

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Katja BEZEK

**VLOGA SIGNALNIH MOLEKUL PRI ALKOHOLNI  
FERMENTACIJI S ČISTO IN ZDРUŽENO STARTER  
KULTURO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Katja BEZEK

**VLOGA SIGNALNIH MOLEKUL PRI ALKOHOLNI  
FERMENTACIJI S ČISTO IN ZDRAŽENO STARTER KULTURO**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**THE ROLE OF SIGNALING MOLECULES IN ALCOHOLIC  
FERMENTATION WITH PURE AND MIXED STARTER CULTURE**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2012

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Petra Rasporja, za somentorico doc. dr. Nežo Čadež in za recenzentko doc. dr. Polono Zalar.

## Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana Marinšek Logar  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter Raspotnik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Neža Čadež  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Polona Zalar  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki identična tiskani verziji.

Katja Bezek

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.22/.26:582.282.23:663.252.4(043)=163.6
KG	kvasovke/vinske kvasovke/ <i>Saccharomyces cerevisiae/Candida zemplinina</i> /alkoholna fermentacija/čista starter kultura/združena starter kultura/komunikacija med celicami/zaznavanje celične gostote/signalne molekule/feniletanol/triptofol/aromatski profil
AV	BEZEK, Katja
SA	RASPOR, Peter (mentor)/ČADEŽ, Neža (somentorica)/ZALAR, Polona (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2012
IN	VLOGA SIGNALNIH MOLEKUL PRI ALKOHOLNI FERMENTACIJI S ČISTO IN ZDRUŽENO STARTER KULTURO
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XIV, 63 str., 7 pregl., 23 sl., 38 pril., 140 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AB	Vinarji za učinkovit potek alkoholne fermentacije že leta uporabljajo starter kulture izbranih sevov <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . S težnjo po izboljšanju kemijske sestave in senzoričnih lastnosti vina pa je prišla v ospredje ideja o uporabi združene starter kulture. Pri združeni fermentaciji naj bi tako poleg vodilne kvasovke fermentacije vina <i>S. cerevisiae</i> , sodelovale tudi kvasovke, ki jih navadno najdemo v začetnih fazah spontane fermentacije mošta npr. <i>Candida zemplinina</i> . Domnevali smo, da obstajajo interakcije med vrstami tudi na ravni medcelične komunikacije. Pri <i>S. cerevisiae</i> imata vlogo prenosa signala aromatska alkohola feniletanol in triptofol, katerih sinteza je odvisna od celične gostote ter dostopnosti hrani v okolju. Namen magistrskega dela je bil ugotoviti glavne razlike med dinamiko čiste in združene alkoholne fermentacije s kvasovkama <i>C. zemplinina</i> ZIM 842 in <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927 in vpliv dodatka signalnih molekul na potek fermentacije. Spremljali smo dinamiko rasti in tvorbe metabolitov dveh neodvisnih fermentacij mošta sorte Malvazija in Sauvignon. V mošti sorte Sauvignon smo dodali signalni molekuli feniletanol in triptofol v končni koncentraciji 1000 µM. Ugotovili smo, da aromatska alkohola ne vplivata na živost kvasovk, ter da je njuna sinteza med fermentacijo odvisna od celične gostote in dostopnosti vira dušika v moštu. S sledenjem porabe substrata in nastanka metabolitov z analizo HPLC smo ugotovili, da interakcije med kvasovkami v združeni kulturi vplivajo na končno aroma vina. To smo dokazali tudi z analizo GC-MS aromatskega profila, ki se med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija statistično razlikuje. Signalni molekuli nista imeli zaznavnega vpliva na dinamiko fermentacije ali aroma vina.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	UDC 579.22/.26:582.282.23:663.252.4(043)=163.6
CX	yeasts/wine yeasts/ <i>Saccharomyces cerevisiae/Candida zemplinina</i> /alcoholic fermentation/pure starter culture/combined starter culture/cell communication/quorum sensing/signaling molecules/phenylethanol/tryptophol/aromatic profile/
AU	BEZEK, Katja
AA	RASPOR, Peter (supervisor)/ČADEŽ, Neža (co-advisor)/ZALAR Polona (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology, Field: Microbiology
PY	2012
TI	THE ROLE OF SIGNALING MOLECULES IN ALCOHOLIC FERMENTATION WITH PURE AND MIXED STARTER CULTURE
DT	M. SC. THESIS (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO	XIV, 63 p., 6 tab., 23 fig., 38 ann., 140 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	To increase efficiency of alcoholic fermentation the use of selected strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> was introduced to wine industry many years ago. With the development of wine production the use of combined starter cultures was applied to improve the chemical composition and sensory characteristics of the wine. Combined fermentation was carried out by <i>S. cerevisiae</i> and one of the yeasts species commonly predominating in the early stages of spontaneous fermentation of must, i.e. <i>Candida zemplinina</i> . Our hypothesis is that during wine fermentation interactions between species on the level of intercellular communication exist. The signal molecules phenylethanol and tryptophol released by <i>S. cerevisiae</i> have main role transferring the signal in connection with cell density and nutrient availability in the environment. The purpose of the thesis was to determine the differences between the dynamics of pure and combined alcoholic fermentation with yeast <i>C. zemplinina</i> ZIM 842 and <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927 as well as the influence of added signalling molecules on fermentation dynamics. Growth kinetics and fermentation dynamics was followed during two independent fermentation trials of <i>Vitis vinifera</i> cv. Malvasia and cv. Sauvignon musts. In the latter must we added signal molecules phenylethanol and tryptophol at final concentration of 1000 µM. We found that aromatic alcohols did not affect the viability of yeast cells, and that their synthesis during fermentation depended on cell density and accessibility of the nitrogen source in must. By monitoring the consumption of substrate and the formation of metabolites by HPLC analysis, we found that the cell interactions in combined culture affected the final flavour of the wine. This was also proved by GC-MS analysis of the aromatic profile that was statistically different between pure and combined fermentation of Malvasia must. Signal molecules did not have detectable effect on the dynamics of fermentation or wine flavour.

## KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XI
Okrajšave in simboli	XIII
Slovarček	XIV
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 PRIDELAVA VINA IZ GROZDNEGA SOKA	3
<b>2.1.1 Zgodovinski pregled</b>	<b>3</b>
<b>2.1.2 Sestava substrata</b>	<b>3</b>
2.1.2.1 Sladkorji	3
2.1.2.2 Dušik	4
2.1.2.3 Organske kisline	4
2.1.2.4 Ostale komponente	4
<b>2.1.3 Prisotna mikrobna združba</b>	<b>5</b>
<b>2.1.4 Alkoholna fermentacija</b>	<b>6</b>
2.2 SPONTANA IN VODENA ALKOHOLNA FERMENTACIJA	7
<b>2.2.1 Uporaba čistih in združenih starter kultur pri proizvodnji vina</b>	<b>8</b>
<b>2.2.2 Uporaba kvasovke <i>Candida zemplinina</i> v združeni kulti s kvasovko <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>9</b>
2.3 KOMUNIKACIJA MED CELICAMI	10
<b>2.3.1 Zaznavanje celične gostote (ang. quorum sensing)</b>	<b>11</b>
<b>2.3.2 Vpliv dejavnikov okolja na spremembo morfologije pri <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>11</b>
2.4 SIGNALNI MOLEKULI FENILETANOL IN TRIPTOFOL	12
<b>2.4.1 Uravnavanje sinteze</b>	<b>13</b>
<b>2.4.2 Metode za določanje signalnih molekul</b>	<b>14</b>
2.4.2.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	15
2.4.2.2 Jedrska magnetna resonančna spektroskopija (NMR)	15

2.4.2.3 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS)	15
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>16</b>
3.1 MATERIALI	18
<b>3.1.1 Mikroorganizmi</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2 Mikrobiološka gojišča</b>	<b>18</b>
3.1.2.1 Tekoče gojišče YPD	18
3.1.2.2 Trdno gojišče YPD	18
3.1.2.3 Pravi mošt	19
3.1.2.4 Trdno gojišče WL	19
3.1.2.5 Trdno gojišče WL s cikloheksimidom	19
<b>3.1.3 Pufri in raztopine</b>	<b>19</b>
3.1.3.1 Pufer PBS	19
3.1.3.2 Metilensko modrilo	20
<b>3.1.4 Priprava mobilne faze za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti</b>	<b>20</b>
<b>3.1.5 Standardne raztopine za umeritvene krivulje</b>	<b>20</b>
3.1.5.1 Glukoza in fruktoza	20
3.1.5.2 Etanol	20
3.1.5.3 Glicerol	21
3.1.5.4 Organske kisline: citronska, jabolčna, ocetna in vinska	21
3.1.5.5 Signalni molekuli: feniletanol (PheOH) in triptofol (TrpOH)	21
<b>3.1.6 Laboratorijska oprema</b>	<b>22</b>
<b>3.1.7 Reagenti</b>	<b>23</b>
3.2 METODE	24
<b>3.2.1 Namnožitev biomase za vcepek</b>	<b>24</b>
<b>3.2.2 Določitev vpliva različnih koncentracij feniletanola in triptofola na živost celic</b>	<b>24</b>
<b>3.2.3 Alkoholna fermentacija</b>	<b>24</b>
<b>3.2.4 Merjenje optične gostote vzorcev</b>	<b>24</b>
<b>3.2.5 Neposredno in posredno določanje koncentracije celic</b>	<b>25</b>
<b>3.2.6 Merjenje med fermentacijo sproščenega ogljikovega dioksida (<math>\text{CO}_2</math>)</b>	<b>25</b>
<b>3.2.7 Priprava umeritvene krivulje za HPLC s standardnimi raztopinami</b>	<b>26</b>
<b>3.2.8 Določanje koncentracije sladkorjev, etanola, glicerola in organskih kislin, s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)</b>	<b>27</b>
<b>3.2.9 Določanje količine asimilirajočega dušika</b>	<b>28</b>
<b>3.2.10 Analiza aromatskega profila</b>	<b>28</b>
3.2.10.1 Natrijev azid	28
3.2.10.2 Hierarhično grupiranje	29
3.2.10.3 Regularizirana diskriminatna analiza	29

<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>30</b>
4.1	POTEK ČISTE IN ZDRUŽENE ALKOHOLNE FERMENTACIJE MOŠTA SORTE MALVAZIJA BREZ DODATKA SIGNALNIH MOLEKUL	30
4.1.1	<b>Spremljanje rasti kvasovk med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Malvazija</b>	30
4.1.2	Dinamika čiste in združene alkoholne fermentacije mošta sorte <b>Malvazija</b>	31
4.1.3	Kemijske spremembe med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte <b>Malvazija</b>	33
4.1.4	<b>Primerjava aromatskega profila čiste in združene fermentacije</b>	35
4.1.4.1	Hierarhično grupiranje	35
4.1.4.2	Regularizirana diskriminatna analiza	36
4.2	VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ FENILETANOLA IN TRIPTOFOLA NA ŽIVOST CELIC	37
4.3	POTEK ČISTE IN ZDRUŽENE ALKOHOLNE FERMENTACIJE MOŠTA SORTE SAUVIGNON	38
4.3.1	<b>Spremljanje rasti kvasovk med čisto in združeno alkoholno fermentacijo po/brez dodatka feniletanola in triptofola</b>	38
4.3.2	Dinamika čiste in združene fermentacije po/brez dodatka feniletanola in <b>triptofola</b>	39
4.3.3	Kemijske spremembe med čisto in združeno fermentacijo po/brez dodatka feniletanola in triptofola	42
4.3.4	Dinamika tvorbe signalnih molekul med čisto in združeno fermentacijo po/brez dodatka feniletanola in triptofola	44
4.3.5	<b>Določanje količine asimilirajočega dušika v moštu</b>	46
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>47</b>
5.1	VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ FENILETANOLA IN TRIPTOFOLA NA ŽIVOST CELIC	47
5.2	DINAMIKA ČISTE IN ZDRUŽENE ALKOHOLNE FERMENTACIJE	48
5.2.1	<b>Spremljanje rasti kvasovk med potekom alkoholne fermentacije</b>	48
5.2.2	Dinamika čiste in združene alkoholne fermentacije	49
5.2.3	Dinamika nastalih produktov presnove med čiso in združeno fermentacijo	50
5.2.4	<b>Dinamika nastalih signalnih molekul med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon</b>	52
5.3	SKLEPI	54

<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>55</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>56</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Možni vplivi prisotne mikrobne združbe na okus in kakovost vina (Fleet, 2003).	5
Preglednica 2: Uporabljeni sevi mikroorganizmov.	18
Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema.	22
Preglednica 4: Ostali uporabljeni laboratorijski pripomočki.	23
Preglednica 5: Poraba sladkorjev po čisti in združeni alkoholni fermentaciji mošta sorte Malvazija s kvasovkama <i>C. zemplinina</i> ZIM 842 in <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927.	33
Preglednica 6: Poraba sladkorjev po čisti in združeni alkoholni fermentaciji mošta sorte Sauvignon s kvasovkama <i>C. zemplinina</i> ZIM 842 in <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927 brez dodatka feniletanola in triptofola.	41
Preglednica 7: Poraba sladkorjev po čisti in združeni alkoholni fermentaciji mošta sorte Sauvignon s kvasovkama <i>C. zemplinina</i> ZIM 842 in <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927 po dodatku feniletanola in triptofola v koncentraciji 1000 µM.	41

## KAZALO SLIK

Slika 1:	Shema rastnih krivulj kvasovk v moštu, med primarno in sekundarno fermentacijo ter med zorenjem vina: (A) ne- <i>Saccharomyces</i> vrste, (B) <i>Saccharomyces</i> , (C) <i>Oenococcus oeni</i> in (D) mikroorganizmi, ki povzročajo kvar (Fugelsang in Edwards, 2007).	7
Slika 2:	Nastanek 2-feniletanola z razgradnjo fenilalanina po Ehrlichovi poti; transaminacija L-fenilalanina do 3-fenilpiruvata, ki je dekarboksiliran v 2-fenilacetaldehid, ta pa nato reduciran v 2-feniletanol (Dickinson in sod., 2003).	13
Slika 3:	Nastanek triptofola (3-hidroksietil indol) z razgradnjo triptofana po Ehrlichovi poti (Dickinson in sod., 2003).	13
Slika 4:	Shema sinteze aromatskih alkoholov triptofola (TrpOH) in fenilalanina (PheOH) ter sodelujoči encimi: aminotransferaze (Aro8, Aro9 in Aro10), piruvat dekarboksilaze (Pdc1, Pdc5 in Pdc6) in alkoholne dehidrogenaze (Adh) (Wüster in Babu, 2010).	14
Slika 5:	Hodogram predposkusa, alkoholna fermentacija mošta sorte Malvazija.	16
Slika 6:	Hodogram poskusa, alkoholna fermentacija mošta sorte Sauvignon.	17
Slika 7:	Bürker-Türk števna komora (Proscitech, 2003).	25
Slika 8:	Dinamika rasti kvasovk <i>C. zemplinina</i> ZIM 842 in <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927 med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija.	31
Slika 9:	Dinamika pretvorbe sladkorjev in tvorbe etanola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927 in <i>C. zemplinina</i> ZIM 842.	32
Slika 10:	Dinamika tvorbe/porabe organskih kislin med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927 in <i>C. zemplinina</i> ZIM 842.	34
Slika 11:	Dinamika tvorbe glicerola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927 in <i>C. zemplinina</i> ZIM 842.	35
Slika 12:	Dendrogram podobnosti med aromatskimi profili končnih proizvodov po čisti in združeni fermentaciji mošta sorte Malvazija.	36
Slika 13:	Razvrstitev devetih vzorcev končnega proizvoda po čisti in združeni fermentaciji mošta sorte Malvazija, na osnovi izračunane matrice RDA in rezultati ocenjevanja matrice.	36
Slika 14:	Rastne krivulje celic <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927 (A) in <i>C. zemplinina</i> ZIM 842 (B) med 66 urno fermentacijo mošta sorte Mavazija, po dodatku feniletanola in triptofola v koncentracijah 350 µM, 500 µM, 750 µM in 1000 µM.	37
Slika 15:	Rastne krivulje čiste in združene fermentacije mošta sorte Sauvignon po in brez dodatka feniletanola in triptofola v koncentraciji 1000 µM.	38
Slika 16:	Dinamika pretvorbe sladkorjev in tvorbe etanola med čisto fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovko <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927.	40
Slika 17:	Dinamika pretvorbe sladkorjev in tvorbe etanola med čisto fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovko <i>C. zemplinina</i> ZIM 842.	40
Slika 18:	Dinamika pretvorbe sladkorjev in tvorbe etanola med združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama <i>C. zemplinina</i> ZIM 842 in <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927.	41
Slika 19:	Dinamika tvorbe glicerola med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama <i>C. zemplinina</i> ZIM 842 in <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927.	42
Slika 20:	Dinamika tvorbe organskih kislin med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama <i>C. zemplinina</i> ZIM 842 in <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927.	43
Slika 21:	Dinamika tvorbe feniletanola med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama <i>C. zemplinina</i> ZIM 842 in <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927 brez dodatka feniletanola in triptofola.	45
Slika 22:	Dinamika koncentracije triptofola med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama <i>C. zemplinina</i> ZIM 842 in <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927 po dodatku feniletanola in triptofola.	45
Slika 23:	Dinamika koncentracije feniletanola med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama <i>C. zemplinina</i> ZIM 842 in <i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927 po dodatku feniletanola in triptofola.	46

## KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) med čisto fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga A2: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) med združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga A3: Dinamika rasti kvasovk *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija.
- Priloga A4: Povprečne vrednosti porabe glukoze med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga A5: Dinamika porabe fruktoze med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga A6: Dinamika tvorbe etanola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga A7: Dinamika tvorbe glicerola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga A8: Dinamika tvorbe citronske kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga A9: Dinamika tvorbe jabolčne kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga A10: Dinamika tvorbe ocetne kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga A11: Dinamika tvorbe vinske kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija ( $T=22^{\circ}\text{C}$ ) s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga B1: Povprečne vrednosti koncentracij feniletanola neposredno po dodatku in po 52 urni fermentaciji mošta sorte Malvazija s čistima kulturama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga B2: Povprečne vrednosti koncentracij triptofola neposredno po dodatku in po 52 urni fermentaciji mošta sorte Malvazija s čistima kulturama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga B3: Povprečne vrednosti števila celic *S. cerevisiae* ZIM 1927 med 66 urno čisto fermentacijo mošta sorte Malvazija po dodatku različnih koncentracij feniletanola in triptofola.
- Priloga B4: Povprečne vrednosti števila celic *C. zemplinina* ZIM 842, med 66 urno čisto fermentacijo mošta sorte Malvazija po dodatku različnih koncentracij feniletanola in triptofola.
- Priloga C1: Dinamika rasti kvasovk *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon.
- Priloga C2: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) med čisto fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga C3: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) med združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga C4: Dinamika pretvorbe glukoze in fruktoze ter tvorba etanola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga C5: Dinamika tvorbe/porabe glicerola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga C6: Dinamika tvorbe/porabe citronske kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga C7: Dinamika tvorbe/porabe jabolčne kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga C8: Dinamika tvorbe/porabe ocetne kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga C9: Dinamika tvorbe/porabe vinske kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.

- Priloga C10: Dinamika tvorbe feniletanola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga C11: Dinamika tvorbe/porabe triptofola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga D1: Umeritvena krivulja za določanje dinamike glukoze [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.
- Priloga D2: Umeritvena krivulja za določanje dinamike fruktoze [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti..
- Priloga D3: Umeritvena krivulja za določanje dinamike etanola [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti..
- Priloga D4: Umeritvena krivulja za določanje dinamike glicerola [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.
- Priloga D5: Umeritvena krivulja za določanje dinamike jabolčne kisline [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.
- Priloga D6: Umeritvena krivulja za določanje dinamike vinske kisline [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.
- Priloga D7: Umeritvena krivulja za določanje dinamike acetne kisline [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti
- Priloga D8: Umeritvena krivulja za določanje dinamike citronske kisline [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.
- Priloga D9: Umeritvena krivulja za določanje dinamike feniletanola [ $\mu$ M] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.
- Priloga D10: Umeritvena krivulja za določanje dinamike triptofola [ $\mu$ M] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.
- Priloga E1: Kromatograf po 24 urni (A) in 7 dnevni (B) čisti fermentaciji s *S. cerevisiae* ZIM 1927.
- Priloga F1: Fermentorji na magnetnih mešalih med alkoholno fermentacijo.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CFU	Število mikroorganizmov, ki tvorijo kolonije, kolonijska enota (ang. Colony Forming Units)
CO <sub>2</sub>	Ogljikov dioksid
GC-MS	Plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (ang. Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
HPLC	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High-Performance Liquid Chromatography)
KV	Koeficient variacije
MAPK	Z mitogenom aktivirana proteinska kinaza (ang. Mitogen-Activated Protein Kinase)
QS	Zaznavanje celične gostote (ang. Quorum Sensing)
PheOH	Feniletanol
PKA	Protein kinaza A (ang. Protein Kinase A)
SD	Standardni odklon (ang. Standard Deviation)
TrpOH	Triptofol
VBNC	Žive vendar ne-kultivabilne celice (ang. Viable But Non-Culturable)
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov
YAN	Količina asimilirajočega dušika (ang. yeast assimilable nitrogen)
YPD	Kvasni ekstrakt-pepton-glukozno gojišče (ang. Yeast Extract Pepton Dextrose)
WL	Wallersteinov-o gojišče (ang. Wallerstein Laboratories Nutrient agar)

## SLOVARČEK

<b>botritizirana vina</b>	naravna sladka vina pridelana iz grozdja okuženega z žlahtno plesnijo <i>Botrytis cinerea</i> (ang. noble rot)
<b>čista fermentacija</b>	fermentacija s čisto kulturo izbranega seva kvasovk
<b>dimorfizem</b>	sposobnost prehoda iz kvasne v nitasto obliko rasti
<b>grozdni sok</b>	brezalkoholna tekočina, pridobljena s stiskanjem grozdnih jagod
<b>koeficient variacije</b>	razmerje med standardnim odklonom in aritmetično sredino
<b>mikrobna ekologija</b>	veda, ki proučuje razmerja med mikroorganizmi in njihovim živim ter neživim okoljem
<b>mošt</b>	delno fermentiran grozdni sok
<b>pseudohife</b>	skupki celic v obliki verižice, ki nastanejo pri brstenju in se ne ločijo od materinske celice
<b>starter kultura</b>	izbrani sev tehnološko koristnih mikroorganizmov, katerih dodatek omogoča nadzorovan potek bioprosesa
<b>vcepek</b>	skupek živih celic za nacepitev nove kulture na/v gojišče
<b>vinifikacija</b>	proizvodnja vina, ki obsega vse postopke od izbire grozdja do ustekleničenja vina
<b>vino</b>	končni produkt alkoholne fermentacije grozdnega soka
<b>združena alkoholna fermentacija</b>	fermentacija s sevi kvasovk, ki so bili pripravljeni kot čiste kulture in nato združeni (koktajlizacija) ob nacepitvi v mošt

## 1 UVOD

Vino je kompleksna alkoholna pijača, pri kateri so za razvoj barve, okusa in arome ključnega pomena med fermentacijo grozdnega soka nastale komponente. Na senzorične lastnosti končnega proizvoda vplivajo številne spremenljivke, kot je sorta grozdja in njegova kakovost, vinarska praksa ter pogoji predelave in zorenja. Pomemben vpliv ima tudi prisotna mikrobna združba, njena sestava in številčnost ter presnovna in encimska aktivnost (Romano in sod., 2003; Sumby in sod., 2010). V grozdnem soku lahko najdemo raznoliko mikrobioto, znotraj katere vodilna vloga pri alkoholni fermentaciji pripada kvasovkam (Fleet, 2003). Za spontan začetek poteka fermentacij so odgovorne kvasovke, ki izvirajo s površine grozdih jagod in vinarske opreme (Mateo in sod., 2001). To so navadno pripadnice rodov *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia* in *Metschnikowia*, vendar že po nekaj dnevih vodilno vlogo prevzame *S. cerevisiae*, ki fermentacijo vodi do konca (Fleet, 2003; Moreira in sod., 2005; Gognies in sod., 2006; Fleet, 2008). Čeprav je fermentacija samo z naravno prisotno bioto kvasovk mogoča, pa so vinarji dolgotrajen in nepredvidljiv proces raje izpopolnili in v uporabo uvedli starter kulturo (Pretorius, 2000; Ciani in sod., 2006; Ciani in sod., 2010).

Delovne organizme so sprva izbirali glede na njihovo fermentacijsko moč, ustrezno kinetiko pri različnih temperaturah, nizko proizvodnjo acetne kisline in odpornost na žveplov dioksid (Suárez-Lepe in Morata, 2012). Tako še vedno v največjem obsegu za nadzorovan potek sodobnega proizvodnega procesa, moštvo dodajo vcepek izbranega seva vinske kvasovke *S. cerevisiae* (Heard in Fleet, 1985). Čeprav lahko čiste komercialne kulture rodu *Saccharomyces* prerastejo in zavirajo rast celic avtohtone populacije, popolnega zaviralnega učinka ne moremo zagotoviti (Heard in Fleet, 1985; Mora in sod., 1990; Moreira in sod., 2005; Ciani in sod., 2010). Ravno na podlagi tega dognanja so spoznali, da vloga kvasovk na začetku spontane fermentacije mošta ni povsem zanemarljiva (Fleet, 2003; Domizio in sod., 2007; Comitini in sod., 2011). Zaradi doprinsa k izboljšani kemijski sestavi in senzoričnim lastnostim vina so predlagali potek fermentacije z mešano starter kulturo (Romano in sod., 2003; Ciani in sod., 2006, 2010)

Kompleksne interakcije znotraj prisotne mikrobne združbe, ki se skozi posamezne stopnje proizvodnega procesa spreminja, vplivajo na specifičnost končnega izdelka (Fleet, 2003). Med potrošniki veljata aroma in okus vina za glavni značilnosti, ki določata njegovo kakovost in vrednost (Swiegers in Pretorius, 2005). Aroma vin je edinstvena mešanica hlapnih spojin, katerih vir je sorta grozdja, sekundarni produkti fermentacije in procesi med zorenjem vina. Narava in količina sintetiziranih snovi med fermentacijo je odvisna od vsebnosti dušika v mediju, temperature in sodelujočih kvasovk (Molina in sod., 2007; Swiegers in Pretorius, 2007). Našteti dejavniki vplivajo tudi na medcelično komuniciranje, odvisno od gostote celic in koncentracije v okolje sproščenih signalnih molekul (Gori in sod., 2011). Chen in Fink (2006) sta mehanizem zaznavanja celične gostote opredelila tudi pri vinski kvasovki *S. cerevisiae*. Ob prisotnosti feniletanola in triptofola v gojišču pride namreč do prenosa signala, ki sproži spremembo na nivoju izražanja genov za uravnavanje prehoda med kvasno in nitasto obliko rasti celic (Chen in Fink, 2006; Wuster in Babu, 2010). Klub poznavanju mehanizma zaznavanja celične gostote pri vodilni kvasovki v vinski industriji, pa vpliv medcelične komunikacije na potek fermentacije ni znana (Fleet, 2003).

## 1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE

Cilj magistrskega dela je ugotoviti glavne razlike med dinamiko fermentacij z združeno starter kulturo v primerjavi s čisto kulturo, kar ima vpliv na končno aromo vina. Poleg tega želimo raziskati še nepoznan vpliv signalnih molekul (feniletanola in triptofola) na potek alkoholne fermentacije.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Delovni hipotezi magistrske naloge sta bili:

- aromatski profil pri združeni fermentaciji s kvasovkama *S. cerevisiae* in *C. zemplinina* se razlikuje od tistega pri fermentacijah s čisto kulturo *S. cerevisiae* ali *C. zemplinina*
- signalni molekuli (feniletanol in triptofol) imata zaznaven vpliv na dinamiko fermentacije in aromo vina pri fermentaciji s čisto kulturo (*S. cerevisiae* ali *C. zemplinina*) in pri fermentaciji z združenima kulturama (*S. cerevisiae* in *C. zemplinina*)

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 PRIDELAVA VINA IZ GROZDNEGA SOKA

#### 2.1.1 Zgodovinski pregled

Pivovarstvo in pridelava vina sta danes zelo obsežni in donosni živilski dejavnosti, ki sta se razvili iz starodavnega in empiričnega znanja vzhodnih narodov iz različnih delov sveta. Po arheoloških odkritijih ocenjujejo, da so radovedni kmetje že pred 7000 leti začeli uživati produkt spontane fermentacije grozdnega soka, saj jim je bil všeč učinek alkoholne pijače (McGovern, 2009; Alba-Lois in Segal-Kischinevsky, 2010). Tekom zgodovine človeštva se je proizvodnja na osnovi sistema preizkušanja, napak in skrbnega opazovanja le še izpopolnjevala. Iz opazovanja dogajanju med samim postopkom, so ga poimenovali z besedo fermentacija, ki izvira iz latinske besede *fervere*, kar pomeni »vreti« (Alba-Lois in Segal-Kischinevsky, 2010).

Prvi pridelovalci vina niso niti pomislili, da imajo glavno vlogo v procesu mikroorganizmi, ki so jih med mečkanjem grozdov z nogami delno tudi sami prenesli v grozjni sok. Šele v sedemnajstem stoletju, ko je nizozemski trgovec Antoni van Leeuwenhoek razvil visoko kakovostne leče, so lahko opazovali celice kvasovk, ki so jih sprva imeli za delce škroba. Temelje našega sodobnega razumevanja procesa fermentacije je postavil francoski kemik Louis Pasteur. Ta je prvi eksperimentalno pokazal, da so fermentirane pijače rezultat delovanja kvasovk, ki v odsotnosti kisika pretvorijo glukozo v etanol (Barnett, 2000). Svoje ugotovitve je povzel in objavil v znanstvenem delu z naslovom »Mémoire sur la fermentation alcoolique« (Alba-Lois in Segal-Kischinevsky, 2010).

#### 2.1.2 Sestava substrata

Na lastnosti končnega proizvoda fermentacije ima v veliki meri vpliv sestava izhodnega substrata, saj lahko prisotnost ali odsotnost določene komponente bistveno vpliva na dinamiko rasti prisotne mikrobne združbe. Mikroorganizmi s svojo prisotnostjo in presnovo namreč pomembno vplivajo na razvoj senzoričnih lastnosti vin, saj po fermentaciji mošta enake sestave z različnimi sevi kvasovk dobimo drugačen proizvod (Cabrera in sod., 1988). Velja pa tudi obratno, da se produkta fermentacije po sestavi različnega mošta z istim sevom kvasovk, razlikujeta (Romano in sod., 2003).

##### 2.1.2.1 Sladkorji

Poleg vode največji delež grozdnega soka predstavljajo monosaharidi; glukoza in fruktoza v ekvimolarni koncentraciji (80-120 g/l), arabinoza (0,2-1,5 g/l) in ksiloza (0,03-0,1 g/l) ter disaharid saharosa (<10 g/l). Najdemo tudi polisaharide kot sta pektin in dekstrin v koncentraciji 3-5 g/l, ki pa ju kvasovke ne presnavljajo (Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Skupna koncentracija sladkorjev v moštu niha med 170 in 220 g/L (Ribéreau-Gayon in sod., 2006), vendar lahko prevelike koncentracije (250-300 g/l) zaradi visokega osmotskega pritiska in zvišane ravni znotrajcelične koncentracije etanola zaustavijo rast kvasovk (Nishino in sod., 1985).

### 2.1.2.2 Dušik

Sprememba količine in oblike prisotnih virov dušika lahko pomembno vpliva na sam potek fermentacije, saj predstavlja dušik enega omejujočih dejavnikov rasti določenih sevov vinskih kvasovk (Monteiro in Bisson, 1992). Osnovni viri dušika so amonijevi ioni in proste aminokisline, čeprav lahko v mediju najdemo tudi polipeptide, proteine in v manjših količinah nitrate, nukleotide, amine in vitamine. Vsebnost virov dušika niha glede na vrsto in zrelost grozdja, vinorodni okoliš, vinogradniško prakso (čas trgatve, uporaba gnojil), dodatke med postopki proizvodnje in stopnjo prečiščenosti mošta (Lagunas, 1986; Aranda in sod., 2011). Normalen potek fermentacije je mogoč, ko imajo kvasovke na razpolago vsaj 140 mg N/l (Bely in sod., 1990), vrednosti v moštu pa se navadno gibljejo vse od 60 pa do 2400 mg N/l (Henschke in Jiranek, 1992). Postopki predelave grozdja in nihanja v temperaturi lahko znižajo vsebnost dušika, kar lahko zaradi vpliva na rast kvasovk in metabolizem sladkorjev vodi do upočasnjene in zaustavljene fermentacije (Henschke in Jiranek, 1992). Negativen učinek ima lahko tudi prevelika količina vira dušika, ki omogoči rast kvarljivcev in s tem vpliva na stabilnost prisotne biote ali pa preko procesa deaminacije poslabša aroma vina (Aranda in sod., 2011).

### 2.1.2.3 Organske kisline

Nizkomolekularne organske kisline so pomembna skupina spojin v grozdnem soku in vinu, saj imajo vlogo pri razvoju senzoričnih lastnosti ter pri stabilnosti in mikrobiološki varnosti alkoholnih pijač. V grozdnem soku sta prevladujoči vinska in jabolčna kislina, katerih prisotnost nakazuje na stopnjo zorenja grozdja. Med zorenjem se razmerje med njima spreminja in vinske kisline je več kot jabolčne, saj slednjo lahko porabljajo tudi nekateri sevi iz rodu *Saccharomyces* (Mato in sod., 2005; Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Vinske kisline sicer mikroorganizmi ne razgradnjo, vendar se v vinu počasiobarja v obliki kalijevih in kalcijevih soli, posledica česar je znižanje njene koncentracije (Torija in sod., 2003). Ostale organske kisline so navadno prisotne že v grozdih jagodah (5-20 g/l) in jih med alkoholno fermentacijo nastane majhna količina (Hutkins, 2006). Koncentracija kislin je odvisna od dejavnikov, kot so narava grozdnega mošta, aktivnost kvasovk in enološka praksa v vinarstvu (Ramon-Portugal in sod., 1999). Kljub prispevku k senzoričnim lastnostim vina, prisotne kisline v ravnovesju z njihovimi solmi, delujejo kot pufri in vzdržujejo pH vin v razponu od 2,9 do 4. Aktivno rastoče kvasovke zakisajo medij s kombinacijo razlik v prevzemu ionov, sproščanja protonov med transportom hranil, neposrednega izločanja organskih kislin in sproščanjem CO<sub>2</sub>. Puferska kapaciteta grozdnega soka je pomembna za preprečevanje sprememb pH medija, ki bi lahko vplivale na pH v citosolu kvasovk in na njihov metabolizem med alkoholno fermentacijo (Torija in sod., 2003).

### 2.1.2.4 Ostale komponente

V grozdnem soku najdemo vse potrebne komponente za osnovno rast kvasovk. Za normalen potek metabolizma in vzdrževanje pH ter ravnovesja ionov potrebujejo celice tudi anorganske spojine. Posebno pomembni so fosfatni ioni, ki so ključni za fosforilacijo sladkorjev po prevzemu v celico (Aranda in sod., 2011). V anaerobnih razmerah povezanih z alkoholno fermentacijo, kvasovke brez dodatka kisika ne morejo tvoriti sterolov ali dolgočasnih maščobnih kislin (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Pomanjkanje sterolov lahko prizadene strukturo in nalogu plazemske membrane, kar vodi do večje občutljivosti na etanol in nižje sposobnosti prevzema glukoze (Ribéreau-Gayon in sod., 2006). V grozdnem soku najdemo tudi številne druge komponente, ki vplivajo na prisotno mikrobno združbo. Tako lahko nekatere vrste polifenolov (npr. resveratrol), insekticidi in fungicidi podaljšajo čas prilagajanja in generacijski čas kvasovk ali pa celo preprečujejo njihovo rast (Howitz in sod., 2003; Aranda in sod., 2011). Navadno je pH grozdnega soka med 2,75 in 4,2, kar nima neposrednega negativnega učinka na rast kvasovk. Pri padcu vrednosti pod 2,8 pa se kaže toksični učinek predvsem zaradi močnejšega učinka etanola in sulfita (Aranda in sod., 2011).

### 2.1.3 Prisotna mikrobna združba

Poleg sorte grozdja in pogojev obdelovanja vinske trte, ki prispevata k osnovnemu okusu vina, njegovo nežnost in posebnost določajo predvsem kvasovke. Zato je pomembno prepoznati in razumeti ekološke interakcije, ki se pojavljajo med različnimi skupinami, vrstami in sevi mikroorganizmov (Fleet, 2003). Medsebojni vpliv na grozdnih jagodah prisotne mikrobne združbe pomembno prispeva h kasnejši raznolikosti med vrstami, saj grozdje predstavlja prvotni vir kvasovk. Med zorenjem pride do sproščanja sladkorjev na površino jagod, kar spodbudi rast kvasovk in se njihova koncentracija iz  $10\text{-}10^3$  CFU/g povzpne na  $10^4\text{-}10^6$  CFU/g, ko grozdje dozori. Na nezrelem grozdju prevladujejo vrste *Rhodotorula*, *Cryptococcus* in *Candida*, na zrelem pa kvasovke *Hanseniaspora* in *Metschnikowia*. V moštu so prisotne tudi vrste iz rodov *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Issatchenka*, *Kluyveromyces*, *Pichia* in *Rhodotorula*. Najpogosteje izolirana naravno prisotna vrsta je *Hanseniaspora uvarum*, ki lahko predstavlja več kot 50 odstotkov skupne biote kvasovk (Holloway in sod., 1990; Sabate in sod., 2002). S poškodbo površine jagod se poveča dostopnost hranil in s tem populacije mikroorganizmov ter raznolikost kvasovk, ki soobstajajo z različnimi vrstami nitastih gliv, ocetnokislinskih in mlečnokislinskih bakterij (Fleet, 2003).

Preglednica 1: Možni vplivi prisotne mikrobne združbe na okus in kakovost vina (Fleet, 2003).

Kvasovke	Bakterije	Nitaste glive
• vpliv na kakovost grozdja pred trgovijo; biokontrola plesni	• kvarjenje grozdja v vinogradu	• kvarjenje grozdja v vinogradu
• vodena alkoholna fermentacija grozdnega soka v vino	• možen vzrok upočasnjenje ali zaustavljene fermentacije	• proizvodnja mikotoksinov
• biokatalitično preoblikovanje neutralnih v aktivne sestavine okusa	• vodijo jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo	• sodelovanje »plemenitih plesni« pri pridelovanju botritiziranih vin
• vpliv na senzorične lastnosti vina z avtolizo	• povzročajo kvar med skladiščenjem vina	• vpliv vmesnih produktov presnove na rast drugih vrst
• bioadsorpcija sestavin grozdnega soka	• proizvodnja biogenih aminov	• povzročitelji neželenega okusa vina po zemlji ali pluti
• povzročiteljice kvara	• povzročitelji neželenega okusa vina po zemlji ali pluti	
• delovanje na rast mlečnokislinskih bakterij in kvarljivcev		

Zanimivo je, da *S. cerevisiae* ni prevladujoča vrsta na grozdju, saj je prisotnih le 10-100 CFU/g, zaradi česar je nastal dvom o njenem izvoru pri proizvodnji vina (Martini in sod., 1996; Fleet, 2003). Na prisotnost izbranih vrst kvasovk imajo lahko vpliv naslednji dejavniki: fiziološka in biokemijska sposobnost prilagoditve vrst na površino grozdne jagode (npr. oprijem, presnova razpoložljivih hranil), odpornost na stresne dejavnike okolja, kot so temperatura, sončna svetloba, sevanje, periodične izsušitve, odpornost na naravna in umetna kemična sredstva in medsebojni vpliv raznolikih vrst kvasovk, bakterij ter nitastih gliv (Preglednica 1) (Fleet, 2003).

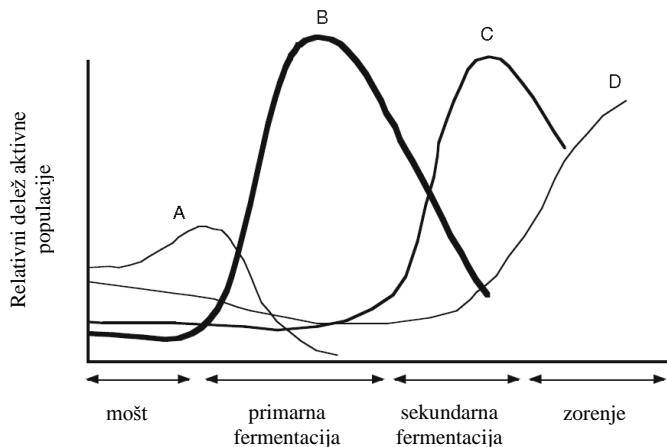
Razumevanje mikrobne ekologije med vinifikacijo se še bolj zaplete ob upoštevanju dejstva, da so lahko mikroorganizmi živi, vendar jih z gojitvenimi metodami ne moremo dokazati (VBNC; ang. Viable But Not Culturable) (Oliver, 2005). Prehod v omenjeno stanje sprožijo neugodni okoljski pogoji in ko le-ti spet postanejo ugodni, se celice povrnejo v prvotno stanje. *Acetobacter aceti*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida zemplinina*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae* in *Zygosaccharomyces bailii* so vrste mikrobov, ki jih najdemo v vinu in so sposobne vzpostaviti VBNC stanje, kar lahko pripelje do napačnih zaključkov o dejanski mikrobnii dinamiki (Oliver, 2005; Fugelsang in Edwards, 2007).

#### 2.1.4 Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija je pot razgradnje, ki zajema pretvorbo sladkorjev do etanola in ogljikovega dioksida. Vir ogljika so navadno sladkorji v grozdnem soku, iz katerih tekom zaporednih reakcij Embden-Mayerhof-Parnasove poti nastane piruvat. Ta se nato v anaerobnih pogojih, z encimom piruvat dehidrogenaza, dekarboksilira v acetaldehid in CO<sub>2</sub>. Nato encim alkohol dehidrogenaza, ob hkratni oksidaciji NADH, reducira acetaldehid v etanol. Glikoliza ne služi samo za nastanek energijsko bogatih molekul, ampak lahko vmesni produkti služijo kot substrat za biosintezo molekul. Tako služi vmesni produkt dihidroksiaceton fosfat za nastanek glicerola, ki ima močan vpliv na kakovost vina, sodeluje pri nastanku triacilglicerolov in je osnovni kompatibilen osmolit (Aranda in sod., 2011). Poleg etanola in ogljikovega dioksida med alkoholno fermentacijo nastajajo še ostale komponente z nizko molekulsko maso, ki vplivajo na kvaliteto proizvoda (alkoholi, aldehydi, organske kisline, estri, organski sulfidi, karbonili) (Hazelwood in sod., 2008).

## 2.2 SPONTANA IN VODENA ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Tradicionalen potek pridelave vina vključuje spontano fermentacijo grozdnega soka, vodeno s kvasovkami iz grozdja in vinarske opreme, ki po nekem sosledju porabljajo razpoložljiva hranila (Fleet, 2003). Večina vrst zaradi zavirnega učinka etanola vztraja le prvih nekaj dni, nato pa glavno vlogo prevzame vrsta *Saccharomyces cerevisiae* (Pretorius, 2000; Beltran in sod., 2002; Ciani in sod., 2006; Ciani in sod., 2010). Poglavitni razlogi za njeno prevlado in aktivnost do konca fermentacije so odpornost na visoke koncentracije etanola, sladkorja in prilagodljivost na vsebnost kisika (Heard in Fleet, 1985; Constanti in sod., 1997; Hansen in sod., 2001; Moreira in sod., 2005). Primarni fermentaciji lahko sledi jabolčno-mlečnokislinska fermentacija, ki jo vodijo mlečnokislinske bakterije (Slika 1). Med zorenjem vina je mogoča rast različnih kvasovk in bakterij, ki povzročajo kvar (Fugelsang in Edwards, 2007). S spontano fermentacijo lahko dobimo večji izkupiček komponent, ki pomembno vplivajo na senzorične lastnosti vina, pogosto pa tudi neželeno nižjo raven alkohola in nepopolno porabljenje sladkorje (Fugelsang in Edwards, 2007).



Slika 1: Shema rastnih krivulj kvasovk v moštu, med primarno in sekundarno fermentacijo ter med zorenjem vina: (A) ne-*Saccharomyces* vrste, (B) *Saccharomyces*, (C) *Oenococcus oeni* in (D) mikroorganizmi, ki povzročajo kvar (Fugelsang in Edwards, 2007).

Uporaba starter kultur v vinarstvu predstavlja pomemben napredok v biotehnologiji vina in je usmerjena v standardizacijo njegovih analitičnih in senzoričnih lastnosti (Ciani in sod., 2010). Glavna prednost je hitrejši začetek vrenja in hkratno zaviranje rasti morebitnih kvarljivcev (Henick-Kling in sod., 1998). Močno zaželeni sta tudi primerna hitrost in stopnja fermentacije, ker vplivata na sproščanje toplove in s tem na temperaturo poteka reakcije. Koristno je, če so značilnosti seva predvidljive, ter da je sev sposoben zaključiti fermentacijo ob zadovoljivem izkoristku sladkorjev. Rast kvasovk lahko upočasni in zaustavi previsoka koncentracija etanola ali neprimerena temperatura, zato moramo pogoje fermentacije prilagoditi lastnostim uporabljenega seva. Sev mora biti odporen tudi na žveplov dioksid, ki se uporablja med pridelovanjem kot antioksidant in ima protimikrobni učinek. Prednost imajo sevi z manjšo proizvodnjo ocetne kisline, ki so združljivi z ostalimi prisotnimi, pozitivno delujočimi mikrobi. Večina komercialnih vrst je odpornih tudi na zimocidne peptide (ang. killer factor) sorodnih vrst in jih niti ne proizvajajo (Bisson, 2001).

Prevlada nacepljenih sevov je odvisna od mnogih dejavnikov med pridelavo vina: a) velikosti, sposobnosti preživetja in pravilne uporabe vcepka; b) fizioloških in presnovnih značilnosti izbrane kulture kvasovk in c) uporabljene tehnologije; temperatura procesa, koncentracija kisika, sestava grozdnega soka (Gao in Fleet, 1988; Heard in Fleet, 1988; Erten, 2002; Fleet, 2003; Ciani in sod., 2010). Zmanjšana občutljivost ne-*Saccharomyces* kvasovk na etanol naj bi bila povezana s potekom fermentacije pri nižjih temperaturah, kar je pomemben dejavnik njihovega daljšega preživetja (Fleet, 2003). Novejše študije so osvetlile tudi vpliv koncentracije kisika na preživetje nekaterih vrst, kot sta *Torulaspora delbruckii* in *Klyveromyces thermotolerans* (Hansen in sod., 2001). Pri teh dveh vrstah so opazili tudi fenomen interakcij med celicami, saj *S. cerevisiae* v visoki koncentraciji zavira njuno rast (Nissen in Arneborg, 2003; Nissen in sod., 2003). Možen zaviralni učinek na prisotno združbo imajo tudi spojine nastale med samo fermentacijo, kot so etanol, ocetna kislina, verižne maščobne kisline, acetaldehid in njihov kombiniran učinek (Edwards in sod., 1990; Ludovico in sod., 2001; Fleet, 2003; Ciani in sod., 2010).

### **2.2.1 Uporaba čistih in združenih starter kultur pri proizvodnji vina**

Velika izbira starter kultur je omogočila bolj razširjeno uporabo vodenih fermentacij in posledično boljši nadzor nad potekom obstoječih ter uvajanje novih procesov v vinarstvu (Bisson, 2001). Zaradi lažje nadzorovanega, vodenega in bolje napovedljivega postopka pridelave vina, so desetletja uporabljali predvsem čiste starter kulture (Romano in sod., 2003). Najbolj uporabljena vinska kvasovka je bila že od vsega začetka *Saccharomyces cerevisiae*, z dodatkom katere lahko preprečimo negativno delovanje divjih kvasovk, prevlado nacepljenega seva pa lahko še povečamo z dodatki kot je žveplov dioksid (Ciani in sod., 2010). Vendar pa z uporabo vcepka, izbrane starter kulture *S. cerevisiae*, ne moremo zagotoviti popolne prevlade slednje nad ostalimi sevi (Mora in sod., 1990). Čeprav se velikost populacije ostalih kvasovk skozi celoten potek fermentacije zmanjša, so s kvantitativnimi ekološkimi študijami dokazali, tako v spontani kakor tudi v vodenih fermentacijih, da njihove rasti ni mogoče popolnoma ustaviti (Heard in Fleet, 1985; Pardo in sod., 1989; Mora in sod., 1990; Hierro in sod., 2006; Andorrá in sod., 2008; Ciani in sod., 2010). Kvasovke imajo potencial pri izboljšanju okusa vina (Fleet, 2003; Viana in sod., 2008) in obetajočo biotehnološko naravo encimov (Charoenchai in sod., 1997; Fernandez in sod., 1999).

Nekatere vrste vinskih kvasovk lahko proizvajajo večje količine glicerola (Romano in sod., 1997) in izločajo encime, kot so esteraze,  $\beta$ -glukozidaze in proteaze, ki s svojim delovanjem vplivajo na sadno aroma vina (Domizio in sod., 2007). Ne-*Saccharomyces* vrste, kot sta *Candida stellata*, danes uvrščena kot *C. zemplinina* (Sipiczki in sod., 2005) in *Hanseniaspora uvarum*, so imele dolgo zanemarljivo ali celo neželeno vlogo pri procesu fermentacije. Kljub temu skušajo zadnjih nekaj let ovrednotiti uporabo raznolikega spektra kvasovk (*Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces* in *Torulaspora*) za izboljšanje kakovosti vina, pri nadzorovani mešani fermentaciji (Toro in Vazquez, 2002; Jolly in sod., 2003; Jolly in sod., 2005; Mamede in sod., 2005). Pri mešanih alkoholnih fermentacijah s sevi iz rodov *Candida* in *Saccharomyces* so poročali o boljšem izkoristku sladkorjev, problem pa naj bi predstavljala nižja stopnja rasti celic in počasnejši potek fermentacije (Toro in Vazquez, 2002).

Kombinirana uporaba različnih vrst kvasovk lahko pripelje do nastanka nepredvidljive koncentracije ali vrste spojin, ki pomembno vplivajo na kemijsko sestavo in aroma vina (Ciani in sod., 2010). Zaradi večje porabe razpoložljivih aminokislin, je pri takšnih fermentacijah večja koncentracija hlapnih spojin (Andorrà in sod., 2010b). Andorrà in sod. (2010b) navajajo tudi upočasnitev fermentacije in večjo raven glicerola ter ocetne kisline v končnem proizvodu, ki presega dovoljeno mejo, kar je omejujoč dejavnik takojšnje uvedbe načina pridelave vina z mešano kulturo. Čeprav je splošno znano, da lahko prisotnost različnih ne-*Saccharomyces* kvasovk pozitivno vpliva na kompleksnost okusa vina, je njihova uporaba v vinarstvu omejena, predvsem zaradi oteženega nadzora poteka spontane ali fermentacije z mešano starter kulturo (Suárez-Lepe in Morata, 2012).

### **2.2.2 Uporaba kvasovke *Candida zemplinina* v združeni kulturi s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae***

Zlasti pri fermentaciji botritiziranih vin ali vin iz prezrelega grozdja, pogosto najdemo vrsto *Candida zemplinina* (Sipiczki, 2004; Tofalo in sod., 2012). Nedavne taksonomske študije so pokazale, da je vrsto *C. zemplinina* enostavno zamenjati s tesno sorodno vrsto *C. stellata*, zato je za njeno nedvoumno identifikacijo potrebna uporaba molekularnih tehnik, kot so polimorfizem dolžine restriktijskih fragmentov regij ITS in 5,8 S ribosomske RNA, ali pa določitev nukleotidnega zaporedja domene D1/D2 gena 26S rRNA (Sipiczki, 2004; Sipiczki in sod., 2005). Za kar nekaj sevov iz različnih zbirk kultur, izoliranih iz grozdja ali vina in opredeljenih kot *C. stellata*, so po molekularni analizi ugotovili, da pripadajo vrsti *C. zemplinina* (Csoma in Sipiczki, 2008; Magyar in Toth, 2011). Domnevna vloga *C. stellata* pri določanju kakovosti vina je postala negotova, ob večjih razlikah v dinamiki fermentacije med uporabljenimi sevi (Csoma in Sipiczki, 2008). Menili so, da gre za zelo heterogeno vrsto ali pa so ene izmed uporabljenih kvasovk zamenjali z drugo vrsto, ki naseljuje isto podlago kot *C. stellata*. V večini nedavnih objav o mikrobioti vina, so poročali samo o prisotnosti kvasovke *C. zemplinina* (Nisiotou in sod., 2007; Urso in sod., 2008; Andorrà in sod., 2010a; Tofalo in sod., 2012).

Med fermentacijo nastalo razmerje med fruktozo in glukozo, ki je zadnja leta pritegnilo veliko pozornosti, najverjetneje nastane kot posledica razlik v presnovi prisotnih kvasovk. Znano je, da večina vrst, vključno s *Saccharomyces cerevisiae*, preferenčno kot vir ogljika uporablja glukozo (gluktofilne kvasovke). Ravno nasprotno pa je pri *C. zemplinina*, ki je močno fruktofilna vrsta in prej porabi razpoložljivo fruktozo (Ciani in Ferraro, 1998; Soden, 2000; Mills in sod., 2002; Magyar in Toth, 2011). Preferenčna poraba fruktoze bi bila lahko uporabna za uravnavanje gluktofilnega značaja *Saccharomyces* vrst pri mešani fermentaciji, saj bi s tem zagotovili ugodno razmerje med glukozo in fruktozo (Jolly in sod., 2006; Magyar in Toth, 2011). Sevi kvasovke *C. zemplinina* so različno odporni na prisotnost etanola v gojišču (Gao in Fleet, 1988; Sipiczki in sod., 2004; Tofalo in sod., 2009). Pri fermentaciji s čisto kulturo *C. zemplinina* sta Magyar in Toth (2011) pokazala presenetljivo slab donos etanola, glede na porabo sladkorja, katero pa ni mogoče razložiti s prekomerno proizvodnjo drugih produktov presnove. Soden in sodelavci (2000) so pri čisti alkoholni fermentaciji s sevom *C. zemplinina* poročali o povečani proizvodnji glicerola in ocetne kisline v primerjavi s čisto kulturo *S. cerevisiae*.

Koncentracija večine končnih produktov mešane fermentacije, je bila bolj podobna tisti, pridobljeni s čisto kulturo *S. cerevisiae* (Comitini in sod., 2011). Količina glicerola pri mešani fermentaciji s starter kulturama *C. zemplinina* in *S. cerevisiae* je lahko višja, kot pri fermentaciji s čisto kulturo *S. cerevisiae* (Ciani and Ferraro, 1998; Soden in sod., 2000; Comitini in sod., 2011). Glicerol je nehlapna spojina, ki nima bistvenega pomena za aroma vina, ampak daje sladek okus in pomembno prispeva k telesu in polnosti vina (Noble in Bursick, 1984). Prisotnost *C. zemplinina* ima učinek tudi na samo aroma vina, ki je po čisti fermentaciji s kulturo *S. cerevisiae* podobna vonju po limeti, tropskem sadju in banani, po mešani fermentaciji s kvasovko *C. zemplinina* pa vonju po marelicah, medu in kislem zelju. Proizvodnjo želenega profila vin si lahko zagotovimo z izbiro ustreznih vrst ter postopkov nacepljanja (hkrati, zaporedno) mošta (Soden in sod., 2000). Comitini in sod. (2011) so pokazali, da lahko z izbiro ustreznih vrst kvasovk, v mešani fermentaciji s *S. cerevisiae* izboljšamo kakovost, kompleksnost in sestavo končnega proizvoda. Vsi dejavniki pa so v veliki meri odvisni od izbranih vrst in sevov ter njihovih razmerij (Comitini in sod., 2011).

### 2.3 KOMUNIKACIJA MED CELICAMI

Komunikacija je proces izmenjave podatkov in informacij za medsebojno sporazumevanje. Beseda latinskega izvora (lat. *communicatio*) pomeni: naznanilo, sporočilo, občevanje, povezanost ali povezava; izpeljanka komunicirati (lat. *communicare*), pa »napraviti nekaj skupno, deliti kaj s kom« (Štefanc, 2003). Vsaka oblika komunikacije zahteva obstoj vsaj treh členov: sporočevalca, sporočila in prejemnika. Slednji sporočilo sprejme, ga dekodira, interpretira ter se nanj odzove (Ucman, 2003). Gre za nujno potreben proces ne samo za obstoj človeške družbe, ampak se pomembnost komunikacije razprostira vse do nivoja posamezne celice. Čeprav je prenos signala med celicami osnova za usklajeno delovanje in razvoj večceličnih struktur, pa ima nezanemarljivo vlogo tudi pri enoceličnih organizmih, kot so bakterije in kvasovke (Wüster, 2009).

Od odkritja zaznavanja celične gostote pri bakteriji *Vibrio fischeri* in *Vibrio harveyi* (Nealson in sod., 1970), so preteklih 40 let potekale obsežne raziskave v tej smeri. Med doseganjem določene gostote celice izločajo v zunajcelični prostor difuzne signalne molekule, ki vplivajo na izražanje genov širokega spektra fizioloških in morfoloških lastnosti. Do prenosa signala pride, ko signalne molekule v neposredni odvisnosti od gostote celic, dosežejo določen koncentracijski prag. Obliko uravnavanja na osnovi gostote celic pri mikroorganizmih so leta 1994 definirali s pojmom »quorum sensing«, saj gre za mehanizem, ki celicam preko zaznavanja kemijskih signalov omogoča ocenitev gostote celic (Fuqua in sod., 1994). Velika razširjenost raznolikih sistemov zaznavanja celične gostote kaže na njihovo pomembnost pri uspešni prilagoditvi mikroorganizmov na različna okolja (Hogan, 2006; Wüster, 2009).

### 2.3.1 Zaznavanje celične gostote (ang. quorum sensing)

Zaznavanje celične gostote je mehanizem komunikacije, ki temelji na signalnih molekulah, ki se v odvisnosti od velikosti populacije celic kopičijo v mediju in na določeni stopnji rasti uravnavajo različne vedenjske vzorce (Waters in Bassler, 2005). Winzer in sod. (2002) so predlagali kriterije, katerim naj bi ustrezale nosilke medceličnega sporazumevanja, ali tako imenovane medcelične signalne molekule (CCSM; ang. cell-to-cell signal molecule). Do njihovega sproščanja pride med specifično fazo rasti, pod določenimi fiziološkimi pogoji ali kot odziv na spremembe v okolju. Po kopičenju v zunajceličnem prostoru jih prepozna specifični receptor in ob doseženi kritični koncentraciji pride do sprožitve in prenosa signala. Pomembno je, da se postavljeni kriteriji dopolnjujejo, saj lahko posameznemu ustreza katerikoli drugi produkt celice (Winzer in sod., 2002). Na medcelično sporazumevanje pri glivah naletimo že pri pregledu osnovnih bioloških funkcij, kot so parjenje, rast, preklop morfologije rasti ali uravnavanje izražanja virulentnih dejavnikov. Signalne molekule za uravnavanje večine omenjenih mehanizmov so lahko majhni peptidi, alkoholi, lipidi ali hitro hlapljive spojine (Cottier in Muhlschlegel, 2012). Gre za kemijsko različne signalne molekule, ki v odvisnosti od razmer v okolju pogosto sprožijo prehod iz enocelične oblike kvasovk v filamentozno (nitasto) obliko (Chen in Fink, 2006). Sprememba morfologije je nadzorovana preko avtoregulatornih molekul, vključenih v mehanizem zaznavanja celične gostote (Hornby in sod., 2001).

Vlogo signalnih molekul pri po Gramu negativnih bakterijah imajo homoserinlaktoni (Miller in Bassler, 2001), pri po Gramu pozitivnih pa majhni peptidi, ki potrebujejo za prenos signala dvokomponentni mehanizem (Kleerebezem in sod., 1997). Prvotno je bil sistem odkrit pri bakterijah, na nivoju gliv pa prvič pri *Candida albicans*, v povezavi z izražanjem virulentnih dejavnikov (Hazen in Cutler, 1979). Pri planktonsko rastочih celicah *C. albicans* in v zgodnjih fazah nastajanja biofilma, aromatski alkohol tirozol sproži nastanek kalitvene cevi (ang. germ tube), po razredčitvi zelo koncentrirane kulture, pa skrajša fazo prilagajanja (lag faza) (Chen in Fink, 2006; Cottier in Muhlschlegel, 2012). Alifatski alkohol fernezol, deluje kot signalna molekula v smeri zaviranja nastanka psevdomicelija (Hazen in Cutler, 1979; Hornby in sod., 2001). Pri industrijsko najbolj pomembni kvasovki *S. cerevisiae* so nalogu prenosa signala pripisali triptofolu in feniletanolu, ki v odvisnosti od razmer v okolju posredno uravnavata prehod med kvasno in nitasto obliko rasti (Chen in Fink, 2006). Poleg tega so odkrili tudi, da je feniletanol odgovoren za invazivno rast, ki se po dodatku triptofola še stopnjuje (Gori in sod., 2011).

### 2.3.2 Vpliv dejavnikov okolja na spremembo morfologije pri *S. cerevisiae*

Tvorbo pseudomicelija pri glivah lahko sproži pomanjkanje ali nedostopnost vira dušika (Rua in sod., 2001; Dickinson 1994) in rast pri nizkih koncentracijah višjih alkoholov (Dickinson 1996; Lorenz in sod., 2000). V primeru pomanjkanja ali omejene dostopnosti dušika pojavi lahko pojasnimo kot prilagoditev na negibljivost celic, ki si ne morejo poiskati hrane (Gimeno in sod., 1992).

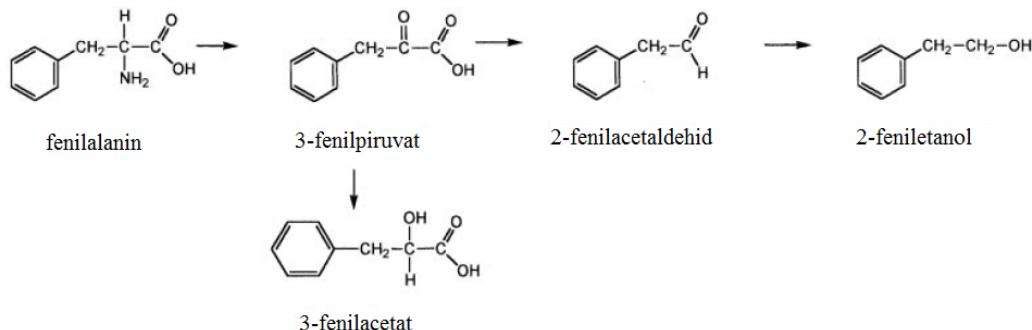
Pri odzivu na pomanjkanje višjih alkoholov pa gre za situacijo, ko kvasovke porabijo preferenčne vire dušika (npr. amonij, glutamin, asparagin) in začnejo z razgradnjo aminokislin (npr. levcin, izolevcin, valin, fenilalanin, tirozin, triptofan), katere produkt so višji alkoholi (Dickinson in sod., 2000, 2003). Končni produkti presnove delujejo kot signalne molekule, ki sprožijo spremembo morfologije (Chen and Fink 2006; Dickinson 2008). Morfogeneza je opisana tudi pri *S. cerevisiae* in sicer v odvisnosti od celične gostote. Kvasovke v okolje izločajo aromatska alkohola, ki posredno sprožijo izražanje *FLO11* in s tem spremembo morfologije. Sinteza avtosignalnih molekul je uravnavana z dušikom tako, da visoke koncentracije amonija zavirajo potek biosintetske poti, medtem ko jo pomanjkanje dušika aktivira. Sinteza je odvisna od sistema zaznavanja celične gostote in uravnana s pozitivno povratno zanko, pri čemer je potreben Aro80p transkripcijski faktor. Vzpostavitev vezi omogoča *S. cerevisiae* možnost odziva na koncentracijo celic in hrani v okolju. Sklepamo lahko, da so omenjeni molekularni signali vrstno specifični, saj pri *C. albicans* ne dobimo enakega odziva na njihovo prisotnost (Wüster, 2009). Aromatska alkohola sprožita spremembo na nivoju izražanja genov, kako pa si slednje sledijo in ali so pri sorodnih vrstah kvasovk ohranjene, pa še vedno ni znano (Wüster in Babu, 2010).

## 2.4 SIGNALNI MOLEKULI FENILETANOL IN TRIPTOFOL

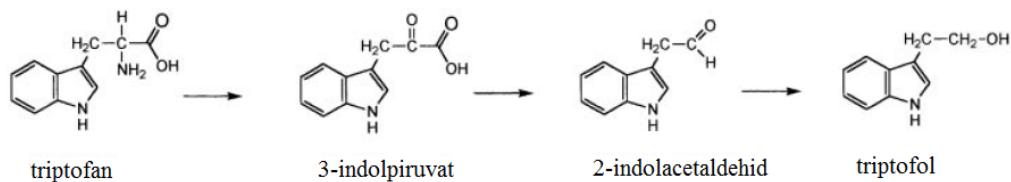
V rastlinskem in grozdnem soku predstavljajo aminokisline velik del razpoložljivega vira dušika (Hazelwood in sod., 2008). Med njihovo razgradnjo lahko nastanejo številni dolgoverižni in kompleksni alkoholi, kot so izoamil alkohol, izobutanol, aktivni amil alkohol, 2-feniletanol in triptofol. Slednji predstavljajo pomembne elemente okusa in arome fermentiranih izdelkov in imajo zanimive senzorične lastnosti (Dickinson in sod., 2003). Pot sinteze je močno odvisna od pogojev rasti, ki vključujejo pH okolja, dostopnost aromatskih kislin, prisotnost kisika ali prisotnost amonijevih soli (Cottier in Muhlschlegel, 2012). Presnova valina, levcina, izolevcina, metionina, triptofana in fenilalanina med fermentacijo poteka po Ehrlichovi poti (Ehrlich, 1907; Hazelwood in sod., 2008). Natančna kombinacija uporabljenih encimov ob določenem času je odvisna od vrste aminokisline, vira ogljika in stopnje rasti kulture (Dickinson in sod., 2003).

Sinteza aromatskih alkoholov (feniletanola in triptofola) je poznana tudi pri modelnem organizmu *Saccharomyces cerevisiae* in sicer po poti, ki vključuje gene *ARO* (Hazelwood in sod., 2008). Učinek feniletanola in triptofola je viden pri pomanjkanju dušika v okolju (Chen in Fink, 2006; Hogan, 2006), saj obe molekuli v koncentraciji večji od 20 µM na gojišču z nizko vsebnostjo dušika (SLAD) pri diploidnih celicah spodbujata oblikovanje psevdohif (Chen in Fink, 2006). Dickinson in sodelavci (2003) so za potrditev poti razgradnje fenilalanina in triptofana po Ehrlichovi poti, uporabili različne mutante sevov *S. cerevisiae* in kot edini vir dušika označene aminokisline. Pridobljene vzorce so nato analizirali z jedrsko magnetno resonančno spektroskopijo (NMR; ang. nuclear magnetic resonance spectroscopy) in plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS) (Dickinson in sod., 2003). Za potek metabolizma po Ehrlichovi poti so potrebne visoke koncentracije prekurzorskih molekul, nastanek alkoholov pa je značilen predvsem za eksponentno fazo rasti (Wittmann in sod., 2002; Etschmann in sod., 2003; Gori in sod., 2011). Aminokisline so po tej poti najprej deaminirane v ustrezne alfa-ketokisline, ki so dekarboksilirane v aldehide, ti pa nato reducirani v primarne alkohole.

Iz triptofana nastane triptofol preko 3-indol piruvata in 3-indol aldehida (Iraqui in sod., 1999). Aromatski alkohol, 2-fenilethanol ima vrtnici podoben vonj in je pomembna surovina v industriji dišav in hrane (Fabre in sod., 1998). Prvi korak je transaminacija L-fenilalanina do 3-fenilpiruvata, ki je dekarboksiliran v 2-fenilacetraldehyd, ta pa nato reduciran v 2-feniletanol (Ehrlich, 1907). Ko je aminokislina edini dostopen vir dušika, ta pot prevlada pred sintezo *de novo*, do katere pride pri nizkih koncentracijah aminokislin (Äyräpää, 1965).



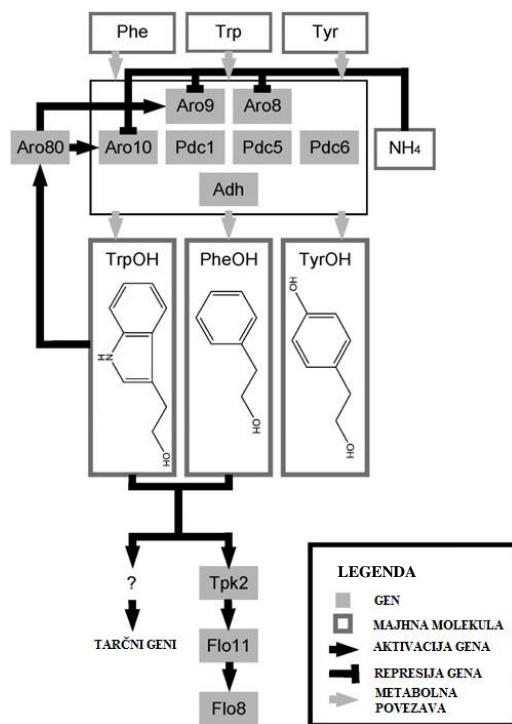
Slika 2: Nastanek 2-feniletanola z razgradnjo fenilalanina po Ehrlichovi poti; transaminacija L-fenilalanina do 3-fenilpiruvata, ki je dekarboksiliran v 2-fenilacetraldehyd, ta pa nato reduciran v 2-feniletanol (Dickinson in sod., 2003).



Slika 3: Nastanek triptofola (3-hidroksietil indol) z razgradnjo triptofana po Ehrlichovi poti; deaminacija triptofana do 3-indolpiruvata, ki je dekarboksiliran v 2-indolacetraldehyd, ta pa nato reduciran v triptofol (Dickinson in sod., 2003).

#### 2.4.1 Uravnavanje sinteze

Čeprav je molekularni mehanizem sinteze feniletanola in triptofola pri *S. cerevisiae* znan, ni še popolnoma jasno, kako pride do zaznave in prenosa signala. Aromatska alkohola sinergistično vplivata na regulacijo gena *FLO11*, preko od c-AMP odvisne podenote protein kinaze A in transkripcijskega faktorja Flo8p (Chen in Fink, 2006). Flo11p, produkt gena *FLO11*, je na celično površino zasidrana beljakovina, nujno potrebna za filamentozno rast (Fischer in sod., 2008). Pri od celične gostote odvisni sintezi sodelujeta gena *ARO9* in *ARO10*, ki sta regulirana preko povratne pozitivne zanke. Triptofol namreč preko transkripcijskega faktorja Aro80p sproži omenjeni aminotransferazi, ki sta potrebni za njegovo lastno sintezo. Torej je produkcija aromatskih alkoholov večja pri višji celični gostoti, pot sinteze pa se prekriva še s potjo zaznavanja prisotnosti vira dušika. Amonij zavira tako nitasto rast, kakor tudi izražanje genov *ARO9* in *ARO10*. Kljub temu pa se zdi, da aromatska alkohola nimata neposrednega vpliva na elemente MAPK-PKA (ang. Mitogen Activated Protein Kinase-Protein Kinase A) signalne poti, ki je potrebna za prenos signala ob pomanjkanju dušika (Chen in Fink, 2006; Wüster in Babu, 2009).



Slika 4: Shema sinteze aromatskih alkoholov triptofola (TrpOH) in fenilalanina (PheOH) ter sodelujoči encimi: aminotransferaze (Aro8, Aro9 in Aro10), piruvat dekarboksilaze (Pdc1, Pdc5 in Pdc6) in alkoholne dehidrogenaze (Adh). Gre za pozitivno povratno zanko, pri kateri sta Aro9 in Aro10 uravnani preko transkripcijskega faktorja Aro80, ki je aktivén v odvisnosti od triptofola. TrpOH in PheOH vplivata na spremembo izražanja približno 200 tarčnih genov, vendar sam mehanizem še vedno ni znan (Wüster in Babu, 2010).

#### 2.4.2 Metode za določanje signalnih molekul

Analitična kemija igra vedno bolj pomembno vlogo v svetovni industriji vina in je bistvenega pomena za zagotavljanje varnosti izdelkov in skladnosti z regulativnimi zakoni, ki urejajo mednarodni trg, kakor tudi razumevanje temeljnih vidikov pridelave grozdja in vina, za izboljšanje proizvodnih postopkov. Nenehen razvoj novih metod je olajšal razumevanje kemijske sestave in staranja vina, kar je ključnega pomena za nadzor kakovosti in pridobivanje še bolj podrobnejšega znanja (Villiers in sod., 2012). Spektroskopske metode, ki se uporabljajo za analize višjih alkoholov, vključujejo širok spekter tehnik, kot so spektrofotometrija v infrardečem in ultravijolično/vidnem spektru, jedrska magnetna resonančna (NMR) spektroskopija (Chen in sod., 2004) in masna spektrometrija (MS). Med najpogosteje uporabljenimi kromatografskimi metodami za analizo vina najdemo plinsko kromatografijo (GC) (Ciani in Ferraro; 1996; Toro in Vazyuez, 2002) in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (Andorrà in sod., 2010b; Rossouw in sod., 2012). Izboljšano analizo omogočajo kombinirane metode, kot so plinsko tekočinska kromatografija (GLC) (Ciani in sod., 2006) plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GCMS) (Mateo in sod., 2001; Barrajón in sod., 2011; Rossouw in sod., 2012).

#### 2.4.2.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je kromatografska tehnika, ki se uporablja za ločevanje, čiščenje ter kvalitativno in kvantitativno določevanje posamezne komponente v vzorcu (Skoog in sod., 2004). Navadno gre za sistem stacionarne faze v koloni, črpalke za potiskanje mobilne faze skupaj z vzorcem skozi kolono in detektorja, ki zaznava različne retencijske čase in površine kromatografskih vrhov posameznih komponent. Črpalka ustvari visok pritisk, ki omogoča enakomeren pretok mobilne faze z vzorcem. Izberitev mobilne faze je odvisna od sestave in lastnosti kolone ter komponent v vzorcu. Vrsto kromatografske metode izberemo glede na naravo posameznih komponent, ki jih želimo ločiti in določiti v vzorcu. Adsorpcijsko ali porazdelitveno metodo uporabljamo za ločevanje majhnih in manj polarnih molekul na osnovi topnosti, ionsko izmenjevalno za ločevanje večjih molekul na osnovi naboja, izključitveno kromatografijo za ločevanje po velikosti in afinitetno metodo za ločevanje snovi glede na njihovo težnjo po vezavi s snovjo na koloni (StandardBase; Skoog in sod., 2004). Prednosti metode pred klasično kromatografijo so kratek čas ločbe, ponovljivi rezultati, visoka občutljivost in boljša ločljivost (Skoog in sod., 2004).

#### 2.4.2.2 Jедrska magnetna resonančna spektroskopija (NMR)

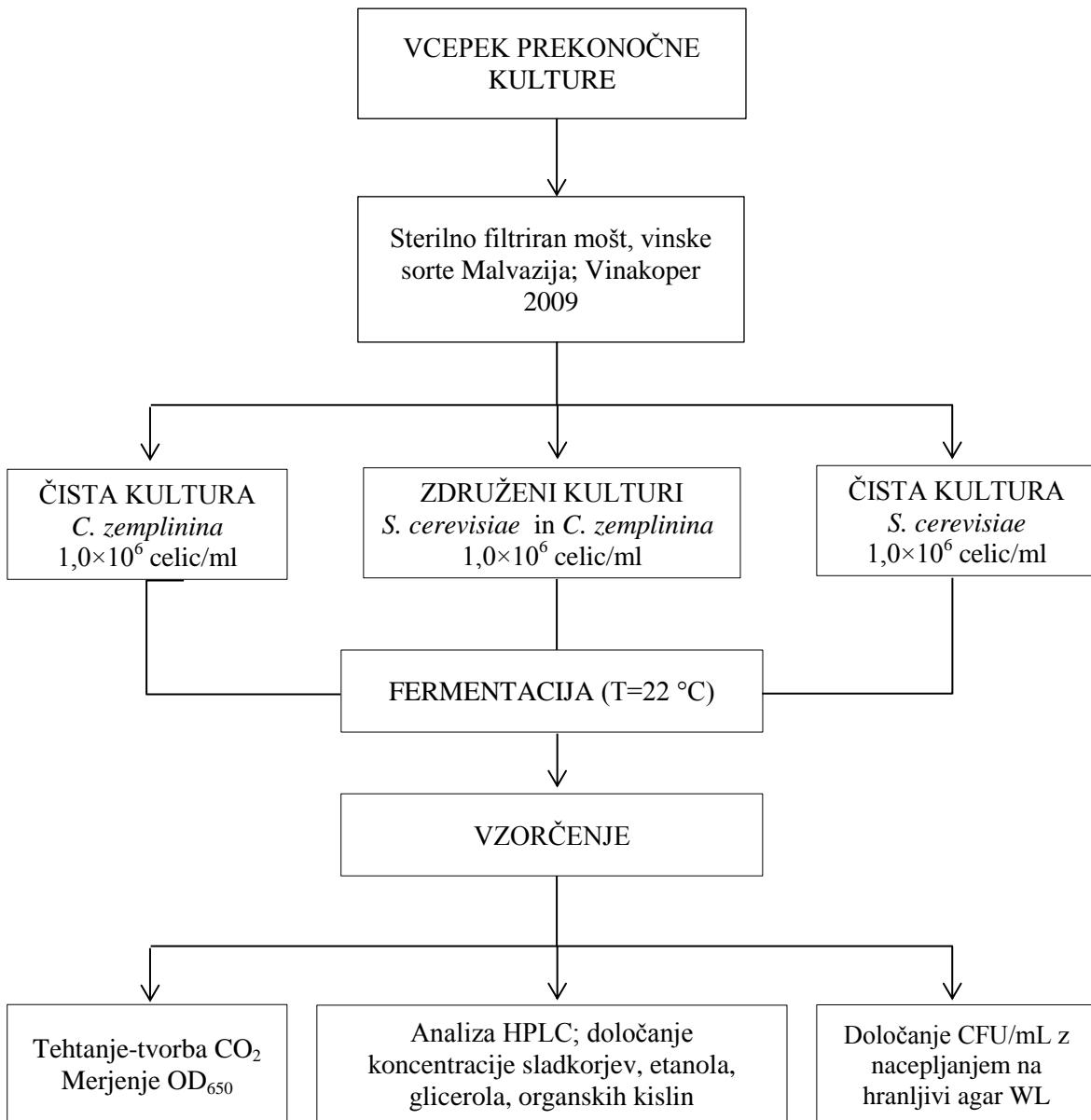
Jedrska magnetna resonanca je neselektivno analitično orodje, ki omogoča določitev molekulske strukture, vključno s konfiguracijo, koncentracijo in celo medmolekulskih interakcij, brez uničenja preiskovane snovi (Rogers, 2007). Gre za pojav, ki nastane ko so jedra atomov s spinom iz določenega statičnega magnetnega polja, izpostavljena drugemu nihajočemu magnetnemu polju (Hornak, 1999). Vzorec z magnetno aktivnimi atomskimi jedri v močnem magnetnem polju izpostavimo elektromagnetnem valovanju določene frekvence. Ko delec postavimo v zunanje magnetno polje z neko magnetno gostoto, se spremeni energija usmerjenosti v prostoru. Frekvenca elektromagnetnega valovanja, s katero sprožimo preskok med spinskima stanjem, je sorazmerna gostoti zunanjega magnetnega polja. S pulznim valovanjem preidejo jedra v vzbujeno stanje, iz katerega se ob oddajanju signalov vračajo v osnovno stanje (iznihavanje). Signale po sprejemu v tuljavo zapiše računalnik, tako da lahko po obdelavi dobimo spekter valovanja (Keeler, 2002).

#### 2.4.2.3 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS)

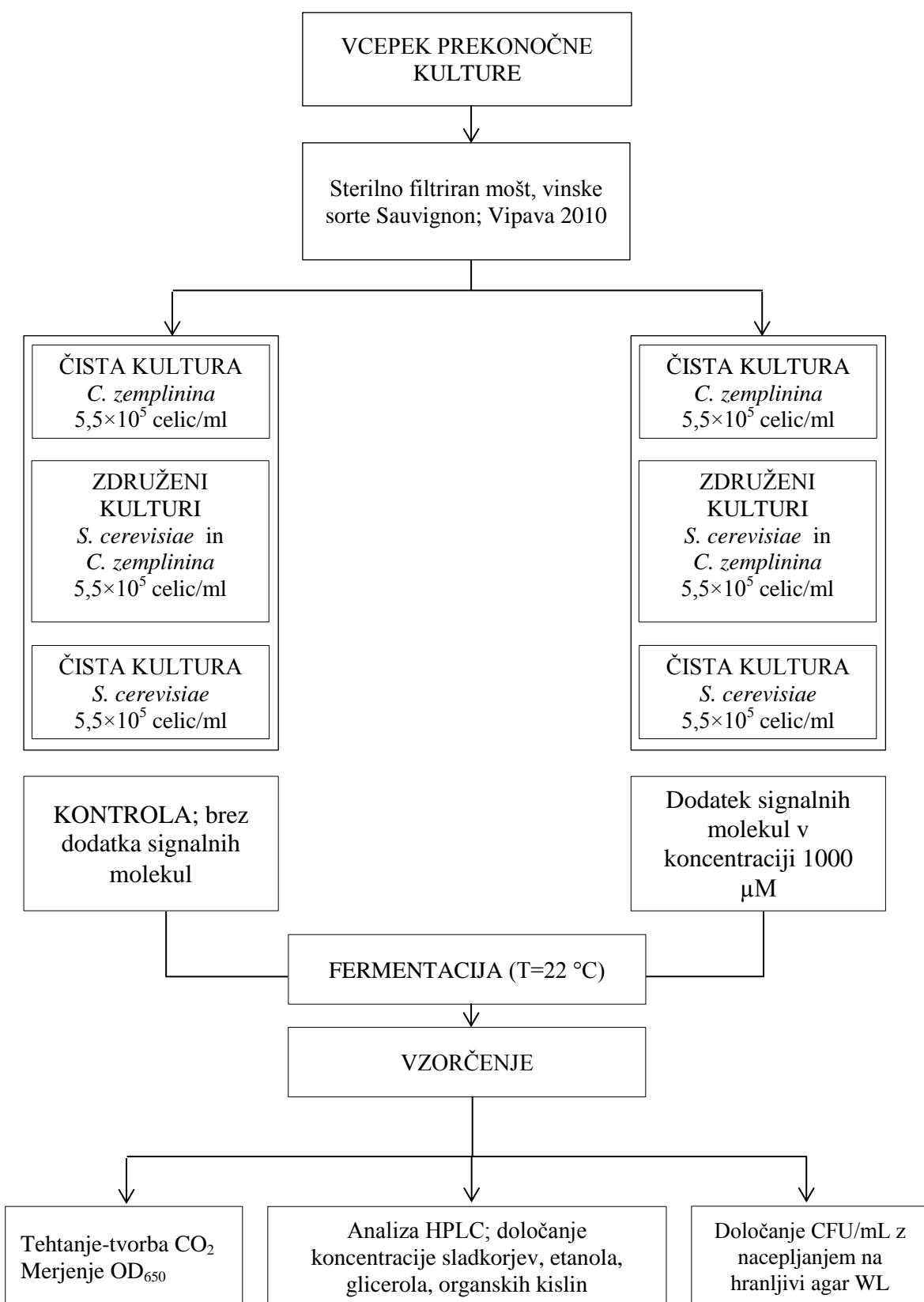
GC-MS je eno najpomembnejših orodij analizne kemije, za kvalitativno in kvantitativno analizo hlapnih organskih spojin. Po principu plinske kromatografije (GC) se molekule na kromatografski koloni ločijo glede na njihove kemijske značilnosti, v okviru masne spektrometrije (MS) pa glede na maso (Hites, 1997). Obvezni sestavni deli so: injektor, plinski kromatogram z virom nosilnega plina, termostat, programska oprema za prevajanje signala, kolona s stacionarno fazo, vmesnik za prenos molekul do vira ionizacije, sistem masne spektrometrije z virom ionizacije, lečami, določevalcem mase, detektorjem ionov in večstopenjskim črpalcem (McMaster, 2008). Zaradi razlik v afiniteti do stacionarne faze, molekule različno hitro potujejo po kromatografski koloni. Molekule, ločene glede na njihov zadrževalni čas na koloni, so analizirane z masnim spektrometrom. Ta v vakuum zajete molekule razbije na ionizirane delce, določi njihovo maso in primerja posamezne vrednosti. Združeni metodi zmanjšata možnost napake analize in dobimo kvantitativno in kvalitativno ločbo molekul v vzorcu (McMaster, 2008).

### 3 MATERIALI IN METODE

V tem poglavju so navedene metode in materiali, ki smo jih uporabili tekom eksperimentalnega dela poskusa.



Slika 5: Hodogram pred-poskusa, alkoholna fermentacija mošta sorte Malvazija.



Slika 6: Hodogram poskusa, alkoholna fermentacija mošta sorte Sauvignon.

### 3.1 MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili spodaj naštete in opisane materiale.

#### 3.1.1 Mikroorganizmi

Uporabljeni sevi se nahajajo v Zbirki industrijskih mikroorganizmov (ZIM) Katedre za Biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Gre za vinski sev *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1927, izoliran iz mošta sorte Malvazija in sev *Candida zemplinina* ZIM 842, izoliran iz mošta sorte Rebula Kvasovke smo po revitalizaciji hranili na agarskih ploščah gojišča YPD pri 28 °C. Da bi ohranili živost in čistost kulture, smo posamezno kolonijo vmesno precepljali na sveža gojišča.

Preglednica 2: Uporabljeni sevi mikroorganizmov.

Vrsta mikroorganizma	Oznaka	Vir
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ZIM 1927	mošt Malvazije, Slovenija
<i>Candida zemplinina</i>	ZIM 842	mošt Rebule, Slovenija

#### 3.1.2 Mikrobiološka gojišča

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili tekočo in trdno obliko gojišča YPD (ang. Yeast Peptone Dextrose) ter trdno gojišče WL (ang. Wallerstein Laboratories Nutrient agar) z in brez cikloheksimida.

##### 3.1.2.1 Tekoče gojišče YPD (Atlas, 2010)

Za pripravo gojišča po recepturi smo uporabili:

Sestavina	Proizvajalec	Količina	Končna koncentracija
• kvasni ekstrakt	Biolife, Italija	10 g	1 %
• pepton	Biolife, Italija	20 g	2 %
• glukoza	Merck, Nemčija	20 g	2 %
• dH <sub>2</sub> O		1000 ml	

Maso sestavin smo preračunali na ustrezni volumen, jih natehtali v enolitrsko steklenico z navojem in jim dodali 750 mL destilirane vode. Gojišče smo toplotno sterilizirali v avtoklavu (20 min, 121 °C, 1,1 bar) in ga po postopku ohladili na sobno temperaturo ter aseptično razdelili v sterilne erlenmajerice. Tekoče gojišče smo uporabili za namnožitev vcepka delovnih organizmov, ki smo jih uporabili kot starter kulturo pri fermentacijah.

##### 3.1.2.2 Trdno gojišče YPD (Atlas, 2010)

Za trdno gojišče YPD smo k sestavinam za tekoče gojišče YPD, dodali še 2 % agar in ustrezni volumen destilirane vode. V enolitrsko steklenico z navojem smo natehtali sestavine in dodali 750 mL destilirane vode ter sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min, 1,1 bar). Po postopku sterilizacije je sledilo hlajenje v vodni kopeli pri 55 °C in aseptično razlivanje v sterilne petrijeve plošče. Trdna oblika gojišča nam je služila za ohranjanje živosti kultur in določanje števila kolonijskih enot.

<b>Sestavina</b>	<b>Proizvajalec</b>	<b>Količina</b>	<b>Končna koncentracija</b>
• kvasni ekstrakt	Biolife, Italija	10 g	1 %
• pepton	Biolife, Italija	20 g	2 %
• glukoza	Merck, Nemčija	20 g	2 %
• agar	Biolife, Italija	20 g	2 %
• dH <sub>2</sub> O		1000 ml	

### 3.1.2.3 Pravi mošt

V pred-poskusu smo za alkoholno fermentacijo uporabili mošt sorte Malvazija (Vinakoper, 2009), v poskusu pa mošt sorte Sauvignon (Vipava, 2010), ki sta bila shranjena v zamrzovalniku pri -20 °C. Odtaljen mošt smo sterilizirali z metodo filtriranja, v nekaj korakih. Najprej smo mošt centrifugirali (10 minut pri 4000×g), supernatant odlili ter ga prefiltrirali skozi filter za grobo filtracijo mošta in nato še skozi filter z velikostjo por 0,45 µm ter končno skozi filter z velikostjo por 0,2 µm.

### 3.1.2.4 Trdno gojišče WL (Fluka, Švedska)

Glede na specifikacijo proizvajalca smo v steklenico natehtali 60,2 g gojišča v prahu ter dodali 750 mL destilirane vode. Po sterilizaciji v avtoklavu (121 °C, 20 min, 1,1 bar) smo gojišče ohladili v vodni kopeli in ga aseptično razlili v petrijeve plošče. Gojišče je diferencialno in nam je omogočilo razlikovanje zraslih kolonij uporabljenih sevov, po barvi in morfologiji. Uporabili smo ga za določanje števila kolonijskih enot med potekom fermentacije.

### 3.1.2.5 Trdno gojišče WL (Fluka, Švedska) s cikloheksimidom

Z dodatkom cikloheksimida WL gojišču smo dobili selektivno gojišče, saj je dodana snov zaviralec rasti določenih skupin kvasovk. Iz založne raztopine v koncentraciji 80 mg/L smo pripravili raztopino začetne koncentracije 1000 mg/l. V mikrocentrifugirki smo zmešali 150 µl založne raztopine in 11,85 mL dH<sub>2</sub>O, premešali in sterilizirali s filtracijo skozi 0,2 µm filter in shranili do uporabe pri 4 °C. Pripravili smo z 7 steklenic z 250 mL WL gojišča, vsako za drugačno končno koncentracijo cikloheksimida in dve za kontrolo, brez dodatka. Po avtoklaviraju smo gojišče ohladili na 55 °C in dodali ustrezni volumen cikloheksimida v koncentraciji 1000 mg/l, da smo dobili sledeče končne koncentracije: 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 in 10 mg/l.

## 3.1.3 Pufri in raztopine

### 3.1.3.1 Pufer PBS (Merck, Nemčija)

Za pripravo 10 X PBS pufra smo uporabili:

• NaCl	Merck, Nemčija	80 g
• KCl	Merck, Nemčija	2 g
• Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×H <sub>2</sub> O	Merck, Nemčija	7,4 g
• KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Nemčija	2,4 g
• dH <sub>2</sub> O		1000 ml

Naštete sestavine v prahu smo natehtali v 1000 mL čašo, dodali vodo in mešali na magnetnem mešalu, dokler se sestavine niso vidno raztopile. Nato smo s pH metrom odčitali pH in ga z dodatkom 5 M NaOH, oziroma 0,5 M HCl, umerili na pH 7,4. Pufer smo sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 20 min, 1,1 bar).

### 3.1.3.2 Metilensko modrilo (Kirsop in Painting, 1989)

V 10 mL destilirane vode smo raztopili 0,01 g metilenskega modrila, dodali 2 g natrijevega citrat dihidrata in raztopili z mešanjem na magnetnem mešalu. Vsebino smo prelimi v 100 mL bučko in do oznake dolili sterilno destilirano vodo. Pripravljeno barvilo smo še filtrirali skozi 0,2 µm filter in ga do uporabe shranili v hladilniku pri 4 °C.

### 3.1.4 Priprava mobilne faze za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

- Acetonitril

Za kromatografsko ločbo s kolono Waters (150 mm×4,6 mm; XBridge Phenyl 5,0 µm), smo kot mobilno fazo pripravili dvajset odstotni acetonitril. V valj smo odmerili 200 mL 100 % acetonitrica in ga prelimi v 1000 mL merilno bučo, v katero smo nato do oznake dolili dH<sub>2</sub>O. Vsebino smo prelimi v enolitsko steklenico z navojem, ki smo jo za 20 min potopili v ultrazvočno kopel.

- 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Za kromatografsko ločbo s kolono Aminex HPX-87H (360 mm×7,8 mm; BioRad) smo kot mobilno fazo pripravili 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. V 2 l merilno bučo smo do vrata natočili dH<sub>2</sub>O in dodali 534 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ter dH<sub>2</sub>O do oznake. Mobilno fazo smo prelimi v steklenico z razplinjevalcem, ki je bila del sistema.

### 3.1.5 Standardne raztopine za umeritvene krivulje

Umeritvene krivulje smo izdelali za glukozo, fruktozo, etanol, glicerol, citronska kislina, jabolčna kislina, ocetna kislina, vinska kislina, feniletanol in triptofol. Pripravili smo različne koncentracije raztopin posamezne komponente in vzorec analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

#### 3.1.5.1 Glukoza in fruktoza

Za pripravo založne raztopine glukoze v koncentraciji 200 g/l, smo v 10 mL bučko natehtali 2 g sladkorja in do oznake dodali dH<sub>2</sub>O. Vsebino smo prefiltrirali skozi 0,2 µm filter in s kombinacijo ustreznih volumnov založne raztopine in dH<sub>2</sub>O pripravili ostale potrebne koncentracije; 30, 50, 70 in 100 g/l. Iz desetkratno redčene založne raztopine smo nato pripravili še redčitve v koncentracijah 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 in 10 g/l. Enak postopek smo uporabili tudi za pripravo fruktoze.

#### 3.1.5.2 Etanol

Za pripravo založne raztopine etanola v koncentraciji 200 g/L smo v 10 mL merilno bučko odpipetirali 2,535 mL 100% etanola ter do oznake dolili dH<sub>2</sub>O. Ustrezen volumen smo po filtraciji skozi 0,2 µm filter, redčili do koncentracij 30, 50, 70 in 100 g/l. Iz desetkrat redčene založne raztopine pa smo pripravili še koncentracije 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 in 10 g/l.

### 3.1.5.3 Glicerol

Pri pripravi založne raztopine glicerola v koncentraciji 50 g/L smo v 10 mL bučko odpipetirali 0,397 mL glicerola ter dodali dH<sub>2</sub>O do oznake. Ustrezen volumen smo prefiltrirali in redčili do koncentracij 2,5; 5; 10; 20; 30; 50 g/l. Iz 10x redčene založne raztopine smo pripravili še koncentracije 0,1; 0,25; 0,5; in 1 g/L.

### 3.1.5.4 Organske kisline: citronska, jabolčna, ocetna in vinska

Za pripravo jabolčne, ocetne in vinske kisline, smo v 10 mL bučko natehtali 0,1 g kisline v prahu in dodali dH<sub>2</sub>O do oznake. Založno raztopino citronske kisline smo pripravili iz 95,2 μl neredčene raztopine in dH<sub>2</sub>O vode do oznake v 10 mL bučki.

### 3.1.5.5 Signalni molekuli: feniletanol (PheOH) in triptofol (TrpOH)

- Feniletanol

Feniletanol v založni koncentraciji 50 mM smo pripravili tako, da smo natehtali 0,05 g feniletanola v tekoči obliki in dodali 8185 μl sterilne dH<sub>2</sub>O. Raztopino smo dobro premešali, filtrirali skozi 0,2 μm filter in do uporabe shranili pri 4 °C.

- Triptofol

V mikrocentrifugirki smo pripravili 0,1 M založno raztopino triptofola; natehtali smo 0,032 g triptofola, dodali 200 μl absolutnega etanola in zmešali na vrtinčniku, dokler se vsebina ni vidno raztopila. Nato smo dodali še 1800 μl sterilne dH<sub>2</sub>O ter filtrirali skozi 0,2 μm filter in do uporabe shranili pri sobni temperaturi. Iz dobljene založne raztopine smo pridobili nadaljnje redčitve za umeritveno krivuljo.

### 3.1.6 Laboratorijska oprema

Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema.

Naziv	Oznaka modela	Proizvajalec
Avtoklav	/	Sutjeska, Jugoslavija
Avtomatske pipete	P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson, Francija
Brezprašna komora	PIO LFVP 12	Iskra, Slovenija
Centrifuga	3K30	Sigma, ZDA
Čitalec mikrotitrskih plošč	Safire 2	Tecan, Švica
Digestorij	/	Iskra, Slovenija
Hladilnik	/	LTH, Slovenia
Hladilnik	/	Gorenje, Slovenija
Inkubator grelno-hladilni	BTES_frigomat	Termo Iskra, Slovenija
Inkubator	Kambič	
Kamera za mikroskop CSF z dokumentacijskim sistemom	Leica	Leica, Nemčija
Magnetno mešalo	RTC basic	IKA, ZDA
Mikroskop	DM4000 B	Leica, Nemčija
Omara za sušenje steklovine	SO-250	Elektromedicina, Slovenija
pH meter	Seven multi	Mettler Toledo, ZDA
Sistem za kromatografijo visoke ločljivosti	/	Knauer, Nemčija
Tehnici	Sartorius-excellence	Sartorius, Nemčija
	Sartorius-analytic	Sartorius, Nemčija
Termostat s cirkulacijo hladilne tekočine	2219 Multitemp II	LKB-Pharmacia, ZDA
Vakuumska črpalka	VEB Reglerwerk	VEB Reglerwerk, Nemčija
Vrtinčnik	IKA Lab Dencer	IKA, ZDA
Zamrzovalnik (-20°C)	Economic	Gorenje, Slovenija

Preglednica 4: Ostali uporabljeni laboratorijski pripomočki.

Naziv	Proizvajalec
Filtri Phenex; velikost por 0,2 µm	Phenomenex, Italija
Filtri Millex; velikost por 0,22 µm	Millipore, ZDA
Filtri nitrocelulozni; 0,45 µm pore	Sartorius, Nemčija
Filtri za grobo filtracijo mošta	Millipore, ZDA
Erlenmajerice 200 ml	Schott Duran, Nemčija
Injekcijske brizge BD Plastipak	/
Merilni valji	/
Mikrocentrifugirke 2 mL	Eppendorf, Nemčija
Mikrotitrski ploščice P96	TPP, Švica
Nastavki za pipete	Eppendorf, Nemčija; Gilson, Francija
Objekttna stekelca	Brand GMBH, Nemčija
Parafilm »M« PM 992	American National Can, ZDA
Plastične filtrirne naprave	TPP, Švica
Plastične mikrocentrifugirke (10 in 50 ml)	TPP, Švica
Steklene filtrirne naprave	Sartorius, Nemčija
Steklene kroglice	Sigma, Nemčija
Sterilne petrijeve plošče	Labortechnika Golias, Slovenija
Sterilne plastične cepilne zanke	
Števec kolonij (ang. Colony Counter)	Bio Kobe, Japan
Števne komore Bürker-Türk	Brand, Nemčija
Viale	Supelco, Sigma-Aldrich, Nemčija

### 3.1.7 Reagenti

- acetonitril Sigma-Aldrich, Nemčija
- agar Biolife, Italija
- citronska kislina Sigma-Aldrich, Nemčija
- etanol (96 %, 70 %) Merck, Nemčija
- feniletanol Sigma-Aldrich, Nemčija
- formaldehid Sigma-Aldrich, Nemčija
- fruktoza Merck, Nemčija
- glicerol Sigma-Aldrich, Nemčija
- glukoza Merck, Nemčija
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Carbo Erba
- jabolčna kislina Merck, Nemčija
- KCl Merck, Nemčija
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Merck, Nemčija
- kvasni ekstrakt Biolife, Italija
- NaCl Merck, Nemčija
- NaOH Merck, Nemčija
- ocetna kislina Merck, Nemčija
- pepton Biolife, Italija
- triptofol Fluka, Švica
- vinska kislina Kemika, Hrvaška

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Namnožitev biomase za vcepek

Vcepek za fermentacijo smo pripravili v 250 mL erlenmajericah s 100 mL tekočega gojišča YPD. Vanj smo iz trdnega gojišča YPD, s cepilno zanko prenesli kolonijo posameznega seva *S. cerevisiae* ZIM 1927 in *C. zemplinina* ZIM 842. Nacepljena gojišča smo 24 ur inkubirali na stresalniku z 220 vrt./min pri temperaturi 28 °C. Pred nacepljanjem sterilnega mošta za fermentacijo, smo kulturo centrifugirali, supernatant zavrgli in pelet suspendirali v sterilnem moštu. Kvasovke smo obarvali z metilenskim modrilom in s pomočjo štetja celic pod mikroskopom, določili njihovo koncentracijo. Glede na slednjo smo izračunali pravšnji volumen, za dosego želene skupne začetne koncentracije. Ta naj bi bila pri pred-poskusu  $6,0 \times 10^6$  celic v 1800 mL mošta in  $5,5 \times 10^5$  celic v 1200 mL mošta pri glavnem poskusu.

### 3.2.2 Določitev vpliva različnih koncentracij feniletanola in triptofola na živost celic

Pred samim poskusom smo preverili vpliv dodatka feniletanola in triptofola na živost celic *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927. Poskus smo izvedli v mikrocentrifugirkah, v katere smo razporedili pravi mošt nacepljen s čisto kulturo posameznega seva po dodatku različnih koncentracij (0 µM, 350 µM, 500 µM, 750 µM, 1000 µM) feniletanola in triptofola. Alkoholna fermentacija je potekala v inkubatorju pri 22 °C. V nekaj urnih časovnih razmikih smo vzorčili (20 µl) 4 neodvisne ponovitve posamezne kombinacije, vzorec redčili z metilenskim modrilom in prešteli žive celice pod mikroskopom ter izračunali njihovo koncentracijo.

### 3.2.3 Alkoholna fermentacija

Fermentacija je potekala v 250 mL erlenmajericah z zamaškom in vrelno veho, na magnetnih mešalih v inkubatorju, pri temperaturi 22 °C. Izhajanje nastalega CO<sub>2</sub>, je omogočala odprtina vrelne vehe, ki smo jo po razdelitvi delovnega volumna mošta v erlenmajerice, namestili skozi zamašek. Ker smo količino sproščenega CO<sub>2</sub> izračunali iz razlik v masi, je bilo potrebno fermentorje pred in po vsakem vzorčenju stehtati. Pri vzorčenju smo iz vsakega fermentorja vzeli po 1,3 mL čim bolj reprezentativnega vzorca, ki smo ga uporabili za določanje koncentracije celic, merjenje optične gostote, redčitveno vrsto in nacepljanje ustreznih razredčitev na trdno gojišče WL. Ostanek vzorca smo centrifugirali (5 min pri 2000×g) in supernatant shranili na -20 °C, za kasnejšo analizo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

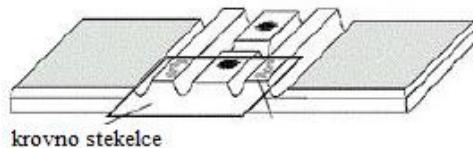
### 3.2.4 Merjenje optične gostote vzorcev

Po vsakem vzorčenju smo 200 µl vzorca odpipetirali v mikrotitersko ploščico in z optičnim čitalcem Tecan pri valovni dolžini 650 nm, izmerili optično gostoto. Dobljenim vrednostim smo odšteli vrednost vzorca mošta, ki smo ga kot kontrolo inkubirali pod istimi pogoji kot fermentorje. Iz rezultatov vzorčenj med potekom fermentacije, smo izdelali rastno krivuljo.

### 3.2.5 Neposredno in posredno določanje koncentracije celic (Zupan in sod., poslano v objavo)

Število celic v raztopini smo določali neposredno, s štetjem celic pod mikroskopom, na Bürker-Türkovo števni komori (Proscitech, 2003). Najprej smo vzorec dobro premešali in 20 µl redčili z 20 µl metilenskega modrila. Dvakratno redčitev vzorca smo nato premešali na vrtinčniku in 20 µl enakomerno nanesli pod pričvrščeno krovno stekelce. Z mikroskopom smo pod 100-kratno povečavo, s pomočjo navodila za iskanje živih celic, posneli sliko vidnega polja. Le-to smo nato obdelali s programom ImageJ in dobili število celic na določeni površini, ki smo ga nato ob upoštevanju redčitve in površine, uporabili za izračun koncentracije celic na mililiter suspenzije po enačbi:

$$\text{število } \frac{\text{celic}}{\text{ml}} = \frac{\text{povprečno št. celic na vidno polje}}{\text{površina vidnega polja}} \times \text{faktor redčitve} \quad \dots (1)$$



Slika 7: Bürker-Türk števna komora (Proscitech, 2003).

Posreden način je bilo določanje števila kolonijskih enot (CFU), ki smo ga izračunali iz števila zraslih kolonij ter volumna ustrezne redčitve, nacepljene na trdno gojišče WL. Ob vsakem vzorčenju smo določili koncentracijo celic posameznega seva v vzorcu in se odločili kolikokrat bomo vzorec redčili, da dobimo števne plošče s številom zraslih kolonij od 30-300 na plošči. Za redčitveno vrsto smo uporabili 1×PBS pufer in določen volumen dveh redčitev v treh paralelkah nacepili na trdno gojišče WL, razmazali s sterilnimi steklenimi kroglicami in plošče 48 ur ali dlje inkubirali pri 28 °C. Po inkubaciji je sledilo štetje kolonij in izračun kolonijskih enot na mililiter (CFU/ml) po enačbi.

$$\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} = \frac{Y * R}{V} \quad \dots (2)$$

Y- število preštetih kolonijskih enot; R- faktor redčitve; V- volumen raztopine nacepljen na gojišče

### 3.2.6 Merjenje med fermentacijo sproščenega ogljikovega dioksida ( $\text{CO}_2$ )

Količino nastalega  $\text{CO}_2$  smo izračunali posredno, iz razlik v masi med posameznimi vzorčenji. Fermentorje smo pred in po vsakem vzorčenju stehtali, da smo lahko pri računanju tvorbe  $\text{CO}_2$ , odšteli spremembo mase odvzetega volumna vzorca.

### 3.2.7 Priprava umeritvene krivulje za HPLC s standardnimi raztopinami

Pripravljene standardne raztopine znanih koncentracij smo analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, ki je potekala pod ustreznimi kromatografskimi pogoji.

Vsebnost sladkorjev glukoze, fruktoze, etanola in glicerola, smo določali z RI detektorjem. Kromatografski pogoji so bili:

- razplinjevalnik: Jour Research, VacCap,
- črpalka: Knauer, Maxi star K-1000,
- kolona: Bio-Rad, Aminex, HPX-87H, dimenzijske 300 mm×7,8 mm,
- mobilna faza: 0,005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,
- pretok mobilne faze: 0,6 mL/min,
- temperatura: 36 °C,
- volumen injiciranja: 40 µL,
- detektor: diferencialni refraktometer, Knauer,
- vzorčevalnik: Spark Holland, Midas,
- zapis signala: programska oprema Eurochrom 2000.

Za določanje vsebnosti organskih kislin smo uporabili UV-VIS detektor.

Pogoji kromatografije so bili:

- razplinjevalnik: Jour Research, VacCap,
- črpalka: Knauer, Maxi star K-1000,
- kolona: Bio-Rad, Aminex, HPX-87H, dimenzijske 300 mm×7,8 mm,
- mobilna faza: 0,005 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,
- pretok mobilne faze: 0,6 mL/min,
- temperatura: 36 °C,
- volumen injiciranja: 40 µL,
- detektor: UV-VIS, Knauer,
- vzorčevalnik: Spark Holland, Midas,
- zapis signala: programska oprema Eurochrom 2000.

Za ločevanje in detekcijo signalnih molekul (triptofola in feniletanola) v vzorcih, smo uporabili 16 minutni program in kolono Waters (150 mm × 4,6 mm; XBridge Phenyl). Triptofol smo detektirali z UV-VIS detektorjem, feniletanol pa s fluorescenčnim (FLD; ang. fluorescence detector) detektorjem pri valovni dolžini vzbujevalne svetlobe  $\lambda=285$  nm (Zupan in sod., poslano v objavo).

Triptofol (IUPAC; 2-(1*H*-indol-3-il)etanol) v vzorcih smo določali z UV-VIS detektorjem, pri sledečih kromatografskih pogojih:

- črpalka: Knauer, Maxi star K-1000,
- kolona: Waters, XBridge Phenyl 5,0 µm, dimenzijske 150 mm×4,6 mm,
- mobilna faza: 20 % acetonitril,
- pretok mobilne faze: 1,0 mL/min,
- temperatura: sobna,
- volumen injiciranja: 40 µL,
- detektor: UV-VIS, Knauer,
- avtomatski podajalec vzorcev: Spark Holland, Marathon-XT,
- zapis signala: programska oprema Eurochrom 2000.

Za določanje feniletanola (IUPAC; 2-feniletanol) smo uporabili fluorescenčni (FLD) detektor. Kromatografski pogoji so bili:

- črpalka: Knauer, Maxi star K-1000,
- kolona: Waters, XBridge Phenyl 5,0 µm, dimenzijske 150 mm×4,6 mm,
- mobilna faza: 20 % acetonitril,
- pretok mobilne faze: 1,0 mL/min,
- temperatura: sobna,
- volumen injiciranja: 40 µL,
- detektor: spektrofluorometrični detektor RF-551, Shimadzu,
- avtomatski podajalec vzorcev: Spark Holland, Marathon-XT,
- zapis signala: programska oprema Eurochrom 2000.

Pridobljene podatke kromatografske ločbe smo obdelali s programom Origin (OriginLab®) in z metodo integriranja na bazni liniji, določili površine kromatografskih vrhov. Pripadnost posameznega vrha določeni spojini smo določili s pomočjo retencijskega časa, to je karakteristični čas, ki ga posamezna komponenta potrebuje za prehod skozi kolono. Grafi odvisnosti znanih koncentracij standardnih raztopin, od dobljenih površin kromatografskih vrhov, predstavljajo umeritvene krivulje. Koeficient  $k$  iz linearne enačbe premice, smo uporabili za izračun koncentracij določene komponente v kasneje pridobljenih vzorcih.

... (3)

$$y = kx + n$$

$y$ - koncentracija komponente v standardni raztopini;  $k$ - smerni koeficient;  $x$ - površina kromatografskega vrhu posamezne komponente v standardni raztopini;  $n$ - presečišče grafa z ordinatno osjo

... (4)

$$c = x \times k$$

$c$ - koncentracija komponente v vzorcu;  $x$ - površina kromatografskega vrha posamezne komponente v vzorcu;  $k$ - smerni koeficient enačbe umeritvene krivulje določene komponente

### 3.2.8 Določanje koncentracije sladkorjev, etanola, glicerola in organskih kislin, s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

Shranjene vzorce smo odmrznili in centrifugirali 5 min pri 6000 × g ter supernatant filtrirali skozi 0,2 µl filter v vijalo. Komponente vzorca so se z uporabo 25 minutnega programa, na koloni Aminex HPX-87H (360 mm×7,8 mm; BioRad), ločile na osnovi velikosti in naboja molekul. Glukozo, fruktozo, etanol in glicerol smo določili z refraktometričnim detektorjem (RI ang. refractive index detector), na osnovi razlik med lomnimi količniki mobilne faze (5 mM raztopina H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in raztopine vzorca. Za določanje organskih kislin (citronske, jabolčne, ocetne in vinske) smo uporabili UV-VIS detektor za ultravijolični in vidni del spektra. Dobljene kromatograme smo kvantitativno ovrednotili preko umeritvenih krivulj standardnih raztopin.

### 3.2.9 Določanje količine asimilirajočega dušika (Gump in sod., 2001)

Metoda titracije formola je enostaven in hiter način za določitev količine asimilirajočega dušika, ki se lahko uporabi za grobo oceno njegove razpoložljivosti v mediju (YAN; ang. Yeast Assimilable Nitrogen). Formaldehid po dodatku k predhodno primerno razredčenemu vzorcu reagira z aminokislinami, ki so poglavitni vir v presnovi uporabljenega dušika. pride do sprostitev protonov ( $H^+$ ), sorazmerno z razpoložljivim dušikom in posledično do padca pH vrednosti vzorca. Z volumnom NaOH, potrebnim za nevtralizacijo sproščenih protonov, dobimo oceno vsebnosti dušika v aminokislinah (Gump in sod., 2001).

Vzorec mošta sorte Sauvignon (pH 3,7) smo prefiltrirali skozi gobi filter in mu z dodajanjem 1 M NaOH umerili pH na 8. Ker smo sklepali, da žveplovega dioksida ( $SO_2$ ) ni bilo v moštu, smo korak dodajanja barijevega klorida izpustili. 100 mL vzorca smo nato prelimili v 200 mL merilno bučo in dopolnili z destilirano vodo do oznake. Vsebino smo dobro premešali in 100 mL razredčine prelimili v čašo in dodali 25 mL formaldehida (pH 8). Vzorec smo nato ponovno umerili na pH 8, z dodajanjem 0,1 M NaOH in volumen slednjega uporabili za izračun količine asimilirajočega dušika (YAN).

... (5)

$$YAN \text{ (mgN/L)} = mL \text{ NaOH} \times 0,10 \text{ mmolOH/mL} \times (1 \text{ mmol N}) / (1 \text{ mmol OH}) \times 200 \text{ mL} / 100 \text{ mL} \times 10 \\ \times 14 \text{ mg/mmol N}$$

... (6)

$$YAN \left( \frac{mgN}{L} \right) = mL \text{ NaOH} \times 28$$

### 3.2.10 Analiza aromatskega profila

Vzorce za analizo aromatskega profila smo odvzeli v treh ključnih točkah fermentacije; na sredini eksponentne faze celic, v sredini stacionarne faze in ob koncu poskusa. V označeno plastično mikrocentrifugirko smo odpipetirali 5 mL vzorca in dodali natrijev azid v končni koncentraciji 0,2 g/l. Po triurni inkubaciji smo mikrocentrifugirke centrifugirali 5 min pri 2000×g, supernatant odlili v nove mikrocentrifugirke in shranili do analize na -20 °C. Natrijev azid smo dodali za boljšo ločbo kvasne biomase iz vzorca, po protokolu Inštituta za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS), ki je za nas izvedlo analizo.

#### 3.2.10.1 Natrijev azid

Pripravili smo natrijev azid v založni koncentraciji 10 g/l; v čašo smo natehtali 1 g NaN3 in ga raztopili v 80 mL d  $H_2O$ , vsebino prelimili v 100 mL bučko in dodali vodo do oznake. Vsebino smo premešali in filtrirali skozi 0,2 µl filter ter do uporabe shranili pri 4 °C.

### 3.2.10.2 Hierarhično grupiranje

Pri metodi hierarhičnega grupiranja ali analizi grup moramo najprej določiti kako podobni so si obravnavani predmeti, ali spremenljivke, ki jih opisujejo. Iz podobnosti med pari naredimo matriko, čemur sledi korak povezovanja, pri katerem je najpogostejša metoda zgoščevanja, z postopnim povezovanjem predmetov v skupine. Osnovni namen je preračunati vrednost številčne podobnosti med novo nastalimi skupinami in ostalimi predmeti. Rezultate analize grup prikažemo z drevesnim diagramom (Košir, 2001).

### 3.2.10.3 Regularizirana diskriminatna analiza

Na osnovi izračuna, ki ga pridobimo z regularizirano diskriminantno analizo (RDA), poudarimo razlike med že na začetku določenimi skupinami vzorcev. Iz skupine znanih vzorcev izračunamo matriko, s pravili za umeščanje neznanih vzorcev. Prvi korak je optimizacija, ki je največkrat navzkrižna in iz vsake skupine vzorcev vzamemo po enega, ostalim pa izračunamo RDA (Košir, 2001).

## 4 REZULTATI

Poglavlje povzema rezultate laboratorijskega dela, ki smo jih pridobili od marca do julija 2012 in so v obliki grafov in preglednic, nekateri podrobnejši podatki ter umeritvene krivulje pa so v poglavju Priloge. Predstavljeni so rezultati poteka fermentacije mošta sorte Malvazija s čisto in z združeno starter kulturo kvasovk *Candida zemplinina* ZIM 842 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1927, brez dodatka signalnih molekul (feniletanola in triptofola) in rezultati poteka fermentacije mošta sorte Sauvignon s čisto in združeno starter kulturo, po in brez dodatka signalnih molekul (feniletanola in triptofola). Rasti kvasovk med fermentacijo smo sledili preko merjenja optične gostote ( $OD_{650}$ ) in določanja kolonijskih enot (CFU/ml). Spremljali smo še količino sproščenega  $CO_2$ , porabo glukoze in fruktoze ter tvorbo etanola, glicerola, organskih kislin (citronske, jabolčne, ocetne, vinske) in dinamiko koncentracije feniletanola ter triptofola. Porabo sladkorjev, količino nastalih produktov presnove ter koncentracijo signalnih molekul smo določili z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC).

### 4.1 POTEK ČISTE IN ZDRUŽENE ALKOHOLNE FERMENTACIJE MOŠTA SORTE MALVAZIJA BREZ DODATKA SIGNALNIH MOLEKUL

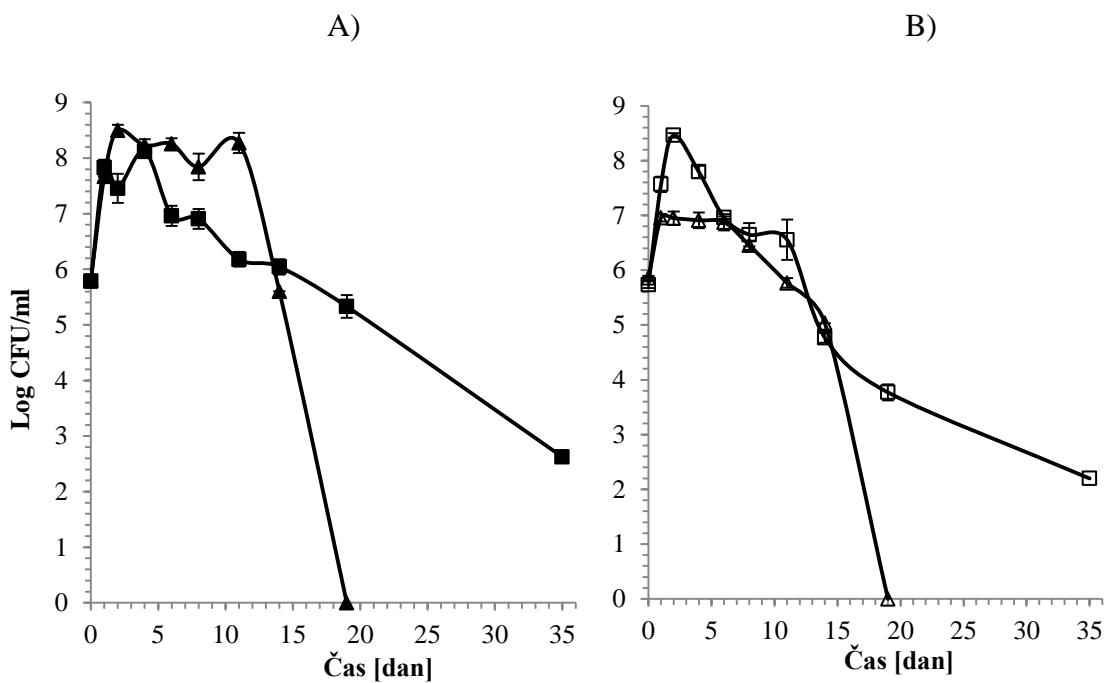
V pred-poskusu smo s spremljanjem naštetih parametrov žeeli preveriti, kakšna je razlika med dinamiko fermentacije s čisto kulturo (*C. zemplinina* ali *S. cerevisiae*) v primerjavi s fermentacijo z združenima kulturama (*C. zemplinina* in *S. cerevisiae*) ter v kakšni koncentraciji nastajata feniletanol in triptofol.

#### 4.1.1 Spremljanje rasti kvasovk med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Malvazija

Dinamiko rasti kvasovk smo med potekom čiste in združene fermentacije mošta sorte Malvazija spremljali preko merjenja ogljikovega dioksida in optične gostote ( $OD_{650}$ ) (Priloga A3) ter z določanjem števila kolonijskih enot (CFU/ml) (Slika 8).

Med fermentacijo s čistima kulturama doseže višje povprečno število CFU/mL čista kultura kvasovk *C. zemplinina*, z najvišjo točko po 48. urah fermentacije ( $3,2 \times 10^8$  CFU/ml) ter z nihajočimi vrednostmi do 14. dne ( $2,0 \times 10^8$  CFU/ml), po katerem ni bilo več vidnih kolonij na gojišču WL (Slika 8A). Število kolonijskih enot *S. cerevisiae* v čisti kulturi, doseže vrh četrti dan ( $1,9 \times 10^8$  CFU/ml) fermentacije in se postopoma zniža na približno 400 CFU/mL ob zaključku fermentacije (Slika 8A).

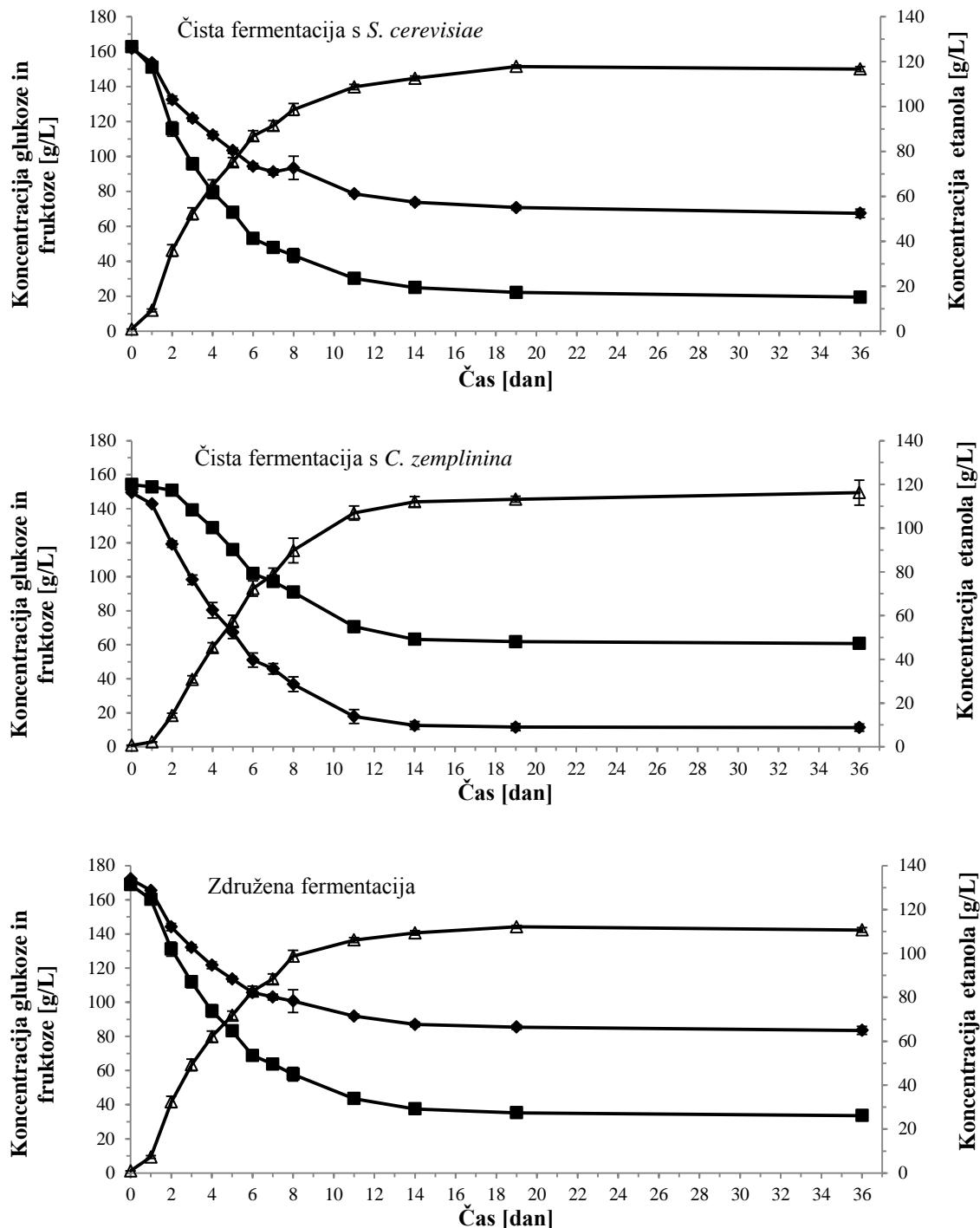
Pri združeni fermentaciji kvasovka *S. cerevisiae* doseže višje število CFU/ml kot v sami čisti kulturi in sicer z najvišjo točko po 48. urah fermentacije ( $2,9 \times 10^8$  CFU/mL), po kateri se število zniža na 170 CFU/mL ob zaključku fermentacije (Slika 8B). Število CFU/mL *C. zemplinina* v združeni kulturi doseže vrh že po 24. urah fermentacije ( $9,2 \times 10^6$  CFU/mL), vendar je njeno število v primerjavi s čisto kulturo nižje in 19. dan fermentacije ni več vidnih kolonij na gojišču WL (Slika 8B).



Slika 8: Dinamika rasti kvasovk *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 med čisto (A) in združeno (B) fermentacijo mošta sorte Malvazija ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Legenda: *C. zemplinina* —■— v čisti kulturi; *S. cerevisiae* —■— v čisti kulturi; *C. zemplinina* —▲— v združeni kulturi; *S. cerevisiae* —□— v združeni starter kulturi.

#### 4.1.2 Dinamika čiste in združene alkoholne fermentacije mošta sorte Malvazija

Na slikah spodaj je prikazana dinamika porabe glukoze in fruktoze ter tvorba etanola med 36 dnevno fermentacijo mošta sorte Malvazija s čisto in z združeno kulturo kvasovk *Candida zemplinina* ZIM 842 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1927. Poraba glukoze je bila pri fermentaciji s čisto kulturo *S. cerevisiae* večja (88,1 %) in hitrejša kot poraba fruktoze (58,3 %). Na ravno nasprotno situacijo naletimo pri fermentaciji s čisto kulturo *C. zemplinina*, ki za presnovo porabi večji delež fruktoze (92,4 %) (Preglednica 5). Pri obeh skupinah fermentorjev se je poraba obeh sladkorjev po 19. dnevu fermentacije ustalila. Pri fermentaciji z združeno kulturo je bila dinamika porabe sladkorjev bolj podobna fermentaciji s čisto kulturo *S. cerevisiae*, z nekoliko manjšim izkoristkom (Slika 9). Količina nastalega etanola na koncu fermentacije je bila pri vseh treh skupinah fermentorjev zelo podobna, čeprav se je dinamika nastajanja med fermentacijo s čisto kulturo *C. zemplinina* nekoliko razlikovala od ostalih. Iz naklona krivulj lahko sklepamo, da je bila sinteza etanola med fermentacijo s čisto kulturo *S. cerevisiae* in z združeno starter kulturo hitrejša (Slika 9). Končna koncentracija po fermentaciji s čistima kulturama je bila približno 116 g/L, po fermentaciji z združeno kulturo pa 110,7 g/L (Slika 9).



Slika 9: Dinamika pretvorbe sladkorjev in tvorbe etanola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *S. cerevisiae* ZIM 1927 in *C. zemplinina* ZIM 842 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Legenda: glukoza ■; fruktoza ♦; etanol ▲.

Preglednica 5: Poraba sladkorjev po čisti in združeni alkoholni fermentaciji mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.

Sladkor	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulti S. cerevisiae in <i>C. zemplinina</i>	
	Poraba [g/L]	Delež [%]	Poraba [g/L]	Delež [%]	Poraba [g/L]	Delež [%]
Glukoza	143,4	88,1	93,5	60,6	135,26	80,1
Fruktoza	94,4	58,3	138,2	92,4	88,7	51,5

Poraba glukoze je bila največja med fermentacijo s čisto kulturo *S. cerevisiae* (88,1 %), sledi fermentacija z združeno kulturo (80,1 %) in najmanjša poraba pri *C. zemplinina* v čisti kulturi (60,6 %). Do najhitrejše in največje porabe fruktoze je prišlo med fermentacijo s čisto kulturo *C. zemplinina* (92,4 %), sledi fermentacija s čisto kulturo *S. cerevisiae* (58,3 %) in najmanjša poraba pri fermentaciji z združeno kulturo (51,5 %) (Preglednica 5).

#### 4.1.3 Kemijske spremembe med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija

Med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *Candida zemplinina* ZIM 842 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1927 smo spremljali tudi količino nastalega glicerola in organskih kislin (citronska, jabolčna, ocetna, vinska). Iz rezultatov lahko sklepamo, da sta si dinamiki tvorbe in porabe glicerola ter organskih kislin med čisto fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* in združeno fermentacijo bolj podobni kot v primerjavi z dinamiko med čisto fermentacijo kvasovko *C. zemplinina* (Slika 10, 11).

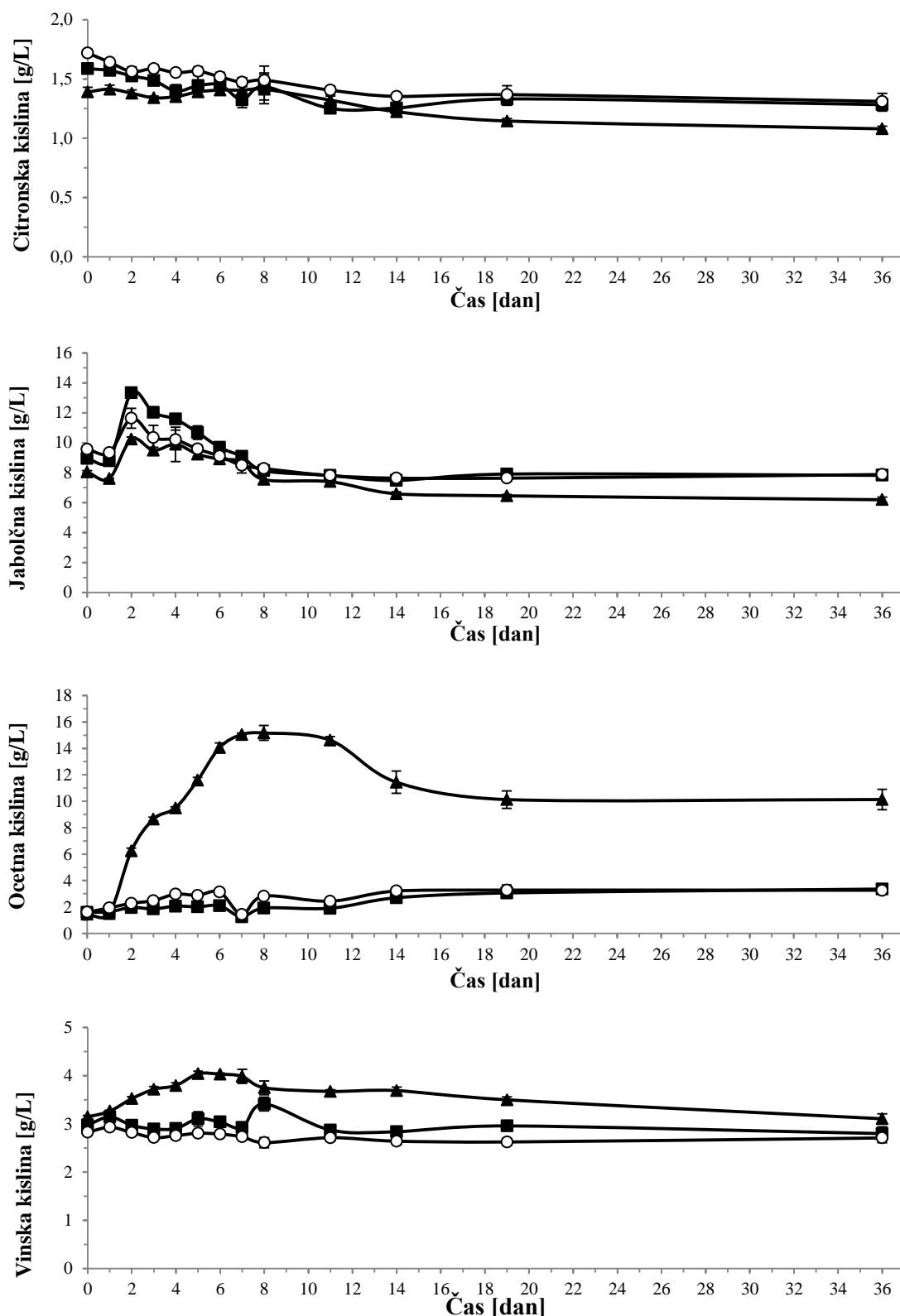
Največ glicerola je nastalo med čisto fermentacijo s kvasovko *C. zemplinina* (8,25 g/L), medtem ko sta koncentraciji nastali med čisto fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* (5,58 g/L) in med združeno fermentacijo (5,78 g/L) bolj podobni (Slika 11).

Citronska kislina je bila prisotna že v moštu in njena koncentracija se med 36 dnevno fermentacijo ni bistveno spremenjala.

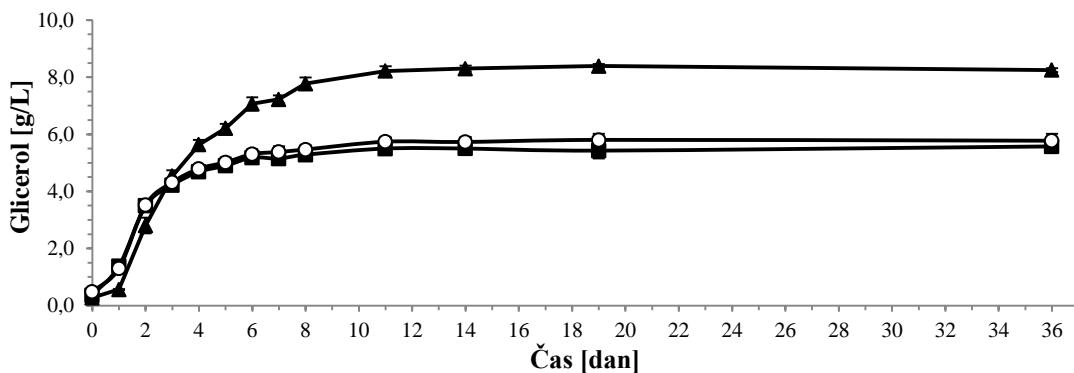
Ob spremeljanju koncentracije jabolčne kisline naletimo na podobno dinamiko med čisto in združeno fermentacijo, z najnižjo končno koncentracijo po fermentaciji s čisto kulturo *C. zemplinina* (6,2 g/L). Količina kisline po 48. urah fermentacije naraste, z najvišjo točko med fermentacijo s čisto kulturo *S. cerevisiae* (13,33 g/L). Nato postopno upada in se ustali po 14. dnevu fermentacije, na kar se njena koncentracija ne spreminja več.

Dinamika nastajanja ocetne kisline je med fermentacijo s čisto kulturo *S. cerevisiae* in med fermentacijo z združeno kulturo zelo podobna in ob koncu poskusa doseže 3,4 g/L. Vidno izstopa koncentracija ocetne kisline pri fermentaciji s čisto kulturo *C. zemplinina*, ki v najvišji točki znaša kar 15,17 g/L in ob koncu 10,1 g/L.

Tudi vinska kislina se nahaja že v samem moštu (2,82-3,14 g/L) in je njena koncentracija ob začetku in koncu fermentacije skoraj enaka. Nihanje je največje pri čisti fermentaciji s kvasovko *C. zemplinina*, ki doseže vrh 5. dan fermentacije (4,04 g/L).



Slika 10: Dinamika tvorbe/porabe organskih kislin med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Legenda: *C. zemplinina* ■ v čisti kulturi; *S. cerevisiae* ▲ v čisti kulturi; kvasovki v združeni starter kulturi ○.

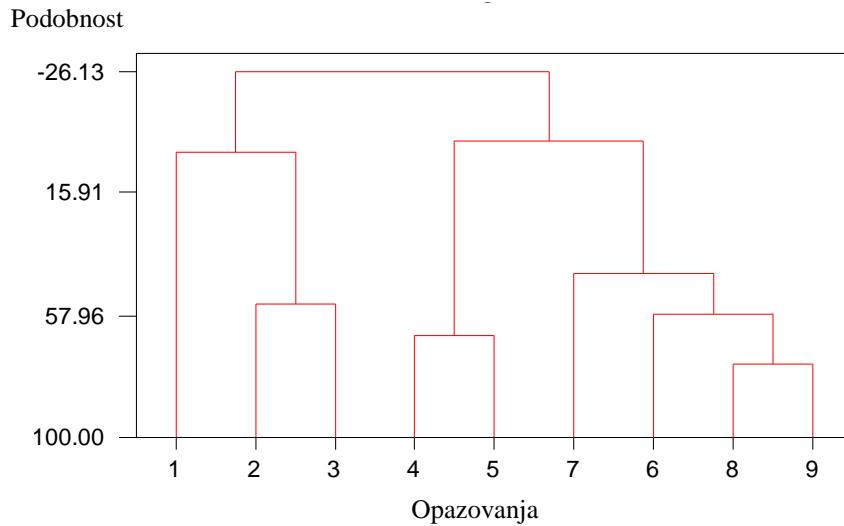


Slika 11: Dinamika tvorbe glicerola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Legenda: *C. zemplinina* ▲ v čisti kulturi; *S. cerevisiae* ■ v čisti kulturi; kvasovki v združeni starter kulturi ○.

#### 4.1.4 Primerjava aromatskega profila čiste in združene fermentacije

##### 4.1.4.1 Hierarhično grupiranje

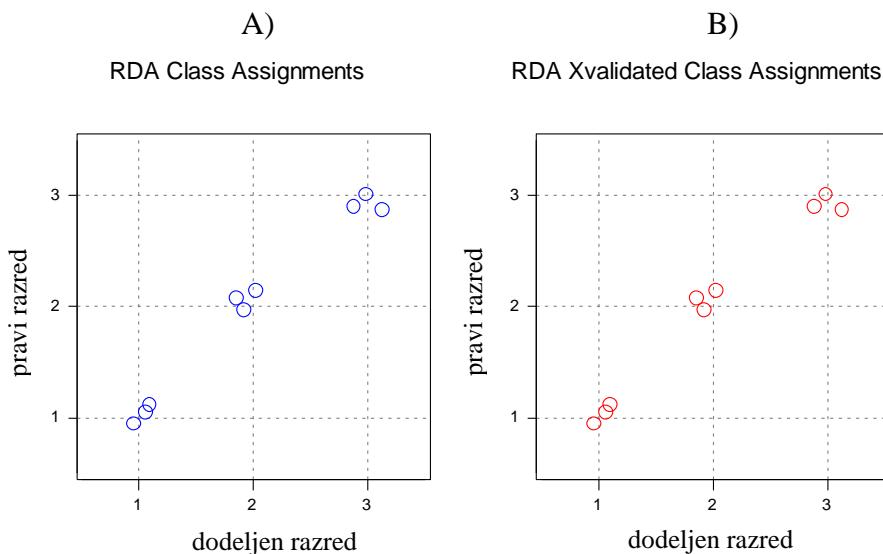
Iz rezultatov prikazanih z drevesnim diagramom lahko vidimo, da so se vzorci vina, nastalega po čisti in združeni fermentaciji razvrstili v dve glavni skupini. V eni glavnih skupin imamo podskupino z vzorci po čisti fermentaciji s kvasovko *Candida zemplinina* ZIM 842 (1, 2, 3) in drugi glavni skupini pa podskupino z vzorci po čisti fermentaciji s kvasovko *S. cerevisiae* ZIM 1927 (4, 5) in podskupino vzorcev po združeni fermentaciji (7, 8, 9). Čeprav je vzorec številka 6 nastal po čisti fermentaciji s *S. cerevisiae*, se nahaja v podskupini z vzorci po združeni fermentaciji (Slika 12). Takšna razporeditev je verjetno posledica tehnične napake, do katere je prišlo zaradi izgube volumna mošta, v 24. urah po začetku fermentacije. Vzorci na dendrogramu so razporejeni glede na odstotek medsebojne podobnosti, katere merilo je na navpični osi. Iz analize aromatskega profila lahko sklepamo, da izbira seva za fermentacijo ključno vpliva na aroma končnega produkta fermentacije.



Slika 12: Dendrogram podobnosti med aromatskimi profili končnih proizvodov po čisti in združeni fermentaciji mošta sorte Malvazija. Zaporednim številкам 1, 2, 3, pripada končni produkt fermentacije s čisto kulturo *C. zemplinina* ZIM 842, številkom 3, 4, 5, produkt fermentacije s čisto kulturo *S. cerevisiae* ZIM 1927 in številkom 6, 7, 8, produkt fermentacije z združenima kulturama.

#### 4.1.4.2 Regularizirana diskriminatna analiza

Z regularizirano diskriminantno analizo (RDA) lahko poudarimo razlike med predhodno definiranimi skupinami vzorcev in postavimo šablon za umestitev neznanih vzorcev. Iz razporeditve devetih vzorcev, treh skupin fermentorjev je razvidno, da znotraj določene skupine ni odstopanj (Slika 13).

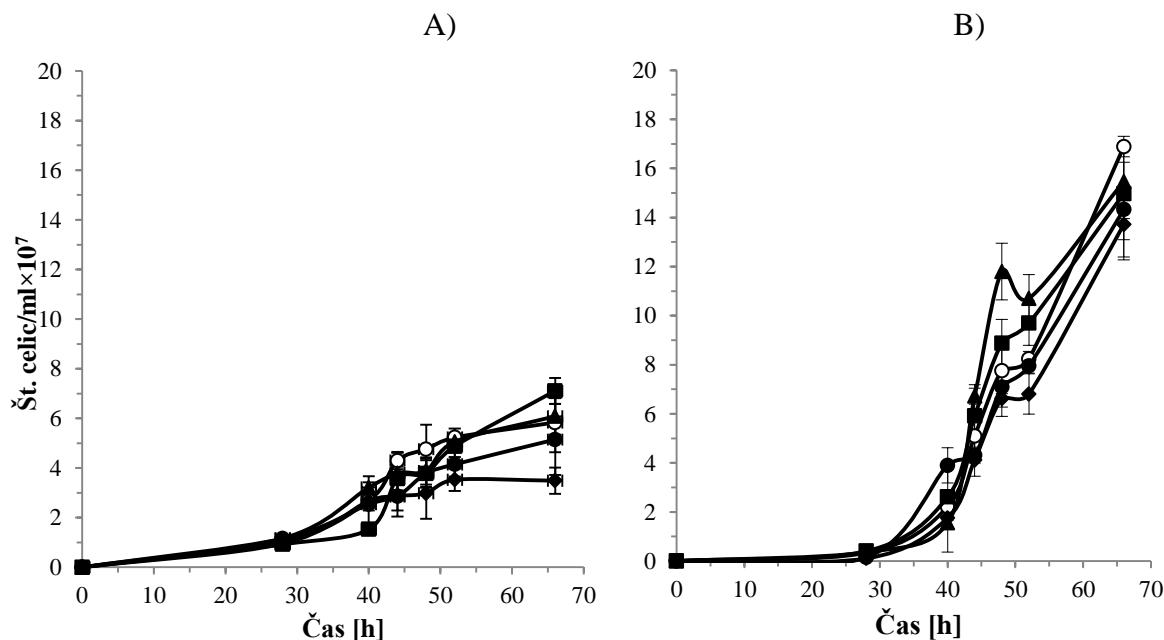


Slika 13: Razvrstitev devetih vzorcev končnega proizvoda po čisti in združeni fermentaciji mošta sorte Malvazija, na osnovi izračunane matrice RDA (A) in rezultati ocenjevanja matrice (B).

#### 4.2 VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ FENILETANOLA IN TRIPTOFOLA NA ŽIVOST CELIC

S ciljem ugotoviti vpliv različnih koncentracij signalnih molekul na potek fermentacije s čistima in z združenima kulturama *Candida zemplinina* ZIM 842 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1927, smo morali najprej določiti najbolj primerno končno koncentracijo feniletanola in triptofola. Preverili smo učinek različnih koncentracij na živost celic *C. zemplinina* in *S. cerevisiae* med mini-fermentacijo.

Poskus je zaradi lažje izvedljivosti potekal v mikrocentrifugirkah in sicer v štirih ponovitvah za posamezno koncentracijo dodanih signalnih molekul. Ob vsakem vzorčenju smo določali število celic/ml s štetjem pod mikroskopom. Iz dobljenih rezultatov smo sklepal, da feniletanol in triptofol niti v 1000 µM koncentraciji, ne vplivata statistično značilno na živost celic. Kljub temu lahko opazimo, da je število celic kvasovke *C. zemplinina* večje (Slika 14B) kot število celic *S. cerevisiae* (Slika 14A), vendar med rastnima krivuljama dinamikami števila celic po dodatku različnih koncentracij signalnih molekul, ni bilo statistično značilnih razlik. Na podlagi ugotovitev smo se odločili, da bomo pri poskusu uporabili 1000 µM končno koncentracijo feniletanola in triptofola.



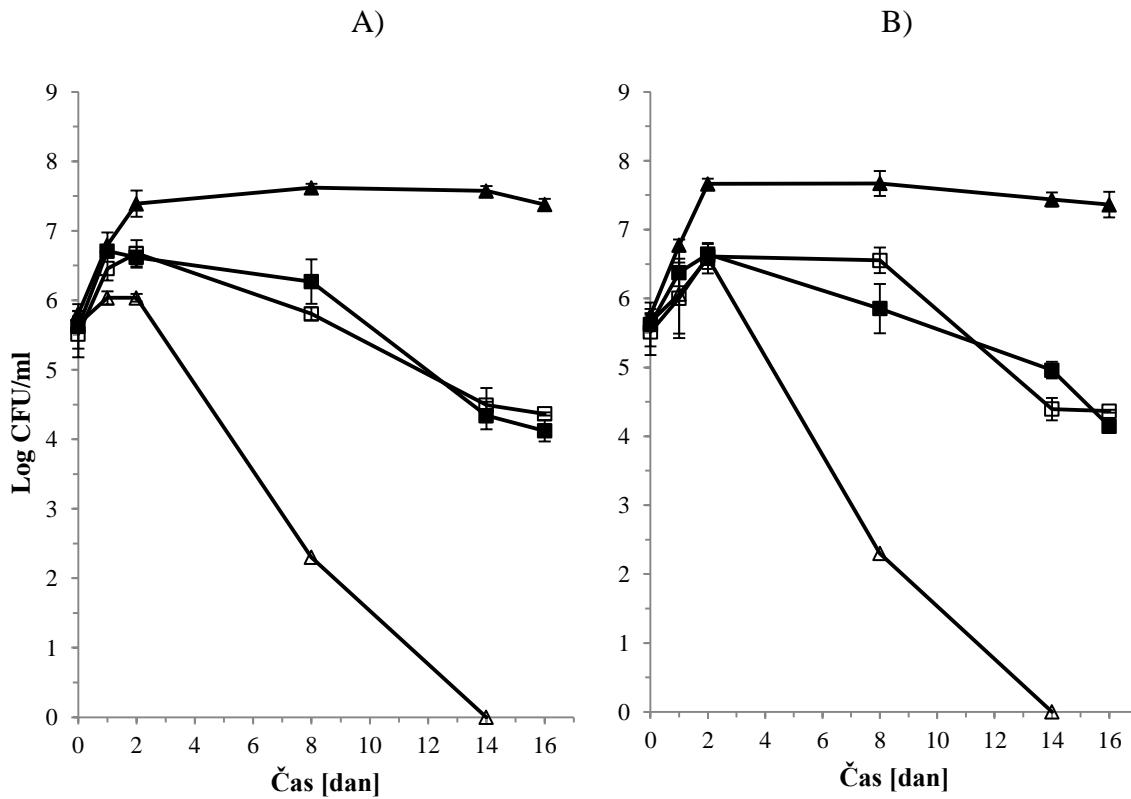
Slika 14: Rastne krivulje celic *S. cerevisiae* ZIM 1927 (A) in *C. zemplinina* ZIM 842 (B) med 66 urno fermentacijo mošta sorte Mavazija, po dodatku feniletanola in triptofola v koncentracijah 0 µM (○), 350 µM (■), 500 µM (▲), 750 µM (●) in 1000 µM (◆).

#### 4.3 POTEK ČISTE IN ZDRUŽENE ALKOHOLNE FERMENTACIJE MOŠTA SORTE SAUVIGNON

Znano je, da sta feniletanol in triptofol signalni molekuli, ki posredujeta preklop morfologije celic *S. cerevisiae* iz kvasne v nitasto obliko rasti, mi pa smo želeli preveriti, ali imata vpliv tudi na dinamiko poteka čiste in združene alkoholne fermentacije. Aromatska alkohola smo pred začetkom poteka čiste in združene fermentacije mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 dodali v končni koncentraciji 1000 µM. Prikazane so povprečne vrednosti treh neodvisnih ponovitev skupine fermentorjev po in brez dodatka feniletanola in triptofola. Dinamiko fermentacije smo spremļjali preko enakih parametrov kot v pred-poskusu.

##### 4.3.1 Spremljanje rasti kvasovk med čisto in združeno alkoholno fermentacijo po/brez dodatka feniletanola in triptofola

Dinamiko rasti starter kultur med čisto in združeno fermentacijo po (Slika 15B) in brez (Slika 15A) dodatka feniletanola in triptofola v končni koncentraciji 1000 µM, smo spremļjali s primerjavo rastnih krivulj, ki smo jih pridobili preko določanja števila kolonijskih enot (CFU/ml) (Priloga C2, C3).



Slika 15: Rastne krivulje kvasovk *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 med alkoholno fermentacijo mošta sorte Sauvignon ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Prikazane so povprečne vrednosti brez (A) in po dodatku feniletanola in triptofola v koncentraciji 1000 µM. Legenda: *C. zemplinina* ■ v čisti kulturi; *S. cerevisiae* ■ v združeni kulturi; *C. zemplinina* ▲ v združeni kulturi; *S. cerevisiae* □ v združeni kulturi.

Pri čistih fermentacijah po dodatku feniletanola in triptofola je število kolonijskih enot *C. zemplinina* doseglo vrh osmi dan ( $5,0 \times 10^7$  CFU/ml), čista kultura *S. cerevisiae* pa je najvišjo vrednost dosegla že po 48. urah fermentacije ( $4,4 \times 10^6$  CFU/ml). Ob koncu čiste fermentacije je bilo kvasovk vrste *C. zemplinina* še  $2,5 \times 10^7$  CFU/ml, kvasovk *S. cerevisiae* pa  $1,4 \times 10^4$  CFU/mL (Slika 15B). Pri združeni fermentaciji po dodatku feniletanola in triptofola je število kolonijskih enot *S. cerevisiae* doseglo vrh po 48. urah ( $4,33 \times 10^6$  CFU/mL), kar je zelo podobno dinamiki števila kolonijskih enot kvasovke *C. zemplinina* v združeni kulturi ( $4,3 \times 10^6$  CFU/mL) (Slika 15B). Pri vseh kombinacijah fermentorjev je vidna rast kolonij tudi ob koncu fermentacije, z izjemo seva *C. zemplinina* ZIM 842 v združeni fermentaciji, med katero po 14. dnevu na gojišču ni bilo več vidnih kolonij (Slika 15).

Dinamiki čiste in združene fermentacije po in brez dodatka feniletanola in triptofola sta si zelo podobni. Pri čisti fermentaciji kontrolne skupine doseže večje število kolonijskih enot prav tako kvasovka *C. zemplinina* ( $4,18 \times 10^7$  CFU/ml) in sicer osmi dan fermentacije, nato pa začne število upadati do  $2,42 \times 10^7$  CFU/mL ob koncu poskusa. Število kolonijskih enot *S. cerevisiae* v čisti kulturi je bilo najvišje po 24. urah in sicer  $5,19 \times 10^6$  CFU/mL (Slika 15A). V združeni kulturi se situacija obrne in večje število kolonijskih enot doseže *S. cerevisiae*  $5,1 \times 10^6$  CFU/mL, *C. zemplinina* pa največ  $1,1 \times 10^6$  CFU/mL, po prvem dnevu fermentacije. Število celic pri *C. zemplinina* v združeni kulturi po 48. urah strmo pada in po 14. dnevu na gojišču ni več vidnih kolonij (Slika 15A).

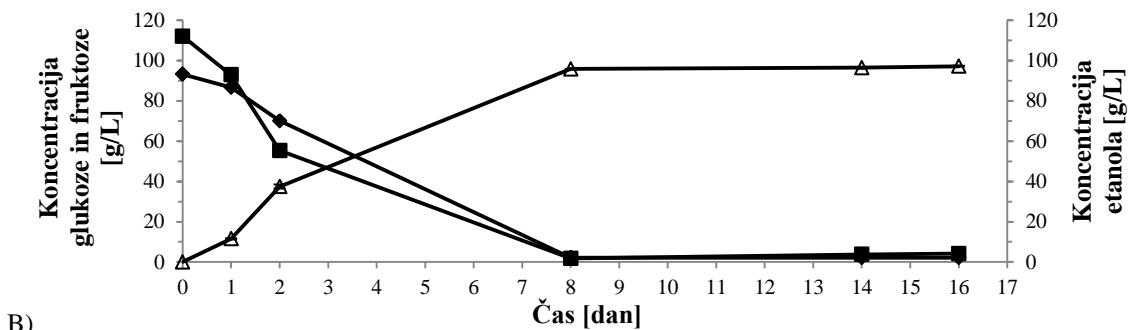
#### **4.3.2 Dinamika čiste in združene fermentacije po/brez dodatka feniletanola in triptofola**

Vzorce odvzete neposredno po nacepitvi mošta, v sredini eksponentne faze rasti, na začetku in sredini stacionarne faze ter ob zaključku fermentacije smo analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Pridobljeni rezultati nam ponazarjajo dinamiko poteka čiste in združene fermentacije s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 in morebitne razlike med fermentacijami po in brez dodatka feniletanola in triptofola. Prikazane so povprečne vrednosti treh neodvisnih ponovitev, po in brez dodatka feniletanola in triptofola v končni koncentraciji 1000 µM.

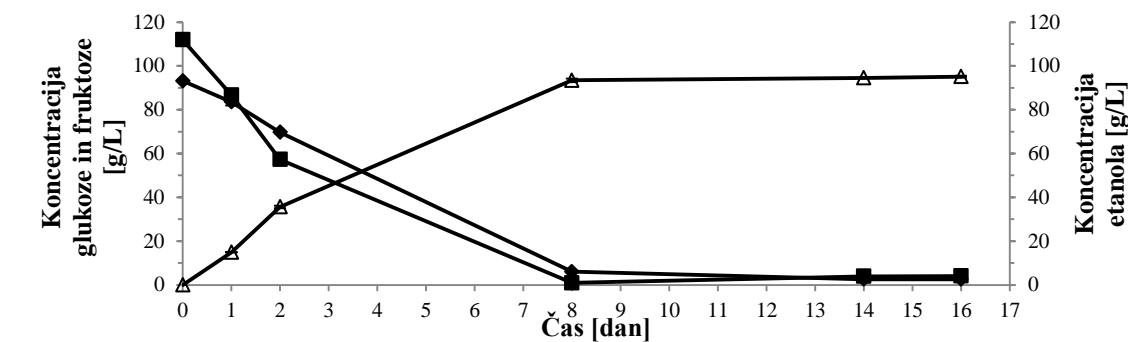
Med dinamikami porabe sladkorjev in tvorbe etanola brez (Slika 16B, 17B, 18B) in po (Slika 16A, 17A, 18A) dodatku feniletanola in triptofola, ni statistično značilnih razlik. Pri obeh skupinah fermentorjev je bila poraba glukoze največja med fermentacijo s čisto kulturo *S. cerevisiae* ter z združeno kulturo *S. cerevisiae* in *C. zemplinina* (96 %) (Preglednica 6, 7). Iz naklona premice lahko sklepamo, da je bila pri obeh poraba najhitrejša v prvih dneh fermentacije, nato naklon nekoliko upade do osmega dne, ko so kvasovke že porabile ves razpoložljivi sladkor (Slika 16, 18).

Dinamika porabe sladkorjev in tvorbe etanola med fermentacijo mošta sorte Sauvignon s čistima in združenima kulturama *C. zemplinina* in *S. cerevisiae* brez dodatka feniletanola in triptofola (Slika 16A, 17A, 18A) je primerljiva z dinamiko fermentacije mošta sorte Malvazija (Slika 9).

A)

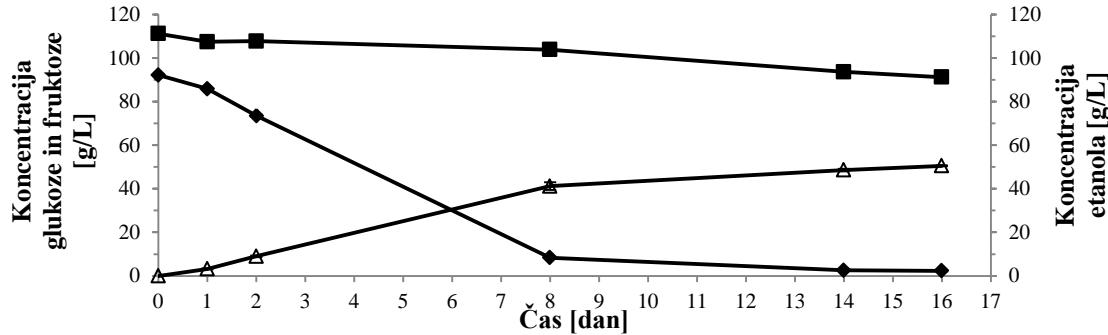


B)

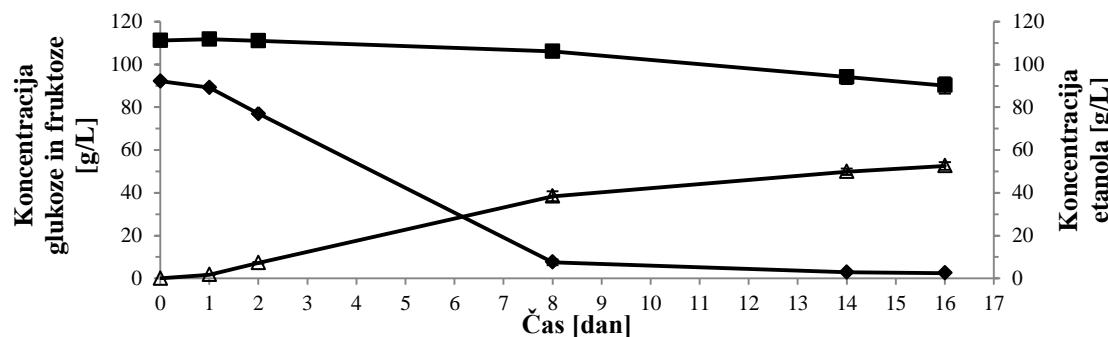


Slika 16: Dinamika pretvorbe sladkorjev in tvorbe etanola med čisto fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovko *S. cerevisiae* ZIM 1927 brez (A) in po (B) dodatku feniletanola in triptofola ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Legenda: glukoza ■; fruktoza ♦; etanol ▲.

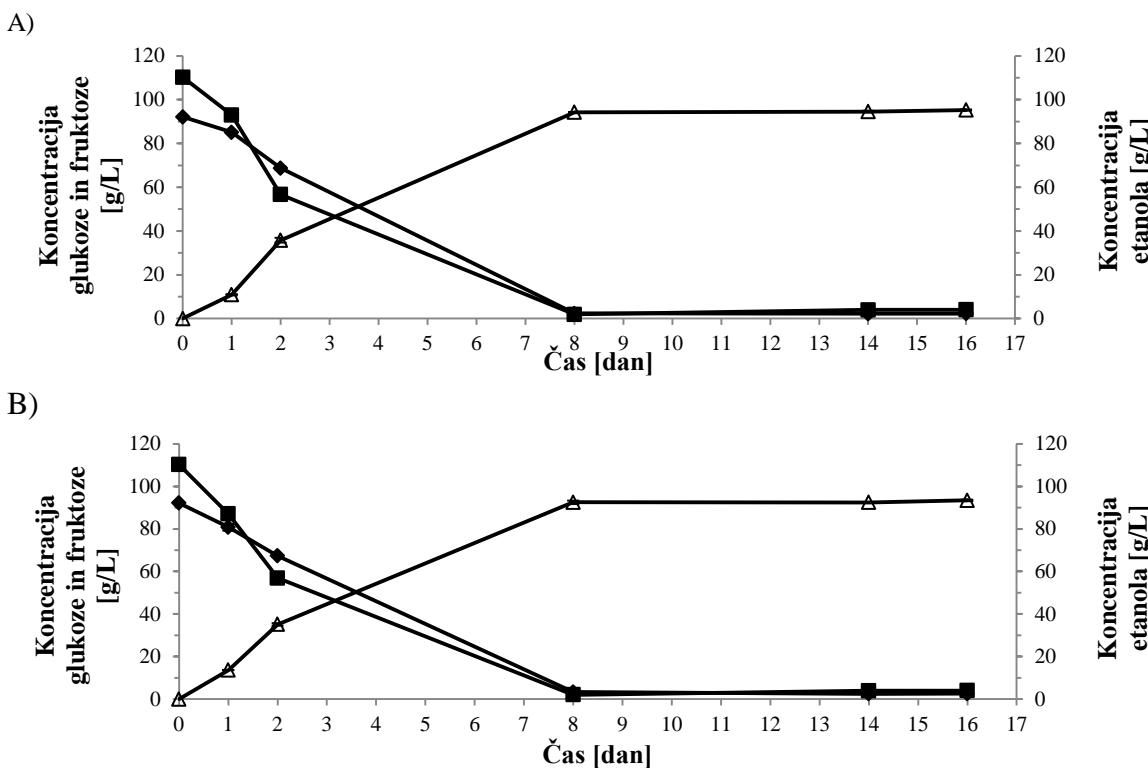
A)



B)



Slika 17: Dinamika pretvorbe sladkorjev in tvorbe etanola med čisto fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovko *C. zemplinina* ZIM 842 brez (A) in po (B) dodatku feniletanola in triptofola ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Legenda: glukoza ■; fruktoza ♦; etanol ▲.



Slika 18: Dinamika pretvorbe sladkorjev in tvorbe etanola med združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 brez (A) in po (B) dodatku feniletanola in triptofola ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Legenda: glukoza ■; fruktoza ♦; etanol ▲.

Preglednica 6: Poraba sladkorjev po čisti in združeni alkoholni fermentaciji mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 brez dodatka feniletanola in triptofola.

Sladkor	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>	
	Poraba [g/L]	Delež [%]	Poraba [g/L]	Delež [%]	Poraba [g/L]	Delež [%]
Glukoza	107,82	96,3	21,03	18,9	106,19	96,3
Fruktoza	91,0	97,6	89,6	97,3	89,8	97,5

Preglednica 7: Poraba sladkorjev po čisti in združeni alkoholni fermentaciji mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 po dodatku feniletanola in triptofola v koncentraciji 1000  $\mu\text{M}$ .

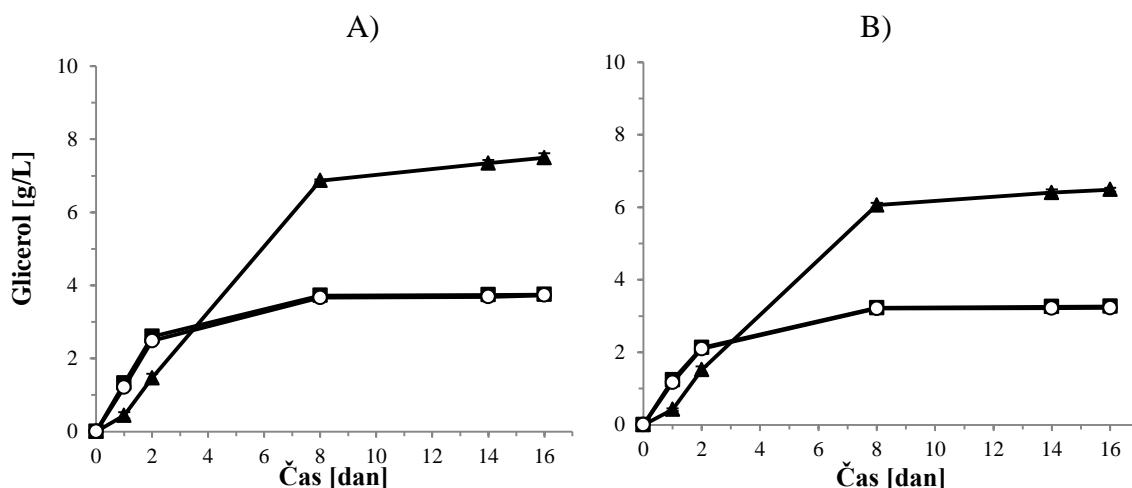
Sladkor	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>	
	Poraba [g/L]	Delež [%]	Poraba [g/L]	Delež [%]	Poraba [g/L]	Delež [%]
Glukoza	107,94	96,4	19,95	17,9	106,31	96,4
Fruktoza	90,6	97,2	89,8	97,5	89,6	97,2

Povprečne vrednosti nastalega etanola se pri skupini po dodatku feniletanola in triptofola, razlikujejo zgolj za 2 g/L več produkta kot pri skupini brez dodatka feniletanola in triptofola. Največ etanola nastane med fermentacijo s čisto kulturo *S. cerevisiae* in združeno kulturo *S. cerevisiae* in *C. zemplinina* (95-97 g/L), opazno manj pa med fermentacijo s čisto kulturo *C. zemplinina* (50-52 g/L). Nastajanje etanola se pri čisti kulturi *S. cerevisiae* (Slika 17) in združeni kulturi (Slika 19) po osmem dnevu fermentacije umiri, pri fermentaciji s čisto kulturo *C. zemplinina* pa do konca poskusa še raste (Slika 18).

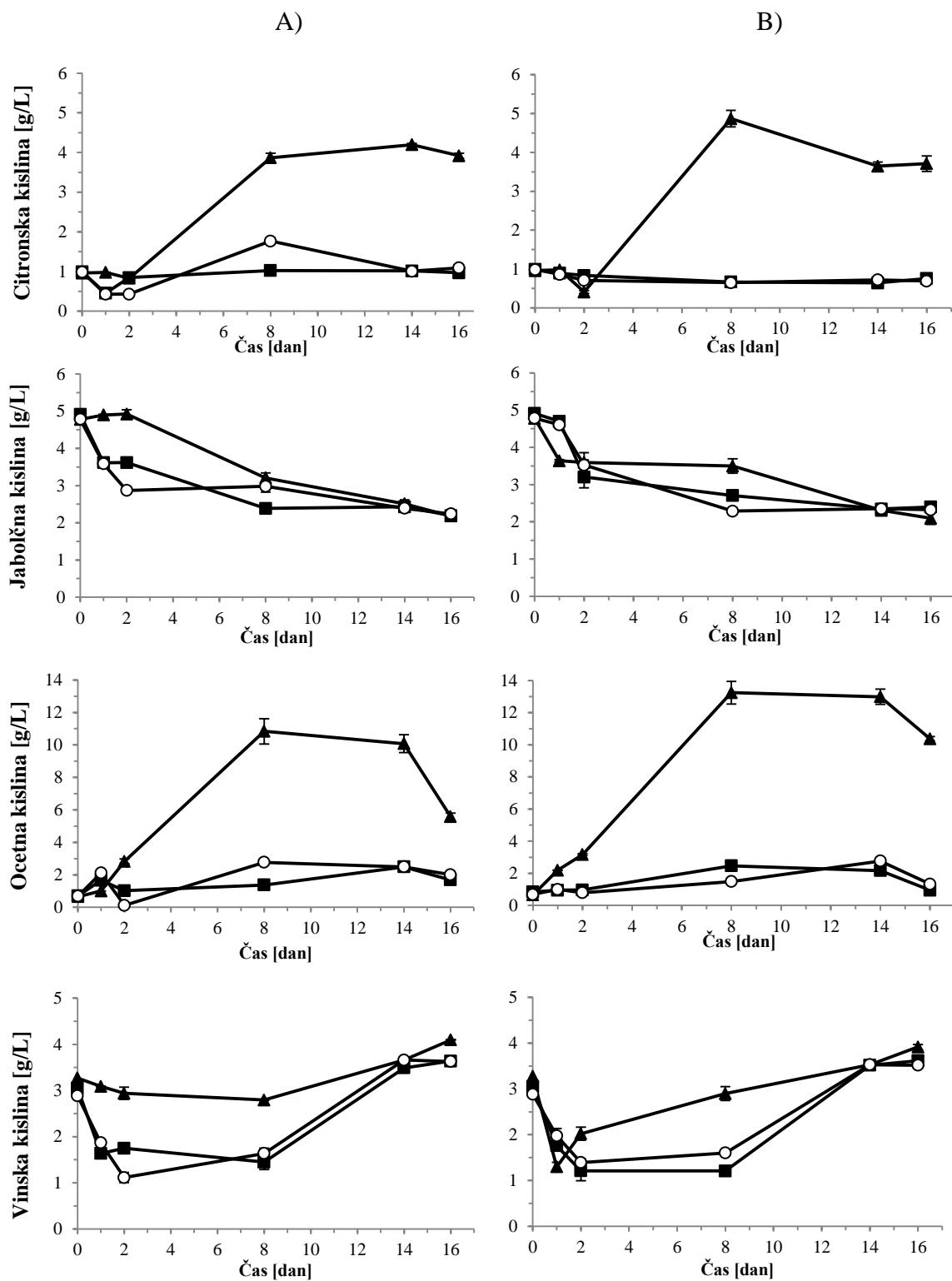
#### 4.3.3 Kemijske spremembe med čisto in združeno fermentacijo po/brez dodatka feniletanola in triptofola

Da bi ugotovili, ali ima dodatek feniletanola in triptofola kakšen vpliv na dinamiko poteka fermentacije, smo s pomočjo analize HPLC spremljali tvorbo/porabo glicerola in organskih kislin (citronska, jabolčna, ocetna, vinska).

Največ glicerola je nastalo med fermentacijo s čisto kulturo kvasovke *C. zemplinina* ZIM 842 (7,50 g/L) brez dodatka signalnih molekul. Sledita ji koncentraciji, nastali med fermentacijo z združeno kulturo in s čisto kulturo *S. cerevisiae* ZIM 1927 (3,7 g/L) (Slika 19A). Pri fermentaciji po dodatku signalnih molekul je količina nastalega glicerola prav tako največja pri čisti kulturi *C. zemplinina* (6,5 g/L), sledita ji čista kultura *S. cerevisiae* in združena kultura (3,3 g/L) (Slika 19B).



Slika 19: Dinamika tvorbe glicerola med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927. Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk, brez (A) in po dodatu (B) feniletanola in triptofola. Legenda: *C. zemplinina* ▲ v čisti kulturi; *S. cerevisiae* ■ v čisti kulturi; kvasovki v združeni starter kulturi ○.



Slika 20: Dinamika tvorbe/porabe organskih kislin med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 brez (A) in po (B) dodatku feniletanola in triptofola. Legenda: *C. zemplinina* ▲ v čisti kulturi; *S. cerevisiae* ■ v čisti kulturi; kvasovki v združeni starter kulturi ○.

Dinamika količine citronske kisline se med skupinama fermentorjev po in brez dodatka feniletanola in triptofola nekoliko razlikuje, vendar je pri obeh največji producent kisline kvasovka *C. zemplinina* v čisti kulturi. Med vrednostmi nastale citronske kisline med čisto fermentacijo s kvasovko *C. zemplinina* po (3,7 g/L) in brez (3,9 g/L) dodatka feniletanola in triptofola ni statistično značilnih razlik. Gre le za nekoliko drugačno dinamiko, saj med fermentacijo po dodatku signalnih molekul pri *C. zemplinina* do osmega dne vidimo večji porast, kot pri kontrolni skupini. Najhitrejši vzpon vidimo v prvih osmih dneh fermentacije in le minimalen porast do zaključka fermentacije. (4,9 g/L), kateremu sledi padec (3,7 g/L). Krivulji *S. cerevisiae* in združene kulture potekata skoraj enako, brez večjih sprememb od začetnega stanja (Slika 20).

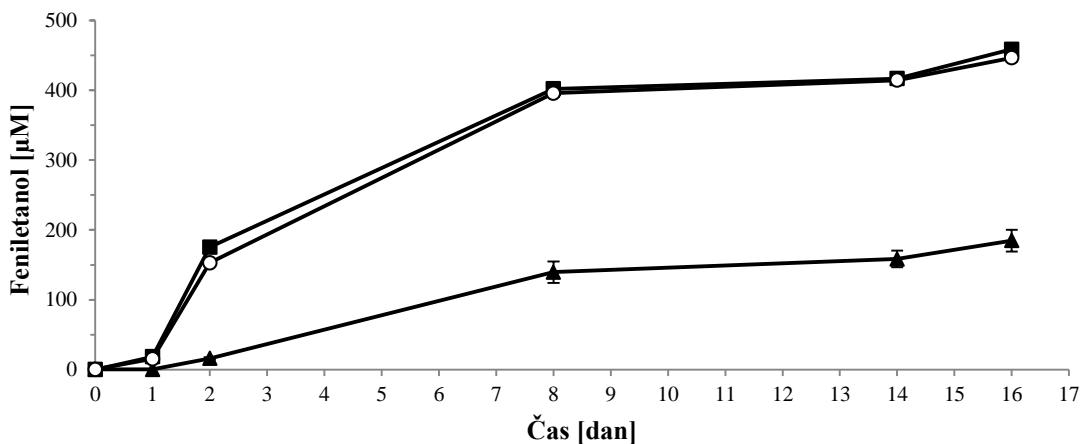
Skupini fermentorjev po in brez dodatka signalnih molekul sta se razlikovali tudi v tvorbi ocetne kisline. Največ ocetne kisline je nastalo med čisto fermentacijo s kvasovko *C. zemplinina* ZIM 842 po dodatku feniletanola in triptofola (10,4 g/L). Čeprav sta dinamiki skupine po in brez dodatka feniletanola in triptofola podobni, je med čisto fermentacijo s kvasovko *C. zemplinina* brez dodatka signalnih molekul nastalo skoraj za polovico manj ocetne kisline (5,6 g/L). Pri obeh količina kisline do osmega dne strmo narašča, nato rahlo upade do 14 dne, čemur sledi nagel padec do 16 dne. Med čisto fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* po dodatku feniletanola in triptofola nastane 0,9 g/L kisline, po združeni fermentaciji pa 1,3 g/L. Vrednosti in dinamika so zelo podobne poteku fermentacije brez dodatka signalnih molekul, pri kateri nastane med čisto fermentaciji s *S. cerevisiae* 1,7 g/L in med združeno fermentacijo 2,0 g/L kisline.

Količina v mediju prisotne jabolčne kisline se pri vseh skupinah fermentorjev med fermentacijo zmanjša. Med čisto in združeno fermentacijo po dodatku feniletanola in triptofola, pride do naglega padca količine jabolčne kisline že po 48. urah fermentacije. Do konca fermentacije količina še rahlo upade, najhitreje pri združeni kulturi, najnižjo vrednost kisline ob koncu poskusa pa ima produkt čiste fermentacije s kvasovko *C. zemplinina* (2,0 g/L). Med fermentacijo brez dodatka feniletanola in triptofola imamo nekoliko drugačno dinamiko, vendar so končne vrednosti podobne kot po fermentaciji po dodatku signalnih molekul (2,2 g/L)

Nekaj vinske kisline je prisotne že v moštu (1,3-2 g/L) in se po fermentaciji njena količina poveča (3,5-4,1 g/L). Kljub temu, da je njena količina ob koncu fermentacije pri vseh fermentorjih zelo podobna, je dinamika tvorbe/porabe med potekom fermentacije skupine po in brez dodatka signalnih molekul nekoliko drugačna.

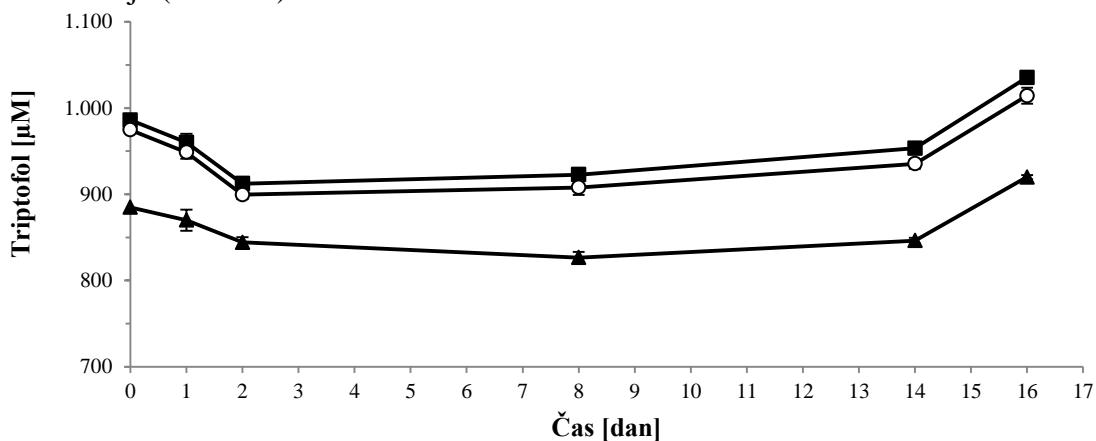
#### **4.3.4 Dinamika tvorbe signalnih molekul med čisto in združeno fermentacijo po/brez dodatka feniletanola in triptofola**

Med potekom alkoholne fermentacije smo pri obeh skupinah fermentorjev spremljali tudi dinamiko tvorbe feniletanola in triptofola. Za skupino brez dodatka feniletanola in triptofola so rezultati prikazani samo za feniletanol, saj je bila koncentracija triptofola pod mejo zaznavnosti.



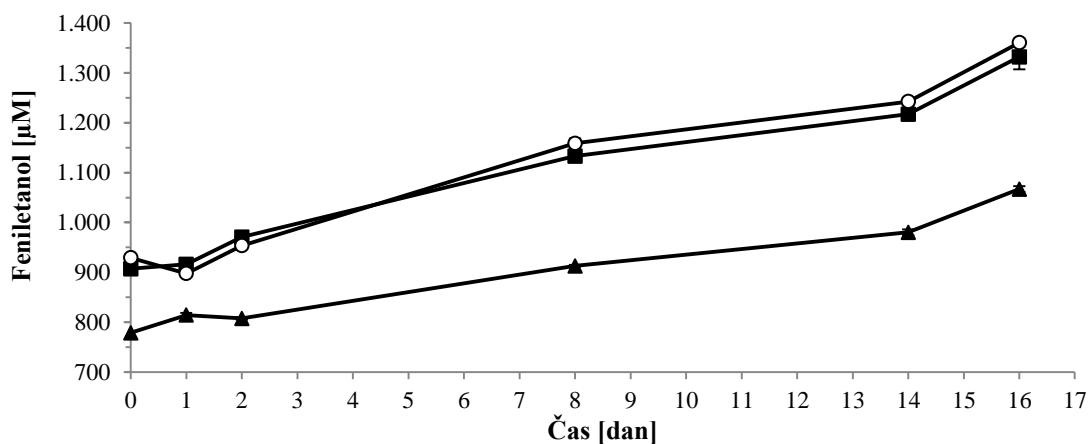
Slika 21: Dinamika tvorbe feniletanola med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 brez dodatka feniletanola in triptofola. Legenda: *C. zemplinina* ▲ v čisti kulturi; *S. cerevisiae* ■ v čisti kulturi; kvasovki v združeni starter kulturi ○.

V kontrolni skupini, brez dodatka signalnih molekul, je bila količina nastalega feniletanola najnižja po fermentaciji s čisto kulturo *C. zemplinina* ( $185 \mu\text{M}$ ). Trend nastajanja feniletanola med čisto fermentacijo s kvasovko *S. cerevisiae* in med združeno fermentacijo je zelo podoben in koncentracija ob koncu poskusa znaša  $446-458 \mu\text{M}$ . Tudi naklon premice je pri temu dvema skupinama fermentorjev največji, predvsem do drugega dne, nato pa nekoliko manjši do osmega dne fermentacije. Od 8. do 14. dne se količina feniletanola ne spremeni veliko, vendar je do zaključka poskusa sledil še en rahel dvig koncentracije (Slika 21).



Slika 22: Dinamika koncentracije triptofola med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 po dodatku feniletanola in triptofola. Legenda: *C. zemplinina* ▲ v čisti kulturi; *S. cerevisiae* ■ v čisti kulturi; kvasovki v združeni starter kulturi ○.

Dinamika spreminjanja koncentracije triptofola po dodatku feniletanola in triptofola je pri vseh fermentorjih enaka. Do drugega dne po začetku fermentacije s čisto kulturo *S. cerevisiae* in združeno kulturo, koncentracija dodanega triptofola pada za približno 75 µM. Po drugem dnevu koncentracija rahlo narašča in se po 14 dnevih zopet hitro povzpne. Pri fermentaciji s čisto kulturo *C. zemplinina* je padec nekoliko manjši (40 µM), vendar ne smemo spregledati, da je bila tudi začetna koncentracija precej nižja od predvidene. Ob koncu poskusa znaša koncentracija v mediju s čisto kulturo *S. cerevisiae* 1035 µM, s čisto kulturo *C. zemplinina* 920 µM, po fermentaciji z združeno kulturo pa 1014 µM (Slika 22).



Slika 23: Dinamika koncentracije feniletanola med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 po dodatku feniletanola in triptofola. Legenda: *C. zemplinina* ZIM 842 ■ v čisti kulturi; *S. cerevisiae* ZIM 1927 ■ v čisti kulturi; kvasovki v združeni starter kulturi ○.

Tudi dinamika spreminjanja koncentracije feniletanola po dodatku feniletanola in triptofola je med fermentorji podobna. Po 24. urah koncentracija sicer nekoliko upade, vendar po drugem dnevu samo narašča. Viden je porast z večjim naklonom med 14. in 16. dnem fermentacije. Ob koncu poskusa znaša koncentracija feniletanola po fermentaciji s čisto kulturo *S. cerevisiae* 1332 µM, s čisto kulturo *C. zemplinina* 1067 µM, po fermentaciji z združeno kulturo pa 1360 µM (Slika 23).

#### 4.3.5 Določanje količine asimilirajočega dušika v moštu

Količino asimilirajočega dušika v vzorcu mošta sorte Sauvignon smo določili s titracijsko metodo, pri kateri smo količino asimilirajočega dušika izračunali s pomočjo dobljenega volumena NaOH, ki smo ga potrebovali za nevtralizacijo vzorca po dodatku formaldehida. Dobljeni volumen NaOH je znašal 4,15 mL in smo po enačbi 6 izračunali, da je v moštu 116 mg/L asimilirajočega dušika.

$$YAN \left( \frac{mgN}{L} \right) = mL \text{NaOH} \times 28 = 4,15 \times 28 = 116,2 \left( \frac{mgN}{L} \right)$$

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Po ugotovitvi, da nekatere naravno prisotne kvasovke najdemo tudi v kasnejših fazah fermentacije mošta, se je ponudila možnost uporabe združenih starter kultur (Romano in sod., 2003; Ciani in Comitini, 2006; Andorrà in sod., 2010b). Prednost pred fermentacijo s čisto kulturo je predvsem vpliv ne-*Saccharomyces* kvasovk na izboljšanje kemijske sestave in s tem senzoričnih lastnosti vina ter uspešen zaključek fermentacije s kvasovkami rodu *Saccharomyces* (Romano in sod., 2003; Ciani in Comitini., 2006; Jolly in sod., 2006; Ciani, 2010). Kljub pozitivnemu vplivu med združeno fermentacijo nastalih metabolitov na senzorične lastnosti vina, obstajajo zadržki pri uvedbi takšnega načina pridelave v prakso. Glavna dejavnika sta predvsem hitrost fermentacije, ki se ob prisotnosti druge vrste lahko upočasni in stranski produkti, ki imajo lahko neželen vpliv na okus ter aroma vina (Erten, 2002; Fleet, 2003; Jolly in sod., 2003; Ciani in sod., 2006; Domizio in sod., 2007; Viana in sod., 2008; Ciani in sod., 2010). Ciani in sod. (2010) ter Mendoza in sod. (2007) so poudarili pomembnost vzajemnega delovanja kvasovk pri združeni fermentaciji, saj naj bi interakcije med celicami vplivale tako na živost ne-*Saccharomyces* vrst, kakor tudi na dinamiko rasti sevov *S. cerevisiae*. Čeprav je zaznavanje celične gostote poznan mehanizem celičnega komuniciranja tudi pri kvasovkah, njegova povezava z mikrobiologijo vina še ni bila natančno opredeljena (Fleet, 2003). Chen in Fink (2006) sta pri *S. cerevisiae* opisala pot zaznavanja celične gostote, ki nastane kot odziv na pomanjkanje vira dušika v okolju in vodi do spremembe morfologije celic. Gre za signal posredovan s signalnima molekulama feniletanolom in triptofolom (Chen in Fink, 2006). Z raziskovalnim delom smo žeeli preveriti vlogo feniletanola in triptofola pri dinamiki fermentacije z izbranim sevoma *Candida zemplinina* in *Saccharomyces cerevisiae* v čisti in v združeni kulturi. Preizkusili smo tudi njun vpliv na živost celic. Zanimalo nas je, ali obstajajo razlike med aromatskima profiloma končnih produktov čiste in združene fermentacije.

### 5.1 VPLIV RAZLIČNIH KONCENTRACIJ FENILETANOLA IN TRIPTOFOLA NA ŽIVOST CELIC

Osnovna aroma vina se razvije med alkoholno fermentacijo, pri kateri pride do nastanka aromatičnih spojin, med katere sodijo tudi višji alkoholi. Slednje delimo na alifatske in aromatske, ki v koncentraciji pod 300 g/L pozitivno vplivajo na kompleksnost in senzorične lastnosti vina (Mateo in sod., 2001). Pred poskusom smo izvedli manjši poskus, s katerim smo preverili vpliv različnih koncentracij feniletanola in triptofola na zaviranje rasti celic kvasovk *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927.

Na Sliki 14A vidimo, da nobena izbrana koncentracija feniletanola in triptofola (350 µM, 500 µM, 750 µM, 1000 µM), nima statistično značilnega vpliva na živost in rast celic *S. cerevisiae*. Enako lahko sklepamo tudi iz rezultatov pridobljenih med fermentacijo s *C. zemplinina* (Slika 14B). Na osnovi teh rezultatov, smo pred čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon dodali feniletanol in triptofol do končne koncentracije 1000 µM.

## 5.2 DINAMIKA ČISTE IN ZDRUŽENE ALKOHOLNE FERMENTACIJE

Glavni del poskusa je bil sestavljen iz dveh skupin fermentacij, ki sta se razlikovali po dodatku signalnih molekul feniletanola in triptofola. V kontrolni skupini je bilo 9 fermentorjev (3 čista kultura *C. zemplinina* ZIM 842, 3 čista kultura *S. cerevisiae* ZIM 1927 in 3 združena kultura) brez dodatka feniletanola in triptofola, v drugi skupini pa je fermentacija tekla po dodatku feniletanola in triptofola. Poleg fermentorjev smo pod istimi pogoji inkubirali tudi vzorec sterilnega mošta, za preverjanje aseptičnosti bioprocesa. Vzorčili smo takoj po nacepitvi sevov, na sredini eksponentne faze rasti, ob začetku in sredini stacionarne faze ter pred zaustavitvijo fermentacije. Volumen odvzetega vzorca (1,3 ml) smo uporabili za določanje števila celic pod mikroskopom, merjenje optične gostote, določanje števila kolonijskih enot in za analizo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

### 5.2.1 Spremljanje rasti kvasovk med potekom alkoholne fermentacije

Čeprav metoda merjenja optične gostote ni najbolj zanesljiva, smo jo uporabili kot pomoč pri spremeljanju rasti kvasovk med fermentacijo. Da bi se čim bolj približali dejanskemu številu celic, smo dobljenim vrednostim odšteli OD<sub>650</sub> sterilnega mošta, ki smo ga uporabili za alkoholno fermentacijo. Iz krivulj (Priloga C1) lahko sklepamo, da so kvasovke imele zelo kratko fazo prilagajanja, le *C. zemplinina* nekoliko daljšo. Kvasovke med združeno fermentacijo in med fermentacijo s čisto kulturo *S. cerevisiae* dosežejo sredino eksponentne faze po 24. urah in po 48. urah začetek stacionarne faze rasti, v kateri so celice do osmega dne fermentacije. Zaradi spremembe razmer v mediju pride po 8. dnevu do odmiranja celic in po 14. dnevu do upada števila celic. Trend spremenjanja optične gostote je med kontrolno skupino in skupino po dodatku signalnih molekul enak, z malenkostno večjimi vrednostmi pri skupini po dodatku feniletanola in triptofola.

Na živost in dinamiko rasti kvasovk med fermentacijo lahko vpliva mnogo dejavnikov, med katerimi so še posebej pomembne interakcije znotraj prisotne mikrobne združbe (Fleet, 2003; Nissen in Arneborg, 2003; Andorrà, 2010b). Za spremeljanje živosti kvasovk smo izbrali metodo določanja števila kolonijskih enot, na diferencialnem gojišču WL (Domizio in sod., 2007; De Maio, 2010; Suzzi in sod., 2012). Gojišče WL je uporabno za razločevanje *Saccharomyces* vrst kvasovk od ne- *Saccharomyces* med združeno alkoholno fermentacijo, saj pride ob znižanju pH do spremembe barve indikatorja bromkrezol zeleno (Fugelsang, 1997). Na gojišču so zrasle kvasovke, ki so iz ene celice tvorile vidne kolonije (CFU), ki se med uporabljenima sevoma razlikujejo po morfologiji in videzu. Kvasovka *S. cerevisiae* je po 48. urah na gojišču WL tvorila velike, okrogle, bele kolonije z ravnim robom, ki so se očitno razlikovale od manjših, zelenkasto modrih, okroglih kolonij kvasovke *C. zemplinina*.

Pri fermentaciji mošta sorte Sauvignon brez dodanih signalnih molekul je največje število kolonijskih enot dosegla čista kultura *C. zemplinina* 8. dan fermentacije ( $4,2 \times 10^7$  CFU/ml). *S. cerevisiae* je med čisto fermentacijo dosegla vrh sicer že drugi dan, vendar le  $5,2 \times 10^6$  CFU/mL (Slika 15A). Med združeno fermentacijo pa sta obe kvasovki, *S. cerevisiae* ( $5,1 \times 10^6$  CFU/ml) in *C. zemplinina* ( $1,1 \times 10^6$  CFU/ml), dosegli največje število CFU/mL že po 48. urah fermentacije (Slika 15A).

Celice obeh sevov v čisti fermentaciji so žive tudi ob koncu poskusa, medtem ko je pri združeni fermentaciji 14. dan na gojišču zrastla samo *S. cerevisiae*. Dinamiki rasti med fermentacijo po in brez dodatka feniletanola in triptofola sta si bili zelo podobni. Največje število kolonijskih enot med fermentacijo po dodatku signalnih molekul je dosegla *C. zemplinina* osmi dan čiste fermentacije ( $5,0 \times 10^7$  CFU/ml), *S. cerevisiae* med čisto fermentacijo pa že po 48. urah ( $4,4 \times 10^6$  CFU/ml) (Slika 15B). Med združeno fermentacijo po dodatku feniletanola in triptofola, da je dinamika rasti nekoliko drugačna kot med fermentacijo brez dodatka signalnih molekul. Največje število kolonijskih enot ( $4,3 \times 10^7$  CFU/ml) sta oba seva v združeni fermentaciji dosegla že po 48. urah fermentacije (Slika 15B). Ob primerjavi števila kolonijskih enot kvasovke *C. zemplinina* med čisto fermentacijo po in brez dodatka feniletanola in triptofola lahko vidimo, da dodatek signalnih molekul statistično značilno spodbudi rast kvasovk *C. zemplinina* med 2. in 3. dnem fermentacije (Priloga C3). Iz števila CFU/mL med fermentacijo kontrolne skupine in skupine po dodatku feniletanola in triptofola lahko sklepamo, da dodatek signalnih molekul v končni koncentraciji 1000 µM ne vpliva na živost celic med potekom fermentacije. Število CFU/mL *C. zemplinina* je bilo med fermentacijo v združeni kulturi precej nižje od števila CFU/mL *C. zemplinina* med čisto fermentacijo. Gre verjetno za vlogo medsebojnih interakcij, ki negativno vplivajo na kvasovko *C. zemplinina* v združeni kulturi, saj živost celic *C. zemplinina* po drugem dnevu fermentacije pade in 14. dan ni bilo več vidnih kolonij na gojišču WL. Zdi se, da gre v združeni kulturi za antagonističen učinek kvasovke *S. cerevisiae* na živost *C. zemplinina*, kot so potrdili tudi Andorrà in sod. (2010b).

### **5.2.2 Dinamika čiste in združene alkoholne fermentacije**

Spreminjanje kemijskih parametrov med potekom alkoholne fermentacije smo spremljali preko analize vzorcev s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (Cheraiti in sod., 2005). Določili smo porabo sladkorjev (glukoze in fruktoze) in nastanek produktov presnove, kot so etanol, glicerol in organske kisline (citronska, jabolčna, ocetna, vinska). Tako lahko metabolno aktivnost kvasovk posredno prikažemo z dinamiko fermentacije, ki združuje porabo sladkorjev ter nastajanje etanola in sproščanje ogljikovega dioksida.

Iz dinamike sproščanja CO<sub>2</sub> lahko sklepamo (Priloga C1), da so kvasovke metabolno aktivne do 8. dne poteka fermentacije. Po osmem dnevu čiste fermentacije s kvasovko *S. cerevisiae* ali med združeno fermentacijo ni bilo večje metabolne aktivnosti, kljub temu, da so bile kvasovke žive do zaključka fermentacije (16 dni). To lahko potrdimo s količinami sproščenega ogljikovega dioksida in nastalega etanola. Na drugi strani je bila *C. zemplinina* po osmem dnevu še vedno metabolno aktivna (Priloga C1), kar je verjetno posledica počasnejše dinamike čiste fermentacije s kvasovko *C. zemplinina*. To dokazuje količina sproščenega CO<sub>2</sub>, ki ga je med fermentacijo s čisto kulturo *C. zemplinina* nastalo 46 g/l, medtem ko ga je med fermentacijo s čisto kulturo *S. cerevisiae* in fermentacijo z združeno kulturo, nastalo 88 g/L CO<sub>2</sub>. Dinamiki sproščanja CO<sub>2</sub> med fermentacijama po in brez dodatka feniletanola in triptofola sta si zelo podobni (Priloga C1).

Povprečna začetna vrednost koncentracije glukoze v grozdnem soku sorte Sauvignon je bila 111 g/L, fruktoze pa je bilo približno 92 g/L (Preglednica 6).

Čeprav naj bi kvasovka *S. cerevisiae*, kot vir ogljika prednostno izkoriščala glukozo, nekateri sevi pri nižjih temperaturah, v začetnih fazah fermentacije, kažejo fruktofilen značaj (Tronchoni in sod., 2009). Med posameznimi sevi *S. cerevisiae* lahko prihaja do razlik v izkoristku glukoze in fruktoze zaradi različne aktivnosti heksokinaz (Berthels in sod., 2004; 2008). Pri fermentaciji mošta sorte »Malvazija« in »Sauvignon« s kulturo kvasovk *S. cerevisiae* in združenima kulturama, je prišlo v prvih dneh fermentacije do nagle porabe obeh sladkorjev, katerih koncentracija je že osmi dan fermentacije padla na 2 g/L (Slika 16, 18). Zanimivo je, da je bila koncentracija glukoze ob zaključku fermentacije višja kot osmi dan, kar je verjetno posledica razgradnje rezervnih sladkorjev, ki se kopijo v celicah in se nato sprostijo iz njih. Kljub temu, da *S. cerevisiae* istočasno izkorišča oba sladkorja, iz naklona premice vidimo, da je začetna koncentracija in posledično tudi poraba glukoze večja (Slika 16). Zaradi sprememb v izražanju transporterjev heksoz pride do razlik v izkoristku sladkorjev tudi pri nekaterih sevih kvasovke *C. zemplinina* (Berthels in sod., 2004; Tofalo in sod., 2012). Pri fermentaciji s čisto kulturo *C. zemplinina* pride po 16 dneh do 19 % porabe glukoze in 97 % porabe fruktoze, kar potrebuje njen fruktofilno naravo (Sipiczki, 2003, 2004; Sipiczki in sod., 2005). Poraba fruktoze je bila pri vseh fermentorjih in v obeh neodvisnih poskusih podobna (Preglednica 6,7).

Dinamika porabe glukoze je pri skupini z dodanimi signalnimi molekulami (Slika 16B, 17B, 18B) zelo podobna kontrolni skupini (Slika 16A, 17A, 18A). Pri fermentaciji s čisto kulturo *S. cerevisiae* je koncentracija glukoze osmi dan padla celo pod 1 g/L, do 16. dne pa se je povečala na 4,0 g/L (Slika 16). Podobno se je zgodilo tudi pri fermentaciji z združeno kulturo, le da je bila koncentracija po 8. dnevu 2 g/L (Slika 18). *Candida zemplinina* je sposobna rasti na gojiščih s povisano koncentracijo glukoze in jo zato skupaj z vinskimi kvasovkami, kot sta *Candida apicola* in *Zygosaccharomyces spp.*, umeščamo med osmotolerantne seve (Tofalo in sod., 2009, 2012). Izolati iz sladkih, botritiziranih vin, lahko rastejo celo ob prisotnosti 60 % glukoze v mediju (Sipiczki, 2003). Za kvasovko *C. zemplinina* v čisti kulti glukoza ni predstavljal preferenčnega vira ogljika in jo je do konca poskusa izkoristila samo 18 % (Slika 17). Ugotavlja, da obstajajo razlike v med sevi *C. zemplinina* povsem fruktofilnega značaja (Tofalo in sod., 2012), kot so sprva predvideli (Soden in sod., 2000; Magyar in Toth, 2011). Tofalo in sod. (2012) so pokazali, da lahko kvasovka *C. zemplinina* med alkoholno fermentacijo sočasno izrablja oba monosaharida, ali pa se loti glukoze šele, ko popolnoma izrabi fruktozo (Soden in sod., 2000; Tofalo in sod., 2012).

### **5.2.3 Dinamika nastalih produktov presnove med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta**

Etanol nastaja sorazmerno s porabo sladkorjev in ga večji del nastane v prvih osmih dneh fermentacije. Čeprav je etanol osrednji končni produkt alkoholne fermentacije, predstavlja za celice enega izmed stresnih dejavnikov (Bisson, 1999). Gre predvsem za povečano prepustnost membrane in pasivnega toka protonov v celice, saj etanol prosto prehaja preko plazemske membrane in povzroči poškodbo proteinov membrane in fosfolipidnega dvosloja ter znotrajceličnih encimov (Hallsworth, 1998). Berthels in sod. (2004) so opazili, da visoka raven etanola na splošno zavira porabo sladkorjev, z večjim zaviralnim učinkom v primeru fruktoze. Lahko je tudi vzrok za upočasnjeno in zaustavljeni fermentacijo (Berthels in sod., 2004).

Med fermentacijo po dodatku signalnih molekul nastane največ etanola po čisti fermentaciji s *S. cerevisiae* 95,1 g/L ter podobno pri združeni fermentaciji 93,4 g/L in sicer v prvih osmih dneh. Med čisto fermentacijo s *C. zemplinina* je nastalo največ etanola med drugim in osmim dnevom fermentacije, po katerem se je koncentracija še vzpenjala do končne 52,5 g/L. Dinamika nastajanja etanola je med fermentacijama po in brez dodatka feniletanola in triptofola podobna, razlika je 2 g/L več nastalega etanola pri kontrolni skupini. Vinske kvasovke so odporne tudi na 12 % in več etanola na volumsko enoto (Carrasco in sod., 2001). Kvasovka *C. zemplinina* je sposobna rasti do 8 % etanola, ki v višjih količinah vidno učinkuje na podaljšanje začetne faze prilagajanja (Tofalo in sod., 2012). Magyar in Toth (2011) sta pokazala, da je pri uporabljenih sevih *C. zemplinina* zelo nizek donos etanola, ki ga ni mogoče pojasniti s prekomernim nastankom ostalih produktov presnove. Poleg ogljikovega dioksida in etanola je glicerol večinski končni produkt alkoholne fermentacije. Navadno vrednost glicerola v vinu niha od 1 do 10 g/L, lahko pa je prisoten že v moštu (Ough in sod., 1972; Ciani in Ferraro, 1996). V kontrolni skupini je med čisto fermentacijo s kvasovko *C. zemplinina* ZIM 842 nastalo 7,50 g/L glicerola, največ med 2. in 8. dnem fermentacije. Po čisti fermentaciji s *S. cerevisiae* in po združeni fermentaciji je bila končna koncentracija glicerola 3,7 g/L (Slika 19A). Pri fermentaciji, po dodatku signalnih molekul, je količina nastalega glicerola prav tako največja pri čisti kulturi *C. zemplinina* (6,5 g/L), sledita čista kultura *S. cerevisiae* (3,3 g/L) in združena kultura (3,2 g/L) (Slika 19B).

Kislost je ena izmed pomembnejših senzoričnih značilnosti vina, na katero vplivajo predvsem šibke organske kisline. Pri pogojih z visoko vsebnostjo sladkorjev in nizko vsebnostjo vira dušika, naj bi vplivale na metabolizem kvasovk *S. cerevisiae*. Zaradi puferne sposobnosti organskih kislin, preko katere je uravnan pH mošta med fermentacijo, bi lahko preprečili upočasnjene ali zaustavljene fermentacije (Torija in sod., 2003). Pri pregledu rezultatov dinamike organskih kislin med alkoholno fermentacijo, pozornost hitro pritegnejo izstopajoče koncentracije citronske in ocetne kisline, nastale med čisto fermentacijo s kulturo kvasovk *C. zemplinina* ZIM 842 (Slika 20). Ta med fermentacijo brez dodatka signalnih molekul proizvede 3,9 g/L citronske kisline, v skupini po dodatku signalnih molekul pa 3,7 g/L. Med fermentacijo s čisto kulturo *S. cerevisiae* nastane 0,97 g/L in med fermentacijo z združeno kulturo 1,1 g/L. Med obravnavanimi organskimi kislinami je nastalo največ ocetne kisline, kot produkt fermentacije s čisto kulturo *C. zemplinina* (10,4 g/L), v skupini po dodatku signalnih molekul.

Čeprav med dinamikama porabe substrata in tvorbe metabolitov med čisto in združeno fermentacijo po in brez dodatka feniletanola in triptofola v večini primerov ni statistično značilnih razlik, je v primeru citronske in ocetne kisline nekoliko drugače (Priloga C6, C8). Med čisto fermentacijo s kulturo *C. zemplinina* v kontrolni skupini nastane skoraj za polovico manj ocetne kisline (5,6 g/L), kot po dodatku feniletanola in triptofola (10,4 g/L). Dinamika nastajanja citronske in ocetne kisline je verjetno povezana s koncentracijo in aktivnostjo celic, saj pri obeh kislinah koncentracija po 14. dnevu fermentacije pada. Jabolčna kislina je bila v koncentraciji od 3,6 do 4,9 g/L prisotna že pred samim začetkom fermentacije in se pri vseh fermentorjih njena količina med potekom fermentacije zniža. Pri čisti fermentaciji s kulturo *S. cerevisiae* in združeni fermentaciji je prvih 48 ur viden nagel upad v moštu že prisotne vinske kisline (Slika 20).

Profila čiste fermentacije s kulturo *S. cerevisiae* in združene fermentacije se tudi pri organskih kislinah prekrivata (Slika 20) To si lahko razlagamo kot pozitivno lastnost uporabe dveh sevov v združeni fermentaciji, saj poleg izboljšanja aromatskih lastnosti, ki jih prinese ne-*Saccharomyces* vrsta, kvasovka *S. cerevisiae* preprečuje nastanek neželenih spojin in zagotavlja uspešen zaključek fermentacije.

Rezultati aromatskega profila, ki jo je za nas izvedel Inštitut za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije kažejo, da obstajajo jasne razlike med vsemi tremi kombinacijami fermentorjev. Vzorci končnega produkta čiste fermentacije s kulturo *C. zemplinina* ZIM 842 tvorijo eno skupino, vzorci čiste fermentacije s *S. cerevisiae* ZIM 1927 drugo in vzorci združene fermentacije tretjo skupino. Iz razporeditve vzorcev na drevesnem diagramu vidimo večjo sorodnost med produkti čiste fermentacije s kulturo *S. cerevisiae* in združene fermentacije, saj se vzorci produktov čiste fermentacije s kulturo *C. zemplinina*, nahajajo v ločeni glavni skupini. Dendrogram tako res potrdi med fermentacijo pridobljene rezultate, kjer se profil poteka fermentacije z združeno kulturo, prekriva s profilom čiste fermentacije s kulturo *S. cerevisiae* (Slika 12).

#### **5.2.4 Dinamika nastalih signalnih molekul med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorta Sauvignon**

Pri diploidnih celicah kvasovke *S. cerevisiae* lahko pomanjkanje vira dušika sproži nastanek psevdohif, pri haploidnih celicah pa invazivno rast. Nezadostne koncentracije tega omejujočega dejavnika sprožijo signal, ki se preko MAPK (ang. mitogen activated proteine kinase) ali PKA (protein kinase) poti prenese do transkripcijskih faktorjev, ki vplivajo na višji nivo izražanja za filamentozno rast potrebnih genov (Chen in Fink, 2006). Preklop morfologije celic je pri veliko glivah nadzorovan preko mehanizma zaznavanja celične gostote (Hornby in sod., 2001; Chen in Fink, 2006). Chen in Fink (2006) sta pokazala, da je sinteza obeh aromatskih alkoholov odvisna od celične gostote in uravnana s pozitivno povratno zanko, ki omogoča *S. cerevisiae* hkraten odziv na gostoto celic in razpoložljivost hranil v okolju. Na sintezo feniletanola in triptofola ima močan učinek tudi dodatek amonija, saj je zgornja meja koncentracije, ki še dovoljuje sintezo aromatskih alkoholov 500 µM (Chen in Fink, 2006).

Med potekom alkoholne fermentacije smo spremljali dinamiko feniletanola in triptofola, ki ne vplivata le na aroma vina, ampak sta pomembni signalni molekuli pri kvasovki *S. cerevisiae*. Nastaneta po Ehrlichovi poti iz aromatskih aminokislin fenilalanina in triptofana (Dickinson in sod., 2003). Med alkoholno fermentacijo kontrolne skupine, brez dodatka signalnih molekul, je v zaznavnih koncentracijah nastajal samo feniletanol. Feniletanol je nastalo največ v prvih osmih dneh čiste fermentacije s kulturo *S. cerevisiae*, z največjim naklonom krivulje med prvim in drugim dnem. Do konca poskusa je količina narasla na 458,6 µM (Slika 21). Tudi pri združeni fermentaciji imamo podobno dinamiko, le da je končna koncentracija nekoliko nižja (446,5 µM). Najmanjšo končno koncentracijo pa smo dobili po čisti fermentaciji s kulturo *C. zemplinina* in sicer 184,8 µM (Priloga C10). Največ feniletanola nastane med stacionarno fazo rasti celic, do 14. dne fermentacije, ko se situacija obrne. Celice preidejo namreč že v fazo odmiranja, ko se koncentracija feniletanola naglo poveča iz česar lahko sklepamo, da je prišlo med lizo celic do sproščanja feniletanola.

Ker nastanka triptofola med potekom fermentacije nismo zaznali, smo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, preverili prisotnost triptofana v grozdnem soku. Izkazalo se je, da do sinteze triptofola najverjetneje ne pride, zaradi pomanjkanja triptofana.

Ker smo želeli preveriti učinek signalnih molekul na potek fermentacije, smo v drugo skupino na začetku poskusa dodali feniletanol in triptofol v želeni končni koncentraciji 1000 µM. Kot je razvidno iz rezultatov, je bila dejanska koncentracija ob pričetku nekoliko nižja, kar je verjetno posledica asimilacije obeh aromatskih alkoholov v celice. Zanimivo je, da se dinamika med dodanima signalnima molekulama popolnoma razlikuje. Vzemimo za primer dogajanje med čisto fermentacijo s kulturo *S. cerevisiae* in spreminjaњe koncentracije triptofola. Njegova koncentracija po dodatku v mošt je bila 986,1 µM in je prva dva dni fermentacije padla za 73,8 µM. Nato se je do 14. dne povečala zgolj za 41,1 µM in do 16. dne presenetljivo povzpela na 1035,4 µM končne koncentracije. Podobna razmerja v spreminjaњu koncentracije so tudi pri čisti fermentaciji s kulturo *C. zemplinina* in združeni fermentaciji (Slika 22). Glede na to, da v moštu ni bilo triptofana, kvasovke dodani triptofol mogoče izrabljajo tudi kot vir dušika. Nagel vzpon koncentracije po 14. dnevnu fermentacije je verjetno posledica lize odmrlih celic in sproščenega triptofola. Za razliko od triptofola koncentracija feniletanola po 48. urah samo narašča, z večjim naklonom krivulje med 14. in 16. dnem fermentacije. Po čisti fermentaciji s kulturo *S. cerevisiae* je koncentracija PheOH za 425 µM večja od začetne, po združeni fermentaciji za 431,6 µM večja od začetne in po čisti fermentaciji s kulturo *C. zemplinina* za 288,3 µM večja končna koncentracija feniletanola od začetne. Takšen rezultat bi bil lahko posledica pozitivne povratne zanke, pri kateri prisotnost signalne molekule, še dodatno aktivira izražanje genov za lastno sintezo (Slika 23).

Za učinkovit potek fermentacije je potreben zadosten vir asimilirajočega dušika, saj lahko pomanjkanje privede do neučinkovitega prenosa in nižje stopnje izkoristka sladkorjev (Salmon, 1989). Berthels in sod. (2004) so tako z dodajanjem vira dušika dokazali, da se posledično poveča izkoristek fruktoze (Berthels in sod., 2004). Za določanje količine asimilirajočega dušika smo uporabili metodo titracije formola (Gump in sod., 2001). Bely in sod. (1990) poročajo, da pri zadostni koncentraciji sladkorja, vrednost pod 140 mg/L asimilirajočega dušika, ni dovolj za želeni potek fermentacije (Bely in sod., 1992). Verjetno gre za vpliv več dejavnikov, saj so Carrasco in sod. (2003) pokazali, da je alkoholna fermentacija uspešna tudi pri 120 mg/L asimilirajočega dušika, nekateri sevi pa potrebujejo celo 267 mg/L, kot navajajo Mendes-Ferreira in sod. (2004). V moštu sorte Sauvignon (Vipava 2010) smo določili 116,2 mg/L asimilirajočega dušika. Glede na zahteve po zadostni koncentraciji za normalen potek fermentacije, je dobljena vrednost nekoliko nizka. Ravno pomanjkanje vira dušika pa je eden pomembnejših okoljskih dejavnikov pri preklopu morfologije celic iz kvasne v filamentozno.

### 5.3 SKLEPI

Iz rezultatov našega raziskovalnega dela lahko sklepamo naslednje:

- Aromatska alkohola (feniletanol in triptofol), ki smo ju dodali v končni koncentraciji 1000 µM, med potekom alkoholne fermentacije ne vplivata na živost kvasovk *Candida zemplinina* ZIM 842 in *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1927.
- Sinteza signalnih molekul je odvisna od celične gostote in dostopnosti vira dušika v moštu.
- Interakcije med kvasovkami v združeni kulturi tekom fermentacije mošta imajo pomemben vpliv na končno aroma vina.
- Aromatski profil končnega produkta fermentacije z združenima kulturama kvasovk *S. cerevisiae* in *C. zemplinina* se razlikuje od tistega pri fermentacijah s čisto kulturo *S. cerevisiae* ali *C. zemplinina*.
- Signalni molekuli (feniletanol in triptofol) nimata zaznavnega vpliva na dinamiko fermentacije in aroma vina pri fermentaciji s čisto kulturo (*S. cerevisiae* ali *C. zemplinina*) in pri fermentaciji z združenima kulturama (*S. cerevisiae* in *C. zemplinina*).

## 6 POVZETEK

Obstaja nekaj značilnih razlik med alkoholno fermentacijo s čisto in fermentacijo z združeno starter kulturo. V primeru uporabe *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 v čisti oz. združeni kulturi se ta razlika kaže v živosti in gostoti celic med potekom alkoholne fermentacije, porabi sladkorjev, koncentraciji alkohola, glicerola, organskih kislin ter navsezadnje tudi aromatskega profila končnega produkta. Potencial uporabe združene kulture za alkoholno fermentacijo, je torej predvsem večji spekter vin z raznolikim okusom ter aromo. Iz spremeljanja poteka čiste fermentacije mošta sort Malvazija in Sauvignon s kvasovko *C. zemplinina* lahko sevu pripisemo naslednje značilnosti: preferenčna poraba fruktoze (fruktofilni značaj), nižja proizvodnja etanola ter višja proizvodnja glicerola, ocetne in citronske kisline, sposobnost presnove jabolčne kisline in značilna počasnejša kinetika fermentacije v primerjavi s kvasovko *S. cerevisiae*. Sev vinske kvasovke *S. cerevisiae* kaže rahlo gluktofilen značaj, čeprav sladkorja porablja sočasno, višja je proizvodnja etanola, nižja pa proizvodnja glicerola, ocetne in citronske kisline, sposobnost presnove jabolčne in vinske kisline ter hitrejša kinetika fermentacije. Fermentacijski profil ter količina nastalih presnovnih produktov med združeno alkoholno fermentacijo kvasovk *S. cerevisiae* in *C. zemplinina* je zelo podoben, skoraj enak kvasovki *S. cerevisiae* v čisti starter kulturi.

Med alkoholno fermentacijo z združeno starter kulturo, imajo interakcije med celicami zagotovo pomembno vlogo, saj posredno vplivajo na končno aroma vina. Lahko gre za antagonistično delovanje kvasovke *S. cerevisiae* na kvasovko *C. zemplinina*, kar lahko vpliva na dinamiko poteka fermentacije in razlike v količini nastalih produktov v primerjavi s čisto kulturo. Zaradi nižjega števila kolonijskih enot kvasovke *C. zemplinina* v združeni kulturi, je tudi sam potek alkoholne fermentacije bolj nagnjen k lastnostim, značilnim za čisto fermentacijo s kulturo *S. cerevisiae*. Pri združeni fermentaciji je tako nižja količina nastalega etanola ter organskih kislin, ki bi lahko v prevelikih količinah negativno vplivale na senzorične lastnosti končnega produkta. Poleg doprinosa k izboljšani kakovosti vina, fermentacija z združeno kulturo omogoča boljši izkoristek sladkorjev in hitrejšo kinetiko procesa, manjša pa je tudi verjetnost za zaustavljeno ali upočasnjeno fermentacijo. Uporaba vodene alkoholne fermentacije, z izbrano vrsto ne-*Saccharomyces* kvasovke in vrste iz rodu *Saccharomyces*, bi lahko tako zaradi prednosti pred fermentacijo s čisto kulturo *S. cerevisiae*, omogočila bolj predvidljivo pridelavo vin zaželenih lastnosti.

Želeli smo preveriti ali ima tudi dodatek feniletanola in triptofola, v končni koncentraciji 1000 µM zaznaven vpliv na sam potek čiste in združene fermentacije s kvasovkama *C. zemplinina* in *S. cerevisiae*. Izkaže se, da dodatek teh signalnih molekul ne vpliva na živost celic kvasovk, zaznavnega vpliva pa nima niti na sam potek fermentacije, saj sta dinamika in količina izmerjenih parametrov kontrolne skupine, zelo podobni skupini po dodatku feniletanola in triptofola. Ker oba uporabljena seva proizvajata feniletanol, tako brez dodatka, kakor tudi po dodatku feniletanola in triptofola v medij, bi bilo mogoče zanimivo zastavljen poskus preveriti pri združeni fermentaciji *S. cerevisiae* z vinskimi sevom, ki ne proizvaja signalnih molekul v zaznavnih količinah.

## 7 VIRI

- Alba-Lois L., Segal-Kischinevzky C. 2010. Yeast fermentation and the making of beer and wine. V: Cell origins and metabolism. Coté G., Tullio M.D (eds.). Cambridge, Nature Education: 17 str.
- Andorrà I., Landi S., Mas A., Guillamon J.M., Esteve-Zarzoso B. 2008. Effect of oenological practices on microbial populations using culture-independent techniques. *Food Microbiology*, 25, 7: 849-856
- Andorrà I., Esteve-Zarzoso B., Guillamon J.M., Mas A. 2010a. Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 2: 257-262
- Andorrà I., Berradre M., Rozès N., Mas A., Guillamón J.M., Esteve-Zarzoso B. 2010b. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *European Food Research and Technology*, 231: 215-224
- Aranda A., Matallana E., Olmo M. 2011. *Saccharomyces* yeast: Primary fermentation. V: Molecular wine microbiology. Carrascosa A., Muñoz R., Gonzalez Garcia R. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 1-33
- Atlas R.M., 2010. Handbook of microbiological media. 4<sup>th</sup> ed. Washington, Taylor & Francis: 2036 str.
- Äyräpää T. 1965. The formation of phenethyl alcohol from 14C labelled phenylalanine. *Journal of the Institute of Brewing*, 71: 341–347
- Barnett J.A. 2000. A history of research on yeasts. *Yeast*, 16: 755-771
- Barrajón N., Capece A., Arévalo-Villena M., Briones A., Romano P. 2011. Co-inoculation of different *Saccharomyces cerevisiae* stains and influence on volatile composition of wines. *Food Microbiology*, 28: 1080-1086
- Beltran G., Torija M.J., Novo M., Ferrer N., Poblet M., Guillamon J.M., Rozes N., Mas A. 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 2: 287-293
- Beltran G., Esteve-Zarzoso B., Rozès N., Mas A., Guillamón J.M. 2005. Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 996-1002
- Bely M., Sablayrolles J.M., Barre P. 1990. Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70: 246-252
- Berthels N.J., Cordero Otero R.R., Bauer F.F., Thevelein J.M., Pretorius I.S. 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4: 683-689
- Berthels N.J., Cordero Otero R.R., Bauer F.F., Pretorius I.S., Thevelein J.M. 2008. Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77: 1083-1091
- Bisson L.F. 1999. Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50: 107-119
- Bisson L. 2001. The alcoholic fermentation. Davis, University of California at Davis: 119 str.
- Cabrera M.J., Moreno J., Ortega J.M., Medina M. 1988. Formation of ethanol, higher alcohols, esters, and terpenes by five yeast strains in musts from Pedro Ximénez grapes in various degrees of ripeness. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 4: 283-287
- Carrasco P., Querol A., Del Olmo M. 2001. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Archives of Microbiology*, 175: 450-457

- Carrasco P., Pérez-Ortí J.E., del Olmo M. 2003 Arginase activity is a useful marker of nitrogen limitation during alcoholic fermentations. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 3: 471-479
- Charoenchai C., Fleet G.H., Henschke P.A., Todd B.E.N. 1997. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 3: 2-8
- Chen H., Fink G.R. 2006. Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes & Development*, 20, 9: 1150-1161
- Chen H., Fujita M., Feng Q., Clardy J., Fink G.R. 2004. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 5048-5052
- Cheraiti N., Guezene S., Salmon J.M. 2005. Redox interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 255-260
- Ciani M., Ferraro L., 1996. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 629: 128-132
- Ciani M., Ferraro L. 1998. Combined use of immobilized *Candida stellata* cells and *Saccharomyces cerevisiae* to improve the quality of wines. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 2: 247-54
- Ciani M., Beco L., Comitini F. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 2: 239-245
- Ciani M., Comitini F., Mannazzu I., Domizio P. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10, 2: 123-133
- Comitini F., Gobbi M., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M. 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28, 5: 873-882
- Constantí M., Poblet M., Arola L., Mas A., Guillamón J. 1997. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48: 339-344
- Cottier F., Muhschlegel F.A. 2012. Communication in fungi. *International Journal of Microbiology*, 2012: 1-9
- Csoma H., Sipiczki M. 2008. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. *FEMS Yeast Research*, 8, 2: 328-336
- Di Maio S., Polizzotto G., Planeta D., Oliva D. 2011. A method to discriminate between the *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed fermentation on WLD and lysine agar media. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 32: 35-41
- Dickinson J.R. 1994. Irreversible formation of pseudohyphae by haploid *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 119: 99-104
- Dickinson J.R. 1996. 'Fusel' alcohols induce hyphal-like extensions and pseudohyphal formation in yeasts. *Microbiology*, 142: 1391-1397
- Dickinson J.R., Harrison S.J., Dickinson J.A., Hewlins M.J.E. 2000. An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 10937-10942
- Dickinson J.R., Salgado L.E., Hewlins M.J. 2003. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 10: 8028-34
- Domizio P., Lencioni L., Ciani M., Di Blasi S., Pontremoli C., Sabatelli M.P. 2007. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 115, 3: 281-289

- Edwards C.G., Beelman R.B., Bartley C.E., McConnell A.L. 1990. Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. American Journal of Enology and Viticulture, 41: 48-56
- Ehrlich F. 1907. Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 40: 1027-1047
- Erten H. 2002. 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: 373-378
- Etschmann M. M., Sell D., Schrader J. 2003. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium. Biotechnology Letters, 25: 531-536
- Fabre C.E., Blanc P.J., Goma G. 1998. 2-Phenylethyl alcohol: an aroma profile. Perfume Flavor, 23: 43-45
- Fernandez M.T., Ubeda J.F., Briones A.I. 1999. Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. FEMS Microbiology Letters, 173: 223-229
- Fischer C., Valerius O., Rupprecht H., Dumkow M., Krappmann S., Braus G.H. 2008. Posttranscriptional regulation of *FLO11* upon amino acid starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, 8: 225-236
- Fleet G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. International Journal of Food Microbiology, 86: 11-22
- Fleet G.H. 2008. Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Research, 8, 7: 979-995
- Fuglsang K.C. 1997. Wine microbiology. New York, Chapman & Hall: 245 str.
- Fuglsang K.C., Edwards C.G. 2007. Wine microbiology: Practical applications and procedures. New York, Springer Science+Business Media: 393 str.
- Fuqua W.C., Winans S.C., Greenberg E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. Journal of Bacteriology, 176: 269-275
- Gao C., Fleet G.H. 1988. The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. Journal of Applied Bacteriology, 65: 405-410
- Gimeno C.J., Ljungdahl P.O., Styles C.A., Fink G.R. 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and *RAS*. Cell, 68: 1077-1090
- Gognies S., Barka E.A., Gainvors-Claisse A., Belarbi A. 2006. Interactions between yeasts and grapevines: filamentous growth, endopolygalacturonase and phytopathogenicity of colonizing yeasts. Microbial Ecology, 51: 109-116
- Gori K., Knudsen P.B., Nielsen K.F., Arneborg N., Jespersen L. 2011. Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. FEMS Yeast Research, 11, 8: 643-652
- Gump B.H., Zöcklein B.W., Fuglsang K.C. 2001. The formol method: Prediction of pre-fermentation nutritional status of grape juice. V: Food microbiology protocols; methods in biotechnology. Ragout de Spencer A.L., Spencer J.F. (eds.). New Jersey, Humana Press: 283-296
- Hallsworth J.E. 1998. Ethanol-induced water stress in yeast. Journal of Fermentation and Bioengineering, 85: 125-137
- Hansen E.H., Nissen P., Sommer P., Nielsen J.C., Arneborg N. 2001. 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: 541-547

- Hazelwood L.A., Daran J.M., van Maris A.J., Pronk J.T., Dickinson J.R. 2008. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 8: 2259-2266
- Hazen K.C., Cutler J.E. 1979. Autoregulation of germ tube formation by *Candida albicans*. *Infection and Immunity*, 24, 3: 661-666
- Heard G.M., Fleet G.H. 1985. Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 3: 727-728
- Heard G.M., Fleet G.H. 1988. The effects of temperature and pH on the growth of yeasts during the fermentation of grape juice. *Journal of Applied Bacteriology*, 65: 23-28
- Henick-Kling T., Edinger W., Daniel P., Monk P. 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *Journal of Applied Microbiology*, 84: 865-876
- Henschke P.A., Jiranek V. 1992. Yeasts: Metabolism of nitrogen compounds. V: Wine microbiology and biotechnology. Fleet G.H. (ed.). Camberwell, Harwood Academic Publishers: 77-163
- Hierro N., González A., Mas A., Guillamón J.M. 2006. Diversity and evolution of non-*Saccharomyces* yeast populations during wine fermentations: effect of grape ripeness and cold maceration. *FEMS Yeast Research*, 6: 102-111
- Hites R.A. 1997. Gas chromatography mass spectrometry. V: Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. Settle F.A. (ed.). New Jersey, Prentice Hall: 609-626
- Hogan D.A. 2006. Talking to themselves: autoregulation and quorum sensing in fungi. *Eukaryotic Cell*, 5, 4: 613-619
- Holloway P., Subden R.E., Lachance M.A. 1990. The yeasts in a Riesling must from the Niagara grape-growing region of Ontario Canada. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 23: 212-216
- Hornak J.P. 2011. The basics of NMR. New York, Rochester Institute of Technology: 5 str.  
<http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm> (avgust, 2012)
- Hornby J.M., Jensen E.C., Lisec A.D., Tasto J.J., Jahnke B., Shoemaker R., Dussault P., Nickerson K.W. 2001. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 7: 2982-2992
- Howitz K.T., Bitterman K.J., Cohen H.Y., Lamming D.W., Lavu S., Wood J.G., Zipkin R.E., Chung P., Kisielewski A., Zhang L.L., Scherer B., Sinclair D.A. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425, 6954: 191-196
- Hutkins R.W. 2006. Microbiology and technology of fermented foods. Oxford, Blackwell Publishing: 473 str.
- Iraqui I., Vissers S., André B., Urrestarazu A. 1999. Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 19: 3360-3371
- Jolly N.P., Augustyn O.P.H., Pretorius I.S. 2003. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 24: 63-39
- Jolly N.P., Augustyn O.P.H., Pretorius I.S. 2005. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 27: 15-39
- Keeler J. 2002. Understanding NMR spectroscopy: NMR and energy levels. Irvine, University of California: 19 str.  
<http://www-keeler.ch.cam.ac.uk/lectures/Irvine/> (avgust, 2012)

- Kleerebezem M., Quadri L.E., Kuipers O.P., de Vos W.M. 1997. Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 24, 5: 895-904
- Košir I.J. 2001. Karakterizacija vin z NMR spektroskopijo visoke ločljivosti. Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 218 str.
- Košir I.J., Kidrič J. 2002. Use of modern nuclear magnetic resonance spectroscopy in wine analysis: determination of minor compounds. *Analytica Chimica Acta*, 458: 77-84
- Lagunas R. 1986. Misconceptions about energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2: 221-228
- Lorenz M.C., Cutler N.S., Heitman J. 2000. Characterization of alcohol-induced filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 11: 183-199
- Ludovico P., Sousa M.J., Silva M.T., Leao C., Corte-Real M. 2001. *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid. *Microbiology*, 147: 2409–2415
- Magyar I., Toth T. 2011. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28: 94-100
- Mamede M.E.O., Cardello H.M.A.B., Pastore G.M. 2005. Evaluation of an aroma similar to that of sparkling wine: sensory and gas chromatography analyses of fermented grape musts. *Food Chemistry*, 89: 63-68
- Martini A., Ciani M., Scorzetti G. 1996. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47: 435-440
- Mateo J.J., Jimenez M., Pastor A., Huerta T. 2001. Yeast starter cultures affecting wine fermentation and volatiles. *Food Research International*, 34: 307-314
- Mato I., Suarez-Luque S., Huidobro J.F. 2005. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38: 1175-1188
- McGovern P.E. 2009. Uncorking the past: the quest for wine, beer, and other alcoholic beverages. Berkeley, University of California Press: 352 str.
- McMaster M.C. 2008. GC/MS: a practical user's guide. New Jersey, John Wiley & Sons: 129 str.
- Mendes-Ferreira A., Mendes-Faia A., Leão C. 2004. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 540-545
- Mendoza L.M., Manca de Nadra M.C., Farías M.E. 2007. Kinetics and metabolic behaviour of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnology Letters*, 29: 1057-1063
- Miller M.B., Bassler B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 55: 165-199
- Mills D.A., Johannsen E.A., Cocolin L. 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 4884-4893
- Molina A.M., Swiegers J.H., Varela C., Pretorius I.S., Agosin E. 2007. Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 3: 675-687
- Monteiro F., Bisson L. 1992. Nitrogen supplementation of grape juice. *American Journal of Enology And Viticulture*, 43:11-17
- Mora J., Barbas J.I., Mulet A. 1990. Evolution of the yeast microflora during the first days of fermentation in inoculated Majorcan musts. *Microbiologia*, 6, 2: 65-70
- Moreira N., Mendes F., Hogg T., Vasconcelos I. 2005. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 103: 285-294

- Nealson K.H., Platt T., Hastings J.W. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology*, 104, 1: 313-322
- Nisiotou A.A., Spiropoulos A.E., Nychas G.J. 2007. Yeast community structures and dynamics in healthy and Botrytis-affected grape must fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 21: 6705-6713
- Nissen P., Arneborg N. 2003. Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 180: 257-263
- Nissen P., Nielsen D., Arneborg N. 2003. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. *Yeast*, 20: 331-341
- Noble A. C., Bursick G. F. 1984. The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35:110-112
- Oliver J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*, 43: 93-100
- Ough C.S., Fong D., Amerine M.A. 1972. Glycerol in wine: determination and some factors affecting. *American Journal of Enology and Viticulture*, 23: 1-5
- Pardo I., Garcia M.J., Zuniga M., Uruburu F. 1989. Dynamics of microbial populations during fermentations of wines from the Utiel Requena region of Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 539-541
- Pretorius I.S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16, 8: 675-729
- Proscitech. 2003. Online catalogue for Microscopy: Counting Chambers. Queensland, Proscitech: 4 str.  
[http://proscitech.com.au/cataloguex/get\\_notes.asp?sv](http://proscitech.com.au/cataloguex/get_notes.asp?sv)
- Ramon-Portugal F., Seiller I., Taillandier P., Favarel J.L., Nepveu F., Strehaino P. 1999. Kinetics of production and consumption of organic acids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology*, 37: 235-240
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche D., Lonvaud A. 2006. Handbook of enology: The microbiology of wine and vinification. Chichester, John Wiley and Sons: 512 str.
- Rogers M.T. 2007. Basic NMR Concepts: A guide for the modern laboratory. Michigan, Michigan State University: 42 str.  
<http://www2.chemistry.msu.edu/facilities/nmr/handouts/DH%20NMR%20Basics.pdf> (avgust, 2012)
- Romano P., Suzzi G., Comi G., Zironi R., Maifreni M. 1997. Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 5: 615-618
- Romano P., Fiore C., Paraggio M., Caruso M., Capece A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 1-2: 169-180
- Rossouw D., Du Toit M., Bauer A. 2012. The impact of co-inoculation with *Oenococcus oeni* on the transcriptome of *Saccharomyces cerevisiae* and on the flavour-active metabolite profiles during fermentation in synthetic must. *Food Microbiology*, 29: 121-131
- Rua D., Tobe B.T., Kron S.J. 2001. Cell cycle control of yeast filamentous growth. *Current Opinion in Microbiology*, 4: 720-727
- Sabate J., Cano J., Esteve-Zarzoso B., Guillamón J.M. 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Research in Microbiology*, 157: 267-274
- Salmon J.M. 1989. Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 953-958

- Sipiczki M. 2003. *Candida zemplinina* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53: 2079-2083
- Sipiczki M. 2004. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. Journal of Basic Microbiology, 44, 6: 471-479
- Sipiczki M., Ciani M., Csoma H. 2005. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* DBVPG 3827. Folia Microbiologica, 50, 6: 494-498
- Skoog D.A., West D., Holler F.J. 2004. Fundamentals of analytical chemistry. 8<sup>th</sup> ed.. Belmont, Thomson-Brooks: 1172 str.
- Soden A., Francis I.L., Oakey H., Henschke P.A. 2000. 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: 21-30
- StandardBase. 2012. StandardBase techniques: High performance liquid chromatography. Emmen, Drenthe College: 8 str.  
<http://www.standardbase.com/tech/HPLC.pdf> (avgust, 2012)
- Suárez-Lepe J.A., Morata A. 2012. New trends in yeast selection for winemaking. Trends in Food Science & Technology, 23: 39-50
- Suzzi G., Schirone M., Sergi M., Marianella R.M., Fasoli G., Aguzzi I., Tofalo R. 2012. Multistarter from organic viticulture for red wine Montepulciano d'Abruzzo production. Frontiers in Microbiology, 3, 135: 1-10
- Swiegers J.H., Pretorius I.S. 2005. Yeast modulation of wine flavor. Advances in Applied Microbiology, 57: 131-175
- Swiegers J.H., Pretorius I.S. 2007. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. Applied Microbiology and Biotechnology, 74, 5: 954-960
- Štefanc D. 2003. Pouk kot komunikacijski proces. Vaje iz didaktike. Ljubljana, Filozofska fakulteta: 2 str.  
<http://www.stefanc.net/docs/komunikacija.pdf> (julij, 2012)
- Tofalo R., Chaves-López C., Di Fabio F., Schirone M., Felis G.E., Torriani S., Paparella A., Suzzi G. 2009. Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. International Journal of Food Microbiology, 130: 179-187.
- Tofalo R., Schirone M., Torriani S., Rantsiou K., Cocolin L., Perpetuini G., Suzzi G. 2012. Diversity of *Candida zemplinina* strains from grapes and Italian wines. Food Microbiology, 29, 1: 18-26
- Torija M.J., Beltran G., Novo M., Poblet M., Rozes N., Mas A., Guillamon J.M. 2003. Effect of organic acids and nitrogen source on alcoholic fermentation: study of their buffering capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 4: 916-922
- Toro M.E., Vazquez F. 2002. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18: 347-354
- Tronchoni J., Gamero A., Arroyo-López F.N., Barrio E., Querol A. 2009. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. International Journal of Food Microbiology, 134: 237-243
- Ucman I. 2003. Koncepti in veščine komunikacije. Novo mesto, Ekonombska šola Novo mesto: 93 str.  
<http://www.leila.si/dokumenti/kom.pdf> (julij, 2012)
- Urso R., Rantsiou K., Dolci P., Rolle L., Comi G., Cocolin L. 2008. Yeast biodiversity and dynamics during sweet wine production as determined by molecular methods. FEMS Yeast Research, 8, 7: 1053-62
- Viana F., Gil J.V., Genoves S., Valles S., Manzanares P. 2008. Rational selection of non-*Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. Food Microbiology, 25, 6: 778-785

- Villiers A., Alberts P., Tredoux A.G., Nieuwoudt H.H. 2012. Analytical techniques for wine analysis: an African perspective; a review. *Analytica Chimica Acta*, 730: 2-23
- Zupan J., Avbelj M., Butinar B., Kosel J., Šergan M., Raspor P. 2012. Monitoring of quorum-sensing molecules during mini-fermentation studies in wine yeast. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (poslano v objavo)
- Waters C.M., Bassler B.L. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21: 319-346
- Wittman C., Hans M., Bluemke W. 2002. Metabolic physiology of aroma-producing *Kluyveromyces marxianus*. *Yeast*, 19: 1351-1363
- Winzer K., Hardie K.R., Williams P. 2002. Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now - gone to lunch! *Current Opinion in Microbiology*, 5, 2: 216-222
- Wuster A., Babu M.M. 2010. Transcriptional control of the quorum sensing response in yeast. *Molecular bioSystems*, 6, 1: 134-141
- Wüster A. 2009. The role of small molecules in cell regulation: Quorum sensing. Cambridge, University of Cambridge: 46 str.

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem prof. dr. Petru Rasporju, da me je navdušil za opravljanje magistrskega dela pod njegovim mentorstvom ter za vso pomoč in usmeritve. Zelo sem hvaležna somentorici doc. dr. Neži Čadež in delovni mentorici Martini Avbelj, ki sta me vodili tekom laboratorijskega dela in mi potrežljivo pomagali v trenutkih moje nespretnosti in neznanja. Hvala vama tudi za vse nasvete in pomoč pri pisanku magistrske male. Zahvaljujem se recenzentki doc. dr. Poloni Zalar za strokovnen in hiter pregled magistrskega dela. Hvala tudi predsednici komisije prof. dr. Romani Marinšek Logar za hiter odziv in sodelovanje.

Lepa hvala Juretu in Mateju za dobro voljo in tehnično pomoč, s katero sta mi prihranila veliko časa in truda. Zahvala gre tudi naši vsestranski tajnici Dragici, ki je bila vedno pripravljena pomagati. Za nasvete in spodbudo se zahvaljujem tudi Lukatu, ki se je pred letom dni znašel v isti situaciji. Eva in Neja, hvala vama za vso spodbudo, nasvete in tolažbo. Za dobro voljo in pomoč se zahvaljujem Kseniji in Petri, ki sta bili v času raziskovalnega dela na izmenjavi.

Hvala Selmi Muhar za sodelovanje, prijaznost in napotke ter Lini Burkan Makivić za pomoč in hiter pregled oblikovne ustreznosti naloge.

Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije (IHPS) se zahvaljujem za analizo aromatskega profila, ki so jo izvedli za nas.

Iz srca hvala vsem iz Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, s katerimi sem se vsakodnevno srečevala in so mogoče le z nasmehom in lepo besedo, postali del te magistrske naloge.

Nadvse pa bi se rada zahvalila svojim staršem, Ireni in Jožitu z družinicama ter Kristijanu, za vso spodbudo ter duševno in finančno podporo tekom študija. Brez vas bi bili moja življenjska in študijska pot zagotovo drugačni.

## PRILOGE

V poglavju Priloge se nahajajo tabelični prikazi rezultatov, ki so v magistrskem delu prikazani slikovno. Pod oznako A so vrednosti pridobljene med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija, pod oznako C pa rezultati pridobljeni med čisto in združeno alkoholno fermentacijo mošta sorte Sauvignon. V mošt sorte Sauvignon, kjer je potekala fermentacija po dodatku signalnih molekul, smo dodali feniletanol in triptofol v končni koncentraciji 1000 µM. Rezultati ugotavljanja vpliva feniletanola in triptofola na živost celic so pod oznako B. Sledijo še standardne krivulje glukoze, fruktoze, etanola, glicerola, citronske, jabolčne, ocetne in vinske kisline ter standardni krivulji feniletanola in triptofola.

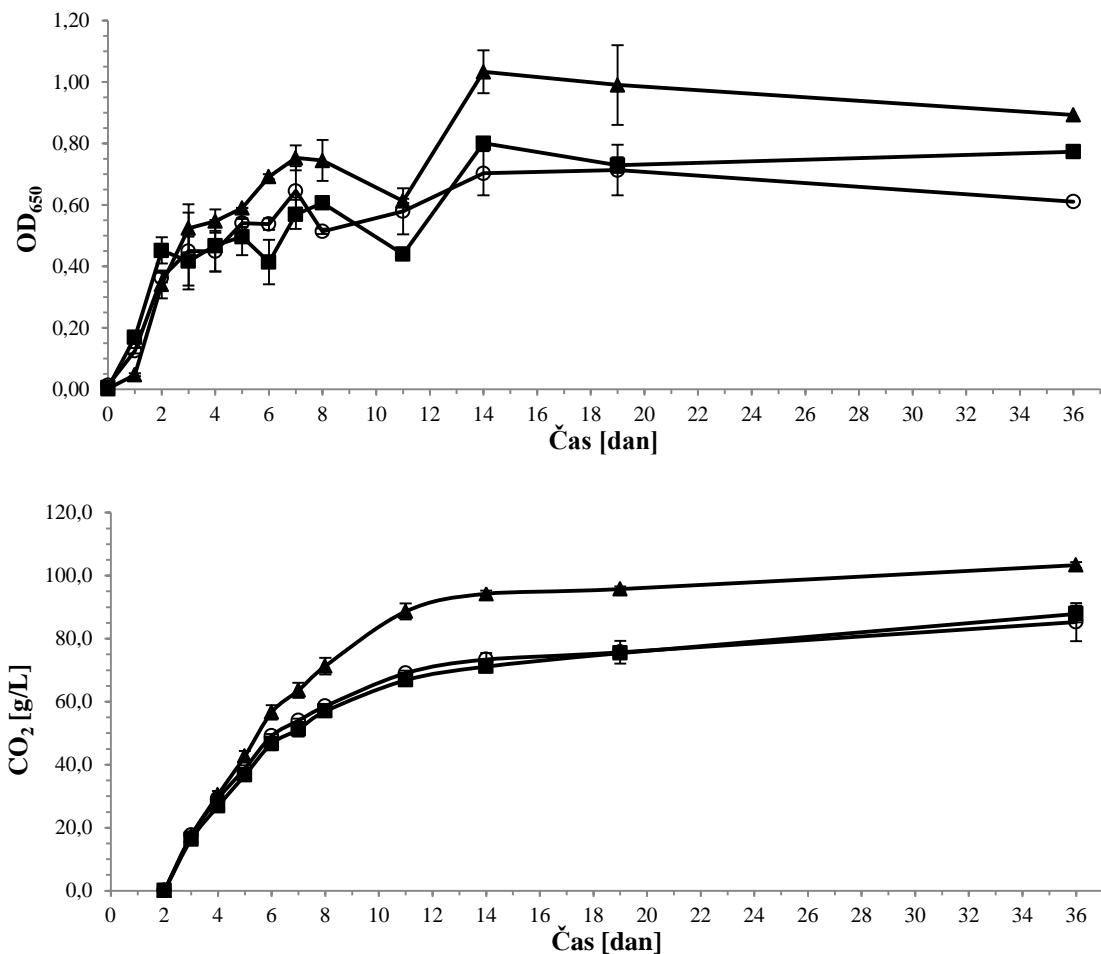
Priloga A1: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) med čisto fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 (T=22 °C). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk.

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842	
	Povp. št. celic ± SD [CFU/ml]	KV [%]	Povp. št. celic ± SD [CFU/ml]	KV [%]
0	$6,29 \times 10^5 \pm 1,61 \times 10^5$	25,63	$6,43 \times 10^5 \pm 1,11 \times 10^5$	17,34
1	$6,98 \times 10^7 \pm 2,37 \times 10^7$	33,98	$4,68 \times 10^7 \pm 1,32 \times 10^6$	2,83
2	$3,17 \times 10^7 \pm 1,53 \times 10^7$	48,21	$3,19 \times 10^8 \pm 7,57 \times 10^7$	23,71
4	$1,90 \times 10^8 \pm 8,35 \times 10^7$	43,84	$1,71 \times 10^8 \pm 4,48 \times 10^7$	26,16
6	$9,71 \times 10^6 \pm 4,22 \times 10^6$	43,49	$1,84 \times 10^8 \pm 3,90 \times 10^7$	21,27
8	$8,21 \times 10^6 \pm 2,39 \times 10^6$	29,14	$7,47 \times 10^7 \pm 3,91 \times 10^7$	52,40
11	$1,56 \times 10^6 \pm 4,94 \times 10^5$	31,70	$1,96 \times 10^8 \pm 7,87 \times 10^7$	40,21
14	$1,14 \times 10^6 \pm 3,44 \times 10^5$	30,14	$4,00 \times 10^5 \pm 0,00$	0,00
19	$2,30 \times 10^5 \pm 1,05 \times 10^5$	45,57		
36	$4,26 \times 10^2 \pm 1,76 \times 10^2$	20,32		

Priloga A2: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) med združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 (T=22 °C). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk.

Potek fermentacije [dan]	Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>			
	CFU/mL ± SD ZIM 1927	KV [%]	CFU/mL ± SD ZIM 842	KV [%]
0	$5,42 \times 10^5 \pm 7,34 \times 10^4$	13,54	$7,21 \times 10^5 \pm 6,34 \times 10^4$	8,79
1	$3,69 \times 10^7 \pm 1,25 \times 10^7$	33,97	$9,16 \times 10^6 \pm 1,40 \times 10^6$	15,29
2	$2,89 \times 10^8 \pm 2,64 \times 10^7$	9,13	$8,89 \times 10^6 \pm 2,36 \times 10^6$	26,60
4	$6,23 \times 10^7 \pm 1,60 \times 10^7$	25,71	$8,11 \times 10^6 \pm 2,83 \times 10^6$	34,95
6	$9,63 \times 10^6 \pm 5,89 \times 10^5$	6,12	$7,73 \times 10^6 \pm 2,55 \times 10^6$	32,97
8	$4,78 \times 10^6 \pm 2,37 \times 10^6$	49,61	$2,88 \times 10^6 \pm 5,16 \times 10^5$	17,89
11	$3,79 \times 10^6 \pm 2,45 \times 10^6$	64,68	$5,83 \times 10^5 \pm 2,89 \times 10^4$	4,95
14	$5,83 \times 10^4 \pm 1,18 \times 10^4$	20,20	$1,08 \times 10^5 \pm 0$	0,00
19	$5,88 \times 10^3 \pm 1,96 \times 10^3$	33,25		
36	$1,70 \times 10^2 \pm 0$	0,00		

Priloga A3: Dinamika rasti kvasovk *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija ( $T=22^{\circ}\text{C}$ ). Legenda: *C. zemplinina* ▲ v čisti kulturi; *S. cerevisiae* ■ v čisti kulturi; *C. zemplinina* △ v združeni kulturi; *S. cerevisiae* □ v združeni kulturi.



Priloga A4: Dinamika porabe glukoze med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk.

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> sev 1927		<i>C. zemplinina</i> sev 842		Združeni kulti S. cerevisiae in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	162,79 $\pm$ 0,45	0,28	154,22 $\pm$ 0,28	0,18	168,84 $\pm$ 0,18	0,10
1	151,02 $\pm$ 0,54	0,36	152,80 $\pm$ 0,14	0,09	160,22 $\pm$ 0,75	0,47
2	115,70 $\pm$ 4,12	3,56	150,79 $\pm$ 0,63	0,42	131,12 $\pm$ 0,71	0,54
3	95,79 $\pm$ 3,41	3,56	139,28 $\pm$ 1,12	0,81	111,94 $\pm$ 1,11	0,99
4	79,52 $\pm$ 3,61	4,54	128,79 $\pm$ 1,33	1,04	94,89 $\pm$ 1,12	1,18
5	67,94 $\pm$ 2,03	2,98	116,01 $\pm$ 1,73	1,49	83,13 $\pm$ 1,56	1,88
6	53,01 $\pm$ 2,46	4,64	101,88 $\pm$ 2,37	2,32	68,76 $\pm$ 1,38	2,00
7	47,79 $\pm$ 2,68	5,61	97,25 $\pm$ 2,59	2,67	63,72 $\pm$ 1,41	2,21
8	43,33 $\pm$ 4,00	9,23	90,93 $\pm$ 1,82	2,01	57,82 $\pm$ 1,97	3,40
11	30,11 $\pm$ 1,11	3,70	70,59 $\pm$ 3,23	4,58	43,51 $\pm$ 1,95	4,47
14	24,92 $\pm$ 0,59	2,36	63,25 $\pm$ 2,05	3,24	37,48 $\pm$ 3,32	8,86
19	22,11 $\pm$ 0,89	4,04	61,86 $\pm$ 1,67	2,71	35,22 $\pm$ 4,07	11,55
36	19,40 $\pm$ 1,28	6,60	60,75 $\pm$ 1,96	3,23	33,58 $\pm$ 5,63	16,77

Priloga A5: Dinamika porabe fruktoze med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk.

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> sev 1927		<i>C. zemplinina</i> sev 842		Združeni kulti S. cerevisiae in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	161,77 $\pm$ 0,54	0,33	149,49 $\pm$ 0,83	0,55	172,16 $\pm$ 0,20	0,12
1	153,57 $\pm$ 0,11	0,07	142,77 $\pm$ 0,23	0,16	165,46 $\pm$ 0,23	0,14
2	132,41 $\pm$ 2,11	1,59	119,21 $\pm$ 1,93	1,62	144,09 $\pm$ 0,68	0,47
3	121,77 $\pm$ 1,71	1,40	98,26 $\pm$ 2,72	2,77	132,11 $\pm$ 0,73	0,55
4	112,27 $\pm$ 2,05	1,82	80,30 $\pm$ 4,63	5,76	121,63 $\pm$ 0,75	0,62
5	103,35 $\pm$ 1,59	1,54	67,28 $\pm$ 3,55	5,28	113,59 $\pm$ 1,12	0,99
6	94,40 $\pm$ 1,60	1,69	51,06 $\pm$ 4,18	8,19	105,63 $\pm$ 1,48	1,40
7	91,11 $\pm$ 1,74	1,90	45,91 $\pm$ 3,10	6,74	103,04 $\pm$ 1,61	1,57
8	93,43 $\pm$ 6,67	7,14	36,82 $\pm$ 4,26	11,57	100,66 $\pm$ 2,36	2,35
11	78,55 $\pm$ 1,18	1,50	17,88 $\pm$ 4,09	22,86	91,86 $\pm$ 3,59	3,91
14	73,76 $\pm$ 1,28	1,73	12,60 $\pm$ 2,29	18,18	87,01 $\pm$ 4,74	5,45
19	70,73 $\pm$ 1,36	1,92	11,57 $\pm$ 2,05	17,72	85,40 $\pm$ 5,82	6,82
36	67,42 $\pm$ 2,36	3,51	11,31 $\pm$ 2,18	19,32	83,46 $\pm$ 6,88	8,24

Priloga A6: Dinamika tvorbe etanola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 (T=22 °C). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk.

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> sev 1927		<i>C. zemplinina</i> sev 842		Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc ± SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc ± SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc ± SD [g/L]	KV [%]
0	0,91 ± 0,02	2,54	0,73 ± 0,05	6,66	0,95 ± 0,02	2,13
1	9,22 ± 0,60	6,48	2,24 ± 0,11	5,05	7,28 ± 0,28	3,86
2	35,93 ± 2,57	7,16	14,35 ± 1,05	7,33	32,36 ± 0,68	2,11
3	52,28 ± 2,63	5,03	30,84 ± 1,62	5,26	49,26 ± 0,91	1,85
4	64,87 ± 2,57	3,96	45,43 ± 2,14	4,71	62,10 ± 0,73	1,18
5	75,30 ± 1,96	2,60	57,31 ± 2,88	5,02	71,77 ± 1,27	1,77
6	86,91 ± 2,28	2,63	72,38 ± 3,46	4,78	82,84 ± 0,97	1,17
7	91,51 ± 2,24	2,45	78,86 ± 2,87	3,63	88,37 ± 1,29	1,46
8	98,67 ± 2,64	2,68	89,90 ± 5,64	6,28	98,73 ± 5,78	5,86
11	108,71 ± 1,15	1,06	106,93 ± 3,27	3,06	106,11 ± 2,71	2,56
14	112,53 ± 1,01	0,90	112,06 ± 2,34	2,08	109,33 ± 4,02	3,68
19	117,53 ± 1,01	0,59	113,24 ± 1,13	1,18	112,10 ± 5,45	4,86
36	116,71 ± 1,12	0,96	116,26 ± 5,70	4,91	110,67 ± 5,96	5,39

Priloga A7: Dinamika tvorbe glicerola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 (T=22 °C). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk.

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> sev 1927		<i>C. zemplinina</i> sev 842		Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc ± SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc ± SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc ± SD [g/L]	KV [%]
0	0,36 ± 0,01	2,81	0,27 ± 0,02	7,97	0,48 ± 0,01	3,02
1	1,38 ± 0,11	8,10	0,56 ± 0,01	2,53	1,31 ± 0,12	9,42
2	3,49 ± 0,17	4,99	2,80 ± 0,27	9,80	3,52 ± 0,07	2,07
3	4,22 ± 0,16	3,68	4,54 ± 0,20	4,37	4,32 ± 0,05	1,17
4	4,68 ± 0,14	3,02	5,64 ± 0,16	2,89	4,79 ± 0,13	2,64
5	4,90 ± 0,08	1,66	6,21 ± 0,16	2,51	5,02 ± 0,16	3,27
6	5,18 ± 0,09	1,81	7,07 ± 0,23	3,25	5,31 ± 0,17	3,16
7	5,15 ± 0,15	2,86	7,22 ± 0,14	1,94	5,38 ± 0,19	3,62
8	5,28 ± 0,07	1,41	7,77 ± 0,22	2,78	5,47 ± 0,14	2,59
11	5,50 ± 0,09	1,68	8,22 ± 0,17	2,04	5,74 ± 0,16	2,75
14	5,50 ± 0,06	1,02	8,30 ± 0,10	1,25	5,73 ± 0,17	2,96
19	5,43 ± 0,27	5,06	8,39 ± 0,07	0,78	5,80 ± 0,21	3,61
36	5,58 ± 0,13	2,34	8,25 ± 0,07	0,79	5,78 ± 0,24	4,15

Priloga A8: Dinamika tvorbe/porabe citronske kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk.

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> sev 1927		<i>C. zemplinina</i> sev 842		Združeni kulti S. cerevisiae in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	1,59 $\pm$ 0,02	1,20	1,39 $\pm$ 0,04	2,82	1,72 $\pm$ 0,03	1,71
1	1,57 $\pm$ 0,04	2,50	1,41 $\pm$ 0,03	2,34	1,64 $\pm$ 0,02	0,99
2	1,53 $\pm$ 0,02	1,40	1,38 $\pm$ 0,03	2,10	1,56 $\pm$ 0,04	2,62
3	1,49 $\pm$ 0,04	2,47	1,34 $\pm$ 0,01	1,09	1,59 $\pm$ 0,03	2,05
4	1,40 $\pm$ 0,06	3,94	1,35 $\pm$ 0,03	2,13	1,55 $\pm$ 0,02	1,05
5	1,44 $\pm$ 0,09	6,37	1,39 $\pm$ 0,02	1,49	1,56 $\pm$ 0,04	2,30
6	1,45 $\pm$ 0,07	4,98	1,41 $\pm$ 0,04	2,90	1,52 $\pm$ 0,04	2,51
7	1,32 $\pm$ 0,07	4,92	1,41 $\pm$ 0,04	2,49	1,47 $\pm$ 0,04	2,62
8	1,44 $\pm$ 0,11	7,93	1,41 $\pm$ 0,12	8,61	1,49 $\pm$ 0,12	7,98
11	1,25 $\pm$ 0,04	2,97	1,32 $\pm$ 0,03	2,58	1,41 $\pm$ 0,03	2,32
14	1,25 $\pm$ 0,02	1,62	1,22 $\pm$ 0,03	2,07	1,35 $\pm$ 0,01	1,05
19	1,33 $\pm$ 0,05	3,93	1,15 $\pm$ 0,02	1,86	1,37 $\pm$ 0,08	5,57
36	1,28 $\pm$ 0,05	4,22	1,08 $\pm$ 0,02	1,98	1,31 $\pm$ 0,07	5,14

Priloga A9: Dinamika tvorbe/porabe jabolčne kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk.

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> sev 1927		<i>C. zemplinina</i> sev 842		Združeni kulti S. cerevisiae in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	8,95 $\pm$ 0,02	0,20	8,04 $\pm$ 0,10	1,22	9,57 $\pm$ 0,12	1,29
1	8,79 $\pm$ 0,11	1,24	7,60 $\pm$ 0,02	0,20	9,33 $\pm$ 0,08	0,89
2	13,33 $\pm$ 0,25	1,90	10,24 $\pm$ 0,15	1,47	11,63 $\pm$ 0,66	5,68
3	12,02 $\pm$ 0,31	2,61	9,50 $\pm$ 0,20	2,05	10,35 $\pm$ 0,81	7,84
4	11,57 $\pm$ 0,31	2,65	9,90 $\pm$ 1,15	11,62	10,20 $\pm$ 0,66	6,43
5	10,68 $\pm$ 0,46	4,28	9,23 $\pm$ 0,13	1,36	9,59 $\pm$ 0,27	2,79
6	9,69 $\pm$ 0,33	3,42	8,90 $\pm$ 0,08	0,94	9,10 $\pm$ 0,50	5,48
7	9,08 $\pm$ 0,28	3,10	8,74 $\pm$ 0,28	3,15	8,48 $\pm$ 0,50	5,88
8	8,14 $\pm$ 0,15	1,81	7,54 $\pm$ 0,27	3,58	8,28 $\pm$ 0,22	2,61
11	7,82 $\pm$ 0,15	1,92	7,40 $\pm$ 0,04	0,56	7,81 $\pm$ 0,28	3,55
14	7,48 $\pm$ 0,05	0,66	6,59 $\pm$ 0,13	1,99	7,64 $\pm$ 0,24	3,09
19	7,91 $\pm$ 0,17	2,18	6,45 $\pm$ 0,10	1,52	7,63 $\pm$ 0,20	2,68
36	7,82 $\pm$ 0,12	1,54	6,19 $\pm$ 0,18	2,85	7,88 $\pm$ 0,08	1,03

Priloga A10: Dinamika tvorbe/porabe acetne kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk.

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> sev 1927		<i>C. zemplinina</i> sev 842		Združeni kulti S. cerevisiae in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	1,60 $\pm$ 0,02	1,10	1,45 $\pm$ 0,02	1,54	1,61 $\pm$ 0,06	3,57
1	1,64 $\pm$ 0,10	6,21	1,50 $\pm$ 0,03	2,15	1,93 $\pm$ 0,04	2,17
2	1,96 $\pm$ 0,02	1,01	6,24 $\pm$ 0,21	3,44	2,28 $\pm$ 0,03	1,30
3	1,86 $\pm$ 0,02	1,32	8,65 $\pm$ 0,16	1,80	2,48 $\pm$ 0,02	0,92
4	2,06 $\pm$ 0,02	1,17	9,50 $\pm$ 0,09	0,95	2,97 $\pm$ 0,03	0,90
5	2,02 $\pm$ 0,01	0,52	11,59 $\pm$ 0,22	1,88	2,89 $\pm$ 0,02	0,68
6	2,09 $\pm$ 0,10	4,59	14,07 $\pm$ 0,35	2,51	3,13 $\pm$ 0,15	4,90
7	1,26 $\pm$ 0,12	9,91	15,05 $\pm$ 0,10	0,64	1,44 $\pm$ 0,04	2,69
8	1,92 $\pm$ 0,05	2,57	15,17 $\pm$ 0,56	3,70	2,82 $\pm$ 0,01	0,39
11	1,90 $\pm$ 0,20	10,25	14,62 $\pm$ 0,27	1,84	2,44 $\pm$ 0,16	6,55
14	2,70 $\pm$ 0,13	4,83	11,44 $\pm$ 0,85	7,42	3,21 $\pm$ 0,19	5,87
19	3,06 $\pm$ 0,16	5,08	10,13 $\pm$ 0,66	6,56	3,28 $\pm$ 0,39	11,98
36	3,36 $\pm$ 0,09	2,57	10,13 $\pm$ 0,77	7,56	3,27 $\pm$ 0,04	1,37

Priloga A11: Dinamika tvorbe/porabe vinske kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Malvazija s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk.

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> sev 1927		<i>C. zemplinina</i> sev 842		Združeni kulti S. cerevisiae in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	2,98 $\pm$ 0,02	0,65	3,14 $\pm$ 0,03	1,05	2,82 $\pm$ 0,01	0,31
1	3,14 $\pm$ 0,01	0,31	3,26 $\pm$ 0,02	0,62	2,93 $\pm$ 0,02	0,73
2	2,97 $\pm$ 0,01	0,45	3,52 $\pm$ 0,04	1,22	2,82 $\pm$ 0,03	1,14
3	2,89 $\pm$ 0,03	0,97	3,72 $\pm$ 0,06	1,51	2,71 $\pm$ 0,05	1,75
4	2,90 $\pm$ 0,02	0,85	3,80 $\pm$ 0,05	1,43	2,75 $\pm$ 0,07	2,41
5	3,10 $\pm$ 0,15	4,73	4,04 $\pm$ 0,05	1,30	2,81 $\pm$ 0,05	1,93
6	3,04 $\pm$ 0,08	2,69	4,03 $\pm$ 0,02	0,52	2,79 $\pm$ 0,06	2,15
7	2,92 $\pm$ 0,05	1,84	3,99 $\pm$ 0,15	3,66	2,73 $\pm$ 0,05	1,91
8	3,41 $\pm$ 0,14	4,13	3,75 $\pm$ 0,14	3,80	2,61 $\pm$ 0,10	3,99
11	2,87 $\pm$ 0,07	2,28	3,67 $\pm$ 0,03	0,88	2,71 $\pm$ 0,07	2,66
14	2,84 $\pm$ 0,06	2,08	3,69 $\pm$ 0,07	2,01	2,64 $\pm$ 0,06	2,45
19	2,96 $\pm$ 0,10	3,30	3,50 $\pm$ 0,06	1,67	2,62 $\pm$ 0,07	2,78
36	2,80 $\pm$ 0,14	5,01	3,11 $\pm$ 0,10	3,28	2,71 $\pm$ 0,10	3,59

Priloga B1: Povprečne vrednosti koncentracij feniletanola neposredno po dodatku in po 52 urni fermentaciji mošta sorte Malvazija s čistima kulturama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti štirih neodvisnih paralelk.

Teoretična koncentracija [ $\mu\text{M}$ ]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927			<i>C. zemplinina</i> sev 842		
	Začetna koncentracija	Povp. konc $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	KV [%]	Začetna koncentracija	Povp. konc $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	KV [%]
<b>0</b>	0	$12,79 \pm 3,31$	25,88	0	$0,00 \pm 0,00$	0,00
<b>350</b>	345,43	$350,22 \pm 2,28$	0,65	337,73	$357,34 \pm 36,70$	10,27
<b>500</b>	497,38	$503,22 \pm 1,11$	0,22	476,33	$476,16 \pm 3,81$	0,80
<b>750</b>	726,53	$733,10 \pm 3,50$	0,48	708,78	$714,81 \pm 16,18$	2,26
<b>1000</b>	1086,40	$966,09 \pm 5,04$	0,52	930,93	$939,27 \pm 0,83$	0,09

Priloga B2: Povprečne vrednosti koncentracij triptofola neposredno po dodatku in po 52 urni fermentaciji mošta sorte Malvazija s čistima kulturama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti štirih neodvisnih paralelk.

Teoretična koncentracija [ $\mu\text{M}$ ]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927			<i>C. zemplinina</i> sev 842		
	Začetna koncentracija	Povp. konc $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	KV [%]	Začetna koncentracija	Povp. konc $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	KV [%]
<b>0</b>	0	$0,00 \pm 0,00$	0	0	$0,00 \pm 0,00$	0
<b>350</b>	393,84	$380,96 \pm 1,95$	0,51	387,71	$384,94 \pm 3,89$	1,01
<b>500</b>	558,60	$572,38 \pm 17,55$	3,07	557,07	$555,64 \pm 0,05$	0,01
<b>750</b>	831,15	$840,42 \pm 4,14$	0,49	841,37	$866,95 \pm 37,27$	4,30
<b>1000</b>	1074,65	$1077,67 \pm 8,25$	0,77	1044,62	$1069,07 \pm 9,39$	0,88

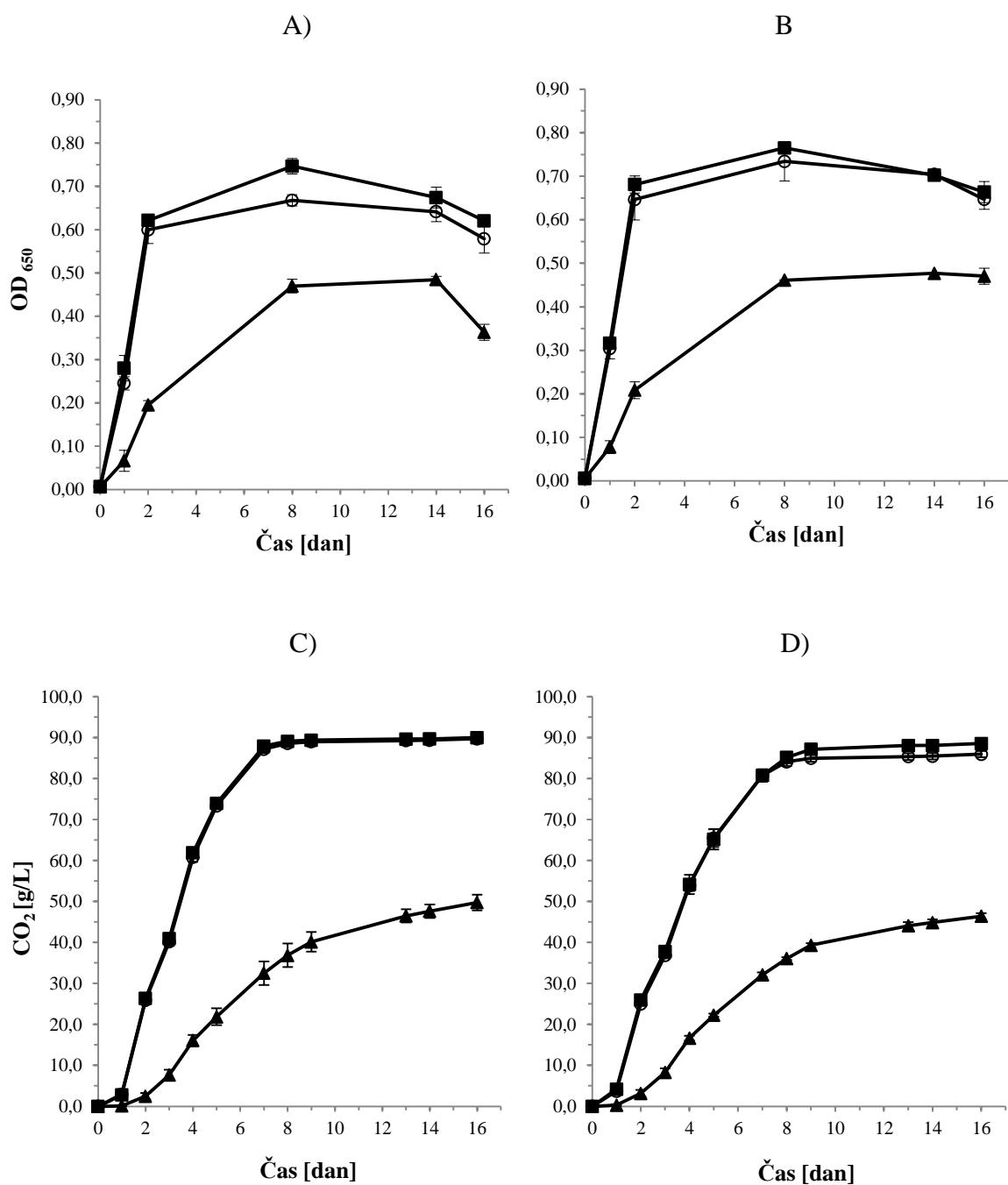
Priloga B3: Povprečne vrednosti števila celic *S. cerevisiae* ZIM 1927 med 66 urno čisto fermentacijo mošta sorte Malvazija po dodatku različnih koncentracij feniletanola in triptofola ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti štirih neodvisnih paralelk.

t [h]	Teoretične začetne koncentracije PheOH in TrpOH [ $\mu\text{M}$ ]				
	0 $\mu\text{M}$	350 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$	750 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$
<b>0</b>	Povp. št. celic/ml $\pm$ SD	Povp. št. celic/ml $\pm$ SD	Povp. št. celic/ml $\pm$ SD	Povp. št. celic/ml $\pm$ SD	Povp. št. celic/ml $\pm$ SD
<b>28</b>	$1,00 \times 10^4 \pm 1,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^4 \pm 1,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^4 \pm 1,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^4 \pm 1,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^4 \pm 1,00 \times 10^1$
<b>40</b>	$1,02 \times 10^7 \pm 1,13 \times 10^6$	$9,25 \times 10^6 \pm 3,74 \times 10^5$	$1,17 \times 10^7 \pm 8,13 \times 10^5$	$1,15 \times 10^7 \pm 1,08 \times 10^5$	$9,50 \times 10^6 \pm 1,05 \times 10^6$
<b>44</b>	$2,69 \times 10^7 \pm 9,87 \times 10^4$	$1,53 \times 10^7 \pm 2,14 \times 10^6$	$3,21 \times 10^7 \pm 2,08 \times 10^6$	$2,54 \times 10^7 \pm 2,48 \times 10^6$	$2,67 \times 10^7 \pm 1,11 \times 10^6$
<b>48</b>	$4,30 \times 10^7 \pm 3,48 \times 10^6$	$3,58 \times 10^7 \pm 4,74 \times 10^6$	$3,80 \times 10^7 \pm 8,19 \times 10^6$	$2,86 \times 10^7 \pm 8,12 \times 10^6$	$2,87 \times 10^7 \pm 5,81 \times 10^6$
<b>52</b>	$4,76 \times 10^7 \pm 9,87 \times 10^6$	$3,78 \times 10^7 \pm 5,37 \times 10^6$	$3,88 \times 10^7 \pm 5,49 \times 10^6$	$3,79 \times 10^7 \pm 5,90 \times 10^6$	$2,98 \times 10^7 \pm 1,03 \times 10^7$
<b>66</b>	$5,23 \times 10^7 \pm 3,65 \times 10^6$	$4,88 \times 10^7 \pm 4,39 \times 10^6$	$5,06 \times 10^7 \pm 1,24 \times 10^6$	$4,15 \times 10^7 \pm 4,91 \times 10^6$	$3,53 \times 10^7 \pm 4,51 \times 10^6$
	$5,83 \times 10^7 \pm 1,21 \times 10^7$	$7,11 \times 10^7 \pm 5,22 \times 10^6$	$6,08 \times 10^7 \pm 7,30 \times 10^6$	$5,15 \times 10^7 \pm 1,43 \times 10^7$	$3,49 \times 10^7 \pm 5,26 \times 10^6$

Priloga B4: Povprečne vrednosti števila celic *C. zemplinina* ZIM 842, med 66 urno čisto fermentacijo mošta sorte Malvazija po dodatku različnih koncentracij feniletanola in triptofola ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti štirih neodvisnih paralelk.

	Teoretične začetne koncentracije PheOH in TrpOH [ $\mu\text{M}$ ]				
	0 $\mu\text{M}$	350 $\mu\text{M}$	500 $\mu\text{M}$	750 $\mu\text{M}$	1000 $\mu\text{M}$
t [h]	Povp. št. celic/ml ± SD	Povp. št. celic/ml ± SD	Povp. št. celic/ml ± SD	Povp. št. celic/ml ± SD	Povp. št. celic/ml ± SD
0	$1,00 \times 10^4 \pm 1,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^4 \pm 1,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^4 \pm 1,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^4 \pm 1,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^4 \pm 1,00 \times 10^1$
28	$3,38 \times 10^6 \pm 8,51 \times 10^5$	$4,05 \times 10^6 \pm 6,24 \times 10^5$	$3,56 \times 10^6 \pm 1,29 \times 10^6$	$1,52 \times 10^6 \pm 1,16 \times 10^6$	$1,07 \times 10^6 \pm 1,97 \times 10^5$
40	$2,21 \times 10^7 \pm 5,73 \times 10^6$	$2,61 \times 10^7 \pm 1,20 \times 10^7$	$1,56 \times 10^7 \pm 1,20 \times 10^7$	$3,89 \times 10^7 \pm 7,19 \times 10^6$	$1,75 \times 10^7 \pm 7,40 \times 10^5$
44	$5,10 \times 10^7 \pm 8,64 \times 10^6$	$5,91 \times 10^7 \pm 1,27 \times 10^7$	$6,72 \times 10^7 \pm 3,27 \times 10^6$	$4,32 \times 10^7 \pm 8,63 \times 10^6$	$4,12 \times 10^7 \pm 1,32 \times 10^6$
48	$7,75 \times 10^7 \pm 9,25 \times 10^6$	$8,87 \times 10^7 \pm 9,80 \times 10^6$	$1,18 \times 10^8 \pm 1,15 \times 10^7$	$7,08 \times 10^7 \pm 8,08 \times 10^6$	$6,62 \times 10^7 \pm 7,30 \times 10^6$
52	$8,23 \times 10^7 \pm 3,11 \times 10^6$	$9,70 \times 10^7 \pm 9,03 \times 10^6$	$1,07 \times 10^8 \pm 9,78 \times 10^6$	$7,95 \times 10^7 \pm 2,92 \times 10^6$	$6,81 \times 10^7 \pm 8,17 \times 10^6$
66	$1,69 \times 10^8 \pm 4,14 \times 10^6$	$1,50 \times 10^8 \pm 1,87 \times 10^7$	$1,55 \times 10^8 \pm 1,52 \times 10^7$	$1,43 \times 10^8 \pm 1,93 \times 10^7$	$1,37 \times 10^8 \pm 1,45 \times 10^7$

Priloga C1: Dinamika rasti kvasovk *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon ( $T=22^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralel, brez (A,C) in po dodatku (B,D) feniletanola in triptofola v koncentraciji 1000  $\mu\text{M}$ . Legenda: *C. zemplinina* ▲ — □ v čisti kulturi; *S. cerevisiae* ▲ — □ v čisti kulturi; kvasovki v združeni starter kulturi ▲ — □.



Priloga C2: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) med čisto fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 (T=22 °C). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk, brez (A) in po dodatku (B) feniletanola in triptofola.

A)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842	
	Povp. št. celic ± SD [CFU/ml]	KV [%]	Povp. št. celic ± SD [CFU/ml]	KV [%]
0	$4,78 \times 10^5 \pm 3,22 \times 10^5$	67,46	$6,40 \times 10^5 \pm 5,66 \times 10^4$	8,84
1	$5,19 \times 10^6 \pm 5,68 \times 10^5$	10,95	$6,68 \times 10^6 \pm 2,76 \times 10^6$	41,27
2	$4,29 \times 10^6 \pm 1,30 \times 10^6$	30,38	$2,46 \times 10^7 \pm 1,09 \times 10^7$	44,22
8	$2,11 \times 10^6 \pm 1,43 \times 10^6$	67,69	$4,18 \times 10^7 \pm 5,59 \times 10^6$	13,37
14	$2,36 \times 10^4 \pm 1,11 \times 10^4$	47,13	$3,79 \times 10^7 \pm 7,36 \times 10^6$	19,42
16	$1,38 \times 10^4 \pm 5,30 \times 10^3$	38,30	$2,42 \times 10^7 \pm 3,59 \times 10^6$	14,87

B)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842	
	Povp. št. celic ± SD [CFU/ml]	KV [%]	Povp. št. celic ± SD [CFU/ml]	KV [%]
0	$4,78 \times 10^5 \pm 3,22 \times 10^5$	67,46	$5,70 \times 10^5 \pm 4,24 \times 10^4$	7,44
1	$2,61 \times 10^6 \pm 7,17 \times 10^5$	27,52	$6,03 \times 10^6 \pm 8,20 \times 10^5$	13,60
2	$4,42 \times 10^6 \pm 5,36 \times 10^5$	12,11	$4,69 \times 10^7 \pm 6,84 \times 10^6$	14,60
8	$9,63 \times 10^5 \pm 2,97 \times 10^5$	30,83	$5,04 \times 10^7 \pm 1,90 \times 10^7$	37,80
14	$9,38 \times 10^4 \pm 1,86 \times 10^4$	19,84	$3,13 \times 10^7 \pm 1,11 \times 10^7$	35,57
16	$1,41 \times 10^4 \pm 1,66 \times 10^3$	11,79	$2,48 \times 10^7 \pm 9,08 \times 10^6$	36,68

Priloga C3: Povprečno število kolonijskih enot (CFU/ml) med združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 (T=22 °C). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk, brez (A) in po dodatku (B) feniletanola in triptofola.

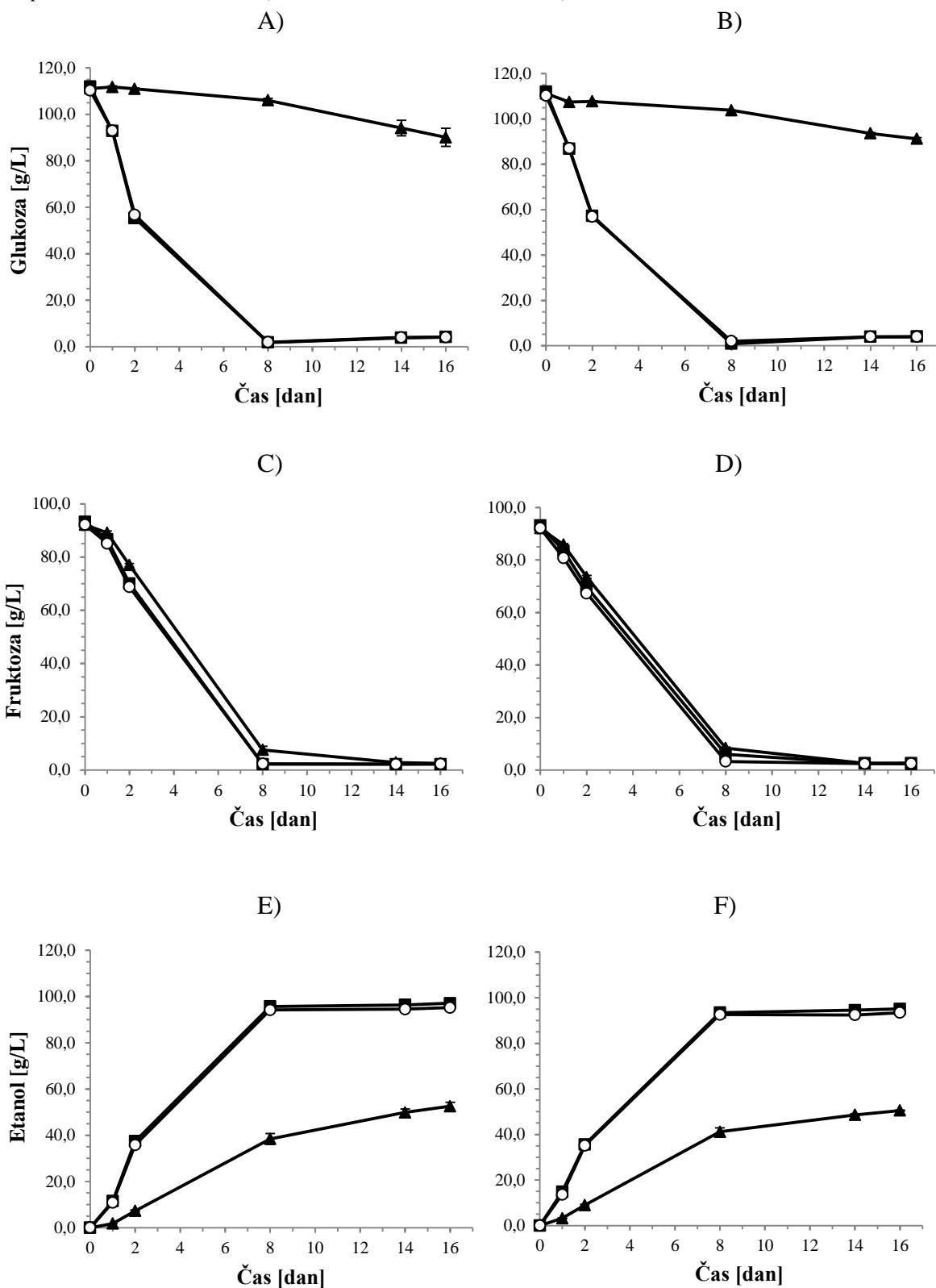
A)

Potek fermentacije [dan]	Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>			
	CFU/mL ± SD ZIM 1927	KV [%]	CFU/mL ± SD ZIM 842	KV [%]
0	$3,76 \times 10^5 \pm 2,63 \times 10^5$	69,96	$4,61 \times 10^5 \pm 1,15 \times 10^5$	24,85
1	$3,09 \times 10^6 \pm 1,35 \times 10^6$	43,67	$1,11 \times 10^6 \pm 2,31 \times 10^5$	20,93
2	$5,07 \times 10^6 \pm 2,37 \times 10^6$	46,76	$1,08 \times 10^6 \pm 8,39 \times 10^4$	7,78
8	$6,49 \times 10^5 \pm 1,34 \times 10^5$	20,58	$1,00 \times 10^2 \pm 0,00$	0,00
14	$3,50 \times 10^4 \pm 4,02 \times 10^3$	11,48		
16	$2,32 \times 10^4 \pm 1,19 \times 10^3$	5,13		

B)

Potek fermentacije [dan]	Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>			
	CFU/mL ± SD ZIM 1927	KV [%]	CFU/mL ± SD ZIM 842	KV [%]
0	$3,76 \times 10^5 \pm 2,63 \times 10^5$	69,96	$4,61 \times 10^5 \pm 1,15 \times 10^5$	24,85
1	$1,63 \times 10^6 \pm 2,79 \times 10^6$	17,09	$2,34 \times 10^6 \pm 2,94 \times 10^5$	12,55
2	$4,33 \times 10^6 \pm 1,86 \times 10^6$	42,88	$4,27 \times 10^6 \pm 1,87 \times 10^4$	43,73
8	$3,83 \times 10^6 \pm 1,31 \times 10^6$	34,14	$1,00 \times 10^2 \pm 0,00$	0,00
14	$2,63 \times 10^4 \pm 9,34 \times 10^3$	35,51		
16	$2,32 \times 10^4 \pm 2,63 \times 10^3$	69,96		

Priloga C4: Dinamika pretvorbe glukoze in fruktoze ter tvorba etanola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Skupini brez (A,C,E) in po dodatku (B,D,F) feniletanola in triptofola v koncentraciji  $1000\text{ }\mu\text{M}$ . Legenda: *C. zemplinina* ▲ v čisti kulturi; *S. cerevisiae* ■ v čisti kulturi; kvasovki v združeni starter kulturi ○.



Priloga C5: Dinamika tvorbe/porabe glicerola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk, brez (A) in po dodatku (B) feniletanola in triptofola.

A)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	0,00		0,00		0,00	
1	1,32 $\pm$ 0,05	3,52	0,44 $\pm$ 0,09	20,25	1,21 $\pm$ 0,04	3,17
2	2,60 $\pm$ 0,04	1,56	1,46 $\pm$ 0,12	8,02	2,48 $\pm$ 0,01	0,40
8	3,72 $\pm$ 0,02	0,49	6,87 $\pm$ 0,03	0,47	3,66 $\pm$ 0,06	1,72
14	3,74 $\pm$ 0,03	0,79	7,35 $\pm$ 0,09	1,20	3,69 $\pm$ 0,04	0,99
16	3,75 $\pm$ 0,01	0,39	7,50 $\pm$ 0,12	1,66	3,73 $\pm$ 0,02	0,63

B)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	0,00		0,00		0,00	
1	1,24 $\pm$ 0,01	0,55	0,42 $\pm$ 0,03	7,82	1,17 $\pm$ 0,01	0,54
2	2,13 $\pm$ 0,01	0,61	1,52 $\pm$ 0,09	6,17	2,09 $\pm$ 0,02	0,84
8	3,23 $\pm$ 0,03	1,02	6,06 $\pm$ 0,07	1,14	3,21 $\pm$ 0,02	0,71
14	3,25 $\pm$ 0,02	0,67	6,40 $\pm$ 0,09	1,42	3,22 $\pm$ 0,02	0,78
16	3,27 $\pm$ 0,03	1,07	6,49 $\pm$ 0,06	0,86	3,22 $\pm$ 0,01	0,44

Priloga C6: Dinamika tvorbe/porabe citronske kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk, brez (A) in po dodatku (B) feniletanola in triptofola.

A)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	0,99		0,96		0,99	
1	0,45 $\pm$ 0,05	11,15	0,98 $\pm$ 0,00	0,44	0,43 $\pm$ 0,01	3,22
2	0,85 $\pm$ 0,02	1,98	0,83 $\pm$ 0,11	12,74	0,43 $\pm$ 0,01	1,70
8	1,02 $\pm$ 0,02	1,63	3,87 $\pm$ 0,11	2,84	1,77 $\pm$ 0,08	4,62
14	1,01 $\pm$ 0,03	3,14	4,20 $\pm$ 0,03	0,78	1,01 $\pm$ 0,02	2,22
16	0,97 $\pm$ 0,02	2,19	3,92 $\pm$ 0,06	1,61	1,09 $\pm$ 0,04	3,86

B)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	0,99		0,96		0,99	
1	0,89 $\pm$ 0,02	2,18	0,98 $\pm$ 0,05	5,37	0,86 $\pm$ 0,03	3,15
2	0,83 $\pm$ 0,04	4,31	0,41 $\pm$ 0,04	9,03	0,71 $\pm$ 0,02	3,30
8	0,67 $\pm$ 0,04	5,46	4,87 $\pm$ 0,21	4,34	0,65 $\pm$ 0,03	4,32
14	0,64 $\pm$ 0,02	3,24	3,65 $\pm$ 0,10	2,81	0,72 $\pm$ 0,01	1,92
16	0,76 $\pm$ 0,03	3,49	3,71 $\pm$ 0,20	5,34	0,69 $\pm$ 0,01	2,05

Priloga C7: Dinamika tvorbe/porabe jabolčne kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk, brez (A) in po dodatku (B) feniletanola in triptofola.

A)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulti S. cerevisiae in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	4,91		4,78		4,78	
1	3,61 $\pm$ 0,11	3,13	4,90 $\pm$ 0,02	0,37	3,59 $\pm$ 0,07	2,03
2	3,62 $\pm$ 0,00	0,07	4,92 $\pm$ 0,11	2,32	2,87 $\pm$ 0,05	1,84
8	2,39 $\pm$ 0,04	1,56	3,21 $\pm$ 0,13	4,08	2,98 $\pm$ 0,16	5,33
14	2,43 $\pm$ 0,03	1,39	2,51 $\pm$ 0,11	4,39	2,39 $\pm$ 0,01	0,63
16	2,19 $\pm$ 0,12	5,31	2,18 $\pm$ 0,11	5,06	2,24 $\pm$ 0,02	0,96

B)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulti S. cerevisiae in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	4,91		4,78		4,78	
1	4,70 $\pm$ 0,06	1,29	3,64 $\pm$ 0,03	0,84	4,61 $\pm$ 0,05	1,15
2	3,20 $\pm$ 0,29	9,08	3,59 $\pm$ 0,07	1,99	3,53 $\pm$ 0,33	9,42
8	2,71 $\pm$ 0,12	4,30	3,50 $\pm$ 0,19	5,50	2,29 $\pm$ 0,09	3,82
14	2,35 $\pm$ 0,08	3,59	2,31 $\pm$ 0,10	4,49	2,35 $\pm$ 0,07	2,92
16	2,40 $\pm$ 0,08	3,44	2,09 $\pm$ 0,16	7,61	2,32 $\pm$ 0,04	1,86

Priloga C8: Dinamika tvorbe/porabe ocetne kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk, brez (A) in po dodatku (B) feniletanola in triptofola.

A)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulti S. cerevisiae in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	0,70		0,65		0,68	
1	1,66 $\pm$ 0,23	13,79	1,01 $\pm$ 0,00	0,25	2,12 $\pm$ 0,06	2,99
2	1,02 $\pm$ 0,03	3,09	2,83 $\pm$ 0,15	5,38	0,12 $\pm$ 0,04	37,33
8	1,37 $\pm$ 0,03	2,05	10,84 $\pm$ 0,78	7,17	2,77 $\pm$ 0,11	3,86
14	2,49 $\pm$ 0,13	5,25	10,08 $\pm$ 0,55	5,51	2,49 $\pm$ 0,14	5,60
16	1,69 $\pm$ 0,06	3,36	5,59 $\pm$ 0,23	4,03	2,00 $\pm$ 0,16	7,93

B)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulti S. cerevisiae in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	0,83		0,65		0,68	
1	0,94 $\pm$ 0,07	7,13	2,19 $\pm$ 0,01	0,47	1,00 $\pm$ 0,02	1,92
2	0,96 $\pm$ 0,00	0,35	3,16 $\pm$ 0,06	1,79	0,79 $\pm$ 0,08	9,63
8	2,46 $\pm$ 0,06	2,43	13,24 $\pm$ 0,71	5,36	1,48 $\pm$ 0,04	2,44
14	2,16 $\pm$ 0,22	10,16	12,99 $\pm$ 0,48	3,67	2,76 $\pm$ 0,07	2,66
16	0,95 $\pm$ 0,07	7,12	10,38 $\pm$ 0,14	1,33	1,33 $\pm$ 0,03	2,25

Priloga C9: Dinamika tvorbe/porabe vinske kisline med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk, brez (A) in po dodatku (B) feniletanola in triptofola.

A)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	3,05		3,27		2,89	
1	1,64 $\pm$ 0,07	3,97	3,09 $\pm$ 0,00	0,09	1,87 $\pm$ 0,04	2,36
2	1,75 $\pm$ 0,07	3,95	2,94 $\pm$ 0,13	4,52	1,11 $\pm$ 0,11	9,79
8	1,45 $\pm$ 0,16	11,20	2,79 $\pm$ 0,01	0,34	1,64 $\pm$ 0,11	6,95
14	3,49 $\pm$ 0,10	2,73	3,66 $\pm$ 0,03	0,93	3,66 $\pm$ 0,03	0,93
16	3,64 $\pm$ 0,07	1,91	4,10 $\pm$ 0,01	0,16	3,63 $\pm$ 0,02	0,65

B)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [g/L]	KV [%]
0	3,05		3,27		2,89	
1	1,76 $\pm$ 0,04	2,06	1,30 $\pm$ 0,10	7,63	1,98 $\pm$ 0,16	7,93
2	1,21 $\pm$ 0,22	17,88	2,02 $\pm$ 0,14	6,95	1,39 $\pm$ 0,08	5,57
8	1,21 $\pm$ 0,04	3,04	2,90 $\pm$ 0,15	5,23	1,60 $\pm$ 0,05	2,87
14	3,52 $\pm$ 0,01	0,21	3,53 $\pm$ 0,06	1,71	3,53 $\pm$ 0,06	1,71
16	3,62 $\pm$ 0,04	1,18	3,91 $\pm$ 0,06	1,43	3,52 $\pm$ 0,02	0,47

Priloga C10: Dinamika tvorbe feniletanola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralelk, brez (A) in po dodatku (B) feniletanola in triptofola.

A)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	KV [%]
0	0,15		0,18		0,15	
1	18,30 $\pm$ 0,62	3,39	0,17 $\pm$ 0,03	20,60	15,31 $\pm$ 1,32	8,59
2	175,24 $\pm$ 4,47	2,55	16,01 $\pm$ 1,72	10,74	152,85 $\pm$ 3,53	2,31
8	401,85 $\pm$ 6,17	1,54	139,52 $\pm$ 15,37	11,02	395,82 $\pm$ 5,44	1,37
14	416,69 $\pm$ 4,41	1,06	158,46 $\pm$ 11,72	7,40	414,28 $\pm$ 6,13	1,48
16	458,62 $\pm$ 6,15	1,34	184,75 $\pm$ 15,62	8,46	446,48 $\pm$ 5,58	1,25

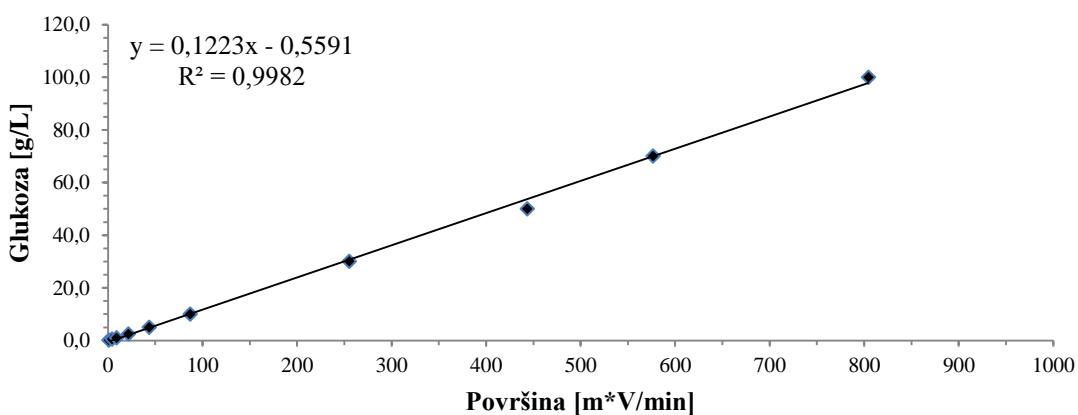
B)

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulturi <i>S. cerevisiae</i> in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	KV [%]
0	907,11		778,78		929,16	
1	916,11 $\pm$ 3,76	0,41	814,38 $\pm$ 4,49	0,55	897,66 $\pm$ 3,31	0,37
2	970,62 $\pm$ 3,84	0,40	807,60 $\pm$ 2,49	0,31	953,67 $\pm$ 7,03	0,74
8	1132,94 $\pm$ 10,60	0,94	912,93 $\pm$ 1,79	0,20	1158,83 $\pm$ 9,48	0,82
14	1217,28 $\pm$ 10,19	0,84	980,27 $\pm$ 5,78	0,59	1242,67 $\pm$ 5,96	0,48
16	1332,12 $\pm$ 25,02	1,88	1067,05 $\pm$ 6,00	0,56	1360,76 $\pm$ 8,13	0,60

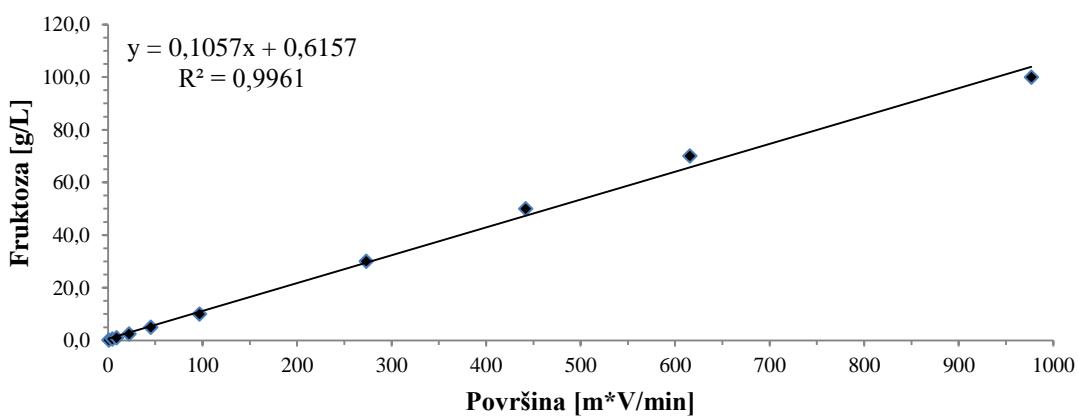
Priloga C11: Dinamika tvorbe/porabe triptofola med čisto in združeno fermentacijo mošta sorte Sauvignon s kvasovkama *C. zemplinina* ZIM 842 in *S. cerevisiae* ZIM 1927 ( $T=22^{\circ}\text{C}$ ). Podane so povprečne vrednosti treh neodvisnih paralel, po dodatku feniletanolu in triptofola.

Potek fermentacije [dan]	<i>S. cerevisiae</i> ZIM 1927		<i>C. zemplinina</i> ZIM 842		Združeni kulti S. cerevisiae in <i>C. zemplinina</i>	
	Povp. konc $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	KV [%]	Povp. konc $\pm$ SD [ $\mu\text{M}$ ]	KV [%]
0	986,12		884,80		974,71	
1	960,12 $\pm$ 10,10	1,05	869,95 $\pm$ 12,37	1,42	948,71 $\pm$ 7,67	0,81
2	912,26 $\pm$ 7,27	0,80	844,23 $\pm$ 6,16	0,73	899,56 $\pm$ 5,02	0,56
8	922,71 $\pm$ 2,19	0,24	826,60 $\pm$ 6,68	0,81	907,86 $\pm$ 8,62	0,95
14	953,36 $\pm$ 0,05	0,53	846,16 $\pm$ 3,31	0,39	935,35 $\pm$ 5,52	0,59
16	1035,43 $\pm$ 3,54	0,34	919,98 $\pm$ 2,41	0,26	1014,31 $\pm$ 9,14	0,90

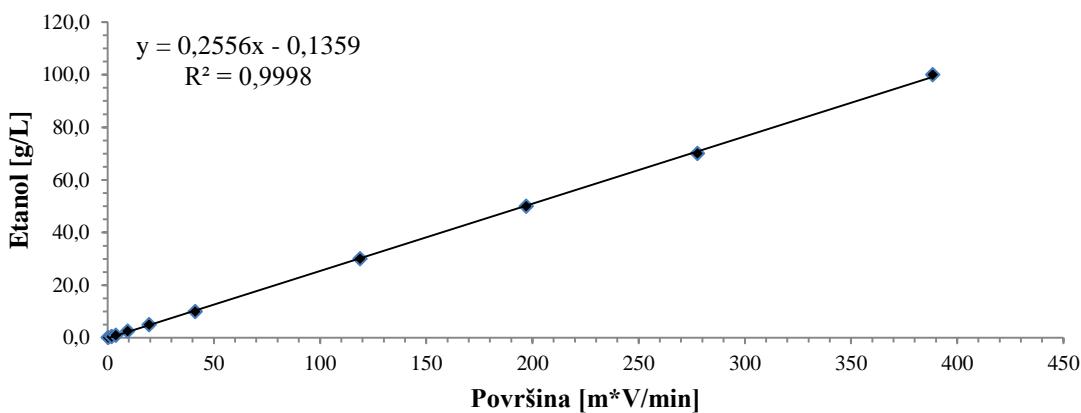
Priloga D1: Umeritvena krivulja za določanje dinamike glukoze [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



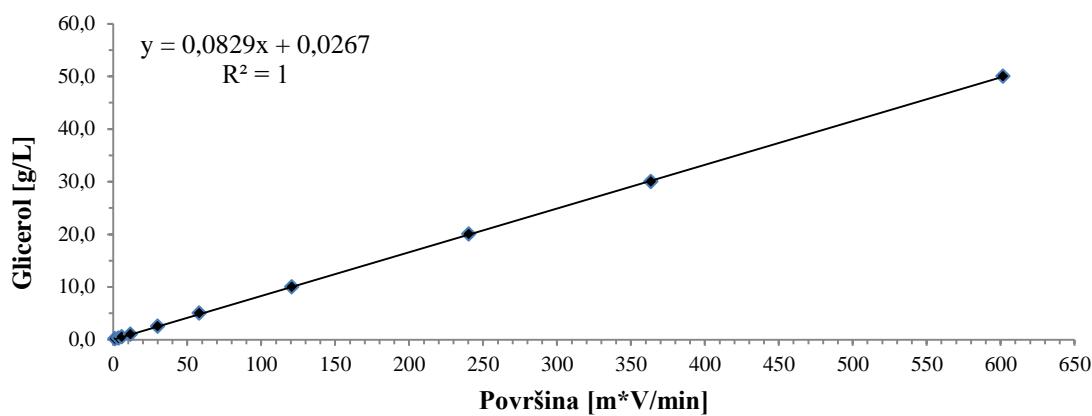
Priloga D2: Umeritvena krivulja za določanje dinamike fruktoze [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



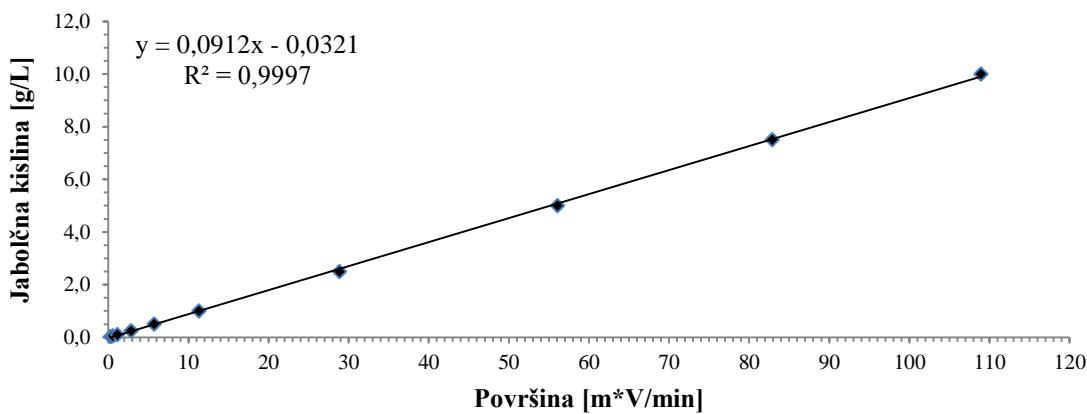
Priloga D3: Umeritvena krivulja za določanje dinamike etanola [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



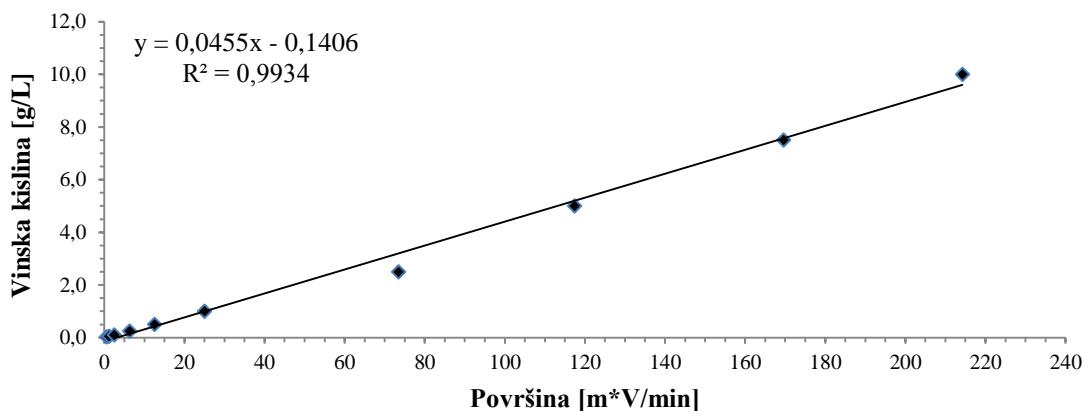
Priloga D4: Umeritvena krivulja za določanje dinamike glicerola [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



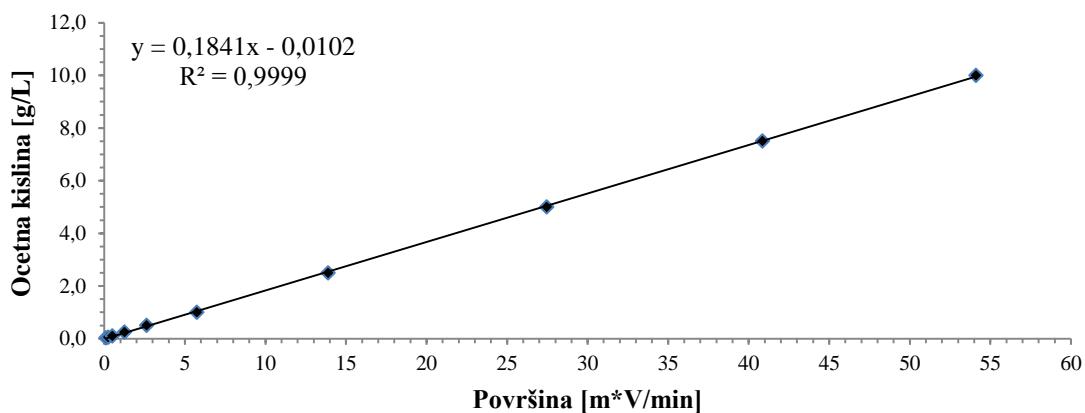
Priloga D5: Umeritvena krivulja za določanje dinamike jabolčne kisline [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



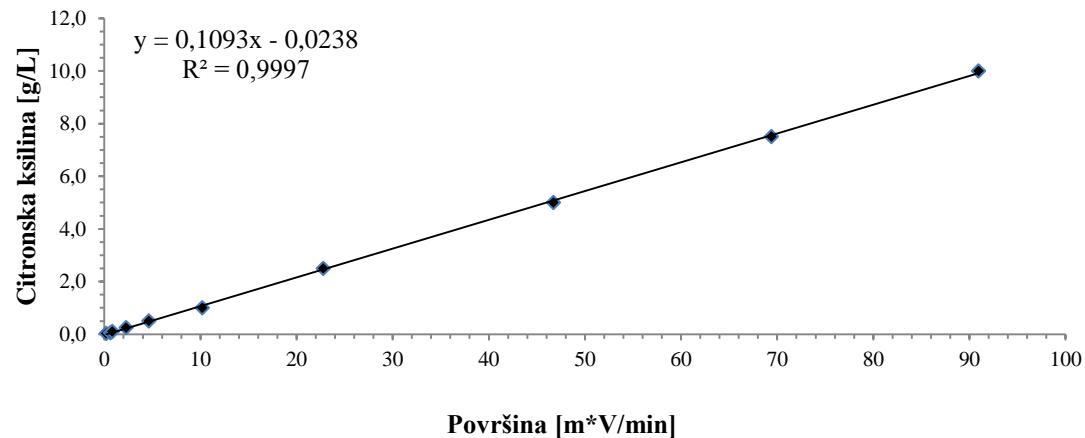
Priloga D6: Umeritvena krivulja za določanje dinamike vinske kisline [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



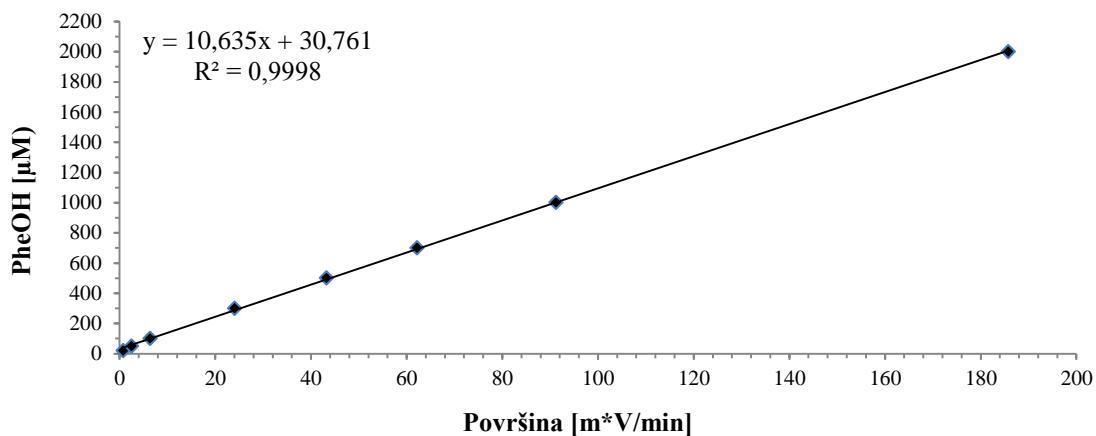
Priloga D7: Umeritvena krivulja za določanje dinamike ocetne kisline [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



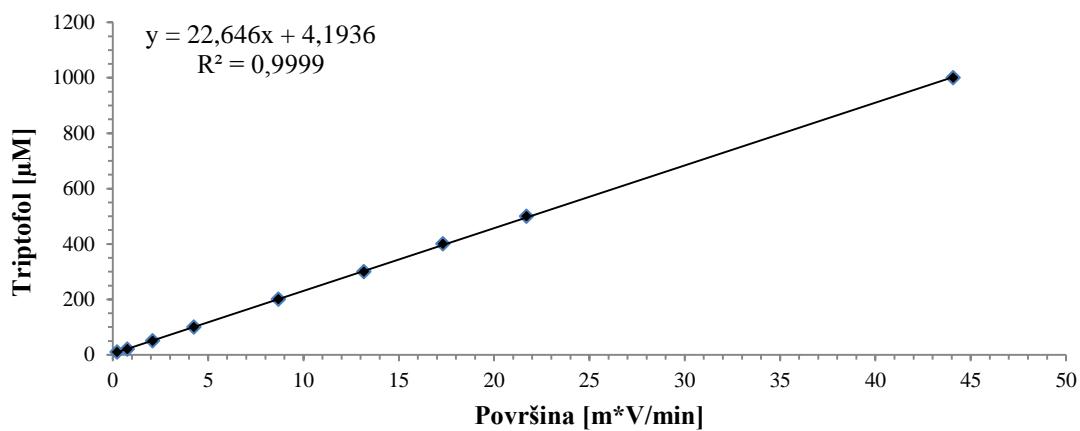
Priloga D8: Umeritvena krivulja za določanje dinamike citronske kisline [g/L] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



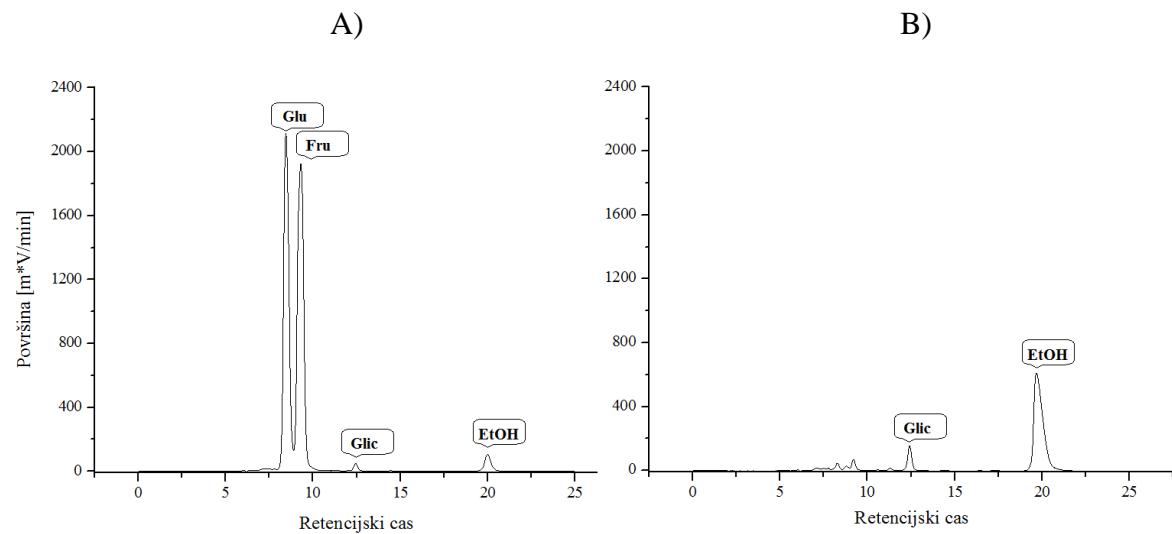
Priloga D9: Umeritvena krivulja za določanje dinamike feniletanola [ $\mu\text{M}$ ] v vzorcih odvzetih med fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.



Priloga D10: Umeritvena krivulja za določanje dinamike triptofola [ $\mu\text{M}$ ] v vzorcih odvzetih med alkoholno fermentacijo mošta, analiziranih s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti



Priloga E1: Kromatograf po 24 urni (A) in 7 dnevni (B) čisti fermentaciji s *S. cerevisiae* ZIM 1927. Prikazani so površine v odvisnosti od retencijskega časa za glukozo (Glu), fruktozo (Fru), glicerol (Glic) in etanol (EtOH).



Priloga F1: Fermentorji na magnetnih mešalih med alkoholno fermentacijo ( $T=22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

