



UNIVERZITET U NIŠU  
TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU



**Stojan S. Mančić**

**NATIVNI SOJEVI NE-SACCHAROMYCES KVASACA IZOLOVANIH  
IZ EPIFITNE MIKROBIOTE VOĆA – ENOLOŠKI POTENCIJAL I  
KINETIKA FERMENTACIJE ŠIRE GROŽĐA PROKUPAC**

Doktorska disertacija

Leskovac, 2025.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF TECHNOLOGY IN LESKOVAC



**Stojan S. Mančić**

**NATIVE STRAINS OF NON-*SACCHAROMYCES* YEASTS ISOLATED  
FROM THE EPIPHYTIC MICROBIOTA OF FRUIT: OENOLOGICAL  
POTENTIAL AND FERMENTATION KINETICS OF PROKUPAC  
GRAPE MUST**

Doctoral dissertation

Leskovac, 2025.

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:

Prof. dr Ivana Karabegović, redovni profesor  
Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu

Naslov:

Nativni sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca izolovanih iz epifitne mikrobiote voća – Enološki potencijal i kinetika fermentacije šire grožđa prokupac

Rezime:

Savremeni koncept proizvodnje vina, kroz pojam mikrobnog teroara otvara prostor za definisanje optimalne kombinacije sorte grožđa i kvasca u cilju proizvodnje regionalno prepoznatljivih, visokokvalitetnih vina. U skladu sa tim, cilj doktorske disertacije bio je izolovanje sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca sa epifitne mikrobiote voća i biljnog materijala vinove loze, definisanje njihovih enoloških karakteristika, kao i određivanje parametara kvaliteta, aromatskog i senzornog profila vina dobijenih od autohtone sorte grožđa prokupac. Ukupno je izolovano 58 izolata kvasaca, od kojih je primenom klaster analize odabrano 17 izolata (*Candida famata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Rhodotorula glutinis* i *Papiliotrema laurentii*) za mikroviniaciju pasterizovane šire prokupac. Na osnovu potencijala stvaranja prijatnih aroma, potrošnje više od polovine šećera u medijumu i proizvodnje glicerola iznad 4 g/L za dalja istraživanja odabrani su sojevi *P. kluyveri* K-1, *M. pulcherrima* K-5 i *H. uvarum* (Kd-2, Š-2 i Šd-1). Odabrani sojevi korišćeni su samostalno i sekvencijalno sa komercijalnim sojem *Saccharomyces cerevisiae* za vinifikaciju na laboratorijskom nivou (7 L). Dobijena vina imala su optimalni kiselinski profil, sadržaj šećera ispod 4 g/L, do 9% niži sadržaj alkohola i 20% viši sadržaj glicerola u odnosu na kontrolni uzorak. GC/MS analizom ukupno je identifikovano 86 isparljivih jedinjenja, od kojih su 29 jedinjenja imala značajnu ulogu u formiranju aromatskog profila vina. Odabrani sojevi proizveli su vina sa intenzivnijom bojom, izraženijom sortnošću i većom aromatskom kompleksnošću. Na osnovu dobijenih rezultata, soj *P. kluyveri* K-1 odabran je za istraživanja u pilot i poluindustrijskim uslovima. Pri ovim uslovima, dobijena vina imala su niži sadržaj isparljive kiselosti (20%) i povećan udeo acetatnih estera, viših alkohola, laktonskih i terpenskih

jedinjenja, uz izraženije voćne i cvetne mirisno note. U cilju industrijske pirmene sprovedena je optimizacija uslova ćelijskog rasta, pri čemu su optimalni uslovi (21,9°C, 184 obrt/min i 48 g/L glukoze) omogućili maksimalan broj vijabilnih ćelija i prinosa biomase soja *P. kluyveri* K-1.

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo  
Naučna disciplina: Prehrambene tehnologije i biotehnologija

Ključne reči: Ne-*Saccharomyces* kvasci, prokupac, HPLC analiza, GC/MS analiza, senzorna analiza

UDK: 663.2 : 663.12 (043.3)

CERIF klasifikacija: T430 – Tehnologija hrane i pića

Tip licencne Kreativne zajednice: **CC BY-NC-ND**

## Data on Doctoral Disseratation

Doctoral Supervisor:	Ivana Karabegović, Full professor University of Niš, Faculty of Technology in Leskovac
Title of Doctoral Dissertation:	Native strains of non- <i>Saccharomyces</i> yeasts isolated from the epiphytic microbiota of fruit: Oenological potential and fermentation kinetics of Prokupac grape must
Abstract:	<p>Modern winemaking approaches introduce the concept of microbial terroir, which provides a structure for determining ideal grape variety-yeast combinations for the development of regionally unique, high-quality wines. In accordance with this concept, the doctoral thesis's goal was to isolate non-<i>Saccharomyces</i> yeast strains from the epiphytic microbiota of fruits and vine plant materials, define their oenological characteristics, and determine the quality, aromatic, and sensory characteristics of wine produced from the indigenous grape variety Prokupac. A total of 58 yeast isolates were isolated, of which 17 isolates (<i>Candida famata</i>, <i>Hanseniaspora uvarum</i>, <i>Pichia kluyveri</i>, <i>Metschnikowia pulcherrima</i>, <i>Rhodotorula glutinis</i>, and <i>Papiliotrema laurentii</i>) were selected for microvinification of pasteurized grape must Prokupac based on cluster analysis. Among these, the strains <i>P. kluyveri</i> K-1, <i>M. pulcherrima</i> K-5, and <i>H. uvarum</i> (Kr-2, Šd-1, and Š-2) were selected for laboratory-scale vinification (7 L) due to their ability to produce pleasant aromas, to consume more than half of the available sugars, and to produce glycerol above 4 g/L. These strains were used in both pure and sequential fermentations with a commercial <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain. The obtained wines had an optimal acid profile, sugar content below 4 g/L, up to 9% lower alcohol content, and 20% higher glycerol content compared to the control. GC/MS analysis identified 86 volatile compounds, of which 29 significantly contributed to the formation of the aromatic profile of wines. Non-<i>Saccharomyces</i> strains enhanced color intensity, varietal typicality, aromatic complexity, and fruity and floral notes. Based on these findings, <i>P. kluyveri</i> K-1 was selected for investigation under pilot and semi-industrial vinification scales. Wines produced under these conditions showed reduced volatile acidity (20%) and increased concentrations of acetate esters, higher alcohols, lactones, and terpenes. Optimization of cell growth conditions for</p>

industrial-scale vinification (21.9 °C, 184 rpm, and 48 g/L glucose) resulted in the maximum viable cell count and biomass yield of the strain *P. kluyveri* K-1.

Scientific Field:  
Specific  
Discipline:

Technological engineering

Food technology and biotechnology

Key words:

Non-*Saccharomyces* yeasts, Prokupac, HPLC analysis, GC/MS analysis, sensory analysis

UDC:

663.2 : 663.12 (043.3)

CRIF  
Classification:

T430 – Food and drink technology

Creative  
Commons  
License Type:

**CC BY-NC-ND**

**Autor:**

**Stojan Mančić**, master inženjer tehnologije  
Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu

**Članovi komisije:**

**prof. dr Bojana Danilović**, predsednik  
Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu

**prof. dr Ivana Karabegović**, mentor  
Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu

**prof. dr Dragan Cvetković, red. prof.**, član  
Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu

**prof. dr Marko Malićanin, vanr. prof.**, član  
Univerzitet u Nišu, Poljoprivredni fakultet u Kruševcu

**prof. dr Sandra Stamenković Stojanović, docent**, član  
Univerzitet u Nišu, Tehnološki fakultet u Leskovcu

**Datum odbrane: 17.03.2026. godine**

## **Zahvalnica**

Ovim putem izražavam svoju iskrenu i duboku zahvalnost svim osobama koje su svojim stručnim znanjem, savetima, podrškom i profesionalnim odnosom doprinele realizaciji ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem svom mentoru, prof. dr Ivani Karabegović, na izuzetnom stručnom vođstvu, nesebičnoj pomoći i kontinuiranoj podršci tokom čitavog procesa istraživanja i izrade rada. Njena posvećenost, dragoceni saveti, strpljenje i podsticaj bili su od presudnog značaja za uspešno sprovođenje istraživanja i završetak ove disertacije.

Zahvaljujem se i članovima komisije na pažljivom, detaljnom i konstruktivnom razmatranju rada, kao i na korisnim sugestijama i primedbama koje su značajno doprinele unapređenju njegovog kvaliteta.

Eksperimentalni deo istraživanja realizovan je u laboratorijama Tehnološkog fakulteta u Leskovcu a delimično u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo u Beogradu i vinariji „Marko“ u Bučju. Ova doktorska disertacija izrađena je u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, Programa za finansiranje rada naučnoistraživačkih organizacija, evidencioni broj 451-03-33/2026-03/200133.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DEO.....	5
2.1. Alkoholna fermentacija.....	6
2.1.1. Hemizam alkoholne fermentacije.....	7
2.1.2. Faktori alkoholne fermentacije.....	9
2.1.2.1. Temperatura.....	10
2.1.2.2. Kiseonik.....	11
2.1.2.3. Koncentracija šećera.....	12
2.1.2.4. Etanol.....	12
2.1.2.5. Ugljen dioksid (CO <sub>2</sub> ).....	13
2.1.2.6. pH vrednost.....	13
2.1.2.7. Hranljive materije.....	14
2.1.2.8. Sumpor dioksid (SO <sub>2</sub> ).....	15
2.1.2.9. Ostaci pesticida.....	16
2.2. Tipovi alkoholne fermentacije.....	16
2.2.1. Spontana fermentacija.....	16
2.2.2. Indukovana fermentacija.....	18
2.2.2.1. Mešovita fermentacija.....	19
2.3. Kvasci alkoholne fermentacije.....	21
2.3.1. Životni stadijum razvića kvasca.....	22
2.3.2. Staništa kvasaca.....	23
2.4. <i>Saccharomyces</i> kvasci.....	28
2.5. Ne- <i>Saccharomyces</i> kvasci.....	30
2.5.1. Kvasci roda <i>Hanseniaspora</i> .....	31
2.5.2. Kvasci roda <i>Pichia</i> .....	33
2.5.3. Kvasci roda <i>Torulasporea</i> .....	35
2.5.4. Kvasci roda <i>Metschnikowia</i> .....	36
2.5.5. Kvasci roda <i>Schizosaccharomyces</i> .....	38
2.5.6. Kvasci roda <i>Lachancea</i> .....	39
2.5.7. Kvasci roda <i>Candida</i> .....	41

2.5.8. Ostali rodovi ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca.....	42
2.6. Kriterijumi za odabir kvasaca za upotrebu u vinarstvu.....	42
2.7. Optimizacija proizvodnje biomase.....	44
2.7.1. Primena metode odzivnih površina u optimizaciji procesa .....	46
2.7.2. Izbor faktora .....	47
2.7.3. Izbor eksperimentalnog dizajna.....	47
2.7.4. Matematičko-statistička analiza .....	48
2.7.5. Provera adekvatnosti modela.....	48
2.7.6. Analiza značajnih efekata .....	49
2.7.7. Određivanje optimalnih uslova.....	50
2.8. Autohtone sorte vinove loze.....	50
2.8.1. Prokupac .....	50
3. MATERIJALI I METODE .....	52
3.1. Materijal .....	52
3.1.1. Biljni materijal.....	52
3.1.2. Hemikalije i reagensi .....	52
3.2. Metode.....	53
3.2.1. Izolacija kvasaca.....	53
3.2.2. Određivanje morfoloških karakteristika izolata .....	53
3.2.3. Identifikacija izolata .....	54
3.2.3.1. Biohemijska karakterizacija izolata .....	54
3.2.3.2. Molekularna identifikacija izolata kvasaca.....	54
3.2.3.2.1. Izolovanje ukupne DNK iz izolata kvasaca .....	54
3.2.3.2.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR).....	55
3.2.3.2.3. Horizontalna gel elektroforeza DNK .....	55
3.2.4. Enološke karakteristike izolata kvasaca .....	56
3.2.4.1. Određivanje optičke gustine .....	56
3.2.4.2. Test rasta na različitim temperaturama .....	56
3.2.4.3. Stvaranje CO <sub>2</sub> .....	56
3.2.4.4. Rast pri različitim koncentracijama etanola.....	56
3.2.4.5. Rezistentnost na SO <sub>2</sub> .....	57

3.2.4.6. Brza metoda procene potencijala kvasaca za produkciju prihvatljivih aroma u vinu .....	57
3.2.5. Određivanje karakteristike šire .....	57
3.2.5.1. Određivanje sadržaja šećera .....	57
3.2.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih kiselina .....	58
3.2.5.3. Određivanje pH vrednosti .....	58
3.2.5.4. Određivanje asimilirajućeg azota .....	58
3.2.6. Vinifikacija .....	59
3.2.6.1. Mikrovinifikacija .....	59
3.2.6.2. Vinifikacija na laboratorijskom nivou .....	59
3.2.6.3. Vinifikacija u pilot uslovima .....	60
3.2.6.4. Vinifikacija u poluindustrijskim uslovima .....	61
3.2.7. Fizičko-hemijska analiza vina .....	61
3.2.7.1. Određivanje gustine i specifične težine vina .....	61
3.2.7.2. Određivanje sadržaja alkohola .....	63
3.2.7.3. Određivanje suvog ekstrakta .....	63
3.2.7.4. Određivanje redukujućih šećera .....	64
3.2.7.5. Određivanje ukupne kiselosti .....	64
3.2.7.6. Određivanje sadržaja isparljivih kiselina .....	65
3.2.7.7. Određivanje pH vrednosti vina .....	65
3.2.5.8. Određivanje koncentracije slobodnog SO <sub>2</sub> .....	66
3.2.5.9. Određivanje ukupnog SO <sub>2</sub> .....	66
3.2.7.10. Hromatske karakteristike .....	66
3.2.8. HPLC analiza .....	67
3.2.9. Identifikacija i kvantifikacija aromatskih jedinjenja .....	68
3.2.9.1. Ekstrakcija isparljivih jedinjenja vina dihlormetanom .....	68
3.2.9.2. Kvalitativna analiza isparljivih jedinjenja vina metodom gasne hromatografije-masene spektroskopije (GC/MS) .....	68
3.2.9.3. Kvantitativna analiza isparljivih jedinjenja .....	69

3.2.10. Optimizacija postupka dobijanja biomase soja <i>P. kluyveri</i> K-1 .....	70
3.2.10.1. Priprema inokuluma soja <i>P. kluyveri</i> K-1 .....	70
3.2.10.2. Određivanje ćelijskog rasta soja <i>P. kluyveri</i> K-1 .....	70
3.2.10.3. Jednofaktorska metoda.....	71
3.2.10.4. Plaket-Burman dizajn.....	71
3.2.10.5. Boks-Benken dizajn i metodologija odzivne površine (RSM) .....	72
3.2.11. Senzorna analiza vina .....	73
3.2.12. Statistička obrada podataka .....	73
4. REZULTATI I DISKUSIJA .....	75
4.1 Karakterizacija izolata kvasaca .....	75
4.2 Enološke karakteristike izolovanih sojeva ne- <i>Saccharomyces</i> kvasaca .....	79
4.3. Mikrovinifikacija.....	86
4.3.1. Kinetika alkoholne fermentacije.....	86
4.3.2. Hemijska karakterizacija vina .....	93
4.4. Vinifikacija na laboratorijskom nivou .....	102
4.4.1. Kinetika alkoholne fermentacije.....	102
4.4.2. Fizičko-hemijska analiza uzoraka vina dobijenih u vinifikaciji na laboratorijskom nivou .....	107
4.4.3. Sadržaj organskih kiselina u vinima sorte prokupac dobijenih u vinifikaciji na laboratorijskom nivou.....	113
4.4.4. GC/MS analiza isparljivih aromatskih jedinjenja u vinima sorte prokupac dobijenih u vinifikacijama na laboratorijskom nivou.....	118
4.4.4.1. Viši alkoholi.....	127
4.4.4.2. Estri.....	133
4.4.4.3. Isparljive masne kiseline.....	142
4.4.4.4. Karbonilna jedinjenja.....	144
4.4.4.5. Isparljiva sumporna jedinjenja .....	145
4.4.4.6. Isparljiva fenolna jedinjenja.....	146
4.4.4.7. Terpenska jedinjenja .....	147
4.4.4.8. C <sub>13</sub> -norizoprenoidi .....	148
4.4.4.9. Laktonska jedinjenja .....	149
4.4.5. Mirisna aktivnost i relativni olfaktorni doprinos aromatskih jedinjenja .....	150

4.5. Hromatske karakteristike vina sorte prokupac .....	161
4.5.1. Intenzitet boje .....	162
4.5.2 Nijansa boje .....	164
4.5.3 Hromatska struktura .....	165
4.6. Senzorna analiza vina sorte prokupac dobijenih u laboratorijskim uslovima.....	166
4.6.1. Vizuelna faza senzornog ocenjivanja .....	166
4.6.2. Olfaktorna faza senzornog ocenjivanja .....	168
4.6.3. Gustativna faza senzornog ocenjivanja .....	171
4.7. Vinifikacija u pilot i poluindustrijskim uslovima .....	173
4.7.1. Fizičko-hemijska analiza uzoraka vina dobijenih u vinifikaciji na pilot i poluindustrijskom nivou .....	174
4.7.2. Hemijski sastav uzoraka vina dobijenih u vinifikaciji na pilot i poluindustrijskom nivou .....	177
4.7.3. GC/MS analiza uzoraka vina dobijenih u vinifikaciji na pilot i poluindustrijskom nivou .....	178
4.7.4. Senzorna analiza uzoraka vina dobijenih u vinifikaciji na pilot i poluindustrijskom nivou .....	185
4.8. Optimizacija uslova kultivacije soja <i>P. kluyveri</i> K-1 .....	187
4.8.1. Odabir izvora ugljenika .....	187
4.8.2. Definisane značajnih faktora koji utiču na ćelijski rast soja <i>P. kluyveri</i> K-1 .....	190
4.8.3. Boks-Benken dizajn i RSM optimizacija .....	193
5. ZAKLJUČAK .....	199
6. LITERATURA .....	203
7. PRILOG .....	275

## 1. UVOD

Prema zakonu o vinu „Sl. glasnik RS“ br. 41/2009 i 93/2012, vino se definiše kao poljoprivredno-prehrambeni proizvod, dobijen potpunom ili delimičnom alkoholnom fermentacijom svežeg grožđa, kljuka ili šire od grožđa vinskih sorti vinove loze (1). Proizvodnja vina datira još iz vremena starih civilizacija (oko 6000. godina p.n.e) sa prostora današnjeg Kavkaza i Mesopotamije i predstavlja jednu od najstarijih poznatih grana prehrambene tehnologije (2,3). Vekovima unazad, vino se proizvodilo isključivo spontanom fermentacijom oslanjajući se na prirodnu mikrobiotu prisutnu na bobicama grožđa i površinama u vinskim podrumima (4–6). Tokom spontane alkoholne fermentacije, različiti kvasci tzv. autohtoni kvasci, igraju ključnu ulogu, pri čemu predstavnici rodova *Hanseniaspora* i *Candida* dominiraju u ranim fazama fermentacije. U srednjoj fazi fermentacije, kada koncentracija etanola dostigne oko 3-4% vol., preovladavaju rodovi *Metschnikowia* i *Pichia*. U završnoj fazi uglavnom dominiraju različiti sojevi vrste *Saccharomyces cerevisiae*, koji su otporniji na veće koncentracije etanola. Pored navedenih rodova kvasaca, tokom procesa alkoholne fermentacije mogu biti prisutni i drugi kvasci, poput predstavnika rodova *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* i *Zygosaccharomyces* (3,7). Imajući u vidu ove navode, uobičajna je podela enoloških kvasaca koji učestvuju u alkoholnoj fermentaciji na dve glavne grupe: *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* vrste (8). U dugoj tradiciji vinarstva, ne-*Saccharomyces* kvasci su uglavnom smatrani uzročnicima mikrobiološkog kvarenja vina (9). Takvo shvatanje proisteklo je iz činjenice da su ovi kvasci često bili izolovani iz kontaminiranog vina i da se njihovo prisustvo dovodilo u vezu sa neželjenim aromama, usporenom fermentacijom i stvaranjem nepoželjnih nusprodukata (10,11). Zbog toga su u cilju eliminacije ne-*Saccharomyces* kvasaca iz fermentacionog medijuma u vinarskoj praksi rutinski primenjivane metode poput pasterizacije šire ili dodavanja sumpor dioksida (SO<sub>2</sub>) (2). Međutim, negativna percepcija ovih kvasaca poslednjih godina sve više se menja, zahvaljujući brojnim istraživanjima koja ukazuju na njihove pozitivne doprinose kvalitetu vina. Danas je naučno dokazano da ne-*Saccharomyces* kvasci mogu imati pozitivan uticaj na aromatski i senzorni profil vina, zahvaljujući sposobnosti sinteze širokog spektra poželjnih isparljivih i neisparljivih jedinjenja (6,12–14). Kod pojedinih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca primećena je sposobnost proizvodnje vina sa nižim sadržajem alkohola (15), povećane antioksidativne aktivnosti (16–18) i poboljšane punoće ukusa i mirisa

(19). Međutim, potrebno je naglasiti da većina ne-*Saccharomyces* kvasaca ima slabu fermentativnu sposobnost, što može dovesti do nepotpunog procesa alkoholne fermentacije. Takođe, pojedini sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca mogu proizvoditi neželjene metabolite koji mogu negativno uticati na senzorna svojstva vina (10,20). Zbog toga se u vinarskoj praksi često koristi koinokulacija sa sojevima vrste *S. cerevisiae* što omogućava ne-*Saccharomyces* kvascima da u ranim fazama fermentacije proizvedu poželjne metabolite, ali i omogućava siguran završetak alkoholne fermentacije (2,4,6,21).

U današnje vreme, potrošači sve više vrednuju transparentnost porekla, održivost proizvodnje i minimalnu upotrebu aditiva, iskazujući jasnu potrebu za autentičnim i visokokvalitetnim vinima od autohtonih i regionalnih sorti vinove loze, jedinstvenog ukusa, arome i naglašenog lokalnog karaktera (22–24). Istovremeno, u porastu je potreba za vinima sa smanjenim sadržajem alkohola, što se može posmatrati kao deo šireg trenda usmerenog ka zdravijem načinu života (25,26). U tom kontekstu, fokus je na primeni ne-*Saccharomyces* kvasaca kao starter kultura zbog njihove sposobnosti da utiču na fermentacione tokove, proizvode specifične aromatske metabolite i utiču na smanjenje sadržaja alkohola u vinu (27). Njihova adaptivna raznolikost i metabolička specifičnost doprinose proizvodnji vina sa složenim, ali teritorijalno prepoznatljivim senzornim profilima (24,28). U skladu s tim, potrošači sve više tragaju za takvim vinima koja nude, ne samo visok kvalitet, već i jedinstveno senzorno iskustvo koje oslikava poreklo i mikrobiološki identitet, odnosno mikrobni teroar (9,29).

Koncept mikrobni teroar sve više se prepoznaje kao jedan od ključnih elemenata savremene proizvodnje vina. Ovaj pojam primarno označava mikrobni profil vina, koji ukazuje na njegovo geografsko poreklo, a zavisi od sorte grožđa, klimatskih uslova, pa čak i od mikrobiološkog okruženja same vinarije. Preciznije, mikrobni teroar obuhvata mikrobni fingerprint određenog područja, koji se sastoji od autohtonih kvasaca i bakterija mlečne i sirćetne kiseline, i koji doprinosi formiranju jedinstvenog i autentičnog senzornog profila vina. U tom smislu, identifikacija prisutne mikrobiote i definisanje mikrobnog teroara danas sve više dobija na značaju, jer direktno utiče na autentičnost vina i može biti od koristi u potvrđivanju porekla vina (30).

Sve navedeno ukazuje na značaj izolovanja i karakterizacije autohtonih ne-*Saccharomyces* kvasaca koji mogu odgovoriti na zahteve savremene enologije, kako u pogledu senzornog kvaliteta, tako i u pogledu autentičnosti proizvoda. Posebno značajnu ulogu primena ovih sojeva kvasaca može imati u kombinaciji sa autohtonim sortama grožđa. Imajući u vidu, da je kao jedan od problema u radu sa autohtonim, lokalnim i novostvorenim sortama grožđa nedostatak specifičnih enoloških sredstava i selekcionisanih kvasaca, izolovanje,

karakterizacija, umnožavanje i korišćenje autohtonih kvasaca sa dobrim enološkim karakteristikama može imati presudan značaj u definisanju tehnologije proizvodnje visokokvalitetnih vina od autohtonih sorti u datim rejonima.

Autohtone sorte grožđa u Srbiji predstavljaju dragocen deo vinskog nasleđa i ključne su za očuvanje autentičnog identiteta srpskih vina. Jedna od najpopularnijih autohtonih sorti grožđa u Srbiji je sorta grožđa prokupac. Prokupac predstavlja autohtonu sortu crvenog grožđa, karakterističnu za centralni i južni deo Srbije, sa dugom tradicijom u proizvodnji vina. Vino od ove sorte grožđa ima lako prepoznatljive arome višnje, crne trešnje, suve šljive, crne ribizle, kupine i vrlo često prijatne začinske note. Jedinstven fenolni sastav, sa većim sadržajem antocijana, flavonola, monomera flavon-3-ola i derivata hidroksibenzoeve kiseline doprinosi njegovoj izraženoj antioksidativnoj aktivnosti. Ova sorta, ali i druge autohtone sorte, dobijaju poslednjih godina sve više na popularnosti sa ciljem da se u prvi plan istaknu autohtone, lokalne i davno zaboravljene sorte, a sve u skladu sa potrebama potrošača, ka jedinstvenim i drugačijim vinima specifičnim za određena podneblja (31–34).

Kombinacija autohtone sorte grožđa, kao što je prokupac i lokalno prisutnih autohtonih kvasaca u skladu je sa potrebama modernog vinarstva, koje je, kroz koncept precizne enologije, u stalnoj potrazi za savršenim spojem soja kvasca i sorte grožđa (35,36). S toga je glavni cilj doktorske disertacije bio izolovanje ne-*Saccharomyces* kvasaca iz epifitne mikrobiote voća, uključujući i bobicu, čokot i list vinove loze, definisanje njihovih enoloških karakteristika, kao i određivanje parametara kvaliteta, senzornog i aromatskog profila vina dobijenih od autohtone sorte grožđa prokupac.

U okviru doktorske disertacije specifični ciljevi bili su:

- izolacija i identifikacija ne-*Saccharomyces* kvasaca prisutnih u epifitnoj mikrobioti voća sa teritorije južne Srbije i bobice, čokota i lista vinove loze sorte prokupac sa teritorije centralne Srbije,
- određivanje fermentativnih karakteristika izolata ne-*Saccharomyces* kvasaca,
- praćenje kinetike alkoholne fermentacije šire od sorte grožđa prokupac primenom odabranih vrsta, odnosno sojeva autohtonih ne-*Saccharomyces* kvasaca inokulisanih samostalno i sekvencijalno sa komercijalnim vinskim kvascem *S. cerevisiae*,
- određivanje parametara kvaliteta, aromatskog i senzornog profila dobijenih vina,

- izbor soja ne-*Saccharomyces* kvasca koji je proizveo vino najboljih senzornih i aromatskih karakteristika,
- optimizacija sastava hranjive podloge i uslova dobijanja biomase odabranog soja kvasca i
- provera enoloških karakteristika odabranog soja kvasca u vinifikaciji šire grožđa prokupač na većoj zapremini u odnosu na laboratorijske uslove na osnovu fizičko-hemijskih, aromatskih i senzornih karakteristika dobijenih vina.

## 2. TEORIJSKI DEO

Vinova loza i vino predstavljaju jednu od najstarijih i najznačajnijih povezanih tradicija u istoriji čovečanstva. Potražnja za vinom globalno raste, pod uticajem demografskih, kulturnih i ekonomskih promena, dok istovremeno jačaju i težnje ka očuvanju autentičnosti i regionalnog identiteta u proizvodnji vina. Upravo iz tih razloga, vinogradarstvo i proizvodnja vina ostaju ključne komponente kako agrarne proizvodnje, tako i kulturnog i ekonomskog nasleđa mnogih zemalja (37). Prema podacima Međunarodne organizacije za vino i vinovu lozu (OIV), ukupna svetska površina pod vinogradima iznosi 7,1 milion hektara, uz godišnju proizvodnju vina koja se procenjuje na 225,8 miliona hektolitara (38).

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.), koja pripada porodici *Vitaceae*, jedna je od najranijih kultivisanih biljnih vrsta. Njeno gajenje datira još iz neolitskog i ranog bronzanog doba. Često se označava kao drvo života, zbog svoje simbolike istrajnosti i sposobnosti prilagođavanja (39). Tokom istorije, posebno značajnu ulogu imala je u mediteranskom basenu, gde je vinogradarstvo postalo nerazdvojni deo kulture i ekonomije (37). U novije vreme, zapaža se povratak autohtonih sorti koje su ranije bile potisnute introdukovanim sortama. Ovaj trend ima za cilj očuvanje genetske raznolikosti, lokalne tradicije i regionalne prepoznatljivosti vina, kao i unapređenje održivosti proizvodnje. Na prostoru današnje Republike Srbije, vinova loza ima duboko ukorenjenu tradiciju. Prvi tragovi gajenja potiču još iz gvozdeneog i bronzanog doba, dok je u srednjem veku zahvaljujući uticaju Rimskog carstva, a potom i slovenskih naroda, vinogradarstvo doživelo intenzivan razvoj (39). U srednjovekovnoj Srbiji, vinogradarstvo je zabeležilo značajan napredak zahvaljujući feudalnoj vlasteli i manastirima, na čijim su posedima uzgajani vinogradi. Usled uspostavljanja Osmanlijskog carstva, fokus srpskog vinogradarstva preusmerava se na uzgoj stonih sorti grožđa, uz uvođenje brojnih novih sorti poreklom sa Bliskog istoka. Krajem 19. veka, srpsko vinogradarstvo deli sudbinu ostatka Evrope, suočavajući se sa razornim posledicama širenja filoksere kao štetočine vinove loze, što je dovelo do uništenja velikog broja vinograda. Nakon perioda oporavka, uspostavljeni su novi zasadi, u kojima su dominirale vinske sorte uglavnom uvežene iz Francuske, kao i stonice sorte raznovrsnog porekla (3,39). Danas u Republici Srbiji dominiraju introdukovane sorte poput kaberne sovinjona, merloa, šardonea i sovinjon blanca, koje pokrivaju oko 61% vinogradarskih površina, dok autohtone sorte, poput prokupca, zauzimaju znatno manje površine (40).

Vino predstavlja jedno od najstarijih fermentisanih pića u istoriji čovečanstva. Najraniji zapisi o vinu datiraju pre 4000. godine p.n.e., dok arheološki nalazi potvrđuju proizvodnju vina u

drevnoj Mesopotamiji, Egiptu, Grčkoj i Rimskom carstvu (41–43). Vino se u različitim kulturama doživljava kao simbol prestiža, duhovnosti i kulturnog identiteta, a njegova uloga kroz istoriju prevazilazi okvire običnog prehrambenog proizvoda (3). Prema zakonu o vinu „Sl. glasnik RS“ br. 41/2009 i 93/2012, vino se definiše kao poljoprivredno-prehrambeni proizvod, dobijen potpunom ili delimičnom alkoholnom fermentacijom svežeg grožđa, kljuka ili šire od grožđa vinskih sorti vinove loze (1). Iako se vino proizvodi više hiljada godina, osnovni principi vinifikacije ostali su uglavnom nepromenjeni. Međutim, naučna saznanja o procesu vinifikacije postala su znatno jasnija, što je dovelo do unapređenja vinogradarskih i enoloških praksi (42). Današnji trendovi u vinogradarsko-vinarskom sektoru sve više teže ka održivosti i autentičnosti proizvoda, kroz očuvanje lokalnih i tradicionalnih tehnologija, ali uz paralelno usklađivanje sa zahtevima savremenih potrošača i tržišnih trendova (44). Fokus je na balansiranju između tradicije i inovacije, pri čemu se sve više pažnje posvećuje i uticaju sortnog sastava, agroekoloških uslova i tehnoloških postupaka na senzorna i hemijska svojstva vina. Uprkos složenosti procesa vinifikacije, alkoholna fermentacija predstavlja glavni biohemijski proces koji podrazumeva transformaciju šećera u alkohol i ugljen dioksid (CO<sub>2</sub>), i ima presudan značaj u formiranju aromatskog i senzornog profila vina.

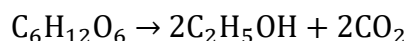
## 2.1. Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija predstavlja najvažniju fazu u procesu vinifikacije. Reč je o složenom biohemijskom i mikrobiološkom procesu tokom kojeg kvasci razlažu šećere šire/kljuka (glukoza i fruktoza) na etanol i CO<sub>2</sub>, uz formiranje niza različitih sekundarnih metabolita kao što su glicerol, organske kiseline, viši alkoholi, estri i druga aromatska i fenolna jedinjenja (45,46). Proces započinje neposredno nakon muljanja grožđa, odnosno ceđenja šire, kada mikrobiota sa pokožice bobica grožđa, pretežno ne-*Saccharomyces* kvasci, dospeva u širu i dolazi u kontakt sa šećerima. Pri povoljnim uslovima, kao što je optimalna temperatura, pH vrednost i dostupnost hranljivih materija, kvasci se intenzivno razmnožavaju i započinju proces alkoholne fermentacije (45). Alkoholna fermentacija u vinifikaciji se odvija u uslovima ograničenog pristupa kiseonika, pri čemu se razgradnja šećera završava formiranjem etanola i CO<sub>2</sub>. U takvim uslovima oslobađa se relativno mala količina energije, zbog čega je neophodno da kvasci fermentišu veće količine šećera kako bi zadovoljili svoje energetske potrebe. Iako je u prisustvu kiseonika izvodljiv aerobni metabolizam, on se u vinifikaciji izbegava kako bi se očuvala koncentracija etanola. Dominantna vrsta kvasca u alkoholnoj fermentaciji vina je *S.*

*cerevisiae*, međutim, brojne druge vrste rodova ne-*Saccharomyces* kvasaca prisutne su u ranim fazama fermentacije. Iako njihova uloga često biva potisnuta tokom burne faze alkoholne fermentacije, ovi kvasci mogu značajno doprineti razvoju specifičnih organoleptičkih svojstava vina, posebno u pogledu kompleksnosti arome i ukusa (46).

### ***2.1.1. Hemizam alkoholne fermentacije***

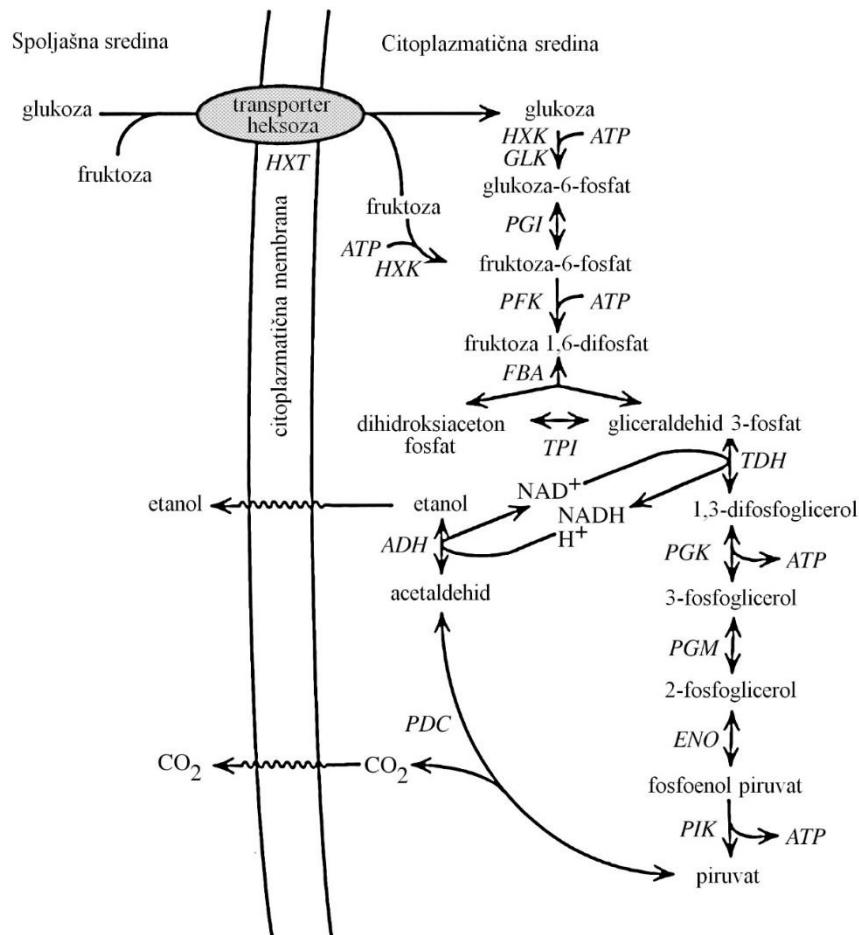
Hemijska osnova procesa alkoholne fermentacije podrazumeva razlaganje šećera od strane kvasca, pri čemu nastaju dva molekula etanola i dva molekula CO<sub>2</sub>. Ovaj proces, opisan kroz Gay-Lussac-ovu jednačinu, predstavlja centralni tok razlaganja šećera do etanola tokom vinifikacije (47).



Alkoholna fermentacija započinje procesom glikolize, tokom kojeg se heksoze (glukoza i fruktoza) razlažu unutar ćelije kvasca do pirogroždane kiseline, pri čemu se oslobađa energija. Glikoliza predstavlja osnovni katabolički put razgradnje šećera kod kvasaca. Pored glikolize, kvasci mogu koristiti i pentozo-fosfatni put, ali ne za proizvodnju energije, već kao izvor redukujućeg koenzima NAD<sup>+</sup>, koji je neophodan za određene metaboličke procese, poput sinteze lipida važnih za deobu ćelija (47).

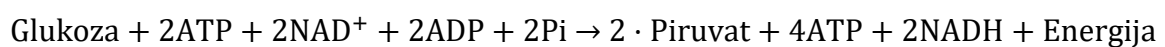
Glikoliza obuhvata jedanaest međusobno povezanih reakcija koje se odvijaju u citoplazmi (slika 2.1). Proces počinje ulaskom heksoza u ćeliju kvasca, gde se fosforilišu pomoću enzima heksokinaze (HXK) ili glukokinaze (GLK), pri čemu se troši ATP. Fosforilacijom nastaju glukoza-6-fosfat i fruktoza-6-fosfat, koji se dalje koriste u glikolizi, ali i u biosintezi jedinjenja koja ulaze u sastav ćelijskog zida. Fruktoza-6-fosfat se fosforiliše pomoću enzima fosfofruktokinaze (PFK), pri čemu nastaje fruktoza 1,6-difosfat. Zatim se fruktoza 1,6-difosfat razlaže na dve trioze (dihidroksiaceton fosfat i glicerolaldehid 3-fosfat) pomoću enzima aldolaze (FBA). Dihidroksiaceton fosfat brzo prelazi u glicerolaldehid 3-fosfat delovanjem enzima triozofosfat izomeraze (TPI). Daljom oksidacijom glicerolaldehid 3-fosfata, pomoću enzima glicerolaldehid 3-fosfat dehidrogenze (TDH), nastaje 1,3-difosfoglicerol i istovremeno se redukuje NAD<sup>+</sup> u NADH. Ova oksidacija je važna za održavanje redoks ravnoteže u ćeliji. Sledeći koraci glikolize uključuju konverziju 1,3-difosfoglicerola u 3-fosfoglicerol pomoću fosfoglicerol kinaze (PGK), čime se stvara ATP. Dejstvom enzima fosfoglicerol mutaze (PGM) 3-fosfoglicerol prelazi u 2-fosfoglicerol, koji se poserdstvom enolaze (ENO) dehidrogenizuje

do fosfoenol piruvata. Enzim piruvat kinaza (PIK) potom koristi ovaj molekul za sintezu dodatnog ATP, uz stvaranje piruvata, odnosno pirogroždane kiseline koja predstavlja konačni proizvod glikolize (48).



Slika 2.1 Proces glikolize (adaptirano prema Boulton i saradnicima (48))

Glikolizom se svaki molekul heksoze razlaže na dva molekula pirogroždane kiseline, četiri molekula ATP i dva molekula NADH. Međutim, pošto se dva molekula ATP odmah utroše, neto energetske bilans glikolize su dva molekula ATP po molekulu heksoze. Ovaj proces predstavlja osnovu za dalje metaboličke puteve u fermentaciji. Opšta hemijska jednačina glikolize može se prikazati na sledeći način (49):



Nakon glikolize, pirogroždana kiselina ulazi u fermentacioni put, gde se pomoću enzima piruvat dekarboksilaze (PDC) pretvara u acetaldehid, uz oslobađanje CO<sub>2</sub>. Acetaldehid se zatim redukuje u etanol pomoću alkohol dehidrogenaze (ADH), pri čemu se NADH oksiduje u NAD<sup>+</sup>, što omogućava nastavak glikolize. Kvasci roda *Saccharomyces* imaju četiri izoenzima ADH (I-IV). ADH-I je glavni enzim u alkoholnoj fermentaciji, dok ADH-II i III reaguju na visok sadržaj šećera u fermentacionom medijumu i učestvuju u anaerobnom metabolizmu etanola. ADH-IV ima nisku aktivnost, a njegova tačna uloga još nije u potpunosti razjašnjena (48). Primarna funkcija proizvodnje etanola u ovom kontekstu jeste održavanje ćelijskog redoks balansa, odnosno obnavljanje NAD<sup>+</sup>, što omogućava neprekidan tok glikolize i kontinuiranu proizvodnju energije pod anaerobnim uslovima (49).

### ***2.1.2. Faktori alkoholne fermentacije***

Šira ili kljuk predstavljaju fermentacione medijume koji obezbeđuju hranljive materije neophodne za proliferaciju i metaboličku aktivnost kvasaca. Efikasnost alkoholne fermentacije uslovljena je kompleksnom interakcijom brojnih faktora, koji obezbeđuju optimalno mikrobiološko i tehnološko okruženje za njen pravilan tok. Ključni uslovi, kao što su adekvatna količina inokuluma, optimalna temperatura i odsustvo inhibitora, omogućavaju pravovremeni početak i stabilan tok fermentacionog procesa. Međutim, različiti inhibicioni faktori mogu značajno narušiti fermentativni kapacitet kvasaca. Ovi faktori mogu biti hemijske (nedostatak esencijalnih hranljivih materija, sinteza toksičnih metabolita), fizičko-hemijske (oscilacije pH vrednosti, visoke koncentracije rastvorenih šećera) ili fizičke (nepovoljna temperatura, stepen aerisanja) prirode. Nepovoljni uslovi menjaju pravilan tok fermentacije, što pogoduje razvoju nepoželjne mikrobiote koja može delovati antagonistički na kvasce, i samim tim negativno uticati na kvalitet vina. Faktori koji utiču na alkoholnu fermentaciju dele se na unutrašnje (hemijski sastav grožđa, šire/kljuka i vina) i spoljne (fizički parametri procesa, poput temperature, prisustva kiseonika i CO<sub>2</sub>). Svako odstupanje od optimalnih vrednosti ovih faktora može rezultirati inhibicijom rasta kvasaca, usporavanjem kinetike alkoholne fermentacije ili prevremenim prekidom procesa, čime se direktno utiče na hemijski sastav i kvalitet vina (49).

### **2.1.2.1. Temperatura**

Temperatura predstavlja jedan od najvažnijih faktora koji direktno utiče na tok alkoholne fermentacije, a samim tim i na konačni kvalitet vina, odnosno na stvaranje sekundarnih metabolita (50). Promenom temperature moguće je značajno menjati brzinu fermentacije, njen kontinuitet i stabilnost, ali i hemijski i senzorni profil vina. Povećanjem temperature unutar biološki prihvatljivih granica dolazi do smanjenja adaptacione faze rasta kvasca, čime se ubrzava početak fermentacije i povećava dinamika metabolizma samog kvasca. Temperatura u rasponu od 15 do 25°C podstiče optimalnu kinetiku fermentacije. Međutim, temperatura iznad 30°C može imati inhibitorno dejstvo na proces alkoholne fermentacije, usled termičkog oštećenja ćelijskih struktura i narušavanja propustljivosti ćelijske membrane kvasca, kao i denaturacije enzima. U takvim uslovima, fermentacija može biti usporena ili prekinuta. Dodatno, nagle temperaturne promene tokom fermentacije, poznate kao temperaturni šok, mogu destabilizovati aktivnost kvasca i predstavljaju rizik za celokupan proces alkoholne fermentacije (49,51).

Optimalni temperaturni uslovi podstiču efikasnu ćelijsku deobu i formiranje mikrobne biomase sposobne da sprovede proces alkoholne fermentacije do kraja. Povišene temperature, naročito tokom eksponencijalne faze rasta, mogu smanjiti vijabilnost ćelija kvasca i povećati njihovu osetljivost na inhibitore poput etanola i masnih kiselina srednjeg lanca (C8 i C10), što dodatno povećava rizik od zaustavljanja fermentacije. Nasuprot tome, niže temperature usporavaju rast kvasca, ali doprinose očuvanju njihove vijabilnosti tokom dužeg perioda, čime se obezbeđuje veća stabilnost procesa alkoholne fermentacije. Ipak, produžena fermentacija pri niskim temperaturama povećava rizik od mikrobioloških problema, iscrpljenja hranljivih materija i nakupljanja inhibitora, što može ugroziti stabilnost i završetak procesa (52).

Metabolička aktivnost kvasca pokazuje izrazitu temperaturnu zavisnost. Umereno povećanje temperature povećava enzimsku aktivnost, pri čemu se tok fermentacije ubrzava i dolazi do povećanja proizvodnje etanola i CO<sub>2</sub>. Ipak, pri temperaturama većim od 30°C enzimi postaju nestabilni, što vodi ka smanjenju prinosa etanola i preusmeravanju metabolizma na formiranje sekundarnih jedinjenja poput glicerola i sirćetne kiseline (51). Promene u temperaturnom režimu direktno se reflektuju i na profil isparljivih aromatskih jedinjenja. Alkoholna fermentacija pri nižim temperaturama (10-15°C) favorizuje sintezu etil estara koji su odgovorni za izražene voćne arome. Nasuprot tome, veće temperature povećavaju sintezu viših alkohola

i acetatnih estara doprinoseći cvetnim i tropskim notama, što rezultira drugačijim aromatskim spektrom vina (53).

#### **2.1.2.2. Kiseonik**

Alkoholna fermentacija se svrstava među anaerobne procese, ali prisustvo kiseonika u određenim fazama ima značajnu ulogu, naročito u pogledu metabolizma kvasaca. Kiseonik, iako nije neophodan za samu sintezu etanola, važan je u početnim fazama fermentacije kada dolazi do intenzivne biosinteze sterola i nezasićenih masnih kiselina (49). U anaerobnim uslovima dolazi do akumulacije zasićenih masnih kiselina srednjeg lanca (C8 i C10), koje imaju toksično dejstvo na kvasce. Prisustvo kiseonika omogućava njihovu konverziju u nezasićene masne kiseline dugog lanca (C16 i C18), koje učestvuju u očuvanju funkcionalnosti ćelijske membrane i omogućavaju efikasan unos šećera i hranljivih materija u ćeliju. Spontana aeracija koja se javlja tokom prerade grožđa često je dovoljna za obezbeđivanje minimalnog nivoa kiseonika (10-20 mg/L) neophodnog za početni razvoj kvasaca. Budući da je u aerobnim uslovima metabolizam kvasca usmeren na sintezu biomase, ciljano aerisanje može dodatno poboljšati vijabilnost ćelija kvasaca, doprineti skraćivanju i stabilnosti procesa alkoholne fermentacije (52). Sa druge strane, odsustvo kiseonika može dovesti do formiranja nepoželjnih jedinjenja, kao što je vodonik sulfid (49). Takođe, prekomerna aeracija, naročito u kasnijim fazama alkoholne fermentacije, dovodi do nakupljanja uree, jedinjenje koje je u direktnoj vezi sa formiranjem toksičnog jedinjenja etil karbamata (54). Zbog toga se aeracija preporučuje isključivo u početnim fazama alkoholne fermentacije, uz mogućnost kombinacije sa dodatkom azotnih jedinjenja, što dodatno stimuliše metaboličku aktivnost kvasaca i sintezu aromatskih jedinjenja (55). Pored toga, na početku alkoholne fermentacije aeracija može imati pozitivan efekat i na stabilnost boje crvenih vina. Naime, oksidacija etanola u prisustvu kiseonika dovodi do povećane sinteze acetaldehida, jedinjenja koje učestvuje u ranom formiranju stabilnih kompleksa između antocijana i tanina, čime se doprinosi očuvanju intenziteta i stabilnosti boje vina (49).

### **2.1.2.3. Koncentracija šećera**

Koncentracija šećera predstavlja još jedan ključni faktor koji direktno utiče na tok i efikasnost alkoholne fermentacije. Kao glavni izvor ugljenika i energije za kvasce, šećeri (glukoza i fruktoza) određuju fermentacionu aktivnost, metabolizam i krajnji prinos etanola. Optimalna koncentracija fermentabilnih šećera omogućava kvascima da efikasno sprovede glikolitičke i fermentativne procese. Proces alkoholne fermentacije se najbolje odvija pri koncentraciji šećera od 15-18% (w/v), i sve do 25% (w/v) se odvija nesmetano. Sa daljim porastom koncentracije šećera u fermentacionom medijumu, proces alkoholne fermentacije počinje kasnije, teče sporije i završava se sa manjom koncentracijom etanola (56). Pri koncentraciji šećera preko 60% (w/v) proces alkoholne fermentacije je praktično nemoguć (49). Visoke koncentracije šećera smanjuju održivost ćelija kvasaca, produžavaju njihovu adaptivnu fazu i povećavaju osetljivost na stresne uslove, kao što je prisustvo etanola (57). Negativni efekat visoke koncentracije šećera prvenstveno se ostvaruje putem osmotskog stresa. Usled razlike u osmotskom pritisku između spoljne sredine (fermentacioni medijum) i unutrašnjosti ćelije kvasca, dolazi do pasivnog gubitka vode iz citoplazme. Polupropustljiva ćelijska membrana omogućava protok vode iz ćelije u hiperkoncentrovani medijum, što izaziva delimičnu plazmolizu, odnosno ćelije postaju dehidrirane, smežurane i funkcionalno oslabljene. Takvo stanje značajno usporava deobu i metaboličku aktivnost kvasaca, a samim tim smanjuje njihovu sposobnost za pretvaranje šećera u etanol (56). Osim što utiče na održivost i metabolizam kvasaca, koncentracija šećera ima direktan uticaj na sintezu brojnih sekundarnih jedinjenja, koja doprinose aromatskom profilu vina. Pri optimalnim uslovima, povećana koncentracija fermentabilnih šećera stimuliše sintezu estara i viših alkohola, koji poboljšavaju senzorna svojstva vina (58).

### **2.1.2.4. Etanol**

Etanol, kao glavni metabolitički proizvod alkoholne fermentacije, ujedno predstavlja i bitan faktor koji značajno utiče na tok i efikasnost fermentacionog procesa. Tokom fermentacije, porast koncentracije etanola u fermentacionom medijumu može dovesti do pojave etanolnog stresa, stanje koje karakteriše smanjena metabolitička aktivnost i održivost ćelija kvasaca. Etanolni stres nastaje kada veće koncentracije etanola počinju da deluju inhibitory na proliferaciju ćelija kvasaca, što se manifestuje usporenim rastom i smanjenom fermentativnom

aktivnošću (59). Čak i pri koncentracijama koje ne izazivaju potpuni prekid alkoholne fermentacije, etanol može ozbiljno ugroziti metabolizam kvasaca (49), pri čemu se, između ostalog, otežava unos asimilirajućeg azota, neophodnog za razmnožavanje ćelija (56).

Mehanizam toksičnog delovanja etanola na ćelije kvasca prvenstveno uključuje narušavanje integriteta i funkcionalnosti citoplazmatične membrane. Etanol razara veze između proteina i lipida u citoplazmatičnoj membrani, čime utiče na njenu propustljivost i fluidnost, a posledično i na transport hranljivih materija i jona (49,60). Pri većim koncentracijama etanola, joni vodonika lakše i brže prodiru kroz citoplazmatičnu membranu dovodeći da povećanja pasivnog toka protona iz spoljne sredine u unutrašnjost ćelija smanjujući pH vrednost. Ukoliko ćelija nije sposobna da održi unutarćelijsku pH ravnotežu, može doći do njene smrti (49).

#### ***2.1.2.5. Ugljen dioksid (CO<sub>2</sub>)***

Uprkos tome što predstavlja nusprodukt alkoholne fermentacije, CO<sub>2</sub> pokazuje inhibitorski efekat na kinetiku fermentacionog procesa, prvenstveno putem negativnog uticaja na metabolizam i fiziološke funkcije ćelija kvasaca. Visoke koncentracije CO<sub>2</sub> u fermentacionom medijumu dovode do smanjenja brzine rasta i održivosti ćelija kvasaca, usporavaju transporta šećera i aminokiselina, čime se ograničava brzina alkoholne fermentacije (61). Mehanizmi odgovorni za ovu inhibiciju još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni, ali se pretpostavlja da CO<sub>2</sub> slobodno prolazi kroz ćelijsku membranu i deluje kao slaba kiselina, narušavajući unutrašnju pH ravnotežu ćelije. U cilju održavanja homeostaze, ćelije aktiviraju energetske zahtevne jonske transportne mehanizme, što dodatno opterećuje ćelijski metabolizam. Ukoliko ne postoji efikasan mehanizam za uklanjanje bikarbonatnih jona, njihova akumulacija u citoplazmi može dovesti do inhibicije enzimske aktivnosti. Osim toga, CO<sub>2</sub> stimuliše unos kalijuma i može direktno uticati na funkcionalnost citoplazmatične membrane, što dodatno doprinosi poremećaju metaboličkih procesa i usporavanju alkoholne fermentacije (62,63).

#### ***2.1.2.6. pH vrednost***

pH vrednost je još jedan od faktora koji značajno utiče na tok alkoholne fermentacije. Većina kvasaca može uspešno sprovoditi alkoholnu fermentaciju u uobičajenom opsegu pH vrednosti koji se javlja u širi i/ili kljuku. Optimalne pH vrednosti za rast i aktivnost kvasaca su između 4

i 6, dok je pH vrednost šire/kljuka uglavnom niža, obično između 2,80 i 3,80. Iako ovaj pH raspon nije idealan, kvasci su uglavnom sposobni da se prilagode i uspešno sprovedu proces i pri nešto nižim pH vrednostima (56). Tokom alkoholne fermentacije, kvasci oslobađaju protone što dovodi do smanjenja pH vrednosti za 0,10-0,30 jedinice (49). Ukoliko pH vrednost padne ispod 2,60, alkoholna fermentacija može biti značajno usporena ili čak potpuno prekinuta, jer tako niska kiselost izaziva hemijski stres u ćelijama kvasaca, narušavajući njihove osnovne metaboličke funkcije. Ovakvi uslovi pogoduju povećanju sadržaja isparljivih kiselina, pre svega sirćetne kiseline, koja pri većim koncentracijama značajno inhibira aktivnost kvasaca, posebno u pokušajima ponovnog pokretanja zaustavljene fermentacije. Sa druge strane, veće pH vrednosti takođe nepovoljno utiču na tok alkoholne fermentacije, ne samo usporavanjem procesa, već i povećanjem stvaranja neželjenih sekundarnih jedinjenja, što se može negativno odraziti na hemijski sastav i kvalitet vina (56). pH vrednost šire i/ili kljuka ima značajan uticaj na sintezu etanola. Optimalna produkcija etanola zapaža se pri pH vrednosti 5, dok niže (pH 3,50) i više (pH 6) pH vrednosti dovode do smanjenog prinosa etanola tokom alkoholne fermentacije (55). Pored toga, pH vrednost posredno utiče i na „čistoću“ alkoholne fermentacije, jer niže pH vrednosti ograničavaju razvoj nepoželjnih mikroorganizama, što doprinosi stabilnijem toku fermentacije i boljoj mikrobiološkoj kontroli (56).

#### **2.1.2.7. Hranljive materije**

Efikasno započinjanje i uspešan završetak alkoholne fermentacije zavisi od niza faktora, među kojima je pravilna ishrana kvasaca od ključnog značaja. U tom kontekstu, azotna jedinjenja predstavljaju najvažniju grupu hranljivih materija koje kvasci koriste za rast i metaboličku aktivnost (56). U najznačajnija azotna jedinjenja prisutna u širi/kljuku ubrajaju se amonijačna jedinjenja, kao i složeniji molekuli poput aminokiselina, oligopeptida, polipeptida, proteina, bioamina, nukleinskih kiselina, pirazina, vitamina i nitrata (64). Ova raznovrsna grupa jedinjenja zajednički se naziva asimilirajući azot (YAN - *Yeast Assimilable Nitrogen*). Njegov sadržaj u širi i/ili kljuku može znatno varirati između 60 i 2400 mg/L i time značajno uticati na sposobnost kvasaca da uspešno sprovede proces alkoholne fermentacije (52).

Za normalan rast i fermentativnu aktivnost kvasaca, smatra se da je neophodan minimalni sadržaj asimilirajućeg azota od 120-140 mg/L (65,66). Koncentracije iznad 400 mg/L dodatno pospešuju rast kvasaca i ubrzavaju proces fermentacije (64). U slučaju nedostatka asimilirajućeg azota, dolazi do usporavanja fermentacije, smanjenja ćelijske aktivnosti i

potencijalnog prekida procesa alkoholne fermentacije (49). Takođe, tada se povećava verovatnoća formiranja nepoželjnih jedinjenja kao što je vodonik sulfid, koji ima negativan uticaj na senzorna svojstva vina (67). Sa druge strane, veće koncentracije asimilirajućeg azota mogu dovesti do prebrze i burne fermentacije (iznad 500 mg/L), što podiže temperaturu u fermentacionom medijumu i može narušiti kvalitet vina. Zaostale količine azotnih jedinjenja nakon alkoholne fermentacije predstavljaju pogodne hranljive materije za mikroorganizme kvarenja, čime se smanjuje mikrobiološka stabilnost vina (49).

Pored toga, uticaj azotnih jedinjenja na kinetiku alkoholne fermentacije zavisi od sadržaja šećera u širi. U slučajevima kada koncentracija šećera ne prelazi 200 g/L, dodatak azotnih materija doprinosi povećanju biomase kvasaca i skraćuje vreme trajanja alkoholne fermentacije. Kod alkoholne fermentacije koja je usporena usled nedostatka asimilirajućeg azota, primena amonijumovih soli često omogućava brz oporavak fermentacije (49). Pored toga, azotna jedinjenja imaju bitnu ulogu i u sintezi viših alkohola i drugih aromatskih aktivnih jedinjenja, koja značajno utiču na senzorni profil vina (68,69).

#### **2.1.2.8. Sumpor dioksid ( $SO_2$ )**

$SO_2$  je jedan od najčešće korišćenih konzervanasa u procesu proizvodnje vina, zahvaljujući njegovim antimikrobnim i antioksidativnim svojstvima. Osim što se dodaje u širu/kljuk ili vino,  $SO_2$  može nastati i kao nusprodukt metabolizma aminokiselina od strane kvasca. U većini slučajeva, endogeno sintetisan  $SO_2$  lako se vezuje za različita karbonilna jedinjenja u ćelijama kvasaca, među kojima su posebno značajni acetaldehid, pirogroždana i  $\alpha$ -ketoglutarina kiselina, što dalje podstiče njihovu biosintezu i potencijalno oslobađanje u širu/kljuku. Zbog toga se koncentracije ovih jedinjenja u vinu često dovode u vezu sa količinom dodatog  $SO_2$ . Vezivanje  $SO_2$  sa ovim jedinjenjima razlog su za povećanje doze sumporisanja, jer vezani  $SO_2$  ne ispoljava antioksidativno i antimikrobno delovanje (49,63).

Uticaj  $SO_2$  na tok alkoholne fermentacije zavisi pre svega od njegove koncentracije. Pri koncentracijama od 15-20 mg/L  $SO_2$  smanjuje održivost ćelija kvasaca i smanjuje njegovu brojnost, što može produžiti adaptivnu fazu, ali ne i ugroziti alkoholnu fermentaciju (63). Međutim, visoke koncentracije  $SO_2$ , naročito iznad 50 mg/L mogu ometati metabolizam ćelija kvasaca utičući na ćelijsko disanje i aktivnost enzima, čime se fermentacija usporava ili potpuno zaustavlja (63,70).

### **2.1.2.9. Ostaci pesticida**

Pesticidi koji se primenjuju u vinogradarstvu imaju negativan uticaj na tok alkoholne fermentacije, pre svega narušavanjem aktivnosti kvasaca, što može rezultirati usporenom ili zaustavljenom fermentacijom, kao i promenama u senzornom profilu vina (71). Među različitim grupama pesticida, fungicidi imaju najizraženiji uticaj na alkoholnu fermentaciju. Njihovo prisustvo u širi/kljuku može izazvati odlaganje početka alkoholne fermentacije, odnosno produženje faze adaptacije kvasaca (lag faza). U većini slučajeva, ovaj efekat se može ublažiti povećanjem količine inokuluma, čime se smanjuje količina fungicida koja dolazi u kontakt sa svakom ćelijom kvasca. Međutim, previsoke koncentracije fungicida mogu u potpunosti sprečiti početak alkoholne fermentaciju (49). Prisustvo fungicida može izazvati strukturne promene u ćelijama kvasaca, uključujući povećanu propustljivost ćelijske membrane i oštećenje ćelijskih organela, što može dovesti do promena u kinetici alkoholne fermentacije. Posebno negativan uticaj ispoljavaju aktivne supstance fungicida na bazi sumpora i hlora, koje ometaju normalan tok fermentacije. Pored toga, jedinjenja iz grupe triazola i imidazola, čiji je mehanizam delovanja zasnovan na inhibiciji biosinteze ergosterola kod fitopatogenih gljiva, mogu imati sličan štetan efekat na kvasce. Kao posledica toga, alkoholna fermentacija može postati neefikasna, uz potencijalno negativne organoleptičke posledice po vino (72). Za razliku od fungicida, herbicidi i insekticidi nemaju značajan uticaj na kvasce, pa samim tim ni na alkoholnu fermentaciju (73).

## **2.2. Tipovi alkoholne fermentacije**

### **2.2.1. Spontana fermentacija**

Izraz „spontana fermentacija“ označava proizvodnju vina bez primene selekcionisanih mikrobnih starter kultura, pri čemu se tok alkoholne i jabučno-mlečne fermentacije prepušta aktivnostima prirodno prisutne mikrobiote, koja uključuje bakterije, kvasce i druge gljive prisutne na grožđu, transportnim sredstvima i/ili u proizvodnom pogonu (74).

Spontana fermentacija može rezultirati vinima visokog kvaliteta sa izraženim regionalnim karakterom, što omogućava razlikovanje proizvoda i dodatnu komercijalnu vrednost na izrazito konkurentnom tržištu. Međutim, oslanjanje na „prirodan tok“ fermentacije smanjuje

predvidljivost procesa, što može dovesti do usporavanja ili prekida alkoholne fermentacije, kao i do raznolikosti u kvalitetu vina (75).

Proces spontane fermentacije otpočinju ne-*Saccharomyces* kvasci, nakon čega se javljaju *Saccharomyces* kvasci koji uobičajno preuzimaju, vode i završavaju alkoholnu fermentaciju do kraja. Broj *Saccharomyces* kvasaca na samom početku alkoholne fermentacije nije visok, zbog čega dolazi do razvoja ne-*Saccharomyces* kvasaca. Ne-*Saccharomyces* kvasci sa početka fermentacije, mogu stvoriti i ostaviti niz sekundarnih metabolita, doprinoseći raznolikosti aromatskog profila vina (49). Kvasci roda *Hanseniaspora*, koji najčešće dominiraju u ranim fazama spontane fermentacije šire i/ili kljuka, poznati su po sposobnosti sinteze acetatnih estara, jedinjenja odgovornih za izražene cvetne note. Takođe, predstavnici roda *Metschnikowia* doprinose povećanim koncentracijama estara i viših alkohola, što ukazuje na njihov potencijalni tehnološki značaj u modifikaciji i obogaćivanju aromatskog profila vina (76). Kvasci roda *Candida* stvaraju više glicerola i prijatne voćne estre (77). Populacije *Saccharomyces* kvasaca sa epifitne mikrobiote su heterogene i najčešće ih čini više vrsta i sojeva. Od ukupne populacije *Saccharomyces* kvasaca, dominantni i u najvećem broju su zastupljeni sojevi vrste *S. cerevisiae*. Pored kvasaca, bakterije prisutne tokom spontane fermentacije mogu doprineti povećanju sadržaja glicerola, kao i smanjenju ukupnog SO<sub>2</sub> i acetaldehida. Važno je napomenuti da ovi mikroorganizmi poseduju visok stepen prilagodljivosti na specifične uslove sredine, što predstavlja jedan od ključnih faktora u izražavanju regionalnog karaktera vina, odnosno teroara (49,76).

Termin teroar tema je diskusije u vinskim zajednicama širom sveta. Ovaj termin, koji potiče iz Francuske, široko je prihvaćen među vinarima i potrošačima vina, kako bi se istakla posebnost i jedinstvenost karakteristika koje proističu iz specifičnih uslova određenog vinogradarskog regiona. Teroar obuhvata jedinstvenu kombinaciju prirodnih i ljudskih faktora koji oblikuju senzorna i tehnološka svojstva vina (78). On uključuje faktore kao što su klima, zemljište, topografija, genetika vinove loze, mikrobna populacija i primenjene vinogradarske i enološke prakse koje zajedno doprinose posebnosti i kvalitetu vina. Teroar je složen koncept, jer ima ključnu ulogu u formiranju stila, ukusa i karaktera vina (79). U svakom fermentacionom procesu, uticaj native mikrobiote je izuzetno važan (80), jer doprinosi izraženijim regionalnim karakteristikama vina, koja dobijaju sve veću pažnju među potrošačima (81). Nativni sojevi kvasaca prisutni u određenim vinogradarskim regionima deo su mikrobnog diverziteta konkretnog regiona i ključni su za formiranje jedinstvenog regionalnog karaktera vina (75). S obzirom na važnost sastava native mikrobiote, termin mikrobni teroar dobija na važnosti (28). Mikrobni teroar je definisan kao prepoznatljiv nativni mikrobiom geografskog, odnosno

vinogradarskog regiona i njegov uticaj na kvalitet i organoleptičke karakteristike vina je veoma značajan, jer doprinosi regionalnoj prepoznatljivosti i stilu vina, što trenutno ima bitnu ulogu u raznovrsnosti i konkurentnosti na svetskom tržištu (81,82). Sve je više dokaza da mikrobnii teroar predstavlja karakterističan mikrobiološki fingerprint određenog vinogradarskog regiona (81). Faktori kao što su klima, geografsko područje, zemljište i okolni biodiverzitet utiču na stvaranje jedinstvenog mikrobnog teroara u svakom vinogradarskom regionu (83).

Zbog raznolikosti epifitne mikrobiote u različitim godinama berbe, vina dobijena primenom spontane alkoholne fermentacije se iz godine u godinu razlikuju po hemijskom sastavu i karakteristikama i ne mogu biti standardnog, odnosno ujednačenog kvaliteta. Danas se smatra da se aktivnošću različitih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca stvara dosta poželjnih sekundarnih metabolita koji pozitivno utiču na kvalitet budućih vina. Kao potvrda za to može biti činjenica da se danas proizvode komercijalni preparati selekcionisanih sojeva *Saccharomyces* kvasaca, sa kojim se unose i ne-*Saccharomyces* kvasci. Nekada se čak u prvoj fazi inokulišu komercijalni preparati ne-*Saccharomyces* kvasaca, nakon čega se vrši sekvencijalna inokulacija sa rodom *Saccharomyces* kvasaca (77).

### **2.2.2. Indukovana fermentacija**

Za razliku od spontane fermentacije, indukovana fermentacija omogućava veći stepen kontrole nad fermentativnim tokom. Ovaj pristup rezultira bržim i predvidljivijim procesom, kao i većom ujednačenošću u pogledu kvaliteta vina (75). Na taj način moguće je delimično neutralisati uticaj agroekoloških uslova koji se javljaju između različitih godina berbe, što je posebno značajno imajući u vidu profil potrošača koji preferiraju konstantan kvalitet vina od berbe do berbe. Nasuprot tome, postoje edukovani potrošači, koji su spremni da prihvate varijabilnost organoleptičkih svojstava vina u zavisnosti od klimatskih i drugih faktora specifičnih za konkretnu berbu. Oni prate, odnosno poznaju kvalitet na osnovu godine berbe i na osnovu toga donose zaključke o kvalitetu (49).

Indukovana alkoholna fermentacija korisna je u situacijama kada je spontana fermentacija otežana. Ograničenja mogu proisteći iz više razloga, uključujući slabu održivost epifitne mikrobiote grožđa, niske temperature fermentacije koje zahtevaju primenu kriotolerantnih sojeva, prisustvo toksičnih jedinjenja za kvasce, visoke koncentracije šećera i/ili etanola u širi/kljuku i vinu, kao i dominaciju neželjenih kvasaca koji poseduju tzv. kiler faktore. Takođe,

postoje specifične enološke potrebe za odabranim sojevima koji proizvode veće količine glicerola ili drugih sekundarnih metabolita, čime se utiče na senzorna svojstva vina (84).

Primena indukovane fermentacije naročito je pogodna u proizvodnji vina namenjenih širokoj potrošnji, gde se zahteva konzistentan kvalitet i efikasan tehnološki proces. Komercijalna dostupnost suvih aktivnih kvasaca značajno je doprinela širenju ovog tipa fermentacije, jer omogućava jednostavnu rehidraciju i inokulaciju kvasaca u širu i/ili kljuk. Na tržištu je prisutan veliki broj komercijalnih sojeva vrste *S. cerevisiae*, odabranih prema različitim kriterijumima, uključujući sposobnost da oblikuju karakter vina u skladu sa tehnološkim zahtevima. Međutim, prisutno je mišljenje da vina dobijena indukovanom fermentacijom pomoću komercijalnih sojeva vrste *S. cerevisiae* mogu imati ograničenu aromatsku kompleksnost. Takva vina se često doživljavaju kao senzorno ujednačena i nedovoljno autentična, što je izazvalo dodatni interes za alternativne sojeve i pristupe fermentaciji koji mogu doprineti većoj raznolikosti u kvalitetu vina (75). Danas je široko prihvaćeno da fermentacije koje uključuju više od jedne vrste kvasca mogu rezultirati vinima boljeg kvaliteta i kompleksnosti, uz niži sadržaj alkohola, dok se mikrobiološka kontrola i dalje uspešno održava. Ovakav tip fermentacije naziva se mešovita fermentacija (85).

### **2.2.2.1. Mešovita fermentacija**

Mešovita fermentacija odnosi se na inokulaciju šire/kljuka sa dve ili više vrste kvasaca. Obično se u mešovitoj fermentaciji kao starter kulture koriste ne-*Saccharomyces* kvasci, dok se nakon nekog vremena zasejavaju komercijalni sojevi vrste *S. cerevisiae*. Postoje dva načina na koja se ne-*Saccharomyces* kvasci inokulišu, istovremeno (koinokulacija) ili uzastopno (sekvencijalna inokulacija). Istovremena inokulacija podrazumeva inokulaciju odabranih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca zajedno sa komercijalnim sojem vrste *S. cerevisiae*, pri čemu *S. cerevisiae* često brzo inhibira njihov rast usled brže potrošnje hranljivih materija i kiseonika, kao i moguće proizvodnje kiler faktora. Zbog toga je u ovom režimu inokulacije potrebno povećati odnos inokuluma u korist ne-*Saccharomyces* kvasaca, kako bi oni imali što značajniju ulogu u početnim fazama alkoholne fermentacije, pre nego što ih nadvladaju komercijalni sojevi vrste *S. cerevisiae*. Sekvencijalna inokulacija podrazumeva inokulaciju prvo jedne vrste kvasca, a kasnije još jedne ili više vrste kvasaca, kako bi se uspostavila dominantna mikrobiota u širi/kljuku. Obično se prvo inokulišu ne-*Saccharomyces* kvasci, a nekoliko dana kasnije, slična količina inokuluma sledi sa komercijalnim sojevima vrste *S. cerevisiae*, jer

fermentativna moć ne-*Saccharomyces* kvasca postepeno slabi. Ovaj sled inokulacije daje pun doprinos ne-*Saccharomyces* kvascima u vinu, a takođe obezbeđuje da se proces alkoholne fermentacije dovede do kraja (86,87). Kontrolisana primena mešovite fermentacije ima brojne prednosti (88) i može predstavljati koristan pristup u proizvodnji vina (tabela 2.1).

Tabela 2.1 Učinak primene različitih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca tokom mešovite fermentacije vina

Vrsta kvasca	Pogodnost	Referenca
<i>Koinokulacija</i>		
<i>Torulaspota delbrueckii/Saccharomyces cerevisiae</i>	Smanjenje koncentracije isparljive kiselosti, povećanje koncentracija C <sub>6</sub> jedinjenja, viših alkohola, estra, terpena i polisaharida	(89,90)
<i>Metschnikowia pulcherrima/S. cerevisiae</i>	Smanjenje koncentracije etanola i isparljive kiselosti, povećanje koncentracije viših alkohola, estra i polisaharida	(89–91)
<i>Lachancea thermotolerans/S. cerevisiae</i>	Smanjenje koncentracije isparljive kiselosti, povećanje koncentracije glicerola, polisaharida i viših alkohola	(89)
<i>Candida zemplinina/S. cerevisiae</i>	Smanjenje koncentracije isparljive kiselosti, povećanje koncentracija glicerola i estra	(89,90)
<i>Pichia anomala/S. cerevisiae</i>	Povećanje koncentracija polisaharida, viših alkohola, estra i masnih kiselina	
<i>Saccharomycodes ludwigii/S. cerevisiae</i>	Povećanje koncentracija glicerola, viših alkohola i estra	(92)
<i>Zygosaccharomyces florentinus/S. cerevisiae</i>	Povećanje koncentracija viših alkohola, estra i masnih kiselina	
<i>Zygosaccharomyces bailii/S. cerevisiae</i>	Povećanje koncentracije estra	(93)
<i>Sekvencijalna inokulacija</i>		
<i>T. delbrueckii/S. cerevisiae</i>	Smanjenje koncentracije etanola i isparljive kiselosti	(94,95)
<i>M. pulcherrima/S. cerevisiae</i>	Smanjenje koncentracije etanola i isparljive kiselosti, povećanje koncentracije viših alkohola i estra	(95,96)
<i>Picha kluyveri/S. cerevisiae</i>	Povećanje koncentracije karbonilnih jedinjenja i estra	(95)
<i>C. zemplinina/S. cerevisiae</i>	Smanjenje koncentracije etanola, povećanje koncentracije glicerola, laktona, terpena i estra	(95,97)
<i>Candida stellata/S. cerevisiae</i>	Smanjenje koncentracije etanola, povećanje koncentracija glicerola i ćilibarne kiseline	(98)
<i>Z. bailii/S. cerevisiae</i>	Smanjenje koncentracije etanola	(94)

Primena mešovite fermentacije ima brojne prednosti, među kojima su:

1. povećana koncentracija glicerola, viši nivo ukupne kiselosti i smanjenje isparljive kiselosti,
2. nastajanje poželjnih aromatskih jedinjenja (estri, ispraljivi tioli),
3. smanjenje koncentracije etanola u vinu,
4. oslobađanje većih količina polisaharida i manoproteina i
5. veća kompleksnost i unaprađen ukupni kvalitet vina.

Odabir vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca za primenu u mešovitoj fermentaciji sa komercijalnim sojevima vrste *S. cerevisiae* predstavlja važan tehnološki faktor, koji može značajno uticati na biohemijske procese tokom fermentacije, a samim tim i na senzorne i hemijske karakteristike vina. Različite vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca ispoljavaju specifične metabolitičke aktivnosti koje se razlikuju u zavisnosti od uslova fermentacije, što rezultira raznovrsnim efektima na krajnji kvalitet vina (8).

### **2.3. Kvasci alkoholne fermentacije**

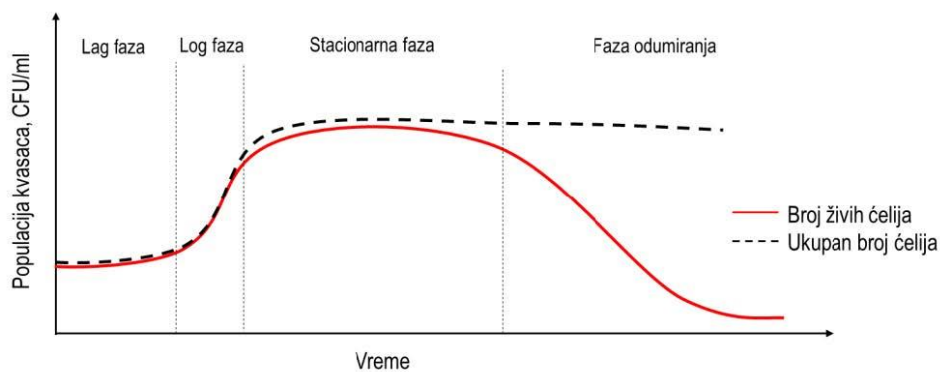
Tokom poslednjih 150 godina, tehnologija vina doživela je značajnu transformaciju zahvaljujući razvoju naučnih saznanja. Ključno otkriće usledilo je 1863. godine kada je Luj Paster dokazao da je alkoholna fermentacija rezultat aktivnosti kvasaca, čime je potvrđena hipoteza da su oni živi mikroorganizmi. Njegova istraživanja oslonila su se na mikroskopska opažanja Anton van Levenhuk, kao i na teorijske doprinose naučnika Kanjara-Latura, Kicinga i Švana. Dalji napredak ostvaren je 1890. godine, kada je Miler-Turgau prvi primenio inokulaciju sa čistim kulturama kvasaca, što je značajno unapredilo kvalitet i stabilnost proizvodnje vina (3).

U taksonomiji, kvasci se definišu kao jednélijske gljive koje se razmnožavaju pupljenjem ili binarnom fisijom. Ova složena i heterogena grupa obuhvata tri klase gljiva, koje se razlikuju prema načinu razmnožavanja: askogljive (*Ascomycetes*), bazidiogljive (*Basidiomycetes*) i nesavršene gljive (*Deuteromycetes*). Kvasci koji se nalaze na površini grožđa i u vinu pripadaju klasama *Ascomycetes* i *Deuteromycetes*. Haploidne spore, odnosno askospore klase *Ascomycetes*, nalaze se u askusu, strukturi nalik kesici koja se formira iz vegetativnih ćelija. Oni kvasci koji ne stvaraju spore i ne vrše seksualnu reprodukciju svrstavaju se u grupu nesavršenih gljiva (52). Budući da su hemoorganotrofi, kvasci koriste organska jedinjenja kao izvor energije i ne zahtevaju sunčevu svetlost za rast. Glavni izvor ugljenika za njih

predstavljaju šećeri heksoze, kao što su glukoza i fruktoza, kao i disaharidi poput saharoze i maltoze (99). Za proizvodnju vina najznačajniji su kvasci roda *Saccharomyces*, pre svega vrsta *S. cerevisiae*, ali se poslednjih godina sve veća pažnja posvećuje i ne-*Saccharomyces* kvascima, među kojima se izdvajaju rodovi *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Torulaspōra*, *Schizosaccharomyces*, *Issatchenkia* i dr.

### 2.3.1. Životni stadijum razvića kvasca

Razvoj kvasaca, naročito tokom alkoholne fermentacije, prolazi kroz nekoliko ključnih stadijuma. Tokom ovog procesa, kvasci ne samo da se razvijaju, već i utiču na okolinu u kojoj se nalaze (56). Životni ciklus razvića kvasca ranije je bio podeljen u sedam faza, uključujući razmnožavanje, intenzivnu fermentaciju, fazu gladovanja i izumiranja, kao i stadijume koji su specifični za određene vrste kvasaca, kao što su obrazovanje spora i rast u oksidativnim uslovima. Ipak, danas se smatra da se životni ciklus kvasaca može podeliti na četiri glavne faze: adaptaciju (lag faza), eksponencijalni rast (log faza), stacionarnu fazu i fazu izumiranja (deklirajuća faza) (slika 2.2) (49).



Slika 2.2 Promena broja ćelija kvasaca tokom alkoholne fermentacije (77)

Lag faza predstavlja početni period u kojem kvasci prilagođavaju svoje metaboličke procese na nove uslove u fermentacionom medijumu. U ovoj fazi dolazi do povećanja zapremine ćelija, a ne dolazi do značajnog povećanja broja novonastalih ćelija (100).

Nakon što kvasci uspešno prebrode lag fazu, prelaze u log fazu, u kojoj počinje eksponencijalan rast populacije. U ovom stadijumu, kvasci se brzo razmnožavaju, pri čemu broj životno

sposobnih ćelija raste stabilnim tempom dok uslovi u medijumu omogućavaju njihov dalji rast. U ovoj fazi broj živih ćelija dostiže svoj maksimum (84).

Kao rezultat iscrpljivanja hranljivih materija i povećanja koncentracije toksičnih jedinjenja (etanol) broj ćelija kvasaca prestaje da raste. U stacionarnoj fazi, broj novih ćelija je približno isti broju onih koje izumiru, usled čega populacija kvasaca ulazi u period stagnacije. Tokom ovog stadijuma, dolazi do odumiranja ćelija zbog stresa izazvanog povećanom koncentracijom toksičnih jedinjenja u medijumu. Nakon stacionarne faze, uslovi postaju nepovoljni za dalji rast kvasaca, što vodi u fazu izumiranja. U ovoj fazi, broj ćelija kvasaca koje izumiru prevazilazi broj novonastalih ćelija. Ovaj stadijum obuhvata smanjenje broja živih ćelija, a na kraju ćelije umiru ili prelaze u dormatno stanje, usled nedostatka osnovnih hranljivih materija i povećanja koncentracija toksičnih jedinjenja u medijumu (49).

Za efikasan proces alkoholne fermentacije, bitna je početna koncentracija inokuluma kvasaca u fermentacionom medijumu. Koncentracija ćelija kvasaca izražava se kao CFU/mL (Eng. *Colony Forming Units per milliliter*). Veći broj ćelija na početku fermentacije obezbeđuje brži prelaz kroz lag fazu, čime se skraćuje ukupno trajanje procesa. Preporučena početna koncentracija je oko  $10^6$  CFU/mL, a tokom log faze broj ćelija može dostići do oko  $10^8$  CFU/mL, što je ekvivalentno biomasi oko 6-8 g/L. Ako broj ćelija u početnoj fazi fermentacije nije dovoljan, to može usporiti početnu brzinu rasta i povećati rizik od razvoja nepoželjnih mikroorganizama. Sa druge strane, prevelik broj živih ćelija kvasaca može izazvati prebrzu fermentaciju, što dovodi do nakupljanja sporednih proizvoda fermentacije, kao što su viši alkoholi i sumporna jedinjenja, što može negativno uticati na ukus i miris vina. Takođe može doći do bržeg starenja i degeneracije ćelija kvasaca, a time i do nastajanja manjeg broja novih vijabilnih ćelija (77).

### **2.3.2. Staništa kvasaca**

Nativni, odnosno prirodno prisutni sojevi kvasaca, od izuzetnog su značaja za vinarstvo, ne samo zbog svoje prilagođenosti specifičnim agroekološkim uslovima karakterističnim za pojedine vinogradarske regione, već i zbog sposobnosti da značajno utiču na krajnji aromatski profil vina, doprinoseći izražavanju regionalnog karaktera (101).

Kvasci su široko rasprostranjeni mikroorganizmi na kopnu, vodi i vazduhu. Mogu se izolovati iz prirodnih staništa poput lišća, cveća, voća, žitarica, insekata, zemljišta, itd (102). Uopšteno, mikrobiota voća je veoma bogata, i sadrži korisne, patogene i mikroorganizme kvarenja.

Mikrobiota može postojati na površini ploda kao epifitna ili u tkivima kao endofitna mikrobiota (103). Voće je važno stanište za ne-*Saccharomyces* kvasce, zbog visoke koncentracije prostih šećera i niže pH vrednosti (104). Površina svežih, neoštećenih plodova voća naseljena je raznolikom mikrobiotom, pri čemu se brojnost kvasaca kreće od  $10^2$ - $10^6$  CFU/cm<sup>2</sup>. Mnogobrojni faktori, poput sorte voća, faze razvoja i zrelosti voća, podneblja, sezonskih i klimatskih uslova, kao i primene agrotehničkih mera utiču na brojnost populacija kvasaca (105). Nezreli plodovi voća uglavnom sadrže oligotrofne, nefermentabilne vrste kvasaca, koji pripadaju rodovima *Cryptococcus* i *Sporobolomyces*. Tokom sazrevanja ploda, njihov zid (perikarp) postaje mekan što izaziva lokalizovano curenje voćnog soka, koji predstavlja izvor šećera i nutrijenata za kvasce. Shodno tome, povećava se broj i raznovrsnost kvasaca na površini ploda, a brzo rastući kvasci rodova *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia* i *Starmerella* brzo nadmašuju ranije populacije kvasaca. Ovi rodovi imaju ograničenu metabolitičku sposobnost, budući da asimiluju nekoliko prostih šećera. Kako voće počinje da propada (truli), šećeri i mikrobn metaboliti postaju lako dostupni i raznovrsnost populacije kvasaca se dalje povećava. Pored roda *Pichia*, rodovi *Meyerozyma*, *Saturnispora*, *Saccharomycopsis*, *Zygoascus* i *Zygosaccharomyces* postaju dominantni (106). Generalno, raznolikost populacije kvasaca na površini voća povećava se sa sazrevanjem plodova (107). Rod *Saccharomyces* se nalazi u malom broju na površini plodova u različitim fazama njihovog sazrevanja (106). U tabeli 2.2 prikazane su vrste kvasaca koje su izolovane sa površina zrelih plodova voća iz različitih geografskih područja. Kako je prikazano u tabeli 2.2, jasno se može videti da su rodovi kvasaca kao što su *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces* i *Cryptococcus* uglavnom prisutni na površini svežeg voća. Međutim, geografsko područje i vrsta voća utiču na raznolikost vrsta rodova kvasaca.

Izolovanje kvasaca sa ovih površina i njihova primena u fermentaciji vina predstavlja prednost, jer ova mikrobiota, prirodno prisutna na površini voća, kompatibilna sa različitim jedinjenjima prisutnim u plodu, može doprineti proizvodnji vina jedinstvenog kvaliteta (108).

Tabela 2.2 Vrste kvasaca prisutne u epifitnoj mikrobioti različitog voća i geografskog porekla

Izvor	Vrsta	Geografsko poreklo	Vrste kvasaca	Referenca
Grožđe	Rajnski rizling, velšrizling, furmint, lipovina, moravski muskat, palava, pino blanc, pino gri, gruner veltliner, kaberne sovinjeno, frankovka, merlo i pino noir	Slovačka	<i>Candida magnoliae</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida saitoana</i> , <i>Cryptococcus diffluens</i> , <i>Cryptococcus magnus</i> , <i>Hanseniaspora uvarum</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Kazachstania exigua</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>M. pulcherrima</i> , <i>Rhodotorula glutinis</i> , <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	(109)
	Zinfandel, kaberne sovinjon, šenin blanc, sovinjon blanc i širaz	Indija	<i>Candida azyma</i> , <i>Candida quercitrusa</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Hanseniaspora guilliermondii</i> , <i>Hanseniaspora vineae</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>I. orientalis</i> , <i>Issatchenkia terricola</i> , <i>Pichia membranifaciens</i> , <i>Zygoascus steatolyticus</i> , <i>S. cerevisiae</i>	(110)
	Tempranilo, kaberne sovinjon	Teksas	<i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>C. magnus</i> , <i>Cryptococcus sp.</i> , <i>Filobasidium sp.</i> , <i>Naganishia globosa</i> , <i>Naganishia albida</i> , <i>Solicoccozyma aerea</i>	(111)
	Kaberne sovinjon	Kipar	<i>A. pullulans</i> , <i>C. magnus</i> , <i>Filobasidium sp.</i> , <i>N. globosa</i>	(112)
	Kaberne sovinjon		<i>A. pullalans</i> , <i>C. magnus</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>R. mucilaginosa</i>	
	Marateftiko		<i>A. pullalans</i> , <i>C. magnus</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>Candida zeylanoides</i> , <i>Candida sake</i> , <i>Pseudozyma aphidis</i>	
	Uva di Troja	Italija	<i>M. pulcherrima</i> , <i>Metschnikowia chrysoperlae</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>Hanseniaspora opuntiae</i> , <i>H. guilliermondii</i> , <i>C. zemplinina</i> , <i>I. orientalis</i> , <i>I. terricola</i> , <i>Kluyveromyces thermotolerans</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>S. cerevisiae</i>	(113)
	Belo grožđe	Indija	<i>A. pullulans</i> , <i>Bensingtonia phyllada</i> , <i>Candida famata</i> , <i>Candida spherical</i> , <i>Filobasidium uniguttulatum</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>R. mucilaginosa</i> , <i>Rhodotorula rubra</i> , <i>Rhodotorula toruloides</i> , <i>S. ludwigii</i> , <i>Zygosaccharomyces lentus</i> , <i>S. cerevisiae</i>	(114)
	Kaberne sovinjon – fermentisana šira	Kina	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> , <i>C. zemplinina</i> , <i>C. stellata</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida oleophila</i> , <i>D. hansenii</i> , <i>H. opuntiae</i> , <i>H. uvarum</i> , <i>H.</i>	(115)

*vineae, Metschnikowia fructicola, M. pulcherrima, Meyerozyma guilliermondii, Cryptococcus flavescens, Pichia kluyveri, Pichia kudriavzevii, Pichia occidentalis, Pichia terricola, R. glutinis, Saccharomycopsis vini, Saturnispora diversa, Starmerella apicola, T. delbrueckii, Wickerhamomyces anomalus, Z. bailii*

	Fudži	Severna Italija	<i>D. hansenii, M. guilliermondii, R. glutinis</i>	(116)
	Zlatni delišes	Severna Italija	<i>H. uvarum, W. anomalus, M. guilliermondii, R. glutinis</i>	
	Jonatan	Jugozapadna Slovačka	<i>Cryptococcus sp., Galactomyces candidus, H. guilliermondi, H. uvarum, M. pulcherrima, P. kluyveri, P. kudriavzevii, P. membranifaciens, Saccharomycopsis crataegensis, W. anomalus, S. cerevisiae</i>	(117)
	Divlja jabuka	Madagaskar	<i>Candida fermentati, C. flavescens, D. hansenii</i>	(118)
Jabuka	Sok od jabuke (Zlatni i crveni delišes, reneta, fudži, greni Smit i gala)	Severna Italija	<i>Candida bentonensis, Candida cylindracea, C. oleophila, Candida railenensis, Stramerella bacillaris, Hanseniaspora pseudoguilliermondii, Hanseniaspora valbyensis, H. uvarum, P. fermentans, Pichia nakasei, P. kudriavzevii, P. membranifaciens, M. guilliermondii, Cyberlindnera misumaiensis, M. fructicola, Metschnikowia sinensis, Moesziomyces bullatus</i>	(119)
	Rana jabuka	Rusija	<i>C. parapsilosis, Filobasidium magnum, Filobasidium wieringae, Dothiora cannabinae, H. uvarum, P. kluyveri, Rhodosporidiobolus colostri, R. glutinis</i>	(120)
	Zlatni delišes	Tunis	<i>A. pullulans, Citeromyces matritensis, Cystobasidium minutum, Nakazawaea siamensis, P. fermentans</i>	(121)
	Sveže isečene jabuke	Španija	<i>M. pulcherrima, H. uvarum, Hanseniaspora osmophila, Hanseniaspora valbeyensis, Candida incommunis, C. sake, Candida glaeboza, C. oleophila, P. fermentans, Saturnispora sp., Cryptococcus carnescens, C. flavescens, Zygorulaspora florentinus, Cystofilobasidium infirmominiatum, M. guilliermondii, R. mucilaginoso</i>	(122)
	-	Indija	<i>A. pullulans, C. famata, Candida guilliermondii, C. spherical, Candida krusei, Cryptococcus albidus, Kluyveromyces lactis, P. membranifaciens, R. rubra, R. toruloides, S. cerevisiae</i>	(114)

Kruška	Abale Fetel	Severna Italija	<i>C. oleophila, M. fructicola, M. guilliermondii, P. kluyveri, R. glutinis</i>	(116)
	Boskova bočica (Kaiser)	Severna Italija	<i>C. oleophila, H. uvarum, M. guilliermondii, P. kluyveri</i>	
	Konferans	Jugozapadna Slovačka	<i>Cryptococcus sp., G. candidus, H. guilliermondi, H. uvarum, M. pulcherrima, P. kluyveri, P. kudriavzevii, P. membranifaciens, S. crataegensis, W. anomalus, Z. bailii, S. cerevisiae</i>	(117)
	Divlja kruška	Madagaskar	<i>C. railenensis, C. flavescens, D. hansenii, P. kluyveri</i>	(118)
	Divlja kruška	Rusija	<i>C. parapsilosis, F. magnum, F. wieringae, D. cannabinae, R. colostri, R. glutinis</i>	(120)
Šljiva	Stenlej	Jugozapadna Slovačka	<i>Candida tropicalis, Cryptococcus sp., G. candidus, H. guilliermondi, H. uvarum, M. pulcherrima, P. fermentans, P. kluyveri, P. kudriavzevii, R. mucilaginosa, S. crataegensis, W. anomalus, S. cerevisiae</i>	(117)
	Crna šljiva	Indija	<i>C. famata, Candida ipomoeae, Candida succiphila, R. mucilaginosa, D. hansenii, Kodamaea anthophila, Pichia lachancei</i>	(123)
Smokva	-	Indija	<i>C. guillarmondii, C. krusei, Cryptococcus victoriae, D. hansenii, Rhodotorula minuta</i>	(114)
Breskva	-	Francuska	<i>Lachancea fermentati, Pichia manshurica, T. delbrueckii</i>	(118)
	-	Tunis	<i>A. pullulans, C. magnus, D. hansenii, Pichia guilliermonde</i>	(121)
Kajsija	-	Tunis	<i>A. pullulans, P. kluyveri</i>	(121)
Pomorandža	-	Tunis	<i>C. albidus, Rhodotorula sp.</i>	(121)
	-	Indija	<i>C. guillarmondii, K. lactis, P. membranifaciens, R. mucilaginosa</i>	(114)
Limun	-	Tunis	<i>M. pulcherrima</i>	(121)
Banana	-	Zapadna Australija	<i>R. glutinis, R. rubra, C. albidus, Cryptococcus laurentii, Cryptococcus uniguttulatus, Cryptococcus neoformans, Candida lusitaniae, C. famata, Candida curvata, Candida guilliermondii, Candida ciferri, Candida silvicola, Candida membranaefaciens, Trichosporon cutaneum, Saccharomyces kluyveri, S. cerevisiae</i>	(124)

## 2.4. *Saccharomyces* kvasci

Rod *Saccharomyces* obuhvata najveći broj vrsta kvasaca važnih za proces alkoholne fermentacije, među kojima se pojedine vrste, s obzirom na svoju metaboličku aktivnost i fermentativni potencijal, mogu smatrati glavnim nosiocima ovog procesa. Čelije kvasaca ovog roda su loptastog, ovalnog ili izduženog oblika. Razmnožavaju se multilateralim pupljenjem. Vegetativna faza je pretežno diploidna. Konjugacija se javlja na ili ubrzo nakon klijanja askospora. Mogu se formirati diploidne askospore, koje su loptaste do kratko elipsoidne, sa glatkim zidom i obično od 1-4 po askusu. Kolonije su svetlo krem boje, puteraste teksture, glatke površine koja je obično ravna, povremno podignuta ili savijena i neprozirna, sa celim ili naboranim rubovima (125).

Vrsta *S. cerevisiae* predstavlja jednu od glavnih vrsta ovog roda. Zahvaljujući visokoj toleranciji na različite stresne uslove, uključujući nisku vrednost pH, osmotski i nutritivni stres, povišene koncentracije etanola, kao i izražen fermentativni potencijal, vrsta *S. cerevisiae* često preuzima dominantnu ulogu u procesu alkoholne fermentacije. Kombinacija ovih osobina čini je izuzetno efikasnim i pogodnim modelom za istraživanja, što ju je dovelo u središte brojnih naučnih otkrića. Posebno je značajno da je vrsta *S. cerevisiae* prvi eukariotski organizam za koji je izrađena sveobuhvatna baza podataka potpune sekvence genoma (126).

Primena vrste *S. cerevisiae* kao starter kultura predstavlja standardnu praksu u proizvodnji vina, koja omogućava kontrolisano i efikasno sprovođenje procesa alkoholne fermentacije (127). Ovakav pristup značajno doprinosi povećanju mikrobiološke stabilnosti procesa, što je ključno za sprečavanje ekonomskih gubitaka tokom proizvodnje vina (8). Ova vrsta ističe se zbog svojih povoljnih bioloških osobina, uključujući kratko vreme razmnožavanja, sposobnost prilagođavanja na različite uslove sredine, visoke efikasnosti sporulacije i niske patogeneze (126). U tabeli 2.3 prikazane su najvažnije enološke karakteristike ove vrste (128,129).

U savremenoj proizvodnji vina se u velikoj meri primenjuju komercijalni sojevi vrste *S. cerevisiae*, kako bi se osigurala ponovljivost procesa fermentacije iz godine u godinu i omogućila proizvodnja vina sličnih senzornih karakteristika (130). Međutim, jedan od ključnih nedostataka primene komercijalnih sojeva ove vrste jeste smanjenje izraženosti regionalnog aromatskog identiteta vina, odnosno karakterističnog senzornog profila koji potiče od specifičnosti sorti grožđa i teroara različitih vinogradarskih regiona širom sveta.

Tabela 2.3 Enološke karakteristike vrste *S. cerevisiae*

<b>Fermentativne karakteristike</b>
Efikasnost asimilacije šećera i azota
Visok stepen iskorišćenja supstrata
Dobra tolerancija na etanol
Dobra rezistentnost na osmotski pritisak
Umerena proizvodnja biomase
<b>Tehnološke karakteristike</b>
Visoka rezistentnost na SO <sub>2</sub>
Manje formiranje pene
Genetička stabilnost
Sposobnost flokulacije
Visoka tolerancija na sušenje
<b>Dodatna metabolička svojstva</b>
Proizvodnja nižih koncentracija isparljivih kiselina
Umerena proizvodnja viših alkohola i estra
Povećanje koncentracije resveratrola
Smanjenje proizvodnje H <sub>2</sub> S
Niska ili nulta proizvodnja biogenih amina
<b>Tehnologija proizvodnje vina</b>
Pojednostavljanje bistenja vina
Kompaktna sedimentacija (za proizvodnju penušavih vina)
Formiranje filma (za proizvodnju voćnih vina)

Iako komercijalno selekcionisani sojevi vrste *S. cerevisiae* poseduju poželjne enološke osobine, oni često ne uspevaju da u potpunosti razviju kompleksne aromatske profile, tipične za određenu sortu grožđa ili vinogradarski region. Dodatni problem predstavlja činjenica da se isti komercijalni sojevi koriste u proizvodnji vina na globalnom nivou, što dovodi do standardizacije senzornog profila vina. Ova pojava je dodatno naglašena time što različiti proizvođači kvasaca često distribuiraju isti soj pod različitim oznakama i komercijalnim nazivima (130). Kao odgovor na ovaj problem, poslednjih godina sve veću primenu nalaze nativni sojevi vrste rodova *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* kvasaca, koji su se pokazali kao efikasan pristup za očuvanje tipičnosti i unapređenje aromatskog kvaliteta vina, naglašavajući jedinstvene karakteristike određenog teroara (8,131).

## 2.5. Ne-*Saccharomyces* kvasci

U prošlosti, *ne-Saccharomyces* kvasci često su bili smatrani nepoželjnim, zbog ograničene fermentativne sposobnosti i povećane proizvodnje neželjenih jedinjenja koja negativno utiču na kvalitet vina. Međutim, novija istraživanja sve više ukazuju na značajnu ulogu ovih kvasaca tokom alkoholne fermentacije, posebno u pogledu njihovog metabolitičkog doprinosa na kompleksnost vina. Primena *ne-Saccharomyces* kvasaca u proizvodnji vina dobija na značaju zahvaljujući njihovoj sposobnosti da oblikuju autentične i raznovrsne aromatske profile, smanjuju sadržaj etanola i regulišu ukupnu kiselost vina, kao i da doprinesu biokontroli neželjene mikrobiote. Ove funkcionalnosti predstavljaju perspektivne biotehnološke strategije usmerene ka unapređenju kvaliteta i raznovrsnosti stilova vina, u skladu sa savremenim zahtevima potrošača i tržišnim trendovima (108,132,133).

*Ne-Saccharomyces* kvasci prisutni u širi i tokom fermentacije vina, mogu se podeliti u tri grupe (134):

1. kvasci koji su uglavnom aerobni (*Pichia* spp, *Candida* spp, *Rhodotorula* spp, *Debaryomyces* spp, i *C. albidus*),
2. apikulatni kvasci sa slabom fermentativnom aktivnošću (*Hanseniaspora occidentalis*, *H. uvarum*, *H. guilliermondii*) i
3. kvasci sa fermentativnim metabolizmom (*M. pulcherrima*, *T. delbrueckii*, *K. marxianus* i *Z. bailii*).

Doprinos *ne-Saccharomyces* kvasaca aromatskom profilu vina zavisi od vrste i koncentracije proizvedenih metabolita. Faktori koji utiču na rast, metabolizam i aktivnost *ne-Saccharomyces* kvasaca određuju obim njihovog uticaja na sintezu i akumulaciju metabolita tokom procesa alkoholne fermentacije. Ovi faktori uključuju karakteristike šire/kljuka (vrednost pH, koncentracija šećera), metode prerade (metod bistrenja, upotreba konzervanasa i/ili SO<sub>2</sub>), uslove fermentacije (temperatura, sadržaj kiseonika/aeracija), kao i koncentracije etanola i uticaj sojeva vrste *S. cerevisiae* (135). *Ne-Saccharomyces* kvasci pokazuju nisku toleranciju na ograničenu dostupnost kiseonika, posebno u poređenju sa vrstom *S. cerevisiae*. Uklanjenje kiseonika brзом fermentacijom od strane sojeva vrste *S. cerevisiae* može doprineti ranom odumiranju nekih vrsta *ne-Saccharomyces* kvasaca (136). Pored toga, veće koncentracije šećera imaju uticaj na pojedine vrste *ne-Saccharomyces* kvasaca, zbog njihove slabe osmotolerancije. Temperatura i SO<sub>2</sub> imaju

izražen uticaj na različite vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca. Vrednosti temperature iznad 25°C mogu nepovoljno uticati na rast i metaboličku aktivnost pojedinih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca, dok smanjenje temperature može podsticati prisustvo ne-*Saccharomyces* kvasaca tokom alkoholne fermentacije, poboljšanjem njihove fermentativne aktivnosti i tolerancije na etanol. Ova promena u mikrobnj dinamiци tokom procesa alkoholne fermentacije rezutira povećanjem koncentracija poželjnih aromatskih jedinjenja koje sintetišu ne-*Saccharomyces* kvasci (137,138). Efikasnost SO<sub>2</sub> zavisi od vrste šire/kljuka, odnosno sorte grožđa i prisutne mirkobiote. Dokazano je da koncentracije SO<sub>2</sub> u opsegu od 50 do 100 mg/L ne utiču na rast ne-*Saccharomyces* kvasaca prilikom fermentacije crvenih vina, ali su ove koncentracije efikasne u fermentaciji belih vina. Suzbijanje osetljivih kvasaca dejstvom SO<sub>2</sub> omogućava da se tolerantniji kvasci, koji su prisutni u manjem broju, bolje razmonožavaju (135). Poznato je da vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca imaju slab fermentativni kapacitet i ne mogu same da završe proces alkoholne fermentacije (139), pa se najčešće primenjuju u mešovitim fermentacijama sa komercijalnim sojevima vrste *S. cerevisiae* (132,140).

### **2.5.1. Kvasci roda *Hanseniaspora***

Kvasci roda *Hanseniaspora* uglavnom se nalaze u zemljištu, na površini voća i drveća, kao i u pokvarenoj hrani i piću (141). Predstavljaju najbrojniju vrstu kvasaca epifitne mikrobiote bobica grožđa (142). Kvasci ovog roda imaju ovalne ili sferične (mlade kulture) i apikulatne ili limunaste oblike ćelija (starije kulture) (143). Podležu vegetativnoj reprodukciji bipolarnim pupljenjem u bazipetalnoj sukcesiji, razvijajući se od vrha prema dole (141). Askospore (1-4 po askusu) su sferne i mogu biti u obliku šešira ili saturna (143). Kolonije roda *Hanseniaspora* mogu da budu bele do krem boje, sa glatkom i sjajnom površinom, izdignute u sredini sa ravnom periferijom (143).

Jedna od glavnih karakteristika vrsta kvasaca ovog roda je niska fermentativna moć, uz toleranciju na etanol od svega 3-5% vol. (6). Vrste kvasaca ovog roda uglavnom su fruktofilne, preferirajući više fruktozu u odnosu na glukozu (144). Tokom procesa alkoholne fermentacije ne proizvode visoke koncentracije isparljivih kiselina i mogu se uporediti sa komercijalnim sojevima vrste *S. cerevisiae* (145). Neke vrste odlikuju se izraženom proteolitičkom enzimskom aktivnošću, što

značajno utiče na proteinski profil, a samim tim i na zamućenost vina (146). Sem toga, poznati su i po glikolitičkoj enzimskoj aktivnosti, prvenstveno po  $\beta$ -ksilozidaznoj i  $\beta$ -glukozidaznoj, koje su značajne u oslobađanju aromatskih jedinjenja iz neisparljivih glikozidovanih prekursora, čime mogu doprineti poboljšanju aromatskog profila vina (141). Takođe, mogu da stabilizuju boju vina (142). Pored toga, vrste ovog roda proizvode široku paletu isparljivih aromatskih jedinjenja u vinu (146), a pokazalo se da se hemijski sastav vina dobijen primenom sojeva roda *Hanseniaspora* razlikuje od vina proizvedenih primenom vrste *S. cerevisiae* (134). Sojevi vrsta *H. uvarum*, *H. vineae*, *H. guilliermondii* i *H. osmophila* se najčešće primenjuju u proizvodnji vina (147).

Vrsta *H. uvarum* fermentiše samo glukozu, ali usvaja glukozu, celobiozu, 2-keto-D glukonat i salicin (146). Ova vrsta smatra se potencijalnim kandidatom za proizvodnju manje koncentracije etanola u vinu, jer je potrebno više od 19 g/L šećera da bi proizveo 1% vol. etanola (148). Sojevi *H. uvarum* poseduju enzimске aktivnosti koje su bitne u proizvodnji vina, zbog njihovih tehnoloških efekata i doprinosa u formiranju aromatskog sastava. Pektinaze, proteaze i glikozidaze su neke od enzimskih aktivnosti koje izlučuju sojevi *H. uvarum*, a koji poboljšavaju bistrenje, stabilizaciju i boju vina (149). Sojevi *H. uvarum* pokazuju visoku  $\beta$ -glukozidaznu aktivnost, i u procesu alkoholne fermentacije njihova sinergistička reakcija sa sojevima vrste *S. cerevisiae* može povećati proizvodnju etil estra masnih kiselina srednjih lanaca, čime se pojačavaju cvetne i voćne arome vina (86). Pored toga, dovode do povećanja koncentracije izoamil acetata, doprinoseći izražavanju voćnih nota vina (150).

Predstavnici vrsta *H. vineae* mogu proizvesti do 10% vol. etanola tokom alkoholne fermentacije (145). Primena sojeva *H. vineae* dovodi do povećanja voćnih i cvetnih aromatskih nota vina, sa povećanom punoćom i dužim trajanjem ukusa u ustima (151). Sojevi *H. vineae* doprinose povećanju koncentracije acetatnih estra (2-feniletil acetat i etil acetat) i terpenskih jedinjenja (108,152). Nekoliko aromatskih jedinjenja kao što su benzil alkohol, benzaldehid, *p*-hidroksibenzaldehid i *p*-hidroksibenzil alkohol javljaju se tokom primene ovih sojeva kvasaca, čime doprinose povećanju kompleksnosti aromatskog profila vina (153,154). Takođe, sojevi *H. vineae* ne proizvodi veću količinu isparljivih kiselina (155).

U vinima proizvedenim primenom sojeva *H. guilliermondii* uočava se dobra ravnoteža između isparljivih i neisparljivih jedinjenja (156), proizvodeći veće koncentracije 2-feniletil acetata, 2-feniletil alkohola, 3-(metiltio) propil acetata i 3-metiltiopropionske kiseline (149).

Sojevi *H. osmophila* mogu da dovedu proces alkoholne fermentacije do kraja, jer imaju toleranciju na etanol preko 11% vol. (157). Sojevi roda *Hanseniaspora* uspešno se implementiraju u mešovitim fermentacijama sa sojevima vrste *S. cerevisiae*, pri čemu su većina istraživanja pokazala pogodnosti ovih sojeva na kvalitet vina, što potvrđuju podaci u tabeli 2.4.

Tabela 2.4 Pogodnosti *Hanseniaspora* spp. tokom mešoviti fermentacija sa vrstom *S. cerevisiae*

Vrsta kvasca	Uzorak i tip fermentacije	Pogodnost	Referenca
<i>H. uvarum</i>	Sorta grožđa malbek Sekvencijalna inokulacija	Smanjenje koncentracije etanola	(148)
	Šira grožđa Koinokulacija (1:1)	Povećanje koncentracije izoamil acetata	(158)
<i>H. guilliermondii</i>	Sorta grožđa bobal Koinokulacija (10:1)	Povećanje koncentracije 2-feniletil acetata	(156)
<i>H. vineae</i>	Sorta grožđa šardone Sekvencijalna inokulacija	Smanjenje koncentracije etanola, povećanje koncentracija glicerola, acetatnih i etil estra	(159)
	Sorta grožđa albilo Sekvencijalna inokulacija	Povećanje koncentracije terpena (linalol, $\beta$ -citronelol, geraniol i $\alpha$ - terpineol)	(160)
	Sorta grožđa vidal blanc Sekvencijalna inokulacija	Povećanje koncentracije C <sub>6</sub> alkohola, viših alkohola, acetatnih estra, cis rose oksida, $\beta$ - damascenona i feniletildlehid	(152)

### 2.5.2. Kvasci roda *Pichia*

Kvasci roda *Pichia* imaju ovalne, elipsoidne ili cilindrične oblike ćelija. Razmnožavaju se vegetativno multilateralim pupljenjem. Pseudomicelijum može biti slabo razvijen ili odsutan. Askospore (1-4 po askusu) mogu izgledati sferično, hemisferično i u obliku šešira ili saturna (161). Kolonije roda *Pichia* mogu biti bele do krem boje, maslaste teksture, mutne i naborane površine (162). Vrste ovog roda spadaju među glavne vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca, koje se istražuju kao potencijalne fermentativne starter kulture u proizvodnji vina (108).

Predstavnici vrste *P. kluyveri* imaju slabu fermentativnu moć, sa tolerancijom na etanol do 5% vol. i sporom kinetikom alkoholne fermentacije (6). Tokom proizvodnje vina doprinose poboljšanju

sastava aromatskih jedinjenja, naglašavajući cvetne i voćne arome, koje doprinose ukupnom senzornom profilu vina, kao i sortnim i tiolnim aromama (163).

Sojevi *P. anomala* tokom procesa alkoholne fermentacije mogu da proizvedu do 4,50% vol. etanola (99). Glavni nedostatak ovih sojeva je veća proizvodnja sirćetne kiseline, koja se može kontrolisati odgovarajućom selekcijom soja. Tokom alkoholne fermentacije sojevi vrste *P. anomala* doprinose povećanju koncentracija estra, posebno 2-feniletil acetata (142). Pored toga, pojedini sojevi vrste *P. anomala* smatraju se dobrim proizvođačima izoamil acetata. Istraživanje je dokazalo da proizvode do 10 puta veću koncentraciju ovog jedinjenja u odnosu na komercijalne sojeve vrste *S. cerevisiae* (164). Izlučivanjem enzima ( $\beta$ -glukozidaze,  $\alpha$ -arabinofuranozidaze,  $\alpha$ -ramnozidaze i  $\beta$ -ksilozidaze), predstavnici vrsta *P. anomala* oslobađaju terpeniska jedinjenja vezana za šećerne jedinice u slobodne aglikone koji poboljšavaju sortnu aromu vina. Pored toga, sojevi *P. anomala* izlučuju i veće koncentracije proteaza, koje sprečavaju mutnoću vina (132).

Sojevi *P. fermentans*, u odnosu na sojeve vrste *S. cerevisiae*, doprinose manjem sadržaju isprljive kiselosti u vinu (165). Veća proizvodnja voćnih etil estra masnih kiselina srednjih lanaca (etil oktanoat) i viših alkohola (2-feniletil alkohol) od strane predstavnika vrste *P. fermentans*, potencijalno je poželjna za poboljšanje aromatskog profila vina (86,166). Sojevi *P. fermentans* doprinose i većim koncentracijama acetaldehida, etil acetata, 1-propanola, n-butanola, etil kaprilata, 2,3-butandiola i glicerola, poboljšavajući kompleksnost vina (165). Pored toga, sojevi ove vrste doprinose još i povećanju sadržaja polisaharida, čime se poboljšava ukus i punoća (telo) vina, i pozitivno utiču na postojanost arome i stabilnost proteina i tartarata (167).

Predstavnici vrste *P. kudriavzevii* pokazuju toleranciju prema etanolu do koncentracije od 6,50% vol. Tokom alkoholne fermentacije proizvode značajne količine estra, viših alkohola i ćilibarne kiseline zajedno sa umerenim koncentracijama sirćetne kiseline i acetaldehida. Pored toga, imaju mogućnost razgradnje jabučne kiseline (166).

Sojevi *P. pastoris*, mogu da prežive celukpan proces alkoholne fermentacije, jer su u stanju da tolerišu uslove u fermentacionom medijumu, odnosno u okruženju sa većom koncentracijom etanola (86). Tabela 2.5 pokazuje pogodnosti sojeva roda *Pichia* u mešovitim fermentacijama.

Tabela 2.5 Pogodnosti *Pichia* spp. tokom mešovutih fermentacija

Vrsta kvasca	Uzorak i tip fermentacije	Pogodnost	Referenca
<i>P. kluyveri</i>	Sorta grožđa kaberne sovinjon Koinokulacija (1:1)	Povećenje koncentracije glicerola i etil acetate, smanjenje konceneracija izoamil alkohola	(168)
	Sorta grožđa sovinjon blanc Koinokulacija (9:1)	Povećanje koncentracije sortnih tiola (3-merkaptohexil acetat)	(169)
<i>P. guilliermondii</i>	Belo grožđe Mešovita fermentacija (koinokulacija (1:1) i sekvencijalan inokulacija)	Povećanje koncentracije vinilfenolnih piranoantocijana (pobljšanje stabilnosti vina)	(170)
<i>P. anomala</i>	Sorta grožđa karinjan Sekvencijalna inokulacija	Povećanje acetatnih i etil estra	(171)

### 2.5.3. Kvasci roda *Torulasporea*

Kvasci roda *Torulasporea* imaju sferne do elipsoidne oblike ćelija. Razmnožavaju se aseksualnom deobom ćelija u multilateralnom pupljenju. Mogu da proizvode pseudohife, ali ne i prave hife. Seksualna reprodukcija se odvija preko askusa, koji sadrži jednu do četiri sferne askospore. Kvasci ovog roda fermentišu glukozu i druge šećere, ali ne usvajaju nitrata (172). Kolonije roda *Torulasporea* su tamno bele boje, sa slabo blistavom površinom i puterastom teksturom (173). Predstavnici vrste *T. delbrueckii* imaju srednju fermentativnu moć (7-10% vol. etanola) (174,175) i dobru osmotoleranciju, pri čemu u uslovima hiperosmotskog stresa proizvode veće koncentracije glicerola i manje koncentracije sirćetne kiseline (166). Uopšteno, sojevi *T. delbrueckii* doprinose manjem sadržaju isparljivih kiselina (142), acetaldehida (176) i acetoina (177) čineći ovu vrstu pogodnom starter kulturom u proizvodnji vina (166). Tokom procesa alkoholne fermentacije proizvode veće koncentracije ćilibarne kiseline (134) i smanjuje sadržaj etanola za oko 1% vol., u odnosu na sojeve vrste *S. cerevisiae* (147). Predstavnik ove vrste karakteriše i visok nivo vanćelijskih enzima, kao što je  $\beta$ -glukozidaza sa uticajem na senzorni profil vina, povećanjem koncentracija C<sub>13</sub>-norizoprenoida, terpena i laktona, kao posledica hidrolize odgovarajućih prekursora (147). Sojevi *T. delbrueckii* pokazuju značajnu sposobnost oslobađanja manoproteina i polisaharida u vinu, što povećava kvalitet vina u pogledu poboljšanja punoće i strukture vina (178). Pored toga, ovi sojevi pozitivno utiču na aromatski sastav vina, jer mogu da proizvedu veće koncentracije estra odgovornih za voćne arome, tiolne i terpenne, uz manju sintezu viših alkohola,

zadržavajući na taj način početni karakter grožđa (172). Tokom alkoholne fermentacije doprinose formiranju 3-etoksi propanola, jedinjenje koje daje note crne ribizle u crvenim vinima (179). U tabeli 2.6 prikazane su pogodnosti sojeva *T. delbrueckii* u mešovitim fermentacijama.

Tabela 2.6 Pogodnosti sojeva *T. delbrueckii* tokom mešovitim fermentacija

Uzorak i tip fermentacije	Pogodnost	Referenca
Sorta grožđa kaberne sovinjon Koinokulacija (10:1)	Smanjenje sadržaja isparljive kiselosti, povećanje koncentracija glicerola, viših alkohola i estra	(180)
Sorte grožđa sovinjon blanc i merlo Mešovita fermentacija (koinokulacija (10:1) i sekvencijalan inokulacija)	Povećanje koncentracije acetatnih i etil estra Povećanje koncentracije etil-3-metilbutanoata, etil heksanoata i etil oktanoata	(181)
Borovnica Sekvencijalna inokulacija	Povećanje koncentracije antocijana, terpena, viših alkohola i estra	(182)
		(183)

#### 2.5.4. Kvasci roda *Metschnikowia*

Kvasci roda *Metschnikowia* tokom razmnožavanja formiraju multilateralne pupoljke, kao i pseudohife. Čelije su sferne do elipsoidne, kao i kruškaste, cilindrične ili u obliku polumeseca. Askusi proizvode jednu do dve igličaste askospore bez završnih dodataka. Kolonije roda *Metschnikowia* mogu da budu bele do krem boje, sa glatkom i svetlucavom površinom, mekane i puteraste teksture, sa blagim ispupčenjem po sredini i sa celim rubovima (184).

Predstavnici vrste *M. pulcherrima* mogu se naći na površini grožđa, voća (sveže i/ili pokvareno), cveta, kao i u nektarima (185). Ova vrsta može da fermentiše glukozu i da usvaja brojne izvore ugljenika i azota (184). Fermentativna moć je slaba, pri čemu mnogi sojevi lako dostižu koncentraciju etanola do 4% vol., mada maksimalna koncentracija može da ide do 7% vol. etanola (185). Sojevi vrste *M. pulcherrima* su jedni od sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca, koji su sposobni da izlučuju više vanćelijskih enzima (pektinaze, proteaze, glukanaze, lihenaze,  $\beta$ -glukozidaze, celulaze, ksilanaze, amilaze, sulfid reduktaze, lipaze i  $\beta$ -liaze) (175,178,185). Njihova visoka proteolitička aktivnost čini ih veoma interesantnim učesnicima u mešovitim fermentacijama sa sojevima vrste *S. cerevisiae*, pošto oslobađanje aminokiselina (uključujući one iz autolize) može

poslužiti kao izvor hranljivih materija za različite sojeve vrste *S. cerevisiae*. Pored toga, njihova intenzivna glikozidazna aktivnost obezbeđuje oslobađanje sortnih aromatskih jedinjenja grožđa hidrolizom vezanih monoterpena (185). Proizvode veoma visoke koncentracije estra, posebno etil acetata i etil oktanoata. Vina proizvedena primenom ovih sojeva imaju intenzivan izražen estarski karakter, gde se ova karakteristika koristiti za intenziviranje arome vina (166). Neki sojevi u stanju su da proizvedu veću koncentraciju 3-merkaptiheksanola, koji je važan za aromu belih vina (186). Pored toga, pojedini sojevi vrste *M. pulcherrima* izlučuju tzv. kisele proteaze koje mogu doprineti povećanju sadržaja asimilirajućeg azota, utičući na aromatski profil vina i smanjujući njegovu zamućenost (187). Sojevi ove vrste pomažu u stabilizaciji boje vina, zbog niske stope apsorpcije antocijana na ćelijski zid i stvaranja stabilnih pigmenata (piranoantocijanina i polimera) (188). Neki sojevi proizvode manje vodonik sulfida tokom procesa alkoholne fermentacije (185). Tabela 2.7 pokazuje pogodnosti sojeva *M. pulcherrima* u mešovitim fermentacijama sa različitim sojevima vrste *S. cerevisiae*.

Tabela 2.7 Pogodnosti sojeva *M. pulcherrima* tokom mešovitih fermentacija sa vrstom *S. cerevisiae*

Uzorak i tip fermentacije	Pogodnost	Referenca
Sorta grožđa merlo Sekvencijalna inokulacija	Smanjenje koncentracije etanola	(189)
Sorte grožđa šardone i semijon i sintetička šira Sekvencijalna inokulacija		(190)
Sorte grožđa šardone i širaz Sekvencijalna inokulacija	Povećanje koncentracije acetatnih i etil estra	(191)

Predstavnici vrste *M. pulcherrima* mogu se koristiti kao biološki kontrolni agensi, zahvaljujući sposobnosti da proizvode prirodna antimikrobna jedinjenja, odnosno pulčerim, nerastvorljiv crveni pigment sa antifugalnim delovanjem. Antimikrobna aktivnost zasniva se na smanjenju koncentracije gvožđa u medijumu, taloženjem  $Fe^{3+}$  jona, koje nastaje interakcijom sa pulčerimskom kiselinom. Na ovaj način, okruženje postaje neprihvatljivo za druge mikroorganizme, kojima je za rast i razvoj potrebno gvožđe. Pulčerim pokazuje efektivnu inhibitornu aktivnost prema sojevima rodova *Candida*, *Brettanomyces/Dekkera*, *Hanseniaspora* i *Pichia*, i gljiva *Botrytis cinerea*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Monilia*. Međutim, sojevi vrste *S. cerevisiae* nisu pod uticajem ove antimikrobne aktivnosti, pa stoga, primena sojeva *M. pulcherrima*

u mešovitim fermentacijama sa ovim sojevima može biti od velikog interesa u proizvodnji vina (60, 97).

### **2.5.5. Kvasci roda *Schizosaccharomyces***

Kvasci roda *Schizosaccharomyces* imaju jedinstvenu morfologiju među rodovima ne-*Saccharomyces* kvasaca i vrlo lako se mikroskopski identifikuju. Čelije roda *Schizosaccharomyces* su pravougaone, za razliku od drugih ne-*Saccharomyces* kvasaca, koji uglavnom imaju sferne ili elipsoidne oblike ćelija (192). Kvasci ovog roda razmnožavaju se binarnom fisijom. Mogu da stvore micelije, a askusi proizvode dve do osam sfernih ili elipsoidnih askospora. Kolonije roda *Schizosaccharomyces* mogu biti sivkaste do svetlo smeđe, odnosno braonkaste boje, sa sjajnom ili mutnom površinom, naborane ili prugaste u središnjem delu sa celim ili vijugavim ivicama (193). Glavna karakterisitika po kojoj se kvasci roda *Schizosaccharomyces* razlikuju od drugih rodova ne-*Saccharomyces* kvasaca je sposobnost da pretvaraju jabučnu kiselinu u etanol i CO<sub>2</sub>. Svaki molekul jabučne kiseline se transformiše u jedan molekul etanola i dva molekula CO<sub>2</sub> (192). Kvasci roda *Schizosaccharomyces* imaju sličnu etanolnu toleranciju poput sojeva vrste *S. cerevisiae* (108). Sojevi roda *Schizosaccharomyces* ne mogu da usvajaju nitrata, ne pokazuju  $\beta$ -glukozidaznu aktivnost, ali ih ističe posebna ureazna enzimska aktivnost. U svojoj ćelijskoj strukturi sadrže polisaharide i jedinjenja ugljenih hidrata koji su jedinstveni među kvascima, kao što su  $\alpha$ -galaktomanoza i  $\beta(1\rightarrow3)$  glukani. Sojevi ovog roda retko se izoluju sa voća, groždanog soka, vina, piva i ostalih fermentisanih pića. Njihovo relativno malo prisustvo u prirodi je zbog prisustva konkurentnih mikroorganizama, koji su sposobni da brže iskorišćavaju nutritijente, kao što su *Saccharomyces* ili ne-*Saccharomyces* kvasci, bakterije i/ili gljive. Međutim, sojevi roda *Schizosaccharomyces* imaju dobru otpornost na osmotski pritisak, pa se iz tog razloga mogu naći u sušenom voću, medu ili koncentrovanim sokovima od grožđa. Tri glavne vrste ovog roda su *Schizosaccharomyces pombe*, *Schizosaccharomyces japonicus* i *Schizosaccharomyces octosporus* (192).

Predstavnici vrste *S. pombe* imaju odličnu fermentativnu moć, proizvodeći etanol u koncentraciji oko 15% vol. (194). Tokom procesa alkoholne fermentacije proizvode sirćetnu kiselinu u rasponu od 0,33 do 0,96 g/L (174), u zavisnosti od primenjenog soja. Sojevi *S. pombe* doprinose većim

koncentracijama acetaldehida, propanola i 2,3-butandiola, sa nižim koncentracijama viših alkohola i estra u vinu (134). Ova karakteristika je veoma interesantna za vina u kojima se želi očuvanje sortnih aroma grožđa (195). Tokom alkoholne fermentacije proizvode veće koncentracije pirogroždane kiseline, promovišući stvaranje vitisin A i vinilfenolnog piranoantocijanina, pigmenta koji pojačavaju stabilnost boje vina (196). Zbog visokog sadržaja  $\alpha$ -galaktomanoze i  $\beta$ -glukana u ćelijskoj strukturi, sojevi *S. pombe* pokazuju sposobnost oslobađanja znatno većih koncentracija polisaharida, čak do 5 puta više u poređenju sa sojevima vrste *S. cerevisiae*. Polisaharidi i sadržaj manoproteina u vinu poboljšavaju senzorne karakteristike vezane za strukturu vina i smanjuju njegovu trpkost (astrignenciju) (194). Pojedini sojevi vrste *S. pombe* mogu ukloniti glukansku kiselinu iz šire/kljuka tokom procesa alkoholne fermentacije. Ova aktivnost omogućava izbegavanje mogućih negativnih posledica koje nastaju od strane glukanske kiseline, kada se nalazi u većim koncentracijama u trulom grožđu (197). Prisustvo ovih sojeva može smanjiti kvarenje vina kroz redukciju sadržaja uree (prekursor etil karbamata, toksično jedinjenje u vinu) pomoću ureazne enzimske aktivnosti (198). Sem toga, smanjuju vreme starenja crvenih vina na talogu, kroz olakšano oslobađanje manoproteina iz ćelijskog zida, zbog njihove brze autolitičke aktivnosti (175,199). Sojevi *S. japonicus* imaju izrazitu fermentativnu moć, do 14% vol. etanola, ali pokazuju sporiju kinetiku alkoholne fermentacije od sojeva vrste *S. cerevisiae*. Predstavnici ove vrste proizvode veće koncentracije glicerola i polisaharida u poređenju sa sojevima vrste *S. pombe*. Proizvodi veće koncentracije 2-feniletil alkohola i izoamil acetata, pozitivno doprinoseći aromatskom profilu vina (194).

### **2.5.6. Kvasci roda *Lachancea***

Kvasci roda *Lachancea* razmnožavaju se aseksualno multilateralim pupljenjem. U nekim prilikama formiraju se pseudohife, ali se prave hife nikad ne formiraju. Polna reprodukcija se odvija formiranjem askusa, koji sadrži jednu od četiri sferne askospore. Kvasci roda *Lachancea* intenzivno fermentišu glukozu i ne usvajaju nitrata (200). Vrsta *L. thermotolerans* je najzastupljenija vrsta ovog roda. Ima sferne do elipsoidne oblike ćelija, a kolonije su krem boje, sa sjajnom površinom i puterastom teksturom (201). Sojevi ove vrste imaju srednju fermentativnu moć i toleranciju na etanol od 5-9% vol. (202). Jedna od glavnih karakteristika je sposobnost

povećanja kiselosti vina, odnosno, sposobnost proizvodnje mlečne kiseline tokom alkoholne fermentacije. Ova sposobnost je od velikog značaja za toplije vinogradarske regione, koji daju grožđe sa niskom kiselošću (200). Istraživanje navodi da proizvodnja mlečne kiseline varira između 0,23 i 9,60 g/L, u zavisnosti od primenjenih fermentativnih uslova (203). Proizvodnja mlečne kiseline smanjuje pH vrednost vina za 0,30-0,50 jedinica (202), što sprečava dodavanje vinske kiseline u slučajevima kada je kiselost šire/kljuka niža od optimalne (142). Pored toga, smanjenje pH vrednosti može pozitivno uticati na boju crvenih vina, povećavajući intenzitet boje antocijana (195). Sojevi *L. thermotolerans* imaju i druge važne enološke karakteristike, kao što je sposobnost smanjenja isparljive kiselosti, proizvodeći između 0,32 i 0,58 g/L sirćetne kiseline, što je u predviđenim granicama za vino (200,204). Pored toga, mogu poboljšati parametre fermentacije koji utiču na kvalitet vina i pozitivno doprinose senzornoj percepciji, kao što je veća proizvodnja poželjenih aromatskih jedinjenja, povećanje koncentracije glicerola, pirogroždane kiseline i polisaharida (200). Tokom alkoholne fermentacije, sojevi *L. thermotolerans* oslobađaju značajne koncentracije isparljivih tiola, (4-merkaptio-4-metiloentan-2-ol i 3-merkaptioheksan-1-ol, 4-metil-4-sulfanilpentan-2-ol i 3-sulfanilheksan-1-ol) koji pozitivno doprinose senzornom karakteru vina (202). Sojevi *L. thermotolerans* ispoljavaju i antifungalno dejstvo, koje može uticati na konačni kvalitet vina. Dokazano je da sojevi ove vrste služe kao efikasna mera kontrole količine ohratoksina A, jer mogu inhibirati njegovo stvaranje, tako što inhibiraju rast orhatoksigenih gljiva (*Aspergillus carbonarius* i *Aspergillus niger*) (205). U tabeli 2.8 prikazane su pogodnosti sojeva *L. thermotolerans* u mešovitim fermentacijama sa različitim sojevima vrste *S. cerevisiae*.

Tabela 2.8 Pogodnosti sojeva *L. thermotolerans* tokom mešovitih fermentacija sa različitim sojevima vrste *S. cerevisiae*

Uzorak i tip fermentacije	Pogodnost	Referenca
Sorta grožđa kaberne sovinjon Koinokulacija (10:1)	Povećanje koncentracije mlečne kiseline	(180)
Sorta grožđa sandoveze Mešovita fermentacija (koinokulacija (10:1) i sekvencijalna inokulacija)	Smanjenje koncentracija etanola i isparljive kiselosti, povećanje koncentracija ukupne kiselosti, glicerola i polisaharida	(204)
Sorta grožđa pino gris Sekvencijalna inokulacija	Smanjenje koncentracije etanola	(206)
Sorta grožđa pino blanc Sekvencijalna inokulacija	Povećanje koncentracija 2-feniletil alkohola, 2-feniletil acetata i dietilsukcionata	(207)

### 2.5.7. Kvasci roda *Candida*

Kvasci roda *Candida* imaju okrugle, elipsoidne, cilindrične ili izdužene, povremeno u obliku polumeseca, šiljaste i/ili trouglaste oblike ćelija. Razmnožavanje se ostvaruje multilateralnim pupljenjem. Kolonije roda *Candida* mogu biti bele, sivkasto bele do žućkaste boje, sa glatkom, sjajnom ili mutnom površinom, mekane i puteraste teksture, naborane ili prugaste u sredini sa celim rubovima. U zavisnosti od vrste kvasca, različiti šećeri mogu biti fermentisani i različiti izvori azota mogu biti asimilovani (208). Veća koncentracija glicerola i relativno manja koncentracija etanola u vinu su najčešće karakteristike vrsta kvasaca ovog roda (97).

Vrsta *C. stellata* ima pozitivan uticaj u proizvodnji vina, zbog svog fruktofilnog karaktera (88), veće proizvodnje glicerola (88,134) i efikasne proizvodnje vanćelijskih enzima, kao što su pektinaze, celulaze, proteaze, glikozidaze itd. (142). Sojevi *C. stellata* tokom procesa alkoholne fermentacije daju umerene koncentracije estra i viših alkohola (166). Takođe, jedna od zanimljivih karakteristika ovih sojeva je sposobnost proizvodnje ćilibarne kiseline (196). Predstavnici vrste *C. zemplinina* su posebno poznati kao dobri proizvođači glicerola, sa koncentracijama koje dostižu čak i 14 g/L (147). Ova vrsta ima fruktofilan karakter (209) i opstaje do srednje faze alkoholne fermentacije, jer može da toleriše umerene koncentracije etanola (210). Pored toga, sojevi ove vrste doprinose povećanju sadržaja terpenkih jedinjenja, kao što su linalol, citronelol, nerolidol i geraniol sa pozitivnim uticajem na aromatsku kompleksnost vina (147). Tabela 2.9 pokazuje pogodnosti različitih sojeva roda *Candida* u mešovitim fermentacijama.

Tabela 2.9 Pogodnosti *Candida* spp tokom mešovitim fermentacija sa vrstom *S. cerevisiae*

Vrsta kvasca	Uzorak i tip fermentacije	Pogodnost	Referenca
<i>C. zemplinina</i>	Sorta grožđa macabeo Koinokulacija (9:1)	Povećanje koncentracija viših alkohola (2-feniletil alkohol i 2-metil-1-propanol) i estra (etil laktat i etil oktanoat)	(149)
	Sorta grožđa barbera Mešovita fermentacija (koinokulacija (1:1) i sekvencijalna inokulacija)	Povećanje koncentracije glicerola, viših alkohola i estra	(211)
<i>C. stellata</i>	Sorta grožđa šardone Mešovita fermentacija (koinokulacija (10:1) i sekvencijalna inokulacija)	Smanjenje koncentracije etanola, povećanje koncentracija glicerola, ćilibarne kiseline i etil acetata	(212)

### **2.5.8. Ostali rodovi *ne-Saccharomyces* kvasaca**

Kvasci roda *Zygosaccharomyces* smatraju se nepoželjnim kvascima u industriji vina i posebno predstavljaju problem kod proizvodnje slatkih i penušavih vina. Bez obzira na to, dokazano je da pojedini sojevi ovog roda ispoljavaju pozitivne karakteristike u proizvodnji vina. Na primer, sojevi *Zygosaccharomyces fermentati* proizvode manje koncentracije sirćetne kiseline, vodonik sulfida i SO<sub>2</sub> i imaju veliku fermentativnu moć. Sojevi *Z. baili* imaju sposobnost razgradnje jabučne kiseline i proizvode vodonik sulfid u malim koncentracijama (135). Pored toga, sojevi ovog roda imaju potencijal za proizvodnju vina sa smanjenim sadržajem etanola, kada se koriste kao pojedinačne starter kulture (191).

Predstavnik vrste *K. thermotolerans* karakteriše veća proizvodnja mlečne kiseline, manja proizvodnjom sirćetne kiseline, umerena proizvodnjom etanola i odsustvo neželjenih aromatskih jedinjenja. Ove karakterisitke čine ovu vrstu kvasca interesantnim za enološka ispitivanja (213).

*S. ludwigii* je manje poznata vrsta *ne-Saccharomyces* kvasca, morfološki prepoznatljiva po ćelijama limunastog oblika većih dimenzija. Sojevi ove vrste se najčešće izoluje iz vina u završnim fazama fermentacije ili tokom perioda skladištenja. Pri većoj brojnosti tokom procesa alkoholne fermentacije, sojevi *S. ludwigii* proizvode značajne količine sekundarnih metabolita, među kojima se ističu izobutil alkohol, acetoin i etil acetat. Pored toga, odlikuju se visokom tolerantnošću na povišene koncentracije etanola i SO<sub>2</sub>, što im omogućava opstanak tokom alkoholne fermentacije (135).

## **2.6. Kriterijumi za odabir kvasaca za upotrebu u vinarstvu**

Izolacija, karakterizacija i odabir nativnih kvasaca iz roda *Saccharomyces* i *ne-Saccharomyces*, predstavlja jedan od bitnih pristupa savremene industrije vina, usmeren na očuvanje i unapređenje autentičnosti vina (214). Izolacija nativnih kvasaca iz različitih vinogradarskih regiona predstavlja veliki značaj za razvoj starter kultura specifičnih za određeni teroar, uz prethodnu primenu metoda za tehnološku karakterizaciju potencijalnih sojeva kvasaca (15). Značaj izolacije, karakterizacije i primene ovih kvasaca ogleda se u njihovoj sposobnosti da doprinesu jedinstvenim organoleptičkim karakteristikama vina, naročito kada se radi o vinima proizvedenim od autohtonih sorti grožđa. Zahvaljujući dobroj adaptaciji na specifične uslove šire ili kljuka koje određuju sorta grožđa i

lokalni teroar, ovi kvasci doprinose prepoznatljivom aromatskom profilu, strukturi i boji vina (215). Savremeni trendovi u vinarstvu dodatno ističu važnost ovakvog pristupa, jer sve više današnjih potrošača zahteva vina sa izraženim regionalnim karakterom i uravnoteženim senzornim profilom, što se lakše može postići fermentacijom uz prisustvo native mikrobiote. Odabir kvasaca sa specifičnim fenotipskim osobinama postaje važan pristup za unapređenje kvaliteta vina sa geografskim poreklom (216). U tom kontekstu, proces selekcije obuhvata identifikaciju kvasaca koji pokazuju visoku fermentativnu sposobnost i mogućnost da obezbede dobar kvalitet vina (217).

Nakon izolacije i karakterizacije kvasaca selekcija sojeva/vrsta adekvatnih za dalji rad, istraživanje i upotrebu obavlja se na bazi unapred definisanih kriterijumima. Ovi kriterijumi predstavljaju osnovu za odabir sojeva/vrsta kvasaca sa optimalnim enološkim karakteristikama (75,87), odnosno sojeva koji obezbeđuju kompletnu fermentaciju i doprinose formiranju uravnoteženog i karakterističnog aromatskog profila vina, čime se obezbeđuje visok kvalitet i tržišna konkurentnost (15,214). Iako se pri odabiru kvasaca u razmatranje mogu uzeti različiti faktori, enološke karakteristike imaju najznačajniju ulogu, jer direktno utiču na tok fermentacionog procesa i konačni kvalitet vina. Ove karakteristike mogu se podeliti na tehnološke i kvalitativne (15). Tehnološke karakteristike obuhvataju niz parametara koji su od suštinskog značaja za efikasnost i stabilnost procesa alkoholne fermentacije. Među najvažnijima su fermentativna snaga i moć, koje određuju sposobnost kvasca da brzo započne fermentaciju i dovede je do kraja čak i u nepovoljnim uslovima sredine, odnosno fermentacionog medijuma (218). Značajna je tolerancija na koncentracije etanola (preko 8% vol.) i otpornost na SO<sub>2</sub> do 200 mg/L (87,218). S obzirom na to da prisustvo sojeva sposobnih za proizvodnju visokih količina SO<sub>2</sub> nije uobičajna, neophodno je odrediti sadržaj SO<sub>2</sub> stvoren tokom alkoholne fermentacije i eliminisati sojeve sa visokom sposobnošću proizvodnje SO<sub>2</sub>, kako bi se izbegle neželjene visoke koncentracije ovog jedinjenja u vinu (219). Pored hemijske otpornosti, važni su i fiziološki parametri rasta u fermentacionom medijumu, kao što je sposobnost sedimentacije, stvaranje zamućenja ili formiranje pene i površinskog sloja (filma), kao i sposobnost rasta na niskim i visokim temperaturama (15). Kod sojeva kvasaca, namenjenih proizvodnji vina, poželjan je tip rasta koji obezbeđuje ravnomerno razvijanje populacije ćelija kvasaca tokom fermentacije uz brzu sedimentaciju ćelija na kraju procesa, dok se formiranje pene smatra izrazito nepovoljnom osobinom, budući da stvara pogodno stanište za razvoj bakterija sirćetne kiseline koje mogu prouzrokovati kvarenje vina (219). Sve ove

osobine mogu značajno varirati između sojeva i vrsta kvasaca, zbog čega je njihova detaljna karakterizacija veoma važna za proces selekcije (217).

Kvalitativne karakteristike odnose se na uticaj kvasaca na hemijski sastav i senzorna svojstva vina. Poželjno je da kvasci proizvode manje koncentracije nepoželjnih jedinjenja, poput sirćetne kiseline i vodonik sulfida, i da imaju sposobnost sinteze široke palete isparljivih aromatskih jedinjenja, koja doprinose kompleksnosti aromatskog profila vina (15). Pored sinteze aromatskih jedinjenja, važnu ulogu imaju i različite enzimске aktivnosti koje doprinose oslobađanju aromatskih jedinjenja i obogaćivanju senzornog profila vina (214). Iako sve ove karakteristike (tehnološke i kvalitativne) mogu varirati u zavisnosti od hemijskog sastava šire i/ili kljuka, sorte grožđa i enoloških postupaka, određeni fenotipski pokazatelji, kao što su visoka fermentativna moć, otpornost na stresne uslove i niska produkcija nepoželjnih jedinjenja, smatraju se univerzalno važnim za odabir starter kultura kvasaca (219).

## **2.7. Optimizacija proizvodnje biomase**

Nakon odabira vrste, odnosno soja kvasaca koji imaju najpovoljnije fermentativne karakteristike, sledeća faza u smislu njihove dalje primene podrazumeva ispitivanje i određivanje komponenti medijuma i optimalnih procesnih uslova za proizvodnju biomase, sa posebnim osvrtom na broj vijabilnih ćelija. Pre industrijske proizvodnje, istraživanja se uobičajeno započinju izvođenjem laboratorijskih eksperimenata, koji pružaju detaljnije informacije o kinetici rasta odabranog soja kvasca, kao i potrebama za hranljivim sastojcima. Na osnovu dobijenih rezultata, proces se zatim postepeno prilagođava za izvođenje u bioreaktorima većih zapremina (220).

Formulisanje sastava medijuma jedan je od najvažnijih koraka u razvoju ovog procesa, jer medijum direktno utiče na ćelijski rast, metabolizam i prinos biomase kvasca. Potrebe za hranljivim sastojcima značajno variraju između vrsta i/ili sojeva kvasaca. Iz tog razloga, optimalan sastav medijuma određuje se eksperimentalno, pri čemu se za početak uzimaju u obzir literaturno dostupne karakteristike ispitivane vrste i/ili soja (221,222). Medijum treba da obezbedi osnovne komponente neophodne za ćelijski rast, kao što su izvori ugljenika i azota, i pojedinih jedinjenja (izvori soli, vitamina, faktori rasta itd.) u odgovarajućim hemijskim oblicima i optimalnim koncentracijama (223). Posebnu ulogu imaju joni metala, koji učestvuju u brojnim biohemijskim reakcijama važnim za rast i metabolizam kvasaca. Oni predstavljaju bitne faktore u sintezi biomase

i očuvanja ćelijske funkcionalnosti. Joni magnezijuma, gvožđa i cinka mogu značajno uticati na aktivnost enzima, sintezu lipida, akumulaciju biomase i ćelijsku održivost (224). Dokazano je da dodatak cinka, bakra i mangana u obliku sulfata u medijumu povećava prinos biomase kvasaca do 30% (225). Pored ovih komponenti, kvasac može zahtevati složene organske molekule koje ne može sintetisati, a koji su esencijalni za adekvatan rast i funkcionalnost ćelija. Medijum može sadržati prekursore i supstrate koji se direktno biotransformišu, kao i specifične inhibitore ili aktivatore enzima, koji regulišu metabolitičke puteve. Čistoća medijuma mora biti strogo kontrolisana, kako bi se sprečila kontaminacija i obezbedila biomasa odabranog soja kvasca (223). Pored sastava medijuma, procesni uslovi kao što su temperatura, vrednost pH, aeracija i veličina inokuluma imaju presudan uticaj na kinetiku rasta i krajnji prinos biomase. Temperatura predstavlja jedan od najvažnijih faktora koji utiče na brzinu ćelijskog rasta, pri čemu rast kvasca dostiže maksimum u okviru optimalnog temperaturnog opsega, dok odstupanja izvan tog intervala dovode do progresivnog smanjenja metabolitičke aktivnosti, a pri veoma niskim ili visokim vrednostima i do potpunog prekida ćelijskog rasta (226). Vrednost pH predstavlja važan faktor koji utiče na ćelijski rast kvasaca. Pri optimalnom opsegu pH (4-6), omogućava se pravilno funkcionisanje enzima i efikasan tok biohemijskih reakcija, dok odstupanja od ovog opsega, izazivaju konformacione promene enzima, poremećaj metabolizma i, u ekstremnijim slučajevima, denaturaciju proteina, što dovodi do inhibicije ćelijskog rasta (227). Aeracija omogućava sintezu sterola i lipida neophodnih za ćelijski rast, dok nedostatak kiseonika smanjuje prinos i povećava oksidativni stres. Iako je kratka aeracija nekad dovoljna, kontinuirano prisustvo kiseonika daje najbolje rezultate na industrijskom nivou (228). Veličina inokuluma utiče na vreme prilagođavanja ćelija kvasaca na uslove okoline (medijuma), pri čemu manja zapremina inokuluma produžava period adaptacije ćelija, dok veća zapremina omogućava brže adaptiranje na uslove okoline i uspostavljanje eksponencijalne faze rasta (229). Zbog toga je od velikog značaja odrediti optimalnu veličinu (zapreminu) inokuluma prilikom skaliranja procesa, kako bi proces bio efikasniji, jednostavniji i ekonomski isplativ. Cilj optimizacije sastava komponenti medijuma i procesnih uslova za ćelijski rast kvasaca jeste maksimiziranje prinosa biomase i dobijanje što većeg broja vijabilnih ćelija u najkraćem mogućem vremenskom periodu, uz minimalne troškove. Proces optimizacije može se unaprediti primenom statističkih metoda, pri čemu se proces definiše matematičkim jednačinama i simulira u softverskim paketima, što omogućava identifikaciju grešaka, optimizaciju faktora i procenu održivosti sistema (230).

### ***2.7.1. Primena metode odzivnih površina u optimizaciji procesa***

Klasična metoda optimizacije, odnosno jednofaktorska optimizacija uključuje promenu jednog po jednog faktora, zadržavajući druge faktore konstantnim. Budući da je ovaj metod jednodimenzionalan, naporan, dugotrajan i da ne sagledava interakciju među faktorima često ne garantuje određivanje optimalnih uslova. Sa druge strane, izvođenje eksperimenata sa svakom mogućom kombinacijom faktora je nepraktično zbog velikog broja potrebnih eksperimenata (231). Kako bi se ova ograničenja prevazišla, često se primenjuju multivarijantne statističke metode, među kojima je jedna od često korišćenih metoda odzivne površine (RSM – *Response surface methodology*) (232). RSM predstavlja skup statističkih i matematičkih metoda, koje su namenjene za analizu uticaja više nezavisnih faktora (ulazne promenljive) na jednu ili više praćenih veličina (zavisne promenljive). Ova metoda omogućava formulisanje matematičkog modela koji opisuje ponašanje proučavanog sistema i, u kombinaciji sa Deringerovom funkcijom poželjnih odgovora, omogućava istovremenu optimizaciju više praćenih veličina, predlažući nivoe nezavisnih faktora koji dovode do optimalnih uslova za postizanje željenih vrednosti odgovora sistema (233,234). RSM ujedno smanjuje broj eksperimenata, a pritom zadržava visoku pouzdanost predviđanja i omogućava jasnije i potpunije razumevanje ponašanja sistema (235). Pre primene RSM, potrebno je izabrati adekvatan ekseprimentalni dizajn, koji će definisati koji eksperimenti treba da se izvedu u eksperimentalnom regionu koji se proučava (232).

RSM pokazala se korisnom za razvoj, poboljšanje i optimizaciju različitih procesa (236). Faze u primeni RSM za optimizaciju procesa su (232):

- izbor faktora,
- izbor ekseprimentalnog dizajna i izvođenje eksperimenata prema odabranoj eksperimentalnoj matrici,
- matematičko-statistička analiza dobijenih eksperimentanih podataka kroz generisanje polinomske funkcije kao modela,
- procena adekvatnosti modela i
- višekriterijumska optimizacija i dobijanje optimalnih vrednosti za svaku praćenu veličinu.

### ***2.7.2. Izbor faktora***

U RSM postoje dve vrste faktora, nezavisni (ulazne promenljive) i zavisni faktori (praćene veličine) (237). Faktori koji utiču na proces moraju biti pažljivo identifikovani i ispitani. Za svaki faktor potrebno je definisati eksperimentalni domen, odnosno opseg vrednosti unutar kojih se varira tokom istraživanja. Faktori se mogu podeliti na kvantitativne i kvalitativne, kao i na faktore koji se odnose na sastav smeše (236). Pošto nije moguće odrediti uticaj svih nezavisnih faktora na praćene veličine, neophodno je odabrati one faktore koji imaju najveći uticaj na proučavani sistem. Eksperimenti skininga su korisni za identifikaciju nezavisnih faktora. U tu svrhu često se koriste Plaket Burman (PB) dizajn i Tagučii metod na dva nivoa (niži (-1) i viši (+1)), prvenstveno zato što su efikasni i ekonomični (232,234). Raspon između nivoa predstavlja najširi interval u kojem se određeni faktor može varirati u okviru proučavanog sistema, a određuje se na osnovu podataka iz literature i iskustva istraživača (236). PB dizajn je frakcioni faktorski dizajn čiji je primarni cilj pronalaženje značajnih nezavisnih faktora za dalju optimizaciju (238). Ovaj dvostepeni frakcioni faktorski dizajn omogućava ispitivanje do N-1 faktora u N ponavljanja. Eksperimenti se ponekad ponavljaju radi procene eksperimentalne greške, a za procenu efekata najčešće se koristi model prvog reda. Značajni faktori se identifikuju primenom analize varijanse (ANOVA) (239).

### ***2.7.3. Izbor eksperimentalnog dizajna***

Eksperimentalni dizajn predstavlja sistematički pristup u planiranju eksperimenata, kako bi bili izvedeni na dobro organizovan i efikasan način, sa ciljem identifikovanja uzročno-posledičnih veza između nezavisnih faktora i praćenih veličina, uz primenu statističke analize rezultata (240). U zavisnosti od proučavanog procesa bira se jedan od najčešće korišćenih tipova eksperimentalnog dizajna, kao što su potpuni faktorski dizajn, frakcioni faktorski dizajn, Boks-Benken (BB) dizajn, centralno kompozitni (CC) dizajn ili dr. (241). Među njima, BB dizajn se često primenjuje, jer ne zahteva veliki broj eksperimenata. BB dizajn je nezavisan rotabilan dizajn drugog reda, koji podrazumeva variranje tri faktora na tri različita nivoa, (+1) viši, (0) srednji, (-1) niži, uz najčešće tri ponavljanja u centralnoj tački. Glavna prednost ovog dizajna je ta što ne uključuje kombinacije

u kojima su svi faktori istovremeno na maksimalnim ili minimalnim nivoima, čime se izbegavaju ekstremni eksperimentalni uslovi i poboljšava kvalitet dobijenih rezultata (237).

#### **2.7.4. Matematičko-statistička analiza**

Nakon odabira odgovarajućeg eksperimentalnog dizajna, sprovode se eksperimenti prema utvrđenoj matrici, a dobijeni rezultati se potom podvrgavaju statističkoj analizi koja omogućava formulisanje odgovarajućeg matematičkog modela (242). Jednačina modela koja se koristi u RSM je polinomna kvadratna jednačina (234):

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i<j} \beta_{ij} X_i X_j$$

gde je  $Y$  –praćena veličina,  $\beta_0$  - konstanta,  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  i  $\beta_{ij}$  – linerani, kvadratni i interakcioni koeficijenti, respektivno, i  $X_i$  i  $X_j$  – kodirani nezavisni faktori.

#### **2.7.5. Provera adekvatnosti modela**

Nakon formiranja matematičkog modela, proverava se njegova sposobnost da precizno opisuje odnose između faktora. Značajnost modela i faktora ocenjuje se analizom varijanse (ANOVA), koja kvantifikuje varijacije u eksperimentalnim rezultatima (234,243). Provera adekvatnosti modela procenjuje se na osnovu više parametara.  $F$ - i  $p$ - vrednosti predstavljaju osnovne pokazatelje statističke značajnosti analiziranih faktora i njihovih interakcija. Veća  $F$ -vrednost ukazuje na veću značajnost faktora ili interackije, dok  $p$ -vrednost zavisi od nivoa značajnosti i pokazuje koliko je određeni izvor varijacije statistički značajan.  $p$ -vrednosti manje od 0,05 i 0,001 ukazuju na statističku značajnost sa nivoima poverenja od 95% i 99%, respektivno. Odstupanje od modela (*lack-of-fit*) koristi se za procenu da li se razlika između eksperimentalno dobijenim vrednostima i vrednostima predviđenim modelom mogu objasniti greškom merenja. Ova vrednost je kod modela koji su značajni statistički neznačajna ( $p > 0,05$ ) (232). Koeficijenti determinacije ( $R^2$ ), kao i njegova prilagođena (*adj R<sup>2</sup>*) i predviđena vrednost (*pred R<sup>2</sup>*), opisuju procenat ukupne

varijacije koji model može objasniti, odnosno stepen podudaranja eksperimentalnih i predviđenih vrednosti. Model se smatra adekvatnim kada su  $R^2$  i  $adj R^2$  što bliže jedinici, a razlika između  $adj R^2$  i  $pred R^2$  manja od 0,2 (234,244). Koeficijent varijacije (CV) koristi se za procenu ponovljivosti modela i ukoliko je njegova vrednost manja od 10% model se može smatrati prihvatljivim (245).

### **2.7.6. Analiza značajnih efekata**

Ako je model adekvatan, pristupa se proceni pojedinačnih i kombinovanih efekata nezavisnih faktora. Ova procena zasniva se na apsolutnim vrednostima koeficijenata matematičkog modela, pri čemu veća vrednost koeficijenta ukazuje na veći uticaj faktora na praćenu veličinu. Pozitivan predznak koeficijenta označava da povećanje vrednosti faktora dovodi do rasta praćene veličine, dok negativan predznak ukazuje na suprotan efekat (232).

Jedan od načina da se u RSM analizi proceni efekat nezavisnih faktora jeste grafički prikaz modela (236). Vizualizacija jednačine modela je najčešće u obliku trodimenzionalnih odzivnih površina i konturnih dijagrama. Dijagram odzivnih površina je trodimenzionalni dijagram koji pokazuje odnos između praćene veličine i nezavisnih faktora. Dvodimenzionalni prikaz dijagrama odzivne površine naziva se konturni dijagram, gde se crtaju linije konstatnog odziva u ravni nezavisnih faktora. Kada konturni dijagram prikazuje elipse ili krugove, centar navedenog oblika se odnosi na tačku maksimalnog ili minimalnog odziva. Ponekad konturni dijagram može prikazati hiperbolički ili parabolički sistem kontura. U tom slučaju, stacionarna tačka se naziva prevojna tačka (234). U ovim grafičkim prikazima odziv površine je predstavljen kao funkcija dva faktora. Prema utvrđenom kriterijumu optimizacije, tražena optimalna vrednost može odgovarati maksimalnoj, minimalnoj ili unapred definisanoj vrednosti, koja se može naći jednostavnim vizualnim pregledom dijagrama. Kada se proučava više od dva faktora, oni koji nisu ucrtani moraju biti postavljeni na konstantnom nivou, tako da je prikazan ograničen deo ekseptimentalnog domena i ne mora se nužno videti optimum na dijagramu. Iz tog razloga, vrednost fiksnog faktora mora biti pažljivo odabrana (236).

### **2.7.7. Određivanje optimalnih uslova**

Optimizacija procesa podrazumeva određivanje uslova pri kojima se postižu maksimalne vrednosti praćenih veličina. U složenim realnim sistemima, neophodna je istovremena optimizacija više praćenih veličina, pri čemu optimalni uslovi za jednu od praćenih veličina ne moraju nužno biti optimalni i za druge praćene veličine (246). Deringerova funkcija poželjnih odgovora predstavlja jednu od najčešće korišćenih metoda višekriterijumske optimizacije, koja omogućava istovremeno definisanje optimuma za više praćenih veličina (247).

Primenom Deringerove funkcije poželjnih odgovora, svi izlazi sistema transformišu se na istu skalu od 0 (nepoželjan odgovor) do 1 (poželjan odgovor), a zatim se kombinuju u zajednički odgovor, koji treba da ima maksimalnu vrednost (247). Transformisani pojedinačni odgovori kombinuju se u ukupnu funkciju poželjnih odgovora ( $D$ ), koja može imati vrednosti od  $D = 0$  (svi odgovori su nepoželjni) do  $D = 1$  (svi odgovori su poželjni), pri čemu vrednost bliža 1 ukazuje na približavanje sistema optimalnoj vrednosti (248,249).

## **2.8. Autohtone sorte vinove loze**

U svakom vinogradarskom regionu širom sveta postoje sorte vinove loze, koje su se vekovima prilagođavale specifičnim klimatskim i zemljišnim uslovima tog područja. Takve sorte predstavljaju rezultat dugotrajne selekcije i nose naziv autohtone sorte vinove loze. Proučavanje autohtonih sorti vinove loze postaje sve značajnije, jer one predstavljaju ključni deo genetske, kulturne i enološke baštine pojedinog regiona (39).

### **2.8.1. Prokupac**

Prema podacima iz vinogradarskog registra Republike Srbije, na prvom mestu među autohtonim i regionalnim sortama, po osnovu ukupne površine vinogradarskih parcela je sorta prokupac sa površinom oko 270 ha (250). Prokupac je stara autohtona sorta vinove loze koja je u prošlosti bila jako zastupljena i značajna. Poslednjih godina ova sorta ponovo zauzima važno mesto u asortimentu Republike Srbije (251). Najviše se uzgaja u centralnoj Srbiji, na Kosovu i Metohiji i

mestimično u Vojvodini (252). Pored toga, region južne Srbije ima odgovarajuće tipove zemljišta i klimatske uslove koji su veoma povoljni za gajenje ove sorte vinove loze (253). Poslednjih godina primećuje se da je sorta prokupac sve više zastupljena u novim zasadima u ovom delu Srbije. Pored Republike Srbije, uzgaja se u Severnoj Makedoniji, Bugarskoj i Ruskoj Federaciji. Sorta prokupac je poznata još i pod nazivima prokupka, crnka, niševka, kameničarka, rskavac, nikodimka (Republika Srbija), zarčin (Bugarska), srpsko crno (Severna Makedonija) i majski čorni (Ruska Federacija) (252).

Tokom sazrevanja, čokot razvija bujne, uspravne lastare. Vrh mladog lastara je crvenkasto-zelene boje i veoma maljav. Zreo lastar odlikuje se srednjom do većom debljinom, sa internodijama kratke ili srednje dužine ljubičaste boje, pri čemu mu je kora crvenkaste boje. Listovi, koji mogu biti trodelni ili celi variraju po veličini, od srednje velikih do velikih. Lice lista je glatko i golo, dok je naličje maljavo sa tamnozelenom bojom, a u jesen postaje crvenkaste boje. Nervi na licu lista su crvenkasti, a zupci krupni. Peteljka lista je srednje dužine i crvenkaste boje, pri čemu peteljkin sinus ima oblik slova "V". Grozd je srednje veličine, ponekad i veći, cilindrično-kupastog oblika, srednje zbijen. Peteljka grozda je kratka i zeljasta. Bobice su srednje veličine, okrugle ili blago spljoštene, sa debelom tamnoplavo pokožicom prekrivenom mnogim tačkicama i obilnom peteljkom, sa izraženim pupkom (252). Ova sorta sazreva između III i IV epohe i predstavlja veoma poznju sortu sa dugom vegetacijom, gde kratka rezidba doprinosi povoljnim uzgojnim oblicima. Najbolji prinos daje na suvim, propusnim, rastresitim, kamenito šljunkovitim, umereno plodnim i toplim zemljištima. Otporna je prema pepelnici, ima izraženu otpornost na napad botritisa, ali je veoma osetljiva na plamenjaču (252,254) i na niske temperature (254).

Šira grožđa prokupca je bezbojna, prijatnog mirisa i ukusa, gde pri jačem ceđenju dobija roze boju (255). Radman šire kreće se oko 65-70% (v/v) i njen sastav varira u širokim granicama, pri čemu se sadržaj šećera kreće u granicama od 18-22% (w/v) i ukupne kiseline od 6-7 g/L (252). Pokožica ove sorte grožđa sadrži mali broj isparljivih jedinjenja. Među tim jedinjenjima, viši alkoholi, aldehidi i terpeni doprinose aromi vina, dajući cvetne i voćne note (256). Od ove sorte najčešće se proizvode roze i crvena vina, koja su pitka, harmonična, sa izrazitim cvetnim mirisima, svetlo crveno do crvene ili rubin crvene boje (257).

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijal

##### 3.1.1. Biljni materijal

Plodovi kultivisane i divlje kupine i šljive, kruške i smokve ubrani su u punoj zrelosti na teritoriji varoši Vučje (42°51' N, 21°54' E) i sela Žabljane (42°52' N, 21°53' E), južna Srbija, dok su uzorci čokota i lista vinove loze, kao i grožđa autohtone sorte prokupac prikupljeni iz vinogradskog regiona Tri Morave (43°30' N, 21°39' E), centralna Srbija, u vremenskom periodu septembar-oktobar 2019. godine. Za svaku sortu voća, kao i uzorke čokota i lista vinove loze uzeto je po pet uzoraka sa tri nasumično odabrana stabla, odnosno čokota. Biljni material je u sterilnim plastičnim kesama i u ručnom frižideru, transportovan do laboratorije gde je korišćen u roku od 24 h.

Za vinifikaciju je korišćeno grožđe autohtone sorte prokupac iz već pomenutog vinogradskog regiona, tokom tri uzastopne godine berbe (2020, 2021 i 2022).

##### 3.1.2. Hemikalije i reagensi

Sabouraud maltozni agar (SMA), sabouraud maltozni bujon (SMB), maltoza i pepton-4 (Torlak, Beograd, Srbija), glukoza, fruktoza, natrijum hlorid (NaCl), etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) hlorovodonična kiselina (HCl) i sumporna kiselina (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Zorka Pharma – Hemija d.o.o., Šabac, Srbija), magnezijum sulfat heptahidrat (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O), amonijum sulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), mangan (II) hlorid tetrahidrat (MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O), kalcijum hlorid (CaCl<sub>2</sub>), kalijum metabilsulfit (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), vodonik peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), kalcijum hidroksid (KOH), bakar sulfat (CuSO<sub>4</sub>), natrijum tiosulfat (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), bromtimol plavo i glicerol (Centrohem d.o.o., Stara Pazova, Srbija), amonijum dihidrogen fosfat (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), boraks (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·5H<sub>2</sub>O), dihlormetan, hloramfenikol i gentamicin sulfat (Merck, Darmstadt, Nemačka), kalijum dihidrogen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), cink sulfat heptahidrat (ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) i formaldehid (Merck-Alkaloid, Skopje, Makedonija), natrijum hidroksid (NaOH) (J.T.Baker, Halostok, Meksiko), riboflavin i biotin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Masačusets, SAD), ekstrakt kvasca (Neogen, Ujedinjeno Kraljevstvo), galaktoza (Fluka, Sigma-Aldrich, Gillingem, Ujedinjeno Kraljevstvo), kalijum jodid (KI) (Betahem d.o.o., Beograd, Srbija), jod (I<sub>2</sub>) (MOSLAB

d.o.o., Beograd, Srbija), skrob (NRK Inženjering d.o.o., Beograd, Srbija), fosforna kiselina ( $H_3PO_4$ ), etilen diamino tetra sirćetna kiselina (EDTA) i tris acetat (Sigma-Aldrich, St. Louisu, Misuri, SAD), fenolftalein (Institut MOL d.o.o., Stara Pazova, Srbija), vinska kiselina (Carlo Erba Reagents Srl, Cornaredo, Italija), 2-oktanol, etil heksanoat, 2-feniletal alkohol i dietil sukcinat (KEFO, kemija in farmacija, d.o.o., Ljubljana, Slovenija), helijum (Messer Tehnogas, Beograd, Srbija).

## **3.2. Metode**

### ***3.2.1. Izolacija kvasaca***

Uzorci biljnog materijala (plodovi voća, čokot i list vinove loze) u količini od 10 g ili 10 mL u slučaju soka grožđa, homogenizovani su mešanjem pomoću vorteksa sa 90 mL sterilnog fiziološkog rastvora (NaCl, 0,80% w/v) radi dobijanja suspenzije. Serija razblaženja pripremljena je aseptičnim sukcesivnim prenošenjem po 1 mL pripremljene suspenzije u epruvete sa 9 mL sterilnog fiziološkog rastvora. Od decimalnih razblaženja ( $10^{-6}$  do  $10^{-8}$ ) po 1 mL suspenzije je prenesen u sterilne Petri ploče, koje su potom nalivane sa SMA kojem je prethodno dodat hloramfenikol (80 mg/L) i gentamicin sulfat (5 mg/L), radi obezbeđivanja selektivnog rasta kvasaca, i inhibicije rasta bakterija. Nakon inokulacije, Petri ploče su inkubirane na temperaturi od 25°C tokom 48 h. Za dalja istraživanja izabrane su morfološki različite kolonije, a višestrukim presejavanjem, metodom iscrpljivanja eze, dobijene su čiste kulture kvasaca. Čistoća kultura proveravana je prilikom svakog presejavanja mikroskopiranjem (Leica DM500, Nemačka). Kulture kvasaca čuvane su u SMB sa dodatkom glicerola (20%) na -20°C i održavane periodičnim presejavanjem uz istovremenu proveru čistoće kultura.

### ***3.2.2. Određivanje morfoloških karakteristika izolata***

Makromorfološke i mikroskopske karakteristike izolata određene su u cilju procene morfoloških karakteristika izolata. Od makromorfoloških karakteristika određene su boja, oblik i tekstura kolonija na SMA sa dodatkom hloramfenikola (80 mg/L) i gentamicin sulfata (5 mg/L). Od

mikroskopskih karakteristika određen je oblik ćelija. Makromorfološke karakteristike određene su nakon inokulacije izolata na navedenoj hranljivoj podlozi i inkubacije na temperaturi od 25°C tokom 48 h. Oblik ćelija određen je mikroskopski (Leica DM500, Nemačka) pomoću fiksiranog i obojenog preparata. Bojenje je izvršeno sa kristal violet i Lugolovim rastvorom u trajanju od 5 minuta.

### ***3.2.3. Identifikacija izolata***

#### ***3.2.3.1. Biohemijska karakterizacija izolata***

U cilju preliminarne identifikacije, prvenstveno vrsta kvasaca primenjen je brzi biohemijski test API AUX 20C (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francuska). Ovim testom određivana je sposobnost asimilacije ugljenih hidrata kroz 19 reakcija u veoma malim zapreminama uzoraka. Prekonoćne kulture kvasaca suspendovane su u sterilnom fiziološkom rastvoru (2 mL), nakon čega je suspenzija homogenizovana pomoću vorteksa. Dobijena suspenzija inokulisana je u mikrokupole API AUX 20C trake koje sadrže pojedinačne supstrate za asimilaciju ugljenih hidrata. Inkubacija je trajala 48-72 h na temperaturi od 25°C. Pozitivnom reakcijom smatrala se pojava zamućenja. Za očitavanje rezultata korišćen je softverski paket APIWeb, verzija 1.1.0.

#### ***3.2.3.2. Molekularna identifikacija izolata kvasaca***

##### ***3.2.3.2.1. Izolovanje ukupne DNK iz izolata kvasaca***

Ukupna DNK je izolovana prema proceduri iz komercijalnog kita Qick-DNA<sup>TM</sup>Fecal/Soil Microbe MiniPrep Kit (ZymoResearch, Irvine, Kalifornija, SAD). Koncentracija izolovane DNK kao i čistoća uzorka su određene na Nanovue Plus spektrofotometru (GE Healthcare, Bakingemšir, Ujedinjeno Kraljevstvo). Izolovana DNK je čuvana na -20°C (258).

#### 3.2.3.2.2. Lančana reakcija polimeraze (PCR)

Za potrebe molekularne identifikacije ispitivanih izolata kvasaca, umnožavanje DNK fragmenata izvršeno je PCR (Eng. *Polymerase chain reaction*) metodom korišćenjem specifičnih prajmera ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3') i ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (259). Umnožavanje fragmenata ukupne DNK PCR metodom rađeno je tako što je pripremljena reakciona smeša finalne zapremine od 30  $\mu$ L koja sadrži: 22,80  $\mu$ L bidestilovane vode, 3  $\mu$ L 1 x reakcioni pufer DreamTaq Buffer sa 1,5 mM magnezijum hloridom, 0,60  $\mu$ L dNTP smeše (po 200  $\mu$ M za svaki dNTP), 1  $\mu$ L prajmera (svaki po 2,5  $\mu$ M) i 0,20  $\mu$ L 5U DreamTaq DNA polimeraze (ThermoScientific) i 2  $\mu$ L uzorka DNK. PCR reakcije su rađene po sledećem programu: početna denaturacija na 94°C tokom 4 min, umnožavanje DNK fragmenata u 35 ciklusa: denaturacija na 94°C tokom 30 s, vezivanje prajmera 30 s na 55°C; polimerizacija lanaca na 72°C tokom 1 min i poslednji ciklus, polimerizacija na 72°C tokom 4 min. Dobijeni PCR produkti su nakon prečišćavanja, pri čemu je korišćen kit za prečišćavanje PCR produkata (QIAquick PCR Purification KIT/250 (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka) sekvencirani u centru za sekvenciranje Macrogen, Amsterdam, Holandija. Dobijene sekvence su poređene korišćenjem NCBI baze podataka, BLAST programom za pretraživanje homologne nukleotidne sekvence (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

#### 3.2.3.2.3. Horizontalna gel elektroforeza DNK

Horizontalna gel elektroforeza molekula DNK je rađena na horizontalnim agaroznim gelovima. Gelovi su napravljeni otapanjem 1% agaroze (Sigma, Štajnhajm, Nemačka) u 1 x TAE puferu (40 mM Tris acetat i 1 mM EDTA) uz dodavanje etidijum bromida (0,5  $\mu$ g/mL). Elektroforeza je vršena pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm gela na sobnoj temperaturi. Veličine DNK fragmenata određivana je na osnovu poređenja u pokretljivosti DNK fragmenata poznatih veličina (GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder) (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija) na istom agaroznom gelu (260).

### ***3.2.4. Enološke karakteristike izolata kvasaca***

#### ***3.2.4.1. Određivanje optičke gustine***

Određivanje optičke gustine izolata kvasaca izvršeno je spektrofotometrijskim merenjem. Svaki izolat kvasca bio je dodat u koncentraciji od 3% (v/v) u osnovnu hranljivu podlogu (glukoza 20 g/L, fruktoza 20 g/L i pepton-4 10 g/L) i nakon inkubacije na temperaturi od 25°C tokom 24 h, merena je optička gustina inokulisane hranljive podloge spektrofotometrijski (UV-VIS Spectrophotometer UV-M51, Bell Photonics, Italija) na talasnoj dužini od 620 nm. Kao slepa proba korišćena je nezasejana hranljiva podloga.

#### ***3.2.4.2. Test rasta na različitim temperaturama***

Sposobnost izolata kvasca da raste na različitim temperaturama određena je modifikovanom metodom Peris i saradnika (261). Izolati kvasaca zasejani su na osnovnu hranljivu podlogu sa dodatkom agara, nakon čega su ploče inkubirane na temperaturama od 4, 10, 15 i 20°C, tokom 48 h. Prisustvo kolonija na hranljivoj podlozi nakon inkubacije smatrano je dokazom rasta na odgovarajućoj temperaturi.

#### ***3.2.4.3. Stvaranje CO<sub>2</sub>***

Za proveru sposobnosti stvaranja CO<sub>2</sub> korišćena je modifikovana metoda Sidari i saradnika (15). Prekonoćna kultura kvasca, u koncentraciji od 3% (v/v) dodata je u epruvetu sa osnovnom hranljivom podlogom u kojoj je prethodno bila postavljena Durhamova cevčica, kako bi se detektovalo stvaranje gasa. Inkubacija je vršena na temperaturi od 25°C, tokom 48 h. Pojava CO<sub>2</sub> u Durhamovoj cevčici bio je dokaz da kvasac ima fermentativnu sposobnost.

#### ***3.2.4.4. Rast pri različitim koncentracijama etanola***

Sposobnost izolata kvasca da raste u medijumu pri različitim koncentracijama etanola određena je modifikovanom metodom Tikka i saradnika (262). Za inokulaciju osnovne hranljive podloge, koja je sadržala različite koncentracije etanola (3, 5, 7, 9, 11, 13 i 15 % vol.) korišćeni su inokulumi

starosti 24 h, u koncentraciji od 3% (v/v). Inokulisane podloge inkubirane su na temperaturi od 25°C, tokom 24 h. Rast izolata kvasaca određen je spektrofotometrijski na talasnoj dužini od 620 nm. Kao slepa proba korišćena je nezasejana hranljiva podloga. Rast izolata kvasca izražen je u procentima, koji je dobijen upoređivanjem apsorbance rasta izolata kvasca u podlozi bez dodatka etanola sa absorbancom rasta u podlozi sa dodatkom etanola.

#### ***3.2.4.5. Rezistentnost na SO<sub>2</sub>***

Za određivanje rezistentnosti izolata kvasca pri određenim koncentracijama SO<sub>2</sub>, korišćena je osnovna hranljiva podloga sa dodatkom agara i kalijum metabisulfita u koncentracijama od 50, 100, 200 i 300 mg/L. Zasejavanje ploča vršeno je prekonoćnom kulturom izolata kvasca. Inokulisane ploče inkubirane su na temperaturi od 25°C tokom 48 h. Nakon inkubacije, izrasle kolonije bile su potvrda rezistentosti kvasca pri konkretnim koncentracijama kalijum metabisulfita (263).

#### ***3.2.4.6. Brza metoda procene potencijala kvasaca za produkciju prihvatljivih aroma u vinu***

U cilju određivanja potencijala izolata kvasaca presudnih za senzorne osobine vina, kao hranljiva podloga korišćena je sterilna šira sa dodatkom agara. Inokulacija je izvršena prekonoćnom kulturom kvasaca. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi (2-7 dana), ploče su evaluirane metodom direktnog mirisanja od strane senzornih ocenjivača (n = 4). Cilj je bio da se identifikuju prijatni ili neprijatni mirisi, kao i njihov intenzitet (slab, umeren, izražen), što može ukazivati na potencijal kvasca da pozitivno ili negativno utiče na senzorne karakteristike budućih vina (264).

### ***3.2.5. Određivanje karakteristike šire***

#### ***3.2.5.1. Određivanje sadržaja šećera***

Sadržaj šećera u širi i kljuku određivan je ručnim refraktometrom (ATC Refractometer, Giorgio Bormac, Karpi, Italija).

### **3.2.5.2. Određivanje sadržaja ukupnih kiselina**

Sadržaj ukupnih kiselina u širi i kljuku određivan je acidimetrijski i izražen kao sadržaj vinske kiseline u g/L. U čašu od 100 mL odmereno je 30 mL ključale destilovane vode, 1 mL rastvora bromtimol plavo i 10 mL uzorka. Titracija je vršena sa 0,1M rastvorom NaOH do pojave modrozeleno zelene boje. Koncentracija ukupnih kiselina u širi/kljuku izračunata je prema sledećoj formuli:

$$A = 0,75 \cdot n$$

gde je n – utrošak 0,1M NaOH, mL.

### **3.2.5.3. Određivanje pH vrednosti**

pH vrednost šire i kljuka određena je potenciometrijski pomoću pH metra (HANNA HI 9318, Lejton Bazard, Ujedinjeno Kraljevstvo).

### **3.2.5.4. Određivanje asimilirajućeg azota**

Određivanje asimilirajućeg azota vršeno je po metodi Gump i saradnika (265). Odmereno je 100 mL uzorka (šira ili kljuk), preneto u čašu od 200 mL, i potom neutralisano do pH vrednosti 8,00 pomoću 1M NaOH. Nakon toga, celokupna zapremina uzorka prenesena je u normlani sud od 200 mL, koji je potom dopunjen destilovanom vodom do crte i sadržaj dobro homogenizovan mućkanjem. Sadržaj je profiltriran kroz filter papir i 100 mL alikvota je preneseno u čašu od 200 mL, pri čemu je pH vrednost podešena na 8,00. U tako pripremljen uzorak dodat je neutralisani formaldehid (25 mL, pH 8,00) i celokupna zapremina je homogenizovana. Titracija je vršena sa 0,1M NaOH do pH vrednosti 8,00. Koncentracija asimilirajućeg azota izračunata je prema sledećoj formuli:

$$\text{mg N/L} = n \cdot 28$$

gde je n – utrošak 0,1M NaOH, mL.

### **3.2.6. Vinifikacija**

#### **3.2.6.1. Mikroviniifikacija**

Grožđe sorte prokupac (berba 2019) korišćeno je za proces mikroviniifikacije. Karakteristike šire bile su: 22,6°Brix, ukupna kiselost 7,40 g/L i pH vrednosot 3,59. U Erlenmajer posude od 300 mL odmereno je po 100 mL šire, sa dodatkom amonijum sulfata (75 mg/L) i amonijum dihidrogen fosfata (131 mg/L), i autoklavirano na temperaturi od 100°C tokom 20 minuta. Nakon autoklaviranja i hlađenja do sobne temperature, inokulacija je izvršena pojedinačnim čistim kulturama vrsta *C. famata* (Kd-1, Kd-2, Kd-4 i Kd-17), *H. uvarum* (Kd-8, Kd-9, Kd-10, Kd-12, Kd-13, Kr-2, Kr-4, Š-2 i Šd-1), *P. kluyveri* (K-1), *M. pulcherrima* (K-5), *R. glutinis* (Gf-3) i *P. laurentii* (Č-1) starosti 48 h, sa početnim brojem ćelija od 10<sup>6</sup> CFU/mL. Ovi izolati bili su odabrani na osnovu enološke karakterizacije, pri čemu su prioritet imali oni izolati koji su pokazali visok stepen prilagodljivosti uslovima okoline i sastava medijuma. Šira inokulisana komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV V1116 (Lallemand Inc., Montreal, Kanada) (10<sup>6</sup> CFU/mL) predstavljala je kontrolni uzorak. Mikroviniifikacije su se odvijale u kontrolisanim uslovima na temperaturi od 25°C. Nakon devetog dana fermentacije u svim uzorcima je dodat izvor azota u vidu sterilnog rastvora (amonijum sulfat (75 mg/L) i amonijum dihidrogen fosfat (131 mg/L)). Kinetika alkoholne fermentacije praćena je na osnovu promene sadržaja šećera, koja je određivana ručnim refraktometrom (ATC Refractometer, Giorgio Bormac, Karpi, Italija), a nakon što je utrošeno dve trećine prvobitnog sadržaja šećera referentnom metodom opisanom u poglavlju 3.2.7.4. Kinetika alkoholne fermentacije praćena je i na osnovu mase oslobođenog CO<sub>2</sub> koja je indirektno određivana na osnovu promene mase Erlenmajerovih posuda između dva merenja. Koncentracija šećera, kao i masa posuda određivane su jednom dnevno tokom trajanja alkoholne fermentacije. Alkoholna fermentacija je smatrana završenom kada se gubitak mase u razmaku od dva uzastopna dana nije razlikovao za više od 1%. Sve mikroviniifikacije su izvedene u triplikatu.

#### **3.2.6.2. Vinifikacija na laboratorijskom nivou**

Grožđe sorte prokupac je ručno brano u stanju pune tehnološke zrelosti (berba 2020). Bobice su ručno odvojene od šepurine i izmuljane. U dobijeni kljuk odmah je dodat kalijum metabisulfit (5

g/hL) i pektolitički enzim EXV (Lallemand Inc., Montreal, Kanada) (2 g/hL), a nakon mešanja kljuk je podeljen u 12 fermentora (po 7 L). Karakteristike kljuka bile su: 21,2°Brix, ukupne kiseline 7,80 g/L i pH vrednost 3,60. Inokulacija, sa početnim brojem ćelija od  $10^6$  CFU/mL, izvršena je odabranim vrstama ne-*Saccharomyces* kvasaca (*P. kluyveri* K-1, *M. pulcherrima* K-5 i *H. uvarum* (Kr-2, Šd-1 i Š-2)), koje su nakon mikroviniifikacije pokazale najbolji enološki potencijal za proizvodnju vina sorte prokupac. Osim fermentacije sa čistim kulturama ne-*Saccharomyces* kvasaca, izvršena je i sekvencijalna fermentacija sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254 (Lallemand Inc., Montreal, Kanada). Kao kontrolni uzorak, korišćeno je vino dobijeno primenom komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254. Temperatura fermentacije održavana je na 25°C, a svakog dana, po tri puta je vršeno potapanje kljuka. Nakon što je utrošena približno trećina prvobitnog sadržaja šećera, u svaki fermentor su dodati nutrijenti za rast kvasaca Femaide E (Lallemand Inc., Montreal, Kanada) (30 g/hL). Kada je koncentracija šećera opala ispod 4 g/L, vino je otočeno sa komine i sumporisano do sadržaja slobodnog SO<sub>2</sub> od 25 mg/L. Nakon 48 h, vino je pretočeno sa taloga i flaširano. Idući postupak istovremeno je bio sproveden i u Erlenmajerovim posudama od 300 mL sa zapreminom šire od 150 mL, kako bi bilo moguće praćenje oslobađanja CO<sub>2</sub>. Kinetika alkoholne fermentacije praćena je dnevnim merenjem sadržaja šećera refraktometrom (ATC Refractometer, Giorgio Bormac, Karpi, Italija), referentnom metodom i određivanjem mase oslobođenog CO<sub>2</sub> na osnovu promene mase Erlenmajerovih posuda. Alkoholna fermentacija je smatrana završenom kada gubitak mase u dva uzastopna dana nije prelazio 1%. Sve viniifikacije izvedene su u triplikatu.

### **3.2.6.3. Viniifikacija u pilot uslovima**

Odabrani soj ne-*Saccharomyces* kvasca (*P. kluyveri* K-1), sa najpovoljnijim enološkim karakteristikama, testiran je u fermentacionom eksperimentu u pilot uslovima. Viniifikacija je sprovedena u inox fermentoru zapremine 100 L, inokulisanjem 90 L kljuka sorte grožđa prokupac (berba 2021) (23,5°Brix, ukupne kiseline 5,10 g/L i pH vrednost 3,76) sa početnim brojem ćelija od  $10^6$  CFU/mL soja *P. kluyveri* K-1. Inokulacija komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254 ( $10^6$  CFU/mL) korišćena je kao kontrolni uzorak. Pre inokulisanja starter kulturama, u kljuk je dodat kalijum metabisulfit (5 g/hL) i pektolitički enzim EXV (Lallemand Inc., Montreal, Kanada) (2 g/hL). Temperatura fermentacije je održavana na 25°C i svakodnevno, po tri puta, je vršeno

potapanje kljuka. Nakon što je potrošena približno trećina prvobitnog sadržaja šećera dodati su nutrijenti za rast kvasaca Femaïd E (Lallemand Inc., Montreal, Kanada) u koncentraciji od 30 g/hL. Kada je koncentracija šećera opala ispod 4 g/L, vino je otočeno sa komine i sumporisano do sadržaja slobodnog SO<sub>2</sub> od 25 mg/L. Nakon 48 h, vino je pretočeno sa taloga i flaširano.

#### **3.2.6.4. Vinifikacija u poluindustrijskim uslovima**

Vinifikacija u poluindustrijskim uslovima sprovedena je u vinariji Marko (Bučje, Srbija) u inox tanku od nerđajućeg čelika zapremine 2500 L. Za pokretanje alkoholne fermentacije kljuka, zapremine 2000 L, pripremljen je inokulum soja *P. kluyveri* K-1. Inokulum soja *P. kluyveri* K-1, u koncentraciji od  $7 \cdot 10^8$  CFU/mL resuspendovan je u 1 L razblažene šire sorte prokupac (koncentracija šećera 65,76 g/L) u cilju adaptacije na uslove sredine pri temperaturi od 25°C, i inkubiran 24 h na istoj temperaturi. Nakon ovog perioda, pripremljeni (umnoženi) inokulum je dodat u 2000 L kljuka sorte grožđa prokupac (berba 2022) (23,3°Brix, ukupne kiseline 5,70 g/L i pH vrednost 3,68). Inokulacija komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254 korišćena je kao kontrolni uzorak. Pre inokulisanja starter kulturama, u kljuk je dodat kalijum metabisulfit (5 g/hL) i pektolitički enzim EXV (Lallemand Inc., Montreal, Kanada) (2 g/hL). Temperatura fermentacije je održavana na 25°C i svakodnevno, po tri puta, je vršeno potapanje kljuka. Nakon što je potrošena približno trećina prvobitnog sadržaja šećera dodati su nutrijenti za rast kvasaca Femaïd E (Lallemand Inc., Montreal, Kanada) u koncentraciji od 30 g/hL. Kada je koncentracija šećera opala ispod 4 g/L, vino je otočeno sa komine i sumporisano do sadržaja slobodnog SO<sub>2</sub> od 25 mg/L. Nakon 48 h, vino je pretočeno sa taloga i flaširano.

#### **3.2.7. Fizičko-hemijska analiza vina**

##### **3.2.7.1. Određivanje gustine i specifične težine vina**

Gustina i specifična težina vina određene su referentnom metodom – piknometrijom (266). Za vrlo precizno merenje urađena je korekcija gustine zbog sadržaja sumpor dioksida, prema formuli:

$$\rho_{20^{\circ}\text{C}} = \rho'_{20^{\circ}\text{C}} - 0,0006 * S$$

gde su  $\rho_{20^{\circ}\text{C}}$  – korigovana gustina,  $\rho'_{20^{\circ}\text{C}}$  – određena gustina i  $S$  – količina  $\text{SO}_2$  u vinu, g/L.

Pre određivanja gustine vina, prvo je određena masa praznog piknometra ( $P$ ), koji je prethodno opran, osušen i kalibrisan. Potom je piknometar pažljivo napunjen destilovanom vodom i stavljen u termički izolovanu posudu. Okretanjem posude vršilo se mešanje, dok temperatura nije postigla konstantnu vrednost. Nivo vode na vrhu bočne cevčice piknometra je podešen do crte, brisanjem je piknometar osušen i zatvoren zatvaračem. Očitana je temperatura,  $t^{\circ}\text{C}$ , i merena je masa piknometra sa vodom ( $P_1$ ). Nakon toga, merena je masa tara posude,  $T_0$ .

Tariranje praznog piknometra:

$$\text{Masa praznog piknometra} = P - m$$

gde je  $m$  – masa vazduha u piknometru

$$m = 0,0012 \cdot (P_1 - P)$$

Zapremina piknometra na  $20^{\circ}\text{C}$ :

$$V_{20^{\circ}\text{C}} = [(P_1 - (P - m))] \cdot F_t$$

$F_t$  – faktor za temperaturu  $t^{\circ}\text{C}$  (266)

Masa piknometra sa vodom na  $20^{\circ}\text{C}$ :

$$M_{20^{\circ}\text{C}} = V_{20^{\circ}\text{C}} \cdot 0,998203$$

gde je 0,998203 g/mL gustina vode na  $20^{\circ}\text{C}$ .

Masa tara posude je izmerena  $T_1$  i izračunato je  $dT$ .

$$dT = T_1 - T_0$$

$$\text{Masa praznog piknometra u vreme merenja} = P - m + dT$$

Masa piknometra sa vinom je izmerena na identičan način koji je opisan kod određivanja mase piknometra sa vodom, i njegova masa na t°C je označena sa (P<sub>2</sub>).

Masa piknometra sa vinom na t°C = P<sub>2</sub> – (P – m + dT)

$$\rho_{t^{\circ}\text{C}} = \frac{P_2 - (P - m + dT)}{V_{20^{\circ}\text{C}}}$$

Za izračunavanje gustina na 20°C (ρ<sub>20°C</sub>) korišćena je tabela temperaturne korekcije za gustinu suvih i bezalkoholnih vina, merene Pireks piknometrom na t°C, za proračun rezultata na 20°C (266). Specifična težina vina izračunata je na sledeći način:

$$d_{20/20} = \frac{\rho_{20^{\circ}\text{C}}}{\rho_{\text{H}_2\text{O}}}$$

### **3.2.7.2. Određivanje sadržaja alkohola**

Za određivanje sadržaja alkohola u vinu korišćena je referentna metoda merenje gustine destilata piknometrom (266). U normalni sud od 200 mL dodat je uzorak vina do oznake i izmerena je temperatura. Potom je uzorak vina dekantiran u destilacionu tikvicu. Normalni sud je ispran četiri puta sa po 5 mL destilovane vode, što je takođe prenešeno u destilacionu tikvicu. Dodato je 10 mL 2M rastvora KOH i nekoliko kuglica za ključanje. Destilat je sakupljan u isti normalni sud. Destilacija je vršena do 3/4 početne zapremine normalnog suda. Potom je normalni sud dopunjen destilovanom vodom do oznake, održavajući destilat na istoj početnoj temperaturi. Gustina destilata (ρ<sub>t°C</sub>) je određena na identičan način, koji je prethodno opisan kod određivanja gustine i specifične težine vina. Alkoholna jačina na 20°C je određena primenom međunarodne tabele za alkoholnu jačinu na 20°C (266).

### **3.2.7.3. Određivanje suvog ekstrakta**

Ukupan suvi ekstrakt računat je indirektno iz specifične težine ostatka od destilacije. Specifična težina ostatka od destilacije (d<sub>r</sub>) izračnata je pomoću formule:

$$d_r = d_v - d_a + 1,000$$

gde su  $d_v$  - specifična težina vina na 20°C (korigovana za isparljive kiseline) i  $d_a$  - specifična težina smeše voda-alkohol iste alkoholne jačine kao i vino na 20°C.

Korekcija relativne gustine ili gustine vina na učinak isparljivih kiselina:

$$d_v = d_{20/20} - 0,0000085 \cdot a$$

gde je  $a$  – količina isparljivih kiselina izražena u miliekvivalentima sirćetne kiseline po litru.

Za proračun ukupnog suvog ekstrakta korišćena je tabela za proračun koncentracije ukupnog suvog ekstrakta (g/L) (266).

#### **3.2.7.4. Određivanje redukujućih šećera**

U Erlenmajer posudu od 300 mL odmereno je 25 mL alkalnog rastvora  $\text{CuSO}_4$ , 15 mL destilovane vode i 10 mL uzorka vina. Dodato je nekoliko kulgica za ključanje, i uz povratni refluks smeša je zagrevana do ključanja. Ključanje je trajalo 10 minuta. Po tom je smeša u Erlenmajerovoj posudi ohlađena pod mlazom hladne vode, nakon čega je dodato 10 mL 30% rastvora KI, 25 mL 25%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  i 2 mL rastvor skroba. Titracija je vršena sa 0,1M rastvorom  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , i utrošena zapremina je obeležena sa  $n$ . Za titraciju slepe probe, umesto 10 mL uzorka vina, dodato je 10 mL destilovane vode i utrošena zapremina 0,1M rastvora  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  je obeležena sa  $n'$ .

Koncentracija redukujućih šećera (izražena kao invertni šećer) očitana je iz tabele odnosa između zapremine 0,1M rastvora  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  ( $n' - n$ ) u mL i količine redukujućih šećera u mg (266).

#### **3.2.7.5. Određivanje ukupne kiselosti**

Oko 50 mL uzorka vina je preneto u vakuum tikvicu, koja je zatim priključena na vodenu vakuum pumpu tokom 1-2 minuta uz konstantno mešanje, radi uklanjanja ugljen dioksida. Nakon toga je od tih 50 mL odmereno 10 mL u čašu od 100 mL u kojoj je prethodno dodato 25 mL ključale destilovane vode i 1 mL rastvora bromtimol plavo. Titracija je vršena sa 0,1M rastvorom NaOH

do promene boje u modro-zelenu. Koncentracija ukupne kiseline, izražena u gramima vinske kiseline po litru (A), izračunata je prema sledećoj formuli:

$$A = 0,75 \cdot n$$

gde je n - utrošak 0,1M NaOH, mL.

### **3.2.7.6. Određivanje sadržaja isparljivih kiselina**

U posudu za destilaciju odmereno je 20 mL uzorka vina, prethodno oslobođenog od ugljen dioksida, i 0,50 g vinske kiseline. Tokom destilacije vodenom parom sakupljeno je 250 mL destilata. Dobijeni destilat je titrisan sa 0,1M rastvorom NaOH, uz dodatak dve kapi fenolftaleina kao indikatora. Utrošena zapremina rastvora NaOH označena je sa  $n$  (mL). Potom je dodato četiri kapi razblažene HCl (1:4), 2 mL rastvora skroba i nekoliko kristala KI. Titracija slobodnog SO<sub>2</sub> vršena je sa 0,005M rastvorom I<sub>2</sub>. Utrošena zapremina rastvora I<sub>2</sub> označena je sa  $n'$ . Nakon toga, dodat je zasićen rastvor boraksa (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·5H<sub>2</sub>O) do pojave ružičaste boje. Titracija ukupnog SO<sub>2</sub> vršena je sa istim rastvorom I<sub>2</sub>, gde je utrošena zapremina rastvora označena sa  $n''$ .

Sadržaj isparljivih kiselina, izražen u gramima sirćetne kiseline po litru, izračunat je na sledeći način:

$$A = 0,3 \cdot (n - 0,1 \cdot n' - 0,05 \cdot n'')$$

gde su n - utrošak 0,1M NaOH, mL, n' - utrošak 0,005M rastvora I<sub>2</sub>, mL i n'' - utrošak 0,005M rastvora I<sub>2</sub>, mL.

### **3.2.7.7. Određivanje pH vrednosti vina**

Određivanje vrednosti pH vršeno je direktno u uzorku vina pomoću pH metra (HANNA HI 9318, Lejton Bazard, Ujedinjeno Kraljevstvo).

### **3.2.5.8. Određivanje koncentracije slobodnog SO<sub>2</sub>**

Za određivanje SO<sub>2</sub> (slobodan i ukupan) korišćena je referentna metoda (266). U tikvicu B na slici P3.1 (u Prilogu) odmereno je 2-3 mL rastvora H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i dodato dve kapi indikatora. Rastvor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> je neutralisan dodavanjem 0,01M rastvora NaOH i tikvica B je spojena sa aparaturom. U tikvicu A odmereno je 50 mL uzorka vina i 15 mL 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Tikvica je potom spojena sa aparaturom. Kroz aparaturu je strujao vazduh (ili azot) u trajanju od 15 minuta. Slobodan SO<sub>2</sub> se u tikvici B oksidisao u sumpornu kiselinu. Nastala sumporna kiselina u tikvici B titrisana je sa 0,01M rastvorom NaOH do promene boje. Slobodan SO<sub>2</sub> (mg/L) izračunat je primenom formule:

$$X, \text{ mg/L} = 6,4 \cdot n$$

gde je n - utrošak 0,01M NaOH, mL.

### **3.2.5.9. Određivanje ukupnog SO<sub>2</sub>**

U tikvicu B na slici P3.1 (u Prilogu) odmereno je 2-3 mL rastvora H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> koji je neutralisan na identičan način, opisan u delu određivanja slobodnog SO<sub>2</sub>. U tikvicu A odmereno je 50 mL uzorka vina i 15 mL 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Tikvica je potom spojena sa aparaturom. Uzorak vina je zagrevan do ključanja. Ključanje je održavano oko 15 minuta, dok je kroz aparaturu konstantno strujao vazduh. Nastala sumporna kiselina je titrisana sa 0,01M rastvorom NaOH. Ukupan SO<sub>2</sub> (mg/L) izračunat je primenom formule:

$$X = 6,4 \cdot n$$

gde je n - utrošak 0,01M NaOH, mL.

### **3.2.7.10. Hromatske karakteristike**

Boja vina sastavljena je od tri komponente: žute ( $\lambda = 420 \text{ nm}$ ), crvene ( $\lambda = 520 \text{ nm}$ ) i plave ( $\lambda = 620 \text{ nm}$ ). Spektrofotometrijskim merenjem apsorbance na ove tri talasne dužine mogu se

izračunati: intenzitet boje, nijansa boje, procentualni doprinos žute, crvene i plave boje u intenzitetu boje (267).

Intenzitet boje predstavlja ukupnu boju vina prikazanu kao suma apsorbancija na određenim talasnim dužinama:

$$IB = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

Nijansa boje izračunava se kao odnos apsorbancije na 420 nm i 520 nm:

$$NB = A_{420}/A_{520}$$

Procena procentualnog doprinosa žute, crvena i plave komponente ukupnom intenzitetu boje vina:

žuta boja	$A_{420} (\%) = (A_{420}/IB) \cdot 100$
crvena boja	$A_{520} (\%) = (A_{520}/IB) \cdot 100$
plava boja	$A_{620} (\%) = (A_{620}/IB) \cdot 100$

### **3.2.8. HPLC analiza**

HPLC analiza uzoraka vina sprovedena je primenom metode opisane od strane Castellari i saradnika (268), uz modifikacije, zarad određivanja koncentracija organskih kiselina, glicerola, etanola i redukujućih šećera. Pre same analize, uzorci vina pripremljeni su centrifugiranjem (Centrifuge TH16B, Čang-ša, Kina) i naknadnim filtriranjem pomoću mikrofiltera veličine pora 0,45 µm. Detekcija komponenti izvršena je na Aminex HPX-87H koloni (7,80 × 300 mm, Biorad Laboratories) na uređaju Agilent 1100 Series u izokratskim uslovima. Zapremina uzorka od 20 µL ubrizgana je u kolonu, dok je kao eluent korišćena 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Operativni uslovi rada bili su temperatura kolone 50°C i protok 0,60 mL/min. Organske kiseline detektovane su pomoću UV detektora na talasnoj dužini od 214 nm, dok su glicerol, etanol i redukujući šećeri (glukoza i fruktoza) detektovani na RID detektoru na talasnoj dužini od 280 nm, na osnovu poređenja sa retencionim vremenima standarda. Kvantitativno određivanje svake komponente ponaosob određeno je pomoću kalibracionih krivih zavisnosti površine ispod pika i koncentracije standarda.

### ***3.2.9. Identifikacija i kvantifikacija aromatskih jedinjenja***

#### ***3.2.9.1. Ekstrakcija isparljivih jedinjenja vina dihlormetanom***

U levak za odvajanje od 250 mL odmernoj je 25 mL dihlormetana, 50 mL uzorka vina i 0,50 mL internog standarda (IS) (2-oktanol, 2 mg/mL). Smeša u levku je energično mućkana 3 minuta, nakon čega je ostavljena da se prirodno razdvoje slojevi. Radi efikasnijeg razdvajanja, smeša je centrifugirana u trajanju od 15 minuta pri brzini od 4500 obrt/min. Dihlorometanski sloj (ekstrakt), prenet je u balon pomoću staklene Pasterove pipete. Zapremina ekstrakta je precizno izmerena, nakon čega je podvrgnuta procesu uparavanja na vakuum uparivaču (IKA WERKE RV06-ML i HB4 basic, Staufen im Breisgau, Nemačka) do zapremine od 1 mL. Ovaj ekstrakt je zatim upotrebljen za GC/MS analizu radi karakterizacije njegovog hemijskog sastava.

#### ***3.2.9.2. Kvalitativna analiza isparljivih jedinjenja vina metodom gasne hromatografije-masene spektroskopije (GC/MS)***

GC/MS analiza urađena je na Agilent Technologies 7890B (Santa Klara, SAD) gasnom hromatografu povezanom sa 5977A masenim detektorom. Jedinjenja su izdvojena na slabo polarnoj, silika kapilarnoj koloni, HP-5MS (5% difenil i 95% dimetil-polisilaksan, 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm debljina filma; Agilent Technologies, SAD). Helijum sa konstatnim protokom od 1 mL/min je korišćen kao gas nosač. Temperatura pećnice je održavana na 40°C tokom 2 minuta, i onda povećana do 250°C sa brzinom povećanja temperature od 7°C/min, i na kraju održavana na 250°C u trajanju od 2 minuta. Analiza uzorka trajala je 34 minuta. Temperature MSD prenosne linije, izvora jona i kvadropolnog masenog analizatora podešene su na 300°C, 230°C i 150°C, respektivno. Napon jonizacije bio je 70 eV, a detekcija mase je urađena u Scan mode, u m/z opsegu od 25 do 550. Podaci su obrađeni korišćenjem softverskih alata MSD ChemStation Data Analysis (revizija F.01.00.1903), u kombinaciji sa AMDIS (Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System, verzija 2.70) i NIST MS Search (verzija 2.0g), koje je razvio Nacionalni institut za standarde i tehnologiju (NIST), SAD. Za pouzdanu identifikaciju komponenti prisutnih u smeši, korišćeni su retencioni indeksi standarda, koji su eksperimentalno određeni uz pomoć serije homologih *n*-alkana u opsegu C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>. Identifikacija komponentata je bazirana na

upoređivanju njihovih retencionih indeksa ( $RI^{exp}$ ) sa literaturnim vrednostima ( $RI^{lit}$ ), kao i na upoređivanju njihovih masenih spektara sa spektrima dostupnim u Willey, NIST i RTLPEST bibliotekama. Gde god je to bilo moguće, identifikacija komponenata je dodatno potvrđena putem ko-injektiranja odgovarajućeg standarda.

### 3.2.9.3. Kvantitativna analiza isparljivih jedinjenja

Koncentracije isparljivih jedinjenja u uzorcima vina određene su metodom internog standarda. Konstruisane su kalibracione krive korišćenjem smeše standarda etil heksanoata (0,03-0,236 mg/L), 2-feniletil alkohola (0,22-1,784 mg/L) i dietil sukcinata (0,04-0,35 mg/L) kojoj je dodat 2-oktanol (IS) (2 mg/mL). Za ovu svrhu je pripremljen surogat vina (pH 3,4): 12% etanola i 4 g/L vinske kiseline, kome je dodavana odgovarajuća zapremina pripremljenih smeša standarda. Priprema uzorka se zasnivala na ekstrakciji uzorka dihlormetanom po postupku opisanom u poglavlju 3.2.9.1. Kalibracione krive su konstruisane kao zavisnost odnosa relativnih površina pikova standarda i internog standarda u TIC (Total Ion Chromatogram) hromatogramu i odnosa koncentracija standarda i internog standarda u kalibracionom rastvoru. RRF za svaki od standarda je očitao sa kalibracione krive kao nagib linearne zavisnosti odnosa površina i odnosa koncentracija standarda i IS. Na osnovu RRF vrednosti svih standarda u rastvoru izračunata je srednja vrednost RRF ( $RRF_{mean}$ ), koja je dalje korišćena za proračun koncentracija analita u uzorku prema sledećoj formuli:

$$C_x = (Area_x \cdot C_{is(smp)}) / (RRF_{mean} \cdot Area_{is(smp)})$$

gde su  $C_x$  - koncentracija analita u analiziranom uzorku,  $Area_x$  - površina pika analita u analiziranom uzorku,  $C_{is(smp)}$  - koncentracija internog standarda u analiziranom uzorku,  $RRF_{mean}$  - srednji relativni faktor odgovora i  $Area_{is(smp)}$  - površina pika internog standarda u analiziranom uzorku.

Prilikom proračuna koncentracija uzet je u obzir faktor razblaženja za svaki analizirani uzorak.

### **3.2.10. Optimizacija postupka dobijanja biomase soja *P. kluyveri* K-1**

#### **3.2.10.1. Priprema inokuluma soja *P. kluyveri* K-1**

Inokulum je pripremljen zasejavanjem 300 mL SMB sa dodatkom hloramfenikola (80 mg/L), u Erlenmajer posudu od 500 mL jednom kolonijom soja *P. kluyveri* K-1, nakon čega je inkubiran na temperaturi od 25°C tokom 24 h na rotacionoj mućkalici (Multi-fuctional Orbital Shaker, PSU-20i, Biosan SIA, EU) pri brzini od 120 obrt/min. Za inokulaciju je korišćen inokulum starosti 24 h u koncentraciji od 3% (v/v).

#### **3.2.10.2. Određivanje ćelijskog rasta soja *P. kluyveri* K-1**

Ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1 praćen je određivanjem broja vijabilnih ćelija i prinosa biomase. Broj vijabilnih ćelija određivan je korišćenjem metode serijskog razblaženja koju su opisali Mensah i sardnici (269), sa manjim modifikacijama. Zapremina od 1 mL određenog serijskog razblaženja je korišćena za određivanje koncentracije ćelija. Izvršeno je serijsko razblaženje suspenzije kvasca, sukcesivnim prebacivanjem 1 mL alikvota u epruvetu koja sadrži 9 mL sterilnog fiziološkog rastvora (0,80% w/v), zaključno do osmog razblaženja ( $10^{-8}$ ). Po 1 mL od razblaženja  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  i  $10^{-8}$  je odpipetirano u sterilne Petri ploče koje su potom bile nalivene sa SMA sa dodatkom hloramfenikola (80 mg/L). Nakon nalivanja i mešanja Petri ploča, one su inkubirane na temperaturi od 25°C tokom 48 h. Broj izraslih kolonija je prebrojan i ukupan broj vijabilnih ćelija je određen primenom formule:

$$\text{Broj vijabilnih ćelija, CFU/mL} = \text{Broj kolonija na ploči} \cdot \text{faktor razblaženja}$$

Prinos biomase određivan je primenom gravimetrijske metode koju su opisali Malairuang i sardnici (270), sa manjim modifikacijama. Fermentacioni bujon zapremine 10 mL je centrifugiran (Centrifuge TH16B, China) na 4 000 obrt/min, supernatant je dekantovan, pelet ispran destilovanom vodom, ponovo centrifugiran, zatim resuspendovan u 5 mL destilovane vode i prenet u prethodno izmerenu praznu staklenu Petri ploču. Petri ploča je potom sušena na 105°C do konstantne mase. Prinos biomase je izračunat iz razlike mase pune i prazne Petri ploče.

### 3.2.10.3. Jednofaktorska metoda

Jednofaktorska metoda je primenjena kao početni korak u cilju pojednostavljenja sastava medijuma, za izbor odgovarajućeg izvora ugljenika i određivanje opsega koncentracija, koji daje najbolje rezultate za ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1. Ekseperiment je izveden u Erlenmajerovim posudama od 250 mL, sa po 100 mL modifikovanog YPD bujona (pepton 10 g/L, ekstrakt kvasca 5 g/L, bez glukoze). Pepton i ekstrakt kvasca, koji obezbeđuju aminokiseline, vitamine i druge faktore rasta održavani su na konstantnom nivou tokom eksperimenta, kako bi se obezbedilo da su uočene razlike u rastu kvasca isključivo posledica tipa i koncentracije dodatih šećera. Kao izvor ugljenika korišćeni su glukoza, fruktoza, maltoza, galaktoza i glicerol u koncentracijama od 5, 20, 50, 100 i 150 g/L, na osnovu prethodno objavljenih rezultata (271,272). Modifikovani YPD bujon (pepton 10 g/L i ekstrakt kvasca 5 g/L) bez izvora ugljenika korišćen je kao kontrolni uzorak. Inokulacija je izvršena prekonocnom kulturom soja *P. kluyveri* K-1 u koncentraciji od 3% (v/v). Eksperimenti su izvedeni pri temperaturi od 25°C, uz konstantno mešanje (120 obrt/min) na rotacionoj mućkalici. Tokom 32 h kultivacije određivan je broj vijabilnih ćelija i prinos biomase soja *P. kluyveri* K-1.

### 3.2.10.4. Plaket-Burman dizajn

Plaket-Burman (PB) dizajn korišćen je za odabir faktora koji utiču na praćene veličine, broj vijabilnih ćelija i prinos biomase soja *P. kluyveri* K-1, primenom softvera Design-Expert, verzija 7.0.0 (Stat-Ease Inc., Mineapolis, Minesota, SAD). Na osnovu literaturnih podataka, identifikovano je 11 potencijalno značajnih komponenti medijuma čije je prisustvo neophodno za ćelijski rast, a koje su dalje korišćene u eksperimentalnom radu (273–276). Koncentracija svake od odabranih komponenti, tj. faktora za skrinig, varirana je na dva nivoa: niži (-1) i viši (+1) (tabela P3.1). Pod pretpostavkom da između faktora ne postoji interakcija i da je model višestruke regresije prvog reda prihvatljiv, može se koristiti sledeća jednačina:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_1 x_1$$

gde su  $Y$  – praćena veličina (broj živih ćelija i prinos biomase),  $\beta_0$  – odsečak (konstanta),  $\beta_1$  – linearni koeficijent,  $x_1$  – nezavisni faktor.

### 3.2.10.5. Boks-Benken dizajn i metodologija odzivne površine (RSM)

Metodologija odzivne površine (RSM) i Boks-Benken (BB) dizajn su dalje korišćeni u cilju modelovanja i optimizacije procesa dobijanja biomase soja *P. kluyveri* K-1. Tri najznačajnija faktora, odabrana nakon jednofaktorske metode i PB dizajna, varirana su na tri nivoa, u skladu sa BB matricom dizajna, uz tri ponavljanja u centralnoj tački, što je ukupno činilo 15 eksperimenata (tabele P3.2 i P3.3 u Prilogu). Radi definisanja odnosa između nezavisnih faktora i praćenih veličina (broj vijabilnih ćelija i prinos biomase) i predviđanja optimalnih vrednosti korišćena je polinomna funkcija drugog reda:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_1\beta_2x_1x_2 + \beta_1\beta_3x_1x_3 + \beta_2\beta_3x_2x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2$$

gde su  $Y$  – praćena veličina,  $\beta_0$  – odsečak (konstanta),  $x_1$ ,  $x_2$  i  $x_3$  – nezavisni faktozi,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  i  $\beta_3$  – linearni koeficijenti,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  i  $\beta_{33}$  – kvadratni koeficijenti.

Tokom izvođenja eksperimenata koncentracije peptona-4 (10 g/L), ekstrakta kvasca (5 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (3 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 g/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 g/L) i  $\text{CaCl}_2$  (0,2 g/L) u svim eksperimentima su bile iste i bazirane na rezultatima dobijenim primenom PB dizajna i procesa odabira značajnih faktora. U svim slučajevima za inokulaciju fermentacionih medijuma korišćen je inokulum soja *P. kluyveri* K-1, koncentracije 3% (v/v) starosti 24 h.

Ekperimentalni dizajn, regresiona analiza i određivanje optimalnih uslova sprovedeni su korišćenjem softverskog paketa Design Expert, verzija 7.0.0 (Stat-Ease Inc., Mineapolis, Minesota, SAD). Statistička obrada rezultata izvršena je primenom analize varijanse (ANOVA). Prihvatljivost modela procenjena je putem koeficijenta determinacije ( $R^2$  i *adj*  $R^2$ ), koeficijenta varijacije (C.V.),  $F$ - i  $p$ -vrednosti za modele i odstupanje od modela (*lack of fit*). Optimizacija procesa dobijanja biomase soja *P. kluyveri* K-1, uz istovremeno dobijanje maksimalnog broja vijabilnih ćelija sprovedena je korišćenjem funkcije poželjnosti (desirability function, D). Radi verifikacije modela dobijanje biomase soja *P. kluyveri* K-1 sprovedeno je pod predloženim optimalnim uslovima.

### ***3.2.11. Senzorna analiza vina***

Senzorna analiza vina sprovedena je od strane zvanično sertifikovanih članova senzornog panela ovlašćenih za senzornu analizu vina od strane Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije (šest žena i pet muškaraca, starosti od 29 do 51 godine). Uzorci vina ocenjivani su u duplikatu i u nasumičnom redosledu, pri čemu je intenzitet svakog parametra ocenjen korišćenjem skale od 1-10 (1-nije detektovano, 10-veoma intenzivno), uz primenu kartona za senzorno ocenjivanje vina, koji je modifikovan i prilagođen za ocenjivanja vina sorte prokupac (tabela P3.4 u Prilogu). Prema kartonu, za svaki uzorak vina, panelisti su ocenjivali vizuelne (boja i intenzitet), olfaktorne (tipičnost, intenzitet, kompleksnost, crveno i crno bobičasto voće, koštičavo voće, cvetne note, orašasti plodovi, zeljaste note, začinski tonovi, tostirano) i gustativne (tipičnost, intenzitet, postojanost, kompleksnost, punoća, kiselost, struktura, taniničnost, trpkost i harominčnost) parametre. Senzorna analiza obavljena je u kontrolisanim uslovima (osvetljenje, temperatura, buka, mirisi), u prostoriji prilagođenoj degustaciji vina. Senzorna analiza je urađena prema Pravilniku o postupku i metodama senzornog ocenjivanja vina, načinu obuke i provere stručne osposobljenosti senzornih ocenjivača (277), uz korišćenje standardizovane vinske čaše za degustaciju i senzornu analizu vina (ISO 3591:1977) (278). Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti i predstavljeni su u obliku radar grafikona primenom softvera Origin Pro, verzija 9.0 (OriginLab Corporation, Nortampton, Masačusets, SAD).

### ***3.2.12. Statistička obrada podataka***

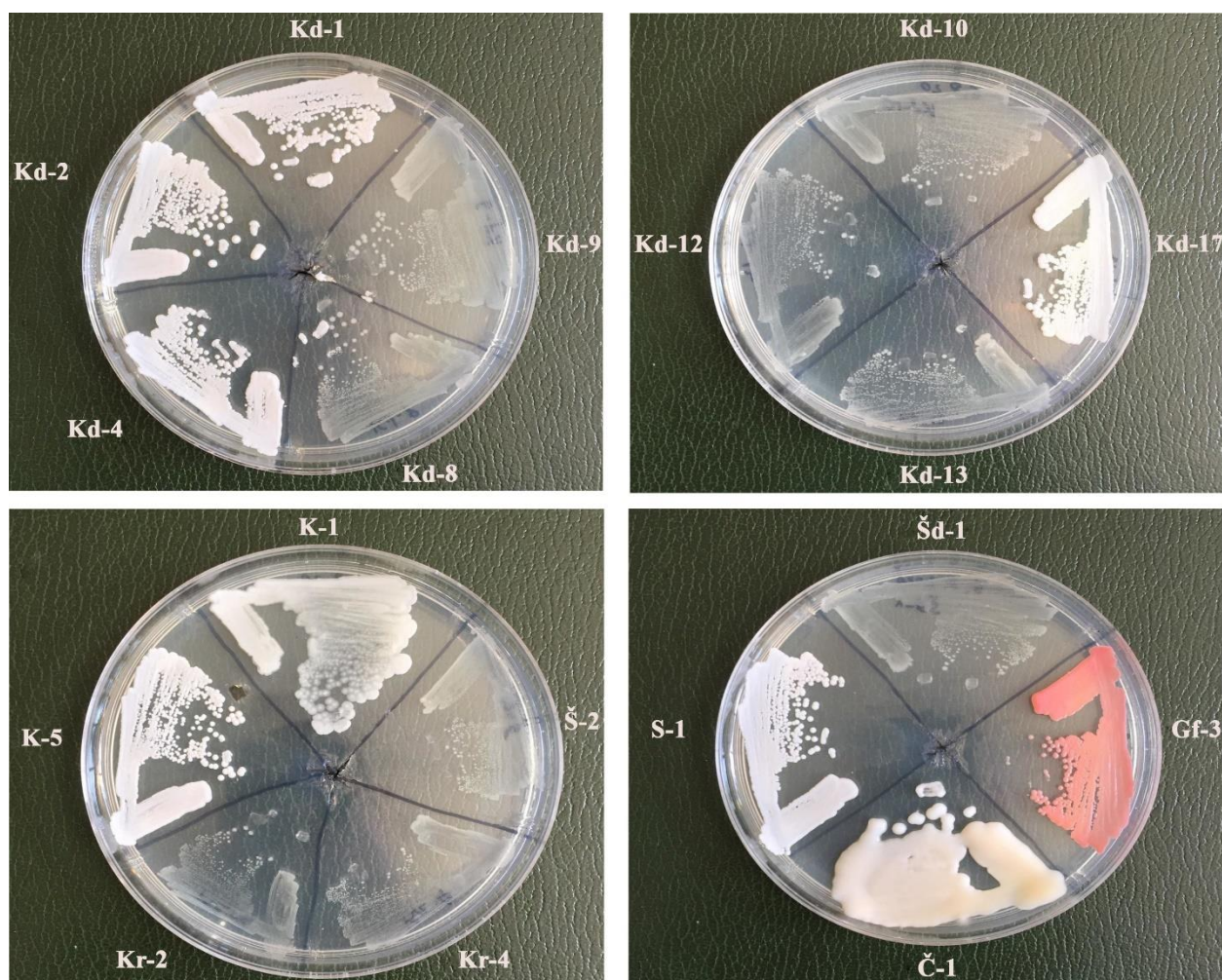
Svi eksperimenti realizovani su u tri paralelna ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. Analiza i poređenje dobijenih rezultata bazirano je na izračunatim srednjim vrednostima. Grafička analiza eksperimentalnih podataka urađena je primenom softvera Origin Pro, verzija 9.0 (OriginLab Corporation, Nortampton, Masačusets, SAD). Za grupisanje izolata kvasaca primenjena je klaster analiza korišćenjem Wardove metode i kvadirane Euklidske distance primenom softvera IBM SPSS Statistics, verzija 27.0.1 (IBM Corporation, Armonk, Njurok, SAD). Statistička značajnost razlika u srednjim vrednostima sadržaja organskih kiselina, glicerola, etanola, redukujućih šećera i isparljivih aromatskih

jedinjenja između različitih uzoraka vina analizirana je korišćenjem istog softvera za statističku analizu. Za procenu značajnosti razlika primenjena je jednofaktoska analiza varijanse (ANOVA), dok su međugrupna poređenja izvršena Tukey-ovim post hoc i Student-ovim testom pri nivou značajnosti od 95% ( $p < 0,05$ ).

## 4. REZULTATI I DISKUSIJA

### 4.1 Karakterizacija izolata kvasaca

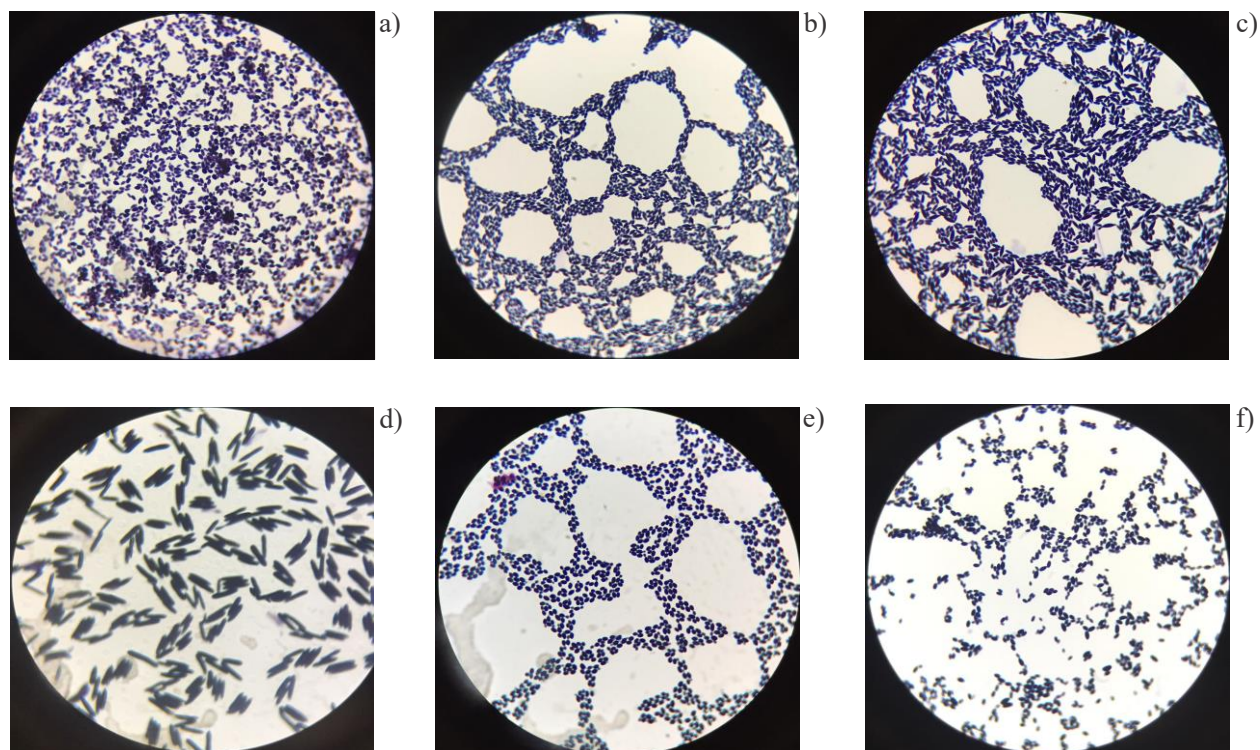
Sa površine zrelih plodova voća kultivisane i divlje kupine i šljive, kruške, smokve, grožđa, kao i sa površine lista i čokota vinove loze i iz soka grožđa prokupac izolovano je ukupno 58 izolata kvasaca. Slika 4.1 prikazuje morfološke karakteristike, oblik, boju, teksturu i izgled pojedinih kolonija izolata kvasaca uzgajanih na SMA sa dodatkom hloramfenikola i gentamicin sulfata.



Slika 4.1 Izgled pojedinih kolonija izolata ne-*Saccharomyces* kvasaca izolovanih sa površine voća, lista i čokota vinove loze

Većina kolonija imala je belu do svetlo žutu boju, pri čemu su površine bile glatke ili blago naborene, dok je konzistencija bila masna i kremasta. Izuzetak je predstavljao izolat Gf-3, koji je formirao kolonije ružičaste boje, kao i izolat Č-1 koji je stvorio velike sluzave kolonije. Oblik kolonija varirao je od kružnog do nepravilnog sa celim ili nejasno definisanim rubovima. U tabeli P4.1 (u Prilogu) prikazane su morfološke karakteristike za sve izolate kvasaca.

Morfologija ćelija pokazala je značajnu varijabilnost među izolatima, pri čemu su primećeni oblici od okruglih i ovalnih do elipsoidnih, štapićastih i limunastih formi (slika 4.2). Opis mikroskopskih karakteristika ćelija svih izolata kvasaca prikazan je u tabeli P4.1 u Prilogu. Dobijeni rezultati u skladu su sa prethodnim istraživanjima koja su se bavila izolacijom i morfološkom karakterizacijom kvasaca, gde je takođe zabeležena široka varijabilnost makromorfoloških i mikroskopskih karakteristika između različitih izolata kvasaca izolovanih sa različitog voća (279,280). U tim istraživanjima kolonije kvasaca najčešće su bile kremaste do beličaste boje, sa glatkom ili hrapavom površinom, kružnog ili nepravilnog oblika, dok su ćelije pokazivale različite morfološke forme od pojedinačnih ovalnih i elipsoidnih ćelija do ćelija organizovanih u razgranate lance (279,280).



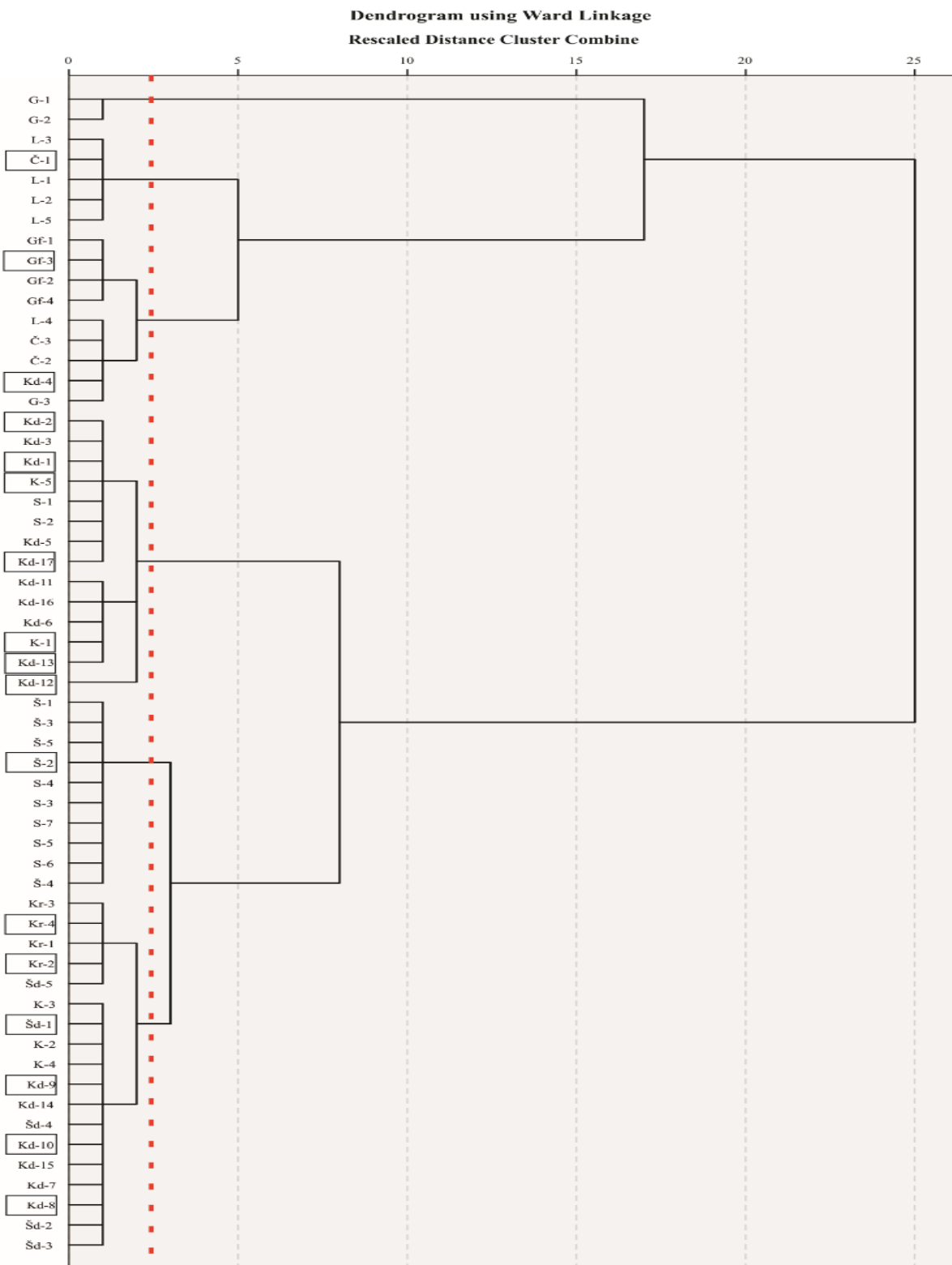
Slika 4.2 Izgled ćelija izolata kvasaca Kd-1 (a), Kr-2 (b), Š-2 (c), L-5 (d), Gf-3 (e) i K-1 (f) pod svetlosnim mikroskopom pri uvećanju od 100x

Za grupisanje i odabir izolata kvasaca za dalja ispitivanja primenjena je klaster analiza korišćenjem Wardove metode i kvadrirane Euklidske distance. Pre analize, rezultatima fermentativnih testova, makromorfoloških (veličina i boja kolonija) i mikroskopskih karakteristika (oblik ćelija) (tabela P4.1 u Prilog) dodeljene su numeričke vrednosti, kako je prikazano u tabeli 4.1. Sve varijable bile su standardizovane kako bi se eliminisao uticaj različitih jedinica merenja.

Tabela 4.1 Fenotipsko kodiranje morfoloških karakteristika i fermentativnih testova

Karakteristika/Kod	Rezultati
Boja kolonije	1 = bela
	2 = svetlo žuta
	3 = prozirna
	4 = crveno – roze
	5 = svetlo braon
Oblik ćelija	1 = okrugao
	2 = limunast
	3 = ovalan
	4 = štapićast
	5 = elipsoidan
Veličina kolonije	1 = male
	2 = srednje
	3 = velike
Stvaranje CO <sub>2</sub>	0 = - (odsustvo osobine)
	1 = + (prisustvo osobine)
Rast na određenim temperaturama	0 = - (odsustvo osobine)
	1 = + (prisustvo osobine)
Rezistentnost na SO <sub>2</sub>	0 = - (odsustvo osobine)
	1 = + (prisustvo osobine)

Na osnovu dobijenih rezultata prikazani u tabeli P4.1 u Prilogu, utvrđeno je da izolati G-1 i G-2 nemaju sposobnost produkcije CO<sub>2</sub> niti otpornost na minimalne koncentracije SO<sub>2</sub>, što predstavlja osnovne kriterijume za selekciju vinskih kvasaca, te nisu uzeti u obzir za dalja istraživanja. Značajne razlike ova dva kvasca u odnosu na ostale analizirane izolate potvrđene su i statističkom analizom prikazanom na dendrogramu (slika 4.3) na kojoj su ova dva izolata kvasaca odvojena u poseban klaster. Od ostalih formiranih klusterskih grupa nasumično je odabrano po nekoliko reprezentativnih izolata kvasaca radi sprovođenja daljih istraživanja usmerenih na potvrđivanje njihovog enološkog potencijala u procesu proizvodnje vina.



Slika 4.3 Dendrogram grupisanja izolata kvasaca na osnovu rezultata morfoloških i enoloških karakteristika primenom Warodovog metoda i kvadrirane Euklidske distance

## 4.2 Enološke karakteristike izolovanih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca

Na osnovu klaster analize odabrano je 17 izolata kvasaca koji su dalje analizirani u cilju procene njihovih enoloških karakteristika i potencijala. Na osnovu rezultata dobijenih API AUX 20C testom (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francuska) najveći broj izolata kvasaca identifikovani su kao vrsta *Hanseniaspora uvarum* (Kd-8, Kd-9, Kd-10, Kd-12, Kd-13, Šd-1, Š-2, Kr-2 i Kr-4). Nešto manji broj izolata kvasaca pripadali su vrsti *Candida famata* (Kd-1, Kd-2, Kd-4 i Kd-17). Ostali odabrani izolati kvasaca identifikovani su kao vrste *Pichia kluyveri* (K-1), *Metschnikowia pulcherrima* (K-5), *Papiliotrema laurentii* (Č-1) i *Rhodotorula glutinis* (Gf-3). Nezavisno od vrste voća i podneblja ne-*Saccharomyces* kvasci identifikovani u ovom istraživanju predstavljaju uobičajan deo mikrobiote plodova jabuke (117,281,282), kruške (117,282,283), kupine (284), šljive (117,282), grožđa (115,168,285), kore i listova različitog voća (282,286).

Fermentativni testovi su obuhvatili sposobnost rasta na različitim temperaturama (4-20°C), produkciju CO<sub>2</sub>, toleranciju na etanol (do 15% vol.) i SO<sub>2</sub> (do 300 mg/L), kao i sposobnost stvaranja aroma. Odabrani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca uzgajani su pod identičnim uslovima, a nakon 24 h rasta zabeležene su različite optičke gustine na 620 nm, što ukazuje na razlike u sposobnosti rasta pri datim uslovima (tabela 4.2). Vrednost optičke gustine na 620 nm kod sojeva *C. famata* (Kd-1 i Kd-4) i *M. pulcherrima* K-5 je bila najveća među odabranim sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca, i nije se statistički značajno razlikovala u poređenju sa sojem *S. cerevisiae* ICV 1116, dok su ostali sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca pokazali znatno lošiju sposobnost rasta pri datim uslovima. Sojevi *H. uvarum* imali su niže vrednosti optičke gustine, koje su se kretale između 0,626 i 0,781. Najniža vrednost optičke gustine zabeležena je kod soja *R. glutinis* Gf-3, što ukazuje na njegovu slabu sposobnost rasta pri datim uslovima.

Fermentativna snaga izražava brzinu kojom kvasci započinju alkoholnu fermentaciju, i određuje se na osnovu količine oslobođenog CO<sub>2</sub> tokom 48 h od početka procesa alkoholne fermentacije (287,288). Statistička analiza pokazala je statistički značajne razlike u fermentativnoj snazi među analiziranim sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca. Većina sojeva *H. uvarum* ispoljila je nisku fermentativnu snagu, koja je bila u opsegu od 1,00 do 1,51 g CO<sub>2</sub>/100 mL (tabela 4.2). Izuzetak je predstavljao soj *H. uvarum* Kd-12 sa vrednošću fermentativne snage od 2,51±0,01 g CO<sub>2</sub>/100 mL. Soj *M. pulcherrima* K-5 odlikovao se s umerenom fermentativnom snagom od 2,17±0,06 g CO<sub>2</sub>/100 mL. Veću fermentativnu snagu pokazali su sojevi *C. famata*, kod kojih su vrednosti bile

u intervalu od 2,24 do 2,66 g CO<sub>2</sub>/100 mL (tabela 4.2). Nasuprot tome, komercijalni soj *S. cerevisiae* ICV V1116 pokazao je 60-80% veću fermentativnu snagu u poređenju sa analiziranim sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca, što je u skladu sa istraživanjem Bianchi i saradnika (289). Dobijeni rezultati bili su u opsegu prethodno objavljenih rezultata. U istraživanju Sidari i saradnika (15), tokom alkoholne fermentacije pasterizovane šire od crvene sorte grožđa vrsta *H. uvarum* je pokazala vrednost fermentativne snage od 1,40 g CO<sub>2</sub>/100 mL, dok je u istraživanju Aponte i Blaiotta (290), tokom alkoholne fermentacije pasterizovane šire sorte grožđa aljaniko fermentativna snaga različitih sojeva vrste *H. uvarum* iznosila 2,12-2,13 g CO<sub>2</sub>/100 mL. U pomenutim istraživanjima, fermentativna snaga različitih sojeva *M. pulcherrima* bila je u opsegu od 1,02 do 1,26 g CO<sub>2</sub>/100 ml tokom fermentacije pasterizovane šire grožđa aljaniko (290), dok je u fermentaciji pasterizovane šire od crvene sorte grožđa iznosila 0,80 i 2,50 g CO<sub>2</sub>/100 mL (15).

Tabela 4.2 Enološke karakteristike odabranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca

Soj kvasca	Optička gustina, A <sub>620</sub>	Fermentativna snaga <sup>1</sup>	Fermentativna moć <sup>2</sup>
<i>C. famata</i> Kd-1	1,020±0,000h	2,66±0,05h	7,41±0,09h
<i>C. famata</i> Kd-2	0,902±0,024fg	2,44±0,08g	6,51±0,22g
<i>C. famata</i> Kd-4	1,004±0,003gh	2,24±0,02f	6,07±0,00f
<i>C. famata</i> Kd-17	0,876±0,004ef	2,51±0,06g	7,36±0,10h
<i>H. uvarum</i> Kd-8	0,668±0,020c	1,44±0,06g	3,30±0,04f
<i>H. uvarum</i> Kd-9	0,781±0,025c	1,22±0,03cd	2,78±0,03c
<i>H. uvarum</i> Kd-10	0,704±0,064de	1,00±0,03b	2,42±0,02b
<i>H. uvarum</i> Kd-12	0,626±0,013cd	2,51±0,01a	8,44±0,00a
<i>H. uvarum</i> Kd-13	0,653±0,003c	1,21±0,03b	2,83±0,03b
<i>H. uvarum</i> Kr-2	0,643±0,035c	1,20±0,03b	2,84±0,02b
<i>H. uvarum</i> Kr-4	0,636±0,044c	1,41±0,04c	3,30±0,05c
<i>H. uvarum</i> Š-2	0,679±0,064cd	1,51±0,03cd	3,76±0,04d
<i>H. uvarum</i> Šd-1	0,639±0,039c	1,20±0,03b	2,81±0,03b
<i>P. kluyveri</i> K-1	0,453±0,030b	1,81±0,01e	13,17±0,01j
<i>M. pulcherrima</i> K-5	1,016±0,031h	2,17±0,06f	6,62±0,10g
<i>R. glutinis</i> Gf-3	0,119±0,023a	1,43±0,01c	5,26±0,00e
<i>P. laurentii</i> Č-1	0,216±0,022a	1,55±0,01d	7,85±0,01i
<i>S. cerevisiae</i> ICV V1116	1,104±0,069h	6,21±0,01i	19,23±0,011

<sup>1</sup>Fermentativna snaga izražena je kao količina proizvedenog CO<sub>2</sub> (g) u 100 mL šire tokom prvih dva dana alkoholne fermentacije, <sup>2</sup>Fermentativna moć izražena je kao ukupna količina proizvedenog CO<sub>2</sub> (g) u 100 mL šire do kraja procesa alkoholne fermentacije. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n = 3). Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na statističku značajnu razliku vrednosti u istoj koloni pri nivou značajnosti  $p < 0,05$  (Tukey HSD test).

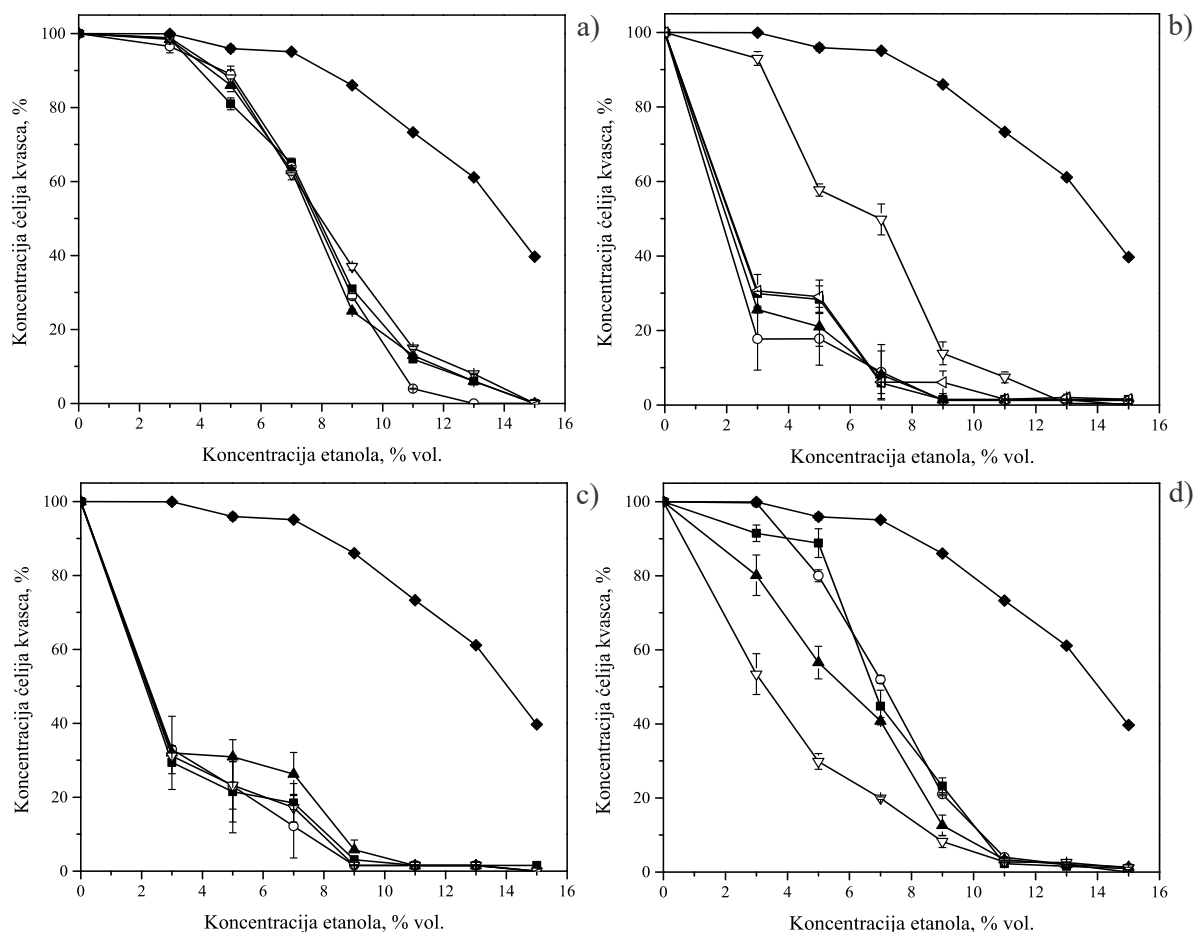
Fermentativna moć omogućava procenu potencijalnog prinosa etanola (% vol.) koji kvasci mogu proizvesti praćenjem količine oslobođenog CO<sub>2</sub> do kraja procesa alkoholne fermentacije (287,291). Zajedno sa kinetikom alkoholne fermentacija, fermentativna moć čini jedan od osnovnih kriterijuma za enološku karakterizaciju kvasaca. Na osnovu vrednosti fermentativne moći moguće je odrediti tip fermentacije u kojoj određeni kvasac može učestvovati. Vrste kvasaca sa niskom fermentativnom moći zahtevaju sekvencijalnu inokulaciju sa vrstom *S. cerevisiae*, kako bi se alkoholna fermentacija odvijala do kraja. Ovaj parametar ukazuje na tehnološki značaj i potencijalnu ulogu ne-*Saccharomyces* kvasaca u proizvodnji vina (292). Među analiziranim sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca zabeležene su statistički značajne razlike u fermentativnoj moći. Najnižu fermentativnu moć pokazali su sojevi *H. uvarum*, čije su vrednosti bile u opsegu od 2,42 do 3,76 g CO<sub>2</sub>/100 mL, izuzev soja *H. uvarum* Kd-12 koji je imao značajno veću vrednost (8,44±0,00 g CO<sub>2</sub>/100 mL) (tabela 4.2), što je u skladu sa istraživanjem Comi i saradnika (293), gde je utvrđeno da većina sojeva *K. apiculata* (*H. uvarum*) tokom alkoholne fermentacije sterilne šire grožđa muskat pokazala slabu fermentativnu moć (ispod 3 g CO<sub>2</sub>/100 mL), dok je manji broj sojeva pokazao veću fermentativnu moć (7-8 g CO<sub>2</sub>/100 mL). U istom istraživanju, ovi sojevi pokazali su širok opseg fermentativne moći (0,51-10,20 g CO<sub>2</sub>/100 mL) tokom fermentacije sterilne šire od mešavine crvenih sorti grožđa. Sojevi *C. famata*, kao i sojevi *M. pulcherrima* K-5 i *P. laurentii* Č-1 pokazali su umerenu fermentativnu moć (tabela 4.2). Dobijeni rezultati u skladu su sa literaturnim podacima, koji navode da različite vrste roda *Candida* i vrsta *M. pulcherrima* generalno karakteriše niska do umerena fermentativna moć (292). Najvišu vrednost fermentativne moći među analiziranim sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca imao je soj *P. kluyveri* K-1 (tabela 4.2). Istraživanje Serafino i saradnika (294) potvrdilo je da različiti sojevi vrste *P. kluyveri* pokazuju vijabilnost ćelija od 30-40%, pri koncentraciji etanola od 16% vol., čime se može objasniti dobijena visoka vrednost fermentativne moći za soj *P. kluyveri* K-1. U poređenju sa sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca, komercijalni soj *S. cerevisiae* ICV V1116 pokazao je znatno veću vrednost fermentativne moći. Ovo ukazuje da analizirani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca mogu biti od značaja za proizvodnju vina sa nižim sadržajem alkohola, ili kao starter kulture u mešovitim fermentacijama sa sojevima vrste *S. cerevisiae*.

S obzirom na to da temperatura predstavlja jedan od ključnih faktora koji utiče na prisustvo i rasprostranjenost mikroorganizama, njen uticaj odražava se značajno i na metaboličku aktivnost i brzinu rasta kvasaca. Regulacijom temperature moguće je uticati na rast, održivost i

fermentativnu aktivnost kvasaca, pri čemu niže temperature usporavaju rast i potrošnju šećera, ali povećavaju održivost ćelija (295), dok više temperature ubrzavaju proces alkoholne fermentacije i rast kvasaca (296). Promena temperature tokom alkoholne fermentacije utiče na produkciju sekundarnih metabolita, što se odražava na hemijski sastav i organoleptička svojstva vina (283,297). Većina analiziranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca pokazala je dobru otpornost na niske temperature, pri čemu su pokazali rast u temperaturnom opsegu od 4 do 20°C (tabela P4.2 u Prilogu). Pored toga, većina sojeva imala je sposobnost proizvodnje CO<sub>2</sub>. Međutim, soj *P. laurentii* Č-1, iako je bio sposoban da raste na svim testiranim temperaturama, nije bio u stanju da proizvede CO<sub>2</sub>, dok soj *R. glutinis* Gf-3 nije pokazao rast na temperaturama ispod 15°C i nije proizvodio CO<sub>2</sub> (tabela P4.2 u Prilogu). Prethodna istraživanja pokazala su slične rezultate. U istraživanju Jankura i saradnika (298) izolati ne-*Saccharomyces* kvasaca, pre svega vrste *H. uvarum*, *C. famata*, *R. glutinis* i *P. laurentii*, izolovani sa površine bobica grožđa pino grido u Slovačkoj, pokazali su nikakav ili veoma slab rast pri temperaturi od 4°C, dok su pri temperaturi od 25°C pokazali umeren do jako izražen rast. Takođe, sojevi *P. kluyveri* i *H. uvarum*, izolovani sa površine ploda kruške i ananasa, respektivno, pokazali su izražen rast na temperaturama od 19-35°C (283). Vezano za proizvodnju CO<sub>2</sub>, koja jasno ukazuje na postojanje mogućnosti korišćenja šećera i fermentativne sposobnosti kvasca (295), vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca (*H. uvarum*, *M. pulcherrima* i *P. kluyveri*) testirane u radu Sidari i saradnika (15) pokazale su intenzivnu sposobnost stvaranja CO<sub>2</sub>. SO<sub>2</sub> predstavlja jedan od najčešće korišćenih hemijskih aditiva u industriji vina, pri čemu efikasno suzbija rast brojnih mikroorganizama, uključujući kvasce, bakterije mlečne kiseline i u manjoj meri bakterije sirćetne kiseline (299). Pored antimikrobnog delovanja, SO<sub>2</sub> se primenjuje i zbog svojih antioksidativnih svojstava, koja se ogledaju u sprečavanju oksidacije vina, čime doprinosi očuvanju boje, arome, ukupnog kvaliteta i senzornih karakteristika (300). Zahvaljujući pozitivnom konzervišućem i regenerativnom efektu na aromatski profil vina, SO<sub>2</sub> se smatra najefikasnijim aditivom u proizvodnji vina. Osnovna antioksidativna funkcija ovog jedinjenja zasniva se na sposobnosti vezivanja vodonik peroksida, koji nastaje redukcijom kiseonika, pri čemu se istovremeno sprečava formiranje aldehida i oksidacija lako oksidujućih jedinjenja. Pored toga, SO<sub>2</sub> redukuje hinone u njihov fenolni oblik, čime doprinosi očuvanju i unapređenju polifenolnog sastava vina (300,301). Znajući da većina vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca pozitivno utiču na kvalitet i kompleksnost vina, izolovanje i korišćenje vrsta, odnosno sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca, koji istovremeno imaju visoku rezistentnost na SO<sub>2</sub> stvara mogućnost njihove primene u

industriji vina (302). Rezistentost na SO<sub>2</sub> ispitivana je u opsegu od 50 do 300 mg/L (133,302) i rezultati su prikazani u tabeli P4.2 u Prilogu. Osim soja *H. uvarum* Kd-12, koji nije pokazao rast pri koncentraciji SO<sub>2</sub> od 300 mg/L, ostali analizirani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca pokazali su dobru toleranciju na SO<sub>2</sub>. Dobijeni rezultati u skladu su sa prethodnim istraživanjima. Milanović i saradnici (302) pokazali su da vrsta *P. kluyveri*, izolovana sa površine bobica grožđa maraština ispoljava dobru otpornost na SO<sub>2</sub> pri koncentraciji od 200 mg/L. Slično tome, Sidari i saradnici (15) potvrdili su izrazitu tolerantnost vrste *P. kluyveri* na SO<sub>2</sub> pri koncentraciji od 300 mg/L. Pored toga, različiti sojevi vrsta *M. pulcherrima* i *H. uvarum*, izolovani sa površine grožđa i tokom spontane fermentacije, pokazali su dobru tolerantnost na visoke koncentracije SO<sub>2</sub> (do 200 mg/L) (290,303).

Jedan od najčešćih stresnih faktora sa kojima se ćelije kvasaca susreću tokom alkoholne fermentacije je povećana koncentracija etanola u fermentacionom medijumu. Visoke koncentracije etanola narušavaju stabilnost ćelijske membrane, tako što smanjuju propustljivost za različite mikronutritijente i smanjuju njenu fluidnost (304). Otpornost na etanol može se definisati kao minimalna koncentracija etanola pri kojoj nije uočen ćelijski rast kvasaca (305). Na slici 4.4 prikazan je uticaj koncentracije etanola na vijabilnost ćelija sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca. Sojevi *C. famata* odlikovali su se visokom tolerantnošću na etanol pri koncentraciji od 5% vol. uz smanjenje broja vijabilnih ćelija do 30%. Daljim povećanjem koncentracije etanola na 7% vol. ovi sojevi su održali vijabilnost u rasponu od 56 do 75%. Pri istoj koncentraciji etanola, vijabilnost sojeva *R. glutinis* Gf-3, *P. kluyveri* K-1 i *M. pulcherrima* K-5 iznosila je  $40,74 \pm 0,01\%$ ,  $44,77 \pm 4,38\%$  i  $52,00 \pm 1,04\%$ , respektivno. Većina sojeva *H. uvarum* pokazala je manju tolerantnost na etanol, budući da je pri koncentraciji od 5% vol. vijabilnost očuvalo oko 40% ćelija. Ipak, izuzetak je predstavljao soj *H. uvarum* Kd-12, kod koga je više od polovine ćelija zadržalo vijabilnost pri koncentraciji etanola od 7% vol. Povećanje koncentracije etanola na 9% vol. značajno je smanjilo broj vijabilnih ćelija analiziranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca, pri čemu su pojedini sojevi održali vijabilnost ćelija do 37%. Dalje povećanje koncentracije etanola iznad 9% vol. pokazalo se toksičnim za analizirane sojeve ne-*Saccharomyces* kvasaca, dovodeći do izraženog smanjenja sposobnosti ćelijskog rasta. Najnižu toleranciju na etanol pokazao je soj *P. laurentii* Č-1, kod koga je već pri koncentraciji od 3% vol. broj vijabilnih ćelija bio prepolovljen.



Slika 4.4 Uticaj koncentracije etanola na koncentraciju ćelija izolovanih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca: a) *C. famata* (-■- Kd-1, -○- Kd-2, -▲- Kd-4, -▽- Kd-17), b) *H. uvarum* (-■- Kd-8, -○- Kd-9, -▲- Kd-10, -▽- Kd-12, -◁- Kd-13), c) *H. uvarum* (-■- Kr-2, -○- Kr-4, -▲- Š-2, -▽- Šd-1) i d) ostali sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca (-■- *P. kluyveri* K-1, -○- *M. pulcherrima* K-5, -▲- *R. glutinis* Gf-3, -▽- *P. laurentii* Č-1). Komercijalni soj *S. cerevisiae* ICV V1116 prikazan je simbolom -◆-. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija, vertikalni barovi označavaju standardnu devijaciju.

Razlike u otpornosti analiziranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca na etanol mogu se objasniti sposobnošću modifikacije lipidnog sastava ćelijske membrane. Kod tolerantnih sojeva otpornost na etanol obezbeđuje se promenama u sastavu sterola (ergosterola) i nezasićenih masnih kiselina (palmitoleinska i oleinska kiselina), koje omogućavaju održavanje optimalnih fizičko-hemijskih svojstava lipidnog dvosloja, čime se obezbeđuje stabilnost i propustljivost ćelijske membrane u prisustvu etanola. Ovaj adaptivni mehanizam predstavlja deo šireg regulatornog sistema koji omogućava ćelijama kvasca da ublaže negativne efekte hemijskog stresa izazvanog akumulacijom etanola. Suprotno tome, kod sojeva sa nižim sadržajem ovih komponenti uočava se smanjena

otpornost, jer se ćelijska membrana teže prilagođava uslovima povećane koncentracije etanola, što dovodi do poremećaja propustljivosti i gubitka homeostaze (304,306). Istraživanje Koulouglitisa i Eriotoua (305) pokazalo je da su sojevi *C. famata*, *R. glutinis* i *P. laurentii*, izolovani sa površine grožđa sorte mavrodafni sa teritorije Kefalonije (Grčka), pokazali različit stepen otpornosti na etanol. Utvrđeno je da su pojedini sojevi *C. famata* mogli da rastu pri koncentraciji etanola do 8% vol, dok je kod sojeva *R. glutinis* rast bio moguć do 6% vol, a kod sojeva *C. laurentii* do 4% vol, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima. Pored toga, u istraživanju Barbosa i saradnika (307) različiti sojevi *M. pulcherrima* izolovani iz Douro vinske regije u Portugalu, imali su tolerantnost na etanol u koncentraciji do 6% vol, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima. Međutim, u istom istraživanju pojedini sojevi *M. pulcherrima* pokazali su tolerantnost do 9% vol, pa čak i do 12% vol. etanola, što je skoro duplo veća tolerantnost u odnosu na dobijene rezultate. Takođe, istraživanje Lai i saradnika (283) otkrilo je da su sojevi vrsta *P. kluyveri* (izolovan sa površine kruške) i *H. uvarum* (izolovan sa površine ananasa) pokazali toleranciju na etanol pri koncentraciji od 11% vol, što nije u saglasnosti sa dobijenim rezultatima. Razlike u otpornosti na etanol između sojeva iste vrste mogu se objasniti time što različiti sojevi ispoljavaju različit kapacitet za prilagođavanje lipidnog sastava ćelijske membrane, što direktno utiče na etanolnu toleranciju (305).

Sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca bili su podvrgnuti skrining olfaktornom testu, koji je omogućio njihovu klasifikaciju u dve kategorije: sojevi koji proizvode prijatnu i neprijatnu aromu sa tri nivoa intenziteta (tabela P4.2 u Prilogu). Rezultati su pokazali da je najperspektivniji soj bio *P. kluyveri* K-1, koji je razvio prijatnu voćnu aromu izraženog intenziteta. Većina sojeva *H. uvarum* pokazala je sposobnost stvaranja voćnih aroma, ali slabijeg do umerenog intenziteta. Sojevi *M. pulcherrima* K-5 i *P. laurentii* Č-1 na osnovu testa pokazali su prijatne arome umerenog intenziteta. Nasuprot tome, sojevi *C. famata* razvili su neprijatne arome umerenog do izraženog intenziteta. Slične senzorne karakteristike pokazali su sojevi *R. glutinis* Gf-3 i *H. uvarum* Kr-4, pri čemu je soj *R. glutinis* Gf-3 razvio neprijatnu aromu umerenog intenziteta, dok je soj *H. uvarum* Kr-4 na osnovu testa pokazao neprijatnu aromu izraženog intenziteta. U istraživanju Gutiérrez i saradnika (264) potvrđeno je da su vrste *P. kluyveri* i rod *Hanseniaspora* doprineli formiranju voćnih aroma izraženog, odnosno slabog do umerenog intenziteta, respektivno, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima. Suprotno tome, za vrste roda *Candida* utvrđeno je da proizvode prijatne voćne arome slabog do umerenog intenziteta, što je suprotno dobijenim rezultatima. Slično tome, vrste roda

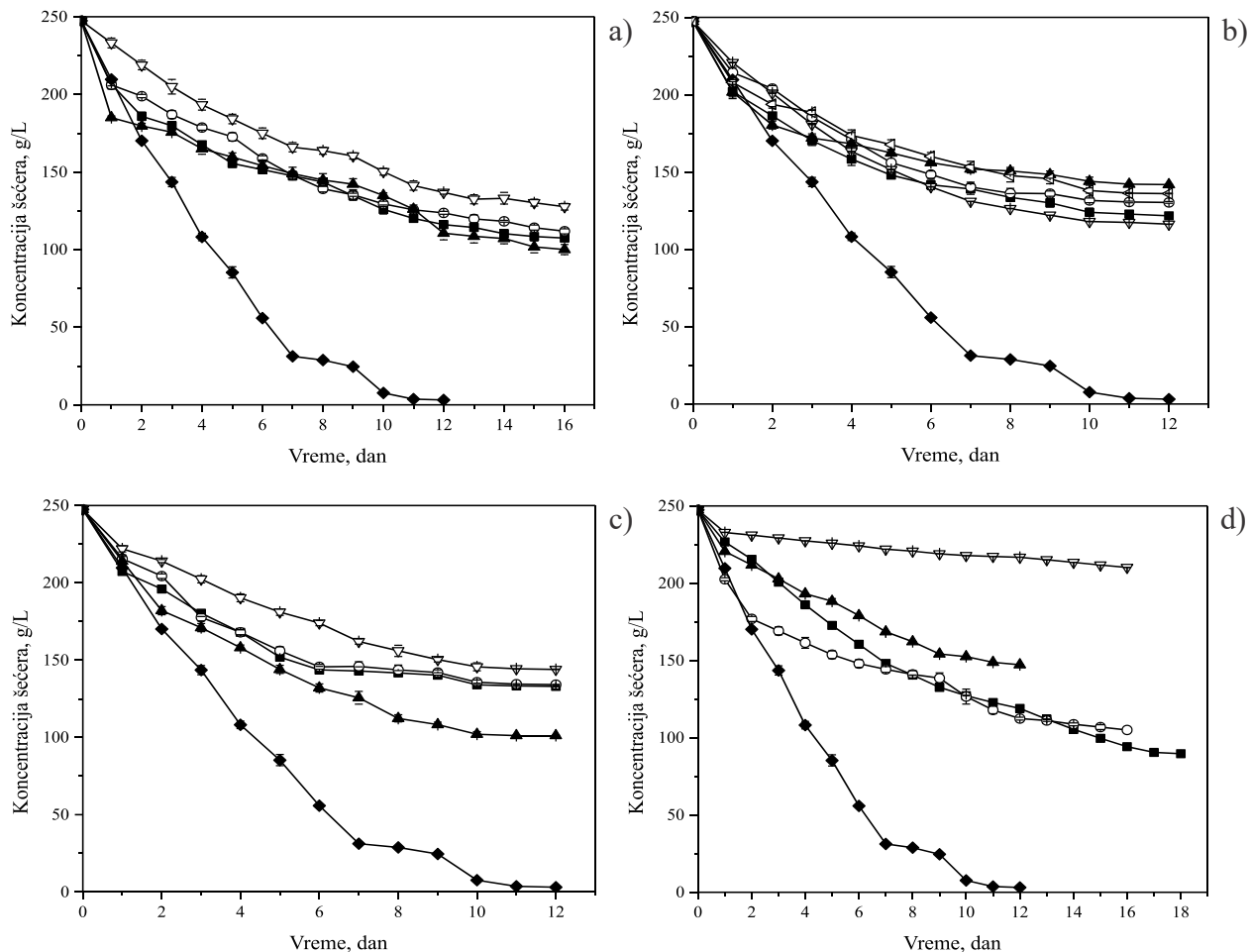
*Papiliotrema* okarakterisane su kao proizvođači neprijatnih aroma, što takođe odstupa od dobijenih rezultata. Ove razlike mogu se prepisati metaboličkim sposobnostima različitih vrsta i sojeva kvasaca.

### 4.3. Mikrovinifikacija

#### 4.3.1. Kinetika alkoholne fermentacije

U cilju procene fermentativnog i enološkog potencijala odabrani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca bili su inokulisani u pasterizovanu širu sorte grožđa prokupac, nakon čega je kinetika alkoholne fermentacije praćena na osnovu promene sadržaja šećera i oslobađanja CO<sub>2</sub>. Kratkotrajnom pasterizacijom na temperaturi od 100°C u trajanju od 20 minuta, nije došlo do značajnih promena u hemijskom sastavu šire, čime je omogućeno da se u odsustvu prirodno prisutne mikrobiote ispita isključivo potencijal inokulisanih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca, što je i potvrđeno u ranijim istraživanjima (15,308–312).

Brzina potrošnje šećera tokom trajanja fermentacije razlikovala se među analiziranim sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca (slika 4.5). U svim uzorcima zabeleženo je smanjenje koncentracije šećera u odnosu na početnu vrednost od 247,39 g/L, koje se u zavisnosti od korišćenog soja ne-*Saccharomyces* kvasaca kretalo u opsegu od 89,68 do 210,22 g/L. U kontrolnom uzorku inokulisanom komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV V1116, koncentracija šećera značajno je opadala u prvih sedam dana fermentacije, pri čemu je proces završen u roku od deset dana. Nasuprot tome, fermentacije vođene sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca trajale su duže, zahvaljujući drugačijoj regulaciji metabolizma i načinu iskorišćavanja azotnih jedinjenja, što dovodi do usporenog toka fermentacije (313,314). Sojevi *C. famata* pokazali su kontinuirano smanjenje koncentracije šećera, čija se koncentracija na kraju procesa fermentacije kretala u granicama od 100,02-127,60 g/L. Među ovim sojevima, najizraženiju sposobnost potrošnje šećera imao je soj *C. famata* Kd-4. Kontinuiranu potrošnju šećera pokazali su i sojevi *H. uvarum*, koji su, generalno, nakon dvanaest dana fermentacije potrošili polovinu dostupnog šećera. Najbolju sposobnost potrošnje šećera među ovim sojevima pokazao je soj *H. uvarum* Š-2, koji je iskoristio 60% dostupnog šećera.



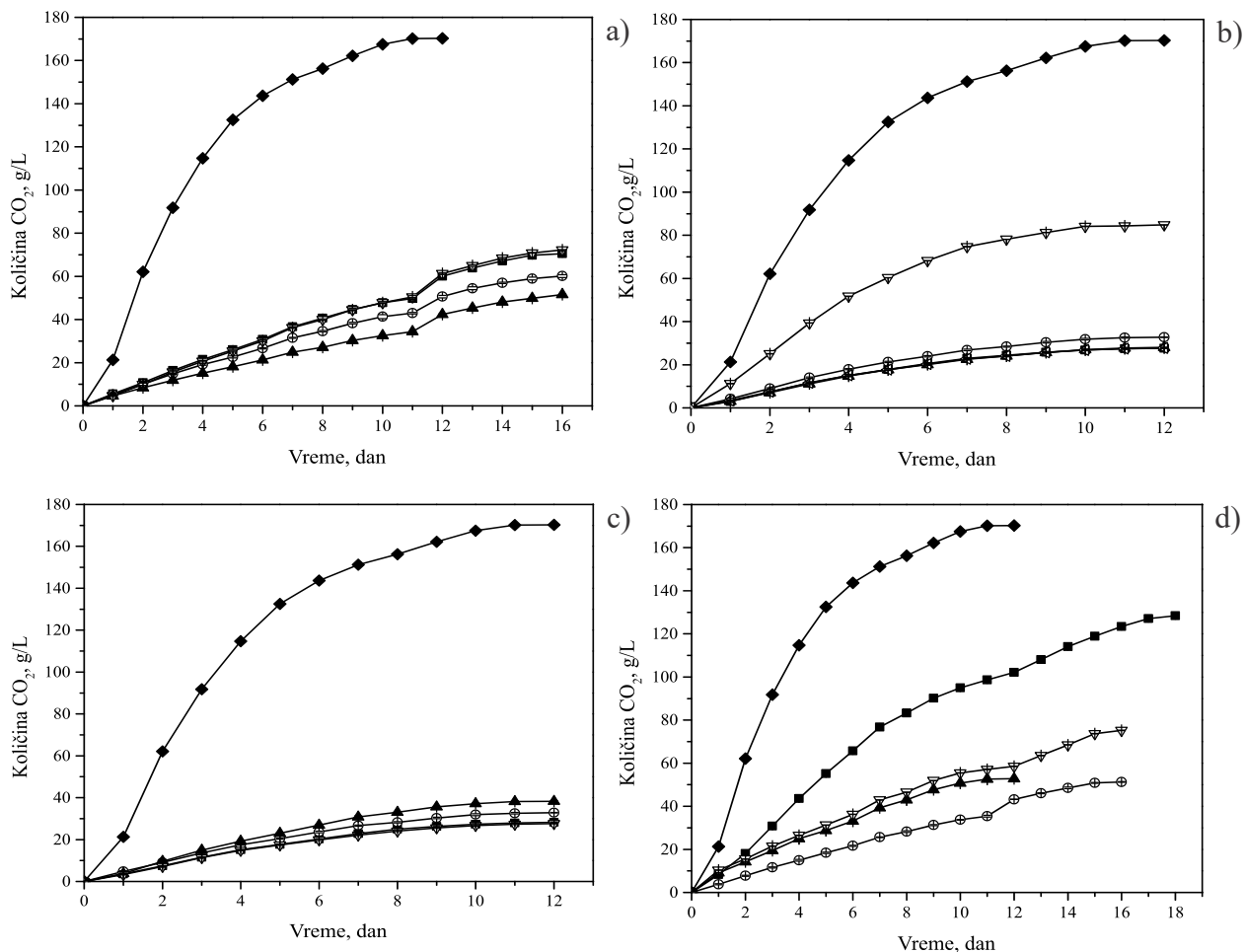
Slika 4.5 Kinetika potrošnje šećera tokom procesa alkoholne fermentacije od strane izolovanih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca: a) *C. famata* (-■- Kd-1, -○- Kd-2, -▲- Kd-4, -▽- Kd-17), b) *H. uvarum* (-■- Kd-8, -○- Kd-9, -▲- Kd-10, -▽- Kd-12, -◁- Kd-13), c) *H. uvarum* (-■- Kr-2, -○- Kr-4, -▲- Š-2, -▽- Šd-1) i d) ostali sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca (-■- *P. kluyveri* K-1, -○- *M. pulcherrima* K-5, -▲- *R. glutinis* Gf-3, -▽- *P. laurentii* Č-1). Komercijalni soj *S. cerevisiae* ICV V1116 prikazan je simbolom -◆-. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija, vertikalni barovi označavaju standardnu devijaciju.

Duže vreme trajanja fermentacije zabeleženo je u eksperimentima gde su korišćeni sojevi *M. pulcherrima* K-5 i *P. kluyveri* K-1. Koncentracije redukujućih šećera na kraju procesa fermentacije primenom ovih sojeva bile su  $105,02 \pm 0,00$  i  $89,68 \pm 0,35$  g/L, respektivno. Znatno sporija potrošnja šećera tokom procesa alkoholne fermentacije zabeležena je kod soja *R. glutinis* Gf-3, gde je nakon dvanaest dana proces zaustavljen, a sadržaj redukujućih šećera, koji je zaostao na kraju procesa iznosio je  $147,27 \pm 0,12$  g/L. Prema literaturnim podacima, vrsta *R. glutinis* favorizuje etanol kao glavni izvor ugljenika, što olakšava potvrdu da je u pitanju oksidativni kvasac (298,315). Takođe,

pokazuje efikasnu asimilaciju amonijum sulfata (315). Soj *P. laurentii* Č-1, u poređenju sa analiziranim sojevima kvasaca, pokazao je najmanju sposobnost i brzinu korišćenja šećera. U pasterezovanoj širi inokulisanoj ovim sojem, nakon šesnaestog dana fermentacije potrošeno je samo 15% početne količine šećera. Iako ovakav rezultat ukazuje da ovaj soj ima ograničenu fermentativnu aktivnost, može biti prednost u kontekstu njegove primene kao bioprotektora, što predstavlja novu i sve značajniju ulogu ne-*Saccharomyces* kvasaca u savremenom vinarstvu. Bioprotekcija podrazumeva sposobnost ovih sojeva da kompetitivno inhibiraju razvoj nepoželjnih mikroorganizama u ranim fazama alkoholne fermentacije, čime doprinose očuvanju kvaliteta i izražavanju sortnih i regionalnih karakteristika vina (316,317). Istraživanje Sun i saradnika (318) potvrdilo je prisustvo vrste *P. laurentii* sa 30% populacije u prvoj fazi spontane alkoholne fermentacije vina sorte merlot. Prethodna istraživanja pokazala su da su različite vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca (*H. uvarum*, *M. pulcherrima* i *P. kluyveri*) tokom samostalne alkoholne fermentacije vina (319,320) pokazale nisku sposobnost iskorišćavanja ukupnog šećera, uz spor proces fermentacije i izostanak potpunog završetka alkoholne fermentacije, što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Ovakvi rezultati u skladu su i sa navodima Cinania (321), koji ukazuje na pojavu zaustavljenih ili usporenih fermentacija primenom različitih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca. Sporija kinetika alkoholne fermentacije može se objasniti sporijom potrošnjom hranljivih materija od strane kvasaca za metaboličke aktivnosti (281,322) ili toksičnim dejstvom etanola (306,323). Međutim, različita istraživanja su pokazala da ne-*Saccharomyces* kvasci, zahvaljujući svojoj sposobnosti da započnu proces alkoholne fermentacije, mogu biti kvalifikovani za upotrebu kao starter kulture, čime se povećava kompleksnost aromatskog profila vina i doprinosi poboljšanju hemijskih i senzornih karakteristika vina (324,325).

Na slici 4.6 je prikazana kinetika oslobađanja CO<sub>2</sub> tokom procesa mikroviniifikacija. Brzina oslobađanje CO<sub>2</sub> od strane komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV V1116 naglo raste tokom prvih pet dana fermentacije dostižući vrednosti od 17-40 g/L dan (tabela P4.3 u Prilogu). U narednih pet dana, brzina oslobađanja CO<sub>2</sub> opala je na približno 7 g/L dan, dok je do kraja procesa iznosila oko 2 g/L dan, gde je ukupna količina CO<sub>2</sub> iznosila 170,28±0,12 g/L. Dnevno oslobađanje CO<sub>2</sub> aktivnošću sojeva *C. famata* nije se značajno menjalo tokom perioda mikroviniifikacije među ovim sojevima i iznosilo je do maksimalno 10 g/L dan (tabela P4.3 u Prilogu). Na osnovu ukupno oslobođenog CO<sub>2</sub>, sojevi *C. famata* mogu se svrstati u dve grupe. Prvu grupu čine sojevi Kd-2 i

Kd-4, koji su stvorili oko 60 g/L ukupne količine CO<sub>2</sub>, dok su druga dva soja Kd-1 i Kd-17 stvorili preko 70 g/L ukupne količine CO<sub>2</sub>.

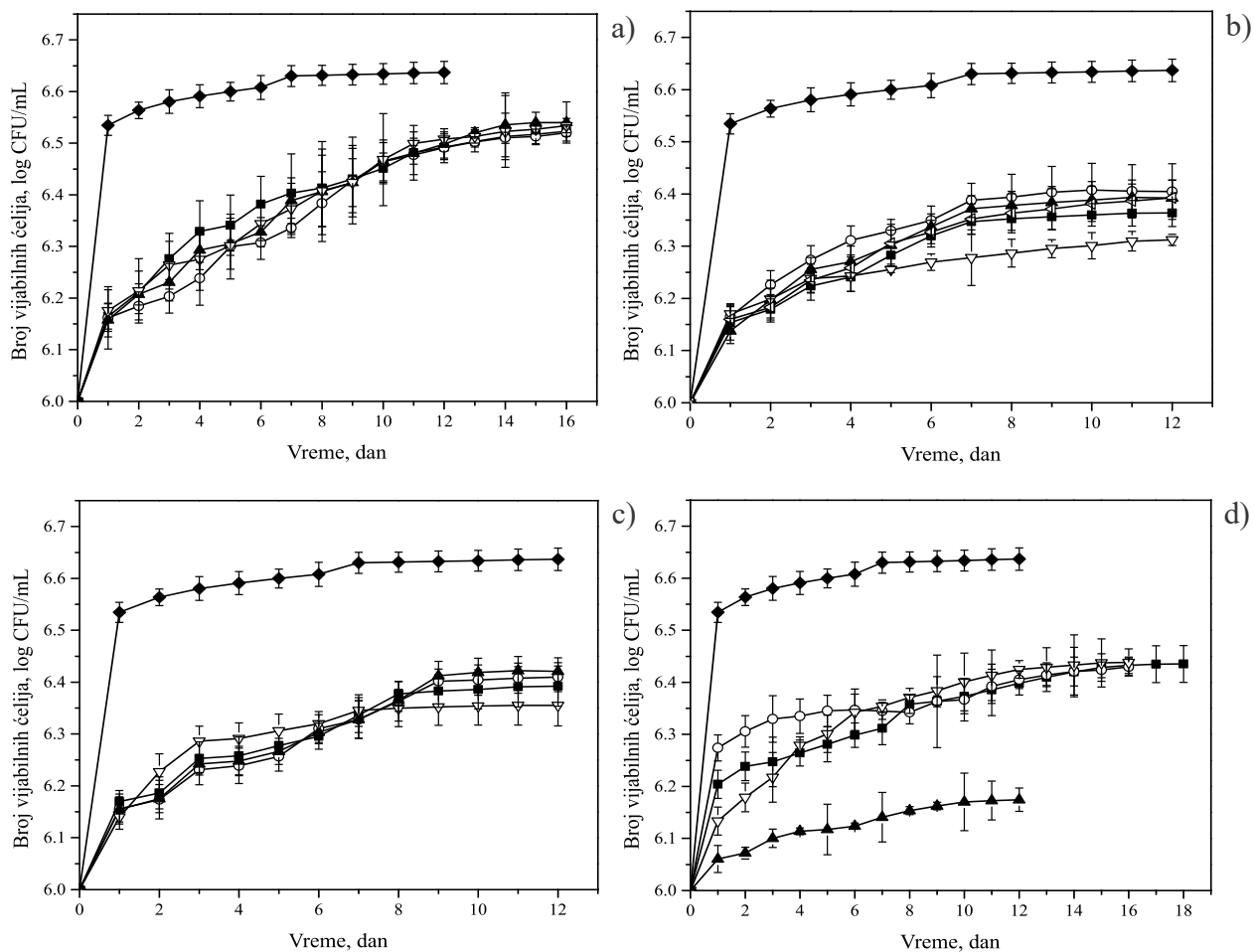


Slika 4.6 Kinetika produkcije CO<sub>2</sub> tokom procesa alkoholne fermentacije od strane izolovanih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca: a) *C. famata* (-■- Kd-1, -○- Kd-2, -▲- Kd-4, -▽- Kd-17), b) *H. uvarum* (-■- Kd-8, -○- Kd-9, -▲- Kd-10, -▽- Kd-12, -◁- Kd-13), c) *H. uvarum* (-■- Kr-2, -○- Kr-4, -▲- Š-2, -▽- Šd-1) i d) ostali sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca (-■- *P. kluyveri* K-1, -○- *M. pulcherrima* K-5, -▲- *R. glutinis* Gf-3, -▽- *P. laurentii* Č-1). Komercijalni soj *S. cerevisiae* ICV V1116 prikazan je simbolom -◆-. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija, vertikalni barovi označavaju standardnu devijaciju.

Među sojevima *H. uvarum*, po najvećoj proizvedenoj količini CO<sub>2</sub> izdvaja se soj *H. uvarum* Kd-12 kod koga je zabeležena ukupna količina CO<sub>2</sub> od 84,79±0,03 g/L, što je za 30-45% više u odnosu na ostale sojeve *H. uvarum*. Kod ostalih sojeva *H. uvarum* količina oslobođenog CO<sub>2</sub> bila je u granicama od 27,59-38,32 g/L. Kod svih analiziranih sojeva *H. uvarum* najveća oslobođena

količina CO<sub>2</sub> zabeležena je trećeg dana fermentacije i kretala se u širokom opsegu od 4,05 do 14,25 g/L dan (tabela P4.3 u Prilogu). Ukupna količina CO<sub>2</sub> od 128,42±0,15 g/L zabeležena je u mikroviniifikaciji sa sojem *P. kluyveri* K-1. Dnevno oslobađanje CO<sub>2</sub> primenom ovog soja bilo je u granicama od 4-12 g/L dan (tabela P4.3 u Prilogu). U mikroviniifikaciji sa sojem *P. laurentii* Č-1 količina CO<sub>2</sub> iznosila je 75,18±0,09 g/L, s tim da je prvog dana fermentacije zabeležena najveća količina oslobađanja CO<sub>2</sub> (10,35±0,05 g/L dan) (tabela P4.3 u Prilogu). Sojevi *M. pulcherrima* K-5 i *R. glutinis* Gf-3 imali su sposobnost stvaranja slične količine CO<sub>2</sub>, koja je iznosila 51,32±0,16 i 52,83±0,03 g/L, respektivno. Tokom procesa mikroviniifikacije soj *M. pulcherrima* K-5 uglavnom je pokazivao ujednačeno oslobađanje CO<sub>2</sub> (3 g/L dan) (tabela P4.3 u Prilogu), uz male promene tokom procesa. Soj *R. glutinis* Gf-3 tokom prvog dana je zabeležio najveće oslobađanje CO<sub>2</sub> (9,11±0,10 g/L dan) i do kraja procesa mikroviniifikacije oslobađanje CO<sub>2</sub> je bilo u proseku oko 4 g/L dan (tabela P4.3 u Prilogu). Slični rezultati uočeni su u istraživanju Zhang i saradnika (326), gde su različiti sojevi vrste *H. uvarum* tokom samostalne fermentacije sterilne šire kaberne sovinjon doprineli oslobađanju CO<sub>2</sub> u koncentracijama od 15-35 g/L. Pored toga, pojedini sojevi *K. apiculata* (telemorfni oblik *H. uvarum*) bili su u stanju da oslobode CO<sub>2</sub> u koncentracijama oko 80 g/L tokom mikroviniifikacije sterilne šire sorte moscato (293), što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Međutim, u istraživanju Lorenzini i saradnika (327) vrsta *P. kluyveri* tokom samostalne fermentacije pasterizovane šire sorte corvina oslobodila je CO<sub>2</sub> u količini od 24,10 g/L, što je pet puta manja količina CO<sub>2</sub> u odnosu na dobijenu vrednost za soj *P. kluyveri* K-1, što potvrđuje njegovu izraženiju fermentativnu sposobnost. Tokom samostalne fermentacije pasterizovane šire sorte tanat, vrsta *M. pulcherrima* proizvela je oko 80 g/L ukupnog CO<sub>2</sub> (328), što je za oko 35% više u odnosu na rezultate dobijene u ovom istraživanju. Razlike u količini oslobođenog CO<sub>2</sub> između različitih sojeva iste vrste kvasaca mogu se objasniti razlikama u sposobnosti usvajanja i iskorišćavanja dostupnih izvora asimilirajućeg azota iz fermentacionog medijumu. Sastav asimilirajućeg azota (aminokiseline i amonijum joni) direktno utiče na rast i metaboličku aktivnost kvasca, uključujući brzinu fermentacije i oslobađanje CO<sub>2</sub>. Neki sojevi kvasaca mogu efikasnije da iskoriste pojedine izvore asimilirajućeg azota, dok drugi pokazuju ograničenu sposobnost njihovog usvajanja, što može biti posledica genetskih razlika, koje utiču na regulaciju metabolizma azota i izlučivanje gena uključenih u transport i biosintezu aminokiselina (329,330).

Tokom procesa alkoholne fermentacije praćen je broj vijabilnih ćelija, čija je kinetika rasta prikazana na slici 4.7. Tokom prva dva dana fermentacije, komercijalni soj *S. cerevisiae* ICV V1116 ušao je u eksponencijalnu fazu rasta, pri čemu je broj vijabilnih ćelija iznosio  $6,56 \pm 0,02$  log CFU/mL. U narednom periodu, tokom stacionarne faze broj ćelija se nije značajno menjao i do kraja procesa alkoholne fermentacije dostigao je maksimalnu vrednost od  $6,64 \pm 0,02$  log CFU/mL.



Slika 4.7 Kinetika rasta ćelija izolovanih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca tokom procesa alkoholne fermentacije: a) *C. famata* (-■- Kd-1, -○- Kd-2, -▲- Kd-4, -▽- Kd-17), b) *H. uvarum* (-■- Kd-8, -○- Kd-9, -▲- Kd-10, -▽- Kd-12, -◁- Kd-13), c) *H. uvarum* (-■- Kr-2, -○- Kr-4, -▲- Š-2, -▽- Šd-1) i d) ostali sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca (-■- *P. kluyveri* K-1, -○- *M. pulcherrima* K-5, -▲- *R. glutinis* Gf-3, -▽- *P. laurentii* Č-1). Komercijalni soj *S. cerevisiae* ICV V1116 prikazan je simbolom -◆-. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija, vertikalni barovi označavaju standardnu devijaciju.

Među sojevima *C. famata* primećene su slične krive rasta, gde je najveće povećanje broja ćelija zabeleženo prvog dana fermentacije, kada je koncentracija dostigla vrednost između 6,16 i 6,18 log CFU/mL. Tokom perioda od drugog do osmog dana fermentacije, primećen je postepeni i kontinuirani rast broja ćelija, pri čemu je koncentracija iznosila od 6,38-6,41 log CFU/mL. Do kraja procesa fermentacije, sojevi *C. famata* pokazali su porast, dostižući konačne vrednosti od 6,52-6,54 log CFU/mL. Sličan ćelijski rast tokom prvog dana fermentacije pokazali su i sojevi *H. uvarum*, pri čemu je koncentracija ćelija iznosila 6,14-6,17 log CFU/mL. Eksponencijalna faza kod ovih sojeva trajala je od drugog do osmog dana, kada je broj ćelija dostizao vrednosti u rasponu od 6,29 do 6,39 log CFU/mL. Nakon osmog dana pa sve do završetka fermentacije uočena je stacionarna faza, u okviru koje su vrednosti broja ćelija bile stabilne i kretale se od 6,31-6,42 log CFU/mL. Najveći porast broja ćelija primećen je kod sojeva *M. pulcherrima* K-5 ( $6,27 \pm 0,03$  log CFU/mL) i *P. kluyveri* K-1 ( $6,20 \pm 0,03$  log CFU/mL) tokom prvog dana fermentacije, što ukazuje da su ćelije bile dobro prilagođene fermentacionim uslovima u širi. Od drugog do sedmog dana fermentacije primećen je eksponencijalni rast u kojem je vrednost broja ćelija za soj *M. pulcherrima* K-5 iznosila  $6,34 \pm 0,02$  log CFU/mL, dok je za *P. kluyveri* bila  $6,31 \pm 0,03$  log CFU/mL. Do kraja procesa alkoholne fermentacije oba soja imala su sličan broj živih ćelija oko 6,44 log CFU/mL. Sličnu dinamiku rasta pokazao je i soj *P. laurentii* Č-1 sa maksimalnim brojem ćelija od  $6,44 \pm 0,03$  log CFU/mL. U eksperimentu sa sojem *R. glutinis* Gf-3 zabeležen je najmanji broj vijabilnih ćelija, pri čemu je maksimalno dostignuta vrednost iznosila  $6,17 \pm 0,02$  log CFU/mL. Iako je početni broj ćelija u svim eksperimentima bio isti (6 log CFU/mL), maksimalna koncentracija ćelija kod sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca bila je značajno niža u poređenju sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV V1116. Ovakva razlika može se objasniti sposobnošću vrste *S. cerevisiae* da efikasno raste i razmnožava se u striktno anaerobnim uslovima, dok većina drugih vrsta kvasaca, uključujući rodove ne-*Saccharomyces* kvasca pokazuju ograničenu adaptaciju i usporen rast pri nedostatku kiseonika (90). U istraživanju Li i saradnika (331), tokom samostalne fermentacije sintetičke šire sa početnim brojem ćelija od 6 log CFU/mL vrsta *P. kluyveri* dostigla je maksimalnu koncentraciju ćelija od 8,30 log CFU/mL. Tokom samostalne fermentacije pasterizovane šire sorte sovinjon blanc (90), pasterizovanog soka od breskve (332) i pasterizovanog soka od višnje (309), vrsta *M. pulcherrima* sa početnim brojem ćelija od 6 log CFU/mL, postigla je maksimalan broj vijabilnih ćelija od 8,23 log CFU/mL, 7,99 log CFU/mL i 6,17 log CFU/mL, respektivno. U istraživanju Zohrea i Ertena (319) tokom samostalne

fermentacije sterilne šire grođža sorte emir, sa početnim brojem ćelija od 6 log CFU/mL, vrste *K. apiculata* i *C. pulcherrima* dostigle su maksimalan broj vijabilnih ćelija od 7,82 log CFU/mL. Tokom fermentacije pasterizovanog soka od breskve sa čistom kulturom *H. uvarum* postignut maksimalan broj ćelija iznosio je 7,56 log CFU/mL (332). Razlike u broju vijabilnih ćelija u odnosu na dobijene rezultate verovatno su posledica dostupnosti i efikasnosti u potrošnji asimilirajućeg azota (aminokislina i amonijum jona), koji neposredno utiče na rast i održavanje populacije kvasaca (333).

#### **4.3.2. Hemijska karakterizacija vina**

Profil i koncentracija organskih kiselina u vinu važni su parametri koji utiču na kvalitet, senzorne karakteristike i mikrobiološku stabilnost vina (334,335). Stoga je u uzorcima vina dobijenih postupkom mikrovinifikacije određena koncentracija organskih kiselina (vinska, jabučna, limunska, ćilibarna, mlečna, sirćetna i izobuterna kiselina), kao i glicerola, etanola i redukujućih šećera (glukoza i fruktoza). Rezultati su prikazani u tabeli 4.3.

Vinska kiselina je najzastupljenija organska kiselina u svim uzorcima vina. Njena koncentracija kretala se u granicama od 4,17-5,57 g/L. Budući da kvasci ne proizvode vinsku kiselinu tokom procesa alkoholne fermentacije, nije bilo očekivano da njena koncentracija zavisi od primenjenog soja kvasca. Međutim, prethodna istraživanja pokazala su da pojedine vrste kvasaca, uključujući *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Schizosaccharomyces*, *Hansenula* i dr., pri većoj koncentraciji ćelija imaju sposobnost razgradnje određene količine vinske kiseline. Iako je zabeležen nizak nivo razgradnje, rezultati pokazuju da on može varirati u zavisnosti od primenjenog soja kvasca (336–338). Najniža koncentracija vinske kiseline određena je u kontrolnom uzorku ( $3,45 \pm 0,17$  g/L). Niža koncentracija vinske kiseline može se objasniti fizičko-hemijskim mehanizmima, kao što su akumulacija etanola ili neutralizacija katjonima ( $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ) i taloženje, kako navode Scutaraşua i saradnici (339).

Tabela 4.3 Sadržaj organskih kiselina, glicerola, redukujućih šećera (g/L) i etanola (% vol.) u uzorcima vina dobijenih primenom izolovanih sojeva *ne-Saccharomyces* kvasaca

Uzorak	Vinska kiselina	Jabučna kiselina	Limunska kiselina	Čilibarna kiselina	Mlečna kiselina	Sričetna kiselina	Izobuterna kiselina*	Glukoza	Fruktoza	Glicerol	Etanol
Šira	5,85±0,29l	3,23±0,01hi	-	-	-	-	-	120,85±3,24l	115,43±2,78j	-	-
<i>C. famata</i> Kd-1	5,09±0,06fg	2,86±0,05fg	0,00±0,00a	0,62±0,02c	1,84±0,08f	0,01±0,01a	0,00±0,00a	25,94±1,57c	64,31±1,74g	4,98±0,21i	6,42±0,26g
<i>C. famata</i> Kd-2	5,17±0,03fgh	3,37±0,06ij	0,00±0,00a	0,91±0,04e	0,98±0,02b	0,01±0,00a	0,00±0,00a	31,74±3,11d	62,92±2,35fg	3,94±0,25def	6,12±0,28fg
<i>C. famata</i> Kd-4	5,51±0,02hij	3,56±0,06j	0,00±0,00a	0,56±0,03c	1,49±0,01de	0,02±0,01a	0,00±0,00a	51,22±2,28f	79,73±2,61i	3,53±0,11bcd	5,93±0,18f
<i>C. famata</i> Kd-17	5,35±0,06ghi	3,22±0,06hi	0,00±0,00a	0,85±0,01e	1,17±0,03bc	0,01±0,01a	0,00±0,00a	28,83±1,51cd	61,57±1,50fg	3,48±0,22bc	6,52±0,33gh
<i>H. uvarum</i> Kd-8	5,07±0,16ij	3,00±0,11fgh	0,00±0,00a	0,00±0,00de	0,00±0,00a	0,63±0,07ef	0,00±0,00a	57,57±0,10cd	53,60±0,07fg	3,47±0,06c	3,50±0,02bc
<i>H. uvarum</i> Kd-9	5,19±0,04efg	2,54±0,12e	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,20±0,06a	0,58±0,02ef	0,00±0,00a	76,31±0,10g	60,72±0,12de	3,74±0,07bcd	4,16±0,01d
<i>H. uvarum</i> Kd-10	5,03±0,08fgh	2,85±0,07f	0,10±0,03a	0,00±0,00a	0,09±0,06a	0,56±0,01def	0,38±0,05c	62,09±1,82j	51,21±0,22f	3,35±0,08bce	3,13±0,02b
<i>H. uvarum</i> Kd-12	4,25±0,17fg	1,39±0,13bc	0,08±0,02b	0,33±0,09a	1,09±0,17b	0,69±0,15f	0,00±0,00a	62,94±0,28h	54,61±0,20cd	3,09±0,13b	6,50±0,21g
<i>H. uvarum</i> Kd-13	5,28±0,10gh	2,96±0,10fg	0,10±0,06b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,54±0,06def	0,24±0,06b	64,16±0,20h	56,13±0,14e	3,74±0,08cde	3,20±0,02b
<i>H. uvarum</i> Kr-2	4,87±0,10def	2,86±0,05fg	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,60±0,12ef	0,00±0,00a	56,41±0,66g	49,12±0,10c	4,07±0,10efg	3,55±0,01bc
<i>H. uvarum</i> Kr-4	4,71±0,07cde	3,11±0,09gh	0,12±0,05b	0,00±0,00a	0,11±0,04a	0,56±0,06def	0,20±0,05b	57,17±0,10g	50,95±0,08cd	3,37±0,07bc	3,88±0,01cd
<i>H. uvarum</i> Š-2	5,03±0,15efg	2,22±0,04d	0,13±0,04b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,57±0,05def	0,00±0,00a	47,62±0,06e	29,97±0,04b	4,40±0,06gh	4,68±0,01e
<i>H. uvarum</i> Šd-1	5,12±0,09fg	3,22±0,06hi	0,11±0,05b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,62±0,07ef	0,21±0,06b	57,25±0,08g	51,36±0,39cd	4,33±0,08fgh	3,47±0,01bc
<i>P. kluyveri</i> K-1	4,17±0,09b	1,14±0,11ab	0,09±0,02b	0,68±0,17cd	1,42±0,13cd	0,44±0,17cde	0,00±0,00a	22,22±0,26b	62,45±0,42fg	5,52±0,21j	6,98±0,21h
<i>M. pulcherrima</i> K-5	5,57±0,07b	3,03±0,06fgh	0,00±0,00ab	0,81±0,02b	1,71±0,06ef	0,56±0,02def	0,00±0,00a	28,82±0,26h	62,11±0,29e	4,70±0,14hi	5,71±0,05f
<i>R. glutinis</i> Gf-3	4,47±0,14bc	1,41±0,10c	0,07±0,02ab	0,12±0,04a	1,40±0,15cd	0,29±0,08bc	0,00±0,00a	71,90±0,38i	73,92±0,42h	0,48±0,03a	0,12±0,05a
<i>P. laurentii</i> Č-1	4,52±0,09bcd	1,64±0,09c	0,05±0,00ab	0,10±0,03a	1,17±0,12bc	0,20±0,06ab	0,00±0,00a	97,22±0,31k	113,56±0,48j	3,10±0,20b	0,13±0,01a
<i>S. cerevisiae</i> ICV V1116	3,45±0,17a	1,08±0,08a	0,11±0,01ab	0,53±0,12c	1,95±0,17f	0,34±0,09bcd	0,00±0,00a	2,54±0,13a	1,10±0,10a	4,70±0,22hi	12,68±0,17i

\* Izobuterna kiselina, mg/L. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n = 3). Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na statistički značajnu razliku vrednosti u istoj koloni pri nivou značajnosti  $p < 0,05$  (Tukey HSD test).

Jabučna kiselina doprinosi intenzivnom i začinskom ukusu vina, ali pri većim koncentracijama može izazvati osećaj oporosti (334). Prema literaturnim podacima, koncentracija jabučne kiseline u vinu može dostići i do 7 g/L (340), a njen sadržaj u značajnoj meri zavisi od fermentacionih uslova, tipova fermentacije i primenjenih sojeva kvasaca, ali i od procesa konverzije u mlečnu kiselinu tokom malolaktične fermentacije (326,341). Statistička analiza pokazala je značajne razlike u koncentraciji jabučne kiseline među većine uzoraka vina. U uzorcima vina dobijenih primenom sojeva *C. famata* Kd-4 i Kd-2 određene su najveće koncentracije jabučne kiseline, što znatno premašuju vrednosti (0,06-2,67 g/L) koje su bile prisutne u različitim španskim, brazilskim, nemačkim i češkim vinima (342). U ostalim uzorcima vina dobijenih primenom sojeva *C. famata*, detektovane su manje količine jabučne kiseline, čiji je sadržaj bio u rasponu od 2,86 do 3,22 g/L. Prema navodima Vicente i saradnika (340) kvasci mogu da stvore jabučnu kiselinu kroz metaboličke mehanizme koji uključuju fumaratni put, katalizovan citosolnom ili mitohondrijalnom fumarazom, i oksaloacetatni put, u kojem se konverzija oksaloacetata u malat odvija uz posredstvo enzima malat dehidrogenaze. U odnosu na početnu vrednost jabučne kiseline u širi u uzorcima dobijenim fermentacijom primenom sojeva *H. uvarum* (Kd-10, Kd-13, Kr-2 i Š-2) dobijena su vina sa sadržajem ove kiseline manjim za oko 10-30%. Izuzetak je predstavljao soj *H. uvarum* Kd-12 čijom je primenom dobijeno vino da sadržajem jabučne kiseline manjim za više od 50% u odnosu na početnu vrednost u širi. Sojevi *R. glutinis* Gf-3 i *P. laurentii* Č-1 dali su vina sa znatno manjim sadržajem jabučne kiseline, pri čemu je koncentracija u uzorcima vina dobijenih ovim sojevima iznosila  $1,41 \pm 0,10$  i  $1,64 \pm 0,09$  g/L, respektivno. Uzorak vina dobijen primenom soja *P. kluyveri* K-1 sadržao je najnižu koncentraciju jabučne kiseline ( $1,14 \pm 0,11$  g/L) u poređenju sa većinom uzoraka vina dobijenih primenom ne-*Saccharomyces* kvasaca. Koncentracija jabučne kiseline bila je značajno niža u uzorku vina dobijenom primenom komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV V1116. Prema navodu Zhang i saradnika (343) kvasci mogu da usvajaju jabučnu kiselinu iz fermentacionog medijuma, pri čemu može doći do smanjenja njene koncentracije i do 40%. Smanjenje koncentracije jabučne kiseline najverovatnije je posledica njenog unosa u ćelije kvasca putem pasivne difuzije ili delimičnog razlaganja (344). Dobijeni rezultati u skladu su sa istraživanjem Ge i saradnika (345) koji su pokazali da različite vrste ne-*Saccharomyces* kvasca (*H. uvarum*, *M. pulcherrima*, *P. kluyveri*, *C. zemplinina*, *P. laurentii* i dr.) tokom samostalne fermentacije šire sorte vidal smanjuju sadržaj jabučne kiseline.

U pojedinim uzorcima vina uočeno je prisustvo nižih koncentracija limunske kiseline (0,05-0,13 g/L). Dobijene vrednosti koncentracija limunske kiseline bile su oko dva puta manje u odnosu na koncentracije određene u uzorcima vina dobijenih primenom različitih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca (335). U istraživanju De Benedictis i saradnika (346), vrednosti koncentracija limunske kiseline, u uzorcima vina dobijenih primenom različitih sojeva *H. uvarum* tokom fermentacije šire od sorte grožđa negroamaro, bile su oko deset puta veće u odnosu na dobijene vrednosti. Neslaganje rezultata može se pripisati različitim sojevima vrste *H. uvarum*.

Koncentracija mlečne kiseline varirala je među analiziranim uzorcima vina. Među uzorcima vina dobijenih primenom različitih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca, najveća koncentracija mlečne kiseline zabeležena je u uzorcima vina dobijenim primenom sojeva *C. famata* Kd-1 i *M. pulcherrima* K-5. Ostali primenjeni sojevi ne-*Saccharomyces* kvasca pokazali su različitu sposobnost proizvodnje mlečne kiseline, što omogućava njihovu podelu u tri grupe. Prvu grupu činili su sojevi *C. famata* Kd-4, *P. kluyveri* K-1 i *R. glutinis* Gf-3 koji su proizveli mlečnu kiselinu u opsegu od 1,40 do 1,50 g/L. Druga grupa obuhvatala je sojeve koji su doprineli stvaranju mlečne kiseline oko 1,00 g/L (*C. famata* Kd-2, Kd-17, *H. uvarum* Kd-12 i *P. laurentii* Č-1). U treću grupu ubrajali su se sojevi *H. uvarum* (Kd-9, Kd-10 i Kr-4) koji su stvorili mlečnu kiselinu do 0,20 g/L. Sa druge strane, nekoliko sojeva *H. uvarum* (Kd-8, Kd-13, Kr-2, Š-2 i Šd-1) nisu pokazali sposobnost proizvodnje ove kiseline. Međutim, literaturni podaci pokazuju drugačije rezultate. U istraživanju Ge i saradnika (345) različite vrste ne-*Saccharomyces* kvasca tokom samostalne fermentacije sterilne šire sorte vidal proizvele su različite koncentracije mlečne kiseline. Vrsta *H. uvarum* doprinela je proizvodnji mlečne kiseline od 0,82 g/L, vrste *C. zemplinina* i *M. pulcherrima* proizvele su mlečnu kiselinu u koncentracijama od 0,74 i 0,66 g/L, respektivno, dok su vrste *P. laurentii* i *P. kluyveri* stvorili manje količine mlečne kiseline (0,38 i 0,34 g/L, respektivno). Istraživanje Lu i saradnika (347) pokazalo je da su komercijalno dostupni sojevi vrsta *M. pulcherrima* i *P. kluyveri* tokom samostalne fermentacije pasterizovanog medijuma, koji je dobijen od voća durijan, proizveli mlečnu kiselinu u koncentracijama od 0,20 i 0,53 g/L, respektivno. Razlike u proizvodnji mlečne kiseline između različitih sojeva istih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca mogu se objasniti genetskim i regulatornim razlikama koje utiču na izlučivanje i aktivnost enzima laktat dehidrogenaze i od toga da li je metabolički put piruvata usmeren ka proizvodnji mlečne kiseline ili etanola (348).

Prisustvo sirćetne kiseline prvenstveno je povezano sa aktivnošću bakterija, ali može biti i nusproizvod alkoholne fermentacije. Sadoudi i saradnici (349) navode da se sirćetna kiselina pretežno formira u početnoj fazi alkoholne fermentacije, odnosno tokom fermentacije prvih 50-100 g/L ukupnih šećera. Koncentracija sirćetne kiseline veća od 0,90 g/L negativno utiče na kvalitet vina, pružajući primetan gorko kiseli ukus, bez izazivanja jakog mirisa (335,350). Uprkos činjenici da se ne-*Saccharomyces* kvasci često dovode u vezu sa povećanjem proizvodnje sirćetne kiseline (134,351), dobijeni rezultati pokazali su suprotno. U uzorcima vina dobijenih primenom sojeva *C. famata* detektovano je prisustvo neznatne količine sirćetne kiseline, čija koncentracija nije prelazila 0,02 g/L. Nasuprot tome, u uzorcima vina dobijenih primenom sojeva *H. uvarum* koncentracija sirćetne kiseline varirala je u rasponu od 0,54 do 0,69 g/L. Ostali analizirani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasca pokazali su različitu sposobnost proizvodnje sirćetne kiseline, pri čemu su zabeležene koncentracije bile u intervalu od 0,20 g/L (*P. laurentii* Č-1) do 0,56 g/L (*M. pulcherrima* K-5). Dobijeni rezultati u skladu su sa prethodnim istraživanjima. Istraživanje Romano i saradnika (352), koje je obuhvatilo 48 sojeva *K. apiculata*, pokazalo je da su pojedini sojevi stvorili manje od 0,07 g/L sirćetne kiseline, dok je većina sojeva proizvela između 0,20 i 0,60 g/L. Pored toga, različiti sojevi vrste *H. uvarum* tokom samostalne fermentacije pasterizovane šire sorte nebiolo proizveli su sirćetnu kiselinu u koncentraciji od 0,43 do 0,68 g/L (294). Sojevi vrste *P. kluyveri* tokom samostalne fermentacije šire sorte nebiolo (294) i gevirctraminer (353) proizveli su sirćetnu kiselinu u koncentracijama od 0,37 do 0,54 g/L. Sa druge strane, pojedini sojevi vrste *K. apiculata* proizveli su nešto veće količine sirćetne kiseline u različitim belim i crvenim vinima (293,319,354). Sojevi vrste *M. pulcherrima* tokom samostalne fermentacije različitih vrsta šira doprineli su proizvodnji sirćetne kiseline u koncentracijama od 0,11 do 0,16 g/L (90,294). Razlike u produkciji sirćetne kiseline pripisuju se sastavu fermentacionog medijuma i uslovima fermentacije, kao i samom soju kvasca (355).

Ćilibarna kiselina igra ključnu ulogu u pružanju mikrobiološke stabilnosti vina kroz regulaciju kiselosti i pH vrednosti, dok istovremeno štiti boju i senzorna svojstva vina, zahvaljujući povećanju sadržaja voćnih aromatskih estara, kao što su metil sukcinat, etil sukcinat i dietil sukcinat (356,357). U pojedinim uzorcima vina dobijenih primenom različitih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca koncentracija ćilibarne kiseline bila je u granicama od 0,10-0,91 g/L, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala da različite vrste ne-*Saccharomyces*

kvasaca (*Candida stellata*, *Candida zeylanoides*, *H. uvarum*, *M. pulcherrima* i dr.) tokom alkoholne fermentacije proizvode ćilibarnu kiselinu u rasponu od 0,25 do 1,00 g/L (177,357,358). Prisustvo izobuterne kiseline bilo je detektovano u pojedinim uzorcima vina dobijeni primenom sojeva *H. uvarum*. Najveća koncentracija izobuterne kiseline ( $0,38 \pm 0,05$  mg/L) bila je prisutna u uzorku vina dobijenom primenom soja Kd-10, dok je najmanja koncentracija bila u uzorku dobijenom primenom soja Kr-4 ( $0,20 \pm 0,05$  mg/L). Iako izobuterna kiselina može negativno da utiče na aromatski i senzorni profil vina u koncentracijama većim od 2,30 mg/L (359), u manjim koncentracijama doprinosi kompleksnosti aromatskog profila vina (360). Sojevi koji imaju sposobnost da produkuju ovu kiselinu mogu biti prepoznati kao potencijalni kandidati za proizvodnju etil izobutirata, što je od posebnog značaja zbog doprinosa ovog estera formiranju voćnih i senzorno prihvatljivih aroma.

Ukupna količina glukoze i fruktoze u uzorku vina dobijenom primenom komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV V1116 bila je niža od 3 g/L, dok je u uzorcima vina dobijenih primenom ne-*Saccharomyces* kvasaca zabeležena značajna količina glukoze i fruktoze (tabela 4.3). U uzorcima vina dobijenih primenom sojeva *C. famata* Kd-1, Kd-2 i Kd-17 količina zaostalog šećera bila je nešto veća od 90 g/L. Izuzetak je predstavljao uzorak vina dobijen primenom soja *C. famata* Kd-4, gde je zabeležena koncentracija zaostalog šećera od 130 g/L. U ovim uzorcima primećeno je da je koncentracija glukoze bila manja od koncentracije fruktoze, što potvrđuje glukofilan karakter ovih sojeva, što je u saglasnosti sa istraživanjem Ahmeda (361), koji je ispitivao uticaj različitih šećera na ćelijski rast vrste *C. famata* i dokazao je da je najbolji rast postignut na podlozi sa glukozom. Različiti sojevi vrste *C. apicola* tokom alkoholne fermentacije pasterizovane šire sorte nebiolo pokazali su sličnu fermentativnu aktivnost, gde su potrošili oko polovine početne koncentracije ukupnih šećera. Međutim, ovi sojevi pokazali su izražen fruktofilan karakter (294). Među uzorcima vina dobijenih primenom sojeva *H. uvarum*, najveća koncentracija glukoze i fruktoze bila je zabeležena u uzorku vina dobijenog primenom soja *H. uvarum* Kd-9 (137,03 g/L), što je za oko 40% više nego kod uzorka vina dobijenog primenom soja *H. uvarum* Š-2, gde je koncentracija glukoze i fruktoze bila najmanja (77,59 g/L). U ovim uzorcima koncentracija glukoze bila je veća od koncentracije fruktoze, što potvrđuje fruktofilan karakter roda *Hanseniaspora* (146,346). U uzorcima vina dobijenih primenom sojeva *P. kluyveri* K-1 i *M. pulcherrima* K-5 ukupna koncentracija glukoze i fruktoze iznosila je 84,67 i 90,93 g/L, respektivno. Kod ovih uzoraka koncentracija glukoze bila je niža od koncentracije fruktoze,

potvrđujući glukofilan karakter ovih vrsta kvasaca (333). Prethodna istraživanja pokazala su veoma slabu fermentativnu aktivnost sojeva vrsta *H. uvarum*, *P. kluyveri* i *M. pulcherrima*. U istraživanju Serafino i saradnika (294) različiti sojevi *H. uvarum* tokom samostalne fermentacije pasterizovane šire sorte nebiolo pokazali su slabiju fermentativnu aktivnost, u odnosu na sojeve *H. uvarum* analizirane u ovom radu. U navedenom istraživanju početna koncentracija šećera u medijumu bila je 274,28 g/L, gde su sojevi *H. uvarum* potrošili šećer u količini od 65-100 g/L, ostavljajući velike količine redukujućih šećera. Takođe, tokom samostalne fermentacije sterilne šire šenen blan, sa početnom koncentracijom šećera od 211 g/L, primenom sojeva *H. uvarum* zaostalo je više od 70% ukupnih šećera (7). Većina analiziranih sojeva *P. kluyveri* je tokom alkoholne fermentacije pasterizovane šire sorte nebiolo pokazala veoma slabu potrošnju šećera (oko 11% od ukupne količine šećera), dok je jedan soj imao sposobnost da potroši preko 60% od početne količine šećera (294). Dobijeni rezultati jasno potvrđuju da je efikasnost potrošnje šećera u zavisnosti od soja kvasca. Različiti sojevi *M. pulcherrima* pokazali su slabu potrošnju šećera, koja se kretala u granicama od 35-78 g/L, ostavljajući velike količine redukujućih šećera (7,294). Uočene razlike u potrošnji šećera mogu se pripisati razlikama u početnoj koncentraciji šećera, dostupnosti hranljivih materija (asimilirajući azot), kao i razlikama u početnoj veličini inokuluma (362–364). Koncentracija glukoze i fruktoze od 145,82 g/L bila je određena u uzorku vina dobijenom primenom soja *R. glutinis* Gf-3, kod koga je primećen glukofilan karakter. Serafino i saradnici (294) takođe su pokazali da različite vrste roda *Rhodotorula* (*R. nothofagi* i *R. graminis*) imaju glukofilan karakter, uz slabu potrošnju šećera. Najveća koncentracija glukoze i fruktoze primećena je u uzorku vina koji je dobijen primenom soja *P. laurentii* Č-1.

Na osnovu statističke analize uočene su značajne razlike u proizvodnji glicerola među primenjenim sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca (tabela 4.3). Najveća koncentracija glicerola bila je prisutna u uzorku vina dobijenom primenom soja *P. kluyveri* K-1. Tokom mikroviniifikacije soj *C. famata* Kd-1 pokazao se kao dobar proizvođač glicerola, dok su preostali sojevi *C. famata* (Kd-2, Kd-4 i Kd-17) proizveli glicerol u rasponu od 3,50 do 4,00 g/L. Dobru sposobnost proizvodnje glicerola imao je i soj *M. pulcherrima* K-5, dok su se među pripadnicima vrste *H. uvarum*, sojevi Š-2, Šd-1 i Kr-2 istakli po većoj proizvodnji glicerola, od preko 4 g/L. Ostali sojevi *H. uvarum* imali su sposobnost proizvodnje glicerola ispod 4,00 g/L. U uzorku vina dobijenog primenom soja *P. laurentii* Č-1 koncentracija glicerola iznosila je 3,10±0,20 g/L. Nasuprot tome, najniža koncentracija glicerola određena je u uzorku vina dobijenom primenom soja *R. glutinis*

Gf-3 ( $0,48 \pm 0,03$  g/L). Istraživanje Comi i saradnika (293) pokazalo je takođe da su 49 različitih sojeva *K. apiculata* (*H. uvarum*) tokom samostalne fermentacije sterilne šire grožđa moskato proizveli glicerol u količinama od 1,36-4,44 g/L, što je u opsegu dobijenih vrednosti za analizirane sojeve *H. uvarum*. Međutim, druga istraživanja pokazala su različitu sposobnost proizvodnje glicerola među vrstama ne-*Saccharomyces* kvasaca. Istraživanje Serafino i saradnika (294) pokazalo je da tokom samostalne fermentacije pasterizovane šire sorte nebiolo različiti sojevi istih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca proizvode veće koncentracije glicerola: *H. uvarum* (6,22-10,79 g/L), *P. kluyveri* (5,84-7,04 g/L) i *M. pulcherrima* (5,18-8,19 g/L), u odnosu na dobijene rezultate. U istom istraživanju dokazano je da različiti sojevi vrste roda *Candida* (*C. apicola*) proizvode glicerol u opsegu od 17,94 do 18,69 g/L. Pored toga, isti istraživači pokazali su da vrsta roda *Rhodotourula* (*R. graminis*) proizvodi glicerol u koncentraciji od 2,00 g/L. Sa druge strane, niže koncentracije glicerola, u poređenju sa dobijenim vrednostima, primećene su u fermentaciji šire sorte makabeo (samostalna fermentacija *H. uvarum* i *M. pulcherrima*) (365) i sintetičke šire (samostalna fermentacija *P. kluyveri*) (331). Razlika u rezultatima je najverovatnije posledica različitih sastava fermentacionog medijuma, posebno početnog sadržaja šećera, uslova fermentacije i metaboličke sposobnosti različitih sojeva kvasaca (366).

Statistička analiza pokazala je značajne razlike u sadržaju etanola među analiziranim uzorcima vina. Kao što se očekivalo, najveći sadržaj etanola bio je određen kod uzorka vina dobijenog primenom komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV V1116, dok je sadržaj etanola bio znatno niži kod uzoraka dobijenih primenom ne-*Saccharomyces* kvasaca obzirom da nijedan od njih nije fermentisao širu sorte prokupac do suva (tabela 4.3). Među analiziranim sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca, soj *P. kluyveri* K-1 izdvajao se po boljoj sposobnosti proizvodnje etanola ( $6,98 \pm 0,21\%$  vol.), dok je soj *M. pulcherrima* K-5 doprineo manjem sadržaju etanola, koji je iznosio  $5,71 \pm 0,05\%$  vol. U prethodnim istraživanjima dokazano je da su različiti sojevi vrste *P. kluyveri* i *M. pulcherrima* tokom samostalne fermentacije šire sorte nebiolo (294) i kaberne sovinjon (168) proizveli etanol u koncentracionom opsegu od 2,20 do 4,95% vol, što je manje u odnosu na dobijene rezultate. Razlike u rezultatima mogu se pripisati različitim nutritivnim sastavima medijuma, kao i spoljašnjim faktorima okoline, kao što su temperatura, pH, prisustvo kiseonika i početna koncentracija šećera (367). Među uzorcima vina dobijeni primenom sojeva *C. famata* koncentracija etanola se kretala u rasponu od 5,93 do 6,52% vol. Ovi rezultati potvrđuju prethodna istraživanja koja su različite vrste roda *Candida* okarakterisale kao slabe proizvođače

etanola (294,368), što se može dovesti u vezu sa većom količinom zaostalih šećera nakon fermentacije. Većina sojeva *H. uvarum* proizvela je nižu koncentraciju etanola, u rasponu od 3,13 do 4,68% vol. Izuzetak je predstavljao soj *H. uvarum* Kd-12 koji je imao sposobnost proizvodnje etanola od  $6,50 \pm 0,21\%$  vol. Istraživanja Jolly i saradnika (354) i Clemente-Jiminez i saradnika (365) pokazala su sličan opseg proizvodnje etanola od strane različitih sojeva vrste *H. uvarum*. Sojevi *R. glutinis* Gf-3 i *P. laurentii* Č-1 pokazali su proizvodnju etanola manju od 1% vol, što je u skladu sa istraživanjem Van Dijken i saradnika (369) koji navode da vrsta *P. laurentii* proizvodi etanol u koncentracijama od 0,1 do 1 g/L, i istraživanjem Serafino i saradnika (294) koji su pokazali da su različite vrste roda *Rhodoturula* veoma slabi proizvođači etanola. Kako navode Mehlomakulu i saradnici (7) niži prinos etanola objašnjava se održavanjem redoks ravnoteže, budući da se deo potrošenog ugljenika usmerava ka formiranju organskih kiselina, glicerola, etil acetata, acetoina, acetaldehida, kao i isparljivih aromatskih jedinjenja od strane ne-*Saccharomyces* kvasca. Proizvedeni metaboliti doprinose aromi, punoći ukusa, zaštiti od mikroorganizama koji izazivaju kvarenje, kao i deacidifikaciji šire.

Kvascima sa dobrim enološkim potencijalom smatraju se oni koji zadovoljavaju većinu važnih parametara koji se odnose na tehnološku i senzornu podobnost za primenu u vinifikaciji. Najvažniji parametar odnosi se na sposobnost primenjenog kvasca da uspešno sprovede i završi alkoholnu fermentaciju, bez prekida i sa stabilnom proizvodnjom etanola, čime se obezbeđuje tehnološka pouzdanost. Pored toga, sposobnost rasta i aktivnost pri različitim temperaturama, kao i otpornost na stresne uslove karakteristične u vinifikacionom procesu predstavljaju važne enološke parametre za kvasce. Značajan pokazatelj enološkog potencijala uključuje i povoljan kiselinski profil, što znači da odabrani kvasac ne dovodi do povećanja isparljivih kiselina u meri koja bi negativno uticala na kvalitet vina. Pored ovih karakteristika, kvasac treba da ima i potencijal za proizvodnju većih koncentracija glicerola i stvaranju prijatnih voćnih aroma izraženog intenziteta, koji će doprineti senzornom kvalitetu vina. Na osnovu svih navedenih parametara, enološki potencijal se može definisati kao kombinacija dobrih fermentacionih sposobnosti, pozitivnog uticaja na aromu, otpornosti na stresne uslove i sposobnosti da se postigne povoljan hemijski i senzorni profil vina. Sojevi koji ispunjavaju te uslove mogu se smatrati pogodnim za dalje korišćenje ili selekciju u industriji vina (3,370).

Na osnovu fermentativnih i enoloških karakteristika analiziranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca, pre svega potencijala stvaranja prijatnih aroma srednjeg i intenzivnog intenziteta,

možnosti potrošnje više od polovine ukupne količine šećera, kao i proizvodnje glicerola iznad 4 g/L, sojevi *P. kluyveri* K-1, *M. pulcherrima* K-5, *H. uvarum* (Kr-2, Šd-1 i Š-2) bili su odabrani za dalja istraživanja u vinifikacionim uslovima. Iako su odabrani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca prvobitno bili identifikovani API AUX 20C testom, njihova identifikacija dodatano je potvrđena i PCR metodom, pri čemu su rezultati sekvenciranja dati u prilogu u tabeli P4.4.

#### **4.4. Vinifikacija na laboratorijskom nivou**

Sa ciljem da se od pet odabranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca identifikuje jedan koji će biti korišćen u narednoj fazi, koja obuhvata postupak skaliranja fermentacionog procesa i optimizaciju prinosa biomase, najpre je izveden set fermentacija na laboratorijskom nivou. Fermentacije su sprovedene zasejavanjem čistih odabranih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, a uporedo su realizovane fermentacije sa sekvencijalnim zasejavanjem komercijalnog soja vrste *S. cerevisiae* ICV D254, kao i spontana fermentacija sa epifitnom mikrobiotom. Uzorak vina dobijen primenom komercijalnog soja vrste *S. cerevisiae* ICV D254 korišćen je kao kontrolni uzorak.

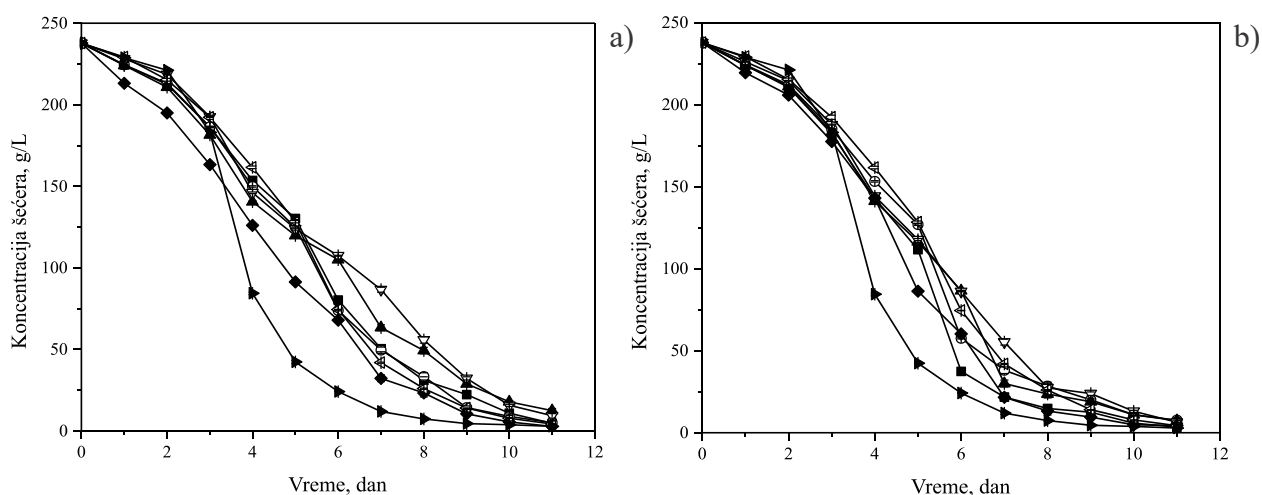
##### **4.4.1. Kinetika alkoholne fermentacije**

Glavni proces u proizvodnji vina je alkoholna fermentacija, gde se šećeri iz šire ili kljuka transformišu u etanol i CO<sub>2</sub> pod dejstvom kvasaca, dok paralelno dolazi do stvaranja mnoštva sekundarnih metabolita (371). Proučavanje kinetike alkoholne fermentacije ima važnu ulogu u razumevanju i kontroli fizičkohemijskih transformacija, koje se dešavaju tokom samog procesa, ali i tokom starenja i skladištenja vina. Takvi podaci omogućavaju da se unapredi proces proizvodnje, održi kvalitet i obezbedi proizvodnja vina željenih karakteristika, kao i stabilnost. Praćenjem i analizom bitnih parametara kinetike alkoholne fermentacije, kao što su potrošnja šećera, stvaranje organskih kiselina i ispraljivih aromatskih jedinjenja doprinosi proizvodnji visokokvalitetnih vina (372).

Inokulacija ne-*Saccharomyces* kvasaca sa početnim brojem od 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> CFU/mL smatra se dovoljnom da se obezbedi rast i razmnožavanje tokom prvih faza alkoholne fermentacije, utičući na kinetiku rasta i metabolizam *Saccharomyces* kvasaca (373). Tokom prve faze alkoholne

fermentacije, obično par dana, ovi kvasci koristeći hranljive sastojke iz šire ili kljuka formiraju dovoljne koncentracije krajnjih produkata koji daju fingerprint na konačni sastav vina (293,373). Ovo se ne zasniva samo na direktnoj proizvodnji sekundarnih metabolita, već se odnosi i na proizvodnju enzima odgovornih za biokonverziju neisparljivih i nearomatskih prekursora u njihove aktivne oblike (374).

Radi potvrde fermentativnih karakteristika odabranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca, u uslovima sličnim realnim vinifikacijama, praćena je potrošnja šećera i oslobađanje CO<sub>2</sub> tokom fermentacije koja je sprovedena u kljuku, za razliku od prethodne faze istraživanja gde je korišćena pasterizovana šira. Na slici 4.8 predstavljena je brzina potrošnje šećera pri fermentaciji kljuka sorte grožđa prokupac.



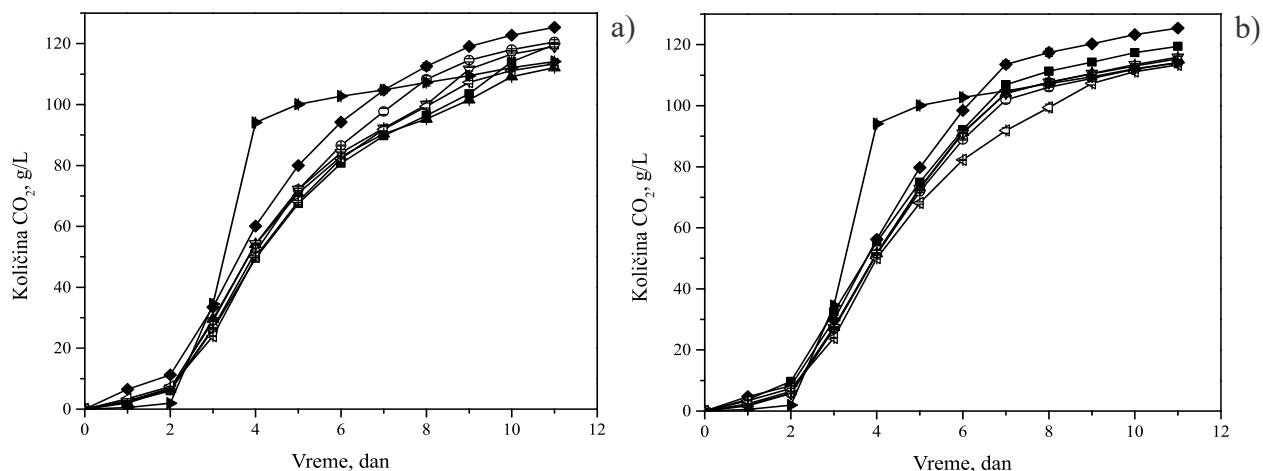
Slika 4.8 Kinetika potrošnje šećera tokom procesa alkoholne fermentacije od strane izolovanih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca: a) samostalna i b) sekvencijalna fermentacija (-■- *P. kluyveri* K-1, -○- *M. pucherrima* K-5, -▲- *H. uvarum* Kr-2, -▽- *H. uvarum* Šd-1, -◆- *H. uvarum* Š-2, -◁- Spontana fermentacija (epifitna mikrobiota), -▶- *S. cerevisiae* ICV D254). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija, vertikalni barovi označavaju standardnu devijaciju.

Analizirani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca tokom samostalne fermentacije pokazivali su različite brzine potrošnje šećera (slika 4.8a). Na samom početku alkoholne fermentacije sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca imali su veću potrošnju šećera u poređenju sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254. Razlog ovome jeste brža adaptacija sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca na realne uslove fermentacionog medijuma, odnosno kljuka (34), a sem toga, dostupnost kiseonika u ranim fazama alkoholne fermentacije omogućava mešoviti respiro-fermentativni metabolizam, što

dovodi do povećanog prinosa biomase i dominacije ne-*Saccharomyces* kvasaca u početnim fazama procesa (337). Veći prinos biomase, odnosno brža stopa rasta može se objasniti i većom potrošnjom asimilirajućeg azota, u poređenju sa vrstama roda *Saccharomyces*, budući da se ne-*Saccharomyces* kvasci lakše prilagođavaju uslovima medijuma, gde brza kolonizacija i efikasno iskorišćavanje hranljivih sastojaka predstavlja selektivnu prednost (375). U daljem toku fermentacije, brzina potrošnje šećera kod sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca opada, odnosno koncentracija šećera se smanjivala sporije u poređenju sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254, što može biti posledica povećanja koncentracije etanola (376,377). Među analiziranim uzorcima fermentisanim sojevima *H. uvarum*, kod uzorka fermentisnog sojem *H. uvarum* Š-2 uočena je značajno veća brzina potrošnje šećera, pri čemu je do petog dana alkoholne fermentacije bilo potrošeno više od polovine dostupnih šećera u kljuku, dok je do devetog dana fermentisano približno 95% ukupnih šećera. Sojevi *H. uvarum* Kr-2 i Šd-1 pokazali su drugačiju fermentativnu aktivnost. Kod uzorka zasejanog sojem *H. uvarum* Šd-1 uočena je umerena brzina potrošnje šećera, sa najvećom potrošnjom četvrtog dana fermentacije ( $46,49 \pm 0,16$  g/L dan) (tabela P4.5 u Prilogu) i sličnom potrošnjom do kraja procesa. Fermentacija primenom soja *H. uvarum* Kr-2 pokazala je najveće razlike u brzini potrošnje šećera, u poređenju sa ostalim analiziranim uzorcima. Kod uzoraka fermentisanih sojevima *P. kluyveri* K-1 i *M. pulcherrima* K-5 uočene su slične brzine potrošnje šećera, gde je kod oba uzorka primećena najveća potrošnja šestog dana fermentacije ( $50,13 \pm 0,28$  i  $51,05 \pm 0,29$  g/L dan, respektivno) (tabela P4.5 u Prilogu). Slična brzina potrošnje šećera primećena je i tokom spontane fermentacije. Najveća brzina potrošnje šećera uočena je kod fermentacije komercijalnim sojem, sa značajnom potrošnjom četvrtog dana fermentacije ( $98,71 \pm 0,41$  g/L dan) (tabela P4.5 u Prilogu). Iako su evidentne bile razlike u brzini potrošnje šećera među analiziranim uzorcima, kao i u uzorku spontane fermentacije bez inokulacije kvascem, alkoholna fermentacija je u svim slučajevima uspešno završena. Analizirani uzorci dobijeni tokom sekvencijalne fermentacije pokazali su različite brzine potrošnje šećera (slika 4.8b). Nakon četvrtog dana, kada je dodat komercijalni soj *S. cerevisiae* ICV D254 u ispitivanim uzorcima, primećen je nagli porast potrošnje šećera kod svih ispitivanih uzoraka. Najveća brzina potrošnje šećera u sekvencijalnoj fermentaciji primećena je kod uzorka zasejanog sojem *P. kluyveri* K-1, gde je šestog dana fermentacije zabeležena potrošnja šećera od  $74,12 \pm 0,29$  g/L dan (tabela P4.5 u Prilogu). U uzorku fermentisanom primenom soja *M. pulcherrima* K-5 zabeležena je konstantna brzina potrošnje šećera tokom celokupnog procesa sekvencijalne

fermentacije. Međutim, kod primene sojeva *H. uvarum* uočene su različite brzine potrošnje šećera tokom sekvencijalne fermentacije, što se može delimično objasniti inhibirajućim efektom vrste *S. cerevisiae*, koja sintetizuje antimikrobne peptide koji narušavaju unutarćelijski prostor ćelija, menjaju pH vrednost i utiču na propustljivost citoplazmatične membrane (378,379). Bez obzira na korišćene sojeve ne-*Saccharomyces* kvasaca, kao i razlike u brzinama potrošnje šećera, u svim analiziranim uzorcima vina potrošeno je više od 95% ukupnih šećera. Dobijeni rezultati, koji ukazuju na povećanje brzine potrošnje šećera nakon sekvencijalnog zasejavanja sa vrstom *S. cerevisiae*, u saglasnosti su sa istraživanjem Puškaš i saradnika (308), gde su primećeni slični rezultati prilikom kombinovanja sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca (*M. pulcherrima* i *T. delbreuckii*) sa vrstama *S. cerevisiae* i *S. bayanus*. Iako primenjeni sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca nisu bili sposobni da dovedu do potpunog završetka alkoholne fermentacije u pasterizovanoj širi grožđa prokupac, dobijeni rezultati pokazali su da ovi sojevi mogu da proizvedu suva vina tokom fermentacije kljuka u nesterilnim uslovima, koji su slični realnim uslovima proizvodnje vina. Završetak fermentacije ukazuje na prisustvo i aktivnost autohtone mikrobiote grožđa, koja je preuzela dominantnu ulogu i omogućila njen završetak (190).

Oslobađanje CO<sub>2</sub> pratilo je kinetiku potrošnje šećera, što ukazuje na njihovu povezanost u okviru fermentativnog metabolizma kvasaca, ali ne nužno i proporcionalan odnos između ovih parametara. Slika 4.9 prikazuje oslobođenu količinu CO<sub>2</sub>, odnosno promenu mase sistema, tokom samostalne i sekvencijalne fermentacije kljuka sorte grožđa prokupac. Kod svih analiziranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca, nezavisno od tipa fermentacije, lag faza je trajala dva dana. Ova faza predstavlja period prilagođavanja ćelija kvasaca na nove uslove sredine, tokom koje se populacije kvasaca adaptiraju na novi nutritivni medijum, pre početka eksponencijalnog rasta (380). U eksponencijalnoj fazi ćelije kvasaca počinju intenzivno da se razmnožavaju, što dovodi do povećanja prinosa biomase i oslobađanja CO<sub>2</sub>. U ovoj fazi prinos biomase dostiže svoj maksimum (381). Eksponencijalna faza kod komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254 trajala je tri dana, nakon čega je usledila stacionarna faza. U samostalnim fermentacijama, na osnovu oslobođene količine CO<sub>2</sub>, može se zaključiti da su sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca imali duži period eksponencijalne faze, koja je trajala šest dana (slika 4.9a), dok je u sekvencijalnim fermentacijama trajala pet dana (slika 4.9b). Primenjeni sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca produkovali su značajno veće količine CO<sub>2</sub> u početnim fazama fermentacije, u poređenju sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254.



Slika 4.9 Kinetika produkcije CO<sub>2</sub> tokom procesa alkoholne fermentacije od strane izolovanih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca: a) samostalna i b) sekvencijalna fermentacija (-■- *P. kluyveri* K-1, -○- *M. pucherrima* K-5, -▲- *H. uvarum* Kr-2, -▽- *H. uvarum* Šd-1, -◆- *H. uvarum* Š-2, -◁- Spontana fermentacija (epifitna mikrobiota), -▶- *S. cerevisiae* ICVD 254). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija, vertikalni barovi označavaju standardnu devijaciju.

Sojevi *H. uvarum* Š-2 i *P. kluyveri* K-1 stvorili su drugog dana alkoholne fermentacije i do 80% više CO<sub>2</sub> u poređenju sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae* istog dana (tabela P4.6 u Prilogu). Ovo je u skladu sa brзом potrošnjom šećera na početku alkoholne fermentacije, što se može objasniti dobrom adaptacijom sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca na uslove sredine, bržim iskorišćenjem hranljivih sastojaka i dostupnošću kiseonika (34,337,375). Ukupna količina izdvojenog CO<sub>2</sub> nije se znatno razlikovala između fermentacija inokulisanih samo analiziranim sojevima ili onih koji su naknadno bili sekvencijalno inokulisani komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254. Ukupna količina CO<sub>2</sub> kretala se u granicama od 112,13-125,33 g/L, dok je kod uzoraka vina dobijenih primenom sekvencijalne fermentacije ukupna količina CO<sub>2</sub> bila neznatno veća.

Na osnovu količine CO<sub>2</sub> izračunate su aktuelne vrednosti za brzinu oslobađanja CO<sub>2</sub> (g/L dan) od strane sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca u toku eksponencijalne faze, kao i srednje vrednosti za brzinu oslobađanja CO<sub>2</sub> u toku eksponencijalne faze rasta, što može indirektno poslužiti kao uvid u brzinu rasta biomase kvasaca (tabela P4.7 u Prilogu). Rezultati pokazuju da su vrednosti brzine oslobađanja CO<sub>2</sub> kod analiziranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca bile manje u poređenju sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254. Među korišćenim ne-*Saccharomyces* sojevima, izdvaja se soj *P. kluyveri* K-1 po manjim brzinama produkcije CO<sub>2</sub> na početku eksponencijalne faze, što potencijalno može imati pozitivan uticaj na zadržavanje isparljivih aromatskih jedinjenja

(159). Ispitivani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca, tokom sekvencijalne inokulacije sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254, pokazali su veće vrednosti brzine produkcije CO<sub>2</sub>, u poređenju sa brzinama produkcije tokom samostalne fermentacije.

#### ***4.4.2. Fizičko-hemijska analiza uzoraka vina dobijenih u vinifikaciji na laboratorijskom nivou***

Standardna fizičko-hemijska analiza uzoraka vina prokupać dobijenih u vinifikaciji na laboratorijskom nivou, dobijeni primenom različitih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca tokom samostalne i sekvencijalne fermentacije, prikazana je u tabeli 4.4. Svi analizirani parametri bili su u granicama koje propisuje Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za vino (382).

Kao glavni izvor hranljivih sastojaka za rast kvasca, većina šećera je pretvorena u etanol i druge metabolite putem glikolitičkog puta tokom alkoholne fermentacije (383). Početni sadržaj šećera u svim eksperimentima bio je visok, približno 240 g/L. Na kraju procesa alkoholne fermentacije, u svim analiziranim uzorcima vina koncentracija redukujućih šećera bila je ispod 4 g/L, što znači da svi uzorci vina mogu biti deklarirani kao suva vina. Kod uzoraka vina dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca koncentracija redukujućih šećera bila je u opsegu od 1,28 do 1,49 g/L. U poređenju sa ovim uzorcima, uzorci vina dobijeni primenom sekvencijalne fermentacije pokazali su oko 8% veću koncentraciju redukujućih šećera. Razlog tome, može biti rana potrošnja hranljivih sastojaka, dostupnog izvora azota i/ili vitamina u širi i/ili kljuku, od strane ne-*Saccharomyces* kvasaca, što može ograničiti rast i fermentativnu sposobnost kvasaca vrste *S. cerevisiae*. Takođe, proizvodnja toksičnih jedinjenja od strane ne-*Saccharomyces* kvasaca, kao što su masne kiseline srednjih lanaca i/ili kiler faktori, mogu predstavljati inhibitore rasta za vrstu *S. cerevisiae* (376). Najmanja koncentracija redukujućih šećera ( $1,21 \pm 0,01$  g/L) bila je zabeležena u kontrolnom uzorku. Dobijeni rezultati potvrđuju prethodna istraživanja o fermentativnom potencijalu ne-*Saccharomyces* kvasaca. Rompkovski i saradnici (384) pokazali su da vrsta *H. uvarum* tokom samostalne fermentacije sveže šire dovodi do gotovo potpune potrošnje šećere (ispod 4 g/L), što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Takođe, sličan trend primećen je kod sekvencijalne fermentacije. Ruiz i saradnici (385) dokazali su da kombinacija vrsta *M.*

*pulcherrima/S. cerevisiae* tokom sekvencijalne fermentacije sveže šire omogućava potpunu potrošnju šećera, što je u skladu sa dobijenim rezultatima.

Rezultati za sadržaj ukupnog ekstrakta i ekstrakta bez šećera pokazali su da su uzorci vina dobijeni primenom samostalne i sekvencijalne fermentacije, nezavisno od primenjenog soja kvasca, imali gotovo podjednake koncentracije, koje nisu bile statistički značajne ( $p > 0,05$ ). Vrednosti ovih parametara bile su više u poređenju sa uzorcima vina dobijeni primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, pri čemu su uočene statistički značajne razlike između pojedinih uzoraka. Izuzetak je zabeležen kod uzorka vina dobijenog primenom čiste kulture *H. uvarum* Š-2, gde su koncentracije ukupnog ekstrakta i ekstrakta bez šećera bile veće u poređenju sa uzorkom dobijen primenom sekvencijalne fermentacije. U kontrolnom uzorku koncentracije ukupnog ekstrakta i ekstrakta bez šećera iznosile su  $27,40 \pm 0,27$  i  $26,61 \pm 0,30$  g/L, respektivno.

Sadržaj ukupnog ekstrakta u analiziranim uzorcima vina bio je znatno viši u poređenju sa prethodno objavljenim rezultatima, koji se odnose na vina sorte prokupac proizvedena primenom komercijalnih sojeva vrste *S. cerevisiae* sa dodatkom proizvoda na bazi inaktivisanog kvasca (386) ili odabranog aromatskog bilja (33). Ovakav rezultat, osim što se može pripisati razlikama u kvalitetu i hemijskom sastavu kljuka, može biti i posledica sposobnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca da proizvode veće količine različitih neisparljivih jedinjenja (387), koja doprinose sadržaju ukupnog ekstrakta i pozitivno utiču na senzorna svojstva vina. Međutim, u istraživanju Karabegović i saradnika (388) sadržaj ukupnog ekstrakta u uzorcima vina prokupac, dobijenim primenom komercijalnog soja vrste *M. pulcherrima* tokom samostalne i sekvencijalne fermentacije, bio je veći u odnosu na dobijene rezultate. Uočene razlike mogu se dodatno pripisati različitoj fermentativnoj aktivnosti autohtonih i komercijalno dostupnih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca. U istraživanju Boban i saradnika (351) sojevi vrste *P. kluyveri*, *M. pulcherrima* i *H. uvarum* korišćeni su tokom samostalne i sekvencijalne fermentacije sterilne šire sorte maraština, pri čemu kao i u ovom radu nije uočena statistički značajna razlika u sadržaju ukupnog ekstrakta u vinima dobijenim fermentacijama primenom sekvencijalne inokulacije sa sojem *S. cerevisiae*. Ukupna kiselost (sadržaj ukupnih kiselina) i vrednost pH predstavljaju dva važna parametra senzornog kvaliteta vina, koja značajno utiču na percepciju njegove strukture i ravnoteže (389). Kiselost daje svežinu vina, smanjuje percepciju slatkoće i sa etanolom deluje inhibitorno na rast nepoželjnih mikroorganizama, čime doprinosi mikrobiološkoj stabilnosti vina (390). Statistička analiza pokazala je značajne razlike u ukupnoj kiselosti među analiziranim uzorcima vina.

Tabela 4.4 Fizičkohemijska analiza uzoraka vina sorte prokupac dobijenih u laboratorijskim uslovima pomoću izolovanih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca

Uzorak	Relativna gustina 20/20°C	Sadržaj alkohola, % vol.	Ukupni ekstrakt, g/L	Redukujući šećeri, g/L	Ekstrakt bez šećera, g/L	Ukupne kiseline, g/L	Isparljive kiseline, g/L	Ukupni SO <sub>2</sub> , mg/L	Slobodni SO <sub>2</sub> , mg/L	pH vrednost
<i>P. kluyveri</i> K-1	0,9939±0,01a	12,39±0,12bcd	27,10±0,27a	1,30±0,01b	26,80±0,27ab	5,55±0,06ab	0,69±0,01c	25,00±0,25d	15,00±0,15d	3,66±0,02bc
<i>P. kluyveri</i> K-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	0,9946±0,01a	12,71±0,10de	27,90±0,21bc	1,47±0,01de	27,43±0,21bcd	5,65±0,04bc	0,76±0,01f	28,00±0,21e	19,00±0,14e	3,64±0,02bc
<i>M. pulcherrima</i> K-5	0,9945±0,01a	12,62±0,13cde	27,10±0,27a	1,46±0,01d	26,64±0,27a	5,68±0,06bcd	0,70±0,01cd	28,00±0,28e	19,00±0,19e	3,67±0,02bc
<i>M. pulcherrima</i> K-5/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	0,9950±0,01a	12,36±0,09bc	27,40±0,21ab	1,49±0,01de	26,91±0,20abc	5,95±0,04f	0,81±0,01g	32,00±0,24f	20,00±0,15f	3,74±0,01de
<i>H. uvarum</i> Kr-2	0,9952±0,01a	12,02±0,12a	27,10±0,27a	1,28±0,01b	26,82±0,27ab	5,48±0,05a	0,73±0,01e	33,00±0,33g	19,00±0,19e	3,63±0,01ab
<i>H. uvarum</i> Kr-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	0,9949±0,01a	12,53±0,09cde	28,10±0,21bc	1,50±0,01e	27,60±0,21cd	5,75±0,04cde	0,76±0,01f	38,00±0,28h	19,00±0,14e	3,66±0,02bc
<i>H. uvarum</i> Šd-1	0,9944±0,01a	12,79±0,13e	26,80±0,27a	1,49±0,01de	26,31±0,26a	5,87±0,06ef	0,71±0,01d	20,00±0,20c	10,00±0,10b	3,58±0,00a
<i>H. uvarum</i> Šd-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	0,9950±0,01a	12,10±0,09ab	27,40±0,21ab	1,56±0,01f	26,84±0,20ab	6,25±0,05g	0,75±0,01f	40,00±0,30i	25,00±0,19h	3,69±0,03cd
<i>H. uvarum</i> Š-2	0,9953±0,01a	12,10±0,12ab	28,40±0,28c	1,42±0,01c	27,81±0,28d	5,56±0,06ab	0,66±0,01b	40,00±0,40i	23,00±0,23g	3,69±0,01c
<i>H. uvarum</i> Š-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	0,9946±0,01a	12,45±0,09cd	27,40±0,21ab	1,59±0,02f	26,98±0,20abc	5,80±0,04de	0,69±0,01c	17,00±0,13b	12,00±0,09c	3,78±0,03e
<i>S. cerevisiae</i> ICV D254	0,9948±0,01a	13,28±0,13f	27,40±0,27ab	1,21±0,01a	26,61±0,30a	5,45±0,05a	0,30±0,00a	15,00±0,15a	6,00±0,06a	3,64±0,02bc

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n = 3). Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na statističku značajnu razliku vrednosti u istoj koloni pri nivou značajnosti  $p < 0,05$  (Tukey HSD test).

Uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca imali su ukupnu kiselost u rasponu od 5,48 do 5,87 g/L. Sa druge strane, uzorci vina dobijeni u sekvencijalnim fermentacijama pokazali su povećanje ukupne kiselosti za 1,70-6,10% u odnosu na uzorke vina dobijene primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Ovo se može objasniti različitim metabolitičkim putevima ne-*Saccharomyces* i *Saccharomyces* kvasaca, pri čemu oni sinergistički doprinose ukupnom sadržaju organskih kiselina (391). Dobijeni rezultati u skladu su sa prethodnim istraživanjima, koja su pokazala da vrste *P. kluyveri*, *H. uvarum* i *M. pulcherrima* tokom sekvencijalne fermentacije sterilne šire grožđa (351) i pasterizovanog soka od višnje (309) i breskve (332) dovode do povećanja ukupne kiselosti u poređenju sa fermentacijom sprovedenom čistim kulturama ovih ne-*Saccharomyces* kvasaca. Vrednost pH je bitan parametar koji kontroliše hemijsku stabilnost vina i razvoj mikrobiote (392). Početna vrednost pH šire od 3,60 bila je pogodna za optimalan rast sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca (372). Vrednost pH se kretala u opsegu od 3,58 do 3,78, pri čemu je uočena statistički značajna razlika među analiziranim uzorcima.

Ukupnu količinu isparljivih kiselina u vinu čini 95% sirćetna kiselina (393), koja se sintetiše kvascima tokom procesa alkoholne fermentacije (hemijska oksidacija etanola uz prisustvo kiseonika) i/ili bakterijama sirćetne kiseline tokom, čuvanja, starenja i skladištenja vina (394). Količina isparljivih kiselina u uzorcima vina proizvedenim primenom ne-*Saccharomyces* kvasaca, bez obzira na tip fermentacije, varirala je u rasponu od 0,66 do 0,81 g/L, što je za 55-65% više u odnosu na kontrolni uzorak. Količina isparljivih kiselina u pogledu tipa fermentacije, bila je veća do 13% u uzorcima vina dobijenim u sekvencijalnim fermentacijama. Ova razlika se može pripisati kompeticiji za hranljivim materijama, naročito za asimilirajući azot, koji je od bitnog značaja za metabolizam i rast vrste *S. cerevisiae* (395,396). Takođe, prema tumačenju Duca i saradnika (397), razlike se mogu pripisati i pojavi različitih enzimskih reakcija između ne-*Saccharomyces* kvasaca i vrste *S. cerevisiae*, tokom alkoholne fermentacije. Međutim, količina isparljivih kiselina u svim analiziranim uzorcima vina nije prelazila koncentraciju pri kojoj se uočava negativan uticaj na senzorne karakteristike vina (približno 0,80 g/L) (195). Istraživanja su pokazala da primena različitih sojeva *H. uvarum* tokom alkoholne fermentacije daje vina sa koncentracijom sirćetne kiseline u veoma širokom opsegu od 0,30 do 1,40 g/L (293,332,346), što je u skladu sa dobijenim rezultatima. U istraživanju Boban i saradnika (351) primećeno je da vrsta *P. kluyveri* tokom samostalne fermentacije proizvela vino sa količinom isparljivih kiselina od 0,63 g/L, što je u

skladu sa dobijenim rezultatom. Dokazano je da različiti sojevi *M. pulcherima* tokom samostalne i sekvencijalne fermentacije daju niže količine isparljivih kiselina, u poređenju sa dobijenim rezultatima (90,398). Razlog tome može biti da se različiti sojevi različito ponašaju u različitim vrstama šire ili kljuka, što se može objasniti činjenicom da fermentacioni medijum pruža veoma selektivne uslove za razvoj kvasaca (34).

Porast sadržaja alkohola u vinu predstavlja jedan od glavnih izazova savremene industrije vina, jer globalno zagrevanje ima za posledicu povećanje sadržaja šećera u grožđu, što dovodi do proizvodnje vina sa većim sadržajem alkohola, potencijalno otežanim fermentacijama i narušavanjem balansa ukusa i aromatskog profila (8,399). Ovaj problem postao je izraženiji usled zahteva potrošača prema vinima sa manjim sadržajem alkohola, osvežavajućim karakterom i izraženijim voćnim aromama (140). Stoga, razvijanje strategije za proizvodnju vina sa smanjenim sadržajem alkohola postaje imperativ, pri čemu je ključno očuvati aromatski profil i druge senzorne karakteristike vina. Jedan od pristupa u postizanju ovog cilja jeste primena ne-*Saccharomyces* kvasaca, koji metabolišu šećere na način koji smanjuje proizvodnju alkohola (96). Na osnovu dobijenih rezultata, statistička analiza pokazala je značajne razlike u koncentraciji alkohola među analiziranim uzorcima vina prokupač. Uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura *H. uvarum* Kr-2 ( $12,02 \pm 0,12\%$  vol.) i *H. uvarum* Š-2 ( $12,10 \pm 0,12\%$  vol.) sadržali su niže koncentracije etanola u poređenju sa uzorcima dobijenim sekvencijalnom fermentacijom. Sa druge strane, uzorak vina dobijen primenom soja *H. uvarum* Šd-1 imao je veću koncentraciju etanola u odnosu na uzorak dobijen u sekvencijalnoj fermentaciji. Ovakav rezultat može se objasniti činjenicom da pojedini sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca ostvaruju viši prinos etanola po gramu potrošenog šećera u odnosu na vrstu *S. cerevisiae* (399). Međutim, bez obzira na tip fermentacije, analizirani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca pokazali su sposobnost proizvodnje vina sa 3,5-9% manje sadržaja etanola u poređenju sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254, koji je proizveo najveću koncentraciju etanola od  $13,28 \pm 0,13\%$  vol. Među sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca, soj *H. uvarum* Kr-2 pokazao se kao najefikasniji u redukciji etanola, pri čemu je smanjenje u odnosu na komercijalni soj *S. cerevisiae* ICV D254 iznosilo 9,50%. Prema literaturnim podacima, vrsta *H. uvarum* se smatra potencijalnom starter kulturom u proizvodnji vina sa manje sadržaja etanola, budući da je za pojedine sojeve ove vrste za formiranje 1% vol. etanola potrebno više od 19 g/L šećera (148). Istraživanje Hu i saradnika (400) pokazalo je da tokom samostalne fermentacije pasterizovanog soka od pomorandže vrsta *H. uvarum* proizvela

10% manje etanola u poređenju sa vrstom *S. cerevisiae*. Sojevi *P. kluyveri* K-1 i *M. pulcherrima* K-5 doprineli su smanjenju etanola za 6,70% i 6,90%, respektivno. Istraživanje Varela i saradnika (401) pokazalo je da vrsta *M. pulcherrima* u koinokulaciji sa *S. cerevisiae* tokom alkoholne fermentacije šire merlo daje vina sa do 6,75% manje etanola u odnosu na vrstu *S. cerevisiae*, što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Rezultati u istraživanju Ding i saradnika (402) pokazali su da različiti sojevi vrste *P. kluyveri* tokom proizvodnje vina od ploda duda doprinose smanjenju sadržaja etanola u rasponu od 9,65 do 12,89%, u odnosu na vrstu *S. cerevisiae*, što je više u poređenju sa dobijenim rezultatima. Suprotno tome, u istraživanju Benito i saradnika (403) uočen je manji uticaj na sadržaj etanola u odnosu na dobijene rezultate. U njihovom istraživanju, tokom sekvencijalne fermentacije sterilne šire sorte rizling vrste *M. pulcherrima* i *P. kluyveri* dale su vina sa sadržajem etanola manjim za 1,37% i 1,81% u odnosu na vino dobijeno primenom vrste *S. cerevisiae*. Razlike u smanjenju sadržaja etanola mogu se pripisati različitim fermentativnim sposobnostima pojedinih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca, kao i procesnim uslovima i sastavu fermentacionog medijuma. Manja produkcija etanola posledica je oksidativnog metabolizma ne-*Saccharomyces* kvasaca, pri čemu deo glukoze biva iskorišćen bez stvaranja etanola (404). Umesto toga, šećeri se preusmeravaju na sintezu drugih metabolita, poput glicerola i organskih kiselina, ili ka forimiranju biomase kvasca, što se može objasniti slabijim izražajem Crabtree efekta (403). Statistička analiza pokazala je i značajne razlike u koncentraciji ukupnog SO<sub>2</sub>. Uzorci vina dobijeni primenom sekvencijalne fermentacije imali su koncentraciju ukupnog SO<sub>2</sub> u rasponu od 28 mg/L (*P. kluyveri* K-1/*S. cerevisiae* ICV D254) do 40 mg/L (*H. uvarum* Šd-1/*S. cerevisiae* ICV D254). U poređenju sa ovim uzorcima, uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca sadržali su niže vrednosti ukupnog SO<sub>2</sub>. Izuzetak je zabeležen u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *H. uvarum* Š-2, gde je koncentracija SO<sub>2</sub> iznosila 40 mg/L, što je dvostruko više u odnosu na uzorak dobijen u sekvencijalnoj fermentaciji. Najmanja koncentracija ukupnog SO<sub>2</sub> određena je u kontrolnom uzorku. Slični rezultati primećeni su u istraživanju Jolly i saradnika (354), koji su pokazali da vrste *H. uvarum* i *M. pulcherrima* tokom samostalne fermentacije sterilne šire sorte šardone, sa tri različite početne koncentracije šećera, doprinose stvaranju ukupnog SO<sub>2</sub> u rasponu od 21,00 do 24,00 mg/L. Tokom sekvencijalne fermentacije sa vrstom *S. cerevisiae*, koncentracija ukupnog SO<sub>2</sub> dodatno je porasla, dostižući vrednosti od 27,00-39,00 mg/L. Prethodna istraživanja navode da vrste *H. uvarum* i *M. pulcherrima* tokom alkoholne fermentacije, nezavisno od tipa, doprinose i većoj proizvodnji SO<sub>2</sub>

u koncentracijama od 41,60 do 67,00 mg/L (332,384,405) i od 33,00 do 64,00 mg/L (332,398), respektivno. Ovakvi rezultati opravdavaju navode Capece i saradnika (406) da različite vrste vinskih kvasaca mogu proizvesti SO<sub>2</sub> u količini od 10 do 100 mg/L.

#### ***4.4.3. Sadržaj organskih kiselina u vinima sorte prokupac dobijenih u vinifikaciji na laboratorijskom nivou***

Organske kiseline doprinose ukupnoj kiselosti i senzornoj percepciji vina, kao što su ukus, aroma i boja. Takođe, ova jedinjenja utiču na mikrobiološku, fizičku i hemijsku stabilnost vina (407). Vina sa niskim koncentracijama pojedinačnih organskih kiselina karakterišu *tup* ukus i mikrobiološka nestabilnost, dok prekomerna kiselost rezultira vinima sa oštrim i neharmoničnim senzornim profilom (408). Primarni izvor organskih kiselina u vinu je grožđe, pri čemu vinska i jabučna kiselina dominiraju i zajedno čine preko 90% ukupnog sadržaja kiselina. Njihov međusobni odnos 1:1 do 3:1 (vinska i jabučna, respektivno), koji zavisi od sorte grožđa, faze zrenja i klimatskih uslova (409,410), varira i značajno utiče na vrednost pH šire/kljuka i vina tokom alkoholne fermentacije i odležavanja (196,411). Drugi značajan izvor organskih kiselina u vinu je proces fermentacije, uključujući alkoholnu i malolaktičnu fermentaciju, kao i oksidaciju etanola. Čilibarna, mlečna i sirćetna kiselina su neke od kiselina koje nastaju tokom procesa alkoholne fermentacije od strane kvasaca, ali i u prisustvu nekih bakterija (411). *Ne-Saccharomyces* kvasci su u fokusu istraživanja zbog svoje sposobnosti da modifikuju kiselinski profil vina povećanjem i/ili smanjenjem sinteze jabučne, mlečne, čilibarne i sirćetne kiseline (408).

U vinu se sreću nekoliko različitih organskih kiselina, gde svaka od njih različito doprinosi ukupnoj kiselosti i svaka ima posebna i jedinstvena organoleptička svojstva (337). Glavne organske kiseline u vinu su vinska, jabučna, mlečna, limunska, sirćetna i čilibarna kiselina, gde se njihov ukupni sadržaj kreće od 5,50-8,50 g/L, u zavisnosti od sorte grožđa, podneblja i klimatskih uslova tokom godine (407). Poznavanje koncentracija organskih kiselina u vinu predstavlja ključnu fazu kako u proizvodnji, tako i u kontroli kvaliteta vina. Određivanje sadržaja pojedinačnih kiselina omogućava praćenje važnih hemijskih i mikrobioloških procesa, uključujući alkoholnu i malolaktičnu fermentaciju, kao i sazrevanje vina. Pored toga, analiza kiselina omogućava rano otkrivanje neželjenih promena ili kvarenja, čime se mogu pravovremeno izvršiti korekcije, sa

ciljem postizanja visokokvalitetnog vina (409,411). Tabela 4.5 prikazuje sadržaj organskih kiselina u analiziranim uzorcima vina prokupac.

Vinska kiselina, najzastupljenija organska kiselina u vinu, pokazuje značajnu ulogu u održavanju hemijske stabilnosti vina, uključujući boju i ukus (407). U poređenju sa početnom koncentracijom vinske kiseline u kljuku, većina analiziranih uzoraka vina je imala manju koncentraciju ove kiseline. Razlog smanjenja može se objasniti precipitacijom, odnosno taloženjem vinske kiseline u obliku kalcijum ili kalijum tartarata tokom i nakon alkoholne fermentacije (387,412). Koncentracija vinske kiseline u svim analiziranim uzorcima vina prokupac, bez obzira na tip fermentacije, bila je u opsegu od 3,05 do 3,62 g/L. Statistička analiza nije pokazala značajne razlike među analiziranim uzorcima vina, budući da je ova kiselina manje podložna razgradnji od strane kvasaca tokom alkoholne fermentacije (413).

Koncentracija jabučne kiseline u uzorcima vina dobijenim primenom ne-*Saccharomyces* kvasaca, bez obzira na tip fermentacije, nije se statistički razlikovala. Dobijeni rezultati u skladu su sa rezultatima Ge i saradnika (335), koji su pokazali da nema statistički značajne razlike u sadržaju jabučne kiseline u uzorcima vina dobijenim primenom sojeva *P. kluyveri*, *H. uvarum* i *M. pulcherrima*. U uzorku vina dobijenom spontanom fermentacijom sadržaj jabučne kiseline bio je manji u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Manja koncentracija jabučne kiseline sugerise na moguću degradaciju jabučne kiseline od strane prirodno prisutnih kvasaca (414). Pored toga, smanjenje koncentracije jabučne kiseline može rezultirati smanjenjem ukupne kiselosti i trpkosti vina, doprinoseći pozitivnim senzornim karakteristikama (415).

Limunska kiselina ima značajnu primenu u proizvodnji vina, doprinoseći osvežavajućem, citrusnom ukusu, dok se istovremeno koristi i kao sredstvo za zakišeljavanje. Njena prednost u odnosu na vinsku kiselinu ogleda se u tome što formira rastvorljive soli sa kalcijumom i kalijumom (196,416). Ova kiselina doprinosi antioksidativnoj zaštiti vina čime se smanjuju oksidativni procesi koji negativno utiču na boju, aromu i svežinu. Pored toga, ispoljava i antimikrobnu aktivnost, inhibirajući rast nepoželjnih plesni i bakterija tokom alkoholne fermentacije i stabilizacije vina (196).

Tabela 4.5 Sadržaj organskih kiselina, glicerola, redukujućih šećera (g/L) i etanola (% vol.) u analiziranim uzorcima vina sorte prokupac dobijenih u laboratorijskim uslovima

Uzorak	Vinska kiselina	Jabučna kiselina	Limunska kiselina	Mlečna kiselina	Čilibarna kiselina	Sirćetna kiselina	Glukoza	Fruktoza	Glicerol	Etanol
Kljuk	4,35±0,12b	2,04±0,10c	-	-	-	-	119,08±1,13f	118,36±0,75d	-	-
<i>P. kluyveri</i> K-1	3,05±0,00a	0,96±0,04ab	0,08±0,02a	0,88±0,01de	0,66±0,05f	0,47±0,18a	0,35±0,03bc	0,47±0,04a	8,02±0,04bc	12,48±0,51ab
<i>P. kluyveri</i> K-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	3,62±0,27ab	0,95±0,04ab	0,07±0,00a	0,82±0,03cd	0,54±0,01cd	0,57±0,01a	0,41±0,00de	0,54±0,00bc	7,95±0,19bc	12,27±0,41a
<i>M. pulcherrima</i> K-5	3,44±0,74a	0,94±0,23ab	0,07±0,02a	0,92±0,06ef	0,55±0,04cd	0,52±0,05a	0,36±0,01bc	0,53±0,00bc	7,72±0,15bc	12,60±0,15ab
<i>M. pulcherrima</i> K-5/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	3,26±0,44a	1,06±0,12ab	0,09±0,01a	0,89±0,06de	0,65±0,03ef	0,55±0,04a	0,43±0,01e	0,54±0,01bc	7,50±0,39b	12,16±0,32a
<i>H. uvarum</i> Kr-2	3,38±0,19a	1,04±0,00ab	0,08±0,00a	0,89±0,00de	0,59±0,00def	0,54±0,02a	0,34±0,00ab	0,55±0,00c	8,13±0,10c	12,13±0,15a
<i>H. uvarum</i> Kr-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	3,39±0,17a	1,05±0,01ab	0,08±0,00a	0,88±0,01de	0,57±0,02cd	0,55±0,01a	0,36±0,02bc	0,55±0,00c	8,01±0,02bc	12,41±0,15ab
<i>H. uvarum</i> Šd-1	3,58±0,05ab	0,98±0,05ab	0,08±0,00a	1,00±0,01f	0,57±0,01cd	0,54±0,01a	0,41±0,00de	0,56±0,00c	8,07±0,10c	12,33±0,17ab
<i>H. uvarum</i> Šd-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	3,48±0,06a	0,92±0,01ab	0,09±0,00a	0,87±0,02de	0,51±0,01c	0,59±0,00a	0,38±0,00cd	0,54±0,00bc	8,06±0,13c	12,39±0,32ab
<i>H. uvarum</i> Š-2	3,36±0,03a	0,97±0,01ab	0,08±0,00a	0,73±0,04bc	0,41±0,00b	0,53±0,01a	0,43±0,00e	0,56±0,00c	8,22±0,03c	12,44±0,08ab
<i>H. uvarum</i> Š-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	3,22±0,26a	0,84±0,01a	0,07±0,00a	0,69±0,01ab	0,53±0,02cd	0,56±0,02a	0,38±0,01cd	0,53±0,01bc	7,72±0,31bc	12,53±0,71ab
Kvasci epifitne mikrobiote	3,43±0,08a	0,87±0,03a	0,08±0,00a	0,88±0,03de	0,58±0,01cde	0,52±0,39a	0,31±0,00a	0,55±0,00c	8,04±0,16c	12,46±0,04ab
<i>S. cerevisiae</i> ICV D254	3,27±0,05a	1,15±0,00b	0,07±0,06a	0,61±0,03a	0,13±0,04a	0,53±0,06a	0,40±0,01de	0,51±0,00b	6,18±0,14a	13,33±0,50b

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n = 3). Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na statističku značajnu razliku vrednosti u istoj koloni pri nivou značajnosti  $p < 0,05$  (Tukey HSD test).

U analiziranim uzorcima vina prokupac, bez obzira na tip fermentacije, vrednosti koncentracije limunske kiseline bile su u rasponu od 0,07 do 0,09 g/L, što je u skladu sa rezultatima koji su dobili Lima i sardnici (417) za vina pino noir iz različitih vinogradarskih regija duž zapadne obale SAD. Niske koncentracije limunske kiseline ( $< 0,021$  g/L) do sada su uočene i kod različitih vrsta crvenih vina od sorti grožđa barbera (Italija), turiga nacional (Portugal), petit verdo (Francuska) i rubi kaberne (Kalifornija, SAD) (418). Sa druge strane, uočene su i veće koncentracije ove kiseline od 0,32 g/L kod vina sorte širaz i 1,16 g/L kod vina sorte tempranilo (419). Niže koncentracije limunske kiseline mogu biti posledica njene konverzije u jabučnu kiselinu tokom starenja vina (420), dok sa druge strane, prisustvo većih koncentracija može biti indikator da je grožđe bilo napadnuto gljivom *Botrytis* (49) i ukazivati na nedozvoljene tehnološke manipulacije (409).

Mlečna kiselina ima pozitivan uticaj na senzornu percepciju vina, jer doprinosi osećaju punoće i mekoće u ustima (174). Prema navodima Morata i saradnika (421) senzorna percepcija mlečne kiseline ne doprinosi mlečnim notama, već suprotno uobičajnom shvatanju, može doprineti svežim i citrusnim tonovima. Nakon završetka alkoholne fermentacije, ako se ne izvodi postupak malolaktičke fermentacije, koncentracija mlečne kiseline se ne menja značajno (202). Statistička analiza nije pokazala značajne razlike u koncentraciji mlečne kiseline među analiziranim uzorcima vina prokupac, osim u slučaju primene soja *H. uvarum* Šd-1. Prethodna istraživanja pokazala su drugačije rezultate. U istraživanju Li i saradnika (331), vrsta *P. kluyveri* tokom fermentacije sintetičke šire doprinela je proizvodnji mlečne kiseline u koncentraciji od 0,19 g/L, dok je tokom koinokulacije i sekvencijalne inokulacije sa vrstom *S. cerevisiae*, sadržaj mlečne kiseline iznosio 0,26 g/L i 0,29 g/L, respektivno. Prema istraživanju Badura i saradnika (312) uočeno je da različite vrste roda *Hanseniaspora* imaju različitu sposobnost proizvodnje mlečne kiseline. Ovi rezultati ukazuju na to da sposobnost proizvodnje mlečne kiseline nije uobičajna osobina vrste, već u značajnoj meri zavisi od primenjenog soja kvasca, što je u skladu sa dobijenim rezultatima, gde je uočena statistički značajna razlika u sadržaju mlečne kiseline dobijene primenom različitih sojeva *H. uvarum* u samostalnoj fermentaciji.

Ćilibarna kiselina pozitivno utiče na senzorni profil vina, posebno u pogledu percepcije ukusa. Međutim, zbog njenog slanog-gorkog-kiselog ukusa, veće koncentracije mogu negativno da utiču na kvalitet vina (135,196). Neke vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca sposobne su da proizvedu ćilibarnu kiselinu tokom alkoholne fermentacije. Njena sinteza se odvija u ranim fazama fermentacije i zavisi najviše od izvora azota (411), zbog čega se smatra nusproizvodom

metabolizma azota kod kvasaca (412). Koncentracija ćilibarne kiseline u crvenim vinima može biti do 2,60 g/L (196). Statistička analiza pokazala je značajne razlike u koncentraciji ćilibarne kiseline među pojedinim uzorcima vina. Uzorak vina dobijen primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1 sadržao je veću koncentraciju ćilibarne kiseline u odnosu na uzorak dobijen u sekvencijalnoj fermentaciji. Sa druge strane, uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura *M. pulcherrima* K-5 i *H. uvarum* Š-2 sadržali su niže koncentracije ćilibarne kiseline u poređenju sa uzorcima dobijenim primenom sekvencijalne fermentacije. U uzorku vina dobijenom primenom komercijalnog soja vrste *S. cerevisiae* detektovana je najmanja koncentracija ćilibarne kiseline. Dobijeni rezultati u skladu su sa istraživanjem Liu i saradnika (332), koje je pokazalo da uzorci vina dobijeni primenom sekvencijalne fermentacije *H. uvarum/S. cerevisiae* i *M. pulcherrima/S. cerevisiae* imaju veće vrednosti ćilibarne kiseline u odnosu na uzorke vina dobijenih primenom čistih kultura ovih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca. Prema istraživanju Torres-Guardado i saradnika (357) prosečne vrednosti proizvodnje ćilibarne kiseline kod vrsta *M. pulcherrima* i *H. uvarum* iznose 0,27 g/L i 0,30 g/L, respektivno. Međutim, prethodna istraživanja pokazala su da različiti sojevi *M. pulcherrima* mogu da proizvedu ćilibarnu kiselinu u granicama od 0,62-1,70 g/L (96,358). Takođe, istraživanje Ge i saradnika (335) pokazalo je da vrste *P. kluyveri* i *H. uvarum* proizvode ćilibarnu kiselinu u koncentraciji od 1,07 g/L i 1,04 g/L, respektivno, što nije u skladu sa dobijenim rezultatima. Razlike u nivou proizvodnje ćilibarne kiseline mogu se pripisati sastavu šire/kljuka, kao i poreklu soja unutar iste vrste kvasca, budući da genetičke varijacije unutar vrste određuju njihove metaboličke sposobnosti (357).

Sirćetna kiselina, obavezni sastojak vina, nastaje tokom alkoholne fermentacije, ali i bakterijskom aktivnošću i pri optimalnim koncentracijama od 0,20-0,70 g/L doprinosi poboljšanju aromatskog profila vina, kao prekursor voćnih acetatnih estara preko acetil CoA (422). Nezavisno od primenjenog soja kvasca nije bilo statistički značajne razlike u sadržaju sirćetne kiseline detektovane u dobijenim uzorcima. Prethodna istraživanja ukazala su na to da različiti sojevi kvasaca mogu da proizvedu i do 45% veće količine sirćetne kiseline u odnosu na dobijene rezultate (423). Istraživanje Fazio i saradnika (424) pokazalo je da je vrsta *H. uvarum* tokom proizvodnje belog vina sorte karikante u sekvencijalnim fermentacijama sa autohtonom i komercijalnom vrstom *S. cerevisiae*, doprinela proizvodnji sirćetne kiseline od 0,65 g/L i 1,02 g/L, respektivno. U istraživanju Li i saradnika (331) primećeno je da vrsta *P. kluyveri* tokom samostalne fermentacije sintetičke šire doprinela proizvodnji sirćetne kiseline u koncentraciji od 0,55 g/L.

Kako su ne-*Saccharomyces* kvasci često povezani sa većom produkcijom sirćetne kiseline (425), dobijeni rezultati ukazuju da kod analiziranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca nije uočena prekomerna sinteza sirćetne kiseline. Iako istraživanje Sadoudi i saradnika (349) pokazuje da sekvencijalna fermentacija dovodi do interakcija u metaboličkim putevima sinteze sirćetne kiseline, u analiziranim uzorcima nije utvrđena statistički značajna razlika u koncentraciji sirćetne kiseline dobijene pri samostalnoj i sekvencijalnoj fermentaciji, kao ni u korišćenim sojevima kvasaca.

Drugu grupu primarnih metabolita u grožđu, koji su direktno povezani sa kvalitetom šire i vina, čine šećeri. U svim analiziranim uzorcima vina, koncentracija glukoze kretala se u rasponu od 0,31 do 0,43 g/L, dok su koncentracije fruktoze bile nešto više, sa vrednostima u opsegu od 0,47 do 0,56 g/L (tabela 4.5). Nezavisno od primenjenog soja kvasca ili tipa fermentacije, u svim slučajevima potrošeno je više od 95% količine šećera prisutne na početku fermentacionog procesa, pri čemu se sva vina mogu klasifikovati kao suva vina.

Povećanje koncentracije glicerola jedna je od prvih prepoznatljivih prednosti ne-*Saccharomyces* kvasaca, zbog pozitivnog uticaja na senzorna svojstva vina (172). Glicerol poboljšava strukturu i teksturu (osećaj u ustima), doprinosi slatkoći i kompleksnosti vina, dok sorta grožđa i stil vina određuju u kojoj meri on utiče na ova svojstva (135). Prag senzorne detekcije glicerola u vinu je oko 5 g/L (88). Vrsta, odnosno soj kvasca, veličina inokuluma, temperatura, aeracija, koncentracija šećera i sulfita neki su od faktora koji utiču na proizvodnju glicerola (88,426,427). Statistička analiza nije pokazala razlike u koncentraciji glicerola među analiziranim uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Najniža vrednost koncentracije glicerola bila je zabeležena u kontrolnom uzorku. Dobijeni rezultati u skladu su sa prethodnim istraživanjima, koja su potvrdila da primena ne-*Saccharomyces* kvasaca (*P. kluyveri*, *M. pulcherrima* i *H. uvarum*) povećavaju koncentraciju glicerola u vinu (101,168,387).

#### ***4.4.4. GC/MS analiza isparljivih aromatskih jedinjenja u vinima sorte prokupac dobijenih u vinifikacijama na laboratorijskom nivou***

Primarne arome vina definišu se kao jedinjenja koja potiču direktno od sorte grožđa doprinoseći tipičnosti vina. U ova jedinjenja ubrajaju se terpeni, norizoprenoidi, tioli i metoksipirazini.

Sekundarne arome predstavljaju jedinjenja koja proizvode kvasci tokom procesa alkoholne fermentacije (147). Uticaj ne-*Saccharomyces* kvasaca na aromatski profil vina je teško predvideti, pa je njihov doprinos ovom segmentu neophodno pažljivo proceniti, imajući u vidu specifične interakcije između jedinjenja prisutnih u širi i metabolitičke aktivnosti pojedinih vrsta kvasaca koje učestvuju u procesu alkoholne fermentacije (219). Ne-*Saccharomyces* kvasci poseduju enzimske aktivnosti koje mogu omogućiti oslobađanje isparljivih aromatskih jedinjenja iz njihovih prekursora, a takođe mogu direktno uticati na njihovo formiranje sopstvenom metabolitičkom aktivnošću (399). U isparljiva aromatska jedinjenja ubrajaju se viši alkoholi, estri, aldehidi, isparljive masne kiseline, isparljivi fenoli, jedinjenja sumpora itd. Sem toga, ne-*Saccharomyces* kvasci utiču na aromatski profil tokom starenja vina na talogu, jer autolizom ćelija kvasaca dolazi do oslobađanja različitih komponenti u vino, poput polisaharida (uglavnom manoproteina), oligosaharida, slobodnih aminokiselina, peptida i masnih kiselina, dok istovremeno dolazi i do adsorpcije jedinjenja vina na ćelijske zidove kvasaca, kao i do smanjenja oksidacije polifenola, čime se poboljšavaju punoća i tekstura vina, aromatski profil, boja i koloidna stabilnost (199).

Tabela 4.6 prikazuje isparljiva aromatska jedinjenja i njihove koncentracije u analiziranim uzorcima vina prokupac. Pored toga, dati su podaci o mirisnim deskriptorima (opis arome) i senzornim pragovima detekcije za pojedina isparljiva aromatska jedinjenja (tabela 4.7). Identifikovano i kvantifikovano je ukupno 86 isparljivih aromatskih jedinjenja, koja su klasifikovana u deset grupa: viši alkoholi, estri (etil i acetatni estri), isparljive masne kiseline, karbonilna jedinjenja, jedinjenja sumpora, fenolna jedinjenja, terpenska jedinjenja, norizoprenoidi, laktoni i ostala jedinjenja.

Na osnovu rezultata može se uočiti da viši alkoholi predstavljaju najzastupljeniju grupu isparljivih aromatskih jedinjenja u svim analiziranim uzorcima vina prokupac. Sledeća grupa po zastupljenosti su estri, uključujući etil i acetatne estre, dok su isparljive masne kiseline i ostale grupe jedinjenja bile prisutne u znatno manjim procentnim udelom.

Tabela 4.6 Kvalitativna i kvantitativna analiza isparaljivih aromatskih jedinjenja (mg/L) u vinima sorte prokupac dobijenih u laboratorijskim uslovima

Naziv jedinjenja	<i>P. kluyveri</i> K-1	<i>P. kluyveri</i> K-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>M. pulcherrima</i> K-5	<i>M. pulcherrima</i> K-5/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Kr-2	<i>H. uvarum</i> Kr-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Šd-1	<i>H. uvarum</i> Šd-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Š-2	<i>H. uvarum</i> Š-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	Kvasci epifitne mikrobiote	<i>S. cerevisiae</i> ICV D254
<b>Viši alkoholi</b>												
Izobutil alkohol	2,96±0,06e	0,51±0,01a	3,13±0,05e	8,55±0,15h	9,10±0,13i	0,72±0,01a	4,20±0,06f	1,53±0,03c	1,97±0,03d	1,29±0,02b	9,33±0,11i	4,93±0,10g
Butil alkohol	0,18±0,00i	0,01±0,00b	0,04±0,00de	0,08±0,00g	0,11±0,00h	0,05±0,00e	0,03±0,00c	0,04±0,00d	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,21±0,00j	0,05±0,00f
3-Metil-1-butanol	16,26±0,33e	9,04±0,14b	11,07±0,19c	21,00± 0,37g	20,81± 0,30g	6,44±0,09a	14,98±0,20d	6,46±0,12a	10,50±0,18c	9,04±0,15b	39,36±0,48h	19,14±0,38f
1-Pentanol	0,06±0,00g	0,01±0,00c	0,00±0,00a	0,02±0,00e	0,02±0,00f	0,01±0,00b	0,02±0,00e	0,01±0,00c	0,00±0,00a	0,01±0,00c	0,00±0,00a	0,02±0,00d
[R-(R*,R*)]-2,3-Butandiol	2,68±0,05i	0,06±0,00a	0,66±0,01d	1,19±0,02f	1,32±0,02g	1,35±0,02g	0,48±0,01c	1,62±0,03h	0,42±0,01c	0,00±0,00a	1,05±0,01e	0,32±0,01b
[S-(R*,R*)]-2,3-Butandiol	3,04±0,06h	0,44±0,01b	1,62±0,03g	0,46±0,01b	0,73±0,01e	0,49±0,01bc	0,69±0,01de	0,66±0,01d	0,55±0,01c	0,47±0,01b	0,90±0,01f	0,20±0,00a
3-Etoksi propanol	0,63±0,01g	0,27±0,00c	0,42±0,01f	0,23±0,00b	0,23±0,00b	0,23±0,00b	0,40±0,01f	0,35±0,01e	0,35±0,01e	0,28±0,00c	0,32±0,00d	0,06±0,00a
3-Metil-1-pentanol	0,02±0,00d	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,02±0,00c	0,00±0,00a	0,03±0,00d	0,00±0,00a
3-Heksanol	0,04±0,00f	0,03±0,00e	0,04±0,00e	0,02±0,00b	0,06±0,00h	0,04±0,00g	0,03±0,00c	0,06±0,00h	0,04±0,00f	0,04±0,00fg	0,02±0,00a	0,03±0,00d
o-Ksilol	0,03±0,00b	0,00±0,00a	0,09±0,00d	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,06±0,00c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
1-Heksanol	1,08±0,02f	0,69±0,01cd	1,08±0,02f	0,67±0,01c	0,73±0,01d	0,62±0,01b	1,25±0,02g	1,06±0,02f	1,06±0,02f	0,79±0,01e	1,07±0,01f	0,43±0,01a
1-Metoksi-2-butanol	0,20±0,00i	0,10±0,00d	0,11±0,00e	0,06±0,00b	0,12±0,00f	0,08±0,00c	0,15±0,00h	0,11±0,00e	0,10±0,00d	0,10±0,00d	0,14±0,00g	0,01±0,00a
1-Heptanol	0,28±0,00j	0,04±0,00fg	0,08±0,00h	0,00±0,00a	0,03±0,00c	0,04±0,00de	0,12±0,00i	0,00±0,00a	0,04±0,00g	0,04±0,00d	0,04±0,00ef	0,02±0,00b
2-Oktanol (IS)	1,44±0,03	0,93±0,01	1,44±0,02	0,85±0,01	0,93±0,01	0,83±0,01	1,42±0,02	1,09±0,02	1,19±0,02	1,05±0,02	1,45±0,02	0,93±0,02
Etil heksanol	0,01±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Benzil alkohol	1,20±0,02h	0,41±0,01cd	0,72±0,01g	0,36±0,01b	0,40±0,01cd	0,39±0,01bc	0,73±0,01g	0,40±0,01c	0,63±0,01f	0,47±0,01e	0,43±0,01d	0,27±0,01a
2,3-Metilbutanol	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,21±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
2-Feniletil alkohol	26,14±0,52h	13,91±0,22c	26,26±0,45h	11,29±0,20b	13,38±0,19c	13,46±0,18c	22,15±0,30f	15,05±0,28d	23,82±0,42g	15,47±0,26d	19,23±0,23c	5,03±0,10a
2-Izopropil-5-metil-1-heptanol	0,04±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,35±0,00c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a

2-Butiloktanol	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,11±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,43±0,01a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Tirosol	0,75±0,01i	0,24±0,00d	0,59±0,01h	0,19±0,00bc	0,27±0,00e	0,25±0,00de	1,40±0,02j	0,18±0,00b	0,43±0,01g	0,31±0,01f	0,21±0,00c	0,12±0,00a
Homovanilil alkohol	0,12±0,00g	0,04±0,00d	0,16±0,00h	0,01±0,00b	0,00±0,00a	0,02±0,00bc	0,64±0,01i	0,03±0,00c	0,08±0,00f	0,05±0,00e	0,00±0,00a	0,05±0,00de
4-(3-Hidroksi-1-butinil)-3,5,5-trimetil-2-cikloheksen-1-ol	0,02±0,00b	0,00±0,00a	0,02±0,00c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,02±0,00d	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Triptofol	3,62±0,07h	1,57±0,03c	3,47±0,06g	1,65±0,03cd	1,98±0,03e	1,56±0,02c	4,96±0,07i	1,29±0,02b	2,13±0,04f	2,15±0,04f	1,75±0,02d	0,39±0,01a
Σ	60,80	28,30	51,11	46,63	50,22	26,58	54,70	29,94	43,35	31,56	75,54	32,00

*Etil estri*

Etil propanoat	0,09±0,00c	0,02±0,00ab	0,67±0,01c	0,02±0,00ab	0,02±0,00a	0,02±0,00a	0,33±0,00d	0,02±0,00ab	0,02±0,00a	0,02±0,00ab	0,03±0,00b	0,02±0,00a
Etil izobutirat	0,00±0,00a	0,00±0,00b	0,00±0,00a	0,03±0,00d	0,00±0,00a	0,00±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,02±0,00c
Etil laktat	8,71±0,17e	5,18±0,08b	8,09±0,14d	4,67±0,08a	4,64±0,07a	4,56±0,06a	6,79±0,09c	6,82±0,13c	8,02±0,14d	6,72±0,11c	8,59±0,10e	4,72±0,09a
Etil 3-hidoksibutirat	0,46±0,01i	0,05±0,00c	0,19±0,00g	0,03±0,00b	0,06±0,00d	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,04±0,00c	0,28±0,00h	0,05±0,00c	0,07±0,00e	0,16±0,00f
Butil laktat	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,53±0,01b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Etil 2-hidroksiizovalerat	0,10±0,00f	0,04±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,04±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,04±0,00c	0,06±0,00e	0,05±0,00d	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Etil heksanoat	0,09±0,00c	0,00±0,00a	0,10±0,00d	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,14±0,00e	0,00±0,00a	0,06±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,34±0,01f
Dietil sukcinat	0,37±0,01e	0,35±0,01d	0,44±0,01f	0,27±0,00b	0,36±0,01de	0,34±0,00d	0,78±0,01g	0,29±0,01c	0,35±0,01de	0,37±0,01e	0,13±0,00a	0,80±0,02h
Etil oktanoat	0,64±0,01c	0,90±0,01e	0,56±0,01b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,70±0,01d	0,00±0,00a	1,34±0,02g	0,00±0,00a	1,22±0,01f	0,93±0,02e
Monoetil sukcinat	1,53±0,03g	0,00±0,00a	1,22±0,02e	0,99±0,02d	0,99±0,01d	1,26±0,02e	1,72±0,02h	1,36±0,03f	1,25±0,02e	0,46±0,01c	0,36±0,00b	1,74±0,03h
Dietil malat	0,07±0,00e	0,02±0,00b	0,08±0,00f	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,02±0,00bc	0,39±0,01h	0,00±0,00a	0,04±0,00d	0,02±0,00c	0,00±0,00a	0,11±0,00g
Metil 2,3-dihidroksibenzoat	0,06±0,00e	0,02±0,00b	0,07±0,00f	0,02±0,00b	0,02±0,00b	0,02±0,00b	0,62±0,01g	0,01±0,00b	0,04±0,00d	0,03±0,00c	0,00±0,00a	0,02±0,00b
2-Etilheksil butirat	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,14±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,19±0,00c	0,00±0,00a
2-(Hidroksimetil)-1-propilbutil-2-metilpropanoat	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,15±0,00c	0,00±0,00a	0,12±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Dietil 2-hidroksi-3-metilsukcinat	0,23±0,00g	0,10±0,00c	0,20±0,00f	0,06±0,00a	0,06±0,00ab	0,07±0,00b	0,64±0,01i	0,07±0,00ab	0,15±0,00e	0,12±0,00d	0,07±0,00ab	0,31±0,01h
Etil kaprat	0,02±0,00bc	0,01±0,00bc	0,02±0,00d	0,02±0,00c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,02±0,00d	0,01±0,00b	0,00±0,00a	0,04±0,00e
Etil 4-hidroksibenzoat	0,12±0,00h	0,06±0,00e	0,11±0,00g	0,02±0,00b	0,05±0,00c	0,04±0,00c	0,45±0,01i	0,00±0,00a	0,07±0,00f	0,05±0,00d	0,00±0,00a	0,06±0,00e
Etil 8-nonenoat	0,27±0,01g	0,13±0,00d	0,28±0,00g	0,09±0,00b	0,12±0,00d	0,12±0,00d	0,81±0,01h	0,10±0,00c	0,20±0,00f	0,14±0,00e	0,10±0,00c	0,06±0,00a
Etil 2,4-dimetilpent-3-il fumarat	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,47±0,01b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Etil vanilat	0,37±0,01h	0,21±0,00f	0,39±0,01i	0,13±0,00b	0,17±0,00d	0,18±0,00de	0,72±0,01j	0,13±0,00b	0,30±0,01g	0,19±0,00e	0,15±0,00c	0,11±0,00a

Etil 4-hidroksicinamat	0,50±0,01h	0,13±0,00cd	0,59±0,01i	0,09±0,00b	0,16±0,00e	0,13±0,00d	1,50±0,02j	0,11±0,00bc	0,46±0,01g	0,20±0,00f	0,15±0,00de	0,00±0,00a
Etil nonanoat	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,01±0,00c	0,00±0,00a	0,01±0,00d	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,01±0,00b	0,00±0,00a
Etil heksadekanoat	0,04±0,00b	0,00±0,00a	0,16±0,00c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,68±0,01d	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Metil oleat	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,11±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,60±0,01c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Etil oleat	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,31±0,01b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,88±0,01c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Etil oktadekanoat	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,10±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,57±0,01c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Σ	13,67	7,22	14,22	6,44	6,83	6,92	18,79	9,12	12,66	8,43	11,07	9,44

#### *Acetatni estri*

Etil acetat	12,29±0,25f	8,49±0,14bc	11,04±0,19e	15,31±0,27h	15,90±0,23i	7,93±0,11bc	13,46±0,18g	8,33±0,16b	8,62±0,15c	9,71±0,16d	21,93±0,27j	3,82±0,08a
Propil acetat	0,07±0,00f	0,02±0,00bc	0,00±0,00a	0,02±0,00cd	0,02±0,00b	0,02±0,00bc	0,31±0,00g	0,02±0,00cd	0,03±0,00d	0,03±0,00d	0,03±0,00e	0,00±0,00a
Izobutil acetat	0,00±0,00a	0,03±0,00cd	0,00±0,00a	0,03±0,00e	0,04±0,00g	0,02±0,00c	0,03±0,00f	0,03±0,00ef	0,05±0,00h	0,03±0,00d	0,08±0,00i	0,01±0,00b
Izoamil acetat	0,32±0,01i	0,19±0,00f	0,21±0,00g	0,10±0,00b	0,12±0,00c	0,13±0,00d	0,20±0,00g	0,14±0,00d	0,16±0,00e	0,15±0,00e	0,25±0,00h	0,05±0,00a
Aktivni amil acetat	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,04±0,00e	0,03±0,00b	0,04±0,00d	0,03±0,00c	0,06±0,00g	0,00±0,00a	0,04±0,00d	0,00±0,00a	0,06±0,00f	0,00±0,00a
1,3-Diacetoksipropan	0,42±0,01i	0,19±0,00e	0,34±0,01h	0,11±0,00b	0,12±0,00b	0,16±0,00cd	0,41±0,01i	0,15±0,00c	0,29±0,01g	0,17±0,00d	0,24±0,00f	0,05±0,00a
2-Feniletil acetat	0,07±0,00f	0,02±0,00bc	0,06±0,00e	0,02±0,00b	0,02±0,00bc	0,03±0,00bc	0,45±0,01g	0,02±0,00b	0,04±0,00d	0,03±0,00c	0,02±0,00b	0,00±0,00a
3-Metil-2-butil acetat	0,03±0,00d	0,02±0,00bc	0,00±0,00a	0,02±0,00cd	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,02±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Σ	13,20	8,96	11,69	15,64	16,26	8,32	14,92	8,69	9,23	10,14	22,61	3,93

#### *Ispaljive masne kiseline*

Izobuterna kiselina	0,00±0,00a	0,03±0,00b	0,00±0,00a	0,10±0,00e	0,10±0,00e	0,08±0,00d	0,19±0,00g	0,04±0,00c	0,08±0,00d	0,17±0,00f	0,00±0,00a	0,04±0,00c
Izovalerična kiselina	0,08±0,00d	0,02±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,03±0,00c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
2-Metil butanska kiselina	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,02±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Heksanska kiselina	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,19±0,00c	0,00±0,00a	0,05±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Geranska kiselina	0,05±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Nonanska kiselina	0,40±0,01e	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,04±0,00b	0,05±0,00bc	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,05±0,00c	0,00±0,00a	0,26±0,01d
Izovanilična kiselina	0,47±0,01g	0,25±0,00e	0,00±0,00a	0,14±0,00b	0,19±0,00cd	0,21±0,00d	1,25±0,02h	0,19±0,00c	0,33±0,01f	0,27±0,00e	0,13±0,00b	0,14±0,00b
3,4,5-Trimetoksifenil sirćetna kiselina	0,31±0,01h	0,11±0,00d	0,34±0,01i	0,00±0,00a	0,14±0,00ef	0,15±0,00f	1,32±0,02j	0,09±0,00c	0,23±0,00g	0,13±0,00e	0,13±0,00de	0,06±0,00b
Heksadekanska kiselina	0,08±0,00b	0,00±0,00a	0,21±0,00c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,62±0,01d	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Σ	1,39	0,41	0,55	0,24	0,49	0,49	3,57	0,32	0,72	0,62	0,26	0,50

<i>Karbonilna jedinjenja</i>												
Acetoin	0,13±0,00j	0,05±0,00f	0,07±0,00h	0,03±0,00c	0,04±0,00e	0,04±0,00d	0,11±0,00i	0,04±0,00de	0,13±0,00j	0,06±0,00g	0,00±0,00a	0,03±0,00b
Fenilacetaldehid	0,00±0,00a	0,01±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Σ	0,13	0,06	0,07	0,03	0,04	0,04	0,11	0,04	0,13	0,06	0,00	0,03
<i>Sumporna jedinjenja</i>												
3-(Metiltio)-1-propanol	0,20±0,00i	0,10±0,00cd	0,15±0,00g	0,10±0,00c	0,11±0,00cd	0,09±0,00b	0,18±0,00h	0,07±0,00a	0,12±0,00f	0,11±0,00e	0,12±0,00f	0,11±0,00de
Σ	0,20	0,10	0,15	0,10	0,11	0,09	0,18	0,07	0,12	0,11	0,12	0,11
<i>Fenolna jedinjenja</i>												
Estragol	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,02±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
p-Vinilgvajakol	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,03±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Eugenol	0,03±0,00c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,02±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Acetovanilon	0,62±0,01f	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,02±0,00c	0,03±0,00d	0,07±0,00e	0,02±0,00b	0,03±0,00d	0,04±0,00d	0,00±0,00a	0,02±0,00bc
2,4-Di-tert-butil fenol	0,28±0,01b	0,00±0,00a	1,19±0,02c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	1,59±0,02d	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
3,4,5-Trimetoksifenol	0,00±0,00a	0,04±0,00f	0,08±0,00g	0,03±0,00d	0,03±0,00e	0,02±0,00c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,08±0,00g	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,01±0,00b
Σ	0,93	0,04	1,29	0,03	0,05	0,05	1,66	0,02	0,16	0,04	0,00	0,03
<i>Terpenska jedinjenja</i>												
Linalol oksid	0,06±0,00c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,02±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Geraniol	0,02±0,00c	0,00±0,00a	0,02±0,00c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,01±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
trans Farnesol	0,03±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Σ	0,11	0,00	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00
<i>C<sub>13</sub>-norizoprenoidi</i>												
3-Hidroksi-β-damascenon	0,05±0,00e	0,03±0,00d	0,07±0,00f	0,02±0,00bcd	0,02±0,00cd	0,02±0,00bcd	0,70±0,01h	0,01±0,00b	0,08±0,00g	0,02±0,00bcd	0,02±0,00bc	0,00±0,00a
Σ	0,05	0,03	0,07	0,02	0,02	0,02	0,70	0,01	0,08	0,02	0,02	0,00
<i>Laktonska jedinjenja</i>												
γ-Butirolakton	0,98±0,02g	0,54±0,01a	0,88±0,01f	0,53±0,01a	0,51±0,01a	0,51±0,01a	0,81±0,01e	0,85±0,02f	0,78±0,01d	0,71±0,01c	0,68±0,01c	0,60±0,01b
Pantolakton	0,00±0,00a	0,02±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
4-Karbetoksi-γ-butirolakton	0,20±0,00h	0,07±0,00ef	0,00±0,00a	0,06±0,00cde	0,04±0,00b	0,06±0,00cd	0,70±0,01j	0,06±0,00de	0,12±0,00g	0,08±0,00f	0,05±0,00bc	0,27±0,01i
Σ	1,18	0,63	0,88	0,59	0,55	0,57	1,51	0,91	0,90	0,79	0,73	0,87

<i>Ostala jedinjenja</i>												
1,3,5- Trimetilbenzen	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,05±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,13±0,00c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
2- (Tiocijanometil)io benzotiazol	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,19±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
4-(1,3- Dimetilbutil)amin o-difenilamin	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,22±0,00b	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	1,11±0,02c	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a	0,00±0,00a
Σ	0,00	0,00	0,46	0,00	0,00	0,00	1,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n = 3). Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na statističku značajnu razliku vrednosti u istoj koloni pri nivou značajnosti  $p < 0,05$  (Tukey HSD test).

Tabela 4.7 Mirsni deskriptori i pragovi senzorne detekcije isparljivih aromatskih jedinjenja

Naziv jedinjenja	Prag senzorne detekcije, mg/L	Opis arome
<i>Viši alkoholi</i>		
Izobutil alkohol	0,50 (428)	Slatka, voćna (429)
Butil alkohol	0,15 (428)	Slatka (430), voćna (428), medicinski (431)
1-Metoksi-2-propanol	40 (432)	Alkoholna, rastvarač (432)
3-Metil-1-butanol	1 (433)	Viski, slad, paljevina (433) i sir (434)
1-Pentanol	64 (431)	Voćna (434), badem i balsam (431)
[R-(R*,R*)]-2,3-Butandiol	120 (434)	Voćna (432), puterna i kremasta (434)
[S-(R*,R*)]-2,3-Butandiol	150 (432)	Voćna (432)
3-Etoksi propanol	0,10 (432)	Voćna (432)
3-Metil-1-pentanol	0,50 (430)	Vinska, kakao (435), zemlja, pečurke (430), vegetativna (432)
3-Heksanol	0,40 (434)	Cvetna, vegetativna (434), sveža, gorka i masna (436)
Furfuril alkohol	45 (437)	Plesnivo seno (437)
1-Heksanol	0,11 (435)	Cvetna, miris pokošene trave (438), zeljasta, slična drvetu (435)
1-Heptanol	0,002 (428)	Limun, pomorandža (439)
Etil heksanol	0,27 (436)	Cvetna, slakto voćna (435), pečurke (434), nalik vosku i sapunu (432)
Benzil alkohol	0,10 (428)	Citrusna, (434), voćna (436), badem (430), jasmin i zumbul (428)
2-Feniletil alkohol	1 (428)	Cvetna, ruža, med (436) i parfem (434)
Tirosol	0,033 (431)	Cvetna, voćna, blago slatka (440)
<i>Etil estri</i>		
Etil propanoat	0,01 (436)	Slatka, voćna (435), banana, jabuka (436)
Etil butirat	0,02 (441)	Jabuka (441)
Etil izobutirat	0,0001 (436)	Slatka, voćna (435)
Etil piruvat		Karamelna, eterična, voćna, slatka (442)
Etil laktat	14 (405)	Mlečna, malina (434) i puterna (431)
Etil 3-hidorksibutirat	0,13 (428)	Grožđe, jabuke (428)
Butil laktat	1 (435)	Kremasta, mlečna, slatka (435)
Etil 2-hidroksiizovalerat	21 (443)	Voćna i cvetna (443)
Etil heksanoat	0,001 (436)	Voćna, zelena jabuka, banana (436), cvetna, ljubičica (430), anis (434)
Dietil sukcinat	1,20 (435)	Voćna (435), vinska (438)
Etil oktanoat	0,002 (432)	Slatka, voćna, cvetna, banana, kruška (436), ananas (434)
Monoetil sukcinat	1000 (444)	Karamel, kafa (444)
Dietil malat	0,76 (428)	Breskva, pokošena trava i prezrela (438), kondirano voće (428)
Etil kaprat	0,10 (428)	Voćna, grožđe (435), slatka (438), cvetna, ruža i nalik vosku (432)
Etil 8-nonenoat		Cvetna (ruža), voćna (ananas), vino (445,446)
Etil vanilat	0,99 (438)	Slatka, med, vanila (435)
Etil dodekanoat	0,50 (447)	Slatka, cvetna, voćna (447)
Etil nonanoat	1,30 (435)	Cvetna, voćna (435) i nalik vosku (430)
Etil heksadekanoat	1,50 (435)	Voćna, slatka, masna i užegla (435)
Etil oleat	0,87 (448)	
Etil oktadekanoat		Nalik vosku (449)

<i>Acetatni estri</i>		
Etil acetat	5 (436)	Voćna, ananas, slatka, anis, balsam (432,434,436)
Propil acetat	4,70 (436)	Slatka, voćna (430)
Izobutil acetat	1,60 (434)	Rastvarač (434)
Izoamil acetat	0,03 (431)	Voćna, banana, kruška i slatka (422,435)
Aktivni amil acetat	0,02 (430)	Voćna, prijatna i masna (430)
2-Feniletil acetat	0,25 (450)	Prijatna, voćna, cvetna, ruža, med (432,434,439) i duvan (431)
<i>Isparljive masne kiseline</i>		
Izobuterna kiselina	2,30 (451)	Užeglo, puter i sir (452)
Izovalerična kiselina	0,033 (438)	Slatka (453)
2-Metil butanska kiselina	0,033 (454)	Sir, slatka (455)
Dekanska kiselina	15 (456)	Masna, neprijatna (456)
Heksanska kiselina	0,42 (431)	Slatka (438), uljna (431), sir, užegla i masna (433)
Heksadekanska kiselina	10 (435)	
Geranska kiselina	0,04 (436)	Green (436)
Nonanska kiselina	3 (435)	Masna (435)
Heksadekanska kiselina	10 (435)	
<i>Karbonilna jedinjenja</i>		
Acetoin	150 (457)	Puterna, kremasta (457)
Fenilacetaldehid	0,001 (435)	Cvetna, ruža (435), med (458)
<i>Sumporna jedinjenja</i>		
3-(Metiltio)-1-propanol	0,50 (434)	Kuvano povrće (459)
<i>Fenolna jedinjenja</i>		
p-Vinilgvajakol	0,04 (435)	Začinska, kari (435) i karanfilići (431)
4-Etilfenol	0,03 (431)	Grožđe (456)
Eugenol	0,005 (435)	Začinska, med, cimet i karanfilići (431,435)
Acetovanilon	0,07 (428)	Cvetna, karanfilići i vanila (460)
2,4-Di-tert-butil fenol	0,20 (461)	Ruža i cvetna (462)
<i>Terpenska jedinjenja</i>		
Linalol oksid	0,025 (463)	Cvetna (464), med (465)
Limonen	0,01 (442)	Citrusna, voćna, drvo (442)
Geraniol	0,01 (466)	Citrusna, cvetna, cvet pomorandže, ruže, zdravac (436)
trans Farnezol	2,40 (435)	Cvetna (435)
<i>C<sub>13</sub>-norizoprenoidi</i>		
3-Hidroksi-β-damascenon		Note čaja i duvana (467)
<i>Laktonska jedinjenja</i>		
γ-Butirolakton	0,035 (438)	Karamela (468), voćna (469)
Pantolakton	18,60 (470)	Voće (dunja), slatko (470)
4-Karbetoksi-γ-butirolakton	0,40 (471)	Slatka i kokos, (471)

Uz svaki prag detekcije i opis arome u zagradi se nalazi broj reference.

#### 4.4.4.1. Viši alkoholi

Ne-*Saccharomyces* kvasci sposobni su da tokom alkoholne fermentacije proizvode različite koncentracije viših alkohola, čije prisustvo u većim količinama može negativno uticati na senzorne karakteristike vina (427,472). Proizvodnjom nižih koncentracija viših alkohola smanjuje se intenzitet aroma karakterističnih za ovu grupu jedinjenja, čime dolaze do izražaja sortne arome (427). Generalno, za razliku od kvasaca vrste *S. cerevisiae*, ne-*Saccharomyces* kvasci uglavnom proizvode niže koncentracije viših alkohola, mada među vrstama i sojevima ove grupe se može uočiti značajna varijabilnost (135). Proizvodnja viših alkohola zavisi od sorte vinove loze, sastava šire, uslova fermentacije, primenjene tehnike proizvodnje vina, primenjong soja kvasca i veličine inokuluma. Viši alkoholi i acetil-CoA predstavljaju glavne prekursore acetatnih estara, uključujući estre razgranatog lanca i aromatske estre koji doprinose povećanju kompleksnosti ukusa vina (427). Poželjno je da sadržaj ukupnih viših alkohola bude manji od 300 mg/L, jer veće koncentracije mogu maskirati sortne, odnosno primarne arome vina (473).

Svi analizirani uzorci vina prokupac sadržali su koncentraciju ukupnih viših alkohola manju od 100 mg/L. Uzorak vina dobijen primenom spontane fermentacije sadržao je koncentraciju ukupnih viših alkohola od 75,54 mg/L, predstavljajući uzorak sa najvećom koncentracijom ukupnih viših alkohola. Koncentracija ukupnih viših alkohola među uzorcima vina dobijeni primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca bila je u opsegu od 43,35 do 60,80 mg/L. Uzorak vina dobijen primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1 imao je najveću koncentraciju ukupnih viših alkohola u poređenju sa ostalim uzorcima (60,80 mg/L). Razlike u koncentracijama viših alkohola rezultat su specifičnosti mikrobnog metabolizma, uključujući i različite mehanizme regulacije Ehrlich-ovog puta, koji ima ključnu ulogu u biosintezi ovih jedinjenja (474). Za razliku od uzoraka vina dobijeni primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, uzorci vina dobijeni sekvencijalnom fermentacijom imali su manju koncentraciju ukupnih viših alkohola. Pored toga, kod ovih uzoraka, osim kod uzorka dobijenog primenom *M. pulcherrima* K-5/*S. cerevisiae* ICV D254, koncentracija ukupnih viših alkohola bila je manja u poređenju sa kontrolnim uzorkom, što je u skladu sa literaturnim podacima koji navode da primena sekvencijalne fermentacije ne-*Saccharomyces* kvasaca i *S. cerevisiae* smanjuje koncentraciju ukupnih viših alkohola (158,168,438). Ukupna koncentracija viših alkohola u kontrolnom uzorku iznosila je 32,00 mg/L.

Po zastupljenosti pojedinih jedinjenja iz ove grupe, u svim analiziranim uzorcima izdvajaju se 2-feniletil alkohol i 3-metil-1-butanol. 2-Feniletil alkohol se smatra poželjnim jedinjenjem u vinu, jer doprinosi formiranju cvetnih aroma, poput mirisa cveća, polena i parfema. Zbog ovih senzornih svojstava, 2-feniletil alkohol se smatra jednim od ključnih jedinjenja odgovornih za cvetne mirisne note vina (334). Koncentracija 2-feniletil alkohola statistički se značajno razlikovala među većinom analiziranih uzoraka, pri čemu je u svim uzorcima koncentracija ovog jedinjenja bila delako iznad praga senzorne detekcije, koji iznosi 1 mg/L (428). Svi analizirani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca, sa izuzetkom soja *H. uvarum* Kr-2, doprineli su većoj proizvodnji ovog jedinjenja tokom samostalne fermentacije. Statistička analiza pokazala je da ne postoji značajna razlika u koncentraciji 2-feniletil alkohola između vina dobijenih primenom čistih kultura *M. pulcherrima* K-5 i *P. kluyveri* K-1. Veća koncentracija ovog jedinjenja u uzorku dobijenog primenom čiste kulture *M. pulcherrima* K-5, u odnosu na ostale analizirane uzorke u skladu je sa poznatom sposobnošću ove vrste da povećava sadržaj 2-feniletil alkohola (46). Manje koncentracije 2-feniletil alkohola bile su zastupljene u uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura *H. uvarum* Š-2 i Šd-1. Za razliku od ova dva soja, soj *H. uvarum* Kr-2 proizveo je vino sa skoro dva puta nižom koncentracijom 2-feniletil alkohola. Ovo je u skladu sa navodima Tufariello i saradnika (475) da različiti sojevi *H. uvarum* imaju različitu sposobnost proizvodnje ovog jedinjenja. U uzorku vina dobijenom spontanom fermentacijom sadržaj 2-feniletil alkohola iznosio je  $19,23 \pm 0,23$  mg/L. Kod uzoraka vina dobijenih primenom sekvencijalne fermentacije koncentracija ovog alkohola bila je u opsegu od 11,29 do 15,47 mg/L. Najniža koncentracija 2-feniletil alkohola određena je u kontrolnom uzorku, koja je bila do 4,50 puta manja u poređenju sa ostalim analiziranim uzorcima vina. Prethodna istraživanja pokazala su da iste vrste ne-*Sacchaoymces* kvasaca, nezavisno od tipa fermentacije, doprinose manjoj proizvodnji 2-feniletil alkohola, u odnosu na dobijene rezultate. U istraživanju Gao i saradnika (168) primećeno je da je nakon samostalne fermentacije šire kaberne sovinjon vrsta *P. kluyveri* stvorila 2-feniletil alkohol u koncentraciji od 8,58 mg/L. Li i saradnici (331) pokazali su da ista vrsta kvasca tokom samostalne fermentacije sintetičke šire doprinosi proizvodnji 2-feniletil alkohola u koncentraciji od 3,05 mg/L, dok je nakon sekvencijalne fermentacije koncentracija ovog jedinjenja iznosila 7,78 mg/L. U istraživanju Lu i saradnika (347) komercijalno dostupni ne-*Saccharomyces* kvasci vrste *P. kluyveri* i *M. pulcherrima* doprineli su proizvodnji ovog jedinjenja u koncentracijama od 1,26 i 19,41 mg/L, respektivno, tokom samostalne fermentacije pasterizovanog medijuma dobijen od

voća durijan. Tokom alkoholne fermentacije pasterizovanog soka od breskve, vrste *M. pulcherrima* i *H. uvarum* nakon samostalne fermentacije proizveli su 2-feniletil alkohol u koncentracijama od 5,47 i 3,39 mg/L, respektivno, dok je nakon sekvencijalne fermentacije sadržaj ovog jedinjenja iznosio 9,97 mg/L i 8,34 mg/L, respektivno (332). U istraživanju Yang i saradnika (476) nakon sekvencijalne fermentacije pasterizovanog soka od jagode primenom vrsta *H. uvaum* i *S. cerevisiae* sadržaj 2-feniletil alkohola iznosio je 4,44 mg/L. Na osnovu navedenih podataka i prema navodima Feng i saradnika (477) proizvodnja 2-feniletil alkohola zavisi od primenjenog soja kvasca, sastava i vrste fermentacionog medijuma, kao i koncentracije dostupnog asimilirajućeg azota u fermentacionom medijumu, koji ispoljava nelinearan efekat na sintezu ovog jedinjenja, što znači da previše ili premalo dostupnog azota može nepovoljno uticati na njegovu produkciju. Prema literaturnim podacima, 3-metil-1-butanol odlikuje se aromama sličnim viskiju, sladu, dimu i siru, gde pri većim koncentracijama može negativno uticati na aromatski profil vina (429). Najveća koncentracija 3-metil-1-butanola bila je određena u uzorku vina dobijenom spontanom fermentacijom, dok je u odnosu na ovaj uzorak, kontrolni uzorak sadržao skoro duplo manju koncentraciju ovog jedinjenja. Za razliku od uzorka vina dobijenog sekvencijalnom fermentacijom primenom vrsta *M. pulcherrima* K-5/*S. cerevisiae* ICV D254 gde je koncentracija 3-metil-1-butanola iznosila  $21,00 \pm 0,37$  mg/L, ostali uzorci vina dobijeni primenom sekvencijalne fermentacije sadržali su značajno manje koncentracije ovog jedinjenja, u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Ovakvo zapaženje u skladu je sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala da vrste *P. kluyveri* i *H. uvarum* tokom sekvencijalne fermentacije daju manji sadržaj ovog jedinjenja u poređenju sa vrstom *S. cerevisiae* (168,331,438,462). Veća koncentracija 3-metil-1-butanola, u odnosu na kontrolni uzorak primećena je u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *H. uvarum* Kr-2. Ostali uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca sadržali su znatno manju koncentraciju 3-metil-1-butanola, koja se kretala u granicama od  $10,50 \pm 0,18$  mg/L (*H. uvarum* Š-2) do  $16,26 \pm 0,33$  mg/L (*P. kluyveri* K-1). Kod svih analiziranih uzoraka vina koncentracija 3-metil-1-butanola prelazila je prag senzorne detekcije, koji iznosi 1 mg/L (433). Slični rezultati primećeni su u istraživanju Liu i saradnika (332) gde su vrste *H. uvarum* i *M. pulcherrima* tokom samostalne fermentacije pasterizovanog soka od breskve proizveli 3-metil-1-butanol u koncentracijama od 10,61 mg/L i 11,70 mg/L, respektivno. Međutim, druga istraživanja dokazala su da iste vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca proizvode niže koncentracije ovog jedinjenja. Istraživanje Sun i saradnika (309) pokazalo je da je vrsta *M. pulcherrima* tokom

samostalne fermentacije pasterizovanog soka od višnje doprinela stvaranju 3-metil-1-butanola u koncentraciji od 6,97 mg/L. U istraživanju Ge i saradnika (478) vrsta *P. kluyveri* tokom samostalne fermentacije pasterizovane šire sorte vidal doprinela je proizvodnji 3-metil-1-butanola u koncentraciji od 2,23 mg/L. Razlike u vrednostima koncentracija mogu se objasniti različitom metaboličkom aktivnošću kvasaca, jer stvaranje viših alkohola je povezano sa metabolizmom aminokislina, koji varira u zavisnosti od roda, vrste i soja kvasca, ali i razlikama u sastavu fermentacionog medijuma (148).

Nešto manje zastupljena jedinjenja bila su izobutil alkohol i triptofol. Primenjeni sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca i tip fermentacije imali su uticaj na sadržaj ovih jedinjenja. Osim uzoraka vina dobijenih primenom spontane fermentacije i čiste kulture *H. uvarum* Kr-2, kod kojih je koncentracija izobutil alkohola iznosila  $9,33 \pm 0,11$  mg/L i  $9,10 \pm 0,13$  mg/L, respektivno, svi ostali uzorci sadržali su koncentraciju izobutil alkohola manju od 9 mg/L, što je ispod donje granice koncentracionog opsega (9 mg/L) navedenog u literaturi za vina (479). Koncentracija izobutil alkohola u svim analiziranim uzorcima vina prelazila je prag senzorne detekcije. Prema navodu Szlavka (480), triptofol doprinosi voćnim aromama, dok prema navodima Cordentea i saradnika (481) ovo jedinjenje pozitivno utiče na senzorna svojstva vina, pre svega na osećaj u ustima, budući da se dovodi u vezu sa gorčinom vina. Koncentracija triptofola u uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca bila je u opsegu od 1,98 do 4,96 mg/L. Nasuprot tome, kod većine uzoraka vina dobijenih sekvencijalnom fermentacijom koncentracija triptofola bila je značajno niža u odnosu na uzorke dobijene primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. U uzorku vina dobijenom primenom prirodne prisutne mikrobiote grožđa koncentracija triptofola iznosila je  $1,75 \pm 0,02$  mg/L. Najniža koncentracija ovog jedinjenja određena je u kontrolnom uzorku. Istraživanje Marques i saradnika (482) navodi da se koncentracija triptofola u različitim crvenim vinima kretala se u rasponu od 11,20 do 24,77 mg/L, što nije u skladu sa dobijenim rezultatima. Neslaganje rezultata može se objasniti činjenicom da proizvodnja triptofola zavisi od sadržaja triptofana u fermentacionom medijumu, i da se veće vrednosti triptofola povezuju sa većim sadržajem triptofana na početku alkoholne fermentacije, jer ovo jedinjenje direktno nastaje od navedene aminokiseline (483).

Tirosol predstavlja fenolni alkohol, koji nastaje tokom procesa alkoholne fermentacije od strane kvasaca katabolizmom aminokiseline tirozina. Doprinosi cvetnim, voćnim i blago slatkim aromatskim notama u vinu (440). Tirosol poseduje niz korisnih zdravstvenih efekata, koji potiču

od njegove sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala, antikancerogenih, kardioprotektivnih i antimikrobnih svojstava (484). Varijacije u sadržaju ovog jedinjenja rezultat su primenjenih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca i tipa fermentacije. Veće koncentracije tirosola bile su prisutne u uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, sa izuzetkom kod uzorka vina dobijenog primenom soja *H. uvarum* Kr-2. Najveća koncentracija određena je u uzorku dobijenom primenom čiste kulture *H. uvarum* Šd-1 ( $1,40 \pm 0,02$  mg/L), dok su ostali uzorci iz ove grupe sadržali tirosol u koncentraciji od 0,27 do 0,75 mg/L. U odnosu na ove uzorke, kod većine uzoraka vina dobijenih primenom sekvencijalne i spontane fermentacije sadržaj tirosola bio je značajno manji. Komercijalni soj *S. cerevisiae* ICV D254 doprineo je najmanjoj proizvodnji tirosola. U svim analiziranim uzorcima vina prokupac, koncentracija tirosola prelazila je prag senzorne detekcije koji iznosi 0,03 mg/L. Prethodna istraživanja pakazala su veće vrednosti tirosola u različitim uzorcima vina. U istraživanju Mestre i saradnika (148) u uzorku vina malbek, uzorak dobijen sekvencijalnom fermentacijom primenom vrsta *H. uvarum*/*S. cerevisiae*, sadržaj tirosola iznosio je 17,11 mg/L. Tokom alkoholne fermentacije šire sorte kioho vrste *P. kluyveri* i *H. uvarum* doprinele su proizvodnji tirosola u koncentracijama od 18,86 mg/L i 21,56 mg/L, respektivno (283). Pored toga, Gutiérrez-Escobar i saradnici (485) navode da koncentracija tirosola može varirati od 20-60 mg/L u različitim vrstama crvenih vina. Veće vrednosti tirosola navedene u literaturi mogu se opravdati razlikama u spoljašnjim faktorima fermentacije, kao što su temperatura, sadržaj alkohola i koncentracija aminokiselina (tirozin), koji utiču na njegovu sintezu, ali i razlikama u primenjenim sojevima kvasaca (486). Koncentracija 1-heksanola u uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca bila je u opsegu od 0,73 do 1,25 mg/L. Slična koncentracija ovog jedinjenja bila je prisutna u uzorku vina dobijenom primenom spontane fermentacije. Sa druge strane, uzorci vina dobijeni primenom sekvencijalne fermentacije sadržali su niže koncentracije 1-heksanola. Niža koncentracija može se objasniti ograničenom metaboličkom aktivnošću ne-*Saccharomyces* kvasaca usled njihove osetljivosti na kiler faktore koje proizvodi vrsta *S. cerevisiae*, što verovatno dovodi do smanjenja sinteze aromatskih jedinjenja nakon sekvencijalne inokulacije (328). Najmanja koncentracija 1-heksanola određena je u kontrolnom uzorku. Kod svih analiziranih uzoraka vina prokupac koncentracija 1-heksanola bila je iznad praga senzorne detekcije, doprinoseći cvetnim i zeljastim notama vinu. U istraživanju Liu i saradnika (332), nakon alkoholne fermentacije pasterizovanog soka od breskve primenom čistih kultura *H. uvarum* i *M. pulcherrima* koncentracija 1-heksanola bila je skoro deset

puta manja u poređenju sa dobijenim rezultatima. Takođe, u istraživanju Gao i saradnika (168) primećeno je da je vrsta *P. kluyveri*, nezavisno od tipa fermentacije, proizvela vina od sorte grožđa kaberne sovinjon u kojima je sadržaj 1-heksanola bio 100-150 puta niži u odnosu na dobijene vrednosti. Ove razlike mogu se pripisati različitim sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca, kao i različitom sastavu fermentacionog medijuma (487). Benzil alkohol doprinosi prijatnim aromama vina, kao što su arome smokve, duvana i čokolade (153). Sa izuzetkom uzoraka dobijenih primenom soja *H. uvarum* Kr-2, veće koncentracije ovog jedinjenja zabeležene su u uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Najveća koncentracija benzil alkohola ( $1,20 \pm 0,02$  mg/L) određena je u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1. Sojevi *H. uvarum* Šd-1 i *M. pulcherrima* K-5 proizveli su vina sa manjom koncentracijom ovog jedinjenja. Većina uzoraka vina dobijena primenom sekvencijalne fermentacije, kao i uzorak vina dobijen primenom spontane fermentacije sadržali su značajno niže koncentracije ovog jedinjenja u odnosu na uzorke dobijene primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Koncentracija benzil alkohola od  $0,27 \pm 0,01$  mg/L, koja je bila određena u kontrolnom uzorku, predstavljala je najnižu koncentraciju među analiziranim uzorcima vina prokupac. U svim analiziranim uzorcima vina prokupac, koncentracije benzil alkohola prelazile su njegov prag senzorne detekcije ( $0,10$  mg/L) (428). Međutim, istraživanje Boban i saradnika (351) pokazalo je drugačije rezultate po pitanju koncentracije benzil alkohola. Naime, u tom istraživanju korišćenjem vrsta *P. kluyveri*, *M. pulcherrima* i *H. uvarum*, nezavisno od tipa fermentacije, dobijena su vina sa značajno manjim koncentracijama benzil alkohola u poređenju sa dobijenim vinima. Takođe, znatno manja koncentracija benzil alkohola (oko  $0,20$  mg/L) dobijena je primenom različitih sojeva vrste *M. pulcherrima* u proizvodnji vina od sorte grožđa tempranilo (488). Sa druge strane, veće koncentracije benzil alkohola čak do  $2,30$  mg/L primećene su u uzorcima vina dobijenim sekvencijalnom fermentacijom primenom vrsta *H. uvarum*/*S. cerevisiae* (405). Razlike u rezultatima mogu se objasniti prisustvom enzima fenil alanin liaze (PAL) kod sojeva kvasaca, koji omogućava efikasnu sintezu benzil alkohola (154). Koncentracija 3-etoksi propanola, jedinjenje koje doprinosi formiranju voćnih aroma, kretala se u opsegu od  $0,06$  do  $0,63$  mg/L. Najviša koncentracija utvrđena je u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1, dok je deset put niža vrednost određena u kontrolnom uzorku. U uzorcima vina proizvedenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, koncentracija 3-etoksi propanola bila je u opsegu od  $0,23$  do  $0,63$  mg/L. Nasuprot tome, većina uzoraka dobijenih

sekvencijalnom fermentacijom sadržala je od 12,50-57,00% niže vrednosti ovog jedinjenja, u poređenju sa uzorcima dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Kod svih analiziranih uzoraka, osim kontrolnog, koncentracija 3-etoksi propanola prelazila je prag senzorne detekcije, koji iznosi 0,10 mg/L (432). Međutim, dobijeni rezultati nisu u skladu sa literaturnim podacima. U poređenju sa rezultatima Ge i saradnika (335), vrste *H. uvarum* i *M. pulcherrima*, za razliku od vrste *P. kluyveri*, kod koje nije bilo detektovano prisustvo ovog jedinjenja, proizveli su značajno manju količinu 3-etoksi propanola, u odnosu na dobijene rezultate. Sa druge strane, uzorci vina dobijeni sekvencijalnom fermentacijom primenom vrsta *H. uvarum*/*S. cerevisiae* i *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* pokazali su znatno veće vrednosti 3-etoksi propanola (457), u odnosu na dobijene rezultate. Razlike u rezultatima mogu se, najverovatnije, pripisati različitim sojevima kvasaca, sastavu fermentacionog medijuma (dostupnosti asimilirajućeg azota i lipida, sastavu aminokiselina), kao i uslovima fermentacije (477).

#### 4.4.4.2. Estri

U vinu, estri su podeljeni u dve grupe, oni koji nastaju tokom procesa alkoholne fermentacije i oni koji nastaju tokom starenja vina (147). Tokom procesa alkoholne fermentacije, estri proizvedeni enzimskim putem podeljeni su u dve glavne grupe na etil estre i acetatne estre (489,490).

Etil estri nastaju tokom alkoholne fermentacije delovanjem kvasaca, pri čemu se njihova sinteza zasniva na reakciji enzima sa prekursorima prisutnim u grožđu, kao i etanolizi acil-CoA, koji se formira tokom sinteze ili razgradnje masnih kiselina (325). Uopšteno, kvasci proizvode etil estre kroz katabolizam razgranatih aminokiselina, nakon čega sledi enzimska esterifikacija odgovarajućih masnih kiselina kratkih lanaca (95). Na njihovu koncentraciju utiču različiti faktori, uključujući soj kvasca, temperaturu fermentacije, stepen aeracije i sadržaj šećera (325). Pored toga, početna koncentracija razgranatih aminokiselina u širi, kao i specifične metaboličke osobine kvasca u pogledu iskorišćavanja aminokiselina, mogu uticati na formiranje etil estara (95).

Ukupna koncentracija etil estara u uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca bila je u opsegu od 6,83 do 18,79 mg/L. Slične koncentracije bile su određene u uzorcima vina dobijenim spontanom fermentacijom, kao i u kontrolnom uzorku. Najveća ukupna koncentracija etil estara (18,79 mg/L) bila je zabeležena u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *H. uvarum* Šd-1, što je u skladu sa literaturnim podacima, koji pokazuju

da primena čiste kulture *H. uvarum* daje vina sa većim ukupnim koncentracijama etil estara (491). Sa druge strane, uzorci vina dobijeni primenom sekvencijalne fermentacije sadržali su manju ukupnu koncentraciju etil estara, koja se kretala u granicama od 6,44 mg/L (*M. pulcherrima* K-5/*S.cerevisiae*) do 9,12 mg/L (*H. uvarum* Šd-1/*S. cerevisiae*). Ranijim istraživanjima utvrđeno je da sekvencijalna fermentacija primenom različitih sojeva vrste *M. pulcherrima* u kombinaciji sa *S. cerevisiae* dovodi do niže koncentracije ukupnih etil estara, za razliku od kombinacija vrste *S. cerevisiae* sa drugim vrstama ne-*Saccharomyces* kvasaca (*H. uvarum*, *P. kluyveri*, *L. thermotolerans* i *T. delbrueckii*) (332,403), što je u skladu sa dobijenim rezultatima.

Najzastupljeniji etil estar u svim analiziranim uzorcima vina prokupač bio je etil laktat. Etil laktat doprinosi mlečnim i voćnim aromama i mekoći na nepcima. U crvenim vinima, koja nisu prošla kroz proces malolaktične fermentacije, prosečna koncentracija etil laktata je između 5 i 8 mg/L (492), što je u skladu sa dobijenim rezultatima, gde je koncentracija etil laktata bila u opsegu od 4,56 do 8,71 mg/L. Najveće koncentracije etil laktata bile su kvantifikovane u uzorcima vina dobijenim primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1 i prirodno prisutne epifitne mikrobiote. Takođe, uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura *M. pulcherrima* K-5 i *H. uvarum* Š-2 odlikuju se većim koncentracijama etil laktata ( $8,09 \pm 0,14$  i  $8,02 \pm 0,14$  mg/L). Većina uzoraka vina dobijenih primenom sekvencijalne fermentacije imala su niže vrednosti koncentracije etil laktata, u poređenju sa uzorcima dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Izuzetak su predstavljali uzorci vina dobijeni primenom sojeva *H. uvarum* Kr-2 i Šd-1, kod kojih nije uočena statistički značajna razlika. Koncentracija etil laktata u svim analiziranim uzorcima vina nije prelazila prag senzorne detekcije. Prethodna istraživanja pokazala su da primena vrsta *P. kluyveri* (283), *M. pulcherrima* (488) i *H. uvarum* (405,438), nezavisno od tipa fermentacije, proizvode značajno niže koncentracije etil laktata, u odnosu na dobijene rezultate. Ova razlika može se pripisati različitim sojevima kvasaca, kao i nutritivnom sastavu fermentacionog medijuma, odnosno šire grožđa (491).

Monoetil sukcinat, jedinjenje koje doprinosi aromama karamele i kafe, bio je zastupljeniji etil estar u analiziranim uzorcima vina prokupač. Najveća koncentracija ovog jedinjenja određena je u uzorcima vina dobijenim primenom komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254 i soja *H. uvarum* Šd-1, dok je najniža detektovana vrednost bila u uzorku vina dobijenom spontanom fermentacijom. Vina dobijena primenom čistih kultura *M. pulcherrima* K-5 i *H. uvarum* Šd-1 i Š-2 sadržala su veće koncentracije ovog jedinjenja u poređenju sa vinima dobijenim sekvencijalnom

fermentacijom. Nasuprot tome, uzorak vina dobijen sekvencijalnom fermentacijom primenom sojeva *H. uvarum* Kr-2/*S. cerevisiae* ICV D254 imao je veću koncentraciju monoetil sukcinata, u poređenju sa uzorkom dobijen čistom kulturom. Pored toga, u uzorku vina dobijenom čistom kulturom *P. kluyveri* K-1 detektovano je prisustvo monoetil sukcinata, čija je koncentracija iznosila  $1,53 \pm 0,03$  mg/L, dok u uzorku vina dobijenom sekvencijalnom fermentacijom primenom ovog soja i *S. cerevisiae* ICV D254 nije utvrđeno prisustvo ovog etil estera. U analiziranim uzorcima vina prokupać monoetil sukcinat bio je prisutan u koncentracijama ispod senzornog praga detekcije. U ranijim istraživanjima uočene su znatno veće koncentracije monoetil sukcinata u različitim vrstama vina, poput bogazkere (468) i šardonea (493), što se može objasniti razlikama u hemijskom sastavu šire, uslovima vinifikacije, dužim periodom odležavanja ili oksidacijom vina (468).

Dietil sukcinat je još jedno isparljivo jedinjenje koje doprinosi pozitivnim senzornim karakteristikama vina. Ćilibarna kiselina, nusproizvod mikrobnog metabolizma  $\alpha$ -ketoglutarata, se esterifikuje u dietil sukcinat, koji u vinima doprinosi cvetnim i voćnim notama podsećajući na jabuku ili dinju (494,495). Njegov prag senzorne detekcije je 1,20 mg/L (435). Koncentracije dietil sukcinata u svim analiziranim uzorcima vina prokupać bile su ispod praga senzorne detekcije. Najveća koncentracija dietil sukcinata određena je u kontrolnom uzorku. Nešto manji sadržaj ovog jedinjenja bio je kvantifikovan u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *H. uvarum* Šd-1. U odnosu na ove uzorke, kod preostalih analiziranih uzoraka koncentracija ovog jedinjenja bila je 2-4 puta manja. U proizvodnji vina sorte maraština, sojevi vrsta *P. kluyveri*, *M. pulcherrima* i *H. uvarum*, nezavisno od tipa fermentacije, proizveli su vina sa znatno nižom koncentracijom dietil sukcinata (više od 10 puta) (351), u odnosu na dobijene rezultate. U istraživanju Lai i saradnika (283) utvrđeno je da vrste *H. uvarum* i *P. kluyveri* nisu bile u stanju da sintetizuju ovaj etil ester. Nasuprot ovome, u istraživanju Hu i saradnika (405) primećen je isti trend u pogledu uticaja tipa fermentacije na produkciju dietil sukcinata, ali su njegove koncentracije bile znatno veće, u poređenju sa dobijenim rezultatima. Razlika u rezultatima može se pripisati upotrebi različitih sojeva *ne-Saccharomyces* kvasca, kao i razlikama u hemijskom sastavu fermentacionog medijuma korišćenog u procesu alkoholne fermentacije, s obzirom na to da Cotea i saradnici (496) navode da se dietil sukcinat formira tokom alkoholne fermentacije. Pored toga, Riu-Aumatell i saradnici (497) ističu da se koncentracija dietil sukcinata može povećati i tokom odležavanja vina.

Etil 3-hidroksibutirat je aromatsko jedinjenje koje se često sreće kod različitih vrsta voća i pića (498). U vinu se najčešće nalazi u koncentracijama između 0,1 i 1 mg/L (498,499). Ovo jedinjenje doprinosi svežim i voćnim aromama, nalik jagodama i bananama (498), a njegov prag senzorne detekcije je 0,13 mg/L (428). Koncentracija etil 3-hidroksibutirata statistički se značajno razlikovala kod većine analiziranih uzoraka vina prokupac. Uzorci vina dobijeni primenom komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254 i čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca (*M. pulcherrima* K-5, *H. uvarum* Š-2 i *P. kluyveri* K-1) su sadržali ovo jedinjenje u koncentraciji iznad praga senzorne detekcije i u opsegu do sada detektovanih koncentracija etil 3-hidroksibutirata u vinu (498,499). Što se tiče etil 4-hidroksicinamata, značajno veća koncentracija bila je prisutna u uzorcima vina dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, u poređenju sa uzorcima dobijenih u sekvencijalnoj fermentaciji. U kontrolnom uzorku nije detektovano prisustvo etil 4-hidroksicinamata. Iako je etil vanilat jedinjenje koje se uglavnom povezuje sa odležavanjem u hrastovim buradima, u analiziranim uzorcima bio je prisutan u koncentracijama od 0,11 do 0,72 mg/L. Najniža koncentracija ovog jedinjenja bila je prisutna u kontrolnom uzorku, dok su značajno veće koncentracije bile prisutne kod uzoraka vina dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Kod svih analiziranih uzoraka vina prokupac, koncentracija etil vanilata bila je ispod praga senzorne detekcije, koji iznosi 0,99 mg/L (438). Slične koncentracije etil vanilata u različitim vrstama crvenih vina pronađene su u prethodnim istraživanjima (500–502). Generalno, u odnosu na uzorke vina dobijene primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, većina uzoraka vina dobijena u sekvencijalnoj fermentaciji imali su niže koncentracije etil vanilata, etil 3-hidroksibutirata i etil 4-hidroksicinamata, što može biti rezultat metaboličke aktivnosti ne-*Saccharomyces* kvasaca u početnoj fazi fermentacije, tokom koje može doći do modifikacije ili potrošnje prekursora za nastanak ovih jedinjenja (422).

Etil 8-nonenoat odlikuje se cvetnim (ruža) i voćnim (ananas) aromama, kao i aromama karakterističnim za vino (445,446). Poređenjem tipa fermentacije utvrđene su, u većini slučajeva, statistički značajne razlike među uzorcima u sadržaju etil 8-nonenoata, pri čemu su veće koncentracije kvantifikovane u uzorcima vina dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Primenom soja *H. uvarum* Šd-1 dobijeno je vino sa koncentracijom etil 8-nonenoata od  $0,81 \pm 0,01$  mg/L, predstavljajući uzorak vina sa najvećom koncentracijom ovog etil estera. Kod uzoraka vina dobijenih primenom čistih kultura *P. kluyveri* K-1 i *M. pulcherrima*

K-5 nije postojala statistički značajna razlika u sintezi etil 8-nonenoata. Najmanja koncentracija ovog etil estera bila je određena u kontrolnom uzorku.

Prisustvo etil oktanoata, koji doprinosi voćnim i cvetnim aromama bilo je detektovano u pojedinim uzorcima vina prokupac, čije su koncentracije bile znatno iznad praga senzorne detekcije (0,002 mg/L). Određene koncentracije etil oktanoata nalazile su se u opsegu vrednosti uobičajno prisutnih u vinima (0,05-3,80 mg/L) (479). U uzorku dobijenom primenom komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254 sadržaj etil oktanoata iznosio je  $0,93 \pm 0,02$  mg/L. Za razliku od ovog uzorka, epifitna mikrobiota grožđa doprinela je značajno većem sadržaju ovog etil estera u uzorku dobijenom spontanom fermentacijom. Većina uzoraka vina dobijena primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca sadržala su etil oktanoat u koncentraciji od 0,56 do 1,34 mg/L. Slične vrednosti potvrđene su u prethodnim istraživanjima, u kojima su vrste *P. kluyveri* (168), *H. uvarum* (283) i *M. pulcherrima* (309) korišćene kao starter kulture u alkoholnoj fermentaciji sorte grožđa kaberne sovinjon i kioho, kao i soka od trešnje, respektivno. Kod većine uzoraka dobijenih primenom sekvencijalne fermentacije nije detektovano prisustvo etil oktanoata, dok je kod uzorka dobijenog primenom vrsta *P. kluyveri* K-1/*S. cerevisiae* ICV D254 određena koncentracija od  $0,90 \pm 0,01$  mg/L. Ovo je u skladu sa literaturnim navodima (195,475), koji ističu da vrsta *P. kluyveri* tokom sekvencijalne fermentacije sa vrstom *S. cerevisiae* dovodi do povećanja sadržaja etil oktanoata. Ranija istraživanja pokazala su da su vrste *H. uvarum* i *M. pulcherrima* u sekvencijalnim fermentacijama u slučaju longjan i rizling sorti grožđa doprinele proizvodnji vina sa koncentracijom etil oktanoata od 2,07 mg/L i 1,46 mg/L, respektivno (403,462), što nije u skladu sa dobijenim rezultatima. Razlike u rezultatima verovatno su posledica različite enzimske aktivnosti između sojeva istih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca, što može uticati na njihovu sposobnost stvaranja estera (503), ali i značajnim razlikama u sastavu šire/kljuka i vinifikacionim uslovima.

Pored etil estera, veliki značaj i uticaj na aromatski profil vina imaju acetatni estri (427). Oni se formiraju reakcijom acetyl-CoA sa višim alkoholima, koji nastaju razgradnjom aminokiselina ili metabolizmom ugljenih hidrata (325). Koncentracija acetatnih estera zavisi ne samo od dostupnosti viših alkohola, koji predstavljaju glavni supstrat za njihovu sintezu, već i od ravnoteže između aktivnosti alkohol-acetyl transferaza, odgovornih za sintezu, i ester-hidrolaza, koje učestvuju u njihovj razgradnji (427). Pri umerenim koncentracijama, acetatni estri pozitivno doprinose senzornom profilu vina, ispoljavajući intenzivne voćne (nalik jabukama i bananama) i

cvetne arome, kao i arome meda (84,156). U koncentracijama iznad 150 mg/L, ova grupa jedinjenja može imati negativan uticaj na kvalitet vina, maskirajući sorte arome vina (132).

U poređenju sa kontrolnim uzorkom, u kojem je ukupna koncentracija acetatnih estara iznosila 3,93 mg/L, svi analizirani uzorci sadržali su znatno veće koncentracije ovih jedinjenja. Među njima, najveća ukupna koncentracija acetatnih estara (22,61 mg/L) zabeležena je u uzorku vina dobijenom spontanom fermentacijom. Kod uzoraka vina dobijenih primenom ne-*Saccharomyces* kvasaca, ukupna koncentracija acetatnih estara varirala je u zavisnosti od tipa fermentacije. Uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura *P. kluyveri* K-1, *H. uvarum* Šd-1 i Kr-2, sadržali su 1,5-2 puta veću ukupnu koncentraciju acetatnih estara u poređenju sa odgovarajućim uzorcima dobijenim primenom sekvencijalne fermentacije. Kod ovih uzoraka koncentracija ukupnih acetatnih estara bila je u opsegu od 13,20 do 16,26 mg/L. Nasuprot tome, uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura *H. uvarum* Š-2 i *M. pulcherrima* K-5, sadržali su niže vrednosti ukupnih acetatnih estara u odnosu na uzorke dobijene primenom sekvencijalne fermentacije. Istraživanja su pokazala da vina dobijena primenom ne-*Saccharomyces* kvasaca, nezavisno od tipa fermentacije, mogu da sadrže i do 3,5 puta veću koncentraciju ukupnih acetatnih estara u odnosu na uzorke vina dobijenim primenom komercijalnih sojeva vrste *S. cerevisiae* (101,332,439,491,504). Ovakvi rezultati su u skladu sa dobijenim rezultatima i mogu se objasniti izraženijom aktivnošću alkohol acetiltransferaza i drugačijim metabolizmom acetyl CoA kod ne-*Saccharomyces* kvasaca, kao i njihovom boljom adaptacijom na aerobne uslove u ranoj fazi fermentacije, što dovodi do intenzivnije esterifikacije viših alkohola i povećane proizvodnje acetatnih estara u odnosu na sojeve vrste *S. cerevisiae* (164).

Etil acetat je identifikovan kao najzastupljeniji acetatni estar u svim analiziranim uzorcima vina prokupač. Statistička analiza pokazala je značajne razlike u koncentraciji ovog jedinjenja kod većine analiziranih uzoraka vina. Uzorak vina dobijen primenom spontane fermentacije izdvojio se po najvećem sadržaju etil acetata. Uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca sadržali su etil acetat u koncentraciji od 8,62 do 15,90 mg/L, i većina uzoraka je imala oko 30-50% veći sadržaj ovog jedinjenja u odnosu na uzorke vina dobijene primenom sekvencijalne fermentacije. Izuzetak su predstavljali uzorci dobijeni sekvencijalnom fermentacijom primenom sojeva *M. pulcherrima* K-5/*S. cerevisiae* ICV D254 i *H. uvarum* Š-2/*S. cerevisiae* ICV D254, koji su imali značajno veći sadržaj ovog jedinjenja u odnosu na uzorke dobijene primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Slična zapažanja primećena su u

istraživanjima Sun i saradnika (309) i Liu i saradnika (332), gde su uzorci vina dobijeni sekvencijalnom fermentacijom primenom vrsta *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* i *H. uvarum*/*S. cerevisiae* sadržali veću koncentraciju etil acetata, u poređenju sa uzorcima dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Liu i saradnici (505) navode da vrste *H. uvarum* i *M. pulcherrima* tokom samostalne fermentacije, na početku dovode do porasta koncentracije etil acetata, pri čemu kod vrste *H. uvarum* dolazi do kontinuiranog porasta tokom celokupnog procesa alkoholne fermentacije, dok se kod vrste *M. pulcherrima* u kasnijim fazama fermentacije beleže promenljivosti u sadržaju etil acetata, bez jasnog trenda stabilnog smanjenja ili povećanja. Koncentracije etil acetata u uzorcima vina dobijenim primenom spontane fermentacije i ne-*Saccharomyces* kvasaca, nezavisno od tipa fermentacije, bile su unutar opsega koncentracije etil acetata za crvena vina (9-257 mg/L) (506) i bile su iznad senzornog praga detekcije, koji iznosi 5 mg/L (436). U uzorku vina dobijenom primenom komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254 sadržaj etil acetata bio je ispod njegovog senzornog praga detekcije. Istraživanje Lu i saradnika (347) pokazalo je da komercijalno dostupni sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca (*P. kluyveri* i *M. pulcherrima*) tokom samostalne fermentacije vina proizvode etil acetat u koncentracijama od 131,05 mg/L i 1034,43 mg/L, respektivno. U istraživanju Gao i saradnika (168) dokazano je da vrsta *P. kluyveri* tokom samostalne fermentacije sterilne šire grožđa kaberne sovinjon doprinela proizvodnji etil acetata od 283,26 mg/L. U istom istraživanju, tokom kofermentacije istog medijuma primenom *P. kluyveri* i *S. cerevisiae* sadržaj etil acetata iznosio je 115,59 mg/L. Sun i saradnici (507) detektovali su koncentraciju etil acetata u granicama od 89,13-178,08 mg/L u vinima sorte kaberne sovinjon dobijenih primenom spontane fermentacije. Ovakava odstupanja mogu se objasniti razlikama u poreklu sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca, sastavu fermentacionog medijuma (dostupnost nutrijenata), tehnološkim uslovima, kao i načinu izvođenja fermentacije i ekstrakcije isparljivih aromatskih jedinjenja (85). Dobijeni rezultati ukazuju da analizirani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca poseduju potencijal za proizvodnju vina sa povoljnim senzornim svojstvima, zahvaljujući umerenoj sintezi etil acetata, jer prema literaturnim podacima koncentracija etil acetata ispod 80 mg/L pruža pozitivnu organoleptičku percepciju vina (508), obezbeđujući voćne arome nalik jabukama i ananasu.

Pored etil acetata, zastupljeniji acetatni ester u analiziranim uzorcima vina bio je izoamil acetat. Izoamil acetat, jedinjenje sa aromom karakterističnom za banane i kruške, ima pozitivnu ulogu u aromatskom profilu mladih crvenih vina (84). U većini slučajeva, među analiziranim uzorcima

vina postojala je statistički značajna razlika u koncentraciji ovog jedinjenja. Uzorak vina dobijen primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1 sadržao je izoamil acetat u koncentraciji od  $0,32 \pm 0,01$  mg/L, predstavljajući najveću koncentraciju među analiziranim uzorcima, opravdavajući karakteristiku vrste *P. kluyveri* da proizvodi veće koncentracije izoamil acetata (32, 291). Uzorci vina dobijeni spontanom fermentacijom i primenom čistih kultura *M. pulcherrima* K-5 i *H. uvarum* Šd-1 sadržali su izoamil acetat u opsegu od 0,20 do 0,25 mg/L. Manje koncentracije ovog jedinjenja primećene su u uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura *H. uvarum* Kr-2 i Š-2 ( $0,12 \pm 0,00$  i  $0,16 \pm 0,00$  mg/L, respektivno), kao i u uzorcima vina dobijenim sekvencijalnom fermentacijom u kojima je koncentracija izoamil acetata bila u granicama od 0,10-0,19 mg/L. Najmanja koncentracija izoamil acetata zabeležena je u kontrolnom uzorku. Kod svih analiziranih uzoraka vina prokupac, koncentracija izoamil acetata bila je iznad praga senzorne detekcije, pri čemu su sve vrednosti, osim u kontrolnom uzorku, bile u okviru opsega koncentracija koje su prethodno zabeležene u vinima (0,10-3,40 mg/L) (479). Ranija istraživanja pokazala su različitu metaboličku aktivnost kvasaca u smislu proizvodnje izoamil acetata, tokom samostalne i mešovite fermentacije, od strane istih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca. Vrsta *P. kluyveri* tokom samostalne fermentacije šire kaberne sovinjon doprinela je proizvodnji izoamil acetata u koncentraciji od 2,44 mg/L, dok je primenom sekvencijalne fermentacije sa vrstom *S. cerevisiae* koncentracija izoamil acetata iznosila 0,59 mg/L (168). Tokom samostalne fermentacije pasterizovanog soka od breskve (332) i pasterizovane šire sovinjon blanc (509) primenom različitih sojeva vrste *M. pulcherrima* dobijen je izoamil acetat u koncentracijama od 0,10 mg/L i 0,92 mg/L, respektivno. U sekvencijalnoj fermentaciji pasterizovanog soka od breskve primenom vrsta *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* sadržaj izoamil acetata iznosio je 0,53 mg/L. Nasuprot tome, tokom koinokulacije pasterizovane šire sovinjon blanc primenom vrsta *M. pulcherrima* i *S. cerevisiae*, u odnosu 10:1, koncentracija izoamil acetata bila je 4,73 mg/L. Različiti sojevi vrste *H. uvarum* tokom samostalne fermentacije nesterilne šire kaberne sovinjon proizveli su izoamli acetat u koncentracijama od 2,55 do 3,74 mg/L, a nakon sekvencijalne fermentacije sa vrstom *S. cerevisiae* sadržaj izoamil acetata bio je u opsegu od 4,35 do 5,33 mg/L (491). Neslaganje rezultata može biti posledica različitog sastava fermentacionog medijuma, kao i varijacije u uslovima i načinu izvođenja alkoholne fermentacije. Istovremeno, soj kvasca ima presudan uticaj na regulaciju metaboličkih puteva kao odgovor na spoljašne faktore, što ukazuje da različiti sojevi unutar iste vrste kvasca mogu biti ključni razlog razlike u koncentracijama izoamil acetata.

Manje zastupljeni acetatni estri bili su 2-feniletil acetat i propil acetat. 2-Feniletil acetat je poželjno jedinjenje u vinu zbog njegove cvetne, voćne i medne arome. Dokazano je da ovo jedinjenje ima važnu ulogu u formiranju prijatnih voćnih aroma, posebno kod mladih crvenih vina (510). Prema literaturnim podacima, koncentracija 2-feniletil acetata u vinima kreće se u granicama od 0,01 do 4,50 mg/L (511), sa pragom senzorne detekcije od 0,25 mg/L (512). Među analiziranim uzorcima vina, jedino se uzorak vina dobijen primenom čiste kulture *H. uvarum* Šd-1 izdvajao po značajno većoj koncentraciji 2-feniletil acetata. U ostalim uzorcima, koncentracija ovog acetatnog estera bila je u rasponu od 0,02 do 0,07 mg/L, dok u kontrolnom uzorku nije bilo detektvano prisustvo ovog jedinjenja. Međutim, prethodna istraživanja pokazala su da iste vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca doprinose značajno većoj proizvodnji 2-feniletil acetata, u poređenju sa dobijenim rezultatima. Istraživanje Li i saradnika (331) pokazalo je da vrsta *P. kluyveri* tokom samostalne fermentacije sintetičke šire proizvela 2-feniletil acetat u koncentraciji od 3,14 mg/L, a pri sekvencijalnoj inokulaciji sa vrstom *S. cerevisiae* doprinela je sadržaju ovog acetatnog estera od 1,57 mg/L. U istom istraživanju, tokom sekvencijalne fermentacije šire grožđa beibinhong primenom vrsta *P. kluyveri*/*S. cerevisiae* sadržaj 2-feniletil acetata bio je 14,5 puta veći u odnosu na fermentaciju sprovedenu samo sa vrstom *S. cerevisiae*. Slične rezultate navode i Scansani i saradnici (353) i Gao i saradnici (168), koji su utvrdili da tokom mešovite fermentacije primenom sojeva vrsta *P. kluyveri* i *S. cerevisiae* dolazi do povećanja koncentracije 2-feniletil acetata za približno 3, odnosno 15 puta u poređenju sa fermentacijom sprovedenom samo sa sojevima vrste *S. cerevisiae*. Primenom vrsta *H. uvarum* i *S. cerevisiae* tokom sekvencijalne fermentacije šire grožđa solaris sadržaj 2-feniletil acetata bio je 3,20 mg/L, što je oko 1,2 puta više u odnosu na koncentraciju ovog jedinjenja koju je proizvela vrsta *S. cerevisiae* (513). U istraživanju Sadoudi i saradnika (509) dokazano je da pri sekvencijalnoj fermentaciji šire grožđa sovinjon blanc primenom vrsta *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* koncentracija 2-feniletil acetata iznosila 2,21 mg/L, odnosno oko 2,5 puta više u odnosu na koncentraciju koja je bila određena kod uzorka vina dobijenog primenom vrste *S. cerevisiae*. Neslaganje u rezultatima može se objasniti činjenicom da proizvodnja acetatnih estera u velikoj meri zavisi od sposobnosti kvasaca da sintetišu enzim alkohol acetiltransferazu (164), ali i od prisustva i dostupnosti hranljivih materija u medijumu neophodnih za rast kvasaca i biosintezu njihovih metabolita. Posebno, izvori azota, uključujući amino kiseline, amonijum i male peptide, predstavljaju ključne faktore koji omogućavaju ne-*Saccharomyces* i *S. cerevisiae* vrstama da sintetišu 2-feniletil-acetat i ostala aromatski aktivna jedinjenja (331).

Senzorne karakteristike propil acetata okarakterisane su voćnim notama koje podsećaju na malinu i krušku (514), sa pragom senzorne detekcije od 4,70 mg/L (436). Kao u prethodnom slučaju, uzorak vina dobijen primenom čiste kulture *H. uvarum* Šd-1, izdvajao se po najvećoj koncentraciji propil acetata, koja je iznosila  $0,31 \pm 0,00$  mg/L. U ostalim uzorcima, koncentracija propil acetata nije prelazila iznad 0,10 mg/L.

#### 4.4.4.3. Isparljive masne kiseline

Isparljive masne kiseline u vinu potiču iz dva izvora: grožđa i metabolizma kvasca tokom alkoholne fermentacije (351). Ove kiseline čine približno oko 5% ukupnih isparljivih jedinjenja u vinu (325), što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Isparljive masne kiseline koje nastaju u enzimskim reakcijama tokom alkoholne fermentacije, predstavljaju važnu grupu aromatskih jedinjenja koja mogu doprineti različitim senzornim karakteristikama vina, uključujući voćne i slatke arome, kao i note sira, masne i užegle tonove. Prisustvo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> masnih kiselina, poput heksanske, oktanske i dekanske kiseline, često se povezuje sa pojavom negativnih senzornih karakteristika, međutim, one mogu uticati na dinamičku ravnotežu između formiranja i hidrolize estara, što ima značajnu ulogu u očuvanju aromatskog profila vina (325), obzirom da predstavljaju ključne supstrate za sintezu etil estra masnih kiselina (334).

Najveća koncentracija ukupnih isparljivih masnih kiselina određena je u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *H. uvarum* Šd-1 (3,57 mg/L). Duplo niža koncentracija detektovana je u uzorku fermentisanom čistom kulturom *P. kluyveri* K-1, koja je iznosila 1,39 mg/L. Kod ostalih uzoraka dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca koncentracija ukupnih isparljivih masnih kiselina kretala se u opsegu od 0,49 do 0,72 mg/L. U uzorcima vina dobijenih sekvencijalnom fermentacijom, sadržaj ukupnih isparljivih masnih kiselina varirao je od 0,24 mg/L (*M. pulcherrima* K-5/*S. cerevisiae* ICV D254) do 0,62 mg/L (*H. uvarum* Š-2/*S. cerevisiae* ICV D254). U kontrolnom uzorku koncentracija ukupnih isparljivih masnih kiselina iznosila je 0,50 mg/L, dok je u uzorku dobijenom primenom spontane fermentacije sadržaj bio gotovo duplo niži (0,26 mg/L). U pogledu sadržaja ukupnih isparljivih masnih kiselina, literaturni podaci pokazuju da vina dobijena primenom istih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca ostvaruju slične vrednosti u poređenju sa dobijenim rezultatima. U uzorcima vina sorte maraština dobijenim primenom čistih kultura *H. uvarum* i *P. kluyveri* sadržaj ukupnih isparljivih masnih kiselina iznosio

je 2,09 mg/L i 1,50 mg/L, respektivno (351). U uzorcima vina sorte longjan dobijenim primenom sekvencijalne fermentacije *H. uvarum*/*S. cerevisiae* i *P. kluyveri*/*S. cerevisiae* sadržaj ukupnih isparljivih masnih kiselina iznosio je 0,37 mg/L i 0,66 mg/L, respektivno (462). Uzorak vina dobijen od pasterizovanog soka od šljive primenom sekvencijalne fermentacije vrsta *M. pulcherrima*/*S. cerevisiae* imao je ukupan sadržaj isparljivih masnih kiselina od 0,38 mg/L (515). Uočene razlike u sadržaju isparljivih masnih kiselina mogu se objasniti time što se acetyl CoA kod pojedinih sojeva kvasaca češće koristi za sintezu etil ili acetatnih estera, umesto za biosintezu masnih kiselina, što zavisi od njihovih specifičnih metaboličkih karakteristika (347), ali i od razlika u sastavu fermentacionog medijuma i uslova vinifikacije.

Dve najzastupljenije isparljive kiseline u analiziranim uzorcima vina prokupac bile su izovanilična i 3,4,5-trimetoksifenilsirćetna kiselina, čije su se koncentracije statistički značajno razlikovale među pojedinim uzorcima vina. Najveća koncentracija obe kiseline zabeležena je u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *H. uvarum* Šd-1, dok je u ostalim uzorcima koncentracija bila višestruko niža. Kod uzorka vina dobijenog primenom čiste kulture *M. pulcherrima* K-5 prisustvo izovanilične kiseline nije detektovano. U uzorcima vina dobijenim primenom spontane i sekvencijalne fermentacije, kao i u kontrolnom uzorku koncentracija izovanilične kiseline nije prelazila 0,30 mg/L. Slično, uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca se izdvajaju po većoj koncentraciji 3,4,5-trimetoksifenilsirćetne kiseline. U većini slučajeva sekvencijalna fermentacija rezultirala je značajno nižim koncentracijama ovog jedinjenja, osim kod uzoraka vina dobijenih primenom soja *H. uvarum* Kr-2. Najmanja koncentracija bila je zabeležena u kontrolnom uzorku.

Izobuterna kiselina identifikovana je u većini analiziranih uzoraka vina prokupac. Senzorno, ova kiselina poznata je po tome što uslovljava pojavu puterastih i sirastih aromarskih nota, dok u većim koncentracijama može dati i negativne aromatske note koje se opisuju kao užeglo (452). Kod uzoraka vina dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, proizvodnji izobuterne kiseline doprineli su samo sojevi *H. uvarum*. Kod tih uzoraka vina koncentracija izobuterne kiseline bila je u opsegu od 0,08 do 0,19 mg/L. Sa druge strane, u svim uzorcima vina dobijenih primenom sekvencijalne fermentacije identifikovano je prisustvo ove kiseline, čiji se sadržaj kretao u rasponu od 0,03 do 0,17 mg/L. Koncentracija izobuterne kiseline u kontrolnom uzorku iznosila je 0,04±0,00 mg/L. Izobuterna kiselina, ni u jednom od analiziranih uzoraka vina

u kome je bila kvantifikovana, nije bila iznad praga senzorne detekcije (2,30 mg/L) (451), ali je bila unutar opsega koncentracija tipično prisutnih u različitim vrstama vina (451,516).

Uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca (*P. kluyveri* K-1 i *H. uvarum* Š-2), kao i uzorak vina dobijen sekvencijalnom fermentacijom primenom sojeva *P. kluyveri* K-1/*S. cerevisiae* ICV D254 jedini su sadržali izovaleričnu kiselinu koja svojim prisustvom može doprineti percepciji slatkih i prijatnih aromatskih nota u vinu (453). Koncentracija izovalerične kiseline iznad praga senzorne detekcije (0,03 mg/L) (438) zabeležena je samo u uzorku dobijenom primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1, gde je njena koncentracija iznosila  $0,08 \pm 0,00$  mg/L. Za razliku od dobijenih rezultata, prethodna istraživanja pokazala su drugačije rezultate. Istraživanje du Plesis i saradnika (457) pokazalo je da je u uzorcima vina sorte širaz dobijenim sekvencijalnom fermentacijom primenom vrsta *M. pulhcerrima*/*S. cerevisiae* i *H. uvarum*/*S. cerevisiae* sadržaj izovalerične kiseline iznosio 9,09 mg/L i 8,78 mg/L, respektivno. U istraživanju Tristezza i saradnika (438) primećeno je da je u uzorcima vina sorte negroamaro dobijenim mešovitim fermentacijama primenom vrsta *H. uvarum* i *S. cerevisiae* sadržaj izovalerične kiseline bio je u opsegu od 0,24 do 0,27 mg/L. Razlike u rezultatima se, osim razlika u sastavu šire/kljuka i uslovima vinifikacije, mogu pripisati različitim enzimskim aktivnostima između sojeva kvasaca, koje katalizuju transaminaciju razgranatih aminokiselina, što utiče na sintezu leucina (517), jer prema navodima Methner i saradnika (518) izovalerična kiselina nastaje kao sporedni proizvod katabolizma leucina.

Ostale isparljive masne kiseline (nonanska i heksadekanska), koje su bile detektovane u većini analiziranih uzoraka vina prokupac nisu mogle negativno da doprinesu aromatskom profilu vina zbog njihovih niskih koncentracija, a visokih pragova senzorne detekcije.

#### **4.4.4.4. Karbonilna jedinjenja**

Karbonilna jedinjenja uglavnom nastaju tokom procesa alkoholne fermentacije putem metabolizma kvasaca (519). U svim analiziranim uzorcima vina, osim kod uzorka dobijenog spontanom fermentacijom, najzastupljenije karbonilno jedinjenje bio je acetoin. Koncentracija acetoina u uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasca kretala se u opsegu od 0,04 do 0,13 mg/L. Međutim, primenom sekvencijalne fermentacije, koncentracija acetoina smanjila se za oko 53-63%. Smanjenje koncentracije acetoina usled primene sekvencijane

fermentacije potvrđeno je i u ranijim istraživanjima. U istraživanju Zhang i saradnika (326) uočeno je da je fermentacijom sterilne šire grožđa kaberne sovinjon pomoću čiste kulture *H. uvarum* proizvedeno 19,49 mg/L acetoina. Nasuprot tome, u uzorku vina dobijenom sekvencijalnom fermentacijom primenom vrsta *H.uvarum/S. cerevisiae*, koncentracija acetoina bila je oko šesnaest puta niža. Slični rezultati zabeleženi su i u istraživanju Escribano-Viana i saradnika (488), gde je pokazano da su različiti sojevi vrste *M. pulcherrima* tokom prvih tri dana fermentacije kljuka grožđa tempranilo doprineli formiranju acetoina u koncentracijama od 11,40 do 13,30 mg/L. Nakon sekvencijalne inokulacije sa vrstom *S. cerevisiae*, koncentracija acetoina bila je smanjena za oko 75-80%. Takođe, nakon sekvencijalne fermentacije primenom različitih sojeva vrste *S. pombe* i *S. cerevisiae* primećeno je smanjenje koncentracije ovog jedinjenja za oko 56-85%, u odnosu na uzorke dobijene samostalnom fermentacijom primenom različitih sojeva vrste *S. pombe* (520). Ovo smanjenje koncentracije može se objasniti činjenicom da kvasci roda *Saccharomyces* retko proizvode veće količine acetoina, dok istovremeno imaju sposobnost njegovog korišćenja u metaboličkim procesima (521). Koncentracija acetoina u analiziranim uzorcima vina prokupac bila je znatno ispod praga senzorne detekcije (150 mg/L).

Fenilacetaldehid bio je jedino detektovan u uzorku vina dobijenom sekvencijalnom fermentacijom primenom sojeva *P. kluyveri* K-1/*S. cerevisiae* ICV D254. Koncentracija ovog jedinjenja iznosila je  $0,01 \pm 0,00$  mg/L i prelazila je prag senzorne detekcije, čime je doprinos senzornim karakteristikama vina, opisanim kao cvetne i medne note, mogao biti ostvaren. Identična koncentracija fenilacetaldehida određena je i u istraživanju Boban i saradnika (351), gde je nakon sekvencijalne fermentacije šire grožđa maraština, primenom sojeva *P. kluyveri/S. cerevisiae*, određena vrednost iznosila 0,01 mg/L.

#### **4.4.4.5. Isparljiva sumporna jedinjenja**

Isparljiva sumporna jedinjenja imaju značajan uticaj na senzorna svojstva vina, posebno na ukus i aromu, a nastaju tokom alkoholne fermentacije pod uticajem metaboličke aktivnosti kvasca (522). Njihova sinteza uključuje složene i raznovrsne mehanizme, pri čemu različiti faktori mogu uticati na finalnu koncentraciju. Soj kvasca, sorta i geografsko poreklo grožđa, uslovi vinifikacije, kao i redoks potencijal šire igraju ključnu ulogu u formiranju i akumulaciji isparljivih sumpornih jedinjenja u vinu (459). Ova jedinjenja mogu da čine do 10% ukupnih isparljivih aromatskih

jedinjenja u vinu. Prisustvo ovih jedinjenja uglavnom je povezano sa neželjenim aromatskim karakteristikama, uključujući mirise slične pokvarenim jajima, kupusu, luku i gumi, što može negativno uticati na senzorna svojstva vina (523).

U analiziranim uzorcima vina prokupač identifikovano je prisustvo 3-(metiltio)-1-propanola. Ovo jedinjenje doprinosi aromi karfiola, kada njegova koncentracija pređe nivo iznad praga senzorne detekcije od 0,50 mg/L (434,524). U svim analiziranim uzorcima vina koncentracija ovog jedinjenja kretala se u opsegu od 0,07 do 0,20 mg/L, bez značajnog uticaja na aromatski profil vina. Dobijeni rezultati u skladu su sa literaturnim podacima, koji navode da se koncentracija 3-(metiltio)-1-propanola u različitim vrstama vina kreće do 5 mg/L (524,525).

#### **4.4.4.6. Isparljiva fenolna jedinjenja**

Isparljiva fenolna jedinjenja (vinilfenoli) prisutna u mladim vinima potiču iz grožđa i/ili nastaju u okviru metaboličkih procesa kvasaca (526). Predstavljaju grupu jedinjenja sa značajnim uticajem na senzorna svojstva vina (526) posebno na ukus (527). Niske koncentracije isparljivih fenola mogu doprineti povoljnim senzornim karakteristikama, posebno u mladim crvenim vinima. Ova jedinjenja poboljšavaju kompleksnost arome dodajući začinske i note dima, kao i povoljne senzorne osobine gorčine i trpkosti (528). Njihovo prisustvo u koncentracijama znatno iznad senzornog praga detekcije može negativno uticati na kvalitet vina, dajući neprijatne arome opisane kao animalne, kožne i medicinske mirisne note (529).

Po zastupljenosti isparljivih fenola, ističe se prisustvo 2,4-di-tert-butil fenola, koji je detektovan u uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura *P. kluyveri* K-1, *M. pulcherrima* K-5 i *H. uvarum* Šd-1. Koncentracija ovog jedinjenja kretala se u opsegu od 0,28 do 1,59 mg/L, što je iznad praga senzorne detekcije (0,20 mg/L) (461). Prisustvo 2,4-di-tert-butil fenola doprinosi formiranju naglašenih cvetnih mirisnih nota (462). Prethodna istraživanja pokazala su da vrste *H. uvarum* i *M. pulcherrima*, tokom samostalne fermentacije, doprinose proizvodnji ovog jedinjenja (90,332). Acetovanilon, jedinjenje koje doprinosi cvetnim aromama, kao i aromama karanfilića i vanile, detektovan je u većini analiziranih uzoraka vina prokupač. Najveća koncentracija ovog jedinjenja određena je u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1 (0,62±0,01 mg/L), što je značajno iznad senzornog praga detekcije (0,07 mg/L). U ostalim uzorcima vina, u kojima je detektovano prisustvo acetovanilona, koncentracija se kretala u opsegu od 0,02 do 0,07 mg/L.

Dobijeni rezultati u skladu su sa vrednostima koncentracija acetavanilona određenih u različitim vrstama turskih (0,32-0,43 mg/L) (468), španskih (0,09-0,17 mg/L) (501) i čileanskih (0,06 mg/L) (530) crvenih vina. Isparljivo fenolno jedinjenje koje doprinosi začinskim notama (karanfilić i kari), *p*-vinilgvajakol, detektovano je u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *H. uvarum* Š-2 u koncentraciji od  $0,03 \pm 0,00$  mg/L. Proizvodnja *p*-vinilgvajakola od strane *H. uvarum* potvrđena je u istraživanju Lorenzini i saradnika (531). Istraživanje Boban i saradnika (351) pokazalo je da vrste *P. kluyveri* i *M. pulcherrima*, inokulisane kao čiste kulture imaju sposobnost proizvodnje *p*-vinilgvajakola, što je suprotno dobijenim rezultatima. Ovo neslaganje može se objasniti različitim metaboličkim profilima i varijabilnom sposobnošću dekarboksilacije aromatskih karboksilnih kiselina između sojeva različitih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasca (289). Eugenol, jedinjenje sa aromama cimeta, karanfilića i meda, bio je prisutan u uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura *P. kluyveri* K-1 ( $0,03 \pm 0,00$  mg/L) i *H. uvarum* Š-2 ( $0,02 \pm 0,00$  mg/L). U oba uzorka, koncentracija eugenola bila je iznad praga senzorne detekcije (0,005 mg/L), što ukazuje na njegov doprinos aromatskom profilu vina. Prethodna istraživanja potvrdila su da različite vrste *Hanseniaspora* (*H. uvarum*, *H. vineae* i *H. osmophila*) doprinose sintezi eugenola tokom samostalne i sekvencijalne fermentacije različitih vrsta vina (289,532).

#### 4.4.4.7. Terpenska jedinjenja

Terpenska jedinjenja čine deo primarne arome vina. Njihovo prisustvo u vinu rezultat je delovanja glikozidaznih enzima, kao što je  $\beta$ -glukozidaza koja hidrolizuju vezane glikozidne nearomatske prekursore prisutne u fermentacionom medijumu (šira/kljuk), oslobađajući slobodne terpene (283). Ova jedinjenja mogu značajno doprineti sortnom karakteru vina, pri čemu različite sorte grožđa sadrže različite nivoe vezanih nearomatskih prekursora. Deskriptori terpenskih jedinjenja, poput cvetnih, biljnih i citrusnih nota igraju ključnu ulogu u formiranju kompleksnosti i prepoznatljivosti aromatskog profila vina konkretnih sorti (95). Sposobnost ne-*Saccharomyces* kvasaca da oslobađaju terpenska jedinjenja iz glikozidnih nearomatskih prekursora potvrđena je u ranijim istraživanjima, pri čemu intenzitet enzimske hidrolize zavisi od soja kvasca i hemijske strukture supstrata (95,325,533).

Po zastupljenosti terpenskih jedinjenja u analiziranim uzorcima vina prokupac izdvajaju se tri uzorka dobijena primenom čistih kultura *P. kluyveri* K-1, *M. pulcherrima* K-5 i *H. uvarum* Š-2,

kao i uzorak dobijen sekvencijalnom fermentacijom primenom sojeva *M. pulcherrima* K-5/*S. cerevisiae* ICV D254. Uzorak vina dobijen primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1 izdvojio se od navedenih uzoraka po najvećem ukupnom sadržaju terpenskih jedinjenja (0,11 mg/L), što opravdava činjenicu da vrsta *P. kluyveri* doprinosi povećanju koncentracija terpenskih jedinjenja (387,475). U ovom uzorku, najzastupljenije terpeno jedinjenje bio je linalol oksid, sa koncentracijom od  $0,06 \pm 0,00$  mg/L, koja prelazi prag senzorne detekcije i značajno doprinosi cvetnim i mednim mirisnim notama. Pored ovog jedinjenja, bila su identifikovana još dva terpena jedinjenja, trans-farnezol ( $0,03 \pm 0,00$  mg/L) i geraniol ( $0,02 \pm 0,00$  mg/L). Koncentracija geraniola prelazila je senzorni prag detekcije (0,01 mg/L) doprinoseći cvetnim i citrusnim aromama vina. Takođe, prisustvo geraniola utvrđeno je u uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura *M. pulcherrima* K-5 i *H. uvarum* Š-2. U uzorku vina dobijenom sekvencijalnom fermentacijom primenom sojeva *M. pulcherrima* K-5/*S. cerevisiae* ICV D254 bilo je detektovano samo prisustvo linalol oksida u koncentraciji od  $0,02 \pm 0,00$  mg/L, koja nije prelazila senzorni prag detekcije (0,025 mg/L) (463). U kontrolnom uzorku nije detektovano prisustvo terpenskih jedinjenja, što se poklapa sa prethodnim istraživanjima, gde je potvrđeno da u uzorcima vina prokupa dobijenim primenom komercijalnih sojeva *S. cerevisiae* (ICV V1116 i D254) nije bilo detektovano prisustvo ove grupe jedinjenja (388,534). Ovo ukazuje da primenjeni sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca doprinose povećanju sadržaja terpenskih jedinjenja u vinu, što je u skladu sa prethodnim istraživanjima. Liu i saradnici (332) dokazali su da vrste *H. uvarum* i *M. pulcherrima*, tokom samostalne i sekvencijalne fermentacije soka od breskve doprinose povećanju koncentracije terpenskih jedinjenja za 2-5% u odnosu na vrstu *S. cerevisiae*. Takođe, istraživanje Boban i saradnika (351) pokazalo je da vrste *P. kluyveri*, *H. uvarum* i *M. pulcherrima* tokom sekvencijalne fermentacije šire od sorte grožđa maraština doprinose povećanju koncentracije ukupnih terpenskih jedinjenja od 8-18% u odnosu na vrstu *S. cerevisiae*.

#### **4.4.4.8. C<sub>13</sub>-norizoprenoidi**

C<sub>13</sub>-norizoprenoidi predstavljaju jednu od ključnih grupa mirisno aktivnih jedinjenja u grožđu, direktno povezanih sa aromatskim profilom vina (535). Zbog izuzetno niskog senzornog praga detekcije, C<sub>13</sub>-norizoprenoidi imaju značajnu ulogu u formiranju sortnog karaktera vina. Ova jedinjenja su posebno povezana sa cvetnim i voćnim mirisnim notama (475,536,537). Većina ovih

jedinjenja u vinu potiče iz prekursora, prvenstveno neisparljivih C<sub>13</sub>-norizoprenoidnih glikozida nastalih cepanjem karotenoida. Oslobođanje C<sub>13</sub>-norizoprenoida odvija se tokom alkoholne fermentacije i/ili starenja vina putem enzimskih i neenzimskih mehanizama (535).

U svim analiziranim uzorcima vina prokupac, osim kontrolnog uzorka detektovano je prisustvo samo jednog C<sub>13</sub>-norizoprenoidnog jedinjenja, 3-hidroksi- $\beta$ -damascenon. Uzorak vina dobijen primenom čiste kulture *H. uvarum* Šd-1 izdvajao se od ostalih uzoraka po najvećoj koncentraciji ovog jedinjenja, koja je iznosila 0,70±0,01 mg/L. U ostalim uzorcima, koncentracija ovog jedinjenja bila je znatno niža i varirala je u opsegu od 0,01 do 0,08 mg/L. Koncentracije 3-hidroksi- $\beta$ -damascenona u okviru su opsega koji je prethodno zabeležen u različitim vrstama crvenih vina (501,538).

#### **4.4.4.9. Laktonska jedinjenja**

Među isparljivim jedinjenjima u vinu, laktoni, posebno  $\gamma$ -laktoni, imaju ključnu ulogu u oblikovanju aromatskog profila vina (539). Ova jedinjenja nastaju ciklizacijom odgovarajućih hidroksi kiselina i predstavljaju ciklične estre sa petočlanim ( $\gamma$ -laktoni) ili šestočlanim ( $\delta$ -laktoni) prestenovima (540,541). Njihov senzorni doprinos zavisi od hemijske strukture, pri čemu tip prstena ( $\gamma$  ili  $\delta$ ), prisustvo funkcionalnih grupa i dužina bočnih lanaca direktno utiču na aromatske karakteristike (526). Aromatski profil laktona obuhvata širok spektar mirisnih nota, među kojima su kokos, voćne (breskva, kajsija, suvo voće), slatko-karamelne note, kao i začinske, biljne, ili mirsne note masnih kiselina i voska (541). Sinergijski efekti između različitih laktona dodatno može uticati na percepciju ovih aroma (542). Takođe, u homolognoj seriji,  $\gamma$ - i  $\delta$ -laktona, povećanje molekulske mase je povezano sa smanjenjem senzornog praga detekcije, što ukazuje da laktoni većih molekulskih masa mogu biti detektovani pri veoma niskim koncentracijama (526).

Po ukupnom sadržaju laktona izdvajaju se uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura *P. kluyveri* K-1 i *H. uvarum* Šd-1. Najzastupljeniji lakton u svim analiziranim uzorcima vina bio je  $\gamma$ -butirolakton.  $\gamma$ -Butirolakton potiče iz glutaminske kiseline ili srodnih jedinjenja (526). Koncentracija ovog jedinjenja u analiziranim uzorcima kretala se u granicama od 0,51 do 0,98 mg/L, koja je prelazila prag senzorne detekcije i doprinela voćnim i karamelnim mirisnim notama. Značajno veće koncentracije  $\gamma$ -butirolaktona zabeležene su kod većine uzoraka vina dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, gde se po najvećem sadržaju ovog jedinjenja

izdvaja uzorak vina dobijen primenom soja *P. kluyveri* K-1 ( $0,98 \pm 0,02$  mg/L). U istraživanju Escribano-Viana i saradnika (488) u uzorcima vina dobijenih sekvencijalnom fermentacijom primenom različitih sojeva *M. pulcherrima/S. cerevisiae* koncentracija  $\gamma$ -butirolaktona kretala se u opsegu od 1,18 do 1,36 mg/L. Takođe, u istraživanju Gao i saradnika (168) koncentracija  $\gamma$ -butirolaktona bila je 1,36 mg/L u uzorku vina dobijenom primenom vrsta *P. kluyveri/S. cerevisiae* u sekvencijalnoj fermentaciji. U istom istraživanju, u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *P. kluyveri* ovo jedinjenje nije detektovano. Tristezza i sardnici (438) odredili su koncentraciju  $\gamma$ -butirolaktona približno 0,10 mg/L u uzorku vina dobijenom primenom vrsta *H. uvarum/S. cerevisiae* u sekvencijalnoj fermentaciji. Ove razlike mogu se objasniti različitim sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca, kao i varijacijama u vremenu odležavanja vina, što može uticati na formiranje i stabilnost  $\gamma$ -butirolaktona (543).

U većini analiziranih uzoraka vina detektovan je 4-karbetoksi- $\gamma$ -butirolakton, derivat  $\gamma$ -butirolaktona. Osim u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *M. pulcherrima* K-5, gde prisustvo ovog jedinjenja nije detektovano, u ostalim uzorcima koncentracija 4-karbetoksi- $\gamma$ -butirolaktona bila je u opsegu od 0,04 do 0,70 mg/L. Koncentracija 4-karbetoksi- $\gamma$ -butirolaktona iznad senzornog praga detekcije koji iznosi 0,40 mg/L detektovana je jedino u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *H. uvarum* Šd-1 ( $0,70 \pm 0,01$  mg/L), što je doprinelo izraženoj slatkoj aromi i aromi kokosa (471). U istraživanju Schneider i saradnika (544), različite vrste komercijalnih crvenih vina (mauri i rivesaltes) iz francuske regije Rusijon, odležala u različitim sudovima i temperaturnim uslovima u periodu od jedne do tri godine, sadržala su koncentracije 4-karbetoksi- $\gamma$ -butirolaktona u opsegu od 0,38 do 0,63 mg/L. Ovo sugerise da soj *H. uvarum* Šd-1 potencijalno može pospešiti razvoj aroma karakterističnih za odležala vina u poređenju sa mladim vinima.

#### **4.4.5. Mirisna aktivnost i relativni olfaktorni doprinos aromatskih jedinjenja**

Nakon kvalitativne i kvantitativne analize isparljivih aromatskih jedinjenja, izračunate su njihove vrednosti mirisne aktivnosti (OAV) (tabela 4.8) i relativnog olfaktornog doprinosa (ROC) (tabela 4.9). Doprinos svakog isparljivog jedinjenja aromatskom profilu procenjen je na osnovu OAV vrednosti, koja se dobija deljenjem koncentracije jedinjenja sa koncentracijom senzornog praga

detekcije, dobijene na osnovu literaturnih podataka. Isparljiva jedinjenja sa vrednostima  $OAV > 1$  smatraju se značajnim za formiranje aromatskog profila vina (148,351). Nasuprot tome, jedinjenja sa koncentracijama ispod senzornog praga detekcije ( $OAV < 1$ ) se ne opažaju pojedinačno, ali njihov doprinos senzornom, odnosno aromatskom profilu ne treba zanemariti zbog mogućih sinergijskih interakcija sa drugim aromatskim jedinjenjima (545). Odnos između  $OAV$  vrednosti pojedinačnih isparljivih jedinjenja i ukupne  $OAV$  vrednosti vina, koji predstavlja relativni olfaktorni doprinos (ROC) (546), izračunat je radi procene senzornog doprinosa konkretnih isparljivih aromatskih jedinjenja.

U analiziranim uzorcima vina prokupac, 29 isparljivih aromatskih jedinjenja prelazilo je prag senzorne detekcije. Estri (10), od čega etil estri (6) i acetatni estri (4), viši alkoholi (9), fenolna jedinjenja (3), terpeni (2), laktoni (2), isparljive masne kiseline (2) i karbonilna jedinjenja (1) predstavljali su grupe isparljivih aromatskih jedinjenja, koje su najviše doprinele aromatskom profilu analiziranih uzoraka vina sorte prokupac.

U većini analiziranih uzoraka, grupa etil estara imala je izraženiji doprinos na ukupni aromatski profil, pri čemu su uočene razlike u doprinosu pojedinačnih jedinjenja, koja su uticala na intenzitet i kompleksnost arome. Kod većine uzoraka vina dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca,  $OAV$  vrednosti za etil oktanoat kretale su se u širokom opsegu od 280 do 670. Među ovim uzorcima, najveća  $OAV$  vrednost ovog jedinjenja bila je određena u uzorku fermentisanom sojem *H. uvarum* Š-2. U uzorcima vina dobijenih primenom sekvencijalne fermentacije, etil oktanoat je detektovan jedino u uzorku dobijenom primenom *P. kluyveri* K-1/*S. cerevisiae* ICV D254, gde je imao najveći relativni olfaktorni doprinos (81,66%), obogaćujući aromatski profil voćnim (nalik bananama, kruškama i ananasu), cvetnim i slatkim notama (434,436). Sličan doprinos etil oktanoata aromatskom profilu vina bio je zabeležen i u uzorku dobijenom primenom spontane fermentacije (79,10%). U kontrolnom uzorku doprinos etil oktanoata aromatskom profilu iznosio je 42,90%. U istom uzorku, etil heksanoat, jedinjenje koje doprinosi voćnim (nalik jabukama, bananama) i cvetnim (ljubičica i anis) notama (430,434,436), ostvario je izraženiji doprinos u formiranju aromatskog profila sa udelom od 31,37%.

Tabela 4.8 Vrednosti mirisne aktivnosti (OAV\*) aromatskih jedinjenja u vinima sorte prokupac dobijenih u laboratorijskim uslovima

Naziv jedinjenja	<i>P. kluyveri</i> K-1	<i>P. kluyveri</i> K-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>M. pulcherrima</i> K-5	<i>M. pulcherrima</i> K-5/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Kr-2	<i>H. uvarum</i> Kr-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Šd-1	<i>H. uvarum</i> Šd-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Š-2	<i>H. uvarum</i> Š-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	Kvasci epifitne mirkobiote	<i>S. cerevisiae</i> ICV D254
Izobutil alkohol	5,92	1,02	6,26	17,10	18,20	1,44	8,40	3,06	3,94	2,58	18,66	9,86
Butil alkohol	1,20	0,07	0,27	0,53	0,73	0,33	0,20	0,27	0,00	0,00	1,40	0,33
3-Metil-1-butanol	16,26	9,04	11,07	21,00	20,81	6,44	14,98	6,46	10,50	9,04	39,36	19,14
3-Etoksi propanol	6,30	2,70	4,20	2,30	2,30	2,30	4,00	3,50	3,50	2,80	3,20	0,60
1-Heksanol	9,82	6,27	9,82	6,09	6,64	5,64	11,36	9,64	9,64	7,18	9,73	3,91
1-Heptanol	140,00	20,00	40,00	0,00	15,00	20,00	60,00	0,00	20,00	20,00	20,00	10,00
Benzil alkohol	12,00	4,10	7,20	3,60	4,00	3,90	7,30	4,00	6,30	4,70	4,30	2,70
2-Feniletil alkohol	26,14	13,91	26,26	11,29	13,38	13,46	22,15	15,05	23,82	15,47	19,23	5,03
Tirosol	22,73	7,27	17,78	5,76	8,18	7,58	42,42	5,45	13,03	9,39	6,36	3,64
Etil propanoat	9,00	2,00	67,00	2,00	2,00	2,00	33,00	2,00	2,00	2,00	3,00	2,00
Etil izobutirat	0,00	0,00	0,00	300,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	200,00
Etil 3-hidroksibutirat	3,54	0,38	1,46	0,23	0,46	0,00	0,00	0,31	2,15	0,38	0,54	1,23
Etil heksanoat	90,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	140,00	0,00	60,00	0,00	0,00	340,00
Etil oktanoat	320,00	450,00	280,00	0,00	0,00	0,00	350,00	0,00	670,00	0,00	610,00	465,00
Etil oleat	0,00	0,00	0,36	0,00	0,00	0,00	1,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Etil acetat	2,46	1,70	2,21	3,06	3,18	1,59	2,69	1,67	1,72	1,94	4,39	0,76
Izoamil acetat	10,67	6,33	7,00	3,33	4,00	4,33	6,67	4,67	5,33	5,00	8,33	1,67
Aktivni amil acetat	0,00	0,00	2,00	1,50	2,00	1,50	3,00	0,00	2,00	0,00	3,00	0,00
2-Feniletil acetat	0,28	0,08	0,24	0,08	0,08	0,12	1,80	0,08	0,16	0,12	0,08	0,00
Izovaleična kiselina	2,42	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,91	0,00	0,00	0,00
Geranska kiselina	1,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fenilacetaldehid	0,00	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Eugenol	6,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00	0,00	0,00	0,00
Acetovanilon	8,86	0,00	0,00	0,00	0,29	0,43	1,00	0,29	0,43	0,57	0,00	0,29
2,4-Di-tert-butil fenol	1,40	0,00	5,95	0,00	0,00	0,00	7,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Linalol oksid	2,40	0,00	0,00	0,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Geraniol	2,00	0,00	2,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
γ-Butirolakton	28,00	15,43	25,14	15,14	14,57	14,57	23,14	24,29	22,29	20,29	19,43	17,14
4-Karbetoksi-γ-butirolakton	0,50	0,18	0,00	0,15	0,10	0,15	1,75	0,15	0,30	0,20	0,13	0,68

\*OAV vrednost izračunata je deljenjem srednje vrednosti koncentracije pojedinačnog jedinjenja sa koncentracijom senzornog praga detekcije tog jedinjenja.

Tabela 4.9 Vrednosti relativnog olfaktornog doprinosa (ROC\*) aromatskih jedinjenja u vinima sorte prokupac dobijenih u laboratorijskim uslovima

Naziv jedinjenja	<i>P. kluyveri</i> K-1	<i>P. kluyveri</i> K-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>M. pulcherrima</i> K-5	<i>M. pulcherrima</i> K-5/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Kr-2	<i>H. uvarum</i> Kr-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Šd-1	<i>H. uvarum</i> Šd-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Š-2	<i>H. uvarum</i> Š-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	Kvasci epifitne mirkobiote	<i>S. cerevisiae</i> ICV D254
Izobutil alkohol	0,81	0,19	1,02	4,34	15,70	1,68	1,13	3,78	0,46	2,54	2,42	0,91
Butil alkohol	0,16	0,01	0,04	0,14	0,63	0,39	0,03	0,33	0,00	0,00	0,18	0,03
3-Metil-1-butanol	2,23	1,64	1,80	5,33	17,95	7,51	2,02	7,99	1,22	8,89	5,10	1,77
3-Etoksi propanol	0,86	0,49	0,68	0,58	1,98	2,68	0,54	4,33	0,41	2,75	0,41	0,06
1-Heksanol	1,35	1,14	1,59	1,55	5,72	6,57	1,53	11,92	1,12	7,06	1,26	0,36
1-Heptanol	19,20	3,63	6,49	0,00	12,94	23,32	8,08	0,00	2,32	19,67	2,59	0,92
Benzil alkohol	1,65	0,74	1,17	0,91	3,45	4,55	0,98	4,95	0,73	4,62	0,56	0,25
2-Feniletil alkohol	3,59	2,52	4,26	2,87	11,54	15,69	2,98	18,61	2,76	15,22	2,49	0,46
Tirosol	3,12	1,32	2,90	1,46	7,06	8,83	5,71	6,74	1,51	9,24	0,83	0,34
Etil propanoat	1,23	0,36	10,87	0,51	1,73	2,33	4,44	2,47	0,23	1,97	0,39	0,18
Etil izobutirat	0,00	0,00	0,00	76,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	18,45
Etil 3-hidroksibutirat	0,49	0,07	0,24	0,06	0,40	0,00	0,00	0,38	0,25	0,38	0,07	0,11
Etil heksanoat	12,34	0,00	16,23	0,00	0,00	0,00	18,85	0,00	6,95	0,00	0,00	31,37
Etil oktanoat	43,89	81,66	45,43	0,00	0,00	0,00	47,12	0,00	77,63	0,00	79,10	42,90
Etil oleat	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Etil acetat	0,34	0,31	0,36	0,78	2,74	1,85	0,36	2,06	0,20	1,91	0,57	0,07
Izoamil acetat	1,46	1,15	1,14	0,85	3,45	5,05	0,90	5,77	0,62	4,92	1,08	0,15
Aktivni amil acetat	0,00	0,00	0,32	0,38	1,73	1,75	0,40	0,00	0,23	0,00	0,39	0,00
2-Feniletil acetat	0,04	0,01	0,04	0,02	0,07	0,14	0,24	0,10	0,02	0,12	0,0	0,00
Izovaletrična kiselina	0,33	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00
Geranska kiselina	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fenilacetaldehid	0,00	1,81	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Eugenol	0,82	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,46	0,00	0,00	0,00
Acetovanilon	1,21	0,00	0,00	0,00	0,25	0,50	0,13	0,35	0,05	0,56	0,00	0,03
2,4-Di-tert-butil fenol	0,19	0,00	0,97	0,00	0,00	0,00	1,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Linalol oksid	0,33	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Geraniol	0,27	0,00	0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00
$\gamma$ -Butirolakton	3,84	2,80	4,08	3,84	12,57	16,99	3,12	30,03	2,58	19,95	2,52	1,58
4-Karbetoksi- $\gamma$ -butirolakton	0,07	0,03	0,00	0,04	0,09	0,17	0,24	0,19	0,03	0,20	0,02	0,06

\*ROC predstavlja odnos OAV vrednosti pojedinačnog jedinjenja i ukupne OAV vrednosti vina.

Značajan olfaktorni doprinos etil heksanoata primećen je još i u uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Među ovim uzorcima, veća OAV i ROC vrednost određena je u uzorku vina fermentisanog sojem *H. uvarum* Šd-1. Najmanji doprinos formiranju aromatskog profila od strane etil heksanoata bio je određen u uzorku dobijenom primenom čiste kulture *H. uvarum* Š-2. U svim uzorcima vina etil propanoat imao je uticaj na aromatski profil, doprinoseći voćnim (nalik jabukama i bananama) i slatkim mirisnim tonovima (435,436). Najveća OAV vrednost zabeležena je u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *M. pulcherrima* K-5, gde je njegov relativni olfaktorni doprinos u ukupnom aromatskom profilu iznosio 10,87%. Skoro duplo manji uticaj ovog jedinjenja na aromatski profil, uočen je u uzorku vina fermentisanog sojem *H. uvarum* Šd-1. U ostalim uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca (*P. kluyveri* K-1 i *H. uvarum* Kr-2 i Š-2) doprinos aromatskom profilu od strane etil propanoata bio je znatno manji. Uzorci vina dobijeni primenom sekvencijalne fermentacije pokazali su varijabilnost po pitanju aromatskog doprinosa ovog jedinjenja. Veći doprinos primećen je u uzorcima vina dobijenim sojevima *H. uvarum* u sekvencijalnoj fermentaciji, gde je ROC vrednost varirala između 1,97 i 2,47%. Najmanji uticaj etil propanoata na ukupni aromatski profil vina zabeležen je u kontrolnom uzorku. Doprinos voćnim notama (nalik grožđu i jabukama) od strane etil 3-hidroksibutirata (428) na aromatski profil imala su vina dobijena primenom sojeva *P. kluyveri* K-1, *M. pulcherrima* K-5, *H. uvarum* Š-2 i *S. cerevisiae* ICV D254. Kod navedenih uzoraka vina, OAV vrednosti etil 3-hidroksibutirata bile su iznad 1. Najveća OAV vrednost ovog jedinjenja određena je u vinu fermentisanom sojem *P. kluyveri* K-1. Vina dobijena sekvencijalnom fermentacijom primenom *M. pulcherrima* K-5/*S. cerevisiae* ICV D254 i primenom komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254 izdvojila su se po doprinosu etil izobutirata, koji je obogatio aromatski profil sa slatkim i voćnim notama (435). ROC vrednost za etil izobutirat iznosila je skoro 80%, što ukazuje da je ovo jedinjenje dominantno u oblikovanju aromatskog profila konkretnog uzorka. U vinu dobijenom primenom vrste *S. cerevisiae*, relativni doprinos ovog jedinjenja na formiranje aromatskog profila iznosio je 18,45%. U poređenju sa dobijenim rezultatima u istraživanju Wang i saradnika (462), primećen je veći doprinos etil oktanoata na aromatski profil vina sorte longjan dobijen sekvencijalnom fermentacijom primenom vrsta *P. kluyveri* i *S. cerevisiae*. U istraživanju du Plessis i saradnika (457) u vinima sorte širaz dobijenim primenom vrsta *H. uvarum* i *M. pulcherrima* doprinos etil 3-hidroksibutirata na aromatski profil vina bio je izraženiji. Istraživanje Hu i saradnika (405) pokazalo je da vrsta *H.*

*uvarum* tokom mešovitih fermentacija u različitim vrstama vina doprinosi proizvodnji etil izobutirata, što je suprotno dobijenim rezultatima. Istraživanja Lai i saradnika (283) i Li i saradnika (331) pokazala su da su vina sorte kioho i beibinghong dobijena primenom vrsta *H. uvarum* i *P. kluyveri*, nezavisno od tipa fermentacije, imala niži doprinos etil heksanoata na formiranje aromatskog profila, u poređenju sa dobijenim rezultatima. Razlike u rezultatima mogu se objasniti u hemijskom sastavu fermentacionog medijuma (477) i različitim enzimskim aktivnostima među sojevima kvasca (503).

Među acetatnim estrima, izoamil acetat, etil acetat, aktivni amil acetat i 2-feniletal acetat su uticali na aromatski profil analiziranih uzoraka vina prokupac. Veće OAV vrednosti izoamil acetata primećene su u uzorcima vina dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Najveća OAV vrednost ovog jedinjenja bila je određena u uzorku dobijenom primenom soja *P. kluyveri* K-1, dok je kod ostalih uzoraka dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca OAV vrednost bila niža. Za razliku od ovih uzoraka, u vinu dobijenom primenom soja *H. uvarum* Kr-2 utvrđena je najniža OAV vrednost izoamil acetata, pri čemu je njegov doprinos u formiranju ukupnog aromatskog profila bio najviši. U pojedinim uzorcima vina dobijenim primenom sekvencijalne fermentacije, relativni doprinos izoamil acetata ukupnom aromatskom profilu bio je veći u poređenju sa uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Uzorci vina dobijeni primenom sojeva *H. uvarum* u sekvencijalnoj fermentaciji imali su izraženiji relativni doprinos ovog jedinjenja u formiranju aromatskog profila (4,92-5,77%), u poređenju sa ostalim analiziranim uzorcima, pri čemu je izoamil acetat doprineo intenziviranju voćnih (banana, kruška) i blago slatkastim aromatskih nota u senzornom profilu vina (422,435). Kod uzoraka vina dobijenih primenom sojeva *P. kluyveri* K-1 i *M. pulcherrima* K-5 u sekvencijalnoj fermentaciji, zastupljenost izoamil acetata u ukupnom aromatskom profilu iznosila je 1,15% i 0,85%, respektivno. Slična vrednost doprinosu na aromatski profil od strane ovog jedinjenja bila je određena u uzorku dobijen primenom spontane fermentacije. Najmanji doprinos izoamil acetata na formiranje aromatskog profila primećen je u kontrolnom uzorku. U većini uzoraka, OAV vrednosti etil acetata bile su veće od 1 i kretale su se u opsegu od 1,59 do 4,39, što ukazuje na doprinos voćnih (ananas), začinskih (anis) i slatkih nota na aromatski profil vina (432,434,436). Za uzorak vina dobijen primenom spontane fermentacije izračunata je najveća OAV vrednost za etil acetat, dok je u kontrolnom uzorku ova vrednost bila najmanja. Među uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, po većoj OAV i

ROC vrednosti izdvaja se uzorak fermentisan sojem *H. uvarum* Kr-2. Kod ostalih uzoraka iz ove grupe, relativni doprinos etil acetata na aromatski profil vina kretao se u opsegu od 0,20 do 0,36%. Uzorci vina gde su sojevi *M. pulcherrima* K-5, *H. uvarum* Šd-1 i Š-2 korišćeni u sekvencijalnoj fermentaciji, u odnosu na vina dobijena primenom čistih kultura ovih kvasaca, imali su znatno veći doprinos etil acetata u formiranju ukupnog aromatskog profila. Nasuprot tome, sekvencijalna fermentacija primenom soja *H. uvarum* Kr-2 rezultirala je 30% nižim, a primenom soja *P. kluyveri* K-1 10% nižim relativnim olfaktornim doprinosom etil acetata u aromatskom profilu vina u poređenju sa samostalnom fermentacijom istih sojeva. Uočene razlike verovatno proizilaze iz specifičnih interakcije između ne-*Saccharomyces* kvasaca i *S. cerevisiae* koje se javljaju tokom sekvencijalne fermentacije. Doprinos aromatskom profilu od strane aktivnog amil acetata bio je značajan u pojedinim analiziranim uzorcima vina prokupac. Sojevi *H. uvarum* i *M. pulcherrima*, kao i epifitna mikrobiota grožđa doprineli su proizvodnji ovog acetatnog estera, koji je u vinima odgovoran za voćne i prijatne arome (430). Najveći relativni doprinos u formiranju aromatskog profila bio je određen u uzorcima dobijenim primenom soja *H. uvarum* Kr-2, u oba tipa fermentacije, pri čemu su vrednosti bile slične. 2-Feniletil acetat, jedinjenje koje doprinosi voćnim, cvetnim (ruža) i mednim notama (432,434,439), kao i notama duvana (431), jedino je u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *H. uvarum* Šd-1 imao OAV vrednost veću od 1. U analiziranim uzorcima vina doprinos aromatskom profilu od strane ovih acetatnih estara bio je niži u poređenju sa prethodnim istraživanjima. Ranija istraživanja ukazuju da iste vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca (*P. kluyveri*, *H. uvarum* i *M. pulcherrima*) generalno proizvode vina u kojima izoamil acetat (283,310,439), etil acetat (332,547), aktivni amil acetat (310) i 2-feniletil acetat (331,347,476) imaju izraženiji doprinos ukupnom aromatskom profilu. Veći doprinos acetatnih estara na aromatski profil vina može se pripisati većem sadržaju asimilirajućeg azota u fermentacionom medijumu, koji podstiče ekspresiju gena ATF1 koji je odgovoran za sintezu acetatnih estara, ali svakako i karakteristikama korišćenih sojeva kvasaca (405,477).

Drugu grupu jedinjenja, koja je značajno doprinela aromatskom profilu analiziranih uzoraka vina prokupac, činili su viši alkoholi. U pojedinim uzorcima vina, ROC vrednosti za više alkohole prelazile su 50%, što ukazuje da su ovi metaboliti imali dominantan doprinos ukupnom aromatskom profilu. Među jedinjenjima iz ove grupe, jedino je 2-feniletil alkohol imao doprinos aromatskom profilu u svim analiziranim uzorcima vina prokupac, koji je bio odgovoran za izražene cvetne (ruža), kao i slatke i medne aromatske note (434,436). Poređenjem OAV vrednosti,

većina uzoraka vina dobijenih primenom sekvencijalne fermentacije imala je niže vrednosti u odnosu na uzorke vina dobijene primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca. Ipak, u uzorcima vina dobijenim sekvencijalnom fermentacijom primenom sojeva *H. uvarum*, udeo 2-feniletil alkohola u formiranju aromatskog profila bio je izraženiji, u rasponu od 15,22 do 18,61%. Uzorci vina dobijeni sekvencijalnom fermentacijom primenom sojeva *P. kluyveri* K-1 i *M. pulcherrima* K-5 imali su sličan doprinos ovog jedinjenja, koji je iznosio 2,52% i 2,87%, respektivno. U poređenju sa ovim uzorcima, u uzorcima dobijenim primenom čistih kultura *P. kluyveri* K-1 i *M. pulcherrima* K-5 primećen je veći udeo ovog jedinjenja na aromatski profil vina. Pored ovog jedinjenja, u uzorku dobijenom primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1 po OAV vrednosti posebno se izdvojio 1-heptanol, čiji je doprinos herbalnim, citrusnim (nalik limunu i pomorandži) i voćnim (nalik jabuci i banani) notama (428,496) na aromatski profil iznosio 19,20%. Manji udeo ovog jedinjenja u aromatskom profilu primećen je kod uzorka vina dobijenog primenom čiste kulture *H. uvarum* Kr-2. Kod ostalih uzoraka vina dobijenih primenom čistih kultura kvasaca (*M. pulcherrima* K-5, *H. uvarum* Šd-1 i Š-2) i primenom prisutne epifitne mikrobiote grožđa, doprinos 1-heptanola na aromatski profil bio je niži. Nasuprot tome, iako su uzorci vina dobijeni primenom sojeva *H. uvarum* (Š-2 i Kr-2) u sekvencijalnoj fermentaciji imali OAV vrednost 20, doprinos aromatskom profilu od strane 1-heptanola bio je najizraženiji upravo u ovim uzorcima (19,67% i 23,32%, respektivno). Pored toga, u istim uzorcima zabeležen je i najveći doprinos tirosola, jedinjenje koje doprinosi nastanku cvetnih, voćnih i blagih slatkih aroma (440). Manji relativni doprinos aromatskom profilu od strane tirosola bio je određen u uzorku dobijen sekvencijalnom fermentacijom primenom soja *H. uvarum* Šd-1/*S. cerevisiae* ICV D254, dok je u svim preostalim uzorcima dobijenim u sekvencijalnim fermentacijama doprinos bio značajno manji. Među uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, izdvajaju se uzorci dobijeni primenom sojeva *H. uvarum* Kr-2 i Šd-1 po većem doprinosu tirosola na aromatski profil vina (7,06% i 5,71%, respektivno). Analiza aromatskog profila ukazala je da benzil alkohol takođe značajno doprinosi aromatskom profilu vina, intenzivirajući citrusne, voćne i cvetne mirisne note (428,430,434,436). Na osnovu izračunatih OAV vrednosti za benzil alkohol, koja je bila u rasponu od 4 do 12, među uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, uzorak vina dobijen primenom *H. uvarum* Kr-2 imao je najnižu OAV vrednost, ali je doprinos benzil alkohola aromatskom profilu bio najveći među ovim uzorcima. U uzorcima vina dobijenim primenom sekvencijalne fermentacije, naročito primenom sojeva *H.*

*uvarum*, primećen je izraženiji uticaj benzil alkohola na aromatski profil vina. Nezavisno od tipa fermentacije, u uzorcima vina dobijenim primenom ne-*Saccharomyces* kvasaca, kao i u uzorku vina dobijenom primenom spontane fermentacije, OAV vrednosti 3-etoksi propanola bile su u opsegu od 2,30 do 6,30. Veći doprinos aromatskom profilu od strane ovog jedinjenja, među ovim uzorcima, bio je zapažen u uzorcima vina dobijenim primenom sojeva *H. uvarum*. Dobijeni rezultati ukazuju na veći doprinos pomenutih viših alkohola na aromatski profil vina u odnosu na prethodna istraživanja, u kojima su vina proizvedena primenom istih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca (*P. kluyveri*, *H. uvarum* i *M. pulcherrima*), nezavisno od tipa fermentacije, imala OAV vrednosti 2-feniletil alkohola (332,462), 1-heptanola (331,405,462), tirosola (283) i benzil alkohola (331,439) manje od 1. Uočena odsutovanja verovatno su posledica specifične interakcije između različitih sojeva kvasaca ili razlike u uslovima fermentacije i sastava fermentacionog medijuma, koje mogu uticati na produkciju ovih viših alkohola (548). Aromatskom profilu analiziranih uzoraka vina prokupac doprineli su još i 3-metil-1-butanol, izobutil i butil alkohol, kao i 1-heksanol. Među uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, uzorak vina dobijen primenom soja *H. uvarum* Kr-2 izdvaja se po većem doprinosu 3-metil-1-butanola i izobutil alkohola na aromatski profil vina. Kod ostalih uzoraka dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, zastupljenost 3-metil-1-butanola i izobutil alkohola u aromatskom profilu bila je znatno niža. U poređenju sa ovim uzorcima, kod većine uzoraka vina dobijenih primenom sekvencijalne fermentacije zabeležen je veći doprinos ovih viših alkohola na aromatski profil. Najveći udeo 1-heksanola u ukupnom aromatskom profilu vina, koji doprinosi cvetnim i herbalnim notama (435,438), primećen je u uzorku dobijenom primenom soja *H. uvarum* Šd-1 u sekvencijalnoj fermentaciji. Uzorci vina dobijeni primenom druga dva soja *H. uvarum* (Š-2 i Kr-2) u sekvencijalnoj fermentaciji imali su oko 1,5-2 puta niži relativni doprinos ukupnom aromatskom profilu od strane ovog jedinjenja. U poređenju sa ovim uzorcima, u vinima dobijenim primenom čistih kultura *H. uvarum* zabeležen je niži doprinos 1-heksanola, naročito u uzorcima dobijenim sojevima *H. uvarum* Šd-1 i Š-2, kod kojih je udeo ovog jedinjenja bio i do deset puta manji. Kod uzoraka dobijenih primenom sojeva *P. kluyveri* K-1 i *M. pulcherrima* K-5, nezavisno od tipa fermentacije, doprinos 1-heksanola aromatskom profilu bio je sličan. Butil alkohol, koji doprinosi slatkim i voćnim aromama (428,430), u uzorku vina dobijenom spontanom fermentacijom, kao i u uzorku dobijenom primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1, imao je OAV vrednost veću od 1. Prethodna istraživanja pokazala su da vina sorte širaz (457), kaberne sovinjon

(101) i pino noar (547), dobijena primenom istih vrsta ne-*Saccharomyces* kvasaca (*P. kluyveri*, *H. uvarum* i *M. pulcherrima*) imala su slične vrednosti doprinosa aromatskom profilu od strane 3-metil-1-butanola, izobutil alkohola i 1-heksanola, što je u skladu sa dobijenim rezultatima.

Sledeća grupa aromatskih jedinjenja koja je doprinela formiranju aromatskog profila analiziranih uzoraka vina sorte prokupac bila su fenolna jedinjenja (acetovanilon, eugenol i 2,4-di-tert-butil fenol). Uzorak vina dobijen primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1 izdvajao se od ostalih uzoraka po izraženom doprinosu acetovanilona i eugenola na aromatski profil. U ovom uzorku, OAV vrednosti izračunate za acetovanilon i eugenol iznosile su 8,86 i 6,00, respektivno, pri čemu je udeo u formiranju ukupnog aromatskog profila od strane acetovanilona iznosio 1,21%, dok je eugenol učestvovao sa 0,82%. Ova jedinjenja doprinose cvetnim, začinskim (vanila, karanfilić i cimet) i slatkim (med) mirisnim notama vina (431,435,460). Doprinos eugenola bio je primećen i u uzorku vina dobijenom primenom soja *H. uvarum* Š-2. Zastupljenost 2,4-di-tert-butil fenola u aromatskom profilu vina, koji doprinosi cvetnim (ruža) notama (334), određena je jedino u vinima dobijenim primenom sojeva *P. kluyveri* K-1, *M. pulcherrima* K-5 i *H. uvarum* Šd-1. Među ovim uzorcima, 2,4-di-tert-butil fenol imao je najveću OAV vrednost u uzorku vina fermentisan sojem *H. uvarum* Šd-1. Niža OAV vrednost ovog jedinjenja bila je određena u uzorku dobijenom primenom soja *M. pulcherrima* K-5. Najmanja zastupljenost 2,4-di-tert-butil fenola u ukupnom aromatskom profilu zabeležen je u uzorku dobijenom primenom soja *P. kluyveri* K-1. Za razliku od dobijenih rezultata, Wang i saradnici (491) su u vinima sorte kaberne sovinjon dobijenih primenom različitih sojeva vrste *H. uvarum*, kao i Liu i saradnici (332) u vinima dobijenim od pasterizovnaog soka breskve primenom vrsta *H. uvarum* i *M. pulcherrima*, odredili OAV vrednosti za 2,4-di-tert-butil fenol manje od 1. Pored toga, Li i saradnici (549) pokazali su da su različite vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca (*Wickerhamomyces anomalus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia fermentans*, *Zygosaccharomyces rouxii* i *Z. bailli*) proizvele vina u kojima je OAV vrednost 2,4-di-tert-butil fenola bila manja od 1. Dobijeni rezultati ukazuju da analizirani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca mogu doprineti povećanju udela specifičnih aromatskih nota fenolnog porekla, što potvrđuju OAV vrednosti fenolnih jedinjenja veće od 1.

Linalol oksid i geraniol izdvojili su se kao predstavnici terpenkih jedinjenja, koja su doprinela formiranju aromatskog profila analiziranih uzoraka vina sorte prokupac. U uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1, OAV vrednost linalol oksida iznosila je 2,40, što ukazuje na doprinos cvetnim i slatkim (med) notama (464,465) u oblikovanju aromatskog profila. U istom

uzorku, geraniol je učestvovao u formiranju aromatskog profila, doprinoseći citrusnim (pomorandža) i cvetnim (ruža i zdravac) notama (436). Doprinos geraniola uočen je još i u uzorcima vina dobijenih primenom sojeva *M. pulcherrima* K-5 i *H. uvarum* Š-2. Prethodna istraživanja pokazala su da iste vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca (*P. kluyveri*, *H. uvarum* i *M. pulcherrima*) doprinose obogaćivanju aromatskog profila vina različitim terpenskim jedinjenjima. U istraživanjima Sun i saradnika (309) i Zhang i saradnika (515) vina dobijena od soka trešnje i šljive, respektivno, primenom vrste *M. pulcherrima* imala su OAV vrednosti linalola veće od 1. Istraživanje Yang i saradnika (476) pokazalo je da vino dobijeno od soka jagode primenom vrste *H. uvarum* u sekvencijalnoj fermentaciji imalo je izrazit doprinos linalola, D-citronelola i nerolidola na aromatski profil. Lai i saradnici (283) potvrdili su da su vina sorte kioho dobijena primenom vrsta *H. uvarum* i *P. kluyveri* imala značajan doprinos  $\beta$ -jonena. Razlike u profilu terpenskih jedinjenja, u poređenju sa navedenim istraživanjima, verovatno su posledica različitog hemijskog sastava fermentacionog medijuma, jer različite vrste voća poseduju različite koncentracije i tipove glikozidno vezanih prekursora terpena, ali svakako ukazuju na potencijal konkretnih sojeva kvasaca da pozitivno utiču na koncentraciju ovih jedinjenja (95,283).

Laktoni su činili grupu jedinjenja koja je značajno uticala na aromatski profil analiziranih uzoraka vina prokupac. Ovu grupu predstavljali su  $\gamma$ -butirolakton i 4-karbetoksi- $\gamma$ -butirolakton. Svi analizirani uzorci vina prokupac imali su OAV vrednosti za  $\gamma$ -butirolakton veće od 14,50. Pojedini uzorci dobijeni primenom sojeva *H. uvarum* izdvojili su se po doprinosu  $\gamma$ -butirolaktona. U uzorcima vina dobijenim primenom ovih sojeva u sekvencijalnoj fermentaciji određen je najveći doprinos  $\gamma$ -butirolaktona na aromatski profil (16,99-30,30%), koji je doprineo voćnim i slatkim (karamela) notama (468,469). Pored ovih jedinjenja, po većem doprinosu na aromatski profil od strane ovog laktona, ističe se i uzorak vina dobijen primenom čiste kulture *H. uvarum* Kr-2. Prisustvo 4-karbetoksi- $\gamma$ -butirolaktona u koncentraciji iznad senzornog praga detekcije uočeno je jedino u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *H. uvarum* Šd-1, gde je ovo jedinjenje učestvovalo sa 0,24% u formiranju aromatskog profila, doprinoseći blagim kokosnim notama (471). Istraživanje Tristezza i saradnika (438) pokazalo je da je u vinima sorte negroamaro dobijenim primenom vrsta *H. uvarum* i *S. cerevisiae* u mešovitim fermentacijama primećen umereni doprinos  $\gamma$ -butirolaktona na formiranje aromatskog profila, što je u skladu sa dobijenim rezultatima.

Isparljive masne kiseline učestvovala su u formiranju aromatskog profila u uzorku vina dobijenom primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1. U ovom uzorku kvantifikovan je udeo geranske kiseline, koja doprinosi biljnim i cvetnim notama (550), i izovalerične kiseline, odgovorne za slatke arome (453).

Uzorak vina dobijen primenom soja *P. kluyveri* K-1 u sekvencijalnoj fermentaciji jedini je imao doprinos karbonilnih jedinjenja, odnosno fenilacetaldehida jedinjenje koje je cvetnim (ruža) i slatkim (med) notama (435,458) doprinelo obogaćivanju aromatskog profila. Međutim, prethodna istraživanja pokazala su drugačije rezultate, pri čemu su vrste *H. uvarum* i *M. pulcherrima* proizvodile fenilacetaldehid u koncentracijama iznad senzornog praga detekcije, doprinosći formiranju aromatskog profila vina proizvedenih od šljive (515) i mandarine (551). Odsustvo ovog jedinjenja u analiziranim uzorcima može ukazivati na specifičnost sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca, jer prema navodu Zhou i saradnika (552), fenilacetaldehid nastaje kao proizvod tokom alkoholne fermentacije, a njegova sinteza zavisi od vrste i metabolitičkog potencijala kvasaca.

#### **4.5. Hromatske karakteristike vina sorte prokupac**

Boja je važan parametar kvaliteta crvenog vina, koji direktno može poslužiti kao pokazatelj njegove starosti, uslova i načina čuvanja, dok istovremeno daje informacije i o mogućim nedostacima i propustima u proizvodnji. Kao primarni vizuelni parametar, boja vina ima ključnu ulogu u formiranju prvog utiska o crvenim vinima i značajno utiče na njihovu prihvatljivost među potrošačima (553). Boja vina zavisi od sorte grožđa, procesa proizvodnje i primenjenih postupaka stabilizacije i starenja vina, pri čemu razlika u boji može pomoći u prepoznavanju tipičnih sortnih karakteristika vina (554,555). Tokom starenja i odležavanja, boja crvenih vina postaje intenzivnija i stabilnija, i menja se od jarko crvene do crvenkasto-bronjane, što je uglavnom povezano sa antocijanima u vinu, sa njihovom degradacijom, oksidacijom, polimerizacijom ili kopigmentacijom tokom koje antocijani formiraju stabilne komplekse sa drugim fenolnim jedinjenjima, čime se povećava intenzitet i stabilnost boje crvenog vina (554). U procesu vinifikacije, antocijani iz pokožice grožđa oslobađaju se u kljuk ili širu, a zatim u vino, gde predstavljaju osnovne pigmente odgovorne za boju crvenih vina. Iako su ovi pigmenti kratkotrajnog karaktera, vino zadržava postojanu crvenu boju. Smanjenje koncentracije antocijana odvija se paralelno sa formiranjem novih pigmenta, koji nastaju kao rezultat reakcija antocijana

sa različitim sastojcima vina, među kojima značajnu ulogu imaju i metaboliti kvasaca, čime se potvrđuje njihov uticaj na stabilnost i kvalitet boje vina (556,557). Prema tome, boja vina određena je koncentracijom pigmenata, odnosno koncentracijom antocijana i srodnih jedinjenja, koji se ekstrahuju iz pokožice grožđa tokom procesa vinifikacije (558). Intenzitet i nijansa boje su važni parametri kvaliteta crvenih vina (558). Intenzitet boje predstavlja „količinu“ boje vina (559,560) i zavisi od vrste pigmenata i stanja ravnoteže pigmenata u vinu, ali takođe i od pH vrednosti i koncentracije SO<sub>2</sub> (555). Nijansa boje ukazuje na razvoj boje prema narandžastim tonovima tokom odležavanja vina. Mlada vina obično imaju vrednost nijanse manju od 1 (0,50-0,70), dok odležala vina dostižu veću vrednost, obično oko 1,20-1,30 (555). Vina sa nijansama između 0,60 i 1,00 karakterišu se crvenim nijansama, dok vrednosti iznad 1 ukazuju na robusna crvena vina ili vina dubokih nijansi (561).

#### **4.5.1. Intenzitet boje**

Među uzorcima vina dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, najveća vrednost intenziteta boje bila je određena u uzorku dobijenom primenom soja *M. pulcherrima* K-5 (tabela 4.10), što opravdava činjenicu da vrsta *M. pulcherrima* ima nisku sposobnost adsorpcije antocijana na ćelijskom zidu, što može doprineti očuvanju veće količine antocijana dajući vina sa izraženijim intenzitetom boje (562). Pored toga, vrsta *M. pulcherrima* se smatra pigmentisanom vrstom, budući da tokom alkoholne fermentacije proizvodi crvenkasto obojenu biomasu (15). Kod ostalih uzoraka vina dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca vrednosti intenziteta boje bile su slične (tabela 4.10). Nasuprot tome, uzorci vina dobijeni primenom sekvencijalne fermentacije pokazali su varijabilnost u intenzitetu boje. Najveći intenzitet boje određen je u uzorku dobijenom primenom soja *P. kluyveri* K-1/*S. cerevisiae* ICV D254 (tabela 4.10), što ukazuje na sinergistički efekat između vrsta *P. kluyveri* i *S. cerevisiae* u povećanju sadržaja i stabilizaciji bojenih jedinjenja (168).

Tabela 4.10 Hromatske karakteristike uzoraka vina sorte prokupac dobijenih u laboratorijskim uslovima

Uzorak	Intenzitet boje	Nijansa boje	Udeo pigmenata, %		
			Žuta	Crvena	Plava
Kljuk	1,545±0,031a	2,027±0,041g	57,73±1,15g	28,48±0,57a	13,79±0,28b
<i>P. kluyveri</i> K-1	2,162±0,043bc	0,955±0,019bcd	41,95±0,84ef	43,94±0,88cde	14,11±0,28b
<i>P. kluyveri</i> K-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	2,764±0,044f	0,946±0,015bcd	39,65±0,63abc	41,90±0,67bc	18,45±0,30f
<i>M. pulcherrima</i> K-5	2,661±0,045f	0,908±0,015bc	39,16±0,67ab	43,10±0,73cde	17,74±0,30f
<i>M. pulcherrima</i> K-5/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	2,420±0,042e	0,900±0,016b	39,92±0,70abcd	44,34±0,78e	15,74±0,28d
<i>H. uvarum</i> Kr-2	2,168±0,031bc	0,977±0,014de	41,19±0,60bcde	42,16±0,61bcd	16,65±0,24e
<i>H. uvarum</i> Kr-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	2,323±0,032de	1,056±0,014f	42,83±0,59ef	40,55±0,56b	16,62±0,23e
<i>H. uvarum</i> Šd-1	2,221±0,030cd	0,927±0,013bcd	40,79±0,55bcde	43,99±0,59cde	15,22±0,21cd
<i>H. uvarum</i> Šd-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	2,082±0,039b	1,021±0,019ef	43,42±0,82f	42,51±0,80bcde	14,07±0,27b
<i>H. uvarum</i> Š-2	2,126±0,037bc	0,938±0,016bcd	41,52±0,73cdef	44,25±0,77de	14,21±0,25b
<i>H. uvarum</i> Š-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	2,106±0,035b	0,951±0,016bcd	41,69±0,70cdef	43,83±0,73cde	14,48±0,24bc
Kvasci epifitne mikrobiote	2,115±0,026bc	0,961±0,012cd	41,94±0,51def	43,64±0,53cde	14,42±0,17b
<i>S. cerevisiae</i> ICV D254	2,343±0,047e	0,731±0,015a	37,86±0,76a	51,77±1,04f	10,37±0,21a

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± standardna devijacija (n = 3). Vrednosti označene različitim slovima ukazuju na statističku značajnu razliku vrednosti u istoj koloni pri nivou značajnosti  $p < 0,05$  (Tukey HSD test).

Prema literaturnim podacima, vino sorte prokupac smatra se vinom sa nižim intenzitetom obojenosti, jer prema istraživanju Lakićević i saradnika (534) vina sorte prokupac proizvedena sa dodatkom aromatskog bilja imala su vrednosti intenziteta boje u rasponu od 0,210 do 0,570. Istraživanje Babincev i saradnika (559) dokazalo je da je vino sorte prokupac tokom odležavanja godinu dana imalo vrednost intenziteta boje od 1,187. Dobijeni rezultati pokazali su značajno veće vrednosti intenziteta boje, što se može dovesti u vezu sa aktivnostima ne-*Saccharomyces* kvasaca u oslobađanju reduktivnih jedinjenja, kao što je glutation, koji ima zaštitino dejstvo na antocijane u vinu (202), i formiranju stabilnih pigmenata, kao što su vitisini i/ili vinilfenolna jedinjenja (derivati cinamične kiseine) tokom alkoholne fermentacije (563,564). S obzirom na to da boja vina predstavlja važnu karakteristiku, koja značajno utiče na ukupno prihvatanje vina od strane potrošača, i imajući u vidu da vina sorte prokupac obično imaju niži intenzitet boje, dobijeni rezultati mogu se smatrati veoma značajnim, naročito u proizvodnji kvalitetnih vina od sorti grožđa koje karakteriše slaba obojenost.

### 4.5.2 Nijansa boje

Uzorci vina dobijeni primenom ne-*Saccharomyces* kvasaca, nezavisno od tipa fermentacije, kao i uzorak dobijen primenom prisutne epifitne mikrobiote grožđa imali su značajno veće vrednosti nijanse boje, u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Statistička analiza u većini slučajeva kod uzoraka vina dobijenih primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca, kao i kod uzorka dobijenog primenom prisutne epifitne mikrobiote nije pokazala statistički značajne razlike u vrednostima nijanse boje. Dobijene vrednosti (0,908-0,977) ukazuju na prisustvo stabilnih crvenih pigmenata karakterističnih za mlada crvena vina (565). Sekvencijalna fermentacija nije usloвила znatne razlike u vrednostima nijanse boje. Poređenjem uzoraka vina, dobijenih primenom sojeva *P. kluyveri* K-1, *M. pulcherrima* K-5 i *H. uvarum* Š-2 u sekvencijalnoj fermentaciji, nisu zabeležene razlike u vrednosti nijanse u poređenju sa uzorcima vina dobijenih primenom čistih kultura, što ukazuje na zadržavanje crvenih pigmenata. Međutim, vina dobijena sekvencijalnom fermentacijom sa sojevima *H. uvarum* (Kr-2 i Šd-1)/*S. cerevisiae* ICV D254 pokazala su vrednosti nijanse iznad 1, što sugeriše formiranju tamnijih crvenih vina sa dubljim i intenzivnijim nijansama. Ovo se može pripisati većem udelu žutih pigmenata u odnosu na crvene, i prema literaturnim navodima potencijalno većem doprinosu flavonoida (565,566). Dobra korelacija između vrednosti intenziteta i nijanse boje vina, pri čemu veće vrednosti intenziteta boje odgovaraju nižoj vrednosti nijanse, takođe su zabeležene kod vina sorti merlo, vranac, kaberne sovinjon, game (559), pino noir i burgundac (567). Istraživanje Babincev i saradnika (559) pokazalo je da vino sorte prokupac nakon jednogodišnjeg odležavanja, imalo vrednost nijanse boje od 1,000, što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Nasuprot tome, u drugim istraživanjima utvrđene su niže vrednosti nijanse boje. U istraživanju Malićanin i saradnika (568) vina sorte prokupac dobijena od grožđa tretiranog sa različitim koncentracijama preparata *Bacillus* imala su vrednosti nijanse boje u opsegu od 0,500 do 0,568. Nešto više vrednosti nijanse boje primećene su u istraživanju Mitrović i saradnika (569), gde su vina sorte prokupac dobijena primenom vrste *S. cerevisiae* imala vrednost nijanse boje oko 0,700. Niže vrednosti nijanse boje mogu se objasniti početnim karakteristikama kljuka/šire, tehnološkim postupkom proizvodnje i uslovima čuvanja vina (554).

### 4.5.3 Hromatska struktura

Boja analiziranih uzoraka vina prokupac izražena je udelom žutih, crvenih i plavih pigmentima. Rezultati prikazani u tabeli 4.10 jasno ukazuju da je u svim uzorcima vina dominirala crvena i žuta sa manjim prisustvom plave boje. Udeo žutih pigmenata bio je oko dva, odnosno četiri puta veći u odnosu na crvene i plave pigmente, respektivno, u širi grožđa prokupac. Ovaj rezultat se može smatrati očekivanim, s obzirom na to da šira grožđa prokupac ima roze boju (255). Nezavisno od tipa, primenom analiziranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca i prirodne epifitne mikrobiote grožđa doprinos žutog pigmenta u boji dobijenih vina kretao se u opsegu od 39,16% do 43,42%, što je značajno veći doprinos u poređenju sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254. Sa druge strane, primenom komercijalnog soja dobijen je uzorak sa najvećim udelom crvenog pigmenta, dok je u uzorcima dobijenim primenom sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca i prirodne epifitne mikrobiote grožđa udeo crvenog pigmenta bio značajno niži. Najmanji udeo plavog pigmenta bio je određen u uzorku vina dobijen primenom komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254 (10,37±0,21%). U uzorcima vina dobijenim primenom ne-*Saccharomyces* kvasaca, kao i u uzorku dobijenom primenom prisutne epifitne mikrobiote udeo plavog pigmenta bio je u granicama od 14,07 do 18,45%. Dobijeni rezultati u skladu su prethodnim istraživanjima, koja su pokazala da različite vrste crvenih vina (monosortna i cuvée) od sorti grožđa merlo, vranac, prokupac, kaberne sovinjon, game, širaz, ksinomauro, limnio iz vinogradarskih regiona Kosovo i Metohija (559), Grčka (555) i Rumunija (561), dobijenih primenom različitih sojeva vrste *S. cerevisiae*, pokazuju veći doprinos crvenih pigmenata u odnosu na žute pigmente. Međutim, Poiană i saradnici (561) uočili su da postoje razlike u hromatskim karakteristikama između crvenih vina sorte kaberne sovinjon. Primetili su da vino koje je odležavalo u hrastovom buretu imalo izraženiji uticaj žutih pigmenata u odnosu na crvene pigmente. Takođe, udeo plavih pigmenata bio je veći za oko 10-30% u odnosu na vina koja nisu odležavala u hrastovom buretu. Slični rezultati dobijeni su u istraživanju Escott i saradnika (563), gde su različiti vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca (*Saccharomycodes ludwigi* i *T. delbrueckii*) u samostalnoj fermentaciji vina sorte tempranillo doprineli izraženijem uticaju žutih pigmenata u odnosu na crvene pigmente u poređenju sa vinom dobijenim primenom komercijalnog soja vrste *S. cerevisiae*. Pored toga u istim uzorcima primećen je porast plavih pigmenata. Ovo je u skladu sa primenjenim sojevima ne-*Saccharomyces* kvasaca, gde su dobijeni slični rezultati. Može se pretpostaviti da različite vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca

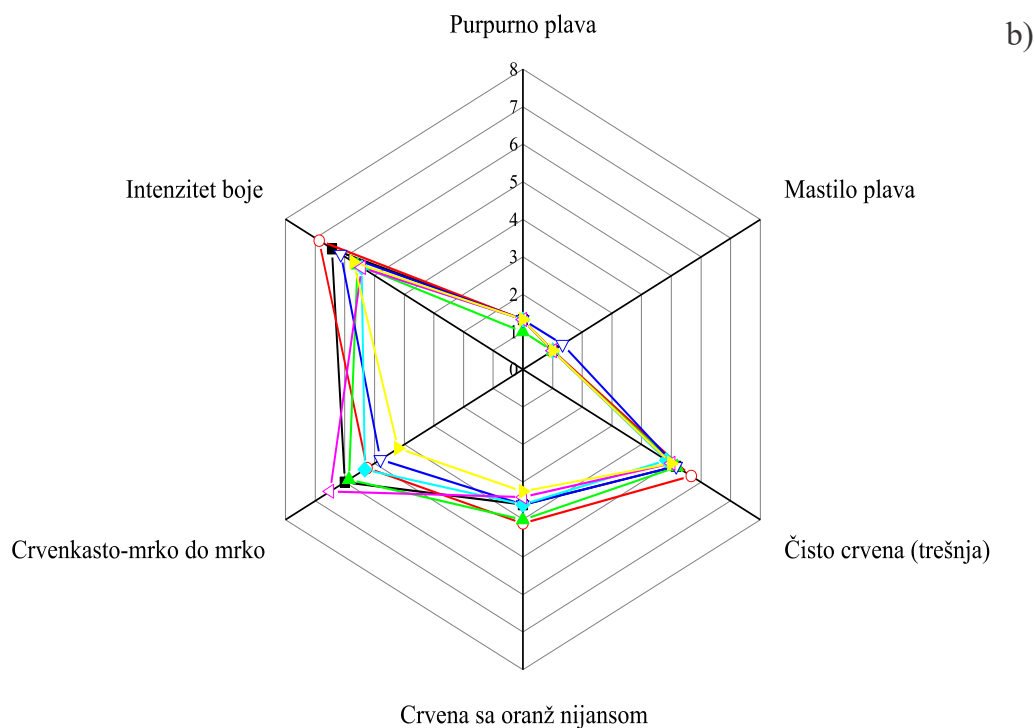
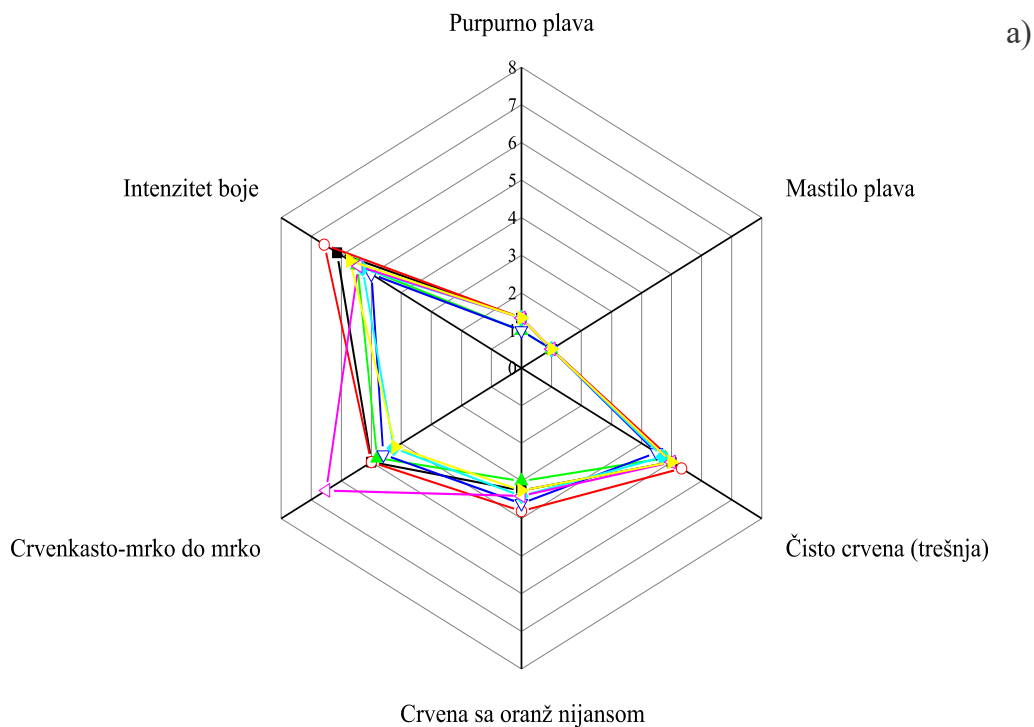
moгу doprineti hromatskim karakteristikama poput onih koji se mogu postiću odležavanjem vina u hrastovom buretu, čak i bez samog procesa odležavanja.

#### **4.6. Senzorna analiza vina sorte prokupac dobijenih u laboratorijskim uslovima**

Kako bi se procenio uticaj svakog soja ne-*Saccharomyces* kvasca na senzorni profil vina, senzorna analiza sprovedena je od strane desetočlanog Panela iskusnih senzornih ocenjivača. Pri kvantifikaciji rezultata korišćena je numerička merna skala (ocene od 1 do 10) i ocenjivački listić za senzorno ocenjivanje, koji je bio prilagođen vinima sorte prokupac. Prema ocenjivačkom listiću, senzorno ocenjivanje vina podrazumevalo je ocenu boje, mirisa/arome i ukusa vina.

##### **4.6.1. Vizuelna faza senzornog ocenjivanja**

Rezultati vizuelne faze senzornog ocenjivanja prikazani su na slici 4.10. Svi analizirani uzorci vina bili su bistri, sa karakterističnom „živom“ crvenom bojom, koja je tipična za mlada vina. Unapred definisani vizuelni opažaji za nijansu boje čiji je intenzitet ocenjivan bili su: crvena, crvena sa oranž nijansama, crveno mrka, purpurno plava i mastilo plava. Vrednost ocene za crvenu (trešnja) boju razlikovala se među uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasca, gde su veće vrednosti ocene primećene kod uzoraka vina dobijenih primenom *P. kluyveri* K-1 i *M. pulcherrima* K-5. Kod kontrolnog uzorka i uzorka vina dobijenog spontanom fermentacijom crvena boja je imala iste vrednosti ocena. Crvena boja sa oranž nijansom imala je najveću vrednost kod uzorka vina fermentisan sojem *M. pulcherrima* K-5, što potvrđuje navode da ova vrsta može ispoljiti određeni stepen pigmentacije vidljiv kroz formiranje crvenkasto obojene biomase tokom alkoholne fermentacije (15). Najveća vrednost ocene za crvenkasto mrku boju primećena je kod uzorka vina dobijenog primenom spontane fermentacije. Istovremeno, uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura *P. kluyveri* K-1 i *M. pulcherimma* K-5 se izdvajaju po većim ocenama ove boje. Takođe, ovi uzorci imali su veće ocene intenziteta obojenosti, u poređenju sa ostalim uzorcima dobijenim primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca.

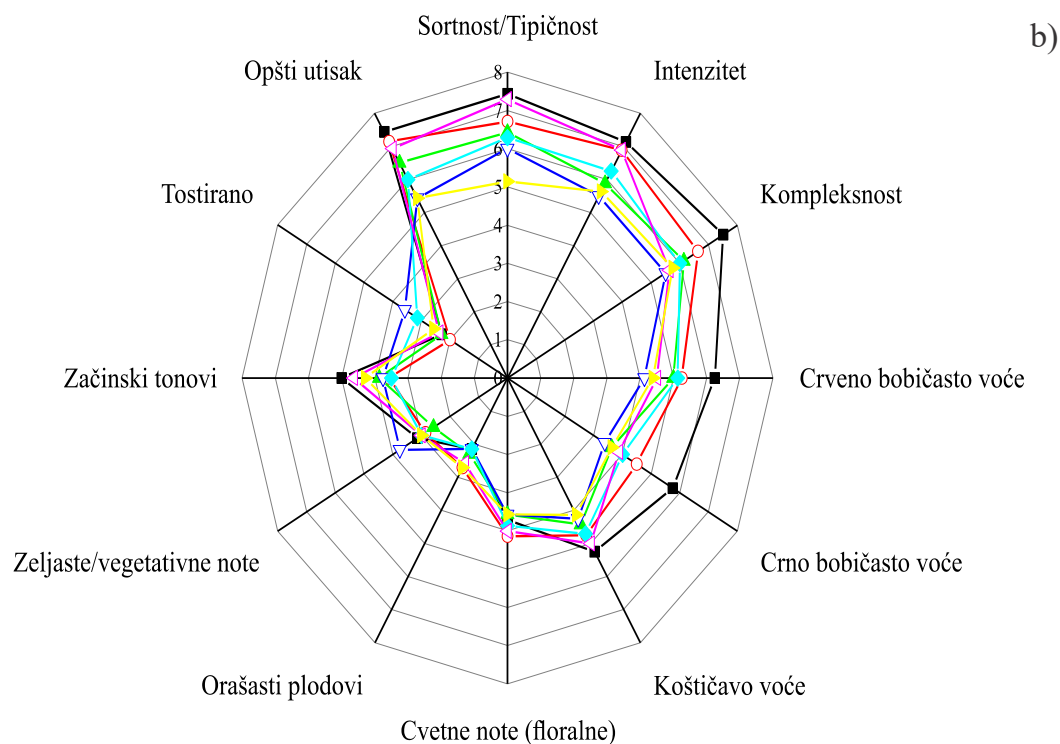
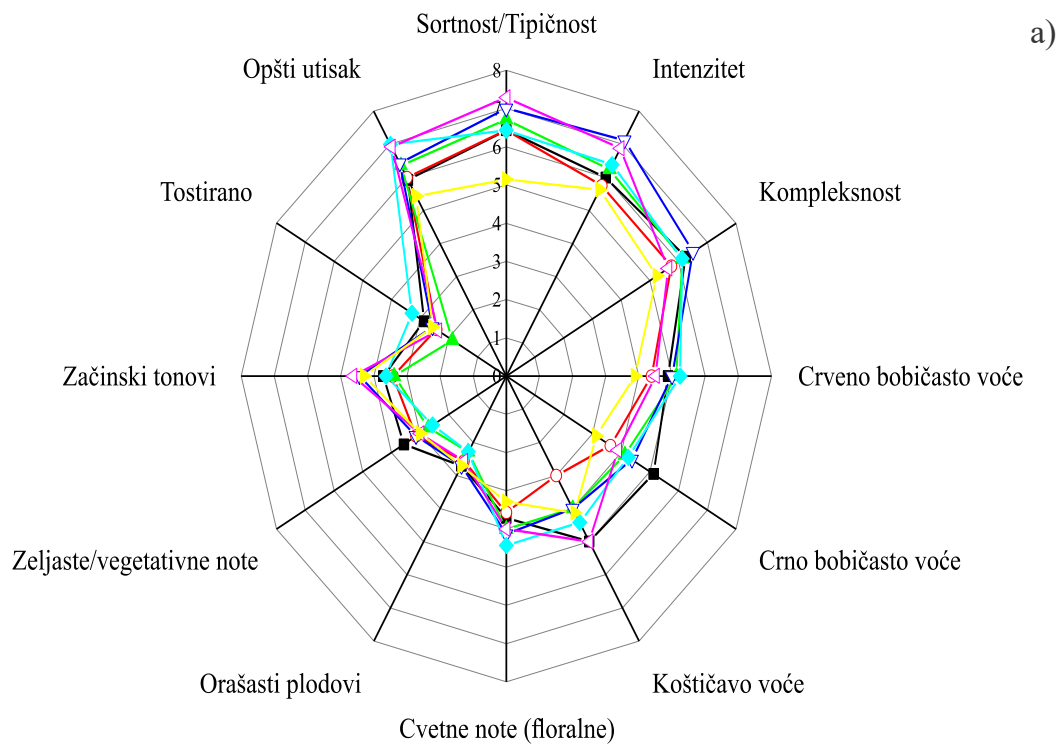


Slika 4.10 Rezultati vizuelne faze senzornog ocenjivanja uzoraka vina prokupac dobijenih primenom izolovanih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca: a) samostalna i b) sekvencijalna fermentacija (-■- *P. kluyveri* K-1, -○- *M. pucherrima* K-5, -▲- *H. uvarum* Kr-2, -▽- *H. uvarum* Šd-1, -◆- *H. uvarum* Š-2, -◁- Spontana fermentacija (epifitna mikrobiota), -▶- *S. cerevisiae* ICVD 254).

Purpurno plava i mastilo plava imale su najniže vrednosti ocena kod svih analiziranih uzoraka vina. Generalno, uzorci vina dobijeni sekvencijalnom fermentacijom imali su veće vrednosti ocena za većinu vizuelnih opažaja nijanse (crvena (trešnja), crvena sa oranaž nijansom i crveno mrka) i intenziteta boje. Istraživanje Lee i saradnika (413) pokazalo je da primena ne-*Saccharomyces* kvasaca, kao što su vrste *Candida quercitrusa*, *Candida railenensi*, *T. delbrueckii*, *H. vineae*, *H. uvarum* i *M. pulcherrima*, u proizvodnji vina, nezavisno od tipa fermentacije, generalno dovode do većih vrednosti intenziteta boje u odnosu na vrstu *S. cerevisiae*. Najverovatnije ne-*Saccharomyces* kvasci imaju niži stepen adsorpcije antocijana, što doprinosi većem sadržaju ovih pigmentata u slobodnom stanju, koji povećavaju intenzitet boje vina (562). Ovo je naročito značajno za proizvodnju vina od sorti grožđa koje nije bogato bojenim materijama, kao što je sorta prokupac (534).

### **3.6.2. Olfaktorna faza senzornog ocenjivanja**

Na slici 4.11 prikazani su rezultati olfaktorne faze senzornog ocenjivanja uzoraka vina sorte prokupac. Može se uočiti značajna razlika između intenziteta ocenjivanih mirisnih nota (olfaktornih opažaja) kod uzoraka vina dobijenih primenom različitih kvasaca i tipa fermentacije. Među primenjenim ne-*Saccharomyces* kvascima, sortnost, odnosno intenzitet, kompleksnost, kao i cvetne mirisne note najviše su bili izraženi u uzorcima vina dobijenim primenom čistih kultura *H. uvarum*, dok se uzorak vina dobijen primenom soja *P. kluyveri* K-1 izdvajao po najvišim ocenama za mirisne note opisane kao voćne i orašaste. Dokazano je da vrsta *P. kluyveri* doprinosi izraženim voćnim mirisnim tonovima, uglavnom povezanim sa aromama breskve, kruške, kajsije, citrusa i grejpfruta (403,404). Uzorci vina dobijeni primenom sekvencijalne fermentacije (*P. kluyveri* K-1/*S. cerevisiae* ICV D254 i *M. pulcherrima* K-5/*S. cerevisiae* ICV D254) izdvojili su se po većim ocenama za sortnost, intenzitet, kompleksnost, intenzitet voćnih, cvetnih i začinskih tonova što je doprinelo generalno boljem opštem senzornom profilu tih uzoraka vina. Dobijeni rezultati u skladu su sa prethodnim istraživanjima. U istraživanju Gao i saradnika (168) vrsta *P. kluyveri* tokom sekvencijalne fermentacije vina sorte kaberne sovinjon rezultirala je izraženijim mirisnim parametrima koje podsećaju na slatke, cvetne, tropske i citrusne voćne note.



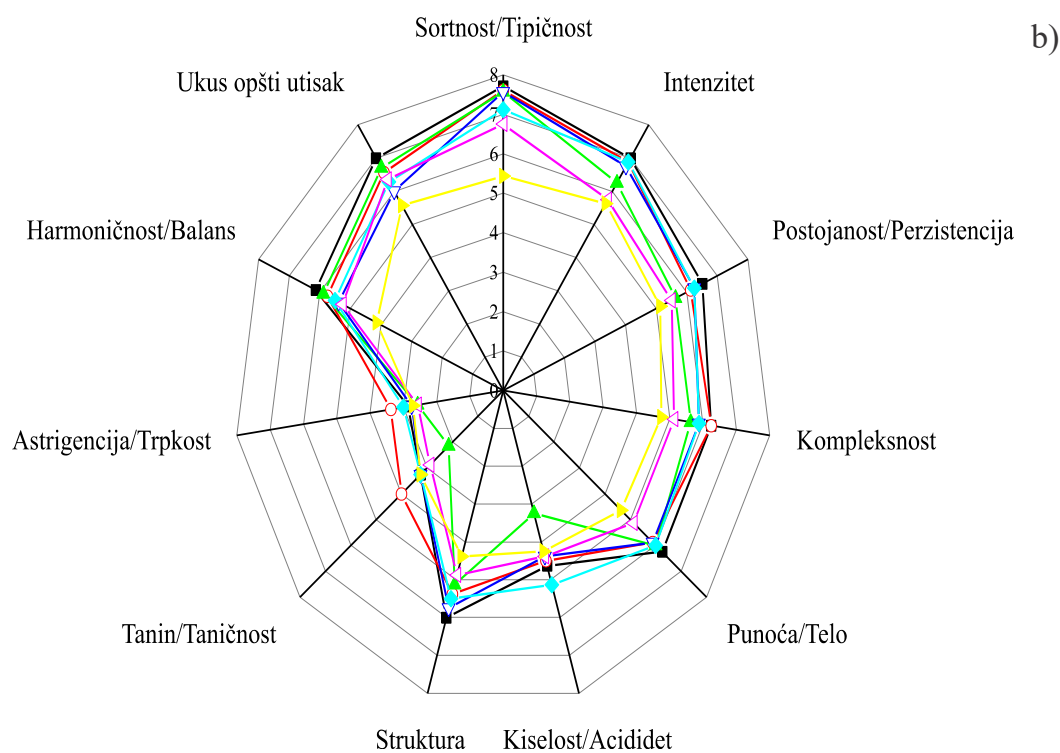
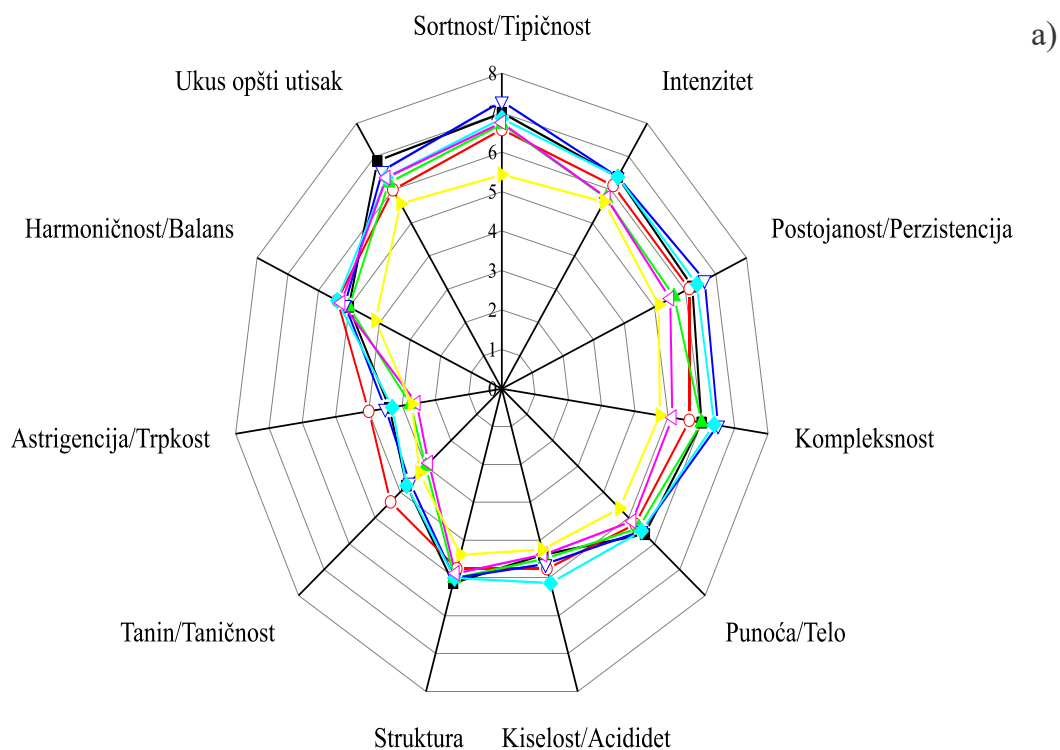
Slika 4.11 Rezultati olfaktorne faze senzornog ocenjivanja uzoraka vina prokupac dobijenih primenom izolovanih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca: a) samostalna i b) sekvencijalna fermentacija (-■- *P. kluyveri* K-1, -○- *M. pucherrima* K-5, -▲- *H. uvarum* Kr-2, -▽- *H. uvarum* Šd-1, -◆- *H. uvarum* Š-2, -◁- Spontana fermentacija (epifitna mikrobiota), -▶- *S. cerevisiae* ICVD 254).

U istraživanju Ruiz i saradnika (570) senzorna analiza je pokazala da je uzorak vina sorte verdejo, dobijen primenom sekvencijalne fermentacije vrsta *M. pulcherrima/S. cerevisiae* imao veće ocene u pogledu tipičnosti, kvaliteta i intenziteta arome. Takođe ovaj uzorak istakao se po izraženijem voćnom mirisu, kao i ukupnom opštem utisku. Ovi istraživači navode, da se ovakav rezultat može objasniti nižom koncentracijom viših alkohola zabeleženom u vinu dobijenom primenom sekvencijalne fermentacije, što može doprineti izraženijoj percepciji sortnih aroma (570). Takođe, Puškaš i saradnici (308) dokazali su da je vrsta *M. pulcherrima* tokom sekvencijalne fermentacije vina sorte sila, sa različitim vrstama kvasaca roda *Saccharomyces*, doprinela izraženijim voćnim aromama. Uzorke vina dobijene sekvencijalnom fermentacijom primenom sojeva *H. uvarum/S. cerevisiae* karakterišu manje vrednosti ocena za sortnost (do 14% manje), intenzitet (do 23% manje), kompleksnost (do 15% manje), arome crvenog i crnog bobičasto voće (do 17% i 22% manje, respektivno), cvetne note (do 14% manje) i orašaste tonove (do 21% manje), uz istovremeno veće vrednosti za koštičavo voće (do 10% više), u odnosu na vina dobijena primenom čistih kultura *H. uvarum*. Iako su većina parametara u olfaktornoj fazi senzornog ocenjivanja vina imala niže ocene, prisutnost izraženijih aroma koštičavog voća doprinelo je formiranju povoljnih senzornih karakteristika. Dobijeni rezultati su u skladu sa istraživanjem Testa i saradnika (571), gde je senzorna analiza pokazala da primena vrste *H. uvarum* u sekvencijalnoj fermentaciji kljuka sorte aglianico rezultira vinom sa prijatnim karakteristikama. Parametri ocenjivani u okviru olfaktornog dela senzorne analize opisani kao mirisne note vegetativno/zeljasto i tostirano imale su niže ocene kod većine uzoraka dobijenih primenom sekvencijalne fermentacije. Kontrolni uzorak imao je znatno niže vrednosti ocena za intenzitet i kompleksnost mirisa u poređenju sa uzorcima dobijenim primenom ne-*Saccharomyces* kvasaca. U istraživanju Karabegović i saradnika (256), koji su ispitivali senzorni profil komercijalno dostupnih vina sorte prokupac, utvrdili su da se ova vina karakterišu sa izraženim voćnim (koštičavo i bobičasto voće), džemastim i začinskim mirinskim tonovima, uz manji doprinos cvetnih nota. Većina uzoraka vina prokupac imala je srednju ocenu opšteg utiska (na osnovu olfaktornog dela senzorne analize) preko 6, što ukazuje da se ova vina sorte prokupac mogu smatrati vinima sa izraženim aromatskim senzornim karakteristikama. U poređenju sa tim rezultatima, većina analiziranih uzoraka vina sorte prokupac imala su veće vrednosti za sortnost, što naglašava da ne-*Saccharomyces* kvasci mogu da doprinesu izraženijem sortnom karakteru vina sorte prokupac. Ostali parametri u okviru olfaktorne senzorne

analize (intenzitet, kompleksnost, bobičasto voće, koštičavo voće, orašasti plodovi, cvetne i biljne note, začinski tonovi i opšti utisak) imali su slične vrednosti ocena.

### **3.6.3. Gustativna faza senzornog ocenjivanja**

Rezultati gustativne faze senzornog ocenjivanja prikazani su na slici 4.12. Uzorci vina dobijeni primenom čistih kultura *P. kluyveri* K-1 i *H. uvarum* Šd-1 i Š-2 dobili su najveće ocene za sortnost, u poređenju sa ostalim analiziranim uzorcima vina, što ukazuje da ove vrste kvasaca mogu naglasiti tipične sorte karakteristike vina sorte prokupac. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima analize isparljivih aromatskih jedinjenja, pri čemu se soj *P. kluyveri* K-1 tokom samostalne fermentacije istakao po većem sadržaju ukupnih terpenskih jedinjenja, dok je soj *H. uvarum* Šd-1 imao najveći doprinos  $C_{13}$  – norizoprenoida. Navedene grupe jedinjenja, zajedno sa tiolnim i karotenoidnim jedinjenjima doprinose izražavanju sortnih karakteristika vina (572). Istovremeno, isti uzorci vina imali su veće ocene ostalih parametara ocenjivanih u okviru gustativne faze senzorne analize, kao što su intenzitet, postojanost, kompleksnost, punoća i struktura naglašavajući da određene vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca mogu povećati intenzitet gustativnih opažaja, dajući joj kompleksniji i bogatiji profil uz bolju postojanost. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima koji navode da vrsta *P. kluyveri* može doprineti oslobađanju različitih aromatskih jedinjenja iz nearomatskih prekursora dejstvom enzima  $\beta$ -liaze, pri čemu je ovaj efekat uslovljen varjabilnošću sojeva (404). Takođe, dokazano je da vrsta *H. uvarum* svojom  $\beta$ -glukozidaznom aktivnošću može doprineti povećanju isparljivih terpenskih jedinjenja i  $C_{13}$  – norizoprenoida (571,573). Većina uzoraka dobijena primenom čistih kultura ne-*Saccharomyces* kvasaca imali su veće ocene za kiselost, u poređenju sa uzorcima dobijenim primenom sekvencijalne fermentacije. Primena komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254 u sekvencijalnoj fermentaciji pozitivno je uticala na punoću, strukturu i harmoničnost ukusa. Uzorci vina imali su u proseku za oko 6-20% veće ocene za ove karakteristike, sa istovremeno nižim vrednostima ocena za taniničnost i trpkost (do 30%). U pogledu opšteg utiska ocenjivanog u gustativnoj fazi senzorne analize uzorci vina dobijeni primenom soja *P. kluyveri* K-1, kod oba tipa fermentacije, izdvojili su se po većim ocenama, u odnosu na ostale analizirane uzorke vina.



Slika 4.12 Rezultati gustativne faze senzornog ocenjivanja uzoraka vina prokupac dobijenih primenom izolovanih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca: a) samostalna i b) sekvencijalna fermentacija (-■- *P. kluyveri* K-1, -○- *M. pucherrima* K-5, -▲- *H. uvarum* Kr-2, -▽- *H. uvarum* Šd-1, -◆- *H. uvarum* Š-2, -◁- Spontana fermentacija (epifitna mikrobiota), -▶- *S. cerevisiae* ICVD 254).

U poređenju sa rezultatima u istraživanju Karabegović i saradnika (256), većina analiziranih uzoraka vina sorte prokupac, bez obzira na primenjeni soj kvasca i fermentacioni protokol, imala su veće vrednosti ocena za sortnost, u poređenju sa komercijalnim vinima sorte prokupac. Većina ostalih parametara u okviru gustativne faze senzornog ocenjivanja (postojanost, kompleksnost, punoća, taniničnost, harmoničnost i opšti utisak) imala su slične vrednosti ocena u poređenju sa komercijalnim vinima sorte prokupac. Dobijeni rezultati ukazuju da primena određene vrste ne-*Saccharomyces* kvasaca i tip fermentacije mogu značajno uticati na gustativne karakteristike vina, čime se otvara mogućnost za unapređenje tehnoloških procesa u proizvodnji vina.

#### 4.7. Vinifikacija u pilot i poluindustrijskim uslovima

Sumiranjem prethodnih rezultata, bazirano većinski na kvalitetu, aromatskim i senzornim karakteristikama uzoraka vina dobijenim vinifikacijama u laboratorijskim uslovima, soj *P. kluyveri* K-1 je odabran za dalja istraživanja. Ovakav odabir zasnovan je prvenstveno na većim vrednostima ocena u okviru olfaktorne i gustativne faze senzornog ocenjivanja, posebno intenziviranja sortnog karaktera, intenziteta i kompleksnosti voćnih (bobičasto i koštičavo voće) i začinskih mirisnih nota, uz bolju postojanost arome i punoću ukusa. Sem toga, ovaj uzorak jasno se izdvajao od ostalih po većim koncentracijama pojedinih estera (etil laktat, etil 3-hidroksibutirat, etil 2-hidroksiizovalerat i izoamil acetata), viših alkohola (1-pentanol, 2,3-butandiol, 3-etoksi propanol, 1-heptanol, etil heksanol i benzil alkohol) i isparljivih masnih kiselina (izovalerična i geranska kiselina), koji su doprineli formiranju aromatskog profila vina sa izrazitim voćnim i začinskim mirisnim notama. Takođe, soj *P. kluyveri* K-1 doprineo je povećanju sadržaja fenolnih (eugenol), terpenskih (linalol oksid i geraniol) i laktonskih jedinjenja ( $\gamma$ -butirolakton), čime je značajno doprineo naglašavanju sortnog karaktera i povećanju kompleksnosti aromatskog profila vina. U mikrovinifikaciji pasterizovane šire soj *P. kluyveri* K-1 odlikovao se nižom proizvodnjom sirćetne kiseline, izraženoj sposobnosti proizvodnje glicerola i umerenoj proizvodnji etanola, što ga čini pogodnom starter kulturom u proizvodnji vina. Na osnovu fermentativnih karakteristika imao je dobru temperaturnu tolerantnost, izraženu rezistenciju na SO<sub>2</sub> (300 mg/L) i sposobnost proizvodnje voćnih aroma izraženog intenziteta, što predstavlja odlične polazne enološke karakteristike. Sem toga, primenom u laboratorijskim uslovima, primenom soja *P. kluyveri* K-1 dobijeno je vino sa optimalnim kiselinskim profilom,

sadržajem glicerola iznad 8 g/L i manjim sadržajem etanola za oko 7% u odnosu na kontrolni uzorak.

Nakon vinifikacije u laboratorijskim uslovima i odabira soja *P. kluyveri* K-1, kao kvasca sa najboljim karakteristikama za dalja istraživanja, vinifikacija je realizovana u pilot i poluindustrijskim uslovima tokom dve uzastopne godine. U prvoj godini sproveden je proces na pilot nivou (90 L), nakon čega je u drugoj godini realizovan prelazak na poluindustrijski obim proizvodnje (2000 L).

#### ***4.7.1. Fizičko-hemijska analiza uzoraka vina dobijenih u vinifikaciji na pilot i poluindustrijskom nivou***

Standardna fizičko-hemijska analiza uzoraka vina sorte prokupac, proizvedenim primenom sojeva *P. kluyveri* K-1 i *S. cerevisiae* ICV D254, u pilot i poluindustrijskim uslovima, pokazala je statistički značajne razlike u sadržaju alkohola, ukupnog ekstrakta i ekstrakta bez šećera, redukujućih šećera, sadržaja ukupnih kiselina i sadržaju SO<sub>2</sub> (tabela 4.11).

Sadržaj alkohola u uzorcima vina dobijenim primenom soja *P. kluyveri* K-1 iznosio je 11,76±0,12% vol. (pilot uslovi) i 12,62±0,13% vol. (poluindustrijski uslovi), što je za 8,70% i 6,93%, respektivno, niže u odnosu na sadržaj alkohola u uzorcima vina dobijenim primenom komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254 (tabela 4.11). Sličan procenat smanjenja sadržaja alkohola (6,70%) bio je zabeležen i u laboratorijskim uslovima, što ukazuje da soj *P. kluyveri* K-1 zadržava sličan metabolitički profil u uslovima povećanih razmera proizvodnje vina sorte prokupac. Prema tome, primena soja *P. kluyveri* K-1 tokom alkoholne fermentacije vina može se smatrati dobrom strategijom za smanjenje sadržaja alkohola, što potvrđuje njegov tehnološki potencijal u procesu vinifikacije.

U uzorcima vina dobijenim primenom soja *P. kluyveri* K-1, u pilot i poluindustrijskim uslovima sadržaj redukujućih šećera iznosio je 1,66±0,02 g/L i 2,10±0,02 g/L respektivno, što je za 6%, odnosno 15,23% više u poređenju sa uzorcima vina fermentisanim komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254. Međutim, bez obzira na uočene razlike u sadržaju redukujućih šećera, prema Pravilniku o kvalitetu i drugim zahtevima za vino (382) sva analizirana vina svrstavaju se u grupu suvih vina, jer sadržaj redukujućih šećera nije prelazio 4,00 g/L. Imajući u vidu rezultate enološke

karakterizacije i mikroviniifikacije, prema kojima je soj *P. kluyveri* K-1 pokazao vijabilnost ćelija od oko 45% pri koncentraciji etanola od 7% vol. i potrošio oko 65% ukupnog sadržaja šećera u pasterizovanoj širi, može se zaključiti da nije bio u stanju da u potpunosti sprovede alkoholnu fermentaciju u kljuku grožđa. S obzirom na to da je sadržaj redukujućih šećera u analiziranim uzorcima bio ispod 4 g/L, pretpostavlja se da su u kljuku grožđa sorte prokupac verovatno bili prisutni autohtoni sojevi vrste *S. cerevisiae* koji su doveli alkoholnu fermentaciju do kraja.

Statistička analiza pokazala je da su između uzoraka vina dobijenim primenom soja *P. kluyveri* K-1 i komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254 postojale statistički značajne razlike u vrednostima ukupnog ekstrakta i ekstrakta bez šećera, kako u fermentacijama sprovedenim u pilot uslovima, tako i u poluindustrijskim uslovima. Uzorci vina dobijeni primenom soja *P. kluyveri* K-1 imali su sadržaj ukupnog ekstrakta od  $23,70 \pm 0,24$  g/L u fermentaciji sprovedenoj u pilot postrojenju, odnosno  $27,60 \pm 0,23$  g/L u poluindustrijskim uslovima, dok je sadržaj ekstrakta bez šećera iznosio  $23,04 \pm 0,23$  g/L i  $26,50 \pm 0,22$  g/L, respektivno. Nezavisno od vinifikacionih uslova, vina dobijena primenom ovog soja ne-*Saccharomyces* kvasca imala su za oko 5% veći sadržaj ovih paramatara, u odnosu na vina fermentisana komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254. Sadržaj ukupnog ekstrakta i ekstrakta bez šećera u svim uzorcima vina bio je u rasponu od 20 do 30 g/L, što je tipično za laka crvena vina (574), kakva su tradicionalno vina sorte prokupac.

Uzorci vina dobijeni u pilot uslovima pokazali su statistički značajnu razliku u sadržaju ukupne kiselosti ( $p < 0,001$ ). Sadržaj ukupnih kiselina u uzorku vina dobijenom primenom soja *P. kluyveri* K-1 iznosio je  $6,00 \pm 0,16$  g/L, što je za oko 15% više u poređenju sa uzorkom vina fermentisanom komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254. Nasuprot tome, u poluindustrijskim uslovima primećene su niže vrednosti sadržaja ukupnih kiselina, koje se statistički nisu značajno razlikovale u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Slične vrednosti sadržaja ukupnih kiselina primećene su i u laboratorijskim uslovima, što sugerise da vinifikacioni uslovi ne utiču značajno na ovaj parametar. Vina dobijena primenom soja *P. kluyveri* K-1, nezavisno od vinifikacionih uslova, imala su značajno smanjen sadržaj isparljivih kiselina (do 25%) u poređenju sa vinima dobijenim primenom komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254. Poređenje sa laboratorijskim uslovima, gde je sadržaj ovih kiselina iznosio  $0,69 \pm 0,01$  g/L (uzorak vina dobijen primenom čiste kulture *P. kluyveri* K-1), ukazuje da se pri vinifikacionim uslovima u pilot i poluindustrijskim uslovima dobijaju vina sa znatno manjim sadržajem isparljivih kiselina. Dobijeni rezultati ukazuju da soj *P. kluyveri* K-1 poseduje enološke karakteristike koje omogućavaju dobijanje vina sa optimalnim sadržajem

ispraljivih kiselina u fermentacijama većeg obima, čime se potvrđuje potencijal ovog soja za proizvodnju vina na industrijskom nivou.

U poređenju sa laboratorijskim uslovima, vina dobijena u pilot i poluindustrijskom postrojenju pokazala su znatno veći sadržaj ukupnog SO<sub>2</sub> koji se kretao u širokom opsegu od 53,00 do 85,00 mg/L. Prema Pravilniku o kvalitetu i drugim zahtevima za vino (382) kod crvenih vina sa sadržajem redukujućih šećera do 4 g/L, granica ukupnog SO<sub>2</sub> iznosi 150 mg/L, što je 2-3 puta manja kod analiziranih uzoraka vina sorte prokupac. Ovo potvrđuje da primena soja *P. kluyveri* K-1 u vinifikacionim uslovima većih razmera ne ugrožava zakonski definisane parametre kvaliteta vina.

Tabela 4.11 Fizičko-hemijska analiza vina sorte prokupac dobijena u pilot i poluindustrijskim uslovima

Ispitivani parametri	Vinifikacija u pilot uslovima			Vinifikacija u poluindustrijskim uslovima		
	<i>P. kluyveri</i> K-1	<i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>p</i> vrednost*	<i>P. kluyveri</i> K-1	<i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>p</i> vrednost*
Relativna gustina 20/20°C	0,995±0,010	0,992±0,010	0,747	0,994±0,010	0,994±0,010	0,926
Sadržaj alkohola, % vol.	11,76±0,12	12,88±0,13	< 0,001	12,62±0,13	13,56±0,14	< 0,001
Ukupni ekstrakt, g/L	23,70±0,24	22,70±0,23	0,006	27,60±0,23	26,15±0,26	0,003
Redukujući šećeri, g/L	1,66±0,02	1,56±0,02	0,002	2,10±0,02	1,78±0,02	< 0,001
Ekstrakt bez šećera, g/L	23,04±0,23	22,14±0,22	0,008	26,50±0,22	25,31±0,25	0,005
Sadržaj ukupnih kiselina, g/L	6,00±0,06	5,17±0,05	< 0,001	5,04±0,05	5,15±0,05	0,057
Sadržaj isparljivih kiselina, g/L	0,48±0,00	0,60±0,00	< 0,001	0,49±0,00	0,66±0,01	< 0,001
Ukupni SO <sub>2</sub> , mg/L	58,00±0,58	53,00±0,53	< 0,001	79,00±0,53	85,00±0,85	< 0,001
Slobodni SO <sub>2</sub> , mg/L	32,00±0,32	25,00±0,25	< 0,001	15,00±0,25	20,00±0,20	< 0,001
pH vrednost	3,36±0,03	3,58±0,04	0,001	3,68±0,04	3,62±0,04	0,114

\* *p* – vrednost dobijena na osnovu Student-ovog testa sa nivoom značajnosti *p* < 0,05.

#### 4.7.2. Hemijski sastav uzoraka vina dobijenih u vinifikaciji na pilot i poluindustrijskom nivou

Sadržaj organskih kiselina predstavlja bitan pokazatelj kvaliteta i stabilnosti vina. Uobičajna podela organskih kiselina jeste na one koje se prirodno nalaze u grožđu (vinska, jabučna i limunska kiselina) i one koje nastaju prvenstveno tokom procesa alkoholne fermentacije vina (ćilibarna, mlečna i sirćetna kiselina) (575). Sadržaj organskih kiselina u uzorcima vina dobijenim primenom sojeva *P. kluyveri* K-1 i *S. cerevisiae* ICV D254 pri vinifikaciji u pilot i poluindustrijskim uslovima prikazan je u tabeli 4.12.

Bez obzira na vinifikacioni protokol i godinu berbe, vrednosti vinske i jabučne kiseline među analiziranim uzorcima vina sorte prokupac, bile su relativno stabilne i kretale su se u opsegu od 2,93 do 3,27 g/L i od 0,91 do 1,05 g/L, respektivno.

Tabela 4.12 Sadržaj organskih kiselina, glicerola, redukujućih šećera (g/L) i etanola (% vol.) u uzorcima vina sorte prokupac dobijenih u pilot i poluindustrijskim uslovima

Ispitivani parametri	Vinifikacija u pilot uslovima			Vinifikacija u poluindustrijskim uslovima		
	<i>P. kluyveri</i> K-1	<i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>p</i> vrednost*	<i>P. kluyveri</i> K-1	<i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>p</i> vrednost*
Vinska kiselina, g/L	3,12±0,05	3,20±0,04	0,084	2,93±0,03	3,27±0,04	< 0,001
Jabučna kiselina, g/L	1,05±0,04	0,96±0,05	0,056	0,91±0,02	0,97±0,02	0,008
Limunska kiselina, g/L	0,07±0,00	0,08±0,00	0,002	0,07±0,00	0,09±0,00	< 0,001
Mlečna kiselina, g/L	1,17±0,02	0,95±0,05	0,002	1,04±0,03	0,91±0,02	0,004
Ćilibarna kiselina, g/L	0,69±0,01	0,69±0,01	0,537	0,75±0,02	0,64±0,01	< 0,001
Sirćetna kiselina, g/L	0,46±0,01	0,51±0,01	0,006	0,45±0,01	0,48±0,01	0,005
Glukoza, g/L	2,13±0,01	1,85±0,02	< 0,001	0,42±0,01	0,70±0,01	< 0,001
Fruktoza, g/L	0,97±0,00	0,84±0,01	< 0,001	0,77±0,02	0,81±0,02	0,038
Glicerol, g/L	8,12±0,04	7,02±0,09	< 0,001	8,60±0,39	7,43±0,25	0,012
Etanol, %vol.	11,77±0,11	13,11±0,13	< 0,001	12,35±0,39	13,53±0,35	0,018

\* *p* – vrednost dobijena na osnovu Student-ovog testa sa nivoom značajnosti  $p < 0,05$ .

Statistička analiza pokazala je značajne razlike u sadržaju sirćetne kiseline. Uzorci vina dobijeni primenom soja *P. kluyveri* K-1, bez obzira na obim vinifikacionog procesa, imali su do 10% manju

koncentraciju sirćetne kiseline u poređenju sa vinima fermentisanim komercijalnom vrstom kvasca *S. cerevisiae*. Sadržaj mlečne kiseline razlikovao se među analiziranim uzorcima vina, pri čemu su kod oba vinifikaciona protokola (pilot i poluindustrijski uslovi) utvrđene statistički značajne razlike. U oba načina proizvodnje, uzorci vina dobijeni primenom soja *P. kluyveri* K-1 imali su veće koncentracije mlečne kiseline u poređenju sa vinima fermentisanim komercijalnom vrstom kvasca, za 18,80% i 12,50%, respektivno. Statistički značajna razlika u koncentraciji ćilibarne kiseline primećena je kod uzoraka vina dobijenih u poluindustrijskim uslovima. Pri ovim uslovima, soj *P. kluyveri* K-1 doprineo je za 15% većem sadržaju ćilibarne kiseline u odnosu na komercijalni soj *S. cerevisiae* ICV D254. Nezavisno od vinifikacionih protokola (laboratorijski, pilot i poluindustrijski uslovi), soj *P. kluyveri* K-1 doprineo je formiranju povoljnog odnosa organskih kiselina u vinima sorte prokupac, pri čemu su njihove koncentracije bile u skladu sa literaturnim vrednostima koje se uobičajno nalaze u različitim vrstama vina (575). Ovo potvrđuje da primenjen soj *P. kluyveri* K-1, bez obzira na veličinu razmera proizvodnje vina, poseduje enološke osobine koje omogućavaju formiranje optimalnog kiselinskog profila, koji obezbeđuje harmoniju ukusa, izraženu svežinu i stabilnost vina tokom čuvanja (408).

Osim što doprinosi optimalnom kiselinskom profilu, vina dobijena primenom soja *P. kluyveri* K-1 imaju oko 15% viši sadržaj glicerola u odnosu na vina fermentisana komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254, nezavisno od vinifikacionog protokola (tabela 4.12). Ova osobina se potvrdila kao karakteristika izolovanog soja, budući da su njenu konzistentnost potvrdili eksperimenti izvedeni u različitim razmerama procesa – od mikrovinifikacije pasterizovane šire i laboratorijske vinifikacije kljuka do pilot- i poluindustrijskih uslova.

#### ***4.7.3. GC/MS analiza uzoraka vina dobijenih u vinifikaciji na pilot i poluindustrijskom nivou***

Sastav i doprinos aromatskih jedinjenja u uzorcima vina dobijenim u pilot i poluindustrijskim uslovima prikazani su u tabeli 4.13 i tabeli 4.14. Tabela 4.13 sadrži identifikovana isparljiva aromatska jedinjenja i njihove koncentracije, dok tabela 4.14 prikazuje vrednosti mirsne aktivnosti (OAV) i relativnog olfaktornog doprinosa (ROC) pojedinih aromatskih jedinjenja koja su bila ključna za formiranje aromatskog profila vina sorte prokupac.

Tabela 4.13 Kvalitativna i kvantitativna analiza isparaljivih aromatskih jedinjenja (mg/L) u vinima sorte prokupac dobijenih u pilot i poluindustrijskim uslovima

Naziv jedinjenja	Vinifikacija u pilot uslovima			Vinifikacija u poluindustrijskim uslovima		
	<i>P. kluyveri</i> K-1	<i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>p</i> vrednost*	<i>P. kluyveri</i> K-1	<i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>p</i> vrednost*
<b>Viši alkoholi</b>						
Butil alkohol	0,21±0,00	0,05±0,00	< 0,001	0,27±0,02	0,03±0,00	< 0,001
1-Metoksi-2-propanol	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,04±0,00	0,00±0,00	< 0,001
3-Metil-1-butanol	23,08±0,25	26,71±0,44	< 0,001	28,07±0,56	30,74±0,61	< 0,001
1-Pentanol	0,25±0,01	0,20±0,00	< 0,001	0,27±0,00	0,22±0,01	< 0,001
2,3-Butandiol	7,22±0,21	3,78±0,10	< 0,001	5,37±0,11	3,98±0,08	< 0,001
3-Etoksi propanol	0,65±0,01	0,05±0,00	< 0,001	0,71±0,00	0,07±0,00	< 0,001
3-Metil-1-pentanol	0,04±0,00	0,01±0,00	< 0,001	0,07±0,00	0,07±0,00	0,260
3-Heksanol	0,14±0,00	0,05±0,00	< 0,001	0,21±0,02	0,09±0,00	< 0,001
Furfuril alkohol	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,31±0,01	0,02±0,00	< 0,001
1-Heksanol	1,14±0,02	0,52±0,01	< 0,001	1,22±0,02	0,51±0,00	< 0,001
1-Heptanol	0,30±0,00	0,02±0,00	< 0,001	0,33±0,01	0,03±0,00	< 0,001
2-Oktanol (IS)	0,92±0,18	1,42±0,07	-	0,91±0,16	1,00±0,07	-
Etil heksanol	0,01±0,00	0,00±0,00	< 0,001	0,03±0,00	0,00±0,00	< 0,001
Benzil alkohol	1,41±0,00	0,26±0,01	< 0,001	1,52±0,01	0,27±0,00	< 0,001
2-Feniletil alkohol	23,47±0,07	3,47±0,02	< 0,001	29,39±0,31	4,35±0,30	< 0,001
Tirosol	0,84±0,03	0,26±0,01	< 0,001	1,33±0,03	0,29±0,02	< 0,001
Triptofol	3,71±0,01	0,34±0,01	< 0,001	4,06±0,01	0,36±0,00	< 0,001
Σ	63,39	37,14		74,11	42,03	
<b>Etil estri</b>						
Etil propanoat	0,10±0,00	0,00±0,00	< 0,001	0,13±0,00	0,02±0,00	< 0,001
Etil butirat	0,02±0,00	0,04±0,00	< 0,001	0,07±0,00	0,13±0,00	< 0,001
Etil piruvat	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,02±0,00	0,00±0,00	< 0,001
Etil laktat	9,22±0,05	4,85±0,03	< 0,001	12,59±0,05	5,27±0,03	< 0,001
Etil 2-hidroksibutirat	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,01±0,00	0,00±0,00	< 0,001
Etil 3-hidroksibutirat	0,26±0,02	0,10±0,00	< 0,001	0,42±0,00	0,12±0,00	< 0,001
Butil laktat	0,07±0,02	0,00±0,00	0,004	0,19±0,00	0,00±0,00	< 0,001
Etil heksanoat	0,12±0,00	0,34±0,00	< 0,001	0,21±0,00	0,31±0,01	< 0,001
Etil 2-hidroksi-4-metilpentanoat	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,08±0,00	0,00±0,00	< 0,001
Izoamil laktat	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,39±0,01	0,00±0,00	< 0,001
2-Metilbutil heksanoat	0,10±0,00	0,00±0,00	< 0,001	0,00±0,00	0,00±0,00	-
Dietil sukcinat	0,22±0,00	0,72±0,00	< 0,001	0,38±0,01	0,80±0,02	< 0,001
Etil oktanoat	0,51±0,21	0,45±0,01	0,652	0,65±0,01	0,50±0,01	< 0,001
Monoetil sukcinat	2,31±0,18	1,08±0,08	< 0,001	4,99±0,10	1,81±0,04	< 0,001
Dietil malat	0,12±0,00	0,08±0,00	< 0,001	0,11±0,00	0,18±0,00	< 0,001
Etil nonanoat	0,21±0,00	0,08±0,00	< 0,001	0,00±0,00	0,00±0,00	

Butil-etil-sukcinat	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,10±0,00	0,00±0,00	< 0,001
Dietil 2-hidroksi-3-metilsukcinat	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,24±0,00	0,00±0,00	< 0,001
Etil kaprat Etil 3-metilbutil-sukcinat	0,22±0,01	0,15±0,00	< 0,001	0,38±0,01	0,16±0,00	< 0,001
Etil vanilat	0,12±0,02	0,03±0,00	0,002	0,14±0,00	0,03±0,00	< 0,001
Etil dodekanoat Etil 4-hidroksicinamat	0,41±0,01	0,10±0,00	< 0,001	0,64±0,00	0,09±0,00	< 0,001
Etil heksadekanoat	0,38±0,01	0,34±0,01	0,002	0,00±0,00	0,00±0,00	-
Metil oleat	0,52±0,01	0,00±0,00	< 0,001	0,87±0,02	0,00±0,00	< 0,001
Metil stearat	0,04±0,00	0,00±0,00	< 0,001	0,03±0,00	0,01±0,00	< 0,001
Etil linoleat	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,00±0,00	0,01±0,00	< 0,001
Etil oleat	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,00±0,00	0,03±0,00	< 0,001
Etil oktadekanoat	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,04±0,00	0,05±0,00	< 0,001
Σ	0,01±0,00	0,01±0,00	1,000	0,02±0,00	0,04±0,00	< 0,001
	14,96	8,37		22,70	9,57	
<b>Acetatni estri</b>						
Izoamil acetat	0,39±0,00	0,04±0,00	< 0,001	0,43±0,01	0,08±0,01	< 0,001
2-Feniletil acetat	0,42±0,01	0,14±0,00	< 0,001	0,43±0,04	0,13±0,01	< 0,001
Σ	0,81	0,18		0,86	0,21	
<b>Ispaljive masne kiseline</b>						
Izovalerična kiselina	0,06±0,00	0,00±0,00	< 0,001	0,06±0,00	0,08±0,00	< 0,001
2-Metil butanska kiselina	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,00±0,00	0,09±0,00	< 0,001
Dekanska kiselina	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,00±0,00	0,31±0,01	< 0,001
Heksadekanska kiselina	0,08±0,00	0,07±0,00	0,001	0,13±0,00	0,09±0,00	< 0,001
Σ	0,14	0,07		0,19	0,57	
<b>Jedinjenja sumpora</b>						
3-(Metiltio)-1-propanol	0,25±0,00	0,11±0,00	< 0,001	0,39±0,10	0,10±0,01	< 0,001
Σ	0,25	0,11		0,39	0,10	
<b>Fenolna jedinjenja</b>						
4-Etilfenol	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,42±0,01	0,00±0,00	< 0,001
Antiarol	0,00±0,00	0,00±0,00	-	0,09±0,00	0,05±0,00	< 0,001
Acetovanilon	0,68±0,00	0,01±0,00	< 0,001	0,73±0,00	0,03±0,00	< 0,001
Σ	0,68	0,01		1,24	0,08	
<b>Terpenska jedinjenja</b>						
Limonen	0,32±0,01	0,28±0,01	< 0,001	0,38±0,00	0,27±0,01	< 0,001
Linalol oksid	0,07±0,00	0,00±0,00	< 0,001	0,08±0,00	0,00±0,00	< 0,001
Σ	0,39	0,28		0,46	0,27	

<i>C<sub>13</sub>-norizoprenoidi</i>						
3-hidroksi-β-damaskon	0,04±0,00	0,00±0,00	< 0,001	0,04±0,00	0,01±0,00	< 0,001
Σ	0,04	0,00		0,04	0,01	
<i>Laktonska jedinjenja</i>						
γ-Butirolakton	1,07±0,01	0,95±0,01	< 0,001	1,47±0,03	1,10±0,02	< 0,001
4-(karboetoksi)-γ-butirolakton	0,44±0,00	0,46±0,01	0,014	0,65±0,01	0,49±0,01	< 0,001
Σ	1,51	1,41		2,12	1,59	

\* *p* – vrednost dobijena na osnovu Student-ovog testa sa nivoom značajnosti *p* < 0,05.

U poređenju sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254, odabrani soj *P. kluyveri* K-1, u oba fermentaciona protokola, dao je vina sa skoro duplo većom ukupnom koncentracijom viših alkohola. U tim uzorcima vina, sadržaj 2-feniletil alkohola, 1-heptanola, 3-etoksi propanola i triptofola bio je za oko 90% veći u odnosu na kontrolne uzorke. Pored toga, koncentracije benzil i butil alkohola, kao i tirosola bile su za oko 80% veće u uzorcima vina dobijenim primenom soja *P. kluyveri* K-1. Takođe, primenom soja *P. kluyveri* K-1, u pilot i poluindustrijskim uslovima dobijeno je vino sa preko 50% većim sadržajem 1-heksanola i 3-heksanola u poređenju sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254 (tabela 4.13).

Koncentracija ukupnih etil estra u uzorcima vina dobijenim primenom soja *P. kluyveri* K-1 iznosila je 14,96 mg/L u pilot uslovima, odnosno 22,70 mg/L u poluindustrijskim uslovima. U oba slučaja, koncentracije ukupnih etil estra bile su znatno veće u odnosu na kontrolne uzorke. Među jedinjenjima iz ove grupe, u uzorcima vina dobijenim primenom soja *P. kluyveri* K-1, etil laktat se izdvaja kao najzastupljenije jedinjenje, pri čemu je njegov sadržaj bio za 50% (pilot uslovi), odnosno 58% (poluindustrijski uslovi) veći u poređenju sa kontrolnim uzorcima (tabela 4.13). Za razliku od komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254, primenom soja *P. kluyveri* K-1 dobijeno je vino sa duplo većom količinom monoetil sukcinata, nezavisno od povećanja razmere proizvodnje vina. Pored toga, u ovim uzorcima detektovana je veća koncentracija etil 3-hidroksibutirata, butil laktata, dietil malata, etil kaprata i etil vanilata. Sadržaj acetatnih estra (izoamil acetat i 2-feniletil acetat) bio je skoro deset puta veći kod uzoraka vina dobijenih primenom soja *P. kluyveri* K-1. Sa druge strane, nezavisno od vinifikacionih protokola, odabrani soj pokazao je slabu sposobnost sinteze isparljivih masnih kiselina u odnosu na komercijalni soj *S. cerevisiae* ICV D254 (tabela 4.13).

Acetovanilon je bio najzastupljenije jedinjenje iz grupe fenolnih jedinjenja u analiziranim uzorcima vina, pri čemu je soj *P. kluyveri* K-1 proizveo znatno veću količinu, i to do 60 puta veću, u odnosu na komercijalni soj *S. cerevisiae* ICV D254. Pored toga, soj *P. kluyveri* K-1 u proizvodnji vina na poluindustrijskom nivou doprineo je povećanju sadržaja 4-etilfenola i antiarola, za razliku od komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254.

Limonen i linalol oksid predstavljali su grupu terpenskih jedinjenja u analiziranim uzorcima vina (tabela 4.13). U svim uzorcima vina bio je kvantifikovan sadržaj limonena, pri čemu je primećeno da je soj *P. kluyveri* K-1 doprineo za 12,50% (pilot uslovi), odnosno za 30% (poluindustrijski uslovi) većem sadržaju ovog jedinjenja, u poređenju sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae* ICV D254. Takođe, soj *P. kluyveri* K-1 doprineo je povećanju sadržaja linalol oksida, pri čemu su utvrđene slične koncentracije u analiziranim uzorcima vina (oko 0,08 mg/L), nezavisno od vinifikacionih protokola, dok u kontrolnim uzorcima nije detektovano njegovo prisustvo.

3-Hidroksi- $\beta$ -damaskon je bio jedini predstavnik iz grupe C<sub>13</sub>-norizoprenoida u analiziranim vinima. Primenom soja *P. kluyveri* K-1 vina dobijena u oba vinifikaciona protokola imala su 3-hidroksi- $\beta$ -damaskon u koncentraciji od 0,04 mg/L, za razliku od primene komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254, gde je ovo jedinjenje bilo prisutno samo u vinu dobijenom u poluindustrijskim uslovima (0,01 mg/L).

U uzorcima vina dobijenim primenom soja *P. kluyveri* K-1 sadržaj  $\gamma$ -butirolaktona bio je za 11% (pilot uslovi), odnosno za 25% veći (poluindustrijski uslovi), u odnosu na kontrolne uzorke (tabela 4.13). Koncentracija 4-(karbetoksi)- $\gamma$ -butirolaktona u uzorcima vina dobijenim u pilot uslovima nije se značajno razlikovala, dok je pri poluindustrijskim uslovima, sadržaj ovog jedinjenja u uzorku vina dobijenom primenom soja *P. kluyveri* K-1 bio za 25% veći u odnosu na kontrolni uzorak (tabela 4.13).

Grupa etil estra imala je dominantnu ulogu u formiranju aromatskog profila analiziranih uzoraka vina. Iz ove grupe, etil oktanoat se izdvojio kao najvažniji predstavnik sa najvećim relativnim doprinosom u ukupnom aromatskom profilu (tabela 4.14). Kod uzoraka vina dobijenih primenom komercijalnog soja *S. cerevisiae* ICV D254, nezavisno od povećanja obima proizvodnje, doprinos ovog jedinjenja u aromatskom profilu iznosio je oko 65%, što predstavlja približno 1,5 puta veći doprinos u poređenju sa uzorcima vina dobijenih primenom soja *P. kluyveri* K-1. Pored etil oktanoata, formiranju aromatskog profila analiziranih uzoraka vina doprineli su jos i etil propanoat, etil butirat, etil 3-hidroksibutirat i etil kaprat. Slična zapažanja bila su i u vinima

dobijenim u laboratorijskim uslovima, te se može zaključiti da prelazak na vinifikacione protokole većih razmera na utiče značajno na sastav i doprinos etil estra u formiranju aromatskog profila vina sorte prokupac. Pored etil estra, grupa acetatnih estra, odnosno izoamil acetat i 2-feniletil acetat doprineli su obogaćivanju aromatskog profila vina. U uzorcima vina dobijenim primenom soja *P. kluyveri* K-1 doprinos ovih jedinjenja bio je za 2,5-4,5 puta veći u odnosu na kontrolne uzorke. Takođe, u poređenju sa laboratorijskim uslovima proizvodnje, vinifikacije većih razmera proizvodnje, doprinele su za 20-30% većem udelu izoamil acetata i 80-85% većem udelu 2-feniletil acetata u oblikovanju aromatskog profila vina sorte prokupac.

Druga grupa isparljivih aromatskih jedinjenja koja je imala bitan uticaj na formiranje aromatskog profila bila je grupa viših alkohola. Ova grupa jedinjenja imala je oko 40% relativnog doprinosa u ukupnom aromatskom profilu kod uzoraka vina dobijenih primenom soja *P. kluyveri* K-1, što je za oko 60% više u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Iz ove grupe po najvećim OAV i ROC vrednostima izdvaja se 1-heptanol, koji je imao preko 20% udela u formiranju aromatskog profila kod uzoraka vina dobijenih primenom soja *P. kluyveri* K-1 (tabela 4.14). U odnosu na ovo jedinjenje, 2-feniletil alkohol i tirosol imali su znatno manji doprinos aromatskom profilu, pri čemu je njihov udeo u formiranju ukupnog aromatskog profila u vinima dobijenim primenom soja *P. kluyveri* K-1 bio u opsegu od 3,80 do 5,20%, nezavisno od vinifikacionih protokola (pilot i poluindustrijski uslovi) (tabela 4.14), ali su ove vrednosti bile su za 2-3 puta veće u poređenju sa kontrolnim uzorcima. Sa druge strane, kod kontrolnih uzoraka uočen je veći doprinos 3-metil-1-butanola, čiji je udeo u formiranju aromatskog profila iznosio oko 7,75%, što je skoro duplo više u poređenju sa uzorcima vina dobijenim primenom odabranog soja. Pored ovih jedinjenja, doprinos u formiranju aromatskog profila vina pružili su i benzil alkohol, 1-heksanol, 1-heptanol, 3-etoksi propanol i butil alkohol. Primenom soja *P. kluyveri* K-1 pri većim razmerama proizvodnje detektovana su ista jedinjenja iz grupe viših alkohola kao i u laboratorijskim uslovima, samo je njihov relativan doprinos aromatskom profilu bio za 20-40% veći. U poređenju sa kontrolnim uzorcima, u vinima dobijenim primenom soja *P. kluyveri* K-1 uočen je za 30-40 puta veći doprinos fenolnih jedinjenja (acetovanilon i 4-etilfenol) ukupnom aromatskom profilu. Različiti vinifikacioni protokoli i godine berbe pokazali su da su uzorci vina dobijeni u pilot i poluindustrijskim uslovima imali veći doprinos terpenskih jedinjenja na aromatski profil vina. Pri ovim vinifikacionim uslovima, soj *P. kluyveri* K-1 doprineo je povećanju sadržaja limonena, pri čemu je njegov udeo u formiranju aromatskog profila vina iznosio oko 5%. Pored toga, pri većim

razmerama proizvodnje vina, soj *P. kluyveri* K-1 doprineo je i većem relativnom doprinosu laktonskih jedinjenja, pri čemu su udeli  $\gamma$ -butirolaktona i 4-karbeteski- $\gamma$ -butirolaktona u formiranju aromatskog profila bili veći do 30%, odnosno do 65%, respektivno, u odnosu na vino dobijeno u laboratorijskim uslovima.

Tabela 4.14 Vrednosti mirisne aktivnosti (OAV) i relativnog olfaktornog doprinosa (ROC) aromatskih jedinjenja u vinima sorte prokupac dobijenih u pilot i poluindustrijskim uslovima

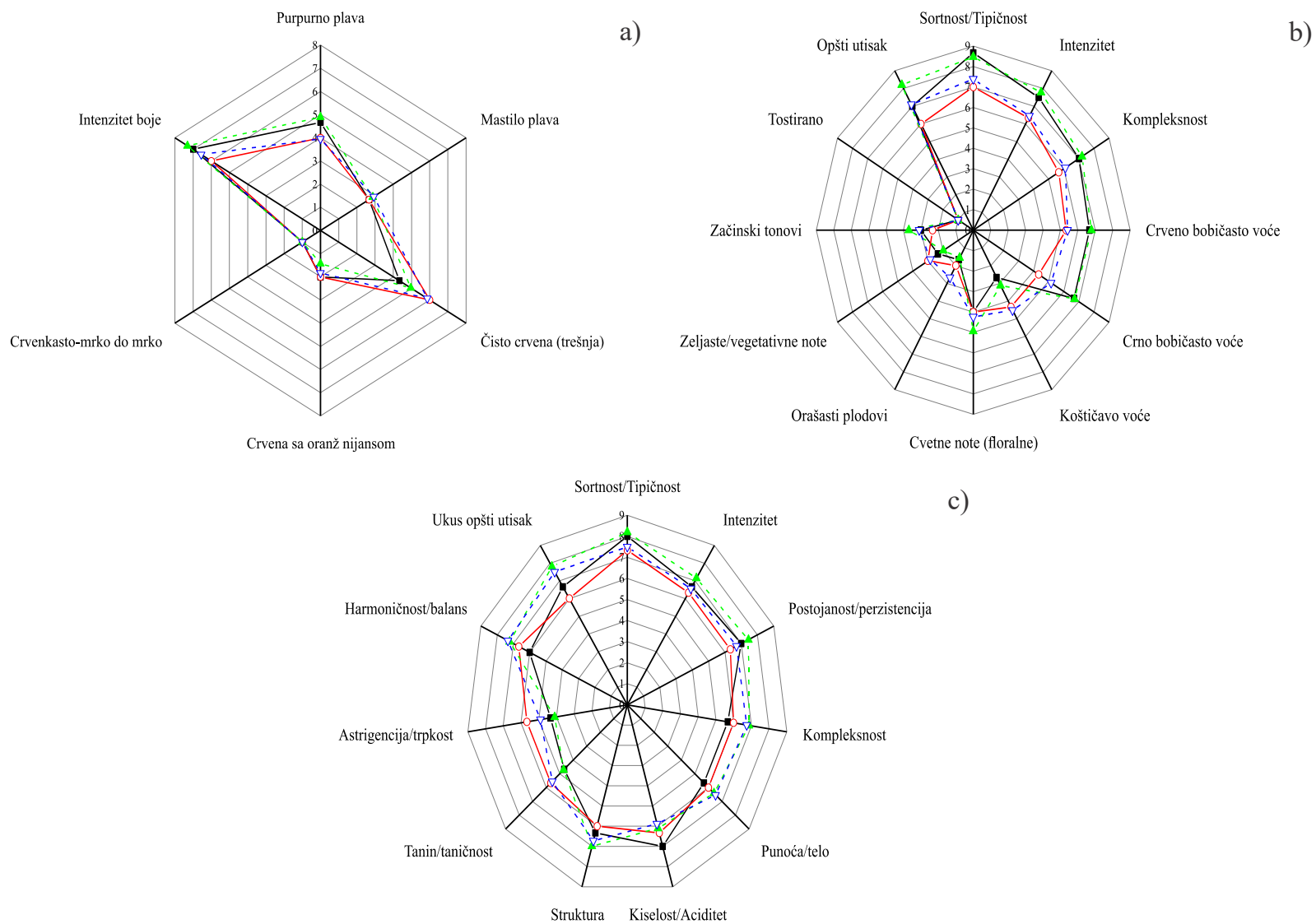
Naziv jedinjenje	Vinifikacija u pilot uslovima				Vinifikacija u poluindustrijskim uslovima			
	<i>P. kluyveri</i> K-1		<i>S. cerevisiae</i> ICV D254		<i>P. kluyveri</i> K-1		<i>S. cerevisiae</i> ICV D254	
	OAV	ROC	OAV	ROC	OAV	ROC	OAV	ROC
Butil alkohol	1,40	0,23	0,33	0,10	1,80	0,23	0,20	0,05
3-Metil-1-butanol	23,08	3,74	26,71	7,77	28,07	3,63	30,74	7,75
3-Etoksi propanol	6,50	1,05	0,50	0,15	7,10	0,92	0,70	0,18
1-Heksanol	10,36	1,68	4,73	1,37	11,09	1,43	4,64	1,17
1-Heptanol	150,00	24,30	10,00	2,91	165,00	21,33	15,00	3,78
Benzil alkohol	14,10	2,28	2,60	0,76	15,20	1,96	2,70	0,68
2-Feniletil alkohol	23,47	3,80	3,47	1,01	29,39	3,80	4,35	1,10
Tirosol	25,45	4,12	7,88	2,29	40,30	5,21	8,79	2,22
Etil propanoat	10,00	1,62	0,00	0,00	13,00	1,68	2,00	0,50
Etil butirat	1,00	0,16	2,00	0,58	3,50	0,45	6,50	1,64
Etil 3-hidroksibutirat	2,00	0,32	0,77	0,22	3,23	0,42	0,92	0,23
Etil oktanoat	255,00	41,31	225,00	65,44	325,00	42,04	250,00	63,04
Etil kaprat	2,20	0,36	1,50	0,44	3,80	0,49	1,60	0,40
Izoamil acetat	13,00	2,11	1,33	0,39	14,33	1,85	2,67	0,67
2-Feniletil acetat	1,68	0,27	0,56	0,16	1,72	0,22	0,52	0,13
Izovalerična kiselina	1,82	0,29	0,00	0,00	1,82	0,24	2,42	0,61
2-Metil butanska kiselina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,73	0,69
4-Etilfenol	0,00	0,00	0,00	0,00	14,00	1,81	0,00	0,00
Acetovanilon	9,71	1,57	0,14	0,04	10,43	1,35	0,43	0,11
Limonen	32,00	5,18	28,00	8,14	38,00	4,91	27,00	6,81
Linalol oksid	2,80	0,45	0,00	0,00	3,20	0,41	0,00	0,00
$\gamma$ -Butirolakton	30,57	4,95	27,14	7,89	42,00	5,43	31,43	7,93
4-Karbeteski- $\gamma$ -butirolakton	1,10	0,18	1,15	0,33	1,63	0,21	1,23	0,31

#### ***4.7.4. Senzorna analiza uzoraka vina dobijenih u vinifikaciji na pilot i poluindustrijskom nivou***

Rezultati senzorne analize vina sorte prokupac dobijenim u većim razmerama proizvodnje, koji obuhvataju vizuelnu, olfaktornu i gustativnu fazu senzornog ocenjivanja, prikazani su na slici 4.13. Uticaj soja *P. kluyveri* K-1 primenjenog u proizvodnji vina sorte prokupac u pilot i poluindustrijskim uslovima analiziran je i dodatno ispitan kroz senzornu analizu. Rezultati vizuelne faze senzornog ocenjivanja pokazali su da je soj *P. kluyveri* K-1 u vinifikacionim protokolima većih razmera doprineo poboljšanju intenziteta boje vina za 10-15% u poređenju sa kontrolnim uzorcima (slika 4.13 a).

U okviru olfaktorne faze senzornog ocenjivanja, vina dobijena primenom soja *P. kluyveri* K-1, imala su veće vrednosti ocena za sortnost, intenzitet, kompleksnost, crveno i crno bobičasto voće, kao i cvetne note i začinske tonove. Sa druge strane, isti uzorci dobili su nešto niže vrednosti ocena za koštičavo voće, orašaste plodove i zeljaste/vegetativne note, u poređenju sa kontrolnim uzorcima (slika 4.13 b). U poređenju sa laboratorijskim uslovima, vinifikacioni protokoli većih razmera (pilot i poluindustrijski uslovi) doveli su do boljih rezultata u okviru olfaktorne faze senzornog ocenjivanja. Parametri kao što su sortnost, intenzitet, kompleksnost, voćne arome (crveno i crno bobičasto voće) i cvetne note bili su u proseku do 30% više izraženi kod ovih uzoraka vina, u odnosu na laboratorijske uslove, što je doprinelo boljem opštem senzornom profilu vina sorte prokupac. Pored toga, proizvodnja vina u većem obimu doprinela je smanjenju zeljastih/vegetativnih i tostiranih aroma. Poređenjem opšteg utiska u okviru ove faze senzornog ocenjiva i vinifikacionih protokola, uzorak vina dobijen primenom soja *P. kluyveri* K-1 u poluindustrijskim uslovima izdvajao se po najvećoj vrednosti ocene opšteg utiska (iznad 8,00).

Gustativna faza senzorne analize pokazala je da proizvodnja vina sorte prokupac, primenom soja *P. kluyveri* K-1 kao starter kulture, pri većim razmerama proizvodnje doprinela boljim vrednostima ocena za sortnost, intenzitet, postojanost, strukturu i opštem utisku. Za navedene parametre, ovi uzorci imali su za do 10% veće vrednosti ocena u odnosu na kontrolne uzorke (slika 4.13 c). Takođe, u okviru ove faze, primećeno je da soj *P. kluyveri* K-1 daje vina sa optimalnom kiselošću. Pored toga, poređenjem sa laboratorijskim uslovima, vinifikacije većih razmera doprinele su izraženoj sortnosti, intenzitetu, punoći ukusa, povoljnoj kiselosti, jačom taninskom strukturom i boljoj harmoničnosti ukusa vina sorte prokupac.



Slika 4.13 Rezultati vizuelne (a), olfaktorne (b) i gustativne (c) faze senzornog ocenjivanja uzoraka vina prokupac dobijenim u pilot (-■- *P. kluveri* K-1 i -○- *S. cerevisiae* ICV D254) i poluindustrijskim (--▲-- *P. kluveri* K-1 i --▽-- *S. cerevisiae* ICV D254) uslovima vinifikacije.

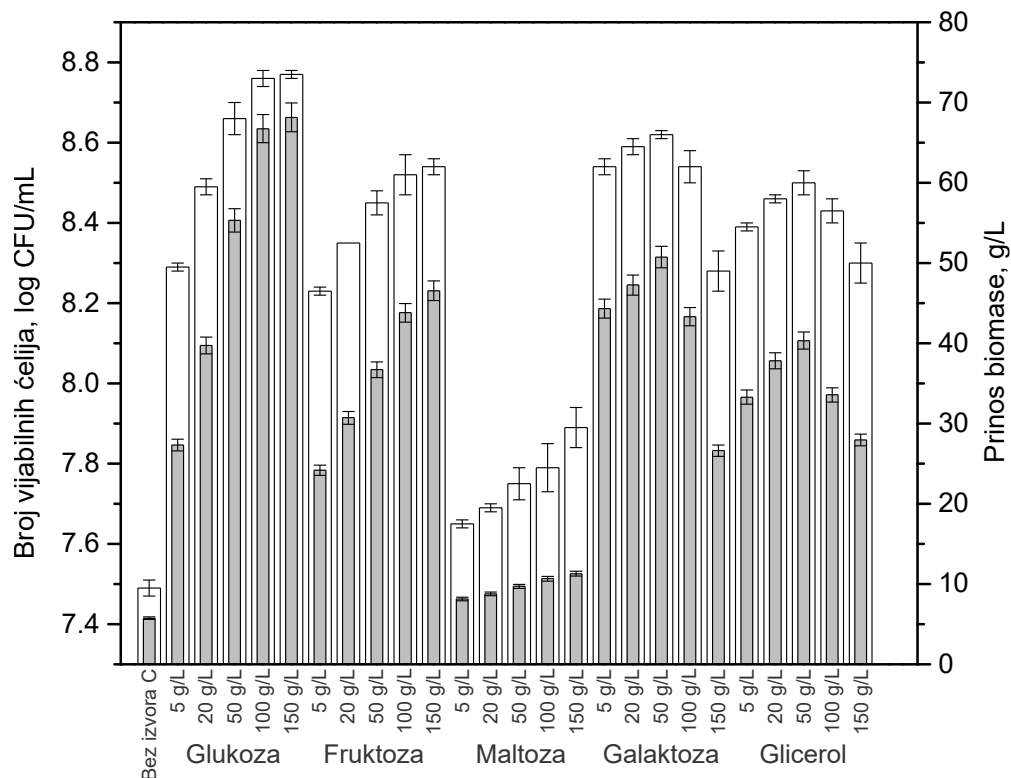
## 4.8. Optimizacija uslova kultivacije soja *P. kluyveri* K-1

Za industrijsku vinifikaciju potrebno je obezbediti veću količinu inokuluma odabranog soja kvasca (*P. kluyveri* K-1), što zahteva optimizaciju uslova kultivacije radi postizanja maksimalnog prinosa biomase uz očuvanje što većeg broja vijabilnih ćelija. Iz tog razloga, sprovedena su istraživanja (eksperimenti) radi formulisanja sastava hranljive podloge i procesnih uslova, koji najbolje pogoduju ćelijskom rastu soja *P. kluyveri* K-1.

### 4.8.1. Odabir izvora ugljenika

Izvor ugljenika je primarni izvor energije za rast mikroorganizama i služi kao ugljenični skelet za brojna jedinjenja u metabolizmu mikrobnih ćelija. Različite vrste mikroorganizama zahtevaju drugačije koncentracije i izvore ugljenika za rast i metaboličke aktivnosti (576). Za mikrobnu kultivaciju često se koristi jedan izvor ugljenika, iz razloga što metabolizam mikroorganizama značajno varira kada se u hranljivoj podlozi nalazi više izvora ugljenika, jer različiti hranljivi sastojci interaguju na složene načine unutar metaboličkih puteva (577). Prema tome, važno je odabrati odgovarajući izvor ugljenika i njegovu optimalnu početnu koncentraciju za svaku vrstu mikroorganizama. Shodno tome, primenom jednofaktorske metode testirana je mogućnost korišćenja glukoze, fruktoze, maltoze, galaktoze i glicerola kao izvora ugljenika, kao i njihova procena na ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da svi korišćeni izvori ugljenika omogućavaju ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1, ali daju različite rezultate za vijabilan broj ćelija i prinos biomase (slika 4.14). Glukoza predstavlja najefikasniji izvor ugljenika za ćelijski rast. Maksimalan broj vijabilnih ćelija ( $8,77 \pm 0,11 \log \text{CFU/mL}$ ) i prinos biomase ( $68,15 \pm 1,80 \text{ g/L}$ ) postignuti su pri koncentraciji glukoze od 150 g/L. Smanjenjem koncentracije glukoze rezultiralo je značajno manjim brojem vijabilnih ćelija i prinosa biomase soja *P. kluyveri* K-1. Ovakav trend jasno ukazuje na pozitivan korelacioni odnos između koncentracije glukoze i ćelijskog rasta soja *P. kluyveri* K-1.



Slika 4.14 Uticaj različitih izvora i koncentracije izvora ugljenika na broj vijabilnih ćelija (beli stubovi) i prinos biomase (sivi stubovi) soja *P. kluyveri* K-1

Pri korišćenju fruktoze kao izvora ugljenika uočena je ista zavisnost, odnosno da povećanje koncentracije ima pozitivan uticaj na praćene veličine (broj vijabilnih ćelija i prinos biomase). Pri koncentraciji fruktoze od 150 g/L postignut je maksimalni broj vijabilnih ćelija i prinos biomase ( $8,54 \pm 0,02$  log CFU/mL i  $46,55 \pm 1,23$  g/L, respektivno). Međutim, u poređenju sa rezultatima dobijenim u eksperimentima sa glukozom, pri korišćenju fruktoze vijabilnost ćelija je bila za oko 40% manja, dok je prinos biomase bio manji za više od 30%. Ovi rezultati ukazuju na to da, iako fruktoza može biti adekvatan izvor ugljenika, ona nije toliko efikasna za ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1 kao glukoza. Ovakvi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala da vrsta *P. kluyveri* pokazuje bolji afinitet prema glukozu, u odnosu na fruktozu (333,578,579). Međutim, iako su ranija istraživanja dokazala da vrsta *P. kluyveri* pokazuje sklonost ka potrošnji glukoze i da u medijumu sa različitim vrstama šećera može ostaviti fruktozu nefermentisanu (404), druga istraživanja su pokazala da vrsta *P. kluyveri* poseduje sposobnost asimilacije fruktoze kao jedinog izvora ugljenika (272,580). Ovo ukazuje da, iako vrsta *P. kluyveri* prvenstveno koristi glukozu, ona zadržava metaboličku fleksibilnost neophodnu za asimilaciju

fruktoze u odsustvu glukoze. Maltoza je bila najmanje efikasan izvor ugljenika za ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1 u poređenju sa drugim korišćenim izvorima ugljenika. U medijumu, koji je sadržao maltozu u koncentraciji od 150 g/L postignut je broj vijabilnih ćelija od  $7,89 \pm 0,05$  log CFU/mL i prinos biomase od  $11,29 \pm 0,30$  g/L, što je približno 90% i 84%, respektivno, niže od rezultata postignutih u eksperimentu sa glukozom pri istoj koncentraciji. Ovi rezultati jasno pokazuju da iako postoji ćelijski rast u medijumu sa maltozom, ona nije pogodan izvor ugljenika za ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1. Kako je poznato da vrsta *P. kluyveri* nije efikasna u korišćenju maltoze, neka istraživanja su pokazala da pod određenim uslovima, posebno u odsustvu drugih izvora ugljenika, ova vrsta kvasca može asimilovati maltozu do određene mere (272,581), što je u skladu sa dobijenim rezultatima. Uopšteno, za ćelijski rast monosaharidni izvor ugljenika je pogodniji od disaharidnog izvora, jer je direktno dostupan za reakcije u okviru metaboličkih puteva (582). Sa druge strane, povećanje koncentracije galaktoze i glicerola do 50 g/L podstaklo je ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1. Dalje povećanje koncentracije tih izvora ugljenika negativno je uticalo na praćene veličine (slika 4.14). Za oba ova izvora ugljenika, najviše vrednosti za broj vijabilnih ćelija i prinos biomase dobijene su pri koncentraciji od 50 g/L, dok su veće koncentracije smanjile vrednosti praćenih veličina za 10%. Veće koncentracije glicerola inhibiraju ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1 verovatno zbog povećanja osmotskog pritiska medijuma, što dovodi do povećanog osmotskog stresa za ćeliju i posledično inhibicije rasta kvasaca (583–585). Slično tome, istraživanja sa ćelijama različitih sojeva *S. cerevisiae* ukazuju na činjenicu da veći nivo dostupnog supstrata, u ovom slučaju galaktoze, može zahtevati veću aktivnost enzima, što dodatno opterećuje ćeliju i vodi smanjenju brzine rasta (586). Dobijeni rezultati pružaju jasne smernice za dalju optimizaciju uslova kultivacije soja *P. kluyveri* K-1, pri čemu glukoza predstavlja najefikasniji izvor ugljenika. U cilju ekonomičnosti procesa, za dalji rad odabrana je koncentracija glukoze od 50 g/L, iako je broj vijabilnih ćelija i prinos suve biomase bio oko 20% manji, u odnosu na vrednosti dobijenih za dva i tri puta veću koncentraciju glukoze. Izbor niže koncentracije glukoze značajno smanjuje ukupne troškove (do 245% manje, na osnovu proračuna troškova po gramu), što je u kontekstu ekonomičnosti od krucijalne važnosti u *scale-up* procesu i industrijskoj proizvodnji.

#### 4.8.2. Definisanje značajnih faktora koji utiču na ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1

PB dizajn je korišćen u cilju ispitivanja uticaja procesnih faktora (temperatura, brzina mešanja) i komponenti hranljive podloge (ekstrakt kvasca,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , riboflavin, biotin,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  i  $CaCl_2$ ) na praćene veličine (broj vijabilnih ćelija i prinos biomase). Analizirani faktori odabrani su na osnovu literaturnih podataka pri čemu brzina mešanja doprinosi rastu kvasaca obezbeđujući homogenost medijuma, olakšavajući pristup hranljivim materijama, poboljšavajući prenos mase i toplote, održavajući stabilne fizičko-hemijske uslove i omogućavajući efikasno rastvaranje i disperziju kiseonika kroz medijum (587,588). Pepton i ekstrakt kvasca poboljšavaju rast kvasaca obogaćivanjem medijuma esencijalnim hranljivim materijama poput aminokiselina, vitamina, nukleotida, polipeptida i minerala stvarajući optimalne uslove za ćelijski rast (589–591). Soli kao što su  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  i  $CaCl_2$  doprinose ćelijskom rastu kvasaca kroz regulaciju metaboličkih aktivnosti, aktiviranjem ključnih enzima i učestvovanju u procesima deobe i pupljenja ćelija, kao i sinteze biomase (592–595).  $(NH_4)_2SO_4$  predstavlja lako iskoristive izvore azota i sumpora neophodne za biosintetske procese (596), dok  $KH_2PO_4$  doprinosi regulaciji unutrašnjeg pH i održavanju homeostaze (597,598). Riboflavin ima ulogu u redoks reakcijama unutar Krebsovog ciklusa i  $\beta$ -oksidacije, čime poboljšava vijabilnost ćelija kvasaca (599), dok biotin povećava brzinu rasta kvasaca (598). Odabrani faktori su varirani na dva nivoa u okviru 12 eksperimenata (Tabela P3.1) sa ciljem identifikacije najznačajnijih komponenti hranljive podloge i procesnih uslova za proizvodnju biomase, sa posebnim osvrtom na vijabilnost ćelija soja *P. kluyveri* K-1.

Na osnovu rezultata, formulisane su jednačine za predviđanje broja vijabilnih ćelija ( $Y_1$ ) i prinosa biomase ( $Y_2$ ) soja *P. kluyveri* K-1.

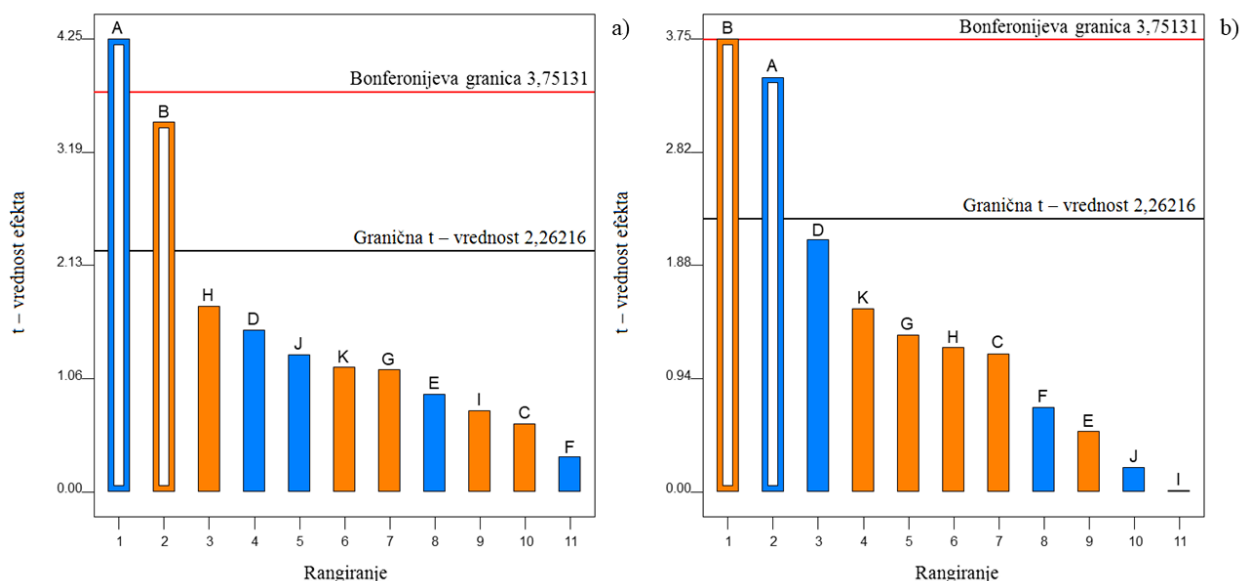
$$Y_1, \log \text{CFU/mL} = 7,77 - 0,43 \cdot A + 0,31 \cdot B + 0,06 \cdot C - 0,14 \cdot D - 0,09 \cdot E - 0,03 \cdot F + 0,11 \cdot G + 0,16 \cdot H + 0,07 \cdot I - 0,12 \cdot J + 0,13 \cdot K$$
$$Y_2, \text{g/L} = 18,22 - 12,61 \cdot A + 11,64 \cdot B + 4,12 \cdot C - 7,52 \cdot D + 2,04 \cdot E - 2,51 \cdot F + 4,68 \cdot G + 4,31 \cdot H + 0,03 \cdot I - 0,72 \cdot J + 6,19 \cdot K$$

Na osnovu analize koeficijenata regresije za 11 faktora, šest od njih (brzina mešanja, ekstrakt kvasca,  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $KH_2PO_4$  i  $CaCl_2$ ) imala su pozitivan uticaj na broj vijabilnih

ćelija. Slično tome, sedam faktora (brzina mešanja, ekstrakt kvasca, riboflavin,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i  $\text{CaCl}_2$ ) pozitivno su doprinela prinosu biomase. Nasuprot tome, temperatura,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , biotin i  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  pokazali su negativan uticaj na obe praćene veličine.

Glavni efekti faktora,  $F$ - i  $p$ -vrednosti analiziranih faktora, kao i standardizovani efekti i doprinos faktora, prikazani su u tabeli 4.15. Visoke vrednosti koeficijenta determinacije ( $R^2$ ) i prilagođenog koeficijenta determinacije (Adj.  $R^2$ ) ukazuju na to da se preko 93% varijabilnosti u obe praćene veličine može objasniti predloženim modelima.

Na osnovu dobijenih rezultata, temperatura (A) i brzina mešanja (B) se izdvajaju kao statistički značajni faktori, što je vizuelno prikazano na Pareto dijagramima (slika 4.15).



Slika 4.15 Pareto dijagrami na osnovu Plaket-Burman (PB) dizajna za a) broj vijabilnih ćelija i b) prinos biomase soja *P. kluyveri* K-1 (A: Temperatura, B: Brzina mešanja, C: Ekstrakt kvasca, D:  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , E: Riboflavin, F: Biotin, G:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , H:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , I:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , J:  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , i K:  $\text{CaCl}_2$ , narandžasta i plava boja predstavljaju pozitivne i negativne efekte, respektivno)

Temperatura ima negativan uticaj, dok brzina mešanja ima pozitivan uticaj na obe praćene veličine. Iako rezultati sugerišu da bi brzina mešanja eventualno mogla imati veće vrednosti, nego u PB dizajnu, usled tehničkih ograničenja korišćene opreme optimizacija je nastavljena u istom opsegu brzine mešanja koji je prvobitno odabran.

Tabela 4.15 Analiza varijanse, standardizovani efekti i doprinos faktora na ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1 u okviru Plaket-Burman (PB) eksperimentalnog dizajna

Faktori*	Nivo		Broj vijabilnih ćelija					Prinos biomase				
	Niži (-1)	Viši (+1)	ANOVA		Rang	Standardizovani efekat	Doprinos, %	ANOVA		Rang	Standardizovani efekat	Doprinos, %
			F- vrednost	p- vrednost				F- vrednost	p- vrednost			
Temperatura	25	35	81,96	<b>0,0120</b>	1	-0,85	48,62	601,41	<b>0,0017</b>	2	-25,21	33,55
Brzina mešanja	40	200	46,35	<b>0,0209</b>	2	0,62	32,39	517,30	<b>0,0019</b>	1	23,28	40,02
Ekstrakt kvasca	0,1	0,5	3,60	0,3089	10	0,12	1,03	64,60	0,0651	7	8,23	1,78
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0	0,1	8,66	0,0987	4	-0,29	6,26	215,49	0,0546	3	-15,03	8,93
Riboflavin	0	0,01	5,18	0,1507	8	-0,17	0,67	15,23	0,0598	9	3,60	7,23
Biotin	0	0,001	19,28	0,7366	11	-0,06	0,23	24,06	0,0691	8	-5,03	0,31
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	0,3	5,35	0,1469	7	0,22	1,64	81,81	0,0620	5	9,36	3,76
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0	0,1	12,34	0,0724	3	0,33	5,26	69,20	0,0541	6	8,62	3,09
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	0,5	2,01	0,2919	9	0,15	1,50	57,49	0,0735	11	0,06	0,42
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0	0,01	6,73	0,1214	5	-0,24	2,31	73,06	0,0692	10	-1,45	0,00
CaCl <sub>2</sub>	0	0,02	4,33	0,1728	6	0,22	0,09	115,55	0,0585	4	10,92	0,90
Model			17,43	<b>0,0013</b>				190,29	<b>0,0052</b>			
			R <sup>2</sup> = 0,9874			Adj R <sup>2</sup> = 0,9308		R <sup>2</sup> = 0,9988			Adj R <sup>2</sup> = 0,9936	

\*Faktori: A: Temperatura, °C, B: Brzina mešanja, obrt/min, C: Ekstrakt kvasca, g/L, D: ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, g/L, E: Riboflavin, mg/L, F: Biotin, mg/L, G: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, g/L, H: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, g/L, I: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, g/L, J: MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, g/L and K: CaCl<sub>2</sub>, g/L.

Doprinos analiziranih faktora (tabela 4.15) na broj vijabilnih ćelija pokazuje da je temperatura dominantni faktor (48,62%). Značajnost brzine mešanja je procenjena na 32,39%, dok je značajnost ostalih faktora iznosila 18,99%. Slična situacija je primećena i za prinos biomase gde je doprinos temperature kao faktora iznosio 33,55%, brzine mešanja 40%, dok je manje od trećine doprinosa bilo rezervisano za sve ostale faktore zajedno. Redosled značajnosti u smislu doprinosa konkretnog faktora praćenim veličinama može se videti u kolonama rangiranja doprinosa (tabela 4.15).

Na osnovu dobijenih rezultata, sve komponente hranljive podloge koje su imale negativan uticaj isključene su iz formulacije medijuma za ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1, dok su komponente sa pozitivnim uticajem dodavane u koncentracijama koje su korišćene za viši nivo u PB dizajnu. Temperatura i brzina mešanja, kao statistički značajni faktori za obe praćene veličine, odabrani su za dalju optimizaciju.

### **4.8.3. Boks-Benken dizajn i RSM optimizacija**

Faktori definisani jednofaktorskom metodom i primenom PB dizajna (temperatura, brzina mešanja i koncentracija glukoze), koji su značajno uticali na ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1, varirani su prema matrici BB dizajna (tabela P3.3), pri čemu su rezultati korišćeni za RSM modelovanje i optimizaciju.

Dobijeni eksperimentalni rezultati aproksimirani su matematičkim modelom (odzivna funkcija), koji opisuje zavisnost praćenih veličina od ulaznih funkcija i njihovih interakcija. Primenom višestruke nelinearne regresione analize dobijena je kvadratna polinomna jednačina koja matematički opisuje uticaj nezavisnih faktora na broj vijabilnih ćelija ( $Y_1$ , log CFU/mL) i prinos biomase ( $Y_2$ , g/L) soja *P. kluyveri* K-1:

$$Y_1 = 8,46 + 0,0078 \cdot A + 0,2459 \cdot B + 0,1527 \cdot C - 0,1080 \cdot A \cdot B - 0,0143 \cdot A \cdot C - 0,0064 \cdot B \cdot C - 0,0565 \cdot A^2 - 0,1222 \cdot B^2 - 0,0342 \cdot C^2$$

$$Y_2 = 37,66 - 1,26 \cdot A + 15,83 \cdot B + 8,95 \cdot C - 4,86 \cdot A \cdot B - 1,41 \cdot A \cdot C + 3,67 \cdot B \cdot C - 2,47 \cdot A^2 - 5,95 \cdot B^2 - 2,50 \cdot C^2$$

gde je Y praćena veličina, dok A, B i C oznaćavaju kodirane vrednosti temperature, brzine mešanja i koncentracije glukoze, respektivno.

Pozitivan koeficijent linearne regresije za faktor ukazuje da faktor ima pozitivan uticaj na praćene veličine, što znaći da povećanje faktora dovodi do povećanja vrednosti praćenih veličina (600). Na osnovu analize rezultata, brzina mešanja (B) i koncentracija glukoze (C) imale su znaćajan uticaj na broj vijabilnih ćelija, pri ćemu je brzina mešanja imala znaćajniji uticaj. Pored toga, na broj vijabilnih ćelija znaćajno i negativno utiće kvadratni ćlan brzine mešanja ( $B^2$ ), sa  $p$ -vrednošću od 0,0401 (tabela 4.16). Da bi se dobio jednostavniji model, faktori koji nisu bili statistićki znaćajni izostavljeni su iz polinomne jednaćine, što je rezultiralo pojednostavljenom jednaćinom modela:

$$Y_1 = 8,46 + 0,2459 \cdot B + 0,1527 \cdot C - 0,1222 \cdot B^2$$

Slićno tome, brzina mešanja (B) i koncentracija glukoze (C) kao pojedinaćni faktori imali su znaćajan uticaj na prinos biomase soja *P. kluveri* K-1 (tabela 4.16). Pored toga, interakcijski efekat temperature i brzine mešanja (AB), kao i kvadratni ćlan brzine mešanja ( $B^2$ ) imali su znaćajan uticaj. Nakon eliminisanja faktora koji nisu pokazali statistićku znaćajnost, dobijena je pojednostavljena jednaćina modela:

$$Y_2 = 37,66 + 15,83 \cdot B + 8,95 \cdot C - 4,86 \cdot A \cdot B - 5,95 \cdot B^2$$

Validnost predloženog modela, kao i znaćaj uticaja pojedinaćnih faktora i njihovih interakcija na praćene veličine procenjeni su na bazi ANOVA analize. Vrednost  $p \leq 0,05$  oznaćava statistićku znaćajnost pri nivou statistićke znaćajnosti od 95% (vrednosti oznaćene podebljanim brojevima u tabeli 4.16), dok viša  $F$ -vrednost ukazuje na veći znaćaj konkretnog faktora ili interakcije. Na osnovu rezultata,  $F$ -vrednosti od 11,98 i 36,73, sa  $p$ -vrednostima od 0,0069 i 0,005 zakljućuje se da su modeli za broj vijabilnih ćelija i prinos biomase znaćajni i da imaju visoku preciznost u ispitivanom opsegu eksperimentalnih uslova.  $p$ -vrednosti odstupanja od modela (0,0125 i 0,0500) pokazali su da ovo odstupanje nije znaćajno. Viša  $F$ -vrednost i neznaćajno odstupanje od modela ukazuju na dobro podudaranje eksperimentalnih i dobijenih vrednosti. Koeficijenti determinacije  $R^2$  (0,9557 i 0,9851) pokazuju da modeli mogu adekvatno objasniti 95,57% i 98,51% varijacije u vrednostima odziva. Vrednosti koeficijenta varijacije (C.V.) (1,02% i 9,42%) dodatno su potvrdile

da su predloženi modeli pouzdani i ponovljivi (245), dok vrednosti Cookove udaljenosti (manje od 0,8) ukazuju da u skupu podataka nema vrednosti koja leži iznad granične vrednosti.

Tabela 4.16 Analiza varijanse modela za predviđanje broja vijabilnih ćelija i prinosa biomase soja *P. kluyveri* K-1

Faktor	Broj vijabilnih ćelija			Prinos biomase		
	Suma kvadrata	F-vrednost	p-vrednost	Suma kvadrata	F-vrednost	p-vrednost
Model	0,78	11,98	<b>0,0069</b>	2973,55	36,73	<b>0,005</b>
A	0,00049	0,067	0,8054	12,78	1,42	0,2868
B	0,48	66,57	<b>0,0004</b>	2005,04	222,90	<b>&lt; 0,0001</b>
C	0,19	25,66	<b>0,0039</b>	640,17	71,17	<b>0,0004</b>
AB	0,047	6,42	0,0523	94,45	10,50	<b>0,0229</b>
AC	0,00081	0,11	0,7510	7,90	0,88	0,3918
BC	0,00015	0,022	0,8871	53,90	5,99	0,0581
A <sup>2</sup>	0,012	1,62	0,2591	22,44	2,49	0,1751
B <sup>2</sup>	0,055	7,58	<b>0,0401</b>	130,83	14,54	<b>0,0125</b>
C <sup>2</sup>	0,0043	0,59	0,4755	23,16	2,57	0,1695
Ostatak	0,036			44,98		
Odstupanje od modela	0,036	79,00	<b>0,0125</b>	43,46	19,15	0,0500
Čista greška	0,0003			1,51		
Ukupna korekcija	0,82			3018,52		
R <sup>2</sup> =0,9557   AdjR <sup>2</sup> =0,8759   C.V.=1,02%   R <sup>2</sup> =0,9851   AdjR <sup>2</sup> =0,9583   C.V.=9,42%						

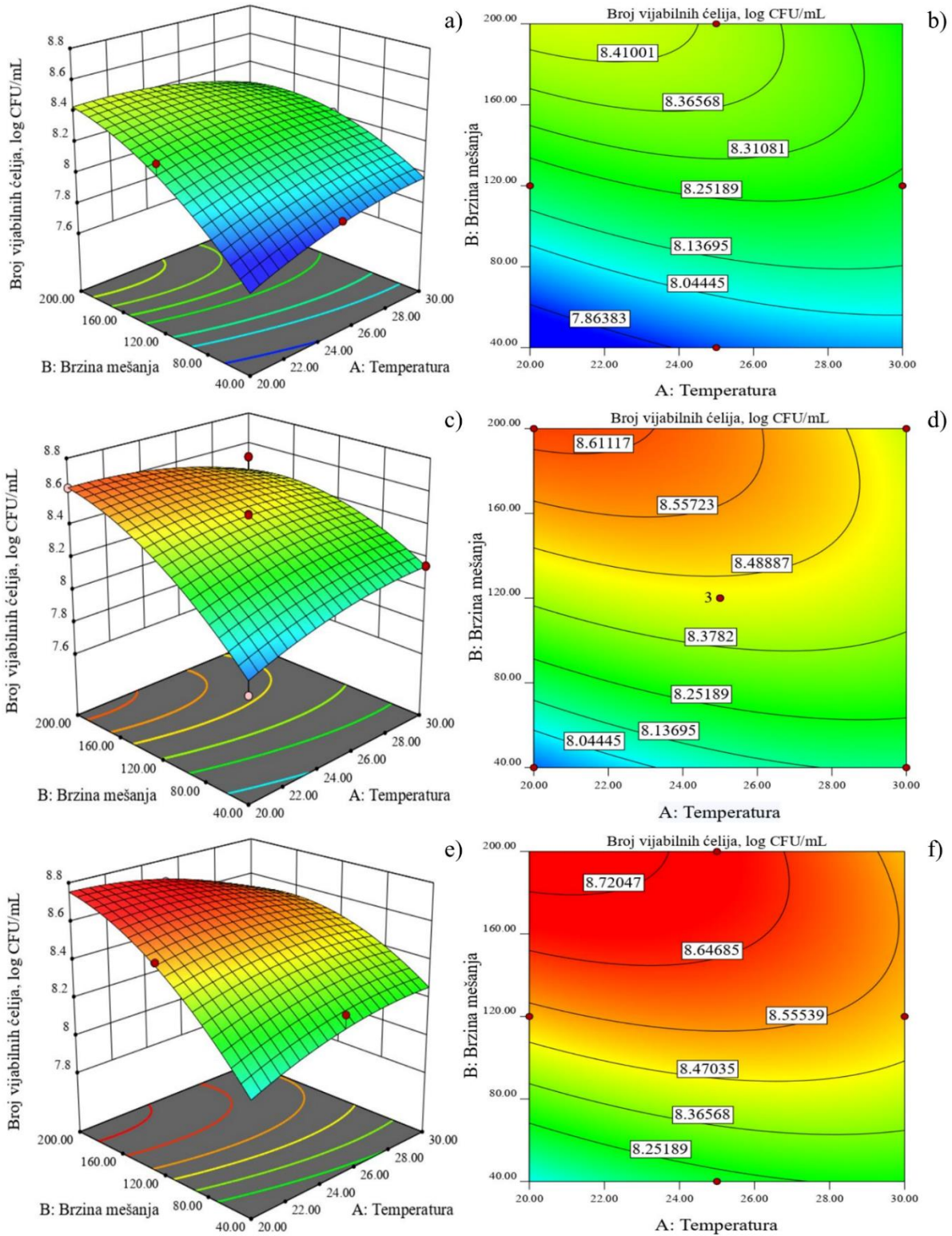
Slike 4.16 i 4.17 predstavljaju odzivne površine i kontur dijagrame za promene broja vijabilnih ćelija i prinosa biomase soja *P. kluyveri* K-1, respektivno, u funkciji brzine mešanja (obrt/min) i temperature (°C), dok je koncentracija glukoze održavana konstantnim. Analizom datih grafičkih prikaza može se zaključiti da, bez obzira na koncentraciju glukoze, povećanje brzine mešanja ima pozitivan uticaj na broj vijabilnih ćelija i prinos biomase. Povećanje koncentracije glukoze ima pozitivan uticaj na obe praćene veličine. Sa druge strane, promena temperature, pri konstantnim brzinama mešanja i koncentraciji glukoze, ne izaziva velike promene kod praćenih veličina. Može se uočiti da je pri nižim temperaturama uticaj promene brzine mešanja na praćene veličine veći, kao i da je uticaj promene temperature izraženiji pri višim brzinama mešanja. Promena temperature u variranom opsegu skoro da nije imala uticaj na prinos biomase pri višim koncentracijama

glukoze. Dobijeni rezultati u su skladu sa literaturnim podacima, gde brzine mešanja do 250 obrt/min i temperatura oko 20°C pozitivno utiču na ćelijski rast vrste *P. kluyveri* (601).

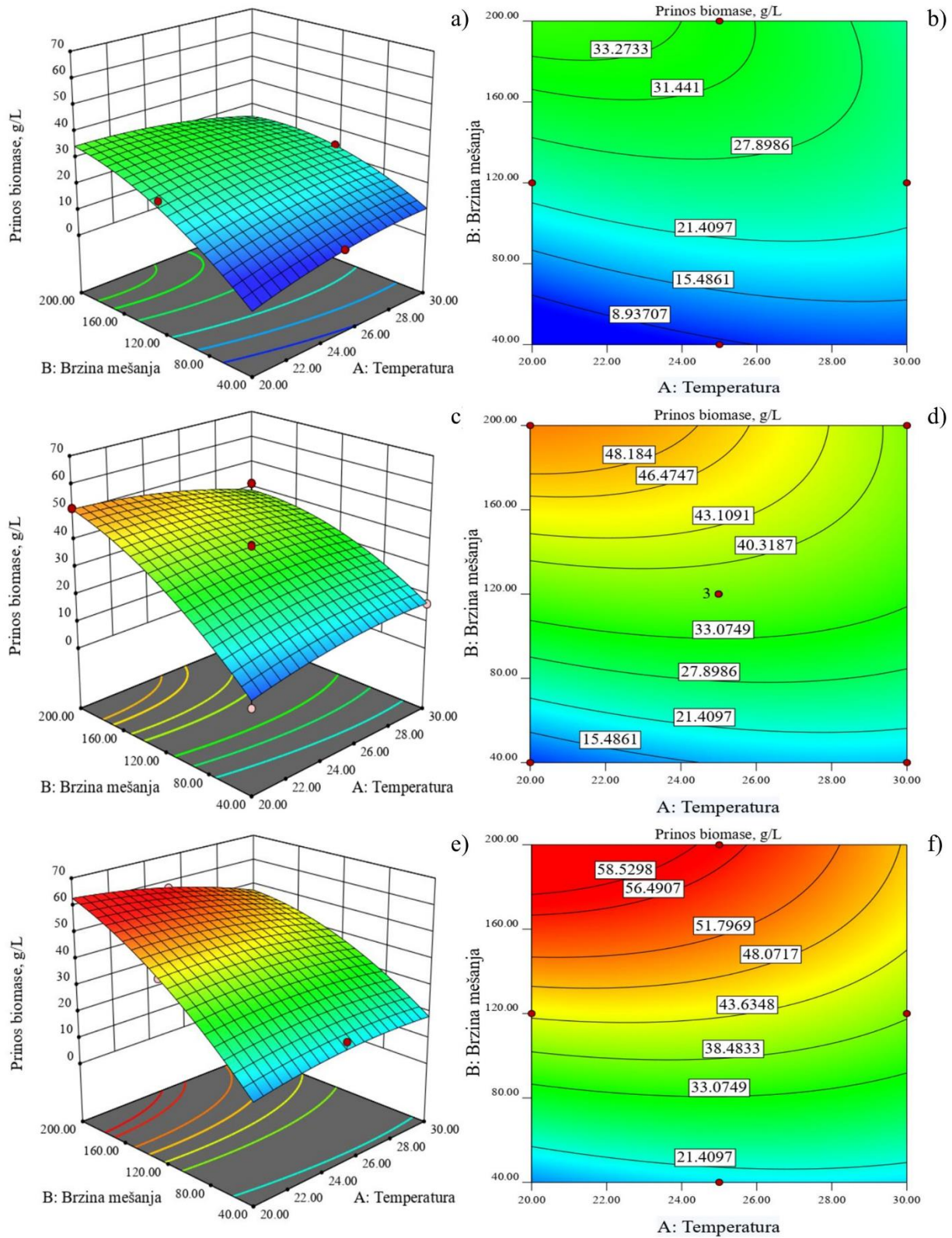
Prema predloženom modelu, vrednosti obe praćene veličine izračunate su i prikazane u tabeli 4.17, zajedno sa eksperimentalnim vrednostima. Maksimalan broj vijabilnih ćelija ( $8,68 \pm 0,02$  log CFU/mL) i prinos biomase ( $57,48 \pm 1,69$  g/L) dobijeni su pri temperaturi od 25°C, brzini mešanja od 200 obrt/min i koncentraciji glukoze od 50 g/L (br. eksp. 6). Praćene veličine imale su najniže vrednosti pri minimalnoj temperaturi i brzini mešanja, kao i srednjoj vrednosti koncentracije glukoze (br. eksp. 3). Optimalni uslovi za postizanje maksimalnog broja vijabilnih ćelija i prinosa biomase definisani su kao: temperatura 21,9°C, brzina mešanja 184 obrt/min i koncentracija glukoze 48 g/L. U tim uslovima, predviđeno je postizanje broja vijabilnih ćelija od 8,68 log CFU/mL i prinos biomase od 58,40 g/L. Poslednja faza RSM optimizacije zahtevala je eksperimentalnu validaciju podataka, kako bi se potvrdila konzistentnost između predloženih optimalnih vrednosti za praćene veličine i eksperimentalnih vrednosti. Eksperimentalno dobijeni rezultati ( $8,74 \pm 0,02$  log CFU/mL i  $64,64 \pm 2,18$  g/L, za broj vijabilnih ćelija i prinos biomase soja *P. kluyveri* K-1, respektivno) pokazuju dobro slaganje između predviđenih i eksperimentalno dobijenih vrednosti, demonstrirajući tačnost predloženih modela.

Tabela 4.17 Matrica Boks-Benkenovog eksperimentalnog dizajna sa eksperimentalno dobijenim i predviđenim vrednostima praćenih odzivnih veličina

Broj eksperimenta	Nekodirane vrednosti faktora			Praćene odzivne veličine			
	Temperatura, °C	Brzina mešanja, obrt/min	Koncentracija glukoze, g/L	Broj vijabilnih ćelija, log CFU/mL		Prinos biomase, g/L	
				Ekseprimentalne vrednosti	Predviđene vrednosti	Ekseprimentalne vrednosti	Predviđene vrednosti
1	20	200	27,50	8,62±0,01	7,92	51,51±1,35	51,19
2	20	120	5	8,27±0,02	8,15	26,16±1,01	23,60
3	20	40	27,50	7,83±0,01	8,63	7,13±0,16	9,81
4	25	120	27,50	8,47±0,05	8,43	38,34±3,26	37,66
5	25	120	27,50	8,44±0,01	8,19	36,68±1,03	37,66
6	25	200	50	8,68±0,02	8,24	57,48±1,69	57,65
7	20	120	50	8,54±0,01	8,53	44,15±1,17	44,30
8	25	40	50	8,28±0,07	8,51	21,48±2,78	18,64
9	25	200	5	8,33±0,01	7,90	29,58±0,72	32,42
10	25	120	27,50	8,46±0,01	8,40	37,96±0,95	37,66
11	25	40	5	7,91±0,04	8,22	8,26±0,71	8,10
12	30	120	5	8,22±0,01	8,69	24,04±0,25	23,88
13	30	40	27,50	8,15±0,02	8,46	16,69±0,74	17,00
14	30	120	50	8,44±0,00	8,46	36,45±0,91	38,96
15	30	200	27,50	8,51±0,02	8,46	41,63±1,41	38,95



Slika 4.16 Odzivne površine i konturni dijagrami za broj vijabilnih ćelija soja *P. kluveri* K-1 u funkciji brzine mešanja, temperature i koncentracije glukoze 5 g/L (a, b), 27,50 g/L (c,d), 50 g/L (e, f)



Slika 4.17 Odzivne površine i konturni dijagrami za prinos suve biomase soja *P. kluyveri* K-1 u funkciji brzine mešanja, temperature i koncentracije glukoze 5 g/L (a, b), 27,50 g/L (c,d), 50 g/L (e, f)

## 5. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata dobijenih u okviru ove doktorske disertacije mogu se izvesti zaključci koji se odnose na enološki potencijal nativnih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca izolovanih iz epifitne mikrobiote različitih plodova voća i biljnog materijala vinove loze (čokot i list) u proizvodnji vina od autohtone srpske sorte grožđa prokupac.

- Sa zrelih plodova voća, kao i sa bobica, čokota i lista vinove loze sorte prokupac ukupno je izolovano 58 izolata. Na osnovu rezultata fermentativnih testova, makromorfoloških i mikroskopskih karakteristika primenom klaster analize sa Wardovom metodom odabrano je 17 izolata kvasaca za mikroviniifikaciju pasterizovane šire sorte prokupac, koji su na osnovu API AUX 20C testa bili identifikovani kao predstavnici vrsta *H. uvarum* (Kd-8, Kd-9, Kd-10, Kd-12, Kd-13, Šd-1, Š-2, Kr-2 i Kr-4), *C. famata* (Kd-1, Kd-2, Kd-4 i Kd-17), *P. kluyveri* (K-1), *M. pulcherrima* (K-5), *R. glutinis* (Gf-3) i *P. laurentii* (Č-1).
- Na osnovu rezultata fermentativnih testova svi odabrani sojevi pokazali su rast na temperaturama iznad 15°C i visoku rezistentnost prema SO<sub>2</sub>. Najveću toleranciju na etanol pokazali su sojevi *C. famata*, dok je soj *P. laurentii* Č-1 imao najmanju toleranciju na etanol.
- Tokom mikroviniifikacije većina sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca iskoristila je više od polovine početnog sadržaja šećera u širi. Sojevi *C. famata* izdvojili su se po većim vrednostima fermentativne snage, dok je soj *P. kluyveri* K-1 pokazao najveću vrednost fermentativne moći.
- Koncentracija sirćetne kiseline u uzorcima dobijenim tokom mikroviniifikacije kretala se ispod 0,70 g/L, dok je sinteza mlečne i ćilibarne kiseline varirala među sojevima. Jedino su sojevi *H. uvarum* pokazali sposobnost proizvodnje izobuterne kiseline. U poređenju sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae*, vina dobijena primenom sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca imala su i do 7% nižu koncentraciju etanola. Soj *P. kluyveri* K-1 izdvojio se po najvećoj količini stvorenog glicerola.
- Na osnovu potrošnje glukoze i fruktoze sojevi vrsta *C. famata*, *P. kluyveri*, *M. pulcherrima*, *R. glutinis* i *P. laurentii* okarakterisani su kao glukofilni, dok su sojevi vrste *H. uvarum* imali fruktofilan karakter.

- Prema skrining olfaktornom testu izvršena je podela odabranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca na one koji imaju sposobnost stvaranja prijatnih ili neprijatnih aroma. Najperspektivniji soj po stvaranju prijatnih, odnosno voćnih aroma izraženog intenziteta bio je soj *P. kluyveri* K-1.
- Prema kriterijumima, kao što je potencijal stvaranja prijatnih aroma srednjeg i intenzivnog intenziteta, mogućnost potrošnje više od polovine ukupne količine šećera i proizvodnja glicerola iznad 4 g/L, za dalja istraživanja odabrani su sojevi *P. kluyveri* K-1, *M. pulcherrima* K-5 i *H. uvarum* (Kr-2, Š-2 i Šd-1).
- U samostalnim fermentacijama, među sojevima vrste *H. uvarum*, soj Š-2 izdvajao se po većim brzinama potrošnje šećera. U sekvencijalnim fermentacijama, uočen je nagli porast potrošnje šećera kod svih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca. Najveća brzina potrošnje šećera primećena je kod soja *P. kluyveri* K-1.
- Nezavisno od tipa fermentacije, korišćeni ne-*Saccharomyces* sojevi doprineli su smanjenju sadržaja alkohola za 3,50-9,00% i povećanju sadržaja glicerola za oko 20% u odnosu na komercijalni soj vrste *S. cerevisiae*. Sva vina bila su deklarirana kao suva, jer je sadržaj redukujućih šećera bio ispod 4,00 g/L. Sadržaj ukupnog ekstrakta i ekstrakta bez šećera kretao se u granicama od 25-30 g/L, što je karakteristično za mlada crvena vina. U samostalnim fermentacijama, odabrani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca doprineli su smanjenju sadržaja sirćetne kiseline za 15% u odnosu na sekvencijalnu fermentaciju. Pored toga, doprineli su smanjenju sadržaja jabučne kiseline za oko 30%, uz istovremeno povećanje količine mlečne kiseline do 40% u odnosu na komercijalni soj vrste *S. cerevisiae*.
- U uzorcima vina dobijenim u laboratorijskim uslovima identifikovano i kvantifikovano je ukupno 86 aromatskih jedinjenja, od kojih su 29 jedinjenja prelazila senzorni prag detekcije i bila ključna u formiranju aromatskog profila vina sorte prokupac.
- U većini uzoraka vina grupa etil estra imala je najizraženiji doprinos u formiranju aromatskog profila vina sorte prokupac. Iz ove grupe, značajan doprinos u formiranju aromatskog profila pružili su etil oktanoat, etil izobutirat, etil heksanoat, etil propanoat i etil 3-hidroksibutirat.
- Od acetatnih estra izoamil acetat, etil acetat, aktivni amil acetat i 2-feniletal acetat značajno su uticali na formiranje aromatskog profila vina sorte prokupac.

- Viši alkoholi, od kojih 1-heptanol, 2-feniletil alkohol, 3-metil-1-butanol i izobutil alkohol značajno su učestvovali u formiranju aromatskog profila vina sorte prokupac.
- Vina dobijena primenom sojeva *H. uvarum* imala su izražen doprinos laktonskih jedinjenja, koji su svojim voćnim, slatkim (karamela) i aromama nalik kokosu obogatili aromatski profil ovih uzoraka vina.
- Soj *P. kluyveri* K-1 je, povećanjem sadržaja fenolnih i terpenskih jedinjenja, kao i produkcijom isparljivih masnih kiselina i karbonilnih jedinjenja, dao značajan doprinos ukupnom aromatskom profilu vina.
- Odabrani sojevi ne-*Saccharomyces* kvasaca doprineli su povećanju intenziteta i poboljšanju nijanse boje vina sorte prokupac. U odnosu na uobičajeni profil komercijalnih vina prokupac, korišćeni sojevi dali su vina sa boljim ocenama za sortnost, kompleksnost i naglašenijim voćnim, orašastim i cvetnim aromama.
- Sumiranjem svih dobijenih rezultata, na osnovu kvaliteta, aromatskog i senzornog profila uzoraka vina dobijenih u laboratorijskim uslovima, soj *P. kluyveri* K-1 odabran je za dalja istraživanja u pilot i poluindustrijskim uslovima vinifikacije.
- Nezavisno od vinifikacionog protokola, od laboratorijskih do poluindustrijskih uslova, primenom soja *P. kluyveri* K-1 u dobijenim uzorcima vina uočeno je smanjenje sadržaja etanola, povećanje sadržaja ukupnog ekstrakta i ekstrata bez šećera i sadržaja glicerola, u poređenju sa komercijalnim sojem *S. cerevisiae*. U pilot i poluindustrijskim uslovima korišćenjem soja *P. kluyveri* K-1 dobijena vina su imala optimalan kiselinski profil i manji sadržaj isparljivih kiselina u poređenju sa vinima dobijenim u laboratorijskim uslovima.
- Poređenjem sastava i relativnih doprinosa isparljivih aromatskih jedinjenja u vinima sorte prokupac dobijenih primenom soja *P. kluyveri* K-1 u laboratorijskim, pilot i poluindustrijskim uslovima uočeno je da u uslovima većih razmera dolazi do znatnog povećanja sadržaja acetatnih estera, viših alkohola, laktonskih i terpenskih jedinjenja u aromatskom profilu vina.
- Primenom soja *P. kluyveri* K-1 u vinifikacionim protokolima većih razmera dobijena su vina sa boljom nijansom i intenzitetom boje, kao i sa većim ocenama sortnosti, intenziteta, kompleksnosti, kiselosti, taninske strukture i harmoničnosti, uz izraženije voćne i cvetne mirisne note, u poređenju sa vinom dobijenim u laboratorijskim uslovima.

- Upotrebom jednofaktorske metode (OFAT) i Plaket-Burman (PB) dizajna glukoza je odabrana kao najpogodniji izvor ugljenika za ćelijski rast soja *P. kluyveri* K-1, dok su temperatura i brzina mešanja definisani kao procesni parametri sa značajnim uticajem na broj vijabilnih ćelija i prinos biomase soja *P. kluyveri* K-1. Primenom metode odzivne površine (RSM) sa Boks-Benken (BB) eksperimentalnim dizajnom određeni su optimalni uslovi (temperatura (21,9°C), brzina mešanja (184 obrt/min) i koncentracija glukoze (48 g/L)) za postizanje maksimalnog broja vijabilnih ćelija i prinosa biomase soja *P. kluyveri* K-1 koji su potvrđeni u laboratorijskim uslovima.
- Dobijeni rezultati jasno potvrđuju da odabrani soj *P. kluyveri* K-1 ima izražen potencijal da u uslovima industrijske i komercijalne proizvodnje vina sorte prokupac doprinese formiranju vina sa nižim sadržajem alkohola, povoljnim kiselinskim profilom, povećanim sadržajem glicerola i poboljšanim aromatskim profilom. Pored toga, primena soja *P. kluyveri* K-1 pokazuje potencijal za proizvodnju kompleksnih, punih i harmoničnih vina sorte prokupac sa izraženom čistom bojom i istaknutim voćnim mirisnim tonovima, što dodatno potvrđuje njegov značajan potencijal za primenu u savremenoj proizvodnji vina.

## 6. LITERATURA

1. Zakon o vinu, Službeni glasnik RS, br. 41/2009 i 93/2012.
2. Liu S., Laaksonen O., Li P., Gu Q., Yang B., Use of Non- *Saccharomyces* Yeasts in Berry Wine Production: Inspiration from Their Applications in Winemaking, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(3), 736-750 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07302>
3. Pretorius S I., Tailoring wine yeast for the new millennium : novel approaches to the ancient art of winemaking, *Yeast*, 16(8), 675-728, 2000. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(20000615\)16:8%3C675::AID-YEA585%3E3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0061(20000615)16:8%3C675::AID-YEA585%3E3.0.CO;2-B)
4. Deak I., Habschied K., Mesić J., Babić J., Kovačević D., Nedović V., Mastanjević K., The Influence of Fermenting Yeast on the Sensory Properties of Graševina Wine, *Foods*, 10(11), 2752-2760, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10112752>
5. de Celis M., Ruiz J., Vicente J., Acedo A., Marquina D., Santos A., Belda I., Expectable diversity patterns in wine yeast communities, *FEMS Yeast Research*, 22(1), 1-5, 2022. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foac034>
6. Borren E., Tian B., The important contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to the aroma complexity of wine: A review, *Foods*, 10(1), 13-26, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10010013>
7. Mehlomakulu N N., Hoff W J., Erten H., Beukes L., Jolly P N., Screening Non-*Saccharomyces* Yeasts as Low Ethanol Producing Starter Cultures, *South African Journal of Enology and Viticulture*, 42(1), 56-66, 2021. <https://doi.org/10.21548/42-1-4335>
8. Fazio A N., Russo N., Foti P., Pino A., Caggia C., Randazzo L C., Inside Current Winemaking Challenges: Exploiting the Potential of Conventional and Unconventional Yeasts, *Microorganisms*, 11(5), 1338-1364, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051338>
9. Carolin Martin M., Paolo Prendes L., Inés Morata V., Gabriela Merín M., Biocontrol and Enzymatic Activity of Non-*Saccharomyces* Wine Yeasts : Improvements in Winemaking, *Fermentation*, 10(4), 218-251, 2024. <https://doi.org/10.3390/fermentation10040218>

10. Vejarano R., Non-*Saccharomyces* in Winemaking: Source of Mannoproteins, Nitrogen, Enzymes, and Antimicrobial Compounds, *Fermentation*, 10(4), 218-251, 2020. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030076>
11. Gunhan M., A Review Article: With Advantages and Disadvantages The Role of Non-*Saccharomyces* Yeast in the Wine Industry, *Turkish Journal of Food and Agriculture Sciences*, 4(1), 13-17, 2022. <https://doi.org/10.53663/turjfas.1096142>
12. Tofalo R., Suzzi G., Perpetuini G., Discovering the Influence of Microorganisms on Wine Color, *Frontiers in Microbiology*, 12, 1-13, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.790935>
13. Li L., Yuan C., Zhang L., Chu R., Yu Q., Cai J., Yanf T., Zhang M., The impact of simultaneous inoculation with *Torulaspora delbrueckii* and *Hanseniaspora uvarum* combined with *Saccharomyces cerevisiae* on chemical and sensory quality of Sauvignon blanc wines, *Frontiers in Microbiology*, 15, 1-14, 2024. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1413650>
14. Bi P., Sun W., Li S., Liu X., Tian Y., Long F., Zhang Z., Guo J., Characterization of the effect of non-*Saccharomyces cerevisiae*s on the non-volatile constituents and volatile profiles of low-alcoholic pomegranate beverages. *Food Bioscience*, 59, 103870, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103870>
15. Sidari R., Ženišová K., Tobolková B., Belajová E., Cabicarová T., Bučková M., Puškárová A., Planý M., Kuchta T., Pangallo D., Wine Yeasts Selection: Laboratory Characterization and Protocol Review, *Microorganisms*, 9(11), 2223-2250, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112223>
16. Wang R., Yang B., Jia S., Dai Y., Lin X., Ji C., Chen Y., The Antioxidant Capacity and Flavor Diversity of Strawberry Wine Are Improved Through Fermentation with the Indigenous Non-*Saccharomyces* Yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Kurtzmaniella quercitrusa*, *Foods*, 14(5), 886-902, 2025. <https://doi.org/10.3390/foods14050886>
17. Binati L R., Lemos Junior J F W., Torriani S., Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to increase glutathione concentration in wine, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 290-294, 2021. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12473>
18. Pietrafesa A., Capece A., Pietrafesa R., Bely M., Romano P., *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora uvarum* mixed starter cultures: Influence of microbial/physical

- interactions on wine characteristics, *Yeast*, 37(11), 609-621, 2020. <https://doi.org/10.1002/yea.3506>
19. Schober D., Wacker M., Schmarr H-G., Fischer U., Understanding the Contribution of Co-Fermenting Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* Yeasts to Aroma Precursor Degradation and Formation of Sensory Profiles in Wine Using a Model System, *Fermentation*, 9(11), 931-951, 2023. <https://doi.org/10.3390/fermentation9110931>
  20. Lang A T., Walker E M., Boss K P., Jiranek V., Effect of ‘loss of function’ mutation in *SER1* in wine yeast: fermentation outcomes in co-inoculation with non-*Saccharomyces*, *OENO One*, 56(2), 47-61, 2022. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2022.56.2.4908>
  21. Drumande-Neves J., Fernandes T., Lima T., Pais C., Franco-Durate R., Learning from 80 years of studies: a comprehensive catalogue of non-*Saccharomyces* yeasts associated with viticulture and winemaking, *FEMS Yeast Research*, 21(3), 1-13, 2021. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foab017>
  22. Bousquet J., Marketing Challenges and Trends Influencing Wine Producers and Consumers, *Journal of Business and Management Studies*, 5(3), 155-160, 2023. <https://doi.org/10.32996/jbms.2023.5.3.16>
  23. Chaillet A, Bastard A. Consumer expectations and values : The role of digitalization in understanding and meeting consumer needs in the wine industry, 44<sup>th</sup> World Congress of Vine and Wine, BIO Web of Conferencess, 68, 03012. 2023. <https://doi.org/10.1051/bioconf/2023680301>
  24. Li R., Feng D., Wang H., Zhang Z., Li N., Sun Y., Genetic diversity of non-*Saccharomyces* yeasts associated with spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon wines from Ningxia, China, *Frontiers in Microbiology*, 14, 1-11, 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1253969>
  25. Martins Afonso S., Inês A., Vilela A., Bio-Dealcoholization of Wines: *Can Yeast Make Lighter Wines?*, *Fermentation*, 10(1), 36-81, 2024. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010036>
  26. Eudes Sam F., Chen X., Li G., Yang J., Tao Y., Aroma Retention and Sensory Characteristics of Low- and No-Alcohol Wines: Influence of Reverse Osmosis Pressure and Ethanol Concentration, *Journal of Food Science*, 90(5), e70253, 2025. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.70253>

27. Ianieva O., Podgorsky V., Enological potential of non-*Saccharomyces* yeast strains of enological and brewery origin from Ukrainian Collection of Microorganisms, *Mycology*, 12(3), 203-215, 2020. <https://doi.org/10.1080/21501203.2020.1837272>
28. Mas A, Carmen Portillo M., Strategies for microbiological control of the alcoholic fermentation in wines by exploiting the microbial *terroir* complexity: A mini-review, *International Journal of Food Microbiology*, 367, 109592, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109592>
29. Farmakis L., Aslanidou P., Katsou .L, Moraiti N., A chromatographic approach for investigating the proliferation ability of native *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains under varying temperatures and ethanol concentrations. *Frontiers in Fungal Biology*, 6, 1-17, 2025. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2025.1542167>
30. Lappa K I., Kachrimanidou V., Pateraki C., Koulougliotis D., Eriotou E., Kopsahelis N., Indigenous yeasts: emerging trends and challenges in winemaking. *Current Opinion in Food Science*, 32, 133-143, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.04.004>
31. Pantelić M., Dabić Zagorac D., Gašić U., Jović S., Bešlić Z., Todić S., Natić M., Phenolic profiles of Serbian autochthonous variety ‘Prokupac’ and monovarietal international wines from the Central Serbia wine region, *Natural Product Research*, 32(19), 2356-2359, 2018. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1408107>
32. Lakićević H S., Popović Đorđević B J., Pejin B., Đorđević S A., Matijašević M S., Lazić L M., An insight into chemical composition and bioactivity of ‘Prokupac’ red wine, *Natural Product Research*, 34(11), 1542-1546, 2018. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1516219>
33. Lakićević S., Popović T., Matijašević S., Ćirković B., Lazić M., Popović-Đorđević J., Chemical evaluation of autochthonous variety “Prokupac” red wine with the addition of selected aromatic herbs. *Analele Universității din Craiova, seria Agricultură – Montanologie – Cadastru (Annals of the University of Craiova - Agriculture, Montanology, Cadastre Series)*, 49(1), 87-97, 2019.
34. Karabegović I., Malićanin M., Popović N., Stamenković Stojanović S., Lazić M., Stanojević J., Danilović B., Native Non-*Saccharomyces* Yeasts as a Tool to Produce Distinctive and Diverse Tamjanika Grape Wines, *Foods*, 11(13), 1935-1950, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11131>

35. Santesteban G L., Precision viticulture and advanced analytics. A short review. *Food Chemistry*, 279, 58-62, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.140>
36. Filippo Di Gennaro S., Matese A., Mancin M., Primicerio J., Palliotti A., An open-source and low-cost monitoring system for precision enology, *Sensors*, 14(12), 23388-23397, 2014. <https://doi.org/10.3390/s141223388>
37. Tamar Hefler Y., Kissinger M., Grape Wine Cultivation Carbon Footprint : Embracing a Life Cycle Approach across Climatic Zones, *Agriculture*, 13(2), 303-314, 2023. <https://doi.org/10.3390/agriculture13020303>
38. State of the World Vine and Wine Sector in 2024, 46<sup>th</sup> World Congress of Vine and Wine, International Organisation of Vine and Wine, Intergovernmental Organisation, Republic of Moldova, 16-20 June, 2025.
39. Bešlić Z., Todić S., Korać N., Lorenzi S., Emanuelli F., Grandó S M., Genetic characterization and relationships of traditional grape cultivars from Serbia, *Vitis*, 51(4), 183-189, 2012. <https://doi.org/10.5073/vitis.2012.51.183-189>
40. Jakšić D., Ivanišević D., Đokić V., Brbkalić Tepevac M., Popis poljoprivrede 2012, Poljoprivreda u Republici Srbiji, Vinski atlas, Republički zavod za statistiku, Beograd, 2015.
41. Chen G., Zhou X., Khasannov M., Spengler N R., Ma J., Annaev T., Kambarov N., Maksudov F., Wang J., Askarov A., Li X., Morphotype broadening of the grapevine (*Vitis vinifera* L.) from Oxus civilization 4000 BP, Central Asia. *Scientific Reports*, 12(1), 16331, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19644-0>
42. Topić Božič J., Korte D., Butinar L., Mozetič Vodopivec B., Yeasts and wine colour, *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 11(2), 291-302, 2019. <https://doi.org/10.17508/CJFST.2019.11.2.17>
43. Vlahović B., Puškarić A., Užar D., Savremeni trendovi na tržištu vina, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2017.
44. López-Santiago J., Md Som A., Asyadi Bin Md Yusof F., Mazarrón R F., Teresa Gómez-Villarino T., Exploring Sustainability in Wineries: Evaluating Food Safety and Environmental Management Aligning with the Farm to Fork Strategy, *Agriculture*, 14(3), 330-365, 2024. <https://doi.org/10.3390/agriculture14030330>

45. Moreno-Arriba V., Polo C., Wine Chemistry and Biochemistry, Springer Science and Business Media LLC, 2009.
46. Padilla B., Gil V J., Manzanares P., Past and future of non-Saccharomyces yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity, *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-20, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
47. Rasmussen C S., From Honey Wine to the Cultivation of the Grape: An Early History of Fermented Beverages, in Rasmussen S., *Chemical Technology in Antiquity*, American Chemical Society, p. 89-138, 2015.
48. Boulton B R., Singleton L V., Bisson F L., Kunkee E R., *Principles and Practices of Winemaking*, Springer-Science + Business Media B.V., 1996.
49. Blesić M., *Tehnologija vina*, Poljoprivredno-prehrambeni fakultet, Univerzitet u Sarajevu, Sarajevo, 2016.
50. Jesús Torija M., Beltran G., Novo M., Poblet M., Manuel Guillamón J., Mas A., Rozès N., Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine, *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2), 127-136, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00506-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00506-8)
51. Jesús Torija M., Rozès N., Poblet M., Manuel Guillamón J., Mas A., Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*, *International Journal of Food Microbiology*, 80(1), 47-53, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00144-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00144-7)
52. Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A., *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications*, Volume 1, Second edition, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
53. Reynolds A, Cliff M, Girard B, Kopp G T., Influence of Fermentation Temperature on Composition and Sensory Properties of Semillon and Shiraz Wines, *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 235-240, 2001. <https://doi.org/10.5344/ajev.2001.52.3.235>
54. Bafrcnová P., Šmogrovičová D., Sláviková I., Pátková J., Dömény Z., Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnology Letters*, 21(4), 337-341, 1999. <https://doi.org/10.1023/A:1005436816047>

55. Reddy V A L., Reddy V S O., Effect of fermentation conditions on yeast growth and volatile composition of wine produced from mango (*Mangifera indica* L.) fruit juice, Food and Bioproducts Processing, 89(4), 487-491, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.11.007>
56. Radovanović V., Tehnologija vina, Izdavačko preduzeće Građevinska knjiga, Beograd, 1970.
57. Aaron T R., Davis C R., Hamdy K M., Toledo T R., Continuous alcohol/malolactic fermentation of grape must in a bioreactor system using immobilized cells, Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 12(2), 127-148, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2004.tb00055.x>
58. Kandylis P., Goula A., Koutinas A A., Corn Starch Gel for Yeast Cell Entrapment. A View for Catalysis of Wine Fermentation, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(24), 12037-12045, 2008. <https://doi.org/10.1021/jf802476w>
59. Ravikumar Sahana G., Balasubramanian B., Sebastian Joseph K., Pappuswamy M., Liu W-C., Meyyazhagan A., Kamyab H., Chelliapan S., Joseph V B., A review on ethanol tolerance mechanisms in yeast: Current knowledge in biotechnological applications and future directions, Process Biochemistry, 138, 1-13, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.12.024>
60. Phong Nguyen H., Du Le H., Viet Man Le V., Effect of Ethanol Stress on Fermentation Performance of *Saccharomyces cerevisiae* Cells Immobilized on *Nypa fruticans* Leaf Sheath Pieces, Food Technology & Biotechnology, 53(1), 96-101, 2015. <https://doi.org/10.17113/ftb.53.01.15.3617>
61. Guadalupe-Daqui M, Goodrich-Schneider M R., Sarnoski J P., Carriglio C J., Sims A C., Pearson J B., MacIntosh J A., The effect of CO<sub>2</sub> concentration on yeast fermentation: rates, metabolic products, and yeast stress indicators. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnolog, 50(1), 1-9, 2023. <https://doi.org/10.1093/jimb/kuad001>
62. Karl W D., Roth M K., Schendel J F., Gooch D V., Jordan J B., Carbon Dioxide Effects on Fuel Alcoholic Fermentation, in: Saha B., Woodward J., Fuels and Chemicals from Biomass, American Chemical Society, p. 93-109, 1997.
63. Jackson R., Wine Science: Principles and Applications, Academic Press, 2020.

64. Zoecklein W B., Fugelsang C K., Gump H B., Nury S F., Wine Analysis and Production, Springer Science and Business Media LLC, 1999.
65. Bell S-J., Henschke A P., Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine, Australian Journal of Grape and Wine Research, 11(3), 242-295, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
66. Henschke A P., Jiranek V., Yeasts - Metabolism of nitrogen compounds, in: Fleet G., Wine Microbiology and Biotechnology, Taylor & Francis, p. 77-164, 1993.
67. Jiranek V., Langridge P., Henschke A P., Amino Acid and Ammonium Utilization by *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts From a Chemically Defined Medium, American Journal of Enology and Viticulture, 46, 75-83, 1995. <https://doi.org/10.5344/ajev.1995.46.1.75>
68. Mauricio C J., Ortega M J., Salmon M J., Sugar uptake by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation at different initial ammoniacal nitrogen concentrations, Acta Horticulturae, 388, 197-202, 1995. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1995.388.29>
69. Valero E., Millán C., Ortega M J., Mauricio C J., Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83(8), 830-835, 2003. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1417>
70. Matthews A., Grimaldi A., Walker M., Bartowsky E., Grbin P., Jiranek V., Lactic Acid Bacteria as a Potential Source of Enzymes for Use in Vinification, Applied and Environmental Microbiology, 70(10), 5715-5731, 2004. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5715-5731.2004>
71. Guo L., Li R., Chen W., Dong F., Zheng Y., Li Y., The interaction effects of pesticides with *Saccharomyces cerevisiae* and their fate during wine-making process, Chemosphere, 328, 138577, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138577>
72. Gava A., Davi Emer C., Ficagna E., Fernandes de Andrade S., Meneghello Fuentefria A., Occurrence and impact of fungicides residues on fermentation during wine production - A review, Food Additives & Contaminants: Part A, 38, 943-961, 2021. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1894357>

73. Becerra K., Ghosh S., Godoy L., Pesticide and Yeast Interaction in Alcoholic Fermentation: A Mini-Review, *Fermentation*, 9(3), 266-279, 2023. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030266>
74. Guzzon R., Franciosi E., Toffanin A., Investigation by High-Throughput Sequencing Methods of Microbiota Dynamics in Spontaneous Fermentation of Abruzzo (South Italy) Wines, *Agronomy*, 12(12), 3104-3119, 2022. <https://doi.org/10.3390/agronomy12123104>
75. Fleet H G., Wine yeasts for the future, *FEMS Yeast Research*, 8(7), 979-995, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00427.x>
76. Chen H., Liu Y., Chen J., Fu X., Suo R., Chitrakar B., Wang J., Effects of spontaneous fermentation on microbial succession and its correlation with volatile compounds during fermentation of Petit Verdot wine, *LWT*, 168, 113890, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113890>
77. Vukosavljević P., Karabegović I., Voćne rakije: Tehnologija proizvodnje i metode analize, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2025.
78. Ballantyne D., Terblanche S N., Lecat B., Chapuis C., Old world and new world wine concepts of *terroir* and wine: perspectives of three renowned non-French wine makers, *Journal of Wine Research*, 30(2), 122-143, 2019. <https://doi.org/10.1080/09571264.2019.1602031>
79. Wang F., Viticulture and wine *terroir*: a bibliometric analyze, EBWFF, E3S Web of Conferences 420, 01006, 2023. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202342001006>
80. Felder D., Burns D., Chang D., Defining microbial *terroir*: The use of native fungi for the study of traditional fermentative processes. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 1(1), 64-69, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2011.11.003>
81. Belda I., Zarraindia I., Perisin M., Palacios A., Acedo A., From vineyard soil to wine fermentation: Microbiome approximations to explain the “*terroir*” Concept. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-12, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00821>
82. Belda I., Conchillo B L., Ruiz J., Navascués E., Marquina D., Santos A., Selection and use of pectinolytic yeasts for improving clarification and phenolic extraction in winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 1-8, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.003>

83. García-Izquierdo I., Colino-Rabanal J V., Tamame M., Rodríguez-López F., Microbiota Ecosystem Services in Vineyards and Wine: A Review, *Agronomy*, 14(1), 131-154, 2024. <https://doi.org/10.3390/agronomy14010131>
84. Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D., Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, Volume 2, Second edition, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
85. Carpena M., Fraga-Corral M., Otero P., Nogueira A R., Garcia-Oliveira P., Prieto A M., Simal-Gandara J., Secondary Aroma: Influence of Wine Microorganisms in Their Aroma Profile. *Foods*, 10(1), 51-77, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods10010051>
86. Wang X., Fan G., Peng Y., Xu N., Xie Y., Zhou H., Liang H., Zhan J., Huang W., You Y., Mechanisms and effects of non-*Saccharomyces* yeast fermentation on the aromatic profile of wine, *Journal of Food Composition and Analysis*, 124, 105660, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105660>
87. Pavlović H., Petravić Tominac V., Velić D., Mađarević Pavetić T., Zechner-Krpan V., Velić N., Application of Wine Yeast Starter Cultures in the Production of Grape and Fruit Wines, *Fermentation*, 11(4), 228-250, 2025. <https://doi.org/10.3390/fermentation11040228>
88. García M., Esteve-Zarzoso B., Mariano Cabellos J., Arroyo T., Advances in the study of *Candida stellata*. *Fermentation*, 4(3):74-96, 2018. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030074>
89. Comitini F., Gobbi M., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M., Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Microbiology*, 28(5), 873-882, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.12.001>
90. Sadoudi M., Tourdot-Maréchal R., Rousseaux S., Steyer D., Gallardo-Chacón J-J., Ballester J., Vichi S., Guérin-Scheider R., Caixach J., Alexandre H., Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts, *Food Microbiology*, 32(2), 243-253, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>
91. Varela C., Barker A., Tran T., Borneman A., Curtin C., Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima*

- and *Saccharomyces uvarum*, International Journal of Food Microbiology, 252, 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.002>
92. Domizio P., Romani C., Lencioni L., Comitini F., Gobbi M., Mannazzu I., Ciani M., Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation, International Journal of Food Microbiology, 147(3), 170-180, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.020>
93. Garavaglia J., de Cassia de Souza Schneider R., Denis Camargo Mendes S., Elisa Welve J., Alcaraz Zini C., Bastos Caramão E., Valente P., Evaluation of *Zygosaccharomyces bailii* BCV 08 as a co-starter in wine fermentation for the improvement of ethyl esters production, Microbiological Research, 173, 59-65, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.02.002>
94. Contreras A., Hidalgo C., Schmidt S., Henschke A P., Curtin C., Varela C., The application of non-*Saccharomyces* yeast in fermentations with limited aeration as a strategy for the production of wine with reduced alcohol content, International Journal of Food Microbiology, 205, 7-15, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.027>
95. Whitener EB M., Stanstrup J., Carlin S., Divol B., Du Toit M., Vrhovsek U., Effect of non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile chemical profile of Shiraz wine, Australian Journal of Grape and Wine Research, 23(2), 179-192, 2017. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12269>
96. Contreras A., Hidalgo C., Henschke A P., Chambers J P., Curtin C., Varela C., Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts for the reduction of alcohol content in wine, Applied and Environmental Microbiology, 80(5), 1670-1678, 2014. <https://doi.org/10.1128/AEM.03780-13>
97. Di Maio S, Genna G, Gandolfo V, Amore G, Ciaccio M, Oliva D. Presence of *Candida zemplinina* in sicilian musts and selection of a strain for wine mixed fermentations, South African Journal of Enology and Viticulture, 33(1), 80-87, 2012. <https://doi.org/10.21548/33-1-1309>
98. Ferraro L., Fatichenti F., Ciani M., Pilot scale vinification process using immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae*, Process Biochemistry, 35(10), 1125-1129, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00148-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00148-5)

99. Fugelsang C K., Edwards G C., Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures, Second edition, Springer, 2007.
100. Carrascosa V A., Muñoz R., González R., Molecular Wine Microbiology, Academic Press, 2011.
101. Liu P-T., Lu L., Duan C-Q., Yan G-L., The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation, LWT – Food Science and Technology, 71, 356-363, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.031>
102. Naiman Ali M., Mazharuddin Khan M., Screening, identification and characterization of alcohol tolerant potential bioethanol producing yeasts, Current Research in Microbiology and Biotechnology, 2(1), 316-324, 2014.
103. Droby S., Wisniewski M., The fruit microbiome: A new frontier for postharvest biocontrol and postharvest biology, Postharvest Biology and Technology, 140, 107-112, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.03.004>
104. Abranches J., Vital J S M., Starmer T W., Mendonça-Hagler C L., Hagler N A., The yeast community and mycocin producers of guava fruit in Rio de Janeiro, Brazil, Mycologia, 92(1), 16-22, 2000. <https://doi.org/10.1080/00275514.2000.12061125>
105. Fleet H G., Yeasts in fruit and fruit products, in: Boekhout T., Robert V., Yeast in Food: Beneficial and detrimental aspects, Woodhead publishing LD and CRC Press LLC, p. 267-287, 2003.
106. Péter G., Takashima M., Čadež N., Yeast Habitats: Different but Global, in: Buzzini P., Lachance MA., Yurkov A., Yeasts in Natural Ecosystems: Ecology, Springer, p. 39-72, 2017.
107. Morais B P., Martins B M., Klaczko B L., Mendonça-Hagler C L., Hagler N A., Yeast succession in the amazon fruit Parahancornia amapa as resource partitioning among *Drosophila* spp, Applied and Environmental Microbiology, 61(12), 4251-4257, 1995. <https://doi.org/10.1128/aem.61.12.4251-4257.1995>
108. Kaur S., Non-*Saccharomyces* Yeast in Fermentation, in: Mishra S., Kumar S., Advances in Agricultural Biotechnology (Volume 2), Akinik Publications, p. 33-45, 2022.

109. Kántor A., Mareček J., Ivanišová E., Terentjeva M., Kačániová M., Microorganisms of grape berries, Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B, 71(6), 502-508, 2017. <https://doi.org/10.1515/prolas-2017-0087>
110. Chavan P., Mane S., Kulkarni G., Shaikh S., Ghormade V., Nerkar P D., Shouche Y., Deshpande V M., Natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India, Food Microbiology, 26(8), 801-808, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.05.005>
111. Bougreau M., Ascencio K., Bugarel M., Nightingale K., Loneragan G., Yeast species isolated from Texas High Plains vineyards and dynamics during spontaneous fermentations of Tempranillo grapes, PLoS One, 14(5), 1-15, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216246>
112. Pantelides S I., Christou O., Tsolakidou M-D., Tsaltas D., Ioannou N., Isolation, identification and in vitro screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes, Biological Control, 88, 46-53, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.04.021>
113. Garofalo C., Tristezza M., Grieco F., Spano G., Capozzi V., From grape berries to wine: population dynamics of cultivable yeasts associated to “Nero di Troia” autochthonous grape cultivar, Word Journal of Microbiology and Biotechnology, 32(59), 1-10, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2017-4>
114. Ghosh K S., Santra T., Chakravarty A., Study of Yeast Flora of Fruits and Their in Vitro Screening for Antagonistic Property Against *Penicillium Digitatum*, Biological science, 4(7), 410-413, 2015. <https://doi.org/10.36106/ijsr>
115. Zhao Y., Sun Q., Zhu S., Du F., Mao R., Liu L., Tian B., Zhu Y., Biodiversity of non-*Saccharomyces* yeasts associated with spontaneous fermentation of Cabernet Sauvignon wines from Shangri-La wine region, China, Scientific Reports, 11(1), 5150-5160, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83216-x>
116. Pelliccia C., Antonielli L., Corte L., Bagnetti A., Fatichenti F., Cardinali G., Preliminary prospection of the yeast biodiversity on apple and pear surfaces from Northern Italy orchards, Annals of Microbiology, 61(4), 965-72, 2011. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0220-y>

117. Vadkertiová R., Molnárová J., Vránová D., Sláviková E., Yeasts and yeast-like organisms associated with fruits and blossoms of different fruit trees, *Canadian Journal of Microbiology*, 58(12), 1344-1352, 2012. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0468>
118. Grondin E., Shum Cheong Sing A., Caro Y., Raherimandimby M., Lalanianina Randrianierenana A., James S., Nueno-Palop C., Marie François J., Petit T., A comparative study on the potential of epiphytic yeasts isolated from tropical fruits to produce flavoring compounds, *International Journal of Food Microbiology*, 203, 101-108, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.032>
119. Lorenzini M., Simonato B., Zapparoli G., Yeast species diversity in apple juice for cider production evidenced by culture-based method, *Folia Microbiologica*, 63(6), 677-684, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0609-0>
120. Glushakova M A., Kachalkin V A., Endophytic yeasts in *Malus domestica* and *Pyrus communis* fruits under anthropogenic impact, *Microbiology*, 86(1), 128-135, 2017. <https://doi.org/10.1134/S0026261716060102>
121. Kheireddine A., Palmieri D., Vitullo D., Barberio A., Zouaoui M., De Curtis F., Sadfi-Zouaoui N., Lima G., Characterization of new yeast isolates collected from different fruits in Tunisia and biocontrol activity against *Penicillium expansum* on apples, *Journal of Plant Pathology*, 103, 1169-1184, 2021. <https://doi.org/10.1007/s42161-021-00921-2>
122. Graça A., Santo D., Esteves E., Nunes C., Abadias M., Quintas C., Evaluation of microbial quality and yeast diversity in fresh-cut apple. *Food Microbiology*, 51, 179-185, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.003>
123. Ghosh S.. Study of yeast flora from fruit of *Syzygium cumini* (linn) skeel, *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2(8), 1166-1170, 2011. <https://doi.org/10.5251/abjna.2011.2.8.1166.1170>
124. Postmaster A., Sivasithamparam K., Turner W D., Enumeration and identity of microorganisms isolated from the surface of banana fruits at three developmental stages, *Scientia Horticulturae*, 69(3-4), 189-197, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00994-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00994-6)
125. Miller W M., Phaff J H., *Saccharomyces* E.C. Hansen, in: Kurtz C., Fell J., *The Yeasts, A Taxonomic Study*, Fourth edition, Elsevier, p. 372-373, 1998.

126. Onyema O V., Amadi C O., Moneke N A., Agu C R., A Brief Review: *Saccharomyces cerevisiae* Biodiversity Potential and Promising Cell Factories for Exploitation in Biotechnology and Industry Processes - West African Natural Yeasts Contribution, *Food Chemistry Advances*, 2, 100162, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100162>
127. Dimopoulou M., Troianou V., Toumpeki C., Gosselin Y., Dorignac É., Kotseridis Y., Effect of strains from different *Saccharomyces* species used in different inoculation schemes on chemical composition and sensory characteristics of Sauvignon blanc wine, *OENO One*, 54(4), 745-749, 2020. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2020.54.4.3240>
128. Eldarov A M., Mardanov V A., Metabolic Engineering of Wine Strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Genes*, 11(9), 964-984, 2020. <https://doi.org/10.3390/genes11090964>
129. Mendoza M L., *Saccharomyces cerevisiae*: A Key Yeast for the Wine-Making Process, in: Perez J., A Closer Look at Grapes, Wines and Winemaking, Nova Science Publishers, New York, p. 173-202, 2018.
130. Capece A., Pietrafesa R., Siesto G., Romaniello R., Condelli N., Romano P., Selected Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Strains as Profitable Strategy to Preserve Typical Traits of Primitivo Wine, *Fermentation*, 5(4), 87-104, 2019. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040087>
131. Boban A., Milanović V., Cardinali F., Radman S., Osimani A., Aquilanti L., Garofalo C., Rampanti G., Budić-Leto I., Unlocking the potential of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* from Maraština grapes for use as starter cultures in the winemaking process, *Applied Food Research*, 5(2), 101145, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2025.101145>
132. Padilla B., Gil V J., Manzanares P., Challenges of the non-Conventional Yeast *Wickerhamomyces anomalus* in Winemaking, *Fermentation*, 4(3), 68-82, 2018. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030068>
133. Morata A., Red wine technology, Academic Press, 2019.
134. Jolly P N., Varela C., Pretorius S I., Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered, *FEMS Yeast Research*, 14(2), 215-237, 2014. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12111>

135. Jolly P N., Augustyn P H O., Pretorius S I., The Role and Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production, South African Journal of Enology and Viticulture, 27(1), 15-39, 2006. <https://doi.org/10.21548/27-1-1475>
136. Holm Hansen E., Nissen P., Sommer P., Nielsen C J., Arneborg N., The effect of oxygen on the survival of non-*Saccharomyces* yeasts during mixed culture fermentations of grape juice with *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Applied Microbiology, 91(3), 541-547, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01426.x>
137. Andorrà I., Landi S., Mas A., Esteve-Zarzoso B., Guillamón M J., Effect of fermentation temperature on microbial population evolution using culture-independent and dependent techniques, Food Research International, 43(3), 773-779, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.11.014>
138. Erten H., Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18(4), 377-382, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1015221406411>
139. Cordero-Bueso G., Esteve-Zarzoso B., Mariano Cabellos J., Gil-Díaz M., Arroyo T., Biotechnological potential of non-*Saccharomyces* yeasts isolated during spontaneous fermentations of Malvar (*Vitis vinifera* cv. L.), European Food Research and Technology, 236(1), 193-207, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1874-9>
140. Comitini F., Capece A., Ciani M., Romano P., New insights on the use of wine yeasts, Current Opinion in Food Science, 13, 44-49, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.005>
141. López S., Mateo J J., Maicas S., Characterisation of *Hanseniaspora* isolates with potential aroma-enhancing properties in muscat wines, South African Journal of Enology and Viticulture, 35(2), 292-303, 2014.
142. Aranda A., Enological Repercussions of Non-*Saccharomyces* Species, Fermentation, 5(3), 68-72, 2019. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030068>
143. Smith T M., *Hanseniaspora* Zikes, in: Kurtz C., Fell J., The Yeasts, A Taxonomic Study, Fourth edition, Elsevier, p. 214-220, 1998.

144. Ciani M., Fatichenti F., Selective sugar consumption by apiculate yeasts, *Letters in Applied Microbiology*, 28(3), 203-206, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00505.x>
145. Martin V., Jose Valera M., Medina K., Boido E., Carrau F., Oenological Impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* Yeast Genus on Wines - A Review, *Fermentation*, 4(3), 76-97, 2018. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030076>
146. Vontrobová E., Kubizniaková P., Fiala J., Sochor J., Matoulková D., Autochthonous yeasts as one of the tools to produce wines by original technologies, *Kvasny Prumysl*, 65(1), 38-45, 2019. <https://doi.org/10.18832/kp2019.65.38>
147. Romano P., Braschi G., Siesto G., Patrignani F., Lanciotti R., Role of Yeasts on the Sensory Component of Wines, *Foods*, 11(13), 1921-1944, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11131921>
148. Victoria Mestre M., Paola Maturano Y., Gallardo C., Combina M., Mercado L., Eugenia Toro M., Carrau F., Vazquez F., Dellacassa E., Impact on Sensory and Aromatic Profile of Low Ethanol Malbec Wines Fermented by Sequential Culture of *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* Native Yeasts, *Fermentation*, 5(3), 65- 80, 2019. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030065>
149. Andorrà I., Berradre M., Rozès N., Mas A., Guillamón M J., Esteve-Zarzoso B., Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations, *European Food Research and Technology*, 231(2), 215-224, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1272-0>
150. García M., Esteve-Zarzoso B., Arroyo T., Non-*Saccharomyces* Yeasts: Biotechnological Role for Wine Production, in: Morata A., Loira I., *Grape and Wine Biotechnology*, InTech, p. 249-271, 2016.
151. Manuel Del Fresno J., Loira I, Escott C., Carrau F, González C., Cuerda R., Morata A., Application of *Hanseniaspora vineae* Yeast in the Production of Rosé Wines From a Blend of Tempranillo and Albillo Grapes, *Fermentation*, 7(3), 141-156, 2021. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030141>
152. Zhang B-Q., Shen J-Y., Duan C-Q., Yan G-L., Use of indigenous *Hanseniaspora vineae* and *Metschnikowia pulcherrima* Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*

- to improve the aroma diversity of Vidal blanc icewine, *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-12. 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02303>
153. Martin V., Boido E., Giorello F., Mas A., Dellacassa E., Carrau F., Effect of yeast assimilable nitrogen on the synthesis of phenolic aroma compounds by *Hanseniaspora vineae* strains, *Yeast*, 33(7), 323-328, 2016. <https://doi.org/10.1002/yea.3159>
154. Martin V., Giorello F., Fariña L., Minteguiaga M., Salzman V., Boido E., Aguilar S P., Gaggero C., Dellacassa E., Mass A., Carrau F., *De Novo* Synthesis of Benzenoid Compounds by the Yeast *Hanseniaspora vineae* Increases the Flavor Diversity of Wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(22), 4574-4583, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05442>
155. Manuel Del Fresno J., Escott C, Loira I., Enrique Herbert-Pucheta J., Schneider R., Carrau F., Cuerda R., Morata A., Impact of *Hanseniaspora vineae* in Alcoholic Fermentation and Ageing on Lees of High-Quality White Wine, *Fermentation*, 6(3), 66-80, 2020. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030066>
156. Rojas V., Gil V J., Piñaga F., Manzanares P., Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations, *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 181-188, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00255-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00255-1)
157. van Wyk N., Badura J., von Wallbrunn C., Pretorius S I., Exploring future applications of the apiculate yeast *Hanseniaspora*, *Critical Reviews in Biotechnology*, 44(1), 100-119, 2024. <https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2136565>
158. Moreira N., Mendes F., Guedes de Pinho P., Hogg T., Vasconcelos I., Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must, *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), 231-238, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.025>
159. Medina K., Boido E, Fariña L., Gioia O., Gomez E M., Barquet M., Gaggero C., Dellacassa E., Carrau F., Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*, *Food Chemistry*, 141(3), 2513-2521, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.056>
160. Manuel Del Fresno J., Escott C., Loira I., Carrau F., Cuerda R., Schneider R., Antonia Bañuelos M., González C., Antonio Suárez-Lepe J., Morata A., The Impact of

- Hanseniaspora vineae* Fermentation and Ageing on Lees on the Terpenic Aromatic Profile of White Wines of the Albillo Variety, International Journal of Molecular Sciences, 22(4), 2195-2209, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22042195>
161. Kurtzman C., *Pichia* E.C. Hansen emend. Kurtzman, in Kurtzman C., Fell J., The Yeasts, A Taxonomic Study, Fourth edition, Elsevier, p. 273-352, 1998.
162. Abbas Kadhim R., Al-Saadoon H A., Al-Mahmoud A W., Morphological and phylogenetic identification of *Pichia* species associated with foods in Basrah, Iraq, Basrah Journal of Science, 37(2), 223-236, 2019. <https://doi.org/10.29072/basjs.20190206>
163. Maicas S., Mateo J J., The Life of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Yeasts in Drinking Wine, Microorganisms, 11(5), 1178-1192, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051178>
164. Rojas V., Gil V J., Piñaga F., Manzanares P., Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts, International Journal of Food Microbiology, 70(3), 283-289, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00552-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00552-9)
165. Clemente-Jimenez M J., Mingorance-Cazorla L., Martínez-Rodríguez S., Las Heras-Vázquez J F., Rodríguez-Vico F., Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation, International Journal of Food Microbiology, 98(3), 301-308, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.007>
166. Ugliano M., Henschke A P., Yeast and Wine Flavour, in Moreno-Arribas V., Polo C., Wine Chemistry and Biochemistry, Springer, p. 313-392, 2009.
167. Domizio P., Romani C., Comitini F., Gobbi M., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M., Potential spoilage non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*, Annals of Microbiology, 61(1), 137-144, 2011. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0125-1>
168. Gao M., Hu J., Wang X., Zhang H., Du Z., Ma L., Du L., Zhang H., Tian X., Yang W., Effects of *Pichia kluyveri* on the flavor characteristics of wine by co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*, European Food Research and Technology, 249(6), 1449-1460, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04224-x>
169. Anfang N., Brajkovich M., Goddard R M., Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in Sauvignon Blanc, Australian Journal of Grape and Wine Research, 15(1), 1-8, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x>

170. Benito S., Morata A., Palomero F., González C M., Suárez-Lepe A J., Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies, *Food Chemistry*, 124(1), 15-23, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.096>
171. Izquierdo Cañas M P., García-Romero E., Heras Manso M J., Fernández-González M., Influence of sequential inoculation of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae* in the quality of red wines, *European Food Research and Technology*, 239(2), 279-286, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2220-1>
172. Benito S., The impact of *Torulaspota delbrueckii* yeast in winemaking, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(7), 3081-3094, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-8849-0>
173. Kurtzman C., *Torulaspota* Linder, in: Kurtzman C., Fell J., *The Yeasts, A Taxonomic Study*, Fourth edition, Elsevier, p. 404-408, 1998.
174. Manuel Del Fresno J., Morata A., Loira I., Antonia Bañuelos M., Escott C., Benito S., González Chamorro C., Antonio Suárez-Lepe J., Use of non-*Saccharomyces* in single-culture, mixed and sequential fermentation to improve red wine quality, *European Food Research and Technology*, 243(12), 2175-2185, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2920-4>
175. Antonia Bañuelos M., Loira I., Escott C., Manuel Del Fresno J., Morata A., Sanz D P., Otero L., Antonio Suárez-Lepe J., Grape Processing by High Hydrostatic Pressure: Effect on Use of Non-*Saccharomyces* in Must Fermentation, *Food and Bioprocess Technology*, 9(10), 1769-1778, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1760-8>
176. Puertas B., Jiménez J M., Cantos-Villar E., Cantoral M J., Rodríguez E M., Use of *Torulaspota delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in semi-industrial sequential inoculation to improve quality of Palomino and Chardonnay wines in warm climates, *Journal of Applied Microbiology*, 122(3), 733-746, 2017. <https://doi.org/10.1111/jam.13375>
177. Ciani M., Maccarelli F., Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(2), 199-203, 1997. <https://doi.org/10.1023/A:1008825928354>

178. Chacon-Rodriguez L., Lucy Joseph M C., Nazaris B., Coulon J., Richardson S., Dycus A D., Innovative Use of Non-*Saccharomyces* in Bio-Protection: *T. delbrueckii* and *M. pulcherrima* Applied to a Machine Harvester, *Catalyst Discovery into Practice*, 4(2), 82-90, 2020. <https://doi.org/10.5344/catalyst.2020.2000>
179. Loira I., Vejarano R., Bañuelos A M., Morata A., Tesfaye W., Uthurry C, Villa A., Cintora I., Antonio Suárez-Lepe J., Influence of sequential fermentation with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality, *LWT - Food Science and Technology*, 59(2P1), 915-922, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.019>
180. Zhang B., Ivanova-Petropulos V., Duan C., Yan G., Distinctive chemical and aromatic composition of red wines produced by *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentation with indigenous and commercial non-*Saccharomyces* strains, *Food Bioscience*, 41, 100925, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.100925>
181. Renault P., Coulon J., de Revel G., Barbe J-C., Bely M., Increase of fruity aroma during mixed *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* wine fermentation is linked to specific esters enhancement, *International Journal of Food Microbiology*, 207, 40-48, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.037>
182. Wang Y., Qi X-Y., Fu Y., Zhang Q., Wang X-H., Cui M-Y., Ma Y-Y., Gao X-L., Effects of *Torulaspora delbrueckii* co-fermented with *Saccharomyces cerevisiae* on physicochemical and aromatic profiles of blueberry fermented beverage, *Food Chemistry*, 403, 135284, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135284>
183. Wang Y., Fu Y., Zhang Q., Zhu Y., Yang Q., Bian C., Zhao L-l., Chen Q., Bi H-J., Yang X-H., Gao X-L., Enhancement of ester biosynthesis in blueberry wines through co-fermentation via cell-cell contact between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Research International*, 179, 114029, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114029>
184. Miller W M., Phaff J H., *Metschnikowia* Kamienski, in Kurtzam C., Fell J., *The Yeasts, A Taxonomic Study*, Elsevier, p. 256-267, 1998.
185. Morata A., Loira I., Escott C., Manuel del Fresno J., Antonia Bañuelos M, Antonio Suárez-Lepe J., Applications of *Metschnikowia pulcherrima* in wine biotechnology, *Fermentation*, 5(3), 63-72, 2019. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030063>

186. Belda I., Ruiz J., Esteban-Fernández A., Navascués E., Marquina D., Santos A., Victoria Moreno-Arribas M, Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement, *Molecules*, 22(2), 189-218, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22020189>
187. Reid VJ, Theron LW, Toit M Du, Divol B. Identification and partial characterization of extracellular aspartic protease genes from *Metschnikowia pulcherrima* IWBT Y1123 and *Candida apicola* IWBT Y1384, *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19), 6838-6849, 2012. <https://doi.org/10.1128/AEM.00505-12>
188. Aranda A., Enological repercussions of non-*Saccharomyces* species, *Fermentation*, 5(3), 68-72, 2019. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030068>
189. Aplin J J., Paup D V., Ross F C., Edwards G C., Chemical and Sensory Profiles of Merlot Wines Produced by Sequential Inoculation of *Metschnikowia pulcherrima* or *Meyerzima guilliermondii*, *Fermentation*, 7(3), 126-136, 2021. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030126>
190. Hranilovic A., Gambetta M J., Jeffery W D., Grbin R P., Jiranek V., Lower-alcohol wines produced by *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces cerevisiae* co-fermentations: The effect of sequential inoculation timing, *International Journal of Food Microbiology*, 329, 108651, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108651>
191. Varela C., Sengler F., Solomon M., Curtin C., Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*, *Food Chemistry*, 209, 57-64, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.024>
192. Benito S., The impacts of *Schizosaccharomyces* on winemaking, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(11), 4291-4312, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09827-7>
193. Vaughan-Martini A., Martini A., *Schizosaccharomyces* Linder, in Kurtz C., Fell J., *The Yeasts, A Taxonomic Study*, Fourth edition, Elsevier, p. 391-394, 1998.
194. Benito S., Ruiz J., Belda I., Kiene F., Beisert B., Navascués E., Marquina D., Calderón F., Santos A., Rauhut D., Application of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Wine Production, in: Sibirny A., *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*, Springer, p. 75-90, 2019.

195. Benito Á., Calderón F., Benito S., The Influence of Non-*Saccharomyces* Species on Wine Fermentation Quality Parameters, *Fermentation*, 5(3), 54-72, 2019. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030054>
196. Vilela A., Use of Nonconventional Yeasts for Modulating Wine Acidity, *Fermentation*, 5(1), 27-42, 2019. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010027>
197. Peinado A R., Maestre O., Mauricio C J., Moreno J J., Use of a *Schizosaccharomyces pombe* mutant to reduce the content in gluconic acid of must obtained from rotten grapes, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2368-2377, 2009. <https://doi.org/10.1021/jf803479r>
198. Benito S., Palomero F., Morata A., Calderón F., Palmero D., Antonio Suárez-Lepe J., Physiological features of *Schizosaccharomyces pombe* of interest in making of white wines, *European Food Research and Technology*, 236(1), 29-36, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1836-2>
199. Neslihan Ivit N., Kemp B., The Impact of Non-*Saccharomyces* Yeast on Traditional Method Sparkling Wine, *Fermentation*, 4(3), 73-97, 2018. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030073>
200. Benito S., The impacts of *Lachancea thermotolerans* yeast strains on winemaking, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(16), 6775-6790, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9117-z>
201. Lachance A M., *Kluyveromyces* van der Walt emend. van der Walt, in Kurtz C., Fell J., *The Yeasts, A Taxonomic Study*, Fourth edition, Elsevier, p. 227-247, 1998.
202. Morata A., Loira I., Tesfaye W., Antonia Bañuelos M., González C., Antonio Suárez Lepe J., *Lachancea thermotolerans* Applications in Wine Technology, *Fermentation*, 4(3), 53-65 2018. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030053>
203. Benito Á., Calderón F., Palomero F., Benito S., Quality and Composition of Airén Wines Fermented by Sequential Inoculation of *Lachancea thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Technology and Biotechnology*, 54(2), 135-144, 2016. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.02.16.4220>
204. Gobbi M., Comitini F., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M., *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, 2013.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.004>
205. Ponsone L M., Nally C M., Chiotta L M., Combina M., Köhl J., Chulze N S., Evaluation of the effectiveness of potential biocontrol yeasts against black sur rot and ochratoxin A occurring under greenhouse and field grape production conditions, *Biological Control*, 103, 78-85, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.07.012>
206. Binati L R., Lemos Junior J F W., Luzzini G., Slaghenaufi D., Ugliano M., Torriani S., Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine volatile and sensory diversity: A study on *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia* spp. and *Starmerella bacillaris* strains isolated in Italy, *International Journal of Food Microbiology*, 318, 108470, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108470>
207. Ženišová K., Cabicarová T., Sidari R., Kolek E., Pangallo D., Szemes T., Kuchta T., Effects of co-fermentation with *Lachancea thermotolerans* or *Metschnikowia pulcherrima* on concentration of aroma compounds in Pinot Blanc wine, *Journal of Food and Nutrition Research*, 60(1), 87–91, 2021.
208. Meyer A S., Payne W R., Yarrow D., *Candida* Berkhout, in Kurtz C., Fell J., *The Yeasts, A Taxonomic Study*, Fourth edition, Elsevier, p. 454-573, 1998.
209. Magyar I., Tóth T., Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Microbiology*, 28(1), 94-100, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.08.011>
210. Englezos V., Giacosa S., Rantsiou K., Rolle L., Cocolin L., *Starmerella bacillaris* in winemaking: opportunities and risks, *Current Opinion in Food Science*, 17, 30-35, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.08.007>
211. Englezos V., Torchio F., Cravero F., Marengo F., Giacosa S., Gerbi V., Rantsiou K., Rolle L., Cocolin L., Aroma profile and composition of Barbera wines obtained by mixed fermentations of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) and *Saccharomyces cerevisiae*, *LWT*, 73, 567-575, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.063>
212. Soden A., Francis L I., Oakey H., Henschke A P., Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of

- Chardonnay wine, Australian Journal of Grape and Wine Research, 6(1), 21-30, 2000.  
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00158.x>
213. Kapsopoulou K., Kapaklis A., Spyropoulos H., 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, 2005.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-005-8220-3>
214. Guerra E., Mannazzu I., Sordi G., Tangherlini M., Clementi F., Fatichenti F., Characterization of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* from the Italian region of Marche: hunting for new strains for local wine quality improvement, Annali di Microbiologia ed Enzimologia, 49, 79-88, 1999.
215. Tristezza M., Fantastico L., Vetrano C., Bleve G., Corallo D., Grieco F., Mita G., Grieco F., Molecular and Technological Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Natural Fermentation of Susumaniello Grape Must in Apulia, Southern Italy, International Journal of Microbiology, 2014(10), 897428, 2014.  
<https://doi.org/10.1155/2014/897428>
216. Feghali N., Bianco A., Zara G., Tabet E., Ghanem C., Budroni M., Selection of *Saccharomyces cerevisiae* Starter Strain for Merwah Wine, Fermentation, 6(2), 43-54, 2020. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020043>
217. Rainieri S., Pretorius S I., Selection and improvement of wine yeasts, Annals of Microbiology, 50, 15-31, 2000.
218. Bonciani T., De Vero L., Mezzetti F., Fay C J., Giudici P., A multi-phase approach to select new wine yeast strains with enhanced fermentative fitness and glutathione production, Applied Microbiology and Biotechnology, 102(5), 2269-2278, 2018.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-8773-3>
219. Mannazzu I., Clementi F., Ciani M., Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters, in Ciani M., Biodiversity and biotechnology of wine yeasts, Reserach Signpost, p. 19-35, 2002.
220. Durão Vieira É., da Graça Stupiello Andrietta M., Roberto Andrietta S., Yeast biomass production: a new approach in glucose-limited feeding strategy, Brazilian Journal of Microbiology, 44(2), 551-558, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000200035>

221. Gracious M., Nandakumar S., Optimization of *Bacillus subtilis* PW12 biomass production using RSM: a preliminary study towards single-cell protein production for aquaculture, *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 13(1), 83-92, 2024. <https://doi.org/10.7324/JABB.2024.177031>
222. Liu X., Jeyakumar John Martin J., Li X., Zhou L., Li R., Li Q., Zhang J., Fu D., Cao H., Optimization of the fermentation culture conditions of *Bacillus amyloliquefaciens* ck-05 using response surface methodology, *Frontiers in Microbiology*, 16, 1-17, 2025. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1552645>
223. Chisti Y., Moo-Young M., Bioreactors, in Meyers A R., *Encyclopedia of Physical Science and Technology*, Third edition, Elsevier, p. 247-271, 2003.
224. Liu J., Li G., Sui Y., Optimization of Culture Medium Enhances Viable Biomass Production and Biocontrol Efficacy of the Antagonistic Yeast, *Candida diversa*, *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-7, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02021>
225. Stehlik-Tomas V., Gulan Zetić V., Stanzer D., Grba S., Vahčić N., Zinc, copper and manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Technology and Biotechnology*, 42(2), 115-120, 2004.
226. Cheung T., Ko J., Lee J., Manpreet T., The effect of temperature on the growth rate of *Saccharomyces cerevisiae*, *The Expedition*, 4, 1-10, 2014.
227. Liu X., Jia B., Sun X., Ai J., Wang L., Wang C., Zhao F., Zhan j., Huang W., Effect of Initial PH on Growth Characteristics and Fermentation Properties of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Food Science*, 80(4), M800-M808, 2015. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12813>
228. Pérez-Torrado R., Gamero E., Gómez-Pastor R., Garre E., Aranda A., Matallana E., Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food industry, *Trends in Food Science & Technology*, 46(2), 167-175, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.10.008>
229. Kaur S., Kaur K., Bhushan B., Kaur M., Hans M., Inoculum Size and Age Studies on Single and Mixed Strain Fermentation of Grape Juice, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(3), 2137-2145, 2020. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.3.54>

230. Jasem Mohammed Breig S., Jaber Kadhum Luti K., Response surface methodology: A review on its applications and challenges in microbial cultures, *Materials Today: Proceedings*, 42(5), 2277-2284, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.316>
231. Rodrigues L., Teixeira J., Oliveira R., van der Mei C H., Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria, *Process Biochemistry*, 41(1), 1-10, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.030>
232. Almeida Bezerra M., Erthal Santelli R., Padua Oliveira P., Silveira Villar L., Amélia Escalera L., Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 76(5), 965-977, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>
233. Panesar S P., Application of response surface methodology in the permeabilization of yeast cells for lactose hydrolysis, *Biochemical Engineering Journal*, 39(1), 91-96, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2007.08.017>
234. Baş D., Boyacı H I., Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *Journal of Food Engineering*, 78(3), 836-845, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>
235. Sánchez Blanco A., Palacios Durive O., Batista Pérez S., Díaz Montes Z., Pérez Guerra N., Simultaneous production of amylases and proteases by *Bacillus subtilis* in brewery wastes, *Brazilian Journal of Microbiology*, 74(3), 665-674, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.019>
236. Vera Candiotti L., De Zan M M., Cámara S M., Goicoechea C H., Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, *Talanta*, 124, 123-138, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.034>
237. Ferreira L C S., Bruns E R., Ferreira S H., Matos D G., David M J., Brandão C G., da Silva G P E., Portugal A I., dos Reis S R., Souza S A., dos Santos N L W., Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>
238. Tennalli B G., Hungund S B., Jain M A., Response surface methodology mediated optimization of serine protease by *Salinicola tamaricis* BGN2 isolated from the West Coast

- of India and its application in culturing of MCF7 cell line, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 14(3), 119-135, 2024. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2024.162421>
239. Plackett L R., Burman P J., The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305-325, 1946. <https://doi.org/10.1093/biomet/33.4.305>
240. Lazarević A., Lazarević D., Non-linear mathematical models in the theory of experimental design: Application in the manufacturing processes, *Facta Universitatis, Series: Mechanical Engineering*, 13(2), 181-191, 2015.
241. Keskin Gündoğdu T., Deniz İ., Çalışkan G., Sefa Şahin E., Azbar N., Experimental design methods for bioengineering applications, *Critical Reviews in Biotechnology*. 36(2), 368-388, 2016. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.973014>
242. Montgomery D., *Design and Analysis of Experiments.*, Eight edition, John Wiley & Sons, Inc, 2012.
243. Granato D., Maria de Araújo Calado V., The use and importance of design of experiments (DOE) in process modelling in food science and technology, in Granato D., Ares G., *Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology*, Wiley Blackwell, p. 3-18, 2014.
244. Nwabueze U T., Basic steps in adapting response surface methodology as mathematical modelling for bioprocess optimisation in the food systems, *International Journal of Food Science and Technology*, 45(9), 1768-1776, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02256.x>
245. Zhang Y., Liu Z., Li Y., Chi R., Optimization of ionic liquid-based microwave-assisted extraction of isoflavones from *Radix puerariae* by response surface methodology, *Separation and Purification Technology*, 129, 71-79, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.03.022>
246. del Castillo E., *Process Optimization, A Statistical Approach*, Springer US, 2007.
247. Derringer G., Suich R., Simultaneous Optimization of Several Response Variables, *Journal of Quality Technology*, 12(4), 214-219, 1980. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>
248. Jeong I-J., Kim K-J., An interactive desirability function method to multiresponse optimization, *European Journal of Operational Research*, 195(2), 412-426, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejor.2008.02.018>

249. Sivakumar T., Manavalan R., Valliappan K., Global optimization using Derringer's desirability function: enantioselective determination of ketoprofen in formulations and in biological matrices, *Acta Chromatographica*, 19, 29-47, 2007.
250. Jakšić D., Bradić I., Beader M., Ristić M., Popović D., Mošič I., Dodok I., *Vinogradarstvo i vinarstvo Srbije: Analiza sektora proizvodnje i prerade grožđa i proizvodnje vina*. Centar za vinogradarstvo i vinarstvo Niš, Niš, 2019.
251. Garić M, Radojević I, Nikolić D, Rakonjac V, Petrović A, Ranković-Vasić Z, et al. Production and technological characteristics of the prokupac wine variety in the Niš wine-growing region. 2<sup>nd</sup> International Symposium on Biotechnology, Proceedings, 155-161, 2024. <https://doi.org/10.46793/SBT29.20MG>
252. Avramov L., Žunić D., *Posebno vinogradarstvo*, Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd, 2001.
253. Menković N., Zivković J., Savikin K., Godjevac D., Zdunić G., Phenolic composition and free radical scavenging activity of wine produced from Serbian autochthonous grape variety Prokupac: A model approach, *Journal of the Serbian Chemical Society*, 79(1), 11-24, 2014. <https://doi.org/10.2298/JSC130511089M>
254. Jakšić D., Bradić I., Ristić M., Koković N., Stefanović D., Mošič I., Aleksić J., Zeljić Stojiljković K., Bonello F., Ragkousi V., *Sorta vinove loze Bagrina*, Centar za vinogradarstvo i vinarstvo Niš, Niš, 2023.
255. Žunić D., Garić M., Ristić M., Ranković V., Radojević I., Mošič I., *Atlas sorti vinove loze*, Centar za vinogradarstvo i vinarstvo Niš, Niš, 2009.
256. Karabegović I., Stamenković Stojanović S., Mančić S., Đorđević N., Malićanin M., Danilović B., *Sensory profile of commercially available Prokupac wines*, 4<sup>th</sup> Agrotourism conference with international participation, 23-24 May, 2024, Prokuplje, Serbia, *Book of Abstract*, p. 88.
257. Jakšić D., Bradić I., Beader M., Milić R., Ristić M., *Autohtone i regionalne sorte vinove loze Srbije*, Centar za vinogradarstvo i vinarstvo Niš, Niš, 2019.
258. Sokovic Bajic S., Djokic J., Dinic M., Veljovic K., Golic N., Mihajlovic S., Tolinacki M., GABA-Producing Natural Dairy Isolate From Artisanal Zlata Cheese Attenuates Gut Inflammation and Strengthens Gut Epithelial Barrier *in vitro*, *Frontiers in Microbiology*, 10, 527-540, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00527>

259. Fujita I S., Senda Y., Nakaguchi S., Hashimoto T., Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains, *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10), 3617-3622, 2001. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.10.3617-3622.2001>
260. Popović N., Ispitivanje probiotičkih i imunomodulatornih karakteristika prirodnih izolata enterokoka u modelima *in vitro* i *in vivo*, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd, 2019.
261. Peris D., Pérez-Través L., Belloch C., Querol A., Enological characterization of Spanish *Saccharomyces kudriavzevii* strains, one of the closest relatives to parental strains of winemaking and brewing *Saccharomyces cerevisiae* × *S. kudriavzevii* hybrids, *Food Microbiology*, 53, 31-40, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.07.010>
262. Tikka C., Prasad Osuru H., Atluri N., Chakravarthi Veera Raghavulu P., Kumar Yellapu N., Shaik Mannur I., Venkateswara Prasad U., Aluru S., Varma K N., Bhaskar M., Isolation and characterization of ethanol tolerant yeast strains, *Bioinformation*, 9(8), 421-425, 2013. <https://doi.org/10.6026/97320630009421>
263. Guidelines for the characterization of wine yeasts of the genus *Saccharomyces* isolated from vitivinicultural environments, OIV-OENO 370-2012, International Organisation of Vine and Wine, 2012.
264. Gutiérrez A., Boekhout T., Gojkovic Z., Katz M., Evaluation of non-*Saccharomyces* yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages, *Journal of the Institute of Brewing*, 124(4), 389-402, 2018. <https://doi.org/10.1002/jib.512>
265. Gump H B., Zoecklein W B.; Fugelsang C K., Prediction of Prefermentation Nutritional Status of Grape Juice: The Formol Method, in Spancer F T J., de Ragout Spencer L A., *Food Microbiology Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, USA, p. 283-296, 2000. <https://doi.org/10.1385/1-59259-029-2:283>
266. Pravilnik o parametrima i metodama za analizu i utvrđivanje kvaliteta šire, vina i drugih proizvoda od grožđa, šire, kljuka i vina koji se koriste u proizvodnji vina, Službeni glasnik RS, br. 107/2014-92 i 72/2023-30.

267. Glories Y., La couleur des vins rouges. 2e partie : mesure, origine et interprétation, *Connaissance de la vigne et du vin*, 18(4), 253-271, 1984. <https://doi.org/10.20870/oenone.1984.18.4.1744>
268. Castellari M., Versari A., Spinabelli U., Galasii S., Amati A., An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates, and alcohols in grape musts and wines, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23(13), 2047-2056, 2000. <https://doi.org/10.1081/JLC-100100472>
269. Abonyi Mensah T., Matilda Ayorkor Tagoe S., Measurement of Yeast Growth Using Spectrophotometer, Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Cape Coast, Cape Coast, Ghana, 1-10, 2019.
270. Malairuang K., Krajang M., Sukna J., Rattanapradit K., Chamsart S., High Cell Density Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* with Intensive Multiple Sequential Batches Together with a Novel Technique of Fed-Batch at Cell Level (FBC), *Processes*, 8(10), 1321-1347, 2020. <https://doi.org/10.3390/pr8101321>
271. Isia I., Sukmono Y., Hadibarata T., Yilmaz M., Enhancing the Biosorption Potential of *Pichia kluyveri* FM012 for 4-Bromophenols, Water, Air, & Soil Pollution, 235(4), 1-15, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11270-024-07074-9>
272. El-Latif Hesham A., Mostafa S Y., Essa Omar AlSharqi L., Optimization of Citric Acid Production by Immobilized Cells of Novel Yeast Isolates, *Mycobiology*, 48(2), 122-132, 2020. <https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1726854>
273. Méndez-Zamora A., Oswaldo Gutiérrez-Avenidaño D., Arellano-Plaza M., Javier De la Torre González F., Barrera-Martínez I., Gschaedler Mathis A., Casas-Godoy L., The non-*Saccharomyces* yeast *Pichia kluyveri* for the production of aromatic volatile compounds in alcoholic fermentation, *FEMS Yeast Research*, 20(8), 1-14, 2020. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa067>
274. Segura-García E L., Taillandier P., Brandam C., Gschaedler A., Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium, *LWT - Food Science and Technology*, 60(1), 284-291, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.005>

275. Ghosalkar A., Sahai V., Srivastava A., Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production, *Bioresource Technology*, 99(16), 7906-7910, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.059>
276. Kurtzman P C., Fell W J., *The Yeast: A Taxonomic Study*, Fourth edition, Springer, 1998.
277. Pravilnik o postupku i metodama senzornog ocenjivanja vina, načinu obuke i provere stručne osposobljenosti senzornih ocenjivača, Službeni glasnik RS, br. 93/2015.
278. ISO 3591:1977 - Sensory analysis - Apparatus - Wine-tasting glass.
279. Chatterjee S., Ghosh B., Ray R R., Isolation and characterization of local yeast strains from waste fruit juices, jaggery and dahi samples, *International Journal of Chemical Sciences*, 9(2), 647-656, 2011.
280. Lentz M., Putzke T., Hessler R., Luman E., Genetic and physiological characterization of yeast isolated from ripe fruit and analysis of fermentation and brewing potential, *J Inst Brew*, 120(4), 559-564, 2014. <https://doi.org/10.1002/jib.154>
281. Gschaedler A., Iñiguez-Muñoz E L., Flores-Flores Y N., Kirchmayr M., Arellano-Plaza M., Use of non-*Saccharomyces* yeasts in cider fermentation: Importance of the nutrients addition to obtain an efficient fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 347, 109169, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109169>
282. Molnárová J., Vadkertiová R., Stratilová E., Extracellular enzymatic activities and physiological profiles of yeasts colonizing fruit trees, *Journal of Basic Microbiology*, 54(S1), S74-S84, 2014. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300072>
283. Lai Y-T., Hsieh C-W., Lo Y-C., Liou B-K., Lin H-W, Hou C-Y., Cheng K-C., Isolation and identification of aroma-producing non-*Saccharomyces* yeast strains and the enological characteristic comparison in wine making, *LWT*, 154, 112653, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112653>
284. Millard T J., Peck F R., Beachy M T., Hepburn L V., Fermentation Gone Wild: A Biochemistry Laboratory Experiment, *Journal of Chemical Education*, 100(8), 3076-3080, 2023. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.3c00499>
285. Wang X-C., Li A-H., Dizey M., Ullah N., Sun W-X., Tao Y-S., Evaluation of aroma enhancement for “Ecolly” dry white wines by mixed inoculation of selected *Rhodotorula*

- mucilaginoso* and *Saccharomyces cerevisiae*, Food Chemistry, 228, 550-559, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.113>
286. Tansel Yalçın H., Fındık B., Terzi Y., Uyar E., Shatila F., Isolation and molecular identification of industrially important enzyme producer yeasts from tree barks and fruits, Archives of Microbiology, 203(3), 1079-1088, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02104-6>
287. Vigentini I., Berrera Cardenas S., Valdetara F., Faccincani M., Panont A C., Picozzi C., Foschino R., Use of Native Yeast Strains for In-Bottle Fermentation to Face the Uniformity in Sparkling Wine Production, Frontiers in Microbiology, 8, 1225-1235, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01225>
288. Capece A., Granchi L., Guerrini S., Mangani S., Romaniello R., Vincenzini M., Romano P., Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Two Italian Wine-Producing Regions, Frontiers in Microbiology, 7, 1018-1029, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01018>
289. Bianchi F., Avesani M., Lorenzini M., Zapparoli G., Simonato B., Fermentation Performances and Aroma Contributions of Selected Non-*Saccharomyces* Yeasts for Cherry Wine Production, Foods, 13(15), 2455-2470, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods13152455>
290. Aponte M., Blaiotta G., Potential Role of Yeast Strains Isolated from Grapes in the Production of Taurasi DOCG, Frontiers in Microbiology, 7, 809-820, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00809>
291. Agarbati A., Canonico L., Ciani M., Comitini F., Fitness of Selected Indigenous *Saccharomyces cerevisiae* Strains for White Piceno DOC Wines Production, Fermentation, 4(2), 37-48, 2018. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020037>
292. Iris L., Antonio M., María Antonia B., José Antonio S-L., Isolation, Selection, and Identification Techniques for Non-*Saccharomyces* Yeasts of Oenological Interest, in Mihai Grumezescu A., Maria Holban A., Biotechnological Progress and Beverage Consumption Volume 19: The Science of Beverages, Elsevier Inc., p. 467-508, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816678-9.00015-1>

293. Comi G., Romano P., Cocolin L., Fiore C., Characterization of *Kloeckera apiculata* strains from the Friuli region in Northern Italy, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(4), 391-394, 2001. <https://doi.org/10.1023/A:1016731420425>
294. Serafino G., Di Gianvito P., Giacosa S., Škrab D., Cocolin L., Englezos V., Rantsiou K., Survey of the yeast ecology of dehydrated grapes and strain selection for wine fermentation, *Food Research International*, 170, 113005, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113005>
295. Ma T., Zhu H., Yin J., Tian Y., Yan W., Sun H., The Response Characteristics of One *Saccharomyces cerevisiae* Strain Under Continuous Passage in Artificial Culture Medium, *Journal of Fungi*, 11(7), 513-534, 2025. <https://doi.org/10.3390/jof11070513>
296. Abarca-Rivas C., Martín-García A., Riu-Aumatell M., Bidon-Chanal A., López-Tamames E., Effect of fermentation temperature on oenological parameters and volatile compounds in wine, *BIO Web Conferences*, 43<sup>rd</sup> World Congress of Vine and Wine, Volume 56, 02034, 2023. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20235602034>
297. Peng B., Li F., Cui L., Guo Y., Effects of Fermentation Temperature on Key Aroma Compounds and Sensory Properties of Apple Wine, *Journal of Food Science*, 80(12), S2937-S2943, 2015. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13111>
298. Jankura E., Píknová L., Lopašovská J., Identification and technological characteristics of yeast strains from vineyards in Slovakia, *Journal of Food and Nutrition Research*, 59(3), 241-249, 2020.
299. Santos C M., Nunes C., Saraiva A J., Coimbra A M., Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations, *European Food Research and Technology*, 234, 1-12, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1614-6>
300. Chinnici F., Sonni F., Natali N., Riponi C., Oxidative evolution of (+)-catechin in model white wine solutions containing sulfur dioxide, ascorbic acid or gallotannins, *Food Research International*, 51(1), 59-65, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.013>
301. Jagatić Korenika A-M., Biloš J., Kozina B., Tomaz I., Preiner D., Jeromel A., Effect of Different Reducing Agents on Aromatic Compounds, Antioxidant and Chromatic Properties of Sauvignon Blanc Wine, *Foods*, 9(8), 996-1013, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9080996>

302. Milanović V., Cardinali F., Boban A., Gajdoš Kljusurić J., Osimani A., Aquilanti L., Garofalo C., Budić-Leto I., White grape variety Maraština as a promising source of non-*Saccharomyces* yeasts intended as starter cultures, *Food Bioscience*, 55, 103033, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103033>
303. Grazia A., Pietrafesa A., Capece A., Pietrafesa R., Siesto G., Romano P., Exploitation of technological variability among wild non- *Saccharomyces* yeasts to select mixed starters for the production of low alcohol wines, *BIO Web of Conferences*, 42<sup>nd</sup> World Congress of Vine and Wine, Volume 15, 02031, 2019. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20191502031>
304. Archana M K., Ravi R., Anu-Appaiah A K., Correlation between ethanol stress and cellular fatty acid composition of alcohol producing non-*Saccharomyces* in comparison with *Saccharomyces cerevisiae* by multivariate techniques, *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), 6770-6776, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1762-y>
305. Koulougliotis D., Eriotou E., Isolation and Identification of Endogenous Yeast Strains in Grapes and Must Solids of *Mavrodafni Kefalonias* and Antioxidant Activity of the Produced Red Wine, *Fermentation Technology*, 5(1), 1-9, 2016. <https://doi.org/10.4172/2167-7972.1000125>
306. Pina C., Santos C., António Couto J., Hogg T., Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - Influence of different culture conditions, *Food Microbiology*, 21(4), 439-447, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.009>
307. Barbosa C., Lage P., Esteves M., Chambel L., Mendes-Faia A., Mendes-Ferreira A., Molecular and Phenotypic Characterization of *Metschnikowia pulcherrima* Strains from Douro Wine Region, *Fermentation*, 4(1), 8-27, 2018. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010008>
308. Puškaš S V., Miljić D U., Djuran J J., Vučurović M V., The aptitude of commercial yeast strains for lowering the ethanol content of wine, *Food Science & Nutrition*, 8(3), 1489-1498, 2020. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1433>
309. Yang Sun S., Sheng Gong H., Man Jiang X., Ping Zhao Y., Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces*

- cerevisiae* on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma of cherry wines, Food Microbiology, 44, 15-23, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.05.007>
310. Qin T., Liao J., Zheng Y., Zhang W., Zhang X., Oenological Characteristics of Four Non-*Saccharomyces* Yeast Strains With  $\beta$ -Glycosidase Activity, Frontiers in Microbiology, 12, 626920, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.626920>
311. Dujmović D., Babić K., Jeromel A., Redžepović S., Kozina B., Iacumin L., Orlić S., Selection of indigenous yeast strains isolated from cv. Gewurztraminer from Ilok winegrowing region, Journal of Central European Agriculture, 9(2), 323-328, 2008.
312. Badura J., Kiene F., Brezina S., Fritsch S., Semmler H., Rauhut D., Pretorius S I., von Wallbrunn C., van Wyk N., Aroma Profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Gewürztraminer Must Fermented with Co-Cultures of *Saccharomyces cerevisiae* and Seven *Hanseniaspora* spp., Fermentation, 9(2), 109-121, 2023. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020109>
313. Roca-Mesa H., Sendra S., Mas A., Beltran G., Torija M-J., Nitrogen Preferences during Alcoholic Fermentation of Different Non-*Saccharomyces* Yeasts of Oenological Interest, Microorganisms, 8(2), 157-176, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020157>
314. Lleixà J., Manzano M., Mas A., del C. Portillo M., *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Competition during Microvinification under Different Sugar and Nitrogen Conditions, Frontiers in Microbiology, 7, 1-10, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01959>
315. Oprean L., Gaspar E., Lengyel E., Cristea V., Physiological Properties of Some Yeast Strains, Acta Biologica Hungarica, 57(2), 261-273, 2006. <https://doi.org/10.1556/ABiol.57.2006.2.12>
316. Wei Y., Mao S., Tu K., Effect of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* on postharvest decay and quality of strawberry, Biological Control, 73, 68-74, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.02.016>
317. Brizzio S., van Broock M., Characteristics of Wild Yeast Killer from Nahuel Huapi National Park (Patagonia, Argentina), Food Technology and Biotechnology, 36, 273-278, 1998.

318. Sun H., Ma H., Hao M., Pretorius S I., Chen S., Identification of yeast population dynamics of spontaneous fermentation in Beijing wine region, China, *Annals of Microbiology*, 59(1), 69-76, 2009. <https://doi.org/10.1007/BF03175601>
319. Zohre E D., Erten H., The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation, *Process Biochemistry*, 38(3), 319-324, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00086-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00086-9)
320. Lai Y-T., Hsieh C-W., Lo Y-C., Liou B-K., Lin H-W., Hou C-Y., Cheng K-C., Isolation and identification of aroma-producing non-*Saccharomyces* yeast strains and the enological characteristic comparison in wine making, *LWT*, 154, 112653, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112653>
321. Ciani M., Role, enological properties and potential use of non-*Saccharomyces* wine yeasts, in Pandalai S.G., *Recent Research Developments in Microbiology*, Research Signpost, Trivandrum, p. 317-331, 1997.
322. Cioch-Skoneczny M., Satora P., Skoneczny S., Pater A., Determination of the oenological properties of yeast strains isolated from spontaneously fermented grape musts obtained from cool climate grape varieties, *European Food Research and Technology*, 246(11), 2299-2307, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03574-0>
323. Satora P., Tuszyński T., Influence of indigenous yeasts on the fermentation and volatile profile of plum brandies, *Food Microbiology*, 27(3), 418-424, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.12.005>
324. Binati L R., Lemos Junior J F W., Luzzini G., Slaghenaufi D., Ugliano M., Torriani S., Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to wine volatile and sensory diversity: A study on *Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia* spp. and *Starmerella bacillaris* strains isolated in Italy, *International Journal of Food Microbiology*, 318, 108470, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108470>
325. Boscaino F., Ionata E., La Cara F., Guerriero S., Marcolongo L., Sorrentino A., Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and *Metschnikowia fructicola* autochthonous mixed starter on Aglianico wine volatile compounds, *Journal of Food Science and Technology*, 56(11), 4982-4991, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03970-9>
326. Zhang Z., Wang H., Xia H., Sun L., Zhang Q., Yang H., Zhang J., Wine aroma modification by *Hanseniaspora uvarum*: A multiple-step strategy for screening potential

- mixed starters, Food Chemistry: X, 20, 100930, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100930>
327. Lorenzini M., Stella Cappello M., Andreolli M., Zapparoli G., Characterization of selected species of *Pichia* and *Candida* for their growth capacity in apple and grape must and their biofilm parameters, Letters in Applied Microbiology, 76(1), ovac028, 2023. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovac028>
328. Morera G., de Ovalle S., González-Pombo P., Prospection of indigenous yeasts from Uruguayan Tannat vineyards for oenological applications, International Microbiology, 25(4), 733-744, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00257-6>
329. Rollero S., Bloem A., Ortiz-Julien A., Camarasa C., Divol B., Fermentation performances and aroma production of non-conventional wine yeasts are influenced by nitrogen preferences, FEMS Yeast Research, 18(5), foy055, 2018. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy055>
330. Kemsawasd V., Viana T., Ardö Y., Arneborg N., Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation, Applied Microbiology and Biotechnology, 99(23), 10191-10207, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6835-3>
331. Li Y., Xu L., Eudes Sam F., Li A., Hu K., Tao Y., Improving aromatic higher alcohol acetates in wines by co-fermentation of *Pichia kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae*: growth interaction and amino acid competition, Journal of the Science of Food and Agriculture, 104(11), 6875-6883, 2024. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13519>
332. Liu C., Li M., Ren T., Wang J., Niu C., Zheng F., Li Q., Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* strains on alcoholic fermentation behavior and aroma profile of yellow-fleshed peach wine, LWT, 155, 112993, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112993>
333. Prior J K., Bauer F F., Divol B., The utilisation of nitrogenous compounds by commercial non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine, Food Microbiology, 79, 75-84, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.002>
334. Wang X., Chen J., Ge X., Fu X., Dang C., Wang J., Liu Y., Sequential fermentation with indigenous non-*Saccharomyces* yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* for flavor and

- quality enhancement of Longyan dry white wine, *Food Bioscience*, 55, 102952, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102952>
335. Ge Q., Guo C., Yan Y., Sun X., Ma T., Zhang J., Li C., Gou C., Yue T., Yuan Y., Contribution of non-Saccharomyces yeasts to aroma-active compound production, phenolic composition and sensory profile in Chinese Vidal icewine, *Food Bioscience*, 46, 101152, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101152>
336. Gao C., Fleet H G., Degradation of malic and tartaric acids by high density cell suspensions of wine yeasts, *Food Microbiology*, 12, 65-71, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80080-8](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80080-8)
337. Silas Chidi B., Rossouw D., Buica A., Bauer F F., Determining the Impact of Industrial Wine Yeast Strains on Organic Acid Production Under White and Red Wine-like Fermentation Conditions, *South African Journal of Enology and Viticulture*, 36(3), 316-327, 2015. <https://doi.org/10.21548/36-3-965>
338. Fonseca A., Utilization of tartaric acid and related compounds by yeasts: Taxonomic implications, *Canadian Journal of Microbiology*, 38(18), 1242-1251, 1992. <https://doi.org/10.1139/m92-205>
339. Cristina Scutarașu E., Valentin Teliban I., Ioan Zamfir C., Elena Luchian C., Cintia Colibaba L., Niculaua M., Cotea V V., Effect of Different Winemaking Conditions on Organic Acids Compounds of White Wines, *Foods*, 10(11), 2569-2581, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10112569>
340. Vicente J., Baran Y., Navascués E., Santos A., Calderón F., Marquina D., Rauhut D., Benito S., Biological management of acidity in wine industry: A review, *International Journal of Food Microbiology*, 375, 109726, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109726>
341. Vilela-Moura A., Schuller D., Mendes-Faia A., Silva D R., Chaves R S., João Sousa M., Côrte-Real M., The impact of acetate metabolism on yeast fermentative performance and wine quality: Reduction of volatile acidity of grape musts and wines, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(2), 271-280, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2898-3>

342. Robles A., Fabjanowicz M., Chmiel T., Płotka-Wasyłka J., Determination and identification of organic acids in wine samples. Problems and challenges, TrAC-Trends in Analytical Chemistry, 120, 115630, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115630>
343. Zhang H., Zhou F., Ji B., Nout M J R., Fang Q., Yang Z., Determination of organic acids evolution during apple cider fermentation using an improved HPLC analysis method, European Food Research and Technology, 227, 1183-1190, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0835-9>
344. Lu Y., Huang D., Lee P-R., Liu S-Q., Effects of cofermentation and sequential inoculation of *Saccharomyces bayanus* and *Torulasporea delbruckii* on durian wine composition, International Journal of Food Science + Technology, 50(12), 2653-2663, 2015. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12937>
345. Ge Q., Guo C., Yan Y., Sun X., Ma T., Zhang J., Li C., Gou C., Yue T., Yuan Y., Contribution of non-Saccharomyces yeasts to aroma-active compound production, phenolic composition and sensory profile in Chinese Vidal icewine, Food Bioscience, 46, 101152, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101152>
346. De Benedictis M., Bleve G., Tristezza M., Tufariello M., Grieco F., An optimized procedure for the enological selection of non-*Saccharomyces* starter cultures, Antonie van Leeuwenhoek, 99(2), 189-200, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9475-8>
347. Lu Y., Huang D., Lee P-R., Liu S-Q., Assessment of volatile and non-volatile compounds in durian wines fermented with four commercial non-*Saccharomyces* yeasts, Journal of the Science of Food and Agriculture, 96(5), 1511-1521, 2016. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7253>
348. Tsaruk A., Filip K., Sibirny A., Ruchala J., Native and Recombinant Yeast Producers of Lactic Acid: Characteristics and Perspectives, International Journal of Molecular Sciences, 26(5), 2007-2029, 2025. <https://doi.org/10.3390/ijms26052007>
349. Sadoudi M., Rousseaux S., David V., Alexandre H., Tourdot-Maréchal R., *Metschnikowia pulcherrima* Influences the Expression of Genes Involved in PDH Bypass and Glyceropyruvic Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*, Frontiers in Microbiology, 8, 1-11, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01137>
350. Huang M., Liu X., Li X., Sheng X., Li T., Tang W., Yu Z., Wang Y., Effect of *Hanseniaspora uvarum*-*Saccharomyces cerevisiae* Mixed Fermentation on Aroma

- Characteristics of *Rosa roxburghii* Tratt, Blueberry, and Plum Wines, *Molecules*, 27(22), 8097-8114, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27228097>
351. Boban A., Vrhovsek U., Carlin S., Milanović V., Gajdoš Kljusurić J., Jurun Z., Budić-Leto I., The effect of indigenous non-*Saccharomyces* yeasts on the volatile profile of Maraština wine: Monoculture versus sequential fermentation, *Applied Food Research*, 4(2), 100554, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2024.100554>
352. Romano P., Suzzi G., Comi G., Zironi R., Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts, *Journal of Applied Bacteriology*, 73(2), 126-130, 1992. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01698.x>
353. Scansani S., van Wyk N., Bou Nader K., Beisert B., Brezina S., Fritsch S., Semmler H., Pasch L., Pretorius S I., von Wallbrunn C., Schnell S., Rauhut D., The film-forming *Pichia* spp. in a winemaker's toolbox: A simple isolation procedure and their performance in a mixed-culture fermentation of *Vitis vinifera* L. cv. Gewürztraminer must, *International Journal of Food Microbiology*, 365, 109549, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109549>
354. Jolly P N., Augustyn P H O., Pretorius S I., The Effect of Non-*Saccharomyces* Yeasts on Fermentation and Wine Quality, *South African Journal of Enology and Viticulture*, 24(2), 55-62, 2003. <https://doi.org/10.21548/24-2-2638>
355. Estela-Escalante W., Rychtera M., Melzoch K., Hatta-Sakoda B., Ludeña-Cervantes Z., Sarmiento-Casavilca V., Chaquilla-Quilca G., Actividad fermentativa de *Saccharomyces ludwigii* Y Evaluación de la síntesis de compuestos de importancia sensorial durante la fermentación de jugo de manzana, *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 14(1), 12-23, 2011. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2011.1.42>
356. Mateo J J., Maicas S., Application of Non-*Saccharomyces* Yeasts to Wine-Making Process, *Fermentation*, 2(3), 14-27, 2016. <https://doi.org/10.3390/fermentation2030014>
357. Torres-Guardado R., Rozès N., Esteve-Zarzoso B., Reguant C., Bordons A., Succinic acid production by wine yeasts and the influence of GABA and glutamic acid, *International Microbiology*, 27(2), 505-512, 2024. <https://doi.org/10.1007/s10123-023-00410-9>

358. Escribano R., González-Arenzana L., Portu J., Garijo P., López-Alfaro I., López R., Santamaría P., Gutiérrez R A., Wine aromatic compound production and fermentative behaviour within different non-*Saccharomyces* species and clones, *Journal of Applied Microbiology*, 124(6), 1521-1531, 2018. <https://doi.org/10.1111/jam.13735>
359. Vázquez-Pateiro I., Arias-González U., Mirás-Avalos M J., Falqué E., Evolution of the Aroma of Treixadura Wines during Bottle Aging, *Foods*, 9(10), 1419-1432, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9101419>
360. Cheng G., Liu Y., Yue T-X., Zhang Z-W., Comparison between aroma compounds in wines from four *Vitis vinifera* grape varieties grown in different shoot positions, *Food Science and Technology*, 35(2), 237-246, 2015. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.6438>
361. Ahmed Z., The Properties of *Candida famata* R28 for D-Arabitol Production from D-glucose, *Journal of Biological Sciences*, 1(11), 1005-1008, 2001. <https://doi.org/10.3923/jbs.2001.1005.1008>
362. Sica P., Tonoli F., Silverio S M., Douradinho R., Mota A L., Prado L., Leite M G L G., Carvalho S R., Pinto U A., Baptista S A., Pre-adaptation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strains to very high gravity can improve fermentation parameters and reduce osmotic stress, *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(6), 9123-9137, 2025. <https://doi.org/10.1007/s13399-024-05746-4>
363. Beigbeder J-B., de Medeiros Dantas M J., Lavoie J-M., Optimization of Yeast, Sugar and Nutrient Concentrations for High Ethanol Production Rate Using Industrial Sugar Beet Molasses and Response Surface Methodology, *Fermentation*, 7(2), 86-102, 2021. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020086>
364. Palma M., Cordeiro Madeira S., Mendes-Ferreira A., Sá-Correia I., Impact of assimilable nitrogen availability in glucose uptake kinetics in *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation, *Microbial Cell Factories*, 11(1), 99-110, 2012. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-99>
365. María Clemente-Jimenez J., Mingorance-Cazorla L., Martínez-Rodríguez S., Javier Las Heras-Vázquez F., Rodríguez-Vico F., Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must, *Food Microbiology*, 21(2), 149-155, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00063-7)

366. Ivit N N., Longo R., Kemp B., The Effect of Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces Non-Cerevisiae* Yeasts on Ethanol and Glycerol Levels in Wine, Fermentation, 6(3), 77-99, 2020. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030077>
367. Tesfaw A., Toksoy Oner E., Assefa F., Optimization of ethanol production using newly isolated ethanologenic yeasts, Biochemistry and Biophysics Reports, 25, 100886, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100886>
368. Magyar I., Nyitrai-Sárdy D., Leskó A., Pomázi A., Kállay M., Anaerobic organic acid metabolism of *Candida zemplinina* in comparison with *Saccharomyces* wine yeasts, International Journal of Food Microbiology, 178, 1-6, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.03.002>
369. van Dijken P J., van den Bosch E., Hermans J J., de Miranda R L., Scheffers A W., Alcoholic fermentation by ‘non-fermentative’ yeasts, Yeast, 2(2), 123-127, 1986. <https://doi.org/10.1002/yea.320020208>
370. Gonzalez R., Morales P., Truth in wine yeast, Microbial Biotechnology, 15(5), 1339-1356, 2022. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13848>
371. Tzamourani P A., Taliadouros V., Paraskevopoulos I., Dimopoulou M., Developing a novel selection method for alcoholic fermentation starters by exploring wine yeast microbiota from Greece, Frontiers in Microbiology, 14, 1-14, 2023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1301325>
372. Sripakdee T., Manochai K., Singkhan P., Jandaruang J., Arthan S., Siritwong K., Poomsuk N., Fermentation Kinetic and Alpha-Amylase Inhibition Studies of Mao Wine Fermented by Three Commercial *Saccharomyces cerevisiae* Yeasts, Trends in Sciences, 21(4), 7462-7473, 2024. <https://doi.org/10.48048/tis.2024.7462>
373. Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M., Capece A., Function of yeast species and strains in wine flavour, International Journal of Food Microbiology, 86(1-2), 169-180, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00290-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00290-3)
374. Steensels J., Verstrepen J K., Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations, Annual Review of Microbiology, 68, 61-80, 2014. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>
375. Medina K., Boido E., Dellacassa E., Carrau F., Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation,

- International Journal of Food Microbiology, 157(2), 245-250, 2012.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012>
376. Lage P., Barbosa C., Mateus B., Vasconcelos I., Mendes-Faia A., Mendes-Ferreira A., *H. guilliermondii* impacts growth kinetics and metabolic activity of *S. cerevisiae*: The role of initial nitrogen concentration, International Journal of Food Microbiology, 172, 62-69, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.11.031>
377. Renault E P., Albertin W., Bely M., An innovative tool reveals interaction mechanisms among yeast populations under oenological conditions, Applied Microbiology and Biotechnology, 97(9), 4105-4119, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4660-5>
378. Branco P., Francisco D., Chambon C., Hébraud M., Arneborg N., Gabriela Almeida M., Caldeira J., Albergaria H., Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions, Applied Microbiology and Biotechnology, 98(2), 843-853, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5411-y>
379. Branco P., Viana T., Albergaria H., Arneborg N., Antimicrobial peptides (AMPs) produced by *Saccharomyces cerevisiae* induce alterations in the intracellular pH, membrane permeability and culturability of *Hanseniaspora guilliermondii* cells, International Journal of Food Microbiology, 205, 112-118, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.015>
380. Ferreira D., Galeote V., Sanchez I., Legras J-L., Ortiz-Julien A., Dequin S., Yeast multistress resistance and lag-phase characterisation during wine fermentation, FEMS Yeast Research, 17(6), 1-11, 2017. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox051>
381. Opalek M., Wloch-Salamon D., Smug J B., Assessing methods for estimating microbial lag phase duration: a comparative analysis using *Saccharomyces cerevisiae* empirical and simulated data, FEMS Yeast Research, 25, 1-9, 2025. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaf033>
382. Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za vino, Službeni list SRJ. br. 54/99 i 39/2002, Službeni list SCG, br. 56/2003, Službeni glasnik RS, br. 87/2011, 38/2012, 26/2015 i 110/2016.
383. Sun W., Chen X., Feng S., Bi P., Han J., Li S., Liu X., Zhang Z., Long F., Guo J., Effect of sequential fermentation with indigenous non-*Saccharomyces cerevisiae*

- combinations and *Saccharomyces cerevisiae* on the chemical composition and aroma compounds evolution of kiwifruit wine, *Food Chemistry*, 460(3), 140758, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140758>
384. Rompkovksi C., Carla Agustini B., Deffert F., Goreti Amboni Stadlober M., Brand D., Almeida da Silva G., Maria Bordin Bonfim T., Microbial dynamics in industrial-scale wine fermentation employing *Hanseniaspora uvarum*  $\beta$ -glucosidase-producer strain, *Journal of Food Science and Technology*, 59(4), 1570-1576, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13197-021-05168-4>
385. Ruiz J., Belda I., Beisert B., Navascués E., Marquina D., Calderón F., Rauhut D., Santos A., Benito S., Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(19), 8501-8509, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9255-3>
386. Malićanin M., Rac V., Rakić V., The effect of inactivated yeast-based products on the process of wine aging, phenolic compounds and sensory characteristics of red wine Prokupac, 40<sup>th</sup> World Congress of Vine and Wine, BIO Web of Conferencess, 9, 02004, 2017. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20170902004>
387. Dutraive O., Benito S., Fritsch S., Beisert B., Patz C-D., Rauhut D., Effect of Sequential Inoculation with Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* Yeasts on Riesling Wine Chemical Composition, *Fermentation*, 5(3), 79-95, 2019. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030079>
388. Karabegović I., Malićanin M., Danilović B., Stanojević J., Stamenković Stojanović S., Nikolić N., Lazić M., Potential of non-*Saccharomyces* yeast for improving the aroma and sensory profile of Prokupac red wine, *Oeno One*, 55(2), 181-195, 2021. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.2.3859>
389. Loira I., Morata A., Comuzzo P., Jesús Callejo M., González C., Calderón F., Antonio Suárez-Lepe J., Use of *Schizosaccharomyces pombe* and *Torulaspora delbrueckii* strains in mixed and sequential fermentations to improve red wine sensory quality, *Food Research International*, 76(3), 325-333, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.06.030>
390. Jackson R., *Wine Science: Principles and Applications*, Third edition, Academic Press, 2008.

391. Babić I., Jeromel A., Jagatić Korenika AM., Utjecaj kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Lachancea thermotolerans* na kemijski sastav vina sorte 'Frankovka', Glasnik Zaštite Bilja, 44(5), 48-57, 2021. <https://doi.org/10.31727/gzb.44.5.7>
392. Morata A., Enological Repercussions of Non-*Saccharomyces* Species in Wine Biotechnology, Fermentation, 5(3), 72-75, 2019. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030072>
393. Sottit C., Salor-Torregrosa M J., Moreno-Garcia J., Peinado J., Mauricio C J., Moreno J., Garcia-Martinez T., Using *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* wine yeasts as starter cultures for fermentation and quality improvement of mead, European Food Research and Technology, 245(12), 2705-2714, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03384-z>
394. Dias R D., Duarte F W., Schwan F R., Methods of Evaluation of Fruit Wines, in Kosseva M., Joshi V., Pamesar P., Science and Technology of Fruit Wine Production, Academic Pres, p. 227-252, 2017.
395. Vilanova M., Ugliano M., Varela C., Siebert T., Pretorius S I., Henschke A P., Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts, Applied Microbiology and Biotechnology, 77(1), 145-157, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1145-z>
396. García M., Esteve-Zarzoso B., Mariano Cabellos J., Arroyo T., Sequential Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* Fermentations to Reduce the Alcohol Content in Wine, Fermentation, 6(2), 60-75, 2020. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020060>
397. Duca G., Soldatenco O., Taran N., The Impact of Non-*Saccharomyces* Yeasts on Grape Must Fermentation: Comprehensive Study, Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Series II: Forestry, Wood Industry, Agricultural Food Engineering, 17(66), 141-152, 2024. <https://doi.org/10.31926/but.fwiafe.2024.17.66.1.8>
398. Sadineni V., Kondapalli N., Sarathi Reddy Obulam V., Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine, Annals of Microbiology, 62(4), 1353-1360, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0383-6>

399. Rossouw D., Bauer F F., Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity, *Food Microbiology*, 55, 32-46, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.11.017>
400. Hu L., Wang J., Ji X., Liu R., Chen F., Zhang X., Selection of non-*Saccharomyces* yeasts for orange wine fermentation based on their enological traits and volatile compounds formation, *Journal of Food Science and Technology*, 55(10), 4001-4012, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3325-5>
401. Varela C., Barker A., Tran T., Borneman A., Curtin C., Sensory profile and volatile aroma composition of reduced alcohol Merlot wines fermented with *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*, *International Journal of Food Microbiology*, 252, 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.002>
402. Ding B., Xiong L., Zhao S., Lin Y., Guo P., Zhang W., Impact of co-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kluyveri* on the metabolic characteristics of the flavor compounds in mulberry wine, *Frontiers in Nutrition*, 12, 1-14, 2025. <https://doi.org/10.3389/fnut.2025.1559599>
403. Benito S., Hofmann T., Laier M., Lochbühler B., Schüttler A., Ebert K., Fritsch S., Röcker J., Rauhut D., Effect on quality and composition of Riesling wines fermented by sequential inoculation with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*, *European Food Research and Technology*, 241(5), 707-717, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2497-8>
404. Vicente J., Calderón F., Santos A., Marquina D., Benito S., High Potential of *Pichia kluyveri* and Other *Pichia* Species in Wine Technology, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1196-1211, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22031196>
405. Hu K., Jin G-J., Xu Y-H., Tao Y-S., Wine aroma response to different participation of selected *Hanseniaspora uvarum* in mixed fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Research International*, 108, 119-127, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.037>
406. Capece A., Pietrafesa R., Siesto G., Romano P., Biotechnological Approach Based on Selected *Saccharomyces cerevisiae* Starters for Reducing the Use of Sulfur Dioxide in Wine, *Microorganisms*, 8(5), 738-759, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050738>

407. Ivanova-Petropulos V., Petruševa D., Mitrev S., Rapid and Simple Method for Determination of Target Organic Acids in Wine Using HPLC-DAD Analysis, *Food Analytical Methods*, 13(5), 1078-1087, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01724-4>
408. Jagatić Korenika A-M., Marinov L., Anđelini D., Jeromel A., Yeasts and wine acidity profile, *Journal of Central European Agriculture*, 21(4), 861-869, 2020. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/21.4.2833>
409. Lena do Nascimento Silva F., Morgado Schmidt E., Luiz Messias C., Nogueira Eberlin M., Christine Helena Frankland Sawaya A., Quantitation of organic acids in wine and grapes by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry, *Analytical Methods*, 7(1), 53-62, 2015. <https://doi.org/10.1039/C4AY00114A>
410. Teixeira A., Martins V., Noronha H., Eiras-Dias J., Gerós H., The First Insight into the Metabolite Profiling of Grapes from Three *Vitis vinifera* L. Cultivars of Two Controlled Appellation (DOC) Regions, *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4237-4254, 2014. <https://doi.org/10.3390/ijms15034237>
411. Lima M M M., Choy Y Y., Tran J., Lydon M., Runnebaum C R., Organic acids characterization: wines of Pinot noir and juices of ‘Bordeaux grape varieties’, *Journal of Food Composition and Analysis*, 114, 104745, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104745>
412. Lelova Z., Ivanova-Petropulos V., Masár M., Lisjak K., Bodor R., Optimization and Validation of a New Capillary Electrophoresis Method with Conductivity Detection for Determination of Small Anions in Red Wines, *Food Analytical Methods*, 11, 1457-1466, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-1117-6>
413. Lee S-B., Banda C., Park H-D., Effect of inoculation strategy of non-*Saccharomyces* yeasts on fermentation characteristics and volatile higher alcohols and esters in Campbell Early wines, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 25(4), 384-395, 2019. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12405>
414. Du Plessis H., Du Toit M., Nieuwoudt H., van der Rijst M., Hoff J., Jolly N., Modulation of Wine Flavor using *Hanseniaspora uvarum* in Combination with Different *Saccharomyces cerevisiae*, Lactic Acid Bacteria Strains and Malolactic Fermentation Strategies, *Fermentation*, 5(3), 64-81, 2019. <https://doi.org/10.3390/fermentation5030064>

415. Liu S., Laaksonen O., Kortensniemi M., Kalpio M., Yang B., Chemical composition of bilberry wine fermented with non-Saccharomyces yeasts (*Torulasporea delbrueckii* and *Schizosaccharomyces pombe*) and *Saccharomyces cerevisiae* in pure, sequential and mixed fermentations, Food Chemistry, 266, 262-274, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.003>
416. Peres G R., Moraes P E., Micke A G., Tonin G F., Tavares F M M., Rodriguez-Amaya B D., Rapid method for the determination of organic acids in wine by capillary electrophoresis with indirect UV detection, Food Control, 20(6), 548-552, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.004>
417. Lima M M M., Choy Y Y., Tran J., Lydon M., Runnebaum C R., Organic acids characterization: wines of Pinot noir and juices of 'Bordeaux grape varieties', Journal of Food Composition and Analysis, 114, 104745, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104745>
418. Monteiro Coelho E., Valéria da Silva Padilha C., Aquino Miskinis G., Gomes Barroso de Sá A., Elias Pereira G., Cavalcanti de Azevêdo L., dos Santos Lima M., Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil, Journal of Food Composition and Analysis, 66, 160-167, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>
419. Monteiro Coelho E., Valéria da Silva Padilha C., Aquino Miskinis G., Gomes Barroso de Sá A., Elias Pereira G., Cavalcanti de Azevêdo L., dos Santos Lima M., Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil, Journal of Food Composition and Analysis, 66, 160-167, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>
420. Monteiro Coelho E., Valéria da Silva Padilha C., Aquino Miskinis G., Gomes Barroso de Sá A., Elias Pereira G., Cavalcanti de Azevêdo L., dos Santos Lima M., Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil, Journal of Food Composition and Analysis, 66, 160-167, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.12.017>
421. Morata A., Escott C., Antonia Bañuelos M., Loira I., Manuel del Fresno J., González C., Antonio Suárez-Lepe J., Contribution of Non-Saccharomyces Yeasts to Wine

- Freshness. A Review, *Biomolecules*, 10(1), 34-59, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10010034>
422. Swiegers H J., Bartowsky J E., Henschke A P., Pretorius S I., Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour, *Australina Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139-173, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x>
423. Bely M., Rinaldi A., Dubourdiou D., Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by *Saccharomyces cerevisiae* during high sugar fermentation, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(6), 507-512, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(04\)70141-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(04)70141-3)
424. Alberto Fazio N., Di Sanzo R., Marino G., Carabetta S., Ligato F., Ioppolo F., Russo M., Randazzo L C., Caggia C., Caccamo M., Impact of native *S. cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts in chemical, aromatic, and sensory profiles of Carricante wines, *Food Bioscience*, 68, 106559, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.106559>
425. Morata A., Loira I., González C., Escott C., Non-*Saccharomyces* as Biotools to Control the Production of Off-Flavors in Wines, *Molecules*, 26(15), 4571-4583, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26154571>
426. Mannazzu I., Clementi F., Ciani M., Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters, *Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts*, 1-18, 2002.
427. Suárez-Lepe A J., Morata A., New trends in yeast selection for winemaking, *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), 39-50, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.005>
428. Mihail M., Călugăr A., Pop N., Gal E., Ioana Pop T., Odor activity value in red wines aroma from three regions in Romania, *Agricultura*, 1-2(109-110), 29-38, 2019. <https://doi.org/10.15835/agrisp.v109i1-2.13245>
429. Aith Barbará J., Primieri Nicolli K., Aparecida Souza-Silva É., Camarão Telles Biasoto A., Elisa Welke J., Alcaraz Zini C., Volatile profile and aroma potential of tropical Syrah wines elaborated in different maturation and maceration times using comprehensive two-dimensional gas chromatography and olfactometry, *Food Chemistry*, 308, 125552, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125552>

430. Shi W-K., Wang J., Chen F-S., Zhang X-Y., Effect of *Issatchenkia terricola* and *Pichia kudriavzevii* on wine flavor and quality through simultaneous and sequential co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*, LWT, 116, 108477, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108477>
431. Jagatić Korenika A-M., Preiner D., Tomaz I., Jeromel A., Volatile Profile Characterization of Croatian Commercial Sparkling Wines, Molecules, 25(18), 4349-4373, 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25184349>
432. Zhao Y., Sun Q., Tian B., Zhu S., Du F., Mao R., Li S., Liu L., Zhu Y., Evaluation of Four Indigenous Non-*Saccharomyces* Yeasts Isolated from the Shangri-La Wine Region (China) for Their Fermentation Performances and Aroma Compositions in Synthetic Grape Juice Fermentation, Journal of Fungi, 8(2), 146-164, 2022. <https://doi.org/10.3390/jof8020146>
433. Carrau F., Boido E., Dellacassa E., Yeast Diversity and Flavor Compounds. in Mérillon J-M., Gopal Ramawat K., Fungal Metabolites, Springer International Publishing, p. 569-597, 2017. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4\\_32](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_32)
434. Jiang B., Zhang Z., Volatile Compounds of Young Wines from Cabernet Sauvignon, Cabernet Gernischet and Chardonnay Varieties Grown in the Loess Plateau Region of China, Molecules, 15(2), 9184-9196, 2010. <https://doi.org/10.3390/molecules15129184>
435. Elisa Welke J., Zanus M., Lazzarotto M., Alcaraz Zini C., Quantitative analysis of headspace volatile compounds using comprehensive two-dimensional gas chromatography and their contribution to the aroma of Chardonnay wine, Food Research International, 59, 85-99, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.002>
436. Wu Y., Duan S., Zhao L., Gao Z., Luo M., Song S., Xu W., Zhang C., Ma C., Wang S., Aroma characterization based on aromatic series analysis in table grapes, Scientific Reports, 6, 31116, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep31116>
437. Federico Casassa L., Ceja M G., Vega-Osorno A., du Fresne F., Llodrá D., Detailed chemical composition of Cabernet Sauvignon wines aged in French oak barrels coopered with three different stave bending techniques, Food Chemistry, 340, 127573, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127573>

438. Tristezza M., Tufariello M., Capozzi V., Spano G., Mita G., Grieco F., The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production, *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-14, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00670>
439. Hu K., Jin G-J., Mei W-C., Li T., Tao Y-S., Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed *H. uvarum*/*S. cerevisiae* fermentation leads to wine fruity aroma enhancement, *Food Chemistry*, 239, 495-501, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.151>
440. Yang E., Drosou F., Dourtoglou G E., Chatzilazarou A., Dourtoglou G V., Approaches to outline the aromatic profile of Kyoho wines from South Korea, 40<sup>th</sup> World Congress of Vine and Wine, BIO Web of Conferencess, 9, 02034, 2017. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20170902034>
441. Roldán M A., Sánchez-García F., Pérez-Rodríguez L., Palacios M V., Influence of Different Vinification Techniques on Volatile Compounds and the Aromatic Profile of Palomino Fino Wines, *Foods*, 10(2), 453-475, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10020453>
442. Perestrelo R., Silva C., Câmara S J., Madeira Wine Volatile Profile. A Platform to Establish Madeira Wine Aroma Descriptors, *Molecules*, 24(17), 3028-3045, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24173028>
443. Gammacurta M., Tempere S., Marchand S., Moine V., de Revel G., Ethyl 2-hydroxy-3-methylbutanoate enantiomers: Quantitation and sensory evaluation in wine, *Oeno One*, 52(1), 57-65, 2018. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2018.52.1.1902>
444. Zea L., Moyano L., Moreno A J., Medina M., Aroma series as fingerprints for biological ageing in fino sherry-type wines, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(12), 2319-2326, 2007. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2992>
445. Nie X., Liu K., Zhang Y., Wang Z., Meng C., Zhao Z., Ao C., Effects of oak chips on quality and flavor of persimmon brandy: A comprehensive analysis of volatile and non-volatile compounds, *LWT*, 183, 114915, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114915>
446. Kula J., Smigielski K., Quang B T., Grzelak I., Sikora M., Preparation of  $\omega$ -hydroxynonanoic acid and its ester derivatives, *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(7), 811-817, 1999. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0070-y>

447. Jiang J., Zhang W., Wu Y., Shi X., Yang X., Song Y., Qin Y., Ye D., Liu Y., Pilot-Scale Vinification of Cabernet Sauvignon Using Combined *Lactiplantibacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* to Achieve Wine Acidification, *Foods*, 11(16), 2511-2528, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11162511>
448. Salo P., Nykänen L., Suomalainen H., Odor thresholds and relative intensities of volatile aroma components in an artificial beverage imitating whisky, *Journal of Food Science*, 37(3), 394-398. 1972. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1972.tb02647.x>
449. Cristina Scutarașu E., Elena Luchian C., Vlase L., Nagy K., Cintia Colibaba L., Carmen Trinca L., Cotea V V., Influence Evaluation of Enzyme Treatments on Aroma Profile of White Wines. *Agronomy*, 12(11), 2897-2921, 2022. <https://doi.org/10.3390/agronomy12112897>
450. Lu Y., Sun F., Wang W., Liu Y., Wang J., Sun J., Mu J., Gao Z., Effects of spontaneous fermentation on the microorganisms diversity and volatile compounds during ‘Marselan’ from grape to wine, *LWT*, 134, 110193, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110193>
451. Louw L., Tredoux G J A., Van Rensburg P., Kidd M., Naes T., Nieuwoudt H H., Fermentation-derived aroma compounds in varietal young wines from South Africa, *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), 213-225, 2010. <https://doi.org/10.21548/31-2-1418>
452. Guerrini L., Masella P., Angeloni G., Sacconi A., Calamai L., Parenti A., Effects of a Small Increase in Carbon Dioxide Pressure during Fermentation on Wine Aroma, *Foods*, 9(10), 1496-1508, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9101496>
453. Zheng Y., Oellig C., Zhang Y., Liu Y., Chen Y., Zhang Y., Characterization of the key odorants in goji wines in three levels of sweetness by applications of sensomics approach, *Food Chemistry*, 461, 140803, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140803>
454. San-Juan F., Ferreira V., Cacho J., Escudero A., Quality and aromatic sensory descriptors (mainly fresh and dry fruit character) of spanish red wines can be predicted from their aroma-active chemical composition, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7916-7924, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf1048657>

455. Varela C., Siebert T., Cozzolino D., Rose L., McLean H., Henschke A P., Discovering a chemical basis for differentiating wines made by fermentation with “wild” indigenous and inoculated yeasts: role of yeast volatile compounds, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(3), 328-348, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00054.x>
456. Jiang B., Xi Z., Luo M., Zhang Z., Comparison on aroma compounds in Cabernet Sauvignon and Merlot wines from four wine grape-growing regions in China, *Food Research International*, 51(2), 482-489, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.001>
457. Du Plessis H., Du Toit M., Nieuwoudt H., Van Der Rijst M., Kidd M., Jolly N., Effect of *Saccharomyces*, Non-*Saccharomyces* Yeasts and Malolactic Fermentation Strategies on Fermentation Kinetics and Flavor of Shiraz Wines, *Fermentation*, 3(4), 64-88, 2017. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040064>
458. César Silva Ferreira A., Guedes de Pinho P., Rodrigues P., Hogg T., Kinetics of Oxidative Degradation of White Wines and How They Are Affected by Selected Technological Parameters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5919-5924, 2002. <https://doi.org/10.1021/jf0115847>
459. Moreira N., Guedes de Pinho P., Santos C., Vasconcelos I., Volatile sulphur compounds composition of monovarietal white wines, *Food Chemistry*, 123(4), 1198-1203, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.086>
460. Culleré L., Escudero A., Cacho J., Ferreira V., Gas Chromatography-Olfactometry and Chemical Quantitative Study of the Aroma of Six Premium Quality Spanish Aged Red Wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1653-1660, 2004. <https://doi.org/10.1021/jf0350820>
461. Tao Y., Zhang L., Intensity prediction of typical aroma characters of cabernet sauvignon wine in Changli County (China), *LWT - Food Science and Technology*, 43(10), 1550-1556, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.003>
462. Wang X., Chen J., Ge X., Fu X., Dang C., Wang J., Liu Y., Sequential fermentation with indigenous non-*Saccharomyces* yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* for flavor and quality enhancement of Longyan dry white wine, *Food Bioscience*, 55, 102952, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102952>

463. Grützmann Arcari S., Caliarì V., Sganzerla M., Teixeira Godoy H., Volatile composition of Merlot red wine and its contribution to the aroma: optimization and validation of analytical method, *Talanta*, 174, 752-766, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.06.074>
464. Dai B., Chen W., Huang W., Liu J., Li B., He P., Grierson D., Tu Y., Wu Y., Volatiles profiles and factors affecting absorption of key odorants in *Osmanthus* black tea, *Food Quality and Safety*, 8, fyae020, 2024. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyae020>
465. Shi Q., Chai G., Xu X., Fan W., Wu C., Ji L., Xi H., Mao J., Liu J., Song Y., Zhang Q., A strategy to maintain the organoleptic quality of flavor- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: Characteristics aroma reconstruction of *Osmanthus* absolute, *LWT*, 176, 114570, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114570>
466. Kelebek H., Selli S., Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dortyol (*Citrus sinensis* L. Osbeck) orange juice, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(10), 1855-1862, 2011. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4396>
467. Souid I., Hassene Z., Sánchez Palomo E., Soledad Pérez-Coello M., Ghorbel A., Aroma potential of three autochthonous grapevine varieties from Tunisia, *Journal international des sciences de la vigne et du vin*, 42(4), 231-239, 2008. <https://doi.org/10.20870/oenone.2008.42.4.813>
468. Darıcı M., Cabaroğlu T., Characterization of Boğazkere wines from different locations in Turkey relating aroma and sensory properties using chemometrics, 44<sup>th</sup> World Congress of Vine and Wine, *BIO Web of Conferencess*, 68, 02043, 2023. <https://doi.org/10.1051/bioconf/20236802043>
469. Wang X., Guo W., Sun B., Li H., Zheng F., Li J., Meng N., Characterization of Key Aroma-Active Compounds in Two Types of Peach Spirits Produced by Distillation and Pervaporation by Means of the Sensomics Approach, *Foods*, 11(17), 2598-2620, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11172598>
470. Ríos-Reina R., Pilar Segura-Borrego M., Lourdes Morales M., Callejón M R., Characterization of the aroma profile and key odorants of the Spanish PDO wine vinegars, *Food Chemistry*, 311, 126012, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126012>

471. Tosi E., Fedrizzi B., Azzolini M., Finato F., Simonato B., Zapparoli G., Effects of noble rot on must composition and aroma profile of Amarone wine produced by the traditional grape withering protocol, *Food Chemistry*, 130(2), 370-375, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.053>
472. Fejzullahu F., Kiss Z., Kun-Farkas G., Kun S., Influence of Non-*Saccharomyces* Strains on Chemical Characteristics and Sensory Quality of Fruit Spirit, *Foods*, 10(6), 1336-1347, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10061336>
473. Lai Y-T., Chen C-H., Lo Y-C., Hsieh C-W., Hsu F-C., Cheng K-C., Application of aroma-producing yeasts and ageing technology in Kyoho-fortified wine, *European Food Research and Technology*, 249(11), 2849-2860, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04332-8>
474. Tofalo R., Perpetuini G., Pio Rossetti A., Gaggiotti S., Piva A., Olivastri L., Cichelli A., Compagnone D., Arfelli G., Impact of *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts to improve traditional sparkling wines production, *Food Microbiology*, 108, 104097, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104097>
475. Tufariello M., Fragasso M., Pico J., Panighel A., Diego Castellarin S., Flamini R., Grieco F., Influence of Non-*Saccharomyces* on Wine Chemistry: A Focus on Aroma-Related Compounds, *Molecules*, 26(3), 644-666, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26030644>
476. Yang B., Liu S., Zang H., Dai Y., Zhang S., Lin X., Liang H., Chen Y., Flavor profile and quality of strawberry wine are improved through sequential fermentation with indigenous non-*Saccharomyces* yeasts and *Saccharomyces cerevisiae*, *Food Bioscience*, 59, 104021, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104021>
477. Tang Feng C., Du X., Wee J., Microbial and Chemical Analysis of Non-*Saccharomyces* Yeasts from Chambourcin Hybrid Grapes for Potential Use in Winemaking, *Fermentation*, 7(1), 15-38, 2021. <https://doi.org/10.3390/fermentation7010015>
478. Ge Q., Guo C., Yan Y., Sun X., Ma T., Zhang J., Li C., Gou C., Yue T., Yuan Y., Contribution of non-*Saccharomyces* yeasts to aroma-active compound production, phenolic composition and sensory profile in Chinese Vidal icewine, *Food Bioscience*, 46, 101152, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101152>

479. Bartowsky E., Pretorius S I., Microbial Formation and Modification of Flavor and Off-Flavor Compounds in Wine, in König H., Uden G., Fröhlich J., Biology of Microorganisms on Grape, in Must and in Wine, Springer, p. 209-232, 2009.
480. Szlavko M C., Tryptophol, tyrosol and phenylethanol - The aromatic higher alcohols in beer, Journal of The Institute of Brewing, 79(4), 283-288, 1973. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1973.tb03541.x>
481. Cordente G A., Espinase Nandorfy D., Solomon M., Schulkin A., Kolouchova R., Leigh Francis I., Schmidt A S., Aromatic Higher Alcohols in Wine: Implication on Aroma and Palate Attributes during Chardonnay Aging, Molecules, 26(16), 4979-5000, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26164979>
482. Marques C., Dinis L-T., João Santos M., Mota J., Vilela A., Beyond the Bottle: Exploring Health-Promoting Compounds in Wine and Wine-Related Products—Extraction, Detection, Quantification, Aroma Properties, and *Terroir* Effects, Foods, 12(23), 4277-4308, 2023. <https://doi.org/10.3390/foods12234277>
483. González B., Vázquez J., Ángeles Morcillo-Parra M., Mas A., Jesús Torija M., Beltran G., The production of aromatic alcohols in non-*Saccharomyces* wine yeast is modulated by nutrient availability. Food Microbiology, 74, 64-74, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.03.003>
484. Vilela A., The Importance of Yeasts on Fermentation Quality and Human Health-Promoting Compounds, Fermentation, 5(2), 46-58, 2019. <https://doi.org/10.3390/fermentation5020046>
485. Gutiérrez-Escobar R., José Aliaño-González M., Cantos-Villar E., Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties: A Review, Molecules, 26(3), 718-772, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26030718>
486. Bordiga M., Lorenzo C., Pardo F., Salinas R M., Travaglia F., Arlorio M., Coïsson D J., Garde-Cerdán T., Factors influencing the formation of histaminol, hydroxytyrosol, tyrosol, and tryptophol in wine: Temperature, alcoholic degree, and amino acids concentration, Food Chemistry, 197, 1038-1045, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.112>

487. Rankine C B., Pocock F K.,  $\beta$ -Phenethanol and n-Hexanol in Wines: Influence of Yeast Strain, Grape Variety and Other Factors; and Taste Thresholds, *Vitis*, 8, 23-37, 1969. <https://doi.org/10.5073/vitis.1969.8.23-37>
488. Escribano-Viana R., González-Arenzana L., Portu J., Garijo P., López-Alfaro I., López R., Santamaría P., Rosa Gutiérrez A., Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-*Saccharomyces/Saccharomyces* yeasts, *Food Research International*, 112, 17-24, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.018>
489. Mina M., Tsaltas D., Contribution of Yeast in Wine Aroma and Flavour, in Morata A., Loira I., *Yeast – Industrial Applications*, IntechOpen, p. 117-134, 2017. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70656>
490. Hirst B M., Richter L C., Review of Aroma Formation through Metabolic Pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in Beverage Fermentations, *American Journal of Enology and Viticulture*, 67(4), 361-370, 2016. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.15098>
491. Wang J., Wang Z., Gao H., Bai X., Li L., Wei R., Dong Z., Metabolomics and flavor diversity in Cabernet Sauvignon wines fermented by various origins of *Hanseniaspora uvarum* in the presence and absence of *Saccharomyces cerevisiae*, *LWT*, 203, 116396, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116396>
492. Lloret A., Boido E., Lorenzo D., Medina K., Carrau F., Dellacassa E., Versini G., Aroma variation in tannat wines: Effect of malolactic fermentation on ethyl lactate level and its enantiomeric distribution, *Italian Journal of Food Science*, 14(2), 175-180, 2002.
493. Patel S., Shibamoto T., Flavor compounds in wines produced from chardonnay grapes fermented with fruit juices, *Food Science and Technology Research*, 9(1), 84-86, 2003. <https://doi.org/10.3136/fstr.9.84>
494. Lasik-Kurdyś M., Majcher M., Nowak J., Effects of Different Techniques of Malolactic Fermentation Induction on Diacetyl Metabolism and Biosynthesis of Selected Aromatic Esters in Cool-Climate Grape Wines, *Molecules*, 23(10), 2549-2564, 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23102549>
495. Sun L., Zhang Z., Xia H., Zhang Q., Zhang J., Typical Aroma of Merlot Dry Red Wine from Eastern Foothill of Helan Mountain in Ningxia, China, *Molecules*, 28(15), 5682-5696, 2023. <https://doi.org/10.3390/molecules28155682>

496. Cotea V V., Cristian Focea M., Elena Luchian C., Cintia Colibaba L., Cristina Scutarașu E., Marius N., Ioan Zamfir C., Popîrdă A., Influence of Different Commercial Yeasts on Volatile Fraction of Sparkling Wines, *Foods*, 10(2), 247-261, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10020247>
497. Riu-Aumatell M., Bosch-Fusté J., López-Tamames E., Buxaderas S., Development of volatile compounds of cava (Spanish sparkling wine) during long ageing time in contact with lees, *Food Chemistry*, 95(2), 237-242, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.029>
498. Lytra G., Cameleyre M., Tempere S., Barbe J-C., Distribution and Organoleptic Impact of Ethyl 3-Hydroxybutanoate Enantiomers in Wine, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(48), 10484-10491, 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04332>
499. de-la-Fuente-Blanco A., Sáenz-Navajas M-P., Valentin D., Ferreira V., Fourteen ethyl esters of wine can be replaced by simpler ester vectors without compromising quality but at the expense of increasing aroma concentration, *Food Chemistry*. 307, 125553, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125553>
500. Gómez García-Carpintero E., Sánchez-Palomo E., González-Viñas A M., Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in La Mancha region, *Food Research International*, 44(1), 61-70, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.013>
501. Gómez García-Carpintero E., Sánchez-Palomo E., Gómez Gallego A M., González-Viñas A M., Free and bound volatile compounds as markers of aromatic typicalness of Moravia Dulce, Rojal and Tortosí red wines, *Food Chemistry*, 131(1), 90-98, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.035>
502. Castro-Vázquez L., Elena Alañón M., Calvo E., Jesús Cejudo M., Consuelo Díaz-Maroto M., Soledad Pérez-Coello M., Volatile compounds as markers of ageing in Tempranillo red wines from *La Mancha* D.O. stored in oak wood barrels, *Journal of Chromatography A*, 1218(30), 4910-4917, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.094>
503. Knight J M., Bull D I., Curnow P., The yeast enzyme Eht1 is an octanoyl-CoA:ethanol acyltransferase that also functions as a thioesterase, *Yeast*, 31(12), 463-474, 2014. <https://doi.org/10.1002/yea.3046>

504. Romani C., Lencioni L., Biondi Bartolini A., Ciani M., Mannazzu I., Domizio P., Pilot Scale Fermentations of Sangiovese: An Overview on the Impact of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Wine Yeasts, *Fermentation*, 6(3), 63-80, 2020. <https://doi.org/10.3390/fermentation6030063>
505. Liu S., Laaksonen O., Marsol-Vall A., Zhu B., Yang B., Comparison of Volatile Composition between Alcoholic Bilberry Beverages Fermented with Non-*Saccharomyces* Yeasts and Dynamic Changes in Volatile Compounds during Fermentation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(11), 3626-3637, 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01050>
506. Etiévant P., Wine, in Maarse H., Volatile compounds in foods and beverages, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 483-547, 1991.
507. Sun Q., Cui R., Zhao Y., Regional aroma characteristics of spontaneously fermented Cabernet Sauvignon wines produced from seven sub-regions in Shangri-La of China, *Scientific Reports*, 14(1), 24566, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-76353-6>
508. Plata C., Millán C., Mauricio C J., Ortega M J., Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts, *Food Microbiology*, 20(2), 217-224, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00101-6](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00101-6)
509. Sadoudi M., Tourdot-Maréchal R., Rousseaux S., Steyer D., Gallardo-Chacón J-J., Ballester J., Vichi S., Guérin-Scheider R., Caixach J., Alexandre H., Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts, *Food Microbiology*, 32(2), 243-253, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.06.006>
510. Zhang B., Xu D., Duan C., Yan G., Synergistic effect enhances 2-phenylethyl acetate production in the mixed fermentation of *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Process Biochemistry*, 90, 44-49, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.007>
511. Lambrechts G M., Pretorius S I., Yeast and its Importance to Wine Aroma - A Review, *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 97-129, 2000. <https://doi.org/10.21548/21-1-3560>

512. Cordente G A., Solomon M., Schulkin A., Leigh Francis I., Barker A., Borneman R A., Curtin D C., Novel wine yeast with *ARO4* and *TYR1* mutations that overproduce 'floral' aroma compounds 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(14), 5977-5988, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9054-x>
513. Liu J., Arneborg N., Bo Toldam-Andersen T., Zhang S., Agerlin Petersen M., Bredie L P W., Impact of sequential co-culture fermentations on flavour characters of Solaris wines, *European Food Research and Technology*, 243(3), 437-445, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2757-2>
514. Wang L., Yin H., Shao X., Zhang Z., Zhong X., Wei R., Ding Y., Wang H., Li H., Improving the aging aroma profiles of Italian Riesling and Petit Verdot Wines: Impact of spontaneous and inoculated fermentation processes, *Food Chemistry: X*, 20, 100978, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100978>
515. Zhang M., Zhong T., Heygi F., Wang Z., Du M., Effects of inoculation protocols on aroma profiles and quality of plum wine in mixed culture fermentation of *Metschnikowia pulcherrima* with *Saccharomyces cerevisiae*, *LWT*, 161(2), 113338, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113338>
516. João Cabrita M., Costa Freitas M A., Laureano O., Borsa D., Di Stefano R., Aroma compounds in varietal wines from Alentejo, Portugal, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), 375-390, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.12.006>
517. Lilly M., Bauer F F., Styger G., Lambrechts G M., Pretorius S I., The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates, *FEMS Yeast Research*, 6(5), 726-743, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00057.x>
518. Methner Y., Dancker P., Maier R., Latorre M., Hutzler M., Zarnkow M., Steinhaus M., Libkind D., Frank S., Jacob F., Influence of Varying Fermentation Parameters of the Yeast Strain *Cyberlindnera saturnus* on the Concentrations of Selected Flavor Components in Non-Alcoholic Beer Focusing on (*E*)- $\beta$ -Damascenone, *Foods*, 11(7), 1038-1062, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11071038>
519. Licek J., Baron M., Sochor J., Comparison of MCFA and Other Methods of Terminating Alcohol Fermentation and Their Influence on the Content of Carbonyl

- Compounds in Wine, *Molecules*, 25(23), 5737-5747, 2020.  
<https://doi.org/10.3390/molecules25235737>
520. Liu S., Laaksonen O., Yang B., Volatile composition of bilberry wines fermented with non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts in pure, sequential and simultaneous inoculations, *Food Microbiology*, 80, 25-39, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.015>
521. Romano P., Suzzi G., Origin and Production of Acetoin during Wine Yeast Fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 309-315, 1996.  
<https://doi.org/10.1128/aem.62.2.309-315.1996>
522. Smith E M., Bekker Z M., Smith A P., Wilkes N E., Sources of volatile sulfur compounds in wine, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 705-712, 2015.  
<https://doi.org/10.1111/ajgw.12193>
523. Jiménez-Lorenzo R., Farines V., Sablayrolles J-M., Camarasa C., Bloem A., New Insights into the Origin of Volatile Sulfur Compounds during Wine Fermentation and Their Evolution during Aging, *Fermentation*, 8(4), 139-156, 2022.  
<https://doi.org/10.3390/fermentation8040139>
524. Moreira N., Mendes F., Pereira O., Guedes De Pinho P., Hogg T., Vasconcelos I., Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts, *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 157-167, 2002.  
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01618-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01618-X)
525. Prusova B., Humaj J., Sochor J., Baron M., Formation, Losses, Preservation and Recovery of Aroma Compounds in the Winemaking Process, *Fermentation*, 8(3), 93-112, 2022. <https://doi.org/10.3390/fermentation8030093>
526. Rocha M S., Rodrigues F., Coutinho P., Delgadillo I., Coimbra A M., Volatile composition of Baga red wine: Assessment of the identification of the would-be impact odourants, *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 257-262, 2004.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.009>
527. Dias L., Dias S., Sancho T., Stender H., Querol A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V., Identification of yeasts isolated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol, *Food Microbiology*, 20(5), 567-574, 2003.  
[https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00152-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00152-1)

528. Kheir J., Salameh D., Strehaiano P., Brandam C., Lteif R., Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts, *European Food Research and Technology*, 237(5), 655-671, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2036-4>
529. Silva I., Campos M F., Hogg T., António Couto J., Factors influencing the production of volatile phenols by wine lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 471-475, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.029>
530. María Domínguez A., Eduardo Agosin A., Gas chromatography coupled with mass spectrometry detection for the volatile profiling of *Vitis Vinifera* CV. Carménère wines, *Journal of the Chilean Chemical Society*, 55(3), 385-391, 2010. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072010000300025>
531. Lorenzini M., Simonato B., Slaghenaufi D., Ugliano M., Zapparoli G., Assessment of yeasts for apple juice fermentation and production of cider volatile compounds, *LWT*, 99, 224-230, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.075>
532. Tristezza M., Tufariello M., Capozzi V., Spano G., Mita G., Grieco F., The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production, *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-14, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00670>
533. Mendes Ferreira A., Clímaco C M., Mendes Faia A., The role of non-*Saccharomyces* species in releasing glycosidic bound fraction of grape aroma components - A preliminary study, *Journal of Applied Microbiology*, 91(1), 67-71, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01348.x>
534. Lakićević H S., Karabegović T I., Cvetković J D., Lazić L M., Jančić R., Popović-Djordjević B J., Insight into the Aroma Profile and Sensory Characteristics of 'Prokupac' Red Wine Aromatised with Medicinal Herbs, *Horticulturae*, 8(4), 277-290, 2022. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8040277>
535. Kwasniewski T M., Vanden Heuvel E J., Pan S B., Sacks L G., Timing of cluster light environment manipulation during grape development affects C<sub>13</sub> norisoprenoid and carotenoid concentrations in riesling, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(11), 6841-6849, 2010. <https://doi.org/10.1021/jf904555p>

536. Sánchez-Palomo E., Alonso-Villegas R., González Viñas A M., Characterisation of free and glycosidically bound aroma compounds of la Mancha Verdejo white wines, *Food Chemistry*, 173, 1195-1202, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.148>
537. Martínez-Gil M A., Angenieux M., Pardo-García I A., Alonso L G., Ojeda H., Rosario Salinas M., Glycosidic aroma precursors of Syrah and Chardonnay grapes after an oak extract application to the grapevines, *Food Chemistry*, 138(2-3), 956-965, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.032>
538. Benucci I., Lombardelli C., Tamborra P., Muganu M., Esti M., Authenticity Markers of Aged Red Wines from Aglianico, Uva di Troia, Negroamaro and Primitivo Grapes, *Foods*, 13(12), 1866-1879, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods13121866>
539. Pérez-Olivero J S., Pérez-Pont L M., Conde E J., Pérez-Trujillo P J., Determination of Lactones in Wines by Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2014, 1-10, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/863019>
540. Câmara S J., Alves A M., Marques C J., Changes in volatile composition of Madeira wines during their oxidative ageing, *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 188-197, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.031>
541. Qian X., Lan Y., Han S., Liang N., Zhu B., Shi Y., Duan C., Comprehensive investigation of lactones and furanones in icewines and dry wines using gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry, *Food Research International*, 137, 109650, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109650>
542. Jarauta I., Ferreira V., Cacho F J., Synergic, additive and antagonistic effects between odorants with similar odour properties, *Developments in Food Science*, 43, 205-208, 2006. [https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(06\)80049-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(06)80049-X)
543. Cortes B M., Moreno J., Zea L., Moyano L., Medina M., Changes in Aroma Compounds of Sherry Wines during Their Biological Aging Carried out by *Saccharomyces cerevisiae* Races *bayanus* and *capensis*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2389-2394, 1998. <https://doi.org/10.1021/jf970903k>
544. Schneider R., Baumes R., Bayonove C., Razungles A., Volatile Compounds Involved in the Aroma of Sweet Fortified Wines (Vins Doux Naturels) from Grenache

- Noir, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(8), 3230-3237, 1998.  
<https://doi.org/10.1021/jf9710138>
545. Sánchez-Palomo E., Trujillo M., García Ruiz A., González Viñas A M., Aroma profile of malbec red wines from La Mancha region: Chemical and sensory characterization, Food Research International, 100(1), 201-208, 2017.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.036>
546. Zhang W., Lao F., Bi S., Pan X., Pang X., Hu X., Liao X., Wu J., Insights into the major aroma-active compounds in clear red raspberry juice (*Rubus idaeus* L. cv. Heritage) by molecular sensory science approaches, Food Chemistry, 336, 127721, 2021.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127721>
547. Hu K., Zhao H., Edwards N., Peyer L., Tao Y., Arneborg N., The effects of cell-cell contact between *Pichia kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae* on amino acids and volatiles in mixed culture alcoholic fermentations, Food Microbiology, 103, 103960, 2022.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103960>
548. Du Q., Ye D., Zang X., Nan H., Liu Y., Effect of low temperature on the shaping of yeast-derived metabolite compositions during wine fermentation, Food Research International, 162, 112016, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112016>
549. Li S., Bi P., Sun N., Gao Z., Chen X., Guo J., Characterization of different non-*Saccharomyces* yeasts via mono-fermentation to produce polyphenol-enriched and fragrant kiwi wine, Food Microbiology, 103, 103867, 2022.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103867>
550. Antonio Delgado J., Ángel Ferrer M., Sánchez Palomo E., Angel González-Viñas M., Aroma Impact Compounds of Red Wines from La Mancha Region, Madridge Journal of Food Technology, 5(1), 176-186, 2020. <https://doi.org/10.18689/mjft-1000127>
551. Hu L., Liu R., Wang X., Zhang X., The Sensory Quality Improvement of Citrus Wine through Co-Fermentations with Selected Non-*Saccharomyces* Yeast Strains and *Saccharomyces cerevisiae*, Microorganisms, 8(3), 323-339, 2020.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8030323>
552. Zhou R., Song Q., Xia H., Song N., Yang Q., Zhang X., Yao L., Yang S., Dai J., Chen X., Isolation and Identification of Non-*Saccharomyces* Yeast Producing 2-

- Phenylethanol and Study of the Ehrlich Pathway and Shikimate Pathway, *Journal of Fungi*, 9(9), 878-894, 2023. <https://doi.org/10.3390/jof9090878>
553. Philippidis A., Poulakis E., Basalekou M., Strataridaki A., Kallithraka S., Velegrakis M., Characterization of Greek Wines by Ultraviolet-Visible Absorption Spectroscopy and Statistical Multivariate Methods, *Analytical Letters*, 50(12), 1950-1963, 2017. <https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1255748>
554. Zhang Q-A., Wang T-T., Effect of ultrasound irradiation on the evolution of color properties and major phenolic compounds in wine during storage, *Food Chemistry*, 234, 372-380, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.022>
555. Skendi A., Papageorgiou M., Stefanou S., Preliminary Study of Microelements, Phenolics as well as Antioxidant Activity in Local, Homemade Wines from North-East Greece, *Foods*, 9(11), 1607-1625, 2020. <https://doi.org/10.3390/foods9111607>
556. Fernandes A., Oliveira J., Teixeira N., Mateus N., de Freitas V., A review of the current knowledge of red wine colour, *OENO One*. 51(1), 1-15, 2017. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2017.51.1.1604>
557. Hayasaka Y., Brise M., Eglinton J., Herderich M., The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* yeast on colour properties and pigment profiles of a Cabernet Sauvignon red wine, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 13(3), 176-185, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2007.tb00248.x>
558. Echeverrigaray S., Joel Scariot F., Menegotto M., Paula Longaray Delamare A., Anthocyanin adsorption by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation is associated to the loss of yeast cell wall/membrane integrity, *International Journal of Food Microbiology*, 314, 108383, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108383>
559. Babincev Lj., Gurešić D., Simonović R., Spectrophotometric characterization of red wine color from the vineyard region of Metohia, *Journal of Agricultural Sciences Belgrade*, 61(3), 281-290, 2016. <https://doi.org/10.2298/JAS1603281B>
560. Harbertson F J., Spayd S., Measuring Phenolics in the Winery, *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 280-288, 2006. <https://doi.org/10.5344/ajev.2006.57.3.280>

561. Poiană M-A., Moigrădean D., Gergen I., Hărmănescu M., The Establishing the Quality of Red Wines on the Basis of Chromatic Characteristics, *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies*, 13(1), 199-208, 2007.
562. Morata A., Loira I., Jose Suárez Lepe A., Influence of Yeasts in Wine Colour, in Morata A., Loira I., *Grape and Wine Biotechnology*, InTech, p. 285-305, 2016. <http://dx.doi.org/10.5772/65055>
563. Escott C., Morata A., Loira I., Tesfaye W., Suarez-Lepe A J., Characterization of polymeric pigments and pyranoanthocyanins formed in microfermentations of non-*Saccharomyces* yeasts, *Journal of Applied Microbiology*, 121(5), 1346-1356, 2016. <https://doi.org/10.1111/jam.13255>
564. Escott C., Manuel Del Fresno J., Loira I., Morata A., Tesfaye W., del Carmen González M., Antonio Suárez-Lepe J., Formation of polymeric pigments in red wines through sequential fermentation of flavanol-enriched musts with non-*Saccharomyces* yeasts, *Food Chemistry*, 239, 975-983, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.037>
565. Jastrzębska A., Determination of home-made wine selected parameters and study of honey addition impact on pro-healthy components content, *European Food Research and Technology*, 248(4), 963-973, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03934-4>
566. Bimpilas A., Panagopoulou M., Tsimogiannis D., Oreopoulou V., Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors, *Food Chemistry*, 197, 39-46, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.095>
567. Coradini R., Madoșă E., Petrescu I., Coradini C., Change of hue and intensity of color during the fermentation in case of must obtained from various varieties of red grapes from Minis-Maderat Winery, *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 18(4), 55-62, 2014.
568. Malićanin M., Danilović B., Cvetković D., Stamenković Stojanović S., Nikolić N., Lazić M., Karabegović I., Modulation of Aroma and Sensory Properties of Prokupac Wines by a *Bacillus*-based Preparation Applied to Grapes Prior to Harvest, *South African Journal of Enology and Viticulture*, 41(2), 158-167, 2020. <https://doi.org/10.21548/41-2-4016>

569. Mitrović D., Zdravković M., Živković N., Sredović-Ignjatović I., Jakšić D., Bradić I., Petrović A., Chemical and sensory characteristics of wine obtained from selected grapevine genotypes of the Prokupac variety, The 3rd International UNIFood Conference UNIFood 2024 Conference, Faculty of Agriculture, University of Belgrade, 28-29 June, Belgrade, p. 125, 2024.
570. Ruiz J., Belda I., Beisert B., Navascués E., Marquina D., Calderón F., Rauhut D., Santos A., Benito S., Analytical impact of *Metschnikowia pulcherrima* in the volatile profile of Verdejo white wines, Applied Microbiology and Biotechnology, 102(19), 8501-8509, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9255-3>
571. Testa B., Coppola F., Jane Lombardi S., Iorizzo M., Letizia F., Di Renzo M., Succi M., Tremonte P., Influence of *Hanseniaspora uvarum* AS27 on Chemical and Sensorial Characteristics of Aglianico Wine, Processes, 9(2), 326-339, 2021. <https://doi.org/10.3390/pr9020326>
572. Romano P., Braschi G., Siesto G., Patrignani F., Lanciotti R., Role of Yeasts on the Sensory Component of Wines, Foods, 11(13), 1921-1947, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11131921>
573. Hu K., Qin Y., Tao Y-S., Zhu X-L., Peng C-T., Ullah N., Potential of Glycosidase from Non-*Saccharomyces* Isolates for Enhancement of Wine Aroma, Journal of Food Science, 81(4), M935-M943, 2016. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13253>
574. Bonatto Machado de Castilhos M., Gonçalves Cattelan M., Carolina Conti-Silva A., Luiz Del Bianchi V., Influence of two different vinification procedures on the physicochemical and sensory properties of Brazilian non-*Vitis vinifera* red wines, LWT - Food Science and Technology, 54(2), 360-366, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.020>
575. Regmi U., Palma M., Barroso G C., Direct determination of organic acids in wine and wine-derived products by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy and chemometric techniques, Analytica Chimica Acta, 732, 137-144, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.009>
576. Yuan H., Sun Q., Wang L., Fu Z., Zhou T., Ma J., Liu X., Fan G., Teng C., Optimization of High-Density Fermentation Conditions for *Saccharomycopsis fibuligera*

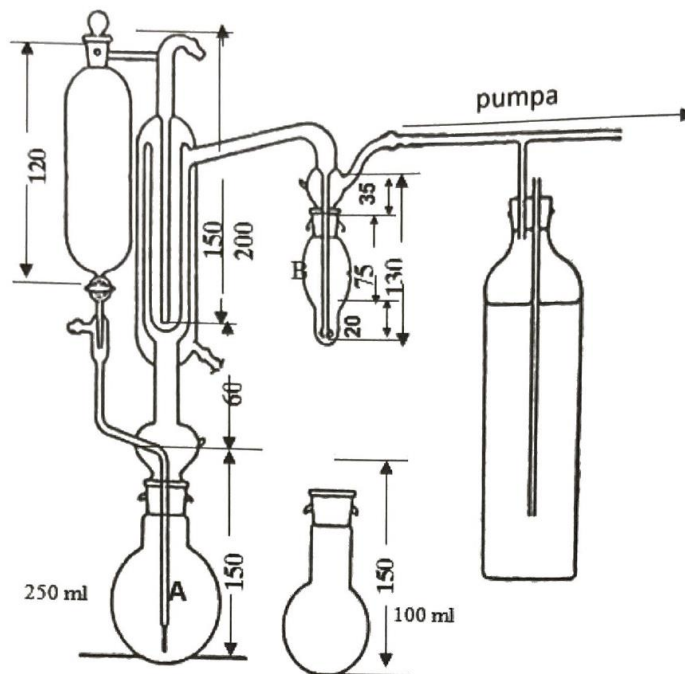
- Y1402 through Response Surface Analysis, *Foods*, 13(10), 1546-1563, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods13101546>
577. Raita S., Kusnere Z., Spalvins K., Blumberga D., Optimization of Yeast Cultivation Factors for Improved SCP Production, *Environmental and Climate Technologies*, 26(1), 848-861, 2022. <https://doi.org/10.2478/rtuect-2022-0064>
578. Liu Y., Lu Y., Quan Liu S., The potential of spent coffee grounds hydrolysates fermented with *Torulaspora delbrueckii* and *Pichia kluyveri* for developing an alcoholic beverage: The yeasts growth and chemical compounds modulation by yeast extracts, *Current Research in Food Science*, 4, 489-498, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.07.004>
579. Chua J-Y., Lu Y., Liu S-Q., Evaluation of five commercial non-*Saccharomyces* yeasts in fermentation of soy (tofu) whey into an alcoholic beverage, *Food Microbiology*, 76, 533-542, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.07.016>
580. Endoh R., Horiyama M., Ohkuma M., D-Fructose Assimilation and Fermentation by Yeasts Belonging to Saccharomycetes: Rediscovery of Universal Phenotypes and Elucidation of Fructophilic Behaviors in *Ambrosiozyma platypodis* and *Cyberlindnera americana*, *Microorganisms*, 9(4), 758-776, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040758>
581. Canonico L., Agarbati A., Comitini F., Ciani M., Recycled Brewer's Spent Grain (BSG) and Grape Juice: A New Tool for Non-Alcoholic (NAB) or Low-Alcoholic (LAB) Craft Beer Using Non-Conventional Yeasts, *Foods*, 13(4), 505-516, 2024. <https://doi.org/10.3390/foods13040505>
582. Campana R., Palma F., Sisti M., Growth ability, carbon source utilization and biochemical features of the new specie *Zalaria obscura*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(12), 1-15, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03417-y>
583. Yang L-B., Zhan X-B., Zheng Z-Y., Wu J-R., Gao M-J., Lin C-C., A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol, *Bioresource Technology*, 151, 120-127, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.031>

584. Chiruvolu V., Eskridge K., Cregg J., Meagher M., Effects of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 75, 163-173, 1998.
585. Tsirigka A., Theodosiou E., Patsios I S., Tsourekis A., Andreadelli A., Papa E., Aggeli A., Karabelas J A., Makris M A., Novel evolved *Yarrowia lipolytica* strains for enhanced growth and lipid content under high concentrations of crude glycerol, *Microbial Cell Factories*, 22(1), 62-81, 2023. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02072-8>
586. Malakar P., Venkatesh V K., GAL regulon of *Saccharomyces cerevisiae* performs optimally to maximize growth on galactose, *FEMS Yeast Research*, 14(2), 342-356, 2014. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12109>
587. Rollero S., Roberts S., Bauer F F., Divol B., Agitation impacts fermentation performance as well as carbon and nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* under winemaking conditions, *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 24(3), 360-367, 2018. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12338>
588. Muhammad Abubakar M., Abolarin S M., Okegbile J O., Influence of Temperature and Agitation Speed on Fermentation Process During Production of Bioethanol Fuel From Cassava, *International Journal of Engineering and Advanced Technology Studies*, 9(3), 40-46, 2021. <https://doi.org/10.37745/ijeats.13>
589. Cubells Martinez X., Narbad A., Carter T A., Stratford M., Flocculation of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*): An essential role for peptone, *Yeast*, 12, 415-423, 1996. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199604\)12:5%3C415::AID-YEA919%3E3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199604)12:5%3C415::AID-YEA919%3E3.0.CO;2-Z)
590. Felix Jacob F., Michel M., Zarnkow M., Hutzler M., Methner F-J., The complexity of yeast extracts and its consequences on the utility in brewing: A review, *Brewing Science*, 72(3-4), 50-62, 2019. <https://doi.org/10.23763/BrSc19-04jacob>
591. Tao Z., Yuan H., Liu M., Liu Q., Zhang S., Liu H., Jiang Y., Huang D., Wang T., Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(1), 151-166, 2023. <https://doi.org/10.4014/jmb.2207.07057>

592. Kamran Azad S., Shariatmadari F., Amir Karimi Torshizi M., Production of zinc-enriched biomass of *Saccharomyces cerevisiae*, Journal of Elementology, 19, 313-326, 2014. <https://doi.org/10.5601/jelem.2014.19.2.655>
593. Udeh O., Role of magnesium ions on yeast performance during very high gravity fermentation, Journal of Brewing and Distilling, 4(2), 19-45, 2013. <https://doi.org/10.5897/JBD2013.0041>
594. Anupama Palukurty M., Kumar Telgana N., Sundar Reddy Bora H., Naresh Mulampaka S., Screening and optimization of metal ions to enhance ethanol production using statistical experimental designs, African Journal of Microbiology Research, 2, 087-094, 2008.
595. Loukin S., Kung C., Manganese effectively supports yeast cell-cycle progression in place of calcium, Journal of Cell Biology, 131(4), 1025-1037, 1995. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.4.1025>
596. Karasu Yalçin S., Özbaş Y Z., Effects of ammonium sulphate concentration on growth and glycerol production kinetics of two endogenic wine yeast strains, Indian Journal of Biotechnology, 7(1), 89-93, 2008.
597. Ribeiro-Filho N., Linforth R., Powell D C., Fisk D I., Influence of essential inorganic elements on flavour formation during yeast fermentation, Food Chemistry, 361, 130025, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130025>
598. Wang M., Gu C., Chang Z., Chen J., Zhou J., Yue M., Liu F., Feng Z., Nutrient Consumption Patterns of *Saccharomyces cerevisiae* and Their Application in Fruit Wine Fermentation, Fermentation, 10(11), 539-554, 2024. <https://doi.org/10.3390/fermentation10110539>
599. Hucker B., Wakeling L., Vriesekoop F., Vitamins in brewing: Presence and influence of thiamine and riboflavin on wort fermentation, Journal of The Institute of Brewing, 122(1), 126-137, 2016. <https://doi.org/10.1002/jib.293>
600. Ma X., Yang M., He Y., Li C., Zhai C., Plackett-Burman Combined with Box-Behnken to Optimize the Medium of Fermented Tremella Polysaccharide and Compare the Characteristics before and after Optimization, Journal of Food Quality, 2020, 1-14, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8896454>

601. Miguel A G., Carlsen S., Almeida-Faria R., Saerens S., Arneborg N., Amino acid preference and fermentation performance of *Pichia kluyveri* strains in a synthetic wort, LWT, 199, 116059, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116059>

## 7. PRILOG



Slika P3.1 Dimenzije su u mm. Unutrašnji prečnici četiri koncentrične cevi što čine kondenzator su: 45, 34, 27 i 10 mm

Tabela P3.1 Matrica eksperimentalnog plana sa praćenim odzivnim veličinama

Broj eksperimenta	Faktori*											Praćene odzivne veličine	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Broj vijabilnih ćelija, log CFU/mL	Prinos biomase, g/L
1	35	40	1	1	1	0	3	1	0	0	0,2	7,21±0,01	2,77±0,03
2	35	200	1	1	1	0,1	0	0	0	0,1	0,2	6,98±0,02	1,59±0,05
3	35	40	5	0	0	0	0	0	5	0,1	0,2	7,17±0,01	2,59±0,06
4	25	200	5	0	1	0,1	3	0	0	0	0,2	8,71±0,01	60,88±0,80
5	25	40	5	1	1	0,1	0	1	5	0	0	7,80±0,06	9,51±1,02
6	35	40	5	0	0	0,1	3	1	0	0,1	0	7,26±0,01	3,10±0,07
7	25	40	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7,75±0,01	8,57±0,23
8	25	40	1	1	0	0,1	3	0	5	0,1	0,2	7,77±0,01	8,87±0,23
9	25	200	1	0	1	0	3	1	5	0,1	0	8,63±0,00	52,53±0,25
10	35	200	1	0	0	0,1	0	1	5	0	0,2	8,19±0,09	22,68±3,74
11	25	200	5	1	0	0	0	1	0	0,1	0,2	8,55±0,00	44,60±0,38
12	35	200	5	1	0	0	3	0	5	0	0	7,72±0,03	9,27±0,49

\*Faktori: A: Temperatura (°C), B: Brzina mešanja (obrt/min), C: Ekstrakt kvasca (g/L), D: ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (g/L), E: Riboflavin (mg/L), F: Biotin (mg/L), G: (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (g/L), H: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (g/L), I: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (g/L), J: MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (g/L) i K: CaCl<sub>2</sub> (g/L).

Tabela P3.2 Kodirane i nekodirane vrednosti praćenih procesnih parametara

Oznaka faktora	Faktor	Niži nivo	Srednji nivo	Viši nivo
		(-1)	(0)	(+1)
A	Temperatura, °C	20	25	30
B	Brzina mešanja, obrt/min	40	120	200
C	Koncentracija glukoze, g/L	5	27,50	50

Tabela P3.3 Matrica eksperimentalnog plana Boks-Benken dizajna

Broj eksperimenata	Nekodirane vrednosti faktora		
	Temperatura, °C	Brzina mešanja, obrt/min	Koncentracija glukoze, g/L
1	20	200	27,50
2	20	120	5
3	20	40	27,50
4	25	120	27,50
5	25	120	27,50
6	25	200	50
7	20	120	50
8	25	40	50
9	25	200	5
10	25	120	27,50
11	25	40	5
12	30	120	5
13	30	40	27,50
14	30	120	50
15	30	200	27,50

Tabela P3.4 Karton za senzorno ocenjivanje vina sorte prokupac

Vino:	Datum senzornog ocenjivanja:	
Degustator:		
Osobine	Definicija/sinonimi	Ocena
	<b>Boja</b>	
Purpurno plava		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Mastilo plava		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Čisto crvena (trešnja)		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Crvena sa oranž nijansom		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Crvenkasto-mrko do mrko		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Intenzitet boje		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
	<b>Miris</b>	
Sortnost/Tipičnost		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Intenzitet		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Kompleksnost		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Crveno bobičasto voće	Jagoda, malina, crvena ribizla, brusnica	1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Crno bobičasto voće	Kupina, borovnica, crna ribizla	1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Koštichavo voće	Šljiva, višnja, trešnja, drenjina	1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Cvetne note (floralne)	Akacija, Linalol (cvet mandarine, lavanda, jasmin), cvet vinove loze, cvet narandže, ruža, ljubičica, muskatni/mošus/muskatna ruža	1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Orašasti plodovi	Orah, lešnik, badem	1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Zeljaste/vegetativne note	Trava, zeleni biber, list paradajza, paprika, šargla, boranija, artičoka	1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Začinski tonovi	Cimet, karanfilić, crni biber, mirođija/korijander, anis	1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Tostirano		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Opšti utisak		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
	<b>Ukus</b>	
Sortnost/Tipičnost		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Intenzitet		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Postojanost/Perzistencija		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Kompleksnost		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Punoća/Telo		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Kiselost/Aciditet		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Struktura		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Tanini/Taniničnost		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Astrigencija/Trpkost		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Harmoničnost/Balans		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10
Ukus opšti utisak		1.....2.....3.....4.....5.....6.....7.....8.....9.....10

Napomena: Ocene 1-10 (intenzitet: 1-nije intenzivno; 10-veoma intenzivno).

Tabela P4.1 Morfološka karakterizacija kolonija i ćelija izolata kvasaca

Uzorak	Oznaka izolata	Makromorfološke karakteristike				Mikroskopske karakteristike	Rast na različitim temperaturama, °C				Stvaranje CO <sub>2</sub>	Rezistentnost na SO <sub>2</sub> , mg/L				Optička gustina, A620 nm, 24h	Etanolna tolerancija (% vijabilnih ćelija kvasca)			
		Oblik	Boja	Tekstura	Veličina		Oblik	4	10	15		20	50	100	200		300	3%	5%	7%
								vol.	vol.	vol.										
Divlja kupina	Kd-1	Okrugao	Bela	Glatka, kremasta	Srednje	Okrugao	+	+	+	+	+	+	+	+	1,088	93,75	66,82	46,69		
	Kd-2	Okrugao	Bela	Glatka, kremasta	Velike	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	0,902	96,90	78,71	52,99		
	Kd-3	Okrugao	Bela	Glatka, kremasta	Velike	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	1,055	93,93	68,72	39,72		
	Kd-4	Okrugao	Bela	Glatka, kremasta	Velike	Ovalan	+	+	+	+	+	+	+	+	1,004	99,20	76,49	65,64		
	Kd-5	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Male	Okrugao	-	-	+	+	-	+	+	+	0,138	65,22	49,28	45,65		
	Kd-6	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Male	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	0,625	95,36	92,00	44,32		
	Kd-7	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Srednje	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	0,705	74,04	50,21	19,72		
	Kd-8	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Srednje	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	0,668	72,01	58,08	23,05		
	Kd-9	Okrugao	Bela	Glatka, masna	Male	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	0,781	60,05	41,36	33,42		
	Kd-10	Okrugao	Bela	Glatka, masna	Male	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	0,704	76,42	40,77	22,30		
	Kd-11	Okrugao	Bela	Glatka, kremasta	Srednje	Limunast	+	+	+	+	-	+	+	+	0,650	87,23	78,77	50,46		
	Kd-12	Okrugao	Bela	Glatka, masna	Srednje	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	-	0,673	93,02	57,65	49,78		
	Kd-13	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Velike	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	0,653	77,95	77,18	53,91		

	Kd-14	Okrugao	Bela	Glatka, kremasta	Male	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,680	72,35	49,12	37,06
	Kd-15	Okrugao	Bela	Glatka, kremasta	Male	Ovalan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,635	82,83	56,54	20,94
	Kd-16	Okrugao	Bela	Glatka, kremasta	Srednje	Limunast	+	+	+	+	-	+	+	+	+	0,642	91,28	83,49	59,97
	Kd-17	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Velike	Okrugao	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,910	96,26	84,84	75,60
Kultivisana kupina	K-1	Nepravilan	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Srednje	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,510	91,57	88,82	44,71
	K-2	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Mala	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,611	58,76	48,61	46,48
	K-3	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Mala	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,611	55,16	53,19	37,97
	K-4	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Mala	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,682	45,01	33,72	23,02
	K-5	Okrugao	Bela	Glatka, kremasta	Srednja	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,016	70,08	61,52	36,81
Divlja šljiva	Šd-1	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Mala	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,639	62,13	44,29	36,93
	Šd-2	Okrugao	Bela	Glatka, kremasta	Srednja	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,655	54,81	47,63	24,73
	Šd-3	Okrugao	Bela	Glatka, kremasta	Srednja	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,598	52,17	48,66	36,29
	Šd-4	Okrugao	Bela	Glatka, kremasta	Mala	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,684	54,39	41,67	27,49
	Šd-5	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Velika	Limunast	+	+	+	+	-	+	+	+	+	0,629	49,13	45,47	23,37
Kultivisana šljiva	Š-1	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Mala	Limunast	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0,627	65,87	65,23	32,06
	Š-2	Okrugao	Bela	Glatka, masna	Srednja	Limunast	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0,679	75,55	66,57	27,69

	Š-3	Okrugao	Bela	Glatka, masna	Srednja	Limunast	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0,633	81,20	72,67	35,23
	Š-4	Okrugao	Bela	Glatka, masna	Mala	Limunast	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0,605	72,40	43,47	37,19
	Š-5	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Velika	Limunast	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0,577	71,06	64,82	37,61
Kruška	Kr-1	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Velika	Ovalan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,618	46,12	39,81	35,11
	Kr-2	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Velika	Ovalan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,643	53,03	48,99	33,75
	Kr-3	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Velika	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,679	54,64	42,12	31,37
	Kr-4	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Velika	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,636	57,55	54,40	32,55
Smokva	S-1	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Mala	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,879	96,25	91,24	73,38
	S-2	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Mala	Limunast	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,828	93,72	84,66	60,63
	S-3	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Mala	Limunast	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0,644	68,94	60,71	22,05
	S-4	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Mala	Limunast	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0,613	77,00	62,97	33,12
	S-5	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Mala	Limunast	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0,661	79,73	63,69	53,25
	S-6	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Mala	Limunast	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0,637	74,25	54,95	48,82
	S-7	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Mala	Limunast	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0,646	89,94	77,55	32,97
Grožđe	G-1	Okrugao	Prozirna	Glatka, masna	Mala	Limunast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,000	0,00	0,00	0,00
	G-2	Okrugao	Prozirna	Glatka, masna	Mala	Limunast	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,001	0,00	0,00	0,00

	G-3	Okrugao	Prozima	Glatka, masna	Mala	Limunast	-	-	+	+	-	+	+	+	+	0,162	85,19	27,16	24,07
List vinove loze	L-1	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Mala	Štapićast	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0,588	64,12	61,90	8,67
	L-2	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Mala	Štapićast	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0,562	69,22	48,22	9,07
	L-3	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Mala	Štapićast	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0,427	55,04	3,28	1,41
	L-4	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, masna	Mala	Štapićast	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0,337	61,42	9,79	1,48
	L-5	Okrugao	Svetlo braon	Naborena, suva	Mala	Štapićast	-	-	-	+	+	+	+	+	+	0,548	68,43	25,73	1,64
Čokot vinove loze	Č-1	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Velika	Ovalan	-	-	+	+	-	+	+	+	+	0,404	51,24	29,95	20,05
	Č-2	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Velika	Ovalan	-	-	+	+	-	+	+	+	+	0,193	86,01	41,97	37,82
	Č-3	Okrugao	Svetlo žuta	Glatka, kremasta	Velika	Ovalan	-	-	+	+	-	+	+	+	+	0,332	62,05	31,02	25,00
Sok grožđa	Gf-1	Okrugao	Prozima	Glatka, masna	Mala	Štapićast	-	-	+	+	-	+	+	+	+	0,046	76,09	47,83	28,26
	Gf-2	Okrugao	Prozima	Naborena, suva	Mala	Štapićast	-	-	+	+	-	+	+	+	+	0,137	48,18	29,20	22,63
	Gf-3	Okrugao	Crveno- roze	Glatka, puterasta	Velika	Elipsoidan	-	-	+	+	-	+	+	+	+	0,149	79,87	56,38	40,94
	Gf-4	Okrugao	Prozima	Glatka, masna	Mala	Štapićast	-	-	+	+	-	+	+	+	+	0,022	77,27	54,55	40,91

Tabela P4.2 Enološke karakteristike odabranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca

Soj kvasca	Rast na različitim temperaturama, °C				Stvaranje CO <sub>2</sub>	Rezistentnost na SO <sub>2</sub> , mg/L				Stvaranje arome <sup>1</sup>
	4	10	15	20		50	100	200	300	
<i>C. famata</i> Kd-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	U++
<i>C. famata</i> Kd-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	U+++
<i>C. famata</i> Kd-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	U++
<i>C. famata</i> Kd-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	U++
<i>H. uvarum</i> Kd-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P++
<i>H. uvarum</i> Kd-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P+
<i>H. uvarum</i> Kd-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P++
<i>H. uvarum</i> Kd-12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	P++
<i>H. uvarum</i> Kd-13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P++
<i>H. uvarum</i> Kr-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P++
<i>H. uvarum</i> Kr-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	U+++
<i>H. uvarum</i> Š-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P++
<i>H. uvarum</i> Šd-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P++
<i>P. kluyveri</i> K-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P+++
<i>M. pulcherrima</i> K-5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P++
<i>R. glutinis</i> Gf-3	-	-	+	+	-	+	+	+	+	U++
<i>P. laurentii</i> Č-1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	P++
<i>S. cerevisiae</i> ICV 1116	+	+	+	+	+	+	+	+	+	P+++

<sup>1</sup>Stvaranje arome: P – prijatna aroma, U – neprijatna aroma. Intenzitet arome: (+) slab, (++) umeren, (+++) izražen.

Tabela P4.3 Brzina oslobađanja CO<sub>2</sub> (g/L dan) od strane odabranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca tokom mikrovinifikacije pasterizovane šire sorte prokupac

Vreme, dan	Kd-1	Kd-2	Kd-4	Kd-17	Kd-8	Kd-9	Kd-10	Kd-12	Kd-13	Kr-2	Kr-4	Š-2	Šd-1	K-1	K-5	Gf-3	Č-1	ICV V1116
0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
1	5,56±0,27	5,20±0,19	4,62±0,15	4,66±0,24	3,00±0,56	4,16±0,43	3,07±0,20	11,28±0,07	3,52±0,25	3,60±0,21	4,84±0,32	3,76±0,27	3,27±0,20	8,25±0,04	3,83±0,24	9,11±0,10	10,35±0,05	21,25±0,16
2	5,20±0,09	4,79±0,40	3,74±0,45	5,29±0,77	4,33±0,09	4,85±0,11	3,96±0,00	13,82±0,02	3,94±0,11	3,83±0,07	4,32±0,11	5,32±0,08	3,86±0,13	9,88±0,08	3,93±0,22	5,16±0,03	5,19±0,02	40,89±0,02
3	5,65±0,24	4,81±0,57	3,52±0,25	5,74±0,71	4,38±0,17	4,97±0,06	4,11±0,16	14,25±0,04	4,05±0,11	4,10±0,02	4,50±0,16	5,85±0,08	4,19±0,07	12,64±0,07	3,86±0,24	5,21±0,01	5,98±0,04	29,61±0,07
4	5,11±0,39	4,37±0,55	3,32±0,36	5,02±0,59	3,38±0,02	3,97±0,11	3,55±0,11	12,41±0,01	3,54±0,06	3,60±0,07	3,87±0,11	4,22±0,05	3,52±0,02	12,82±0,02	3,32±0,21	5,47±0,01	5,00±0,02	23,02±0,02
5	4,48±0,18	3,47±0,57	2,91±0,08	4,66±0,54	2,71±0,09	3,32±0,06	2,98±0,15	8,58±0,02	2,62±0,00	2,57±0,00	2,96±0,03	3,71±0,03	2,60±0,04	11,56±0,04	3,47±0,73	3,81±0,00	4,77±0,01	17,74±0,05
6	4,84±0,39	4,03±0,19	3,17±0,04	4,75±0,45	2,77±0,00	2,72±0,00	2,41±0,09	7,92±0,02	2,60±0,01	2,61±0,05	3,15±0,10	3,97±0,13	2,41±0,02	10,57±0,03	3,27±0,18	4,39±0,02	4,99±0,02	11,19±0,01
7	5,83±0,18	4,86±0,49	3,64±0,49	6,10±0,24	2,38±0,01	2,86±0,05	2,42±0,02	6,47±0,03	2,41±0,03	2,51±0,01	3,05±0,13	3,94±0,26	2,22±0,13	11,01±0,02	3,96±0,15	6,22±0,02	6,68±0,01	7,61±0,02
8	3,95±0,68	3,05±0,55	2,20±0,13	3,77±0,09	1,40±0,14	1,58±0,11	1,56±0,03	3,44±0,03	1,40±0,05	2,17±0,11	1,56±0,01	2,10±0,13	1,96±0,05	6,58±0,02	2,64±0,38	3,61±0,01	3,59±0,01	4,99±0,02
9	4,04±0,73	3,74±0,55	3,15±0,34	4,48±0,50	1,48±0,00	1,99±0,09	1,63±0,16	3,11±0,02	1,61±0,07	1,27±0,05	2,10±0,07	2,55±0,06	1,53±0,04	6,81±0,00	3,00±0,45	4,76±0,05	5,40±0,00	5,97±0,04
10	3,17±0,26	3,00±0,60	2,27±0,48	3,32±0,24	1,00±0,08	1,45±0,01	1,29±0,04	2,84±0,03	1,14±0,05	1,11±0,00	1,56±0,12	1,83±0,26	1,12±0,11	4,83±0,03	1,47±0,40	3,01±0,01	3,57±0,04	5,25±0,05
11	1,85±0,23	1,61±1,21	1,81±0,30	2,69±0,95	0,58±0,14	0,71±0,13	0,77±0,11	0,27±0,06	0,57±0,02	0,56±0,07	0,68±0,13	0,91±0,06	0,65±0,11	3,76±0,02	1,64±0,40	1,86±0,06	1,63±0,03	2,66±0,06
12	10,40±1,17	7,69±0,71	8,01±0,11	10,79±1,02	0,26±0,01	0,20±0,11	0,25±0,18	0,42±0,00	0,36±0,18	0,27±0,06	0,25±0,20	0,11±0,19	0,26±0,11	3,40±0,03	7,84±0,45	0,26±0,00	1,39±0,05	0,13±0,03
13	3,77±2,41	3,86±0,70	3,00±0,22	3,65±0,14										6,02±0,02	3,81±0,15		5,01±0,01	
14	3,32±1,64	2,52±0,59	2,71±0,38	3,50±0,09										6,04±0,05	3,52±0,51		4,99±0,01	
15	2,66±1,21	1,98±0,71	1,81±0,50	2,42±0,16										4,80±0,08	1,30±0,21		5,20±0,00	
16	0,69±0,01	1,17±0,01	1,68±0,19	1,37±0,07										4,52±0,00	1,47±0,06		1,47±0,00	
17														3,69±0,08				
18														1,27±0,00				

*C. famata* (Kd-1, Kd-2, Kd-4, Kd-17), *H. uvarum* (Kd-8, Kd-9, Kd-10, Kd-12, Kd-13, Kr-2, Kr-4, Š-2, Šd-1), *P. kluyveri* (K-1), *M. pulcherrima* (K-5), *R. glutinis* (Gf-3), *P. laurentii* (Č-1), *S. cerevisiae* (ICV V1116).

Tabela P4.4 Parcijalne nukleotidne sekvence gena odabranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca

Vrsta kvasca	Sekvenca gena
<i>P. kluyveri</i> (K-1)	<p>AATGGGGATATATCTTATACACATGCGTGAGCGCACCAAACACCTAAAAT  TGTAATAATACCAGTCACTAAGTTTTAACAAAACAAAACCTTTCAACAACG  GATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGCAGCGAAATGCGATACCTA  GTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGCACATTGCG  CCCCATGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCGTTTCCTTCTTG  CGCAAGCAGAGTTGAGAACAGGCTATGCCTTTTTTCGAAATGGAACGTCGT  GGACGAAGTGAACATAAATTTTTAGCACGCTTTGGCCGCCGAACCTTTAAC  TAAGCTCGACCTCAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATC  AAAAGGGGGGAAGAAAAAGGATCTTTCCTGTGATTTATATCTTATACACA  TGCGTGAGCGCACAAACACCTAAAATTGTAATAATACCATTCCTAAGTTT  TAACAAAACAAAACCTTTCACAACGGATCTCTTGGTTCTGCATCGATGAAG  AGCGCAGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAAATTGCAGCATCTGAAATCAT  CGAGTTTCTTGAAGCACATTGCGCCCAGGGGTATTCCTGGGGGCATGCC  TGTCTGAGCGTCTTTTCTTCTTGCAGAGGCAAAGTTTGAGAAACAGGGCT  ATGCCTTTTTTCAAATGGAAAGTTCTTGGAAACAAAAGTGAACTAAAAT  TTTTTAACAGCTTTTGGCCCCAAAATTTTTAACTAAGCCTGCACCTCAA  TCAGGGTAGGAAATACCCGCTGAACTTAAAGCATATCCTGATGGGGGAA  GAAAAAAAAAAAAAAAAATTTTTTTTTTTTTAATATTAAGTATTCTTA  ATTTATTTTTAATAAGGAATTTTCTTTGATTAAGGCAAATGAAAATT  CACGCGGAGCGCCTAGTGGGAAGGAGGCAGAGGGATGCATGTTTGAAC  GAAAAGCAAAAAGGAAAAAAAAAGAAAGAGAACCGAATCAAAGCTTTTTGA  TGTGAAGGTAAATTCGAAAGTTTTTCTGAGTGAGGCCGCGGATAATTGCG  CCCTTGGATGGTAAAAGATTGCATATGTTATATGACGATTTTTGTTTGA  AGGGCAGAAAAGAACGAATCGCCGCGACTCCCATGGGGGGGCGTCAGAAA  AAGGAAAATAAAAAAAAAACGCGTAGAAAGGGTAGATTTTGGACGAAATT  ATGGGGTGGGGCGCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGGGAGGATTTTAAAGATGA  TTAAAAAGATGGAGCATTTTTTAAATCACGGGGCCGAAGTAGGGGCCCC  CCAAATTTGGTGGTTTGTAGAATGGGTGAAAAAAAAAAATGTCTCGTTT  CATTCGGGAAAATTTTCCATTTGATTGTTTGGATGGAACAGGGGGGGT</p>
<i>M. pulcherrima</i> (K-5)	<p>TAAAATGAATTAACCCTTTAAGGCCAAACTCTAAATCTTAACCGTCAA  TAACTTTATCAAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGA  TGAAGAACGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAGACGTGAATC  ATTGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGGGGTATCCCCAGGGCATGC  GTGGGTGAGCGATATTTACTCTCAAACCTCCGGTTTGGTCTGCTTCGGC</p>

---

CTAATATCAACGGCGCTAGAATAAGTTTTAGCCCCATTCTTTTTCTCAC  
CCTCGTAAGACTACCCGCTGAACCTAAGCATATCAAAAACGGGGAAGGAA  
AAAAATCATTAAAATTGAAATTACACCATTTTAGGCAGAACTCTAAATCT  
CAACGTCAATAACTTTTTCAATAACTTTCTCAACGGATCTCTTGTTCTC  
CATCGATGAAGAAGCAGCGAATTGCGATACGTAATATGACTTGCAAACGT  
GAATCATTGAATCTTTAAACCAATTGGCCCCGGGTATTCCCGGGCATGCG  
TGGGTGAGCAATATTTACTCTCAACTCCGTTTGGTCTGCTTCGCCTAATA  
TCACGGCGCTTGAAATAAGTTTTAGCCCATTCTTTTTCTACCCCTAAAA  
CTACCCTGAAATTTAAGCATATCATAGACGGAAAGAAAAAAAAAAGAAGA  
CAGCGAGCACCTCGGCC

---

*H. uvarum* (Kr-2)

GGGCCTTGGTGATATCATTGTTGCTCGAGTTCTTGTTTAGATCTTTTACA  
ATAATGTGTATCTTTATTGAAGATGTGCGCTTAATTGCGCTGCTTCTTTA  
GAGTGTGCGAGTGAAAGTAGTCTTGCTTGAATCTCAGTCAACGCTACACA  
CATTGGAGTTTTTTTCCTTTAATTTAATTCTTCCGGCTTTAAACCAAAGG  
GTCCAGGGCAAAAACCAACCCCAACCAATTTTATTTTATTATAATTTTTT  
AACCTAACCCAAAATTCCAAACGAAAATTTTAAAAAATTTTAAACTTTC  
ACCACCGAACCCCTGGGTCCCCCACCATAAAAAACGAACCAAATTGCA  
AAAATAAAGGGAAATTGCAAAACCCCGGGAACCATTGAATTTTTAAACCC  
CCTTGCCCCCTTGACCATTCCCAGGGGCAGGCCGGTTTAAACGCCTTTT  
CCTTCCCAAAAAATAATTTATAATTTTTGGGTGGGGGGCAAACCCAGGG  
TTACCTGGAAATGGAAAACGGTTCCATCCTTTTTTAATTCACCCCTTACC  
TCCTTGAAAACCCGGTCCCCCGGGAAGGAATTTAGGAATTTATCCTTT  
TTCTTTCCAAGGAAAAGGGAACCGTCCCTTAGGCAAAGGGTGGCTTTTA  
AAATCCTCCAATTTGGACCCCAAACCAGGAAGAATTACCCCGAACCTTA  
ACCTAATCATAAGACCGGAAGAAAAGAATCAATAGAATGGAATTACCATG  
GTGGCTCAATTCCTGGTTAAAATCTTTAACAATAAGGTGAATCTTTATGG  
AAAAAGTTGCGCTAAATTGCGCTCCTCCTTAAAAGGGTCCCCAGTGAAAA  
GTAATCCTGGCTGGAATCCTCACCCACCCCATGGGAATTTTTTTTTTTT  
TAAATTTATTTTTTTCCCTTAAAAACCAGGGGTGGCGGAAAAAAAAC  
ACAAATTTTTTTTTTTTTTAAAATTTTTTAAAACCAACACAATTTCCG  
GGGAATTTTTTAATAATTTTTTAAATTTTACAGCAGAATTTGGGTTTCCC  
CCCCAAAAAAAAAAAAACAAAAGGGGGGAAAAAAAAAAGGGGGGAGTTGG  
CAAACCCCCACCACGAAAATTTTTTACACCCGCCCCGAACATCTCG  
GGGGGGGGGGGGTGGGGGTTTTTCTCCAATAAAAAAATTTTATATTTT  
TTTGGGGGGGGGGGAACCCGCGGGGGTGGAAAGGGGAAAAAGGTTT  
CCCCTTTTTTTTTACCCCCCTCCCCCCCCGGCGCCCCCCCCGTCCA

---

*H. uvarum* (Šd-1)

---

GGTCTCGGTGCAGTATCATTGTTGCTCGAGTTCTTGTTTAGATCTTTTAC  
AATAATGTGTATCTTTATTGAAGATGTGCGCTTAATTGCGCTGCTTCTTT  
AGAGTGTGCGCAGTAGAAGTAGTCTTGCTTGAATCTCAGTCAACGCTACAC  
ACATTGGAGTTTTTTACTTTAATTTAATTCTTTCTGCTTTGAATCGAAAG  
GTTCAAGGCCAAAAACAACACAAACAATTTTATTTTATTATAATTTTTT  
AAACTAAACCAAAATTCCTAACGGAAATTTAAAATAATTTAAAACTTTC  
ACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAATTGCG  
ATAAGTAATGTGAATTGCAGATACTCGTGAATCATTGAATTTTTGAACGC  
ACATTGCGCCCTTGAGCATTCTCAGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTT  
CCTTCTCAAAGATAATTTATTATTTTTTGGTTGTGGGCGATACTCAGGG  
TTAGCTTGAAATTGGAGACTGTTTCAGTCTTTTTTAATTCAACACTTAGC  
TTCTTTGGAGACGCTGTTCTCGCTGTGATGATTTATGGATTTATTCGTT  
TACTTTACAAGGGAAATGGTAACGTACCTTAGGCCAAAGGGTTGCTTTTA  
ATATTCATCAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGATTACCCGCTGAACTTA  
AGCATATCATAAACGCGGAGGAGAAGATTAAATTAGAATTGAATTATCAT  
TGTTGCTCGAGTCTTGTTTAGATCTTTTACAATAATGTGTATCTTTATT  
GAAGATGTGCGCTTAATTGCGCTGCTTCTTTAGAGTGTGCGATTAGAAGT  
AGTCTTGCTTGAATCTCACTCAACCCCATGGGAATTTTTTTATTTAAT  
TTAAATTTCTCCGTTTTAAATCAAGGGGTGGGGAAAACAAAAACAATT  
TTATTTTTTTATAATTTTTTTAACTAAACAAATTTAAGGAAAATTTTAA  
AAAAATTTAAAATTTCAAGGAACCTTGGGTTCCCCCATAAAAAAATCA  
ACCAAATTGCATAAATAAGGGGAATTGCAAAACGCCGAAAACCATAAAAT  
TTTTGAACCTCGCCGGAACATCCGGGGGGGGCGGTTTGAACCTTTTCTT  
TCACAGAAAAATTTAAATTTGTGGTGTGGGGGAAAACCCGGGGGTGCC  
TGAGAAGGGGGGAAGGGGTTGCTCTTTTTTTTTTCCCCCCCCCTGGCGG

---

*H. uvarum* (Š-2)

GCCTTTGATGATTATCATTGTTGCTCGAGTTCTTGTTTAGATCTTTTACA  
ATAATGTGTATCTTTATTGAAGATGTGCGCTTAATTGCGCTGCTTCATTA  
GAGTGTGCGCAGTAGAAGTAGTCTTGCTTGAATCTCAGTCAACGTTTACAC  
ACATTGGAGTTTTTTTACCTTAATTTAATTCCTTCCGCTTTTAAACCAAA  
GGGTCCAGGGCAAAAACCAACCCCAACCATTTTATTTTATTATAATTTTT  
TAAACCAAACCAAAATTTCCAACGGAAATTTAAAAAAATTTAAACTTT  
CCACCACGGAACCCCTGGTTCCCCCTCCATGAAAAACCTAACCAATTGC  
CAAAAATAATGGGAATTGCCAAAACCCCTGAATCCTTGAATTTTTGAACC  
CCCCTTGGGCCCTGAACCTTCCCCAGGGCCTGCCCGGTTGAACCTCCTT  
TCCCTCCCCAAAAAAATTTTTTATTTTTTGGTTGGGGGCCAAACCCCGG  
GGTAACTTGAAATTGGAAAACGGTTCATCCTTTTTAATTCCACCCTTAA

---

---

CTTCCTTGAAAAACCCGGTCCCCCGGGAAGGATTTATGGAATTATTCCT  
TTTACTTTACCAGGGAAATGGTAATGGACCTTAAGCCAAGGGTTGCTTTT  
AAAATTCCTCCAATTTGGCCTCCAATCCAGGAAGAATACCCGCTGAACCT  
AAACCTATCCATAAACCGGAAGGAAGAAGCAATATAATGGATTAACAATG  
GTGCTCCAATTCCTGGTTAAACTTTTACCATAAAGGGGATCCTTAATGG  
AAATGTGCGCCTAAATGCGCGGCTTCCTTAAGAATGGCGCAATAAAAAGTA  
ATCTTGCTTGAATCTCAATCCACTTTCCCATGGGAATTTTTTTTTTTTA  
TTATATATCTCTTTGCCTTTATAAACCAAGGGTTTGGGGAAAAAAAAAAAA  
AAATTTTTATTTATAATAAATTTTTTTAAACATACACAATTCCCGGGAAA  
TTTTTTAAAAAATTTAAAAATTTACCAGGGACCTCTGGTTTCCCCCCAA  
AAAAATTACCCAATGTTCTAATGATTAGGGGAAATGCGAAAACCCCCC  
AAACCAGGTAAATTTGAACCCCCCCCCCCCCCACGGGCGCCCTGGGG  
CGCCCCCCCCCAAAAAAATTTTTTTTTTTTTGTGGGGGGCCCCCCCG  
CCCCTAAAAATAAAAAAAGGCCCTTTTTTTTAAACCACCCACCCGG

---

Tabela P4.5 Brzine potrošnje šećera (g/L dan) tokom alkoholne fermentacije kljuka grožđa prokupac od strane odabranih sojeva ne-  
*Saccharomyces* kvasaca

Vreme, dan	<i>P. kluyveri</i> K-1	<i>P. kluyveri</i> K-1/ <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ICV D254	<i>M.</i> <i>pulcherrima</i> K-5	<i>M.</i> <i>pulcherrima</i> K-5/ <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Kr-2	<i>H. uvarum</i> Kr-2/ <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Šd-1	<i>H. uvarum</i> Šd-1/ <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Š-2	<i>H. uvarum</i> Š-2/ <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ICV D254	Kvasci epifitne mikrobiote	<i>S.</i> <i>cerevisiae</i> ICV D254
0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
1	13,32±0,07	13,81±0,07	13,22±0,07	13,49±0,07	13,68±0,07	13,99±0,07	9,73±0,05	11,72±0,06	24,61±0,12	18,31±0,09	8,56±1,15	8,98±0,04
2	12,03±0,03	13,49±0,04	11,58±0,03	12,30±0,04	13,36±0,04	12,76±0,04	9,50±0,03	11,49±0,03	18,22±0,05	13,72±0,04	13,89±0,28	7,74±0,02
3	26,27±0,24	28,23±0,26	26,49±0,24	26,96±0,25	29,28±0,26	27,86±0,25	26,01±0,22	26,83±0,24	31,67±0,32	28,30±0,27	23,08±0,41	37,97±0,29
4	32,48±0,08	39,23±0,11	36,61±0,10	31,84±0,07	40,86±0,11	42,04±0,12	46,49±0,16	43,46±0,14	37,26±0,07	34,50±0,08	30,63±0,46	98,71±0,41
5	23,31±0,17	31,49±0,22	24,91±0,18	26,28±0,19	20,86±0,16	27,70±0,18	22,16±0,17	26,57±0,19	34,66±0,25	56,70±0,36	33,24±0,10	42,12±0,31
6	50,13±0,28	74,12±0,29	51,05±0,29	69,42±0,25	14,66±0,38	29,85±0,37	16,47±0,37	31,63±0,36	23,39±0,47	26,06±0,48	53,97±0,56	18,09±0,83
7	29,84±1,56	15,61±1,76	24,39±1,55	19,47±1,64	41,75±1,48	56,60±1,78	20,77±1,25	30,83±1,47	35,69±1,72	38,63±1,81	32,57±0,27	12,30±0,43
8	19,45±0,40	7,03±0,29	16,09±0,37	9,54±0,30	14,04±0,28	6,47±0,28	30,86±0,43	27,79±0,54	9,00±0,30	8,33±0,31	15,88±0,13	4,51±0,13
9	8,61±1,20	2,29±1,33	19,17±1,13	8,45±1,24	20,40±1,01	4,66±1,27	23,51±0,93	3,63±1,24	12,74±1,22	3,72±1,33	11,98±0,22	2,89±0,36
10	11,37±0,40	6,72±0,43	5,39±0,43	9,16±0,40	10,93±0,37	7,88±0,42	16,57±0,36	10,82±0,41	4,99±0,44	4,66±0,44	6,24±0,05	0,60±0,07
11	6,32±0,72	2,32±0,71	3,72±0,71	3,21±0,68	5,52±0,66	3,58±0,69	6,38±0,72	6,62±0,67	2,73±0,71	2,47±0,71	3,48±0,00	0,09±0,08

Tabela P4.6 Brzine oslobađanja CO<sub>2</sub> (g/L dan) tokom alkoholne fermentacije kljuka grožđa prokupac od strane odabranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca

Vreme, dan	<i>P. kluyveri</i> K-1	<i>P. kluyveri</i> K-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>M. pulcherrima</i> K-5	<i>M. pulcherrima</i> K-5/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Kr-2	<i>H. uvarum</i> Kr-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Šd-1	<i>H. uvarum</i> Šd-1/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Š-2	<i>H. uvarum</i> Š-2/ <i>S. cerevisiae</i> ICV D254	Kvasci epifitne mikrobiote	<i>S. cerevisiae</i> ICV D254
0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
1	2,27±0,01	3,73±0,02	2,67±0,01	2,07±0,01	2,00±0,01	2,40±0,01	2,67±0,01	1,73±0,01	6,53±0,03	4,73±0,02	3,40±0,02	0,53±0,00
2	3,73±0,01	5,93±0,02	3,67±0,01	3,73±0,01	4,60±0,02	4,07±0,01	4,20±0,01	4,00±0,01	4,67±0,01	3,53±0,01	4,00±0,01	1,40±0,01
3	20,20±0,15	22,87±0,18	20,27±0,15	21,07±0,15	22,93±0,17	21,00±0,16	22,13±0,16	21,53±0,16	22,27±0,18	21,53±0,16	16,53±0,13	32,60±0,22
4	23,33±0,07	22,80±0,06	25,00±0,08	24,47±0,08	24,53±0,08	24,13±0,08	25,27±0,08	24,33±0,08	26,60±0,08	26,47±0,08	26,13±0,09	59,53±0,24
5	17,93±0,12	19,60±0,14	20,47±0,14	20,60±0,14	16,80±0,12	21,60±0,14	17,87±0,13	21,27±0,14	19,93±0,14	23,47±0,16	18,07±0,12	6,00±0,08
6	13,27±0,21	17,20±0,23	14,47±0,22	17,00±0,22	12,07±0,22	18,07±0,22	12,07±0,23	18,13±0,22	14,20±0,25	18,73±0,24	14,13±0,21	2,67±0,34
7	9,00±0,74	14,73±0,88	11,20±0,80	13,00±0,84	7,47±0,74	12,80±0,86	8,00±0,75	13,13±0,86	10,53±0,86	15,07±0,94	9,60±0,75	2,07±0,84
8	6,67±0,16	4,40±0,16	10,53±0,21	4,13±0,15	4,87±0,14	3,60±0,14	7,80±0,18	3,53±0,14	7,80±0,19	3,93±0,16	7,53±0,17	2,47±0,13
9	7,13±0,54	3,00±0,65	6,27±0,62	2,87±0,62	6,27±0,54	2,73±0,63	11,60±0,54	2,87±0,63	6,53±0,64	2,80±0,69	7,93±0,56	2,20±0,63
10	10,53±0,18	3,07±0,22	3,47±0,22	3,00±0,21	7,60±0,18	2,60±0,21	4,93±0,21	2,93±0,21	3,67±0,23	3,00±0,23	3,80±0,20	2,67±0,21
11	5,60±0,38	2,07±0,36	2,53±0,37	2,13±0,35	3,00±0,35	2,40±0,35	2,53±0,36	2,40±0,35	2,60±0,38	2,13±0,38	2,27±0,35	2,00±0,35

Tabela P4.7 Vrednosti brzine stvaranja CO<sub>2</sub> (g/L dan) tokom eksponencijalne faze rasta kao i srednja vrednost brzine stvaranja CO<sub>2</sub> od strane odabranih sojeva ne-*Saccharomyces* kvasaca

<i>P. kluyveri</i> K-1	<i>P. kluyveri</i> K-1/S. <i>cerevisiae</i> ICV D254	<i>M. pulcherrima</i> K-5	<i>M. pulcherrima</i> K-5/S. <i>cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Kr-2	<i>H. uvarum</i> Kr-2/S. <i>cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Šd-1	<i>H. uvarum</i> Šd-1/S. <i>cerevisiae</i> ICV D254	<i>H. uvarum</i> Š-2	<i>H. uvarum</i> Š-2/S. <i>cerevisiae</i> ICV D254	Kvasci epifitne mikrobiote	<i>S. cerevisiae</i> ICV D254
Brzina stvaranja CO <sub>2</sub>											
20,20±0,15	22,87±0,18	20,27±0,15	21,07±0,15	22,93±0,17	21,00±0,16	22,13±0,16	21,53±0,16	22,27±0,18	21,53±0,16	16,53±0,13	32,60±0,22
23,33±0,07	22,80±0,06	25,00±0,08	24,47±0,08	24,53±0,08	24,13±0,08	25,27±0,08	24,33±0,08	26,60±0,08	26,47±0,08	26,13±0,09	59,53±0,24
17,93±0,12	19,60±0,14	20,47±0,14	20,60±0,14	16,80±0,12	21,60±0,14	17,87±0,13	21,27±0,14	19,93±0,14	23,47±0,16	18,07±0,12	6,00±0,08
13,27±0,21	17,20±0,23	14,47±0,22	17,00±0,22	12,07±0,22	18,07±0,22	12,07±0,23	18,13±0,22	14,20±0,25	18,73±0,24	14,13±0,21	
9,00±0,74	14,73±0,88	11,20±0,80	13,00±0,84	7,47±0,74	12,80±0,86	8,00±0,75	13,13±0,86	10,53±0,86	15,07±0,94	9,60±0,75	
6,67±0,16	4,40±0,16	10,53±0,21	4,13±0,15	4,87±0,14	3,60±0,14	7,80±0,18	3,53±0,14	7,80±0,19	3,93±0,16	7,53±0,17	
7,13±0,54		6,27±0,62		6,27±0,54		11,60±0,54		6,53±0,64		7,93±0,56	
Srednja vrednost brzine stvaranja CO <sub>2</sub>											
13,93±0,07	16,93±0,20	15,46±0,08	16,71±0,19	13,56±0,07	16,87±0,19	14,96±0,08	16,99±0,19	15,41±0,08	18,20±0,21	14,28±0,07	32,71±0,18

## Биографија

Стојан С. Манчић, мастер инжењер технологије, рођен је 3. маја 1994. године у Лесковцу. Основне академске студије на Технолошком факултету у Лесковцу, студијско подручје прехрамбена технологија, завршио 2017. године, са просечном оценом 9,60. Исте године, уписао је мастер академске студије на истоименом факултету, које је завршио септембра 2018. године, са просечном оценом 10. Током основних и мастер студија, био је вишеструко награђиван за постигнути успех од стране града Лесковца, а такође сваке године је добијао захвалницу Факултета.

Докторске академске студије уписао је 2018. године, на студијском подручју Технолошко инжењерство, на Технолошком факултету у Лесковцу. 2019. године као стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја ангажован је на извођењу наставе (рачунске и лабораторијске вежбе) из предмета студијског подручја Прехрамбена технологија и биотехнологија на основним и мастер академским студијама. Исте године добио је истраживачко звање истраживач-приправник, а 2021. године је закључио уговор о раду са Технолошким факултетом у Лесковцу. 2022. године добио је истраживачко звање истраживач-сарадник.

На докторским студијама усавршавао се у области примене модерних технологија и савремених аналитичких метода, са циљем побољшања традиционалних прехрамбених производа. Има 3 објављена научна рада у врхунском међународном часопису (M21), 5 научна рада у истакнутом међународном часопису (M22), 3 научна рада у националном часопису међународног значаја (M24), 1 научни рад у врхунском часопису националног значаја (M51), 29 радова саопштених на скуповима међународног значаја штампаних у изводу (M34) и 6 радова саопштених на скуповима националног значаја штампаних у изводу (M64).

Од познавања светских језика истиче познавање енглеског језика (средњи ниво), а од софтверских пакета познаје MS Office, Matlab, AutoCAD, Origin и др.

## Изјава 1.

### ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом:

**НАТИВНИ СОЈЕВИ НЕ- *SACCHAROMYCES* КВАСАЦА ИЗОЛОВАНИХ ИЗ  
ЕПИФИТНЕ МИКРОБИОТЕ ВОЋА – ЕНОЛОШКИ ПОТЕНЦИЈАЛ И КИНЕТИКА  
АЛКОХОЛНЕ ФЕРМЕНТАЦИЈЕ ШИРЕ ГРОЖЋА ПРОКУПАЦ**

која је одбрањена на Технолошком факулету у Лесковцу, Универзитета у Нишу:

- резултат сопственог истраживања,
- да ову докторску дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао на другим факултетима, нити универзитетима,
- да нисам повредио ауторска права, нити злоупотребио интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 17.03.2026.

Потпис аутора дисертације:

---

(Стојан С. Манчић)

**Изјава 2.**

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације:

**НАТИВНИ СОЈЕВИ НЕ- *SACCHAROMYCES* КВАСАЦА ИЗОЛОВАНИХ ИЗ  
ЕПИФИТНЕ МИКРОБИОТЕ ВОЋА – ЕНОЛОШКИ ПОТЕНЦИЈАЛ И КИНЕТИКА  
АЛКОХОЛНЕ ФЕРМЕНТАЦИЈЕ ШИРЕ ГРОЖЋА ПРОКУПАЦ**

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу**, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 17.03.2026.

Потпис аутора дисертације:

---

(Стојан С. Манчић)

### Изјава 3.

#### ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**НАТИВНИ СОЈЕВИ НЕ- *SACCHAROMYCES* КВАСАЦА ИЗОЛОВАНИХ ИЗ  
ЕПИФИТНЕ МИКРОБИОТЕ ВОЋА – ЕНОЛОШКИ ПОТЕНЦИЈАЛ И КИНЕТИКА  
АЛКОХОЛНЕ ФЕРМЕНТАЦИЈЕ ШИРЕ ГРОЖЂА ПРОКУПАЦ**

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

У Нишу, 17.03.2026.

Потпис аутора дисертације:

---

(Стојан С. Манчић)