

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Neža MANDL

**GENETSKA RAZNOLIKOST KVASOVK IZ
SPONTANIH FERMENTACIJ JABOLČNEGA VINA
IN NJIHOV BIOTEHNOLOŠKI POTENCIAL**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Neža MANDL

**GENETSKA RAZNOLIKOST KVASOVK IZ SPONTANIH
FERMENTACIJ JABOLČNEGA VINA IN NJIHOV
BIOTEHNOLOŠKI POTENCIAL**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

**GENETIC DIVERSITY OF THE YEASTS IN SPONTANEOUS
FERMENTATIONS OF APPLE CIDER AND THEIR
BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Nežo Čadež, za somentorico prof. dr. Tatjano Košmerl in za recenzentko doc. dr. Polono Zalar.

Mentorica: doc. dr. Neža Čadež

Somentorica: prof. dr. Tatjana Košmerl

Recenzentka: doc. dr. Polona Zalar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: izr. prof. dr. Marjanca STARČIČ ERJAVEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Članica: prof. dr. Tatjana KOŠMERL
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Neža Mandl

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 663.31:582.282.23:543.2/.9(043)=163.6
KG sadna vina/jabolčno vino/alkoholna fermentacija/kvasovke/genetska raznolikost/kemijska analiza/senzorična analiza
AV MANDL, Neža, dipl. mikrobiol. (UN)
SA ČADEŽ, Neža (mentorica)/KOŠMERL, Tatjana (somentorica)/ZALAR, Polona (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2017
IN GENETSKA RAZNOLIKOST KVASOVK IZ SPONTANIH FERMENTACIJ JABOLČNEGA VINA IN NJIHOV BIOTEHNOLOŠKI POTENCIJAL
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XII, 68 str., 12 pregl., 20 sl., 2 pril., 81 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Namen magistrske naloge je bil določiti sestavo mikrobiote enajstih vzorcev jabolčnega vina iz visoko- in srednjegorskih kmetij koroške regije, ter jo povezati s kemijskimi in senzoričnimi značilnostmi vzorcev. V prvem delu naloge smo s selektivnih trdnih gojiščih izolirali kvasovke in bakterije, ki smo jih na podlagi morfologije kolonij razdelili v skupine. Vsakemu predstavniku skupine smo izolirali DNA, ter kvasovke na podlagi restriktične analize regije ITS, bakterije pa na osnovi PCR prstnega odtisa z mikrosatelitskim začetnim oligonukleotidom (GTG)_{5x}, uvrstili v genetske skupine. Le-te smo identificirali na osnovi sekvenciranih črtnih kod predstavnikov. Drugi del naloge je obsegal analizi WineScanTM Foss in HPLC, s čemer smo pridobili fizikalno-kemijske parametre kakovosti vina, določili koncentracijo hlapnih fenolov in vsebnost biogenih aminov. Tretji del naloge je obsegal senzorično analizo. Skupno smo iz vseh vzorcev identificirali petnajst vrst kvasovk in dvanajst vrst bakterij, določili njihovo relativno številčnost in povprečne koncentracije v posameznem vzorcu jabolčnega vina. V večini vzorcev sta prevladovali kvasovka *Kregervanrija fluxuum* in bakterija *Oenococcus oeni*, identificirali pa smo tudi ocetnokislinski bakteriji *Acetobacter cerevisiae* in *Gluconobacter oxydans*, ter patogeno vrsto *Bacillus cereus*. Sedem od devetindvajsetih sevov treh vrst kvasovk rodu *Saccharomyces*, določenih s kariotipizacijo, je pokazalo biotehnološki potencial v smislu zmožnosti rasti pri nizkih temperaturah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 663.31:582.282.23:543.2/.9(043)=163.6
CX fruit ciders/apple cider/alcoholic fermentation/yeasts/genetic diversity/chemical analysis/sensory analysis
AU MANDL, Neža
AA ČADEŽ, Neža (supervisor)/ KOŠMERL, Tatjana (co-advisor)/ZALAR, Polona (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2017
TY GENETIC DIVERSITY OF THE YEASTS IN SPONTANEOUS FERMENTATIONS OF APPLE CIDER AND THEIR BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XII, 68 p., 12 tab., 20 fig., 2 ann., 81 ref.
LA sl
AI sl/en
AB The purpose of the master thesis was to determine microbiota of eleven ciders, produced at high- and middle mountain farms in Koroška region, in order to correlate the composition of microbial communities to chemical and sensorical characteristics. In the first part of the experiment yeasts and bacteria were isolated on selective media and quantified, based on their macromorphology. Further, the representative colonies of yeasts and bacteria were grouped based on their restriction patterns of ITS region and microsatellite (GTG)_{5x} PCR fingerprinting, respectively, and were identified based on DNA sequence of the barcoding regions. In the second part of the experiment cider quality assessment, concentrations of volatile phenols and biogenic amines were determined by WineScan™ Foss and HPLC analysis. The third part involved sensory analysis. Fifteen yeast and twelve bacterial species were identified from all cider samples, their relative abundances and average concentration values were assessed. Yeast *Kregenvanrija fluxuum* and bacteria *Oenococcus oeni* were present in most of the sampled ciders. Acetic acid bacteria *Acetobacter cerevisiae* and *Gluconobacter oxydans* and pathogenic *Bacillus cereus* were present as well. Seven out of twenty-nine *Saccharomyces* strains, classified in three species by karyotyping, were cryotolerant which is a biotechnologically relevant trait.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PRILOG.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
SLOVARČEK.....	XII
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE.....	1
1.1.1 Cilji magistrske naloge.....	1
1.1.2 Delovne hipoteze magistrske naloge.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 JABLNE V SLOVENIJI.....	3
2.2 PROCES PRIDELAVE JABOLČNEGA SOKA.....	3
2.3 LASTNOSTI JABOLČNEGA SOKA.....	4
2.3.1 Kemijske lastnosti.....	4
2.3.2 Mikrobiološke lastnosti.....	5
2.4 PROCES FERMENTACIJE.....	5
2.4.1 Alkoholna fermentacija.....	6
2.4.2 Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija.....	8
2.5 LASTNOSTI JABOLČNEGA VINA.....	10
2.5.1 Senzorične lastnosti.....	10
2.5.2 Antioksidanti.....	10
2.6 KVAR JABOLČNEGA VINA.....	11
2.6.1 Upočasnjenja ali zaustavljena fermentacija.....	11
2.6.2 Tvorba biogenih aminov.....	11
2.6.3 Bolezen jabolčnega vina.....	12
2.6.4 Tvorba hlapnih fenolov.....	12
2.6.5 Sluzavost.....	14
2.6.6 Tvorba ocetne kisline.....	14
2.6.7 Tvorba gvajakola.....	14
2.6.8 Tvorba akroleina.....	15
3 MATERIAL IN METODE.....	16
3.1 MATERIAL.....	16
3.1.1 Laboratorijski pribor.....	16
3.1.2 Laboratorijske aparature.....	16

3.1.3 Mikrobiološka gojišča.....	17
3.1.4 Pufri.....	18
3.1.5 Reagenti za izolacijo DNA.....	19
3.1.6 Reagenti za PCR.....	20
3.1.7 Reagenti za agarozno gelsko elektroforezo.....	21
3.1.8 Reagenti za restrikcijo regije ITS kvasovk.....	21
3.1.9 Mešanica ExoSAP za encimsko čiščenje PCR pomnožkov.....	22
3.1.10 Reagenti za izolacijo DNA za kariotipizacijo.....	22
3.2 METODE.....	23
3.2.1 Mikrobiološki del.....	25
3.2.2 Fizikalno - kemijske analize jabolčnega vin.....	29
4 REZULTATI.....	30
4.1 VZORČENJE.....	30
4.2 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA JABOLČNIH VIN.....	31
4.2.1 Izolacija kvasovk in bakterij iz vzorcev jabolčnega vina in brisov sodov.....	31
4.2.2 Koncentracija kvasovk in bakterij v vzorcih jabolčnih vin.....	31
4.2.3 Restriksijska analiza regije ITS kvasovk.....	32
4.2.4 Identifikacija prisotnih vrst v jabolčnem vinu.....	34
4.2.5 Identifikacija prisotnih vrst na površini sodov.....	41
4.2.6 Elektroforetska kariotipizacija sevov <i>Saccharomyces</i>.....	48
4.3 FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE.....	50
4.3.1 Vsebnost biogenih aminov.....	50
4.3.2 Fizikalno-kemijski parametri z analizo WineScan™ Foss.....	51
4.3.3 Vsebnost hlapnih fenolov.....	53
4.4 SENZORIČNA ANALIZA.....	54
5 RAZPRAVA.....	56
5.1 SESTAVA MIKROBIOTE TRADICIONALNIH JABOLČNIH VIN.....	56
5.2 VPLIV MIKROBIOTE NA KEMIJSKE IN SENZORIČNE LASTNOSTI VZORCEV.....	58
5.3 BIOTEHNOLOŠKI POTENCIAL SEVOV RODU <i>Saccharomyces</i>.....	60
6 SKLEPI.....	61
7 POVZETEK.....	62
8 VIRI.....	63
ZAHVALA	69
PRILOGE	70

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava mešanice za PCR z začetnimi in končnimi koncentracijami reagentov	20
Preglednica 2: Sekvenca, smer, velikost in funkcija začetnih oligonukleotidov za PCR in sekvenciranje	20
Preglednica 3: Prepoznavna mesta restriktijskih encimov	21
Preglednica 4: Protokoli za pomnoževanje DNA	26
Preglednica 5: Lokacijski in pridelovalni podatki o kmetijah, na katerih je potekalo vzorčenje.....	30
Preglednica 6: Povprečno št. kolonijskih enot in standardni odklon kvasovk, zrastlih na gojišču YPD in bakterij, zrastlih na gojišču MRS v vzorcih jabolčnega vina.....	32
Preglednica 7: Rezultati identifikacije sevov <i>Saccharomyces</i> z elektroforetsko kariotipizacijo	48
Preglednica 8: Rezultati rasti sevov <i>Saccharomyces</i> pri različnih temperaturah.....	49
Preglednica 9: Rezultati kemijske analize histamin (biogeni amini)	50
Preglednica 10: Rezultati analize WineScan TM Foss jabolčnega vina	51
Preglednica 11: Koncentracije 4-vinilfenola (4-VF), 4-vinilgvajakola (4-VG), 4-etilfenola (4-EF) in 4-etilgvajakola (4-EG) v jabolčnih vinih z enajstih lokacij v µg/L	54
Preglednica 12: Rezultati senzorične analize jabolčnega vina	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema nekaterih procesov, ki potekajo med alkoholno fermentacijo jabolčnega vina (de la Roza in sod., 2003)	7
Slika 2: Shema procesa jabolčno-mlečnokislinske fermentacije (Poolman in sod., 1991) ..	9
Slika 3: Biosinteza pot hlapnih fenolov iz hidroksicimetnih estrov v jabolčnem vinu (Buron in sod., 2012).....	13
Slika 4: Shema poteka raziskovalnega dela	24
Slika 5: rDNA regija, ki se pomnožuje z začetnimi oligonukleotidi ITS1 in ITS4 (Guillamón in sod., 1998).....	27
Slika 6: Primer ločevanja restrikcijskih fragmentov pomnožkov PCR regije ITS kvasovk z agarozno gelsko elektroforezo.....	33
Slika 7: Primer ločevanja pomnožkov DNA bakterij, pomnoženih z mikrosatelitskim začetnim oligonukleotidom (GTG) _{5x} z agarozno gelsko elektroforezo.....	34
Slika 8: Relativna številčnost vrst kvasovk v jabolčnih vinih	35
Slika 9: Koncentracije posameznih vrst kvasovk (CFU/mL) glede na lokacijo vzorcev jabolčnega vina	36
Slika 10: Relativna številčnost bakterij v jabolčnih vinih	38
Slika 11: Koncentracije posameznih vrst bakterij (CFU/ml) glede na lokacijo vzorev jabolčnega vina	39
Slika 12: Relativna številčnost bakterij in kvasovk v jabolčnih vinih	40
Slika 13: Koncentracije posameznih vrst bakterij in kvasovk glede na lokacijo vzorca jabolčnega vina	41
Slika 14: Relativna številčnost kvasovk na površini sodov (bris)	42
Slika 15: Koncentracije posameznih vrst kvasovk glede na lokacijo vzorca brisa površine soda.....	43
Slika 16: Relativna številčnost bakterij na površini sodov (bris)	44
Slika 17: Koncentracije posameznih vrst bakterij glede na lokacijo vzorca brisa površine soda.....	45
Slika 18: Relativna številčnost bakterij in kvasovk v vzorcih brisov površine sodov.....	46
Slika 19: Koncentracije posameznih vrst bakterij in kvasovk glede na lokacijo vzorca brisa površine sodov	47
Slika 20: Elektroforetski kariotipi izbranih sevov <i>Saccharomyces</i> spp.....	49

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Slike trdnih gojišč YPD, MRS in gojišča po Frauterju, nacepljenih z različnimi redčitvami vzorcev jabolčnih vin in brisov površin sodov

Priloga A1: Primeri paralelk plošč z gojiščem YPD s kloramfenikolom, nacepljenih z vzorci jabolčnih vin

Priloga A2: Primeri paralelk plošč z gojiščem YPD s kloramfenikolom, nacepljenih z vzorci brisov površine sodov

Priloga A3: Primeri paralelk plošč z gojiščem MRS s cikloheksimidom, nacepljenih z vzorci jabolčnih vin

Priloga A4: Primeri paralelk plošč z gojiščem MRS s cikloheksimidom, nacepljenih z vzorci brisov površin sodov

Priloga A5: Primera plošč z gojiščem po Frauterju, nacepljena z vzorci jabolčnih vin

Priloga A6: Primera plošče z gojiščem po Frauterju, nacepljena z vzorcem brisa površine soda

PRILOGA B: Prikaz lokacij vzorčenja na izrezu zemljevida Slovenije in prikaz podrobnih lokacij vzorčenja

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

4-EF	4-etilfenol
4-EG	4-etilgvajakol
4-VF	4-vinilfenol
4-VG	4-vinilgvajakol
Agar BCA	selektivni agar za rast bakterije <i>Bacillus cereus</i> (ang. <i>Bacillus cereus</i> Agar)
Agar DRBC	agar z dikloranom in barvilom Rose bengal (ang. Dichloran Rose Bengal Agar)
Agar MRS	agar po DeMan, Rogosa in Sharpe
Agar YPD	agar s kvasnim ekstraktom, peptonom in dekstrozo (ang. Yeast Extract Peptone Dextrose Agar)
Agaroza LMP	agaroza z nizkim tališčem (ang. Low Melting Point Agarose)
Celice VBNC	žive, nekultivabilne celice (ang. Viable But Not Countable)
CFU	kolonijska enota (ang. Colony Forming Unit)
dATP	deoksiadenin trifosfat (ang. Deoxyadenosine Triphosphate)
dCTP	deoksicitozin trifosfat (ang. Deoxycytidine Triphosphate)
dGTP	deoksigvanin trifosfat (ang. Deoxyguanosine Triphosphate)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. Deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat (ang. Deoxynucleotide Triphosphate)
DTT	ditiotreitol
dTTP	deoksitimidintrifosfat (ang. Thymidine Triphosphate)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (ang. Ethylenediaminetetraacetic Acid)
EtAC	etil acetat
GLIC	glicerol
HK	hlapne kisline
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija (ang. High Performance Liquid Chromatography)
JK	jabolčna kislina
KGZ	Kmetijsko-gozdarski zavod
MeOH	metanol
MK	mlečna kislina
obr/min	obrati na minuto
OPA	Ortoftalaldehid (ang. Ortophtaldehid)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction)
PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem polju (ang. Pulsed-field Gel Electrophoresis)
ppb	število delcev na milijardo (ang. Parts Per Billion)
Pufer TBE	pufer TRIS-borova kislina-EDTA

Regija IRS	regija ponavljačih se razpršenih kodirajočih zaporedij DNA (ang. Interspersed Repetitive Sequence)
Regija ITS	regija notranjih distančnikov ribosomske DNA (ang. Internal Transcribed Spacer)
RFLP	polimorfizem dolžine restrikcijskih fragmentov (ang. Restriction Fragment Length Polymorphism)
RG	relativna gostota
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (ang. Ribosomal Ribonucleic Acid)
RS	reducirajoči sladkorji
SK	skupne kisline
sp. nov.	nova vrsta (lat. <i>species nova</i>)
SPE	sladkorja prosti ekstrakt
SSE	skupni suhi ekstrakt
subsp.	podvrsta (ang. subspecies)
U	enota (ang. Unit)
var.	varieteta
VK	vinska kislina

SLOVARČEK

Aw vrednost mera za aktivnost vode

Derivatizacija reakcija med derivatizacijskim reagentom in preiskovano molekulo, pri čemer nastanejo fluorescenčni derivati, ki povzročijo pomik absorbance k večjim vrednostim valovnih dolžin in s tem izboljšanje meje detekcije posamezne metode

pH mera za koncentracijo hidroksilnih ionov v raztopini

1 UVOD

Jabolčno vino je tradicionalna alkoholna pijača koroške regije, ki leži na severnem delu Slovenije. Največja proizvodnja jabolčnega vina v Evropi je sicer v Angliji, proizvajajo pa ga tudi v Španiji, Franciji, Nemčiji, Belgiji, Avstriji, Švici, na Finskem in na Irskem. Izven Evrope jabolčno vino proizvajajo v Severni, Srednji in Južni Ameriki, Južni Afriki in Avstraliji (Lea in Drilleau, 2003). Tradicionalno za pripravo pijače uporabljajo organsko pridelana jabolka starih visokodebelnih sort jablan, kot so kanadka, štajerski mošancelj, goriška sevka, carjevič, krivopecelj, bobovec, grafenštajnc, idr. (Somrak, 2014). Od namiznih sort se razlikujejo v tem, da so pogosto drugačnih oblik, tekstur, barv ter okusov, zato dajo različni kultivarji fermentiranim proizvodom raznolike okuse.

Jabolčno vino tradicionalno pridelujejo iz jabolčnega soka s spontano fermentacijo, ki jo vršijo sevi, prisotni na sadju, opremi, v zraku in vodi, v prostorih pridelave in shranjevanja jabolčnega vina, brez dodatka komercialnih startrskih kultur (Morrissey in sod., 2004). Proces fermentacije poteka v dveh fermentacijskih stopnjah – prva je alkoholna fermentacija, ki jo vršijo kvasovke, in druga je jabolčno-mlečnokislinska fermentacija, ki jo vršijo mlečnokislinske bakterije (Beech, 1972; Jakubík, 2011). Ker se za proces fermentacije ne dodaja izbranih komercialnih starterjev, so pogosto prisotne kontaminacije in posledično kvar jabolčnega vina.

Preučevanje mikrobne združbe tradicionalnih živilskih izdelkov, pridelanih s spontanimi fermentacijami, je pomembno s stališča ohranjanja biotske raznovrstnosti in posledično ohranitve raznolikosti okusov tradicionalnih pijač. Na drugi strani pa je poznavanje mikroorganizmov pomembno za preprečevanje kontaminacij in nadzor procesa za pridelavo kakovostnega proizvoda. Zaradi hitro spremenjajočih se podnebnih sprememb prihaja tudi do spremembe pojavnosti vrst v okolju, zato je pomembno prisotne seve proučiti in jih shraniti v zbirkah, s čimer se prepreči njihovo izumrtje.

1.1 CILJI IN DELOVNE HIPOTEZE

1.1.1 Cilji magistrske naloge

- Določiti strukturo združb kvasovk in bakterij, izoliranih iz enajstih vzorcev jabolčnih vin in površin lesenih sodov za shranjevanje jabolčnih vin na visoko- in srednjegorskih kmetijah koroške regije,
- primerjati kemijske parametre vzorcev jabolčnih vin,
- povezati sestavo mikrobiote jabolčnega vina s kemijskimi značilnostmi vzorcev,
- oceniti biotehnološki potencial identificiranih vrst rodu *Saccharomyces*.

1.1.2 Delovne hipoteze magistrske naloge

- Število kvasovk bo zaradi končanega procesa prve fermentacijske stopnje v času odvzema vzorcev manjša od števila mlečnokislinskih bakterij,
- relativna številčnost sevov rodu *Saccharomyces* bo manjša v primerjavi s prisotnostjo ne-*Saccharomyces* vrst rodu *Dekkera*,
- relativna številčnost ocetnokislinskih bakterij bo minimalna oz. nična.

2 PREGLED OBJAV

2.1 JABLNE V SLOVENIJI

Leta 2014 so v Sloveniji zabeležili 27.235 ha trajnih nasadov jablan, od tega 2.545 ha intenzivnih sadovnjakov, v katerih je bilo posajenih 7.140.051 dreves jablan (SURS, 2015). Razlogi za tolikšno posajenost zemljišč z jablanami v Sloveniji so:

- jablana je najbolj primerna za pridelavo v podnebnih razmerah, kakršne ima Slovenija,
- ekološki pomen ohranjanja biotske raznolikosti in živalskih vrst, ki prebivajo oz. se hranijo v sadovnjakih (velik vpliv ima čebelarska panoga),
- priljubljenost surovih in predelanih sadežev v Sloveniji,
- ohranjanje kulturne dediščine pridelave in predelave starih sort jabolk (Godec, 2006).

2.2 PROCES PRIDELAVE JABOLČNEGA SOKA

Čas obiranja jablan poteka od konca avgusta v nižjih legah, pa do začetka novembra v višjih legah. Obiranje poteka ročno, tako da drevesa otresejo in sadeže poberejo s tal. Obrana jabolka operejo v vodi, s pomočjo naprav, ki obračajo večje količine jabolk hkrati. V tem koraku odstranijo gnila in plesniva jabolka, večje mehanske delce ter zemljo, ki se je oprijela jabolk pri padcu na tla. Oprana jabolka nato zmeljejo v mlinu z noži iz nerjavečega jekla oz. v drobilniku sadja, pri čemer nastane jabolčna pulpa, iz katere je možno iztisniti večjo količino jabolčnega soka (Jakubik, 2011).

Stiskanje jabolčne pulpe tradicionalno poteka v lesenih stiskalnicah s košem ali prtnih stiskalnicah, ki so obložene s posebnimi krpami, na katere naložijo ustrezeno količino jabolčne pulpe in iztisnejo sok s pomočjo hidravlike. Krpe, ki se uporabljajo za stiskanje, predstavljajo vir mikroorganizmov, ki se prenesejo v naslednje proizvodne serije (Morrissey in sod., 2004). V sodobnem času se zaradi boljšega izkoristka pri stiskanju vedno pogosteje uporabljajo močnejše stiskalnice iz nerjavečih materialov. Po koncu stiskanja nastaneta dva produkta – prvi in glavni je jabolčni sok, ki predstavlja tekočo fazo, drugi produkt pa so tropine, ki predstavljajo trdno fazo, in jih običajno zavržejo (Jakubik, 2011).

Iztisnjen jabolčni sok pretočijo v očiščene lesene sode, ki jih na vrhu zaprejo s posebnimi zamaški, imenovanimi vrelna veha. Tako lahko izhaja CO₂, ki nastaja pri alkoholni fermentaciji, hkrati pa je onemogočena kontaminacija z neželenimi mikroorganizmi. Fermentacija poteka v kleteh pri ambientalni temperaturi, ki se v odvisnosti od letnega časa nekoliko spreminja. Ker sta čiščenje in sterilizacija lesenih sodov otežena, tudi ti predstavljajo vir sevov v/na opremi za pridelavo jabolčnega vina (Jakubik, 2011; Morrissey in sod., 2004).

2.3 LASTNOSTI JABOLČNEGA SOKA

2.3.1 Kemijske lastnosti

Kemijske lastnosti jabolčnega soka, kot so pH, število in razmerje kislin, število sladkorjev, oligo- in polisahardiov, koncentracija topnega dušika, fenolnih spojin idr., so odvisne od razmerja sort jabolk, rastnega stanja jablan (starost, poškodbe), podnebnih razmer oz. nadmorske višine in zrelosti jabolk ob obiranju (Beech, 1972; Jarvis, 2003).

Razmerja prisotnih sladkorjev v jabolčnem soku, glede na skupno koncentracijo sladkorjev, so v povprečju 74 % fruktoze, 15 % saharoze in 11 % glukoze. Polioli, kot je sorbitol, so prisotni v manjših količinah, prav tako disaharidi, kot so maltoza, rafinoza in trehaloza ter oligosaharidi, medtem ko so pentoze, kot so arabinoza, D-ksiloza, riboza in ramnoza, ki izvirajo iz hidrolize pektina, prisotne le v sledeh. Povprečna vrednost pH jabolčnega soka je 3,5, giblje pa se v rangu 3,0-4,4 (Beech, 1972). Prevladajoče organske kisline v grozdnem soku in moštu so vinska, jabolčna in citronska (Košmerl in Kač, 2009a), kar lahko povežemo tudi z jabolčnim sokom, kjer je glavna kislina L(-)-jabolčna kislina. Pogosto so v sledeh prisotne tudi šikimska, kina, klorogenska, *p*-kumarna kislina in nekatere druge. Pektinska kislina nastane s hidrolizo pektina, z delovanjem sadnih encimov, imenovanih pektinske esteraze, D-galakturonska kislina pa z mikrobeno razgradnjo protopektina v sadju (Beech, 1972; Unden in Zaunmüller, 2009).

Med fenolne spojine soka sodijo epikatehin, dimerni in trimerni proantocianidin ter fenolne kisline, kar s skupnim imenom imenujemo tanini, in pa florizin, ki tako kot tanini prispeva h grenkobi jabolčnega soka. SO₂, prisoten v jabolčnem soku, ima vlogo antioksidanta, saj inaktivira encime polifenol oksidaze, ki povzročajo oksidacijo fenolnih spojin (Beech, 1972).

Topen vir dušika jabolčnega soka predstavljajo aminokisline, kot so asparagin, glutamin, asparaginska in glutaminska kislina, ki jih v veliki meri asimilirajo kvasovke med alkoholno fermentacijo. V manjši meri so prisotne tudi aminokisline, kot so α -alanin, izolevcin, metilhidroksiprolin, serin in valin. V sledeh so prisotni še β -alanin, arginin, glicin, lizin, metionin, fenilalanin, pipemidinska kislina, prolin in treonin. Zaznati je možno tudi proteine, purine, nukleozide in nukleotide (Beech, 1972; Jarvis, 2003).

V jabolčnem soku so prisotne še nekatere anorganske snovi, kot sta železo in baker, ki izvirata iz sadja in/ali opreme za predelavo. Tekom fermentacije se njihove vrednosti skoraj ne spreminja, v primeru prevelike koncentracije pa lahko povzročajo razna obarvanja zaradi nastanka železovih/bakrovih tanatov ali poslabšanje okusa jabolčnega vina (Jarvis, 2003).

2.3.2 Mikrobiološke lastnosti

Mikrobioti zrelih jabolk sestavljajo plesni, kot so *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, in kvasovke, kot so *Aurebasidium pullulans* ter vrste rodov *Hanseniaspora*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Starmerella*, *Metschnikowia* in *Pichia*, ki se nahajajo na površini jabolk. Vrste rodu *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* in ostale dobro fermentativne kvasovke so na jabolkih redko prisotne (Beech, 1972; Graça in sod., 2015). Morrissey in sod. (2004) so ugotovili, da je populacija *Saccharomyces cerevisiae* v jabolčnem soku znatno večja v primeru jabolk slabše kakovosti, t.j. poškodovanih in umazanih od prsti. Število kvasovk sicer redko preseže 500 CFU na gram sadja.

Pogosto so v manjšem številu na jabolkah prisotne ocetnokislinske bakterije, predvsem vrste rodu *Gluconobacter*, redkeje pa so prisotne enterobakterije rodov *Pantoea*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* in *Escherichia*, ter mlečnokislinske bakterije. Izmed slednjih so večinoma prisotne homofermentativne mlečnokislinske bakterije rodu *Pediococcus* in vrsta *Lactobacillus plantarum*, redkeje pa heterofermentativne mlečnokislinske bakterije rodu *Leuconostoc* in vrsta *Lactobacillus brevis*. Število bakterij na površini jabolk se giblje med 2 in 4 log CFU na gram (Beech, 1972; Graça in sod., 2015; Savino in sod., 2012).

Pri tradicionalnem obiranju sadja iz tal se jabolka hitro kontaminirajo s talnimi organizmi, še posebej v primeru, ko se ob padcu na tla poškodujejo. Najpogosteje jabolka prerastejo plesni in kvasovke. Posebej problematične so bakterije rodu *Gluconobacter*, ki proizvajajo 2,5-diketo snovi iz glukoze in fruktoze, ki vežejo SO₂, ki je sicer potreben za nadzor mikrobiote in preprečevanje oksidacije fenolnih spojin (Beech, 1972).

V jabolčnem soku so prisotne kvasovke *Dekkera anomala*, *D. bruxellensis*, *Saccharomyces ludwigii*, *Pichia fermentas*, *P. guilliermondii*, *Debaryomyces polymorphus*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum* in *Saccharomyces cerevisiae*. Vir teh so predvsem jabolka, oprema za predelavo jabolk ter tudi voda, s katero spirajo jabolka (Morrissey in sod., 2004). Skupno število mikroorganizmov v jabolčnem soku običajno ne preseže vrednosti 1×10^6 CFU na mililiter (Beech, 1972).

2.4 PROCES FERMENTACIJE

Jabolčno vino nastane iz jabolčnega soka, kot rezultat dveh vrst fermentacij. V prvi, imenovani alkoholna fermentacija, kvasovke po Embden-Meyerhof-Parnas-ovi poti pretvorijo sadne sladkorje v etanol in višje alkohole, pri čemer nastaja CO₂ (Jarvis, 2003). V drugi fermentaciji, imenovani jabolčno-mlečnokislinska fermentacija, pa mlečnokislinske bakterije pretvorijo L(-)-jabolčno kislino v L(+)-mlečno kislino in CO₂ (Beech, 1972).

Običajno se proces alkoholne fermentacije začne v času 24 ur po stiskanju, na potek fermentacije, prisotnost in razmerje kvasnih vrst ter senzorične lastnosti jabolčnega vina, pa poleg razmerja sort jabolk vpliva tudi temperatura prostora (Morrissey in sod., 2004).

2.4.1 Alkoholna fermentacija

Morrissey in sod. (2004) so pri preučevanju kvasne mikrobiote jabolčnega vina na Irskem opazili dinamiko pojavljanja različnih vrst kvasovk in tako razdelili fermentacijski proces v tri mikološke faze. V začetni fazи prevladujejo kvasovke rodu *Hanseniaspora*, najpogosteje vrsta *H. uvarum*, ki so prisotne na sadju, v drugi fermentacijski fazи prevladuje vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, ki je prisotna na opremi in v prostorih za predelavo, v zadnji fazи zorenja pa prevladujejo kvasovke rodu *Dekkera*, ki jih je možno zaznati v kleteh tudi izven fermentacijske sezone in tako sodijo med odpornejše vrste. V začetni fazи so lahko prisotne tudi vrste rodov *Pichia* in *Candida* ali vrsti *Metschnikowia pulcheriima* in *Lachancea cidri* (staro ime *Zygosaccharomyces cidri*), v drugi fermentacijski fazи pa poleg *S. cerevisiae* tudi druge vrste rodu *Saccharomyces*, kot so *S. uvarum*, *S. kudriavzevii* in *S. mikatae*, med katerimi so nekatere sposobne produkcije nezaželenega plina H_2S , ki daje jabolčnemu vinu vonj po gnilih jajcih (Pando Bedriñana in sod., 2010; Coton in sod., 2006; Suárez Valles in sod., 2007).

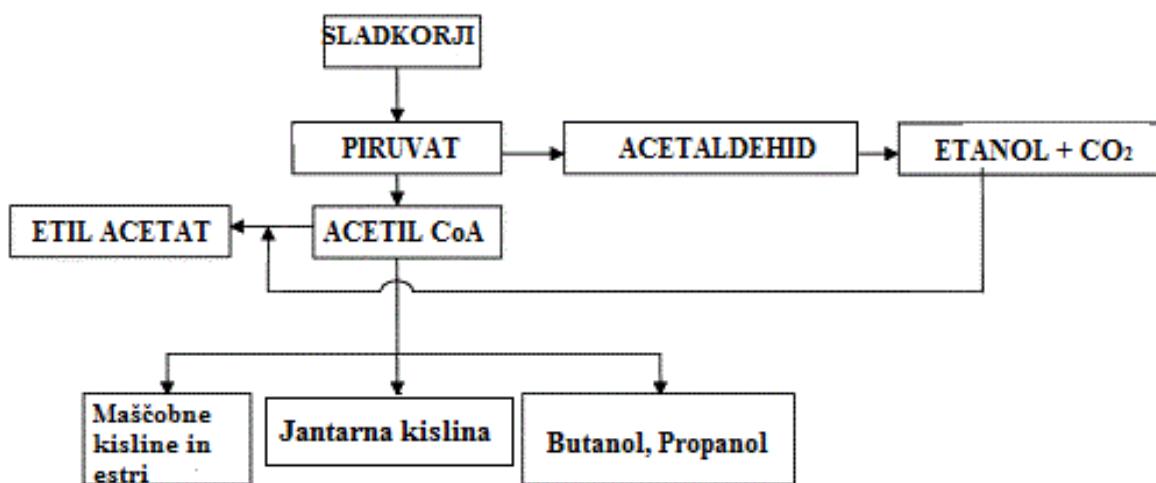
Glede na čas dozorevanja in obiranja jabolk lahko fermentacijsko sezono ločimo na zgodnjo in pozno fermentacijo. Zgodnja fermentacija se začne jeseni, ko je kletna temperatura okoli 20 °C. Zaradi velikega začetnega števila kvasovk poteče zelo hitro, in sicer v 12-15 dneh. Temperatura jabolčnega soka se dvigne iz začetnih 14-16 °C na končnih 34-36 °C. Kvasovke rodu *Hanseniaspora* predstavljajo na začetku fermentacije 90 % populacije, a se zaradi hitrega porasta vsebnosti alkohola v prvih dneh fermentacije njihovo število drastično zmanjša. Prevladati začne vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, ki je bolj odporna na večje vsebnosti alkohola. V naslednjih dneh začne upadati tudi število *S. cerevisiae*, naraščati pa začne število vrst rodu *Dekkera*. Te po približno 22 dneh predstavljajo 90 % populacije kvasovk. V času dozorevanja jabolčnega vina je možno zaznati le še vrste rodu *Dekkera* (Morrissey in sod., 2004).

Pozna fermentacija poteka v času zgodnje zime, ko se kletna temperatura spusti na 10-12 °C. Poteka veliko počasneje od zgodnje fermentacije, in sicer okoli 40 dni. Večinoma prihaja do te fermentacije na višjih nadmorskih legah, kjer traja dlje časa, da jabolka dozorijo in se posledično obirajo kasneje. V tem času ima jabolčni sok okoli 12 °C, med fermentacijo pa ne preseže 24 °C. Začetno število kvasovk rodu *Hanseniaspora* in vrste *S. cerevisiae* je manjše, kot v času zgodnje fermentacije. Prav tako je krajša logaritemska faza rasti *S. cerevisiae*, kot posledica slabšega izkoriščanja sladkorjev zaradi nižje kletne temperature. Vrste rodu *Dekkera* se pojavijo veliko kasneje kot pri zgodnji fermentaciji, in sicer šele po približno 100 dneh (Morrissey in sod., 2004).

Med alkoholno fermentacijo kvasovk nastajajo organske kisline, kot so ocetna, propionska, mlečna, jantarna, glikolna, galakturonska, glukonska, oksalna in fumarna (Košmerl in Kač, 2009c). Kvasovke producirajo tudi keto kisline, kot sta piruvična in α -ketoglutarjeva kislina, ki vežeta sulfit v jabolčnem vinu, in pa acetaldehid, ki veže prosti SO_2 , prisoten v jabolčnem soku v času rasti kvasovk. Višji alkoholi, ki jih sintetizirajo kvasovke, imajo pomembno vlogo pri razvoju okusa jabolčnega vina (Beech, 1972; Jarvis, 2003).

Številni intermediati, ki nastajajo v Embden–Meyerhof–Parnass-ovi metabolni poti, se lahko pretvorijo v druge metabolite, kot sta glicerol (do 0,5 %), ki nastane pri pretvorbi dihidroksiacetona fosfata v glicerol-3-fosfat, in ocetna kislina, ki nastane iz acetaldehyda z encimom acetaldehyd dehidrogenaza. Razlog za nastanek glicerola je lahko velika začetna vsebnost sladkorjev v jabolčnem soku (20 %) ali odsotnost encima alkoholna dehidrogenaza na začetku alkoholne fermentacije. Ocetna kislina sicer predstavlja nezaželeno spojino v jabolčnem vinu, vendar lahko v metabolizmu ocetne kisline z encimom alkoholna acetyltransferaza nastanejo snovi, ki pozitivno vplivajo na aroma, kot sta npr. etil- in izoamil acetat (Rodicio in Heinisch, 2009).

Poleg alkoholne fermentacije potekajo pri kvasovkah še druge metabolne poti, po katerih nastajajo dolgo- ali kratkoverižne maščobne kisline, estri, laktoni, idr. (sl. 1). Kot rezultat hidrolize pektina z encimom pektinmetil esteraza, nastaja v jabolčnem soku v majhnih koncentracijah (10-100 mg/L) tudi metanol (Jarvis, 2003; Jayani in sod., 2005).



Slika 1: Shema nekaterih procesov, ki potekajo med alkoholno fermentacijo jabolčnega vina (de la Roza in sod., 2003)

Po koncu fermentacije se zaradi avtolize kvasovk v jabolčno vino izločijo dušikove spojine, kot so fenilalanin, tirozin, levcin, valin, γ -aminomaslena kislina, histidin, arginin in peptidi. Zaradi sinteze kislin se zniža pH, kar vpliva na razvoj mlečnokislinskih bakterij in jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo (Beech, 1972; Jarvis, 2003).

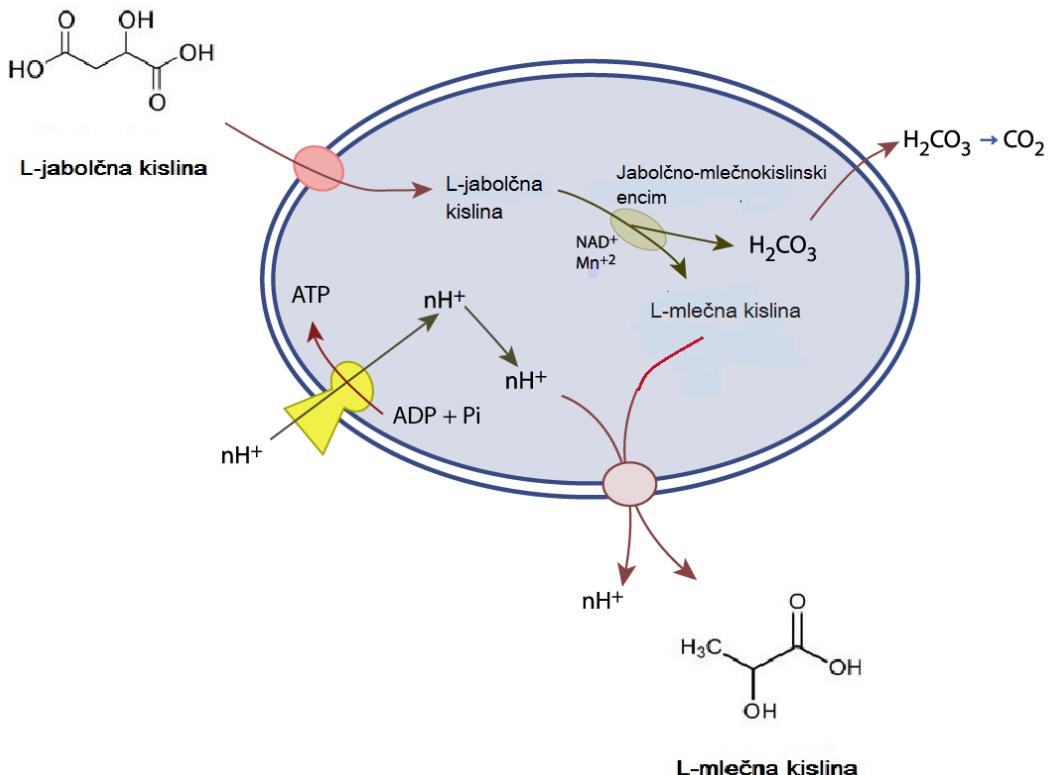
2.4.2 Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija

Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija lahko poteka hkrati z alkoholno fermentacijo, pogosteje pa nastopi potem, ko popolnoma fermentirano jabolčno vino doseže temperaturo 15 °C - to je v času pozne pomladi oz. zgodnjega poletja naslednje leto. Vloga mlečnokislinskih bakterij je pretvorba jabolčne kisline v mlečno kislino in kina kisline v 3-dehidrošikimsko kislino, kar zniža pH in tako poveča biološko stabilnost. Hkrati pri fermentaciji sladkorjev in nekaterih organskih kislin nastajajo aromatične spojine, ki vplivajo na senzorične lastnosti jabolčnega vina (Beech, 1972; Sumby in sod., 2010; Jarvis, 2003; Unden in Zaunmüller, 2009).

Oksidacija sladkorjev predstavlja za mlečnokislinske bakterije osnovni način pridobivanja energije za rast in razmnoževanje. Odvisna je od dejavnikov, kot so pH medija, vsebnost in vrsta prisotnih sladkorjev. Fermentacija heksoz in pentoz poteka po fosfoketolazni oz. oksidativni pentoza-fosfatni poti. Glavni produkt fermentacije glukoze so D-mlečna kislina, etanol in CO₂, pri čemer predstavlja produkcija etanola limitirajoči korak v heterofermentacijski fermentaciji heksoz. Zato lahko pride do sprememb v fermentacijski poti ali do uporabe zunanjih elektronskih akceptorjev, kot so O₂, piruvat ali citronska kislina. Pri tako spremenjenih fermentacijskih reakcijah prihaja do produkcije nezaželenih snovi, kot sta ocetna kislina ali manitol (Vrščaj Vodošek, 2007).

Mlečnokislinske bakterije lahko razgrajujejo tudi organske kisline, kot so citronska, vinska in piruvična kislina, ter alkohole, kot sta glicerol in manitol. Pri fermentaciji citronske kisline se del piruvata pretvori v acetoin, ki se lahko v primeru, da je prisoten kisik, spontano pretvori v diacetil, ki daje jabolčnemu vinu maslen okus (Unden in Zaunmüller, 2009; Vrščaj Vodošek, 2007).

Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija pomeni neposredno dekarboksilacijo L-jabolčne kisline v L-mlečno kislino in CO₂ brez nastanka vmesnih intermediatov, z jabolčno-mlečnokislinskim encimom, ki za svoje delovanje potrebuje prisotnost NAD⁺ in Mn²⁺ (sl. 2). Celice pridobivajo energijo z ustvarjanjem protonskega gradiента preko celične membrane z enosmernim transportom L-jabolčne kisline v celico (Bauer in Dicks, 2004).



Slika 2: Shema procesa jabolčno-mlečnokislinske fermentacije (Poolman in sod., 1991)

Na potek jabolčno-mlečnokislinske fermentacije vplivajo dejavniki, kot so temperatura, vsebnost etanola, acetaldehyda, prisotnost O_2 in CO_2 , pH, vsebnost in razmerje sladkorjev, organskih in maščobnih kislin, aminokislin ter fenolnih spojin. Temperatura vpliva na hitrost rasti in dolžino lag faze mlečnokislinskih bakterij preko fluidnosti celične membrane ter sinteze in aktivnosti encimov. Velika koncentracija etanola zmanjša optimalno temperaturo rasti mlečnokislinskih bakterij, obratno pa se njihova toleranca na etanol zmanjša z zvišanjem temperature. Glavna tarča delovanja etanola so membranski lipidi. Optimalna temperatura za rast vrste *Oenococcus oeni* je okoli 25 °C, njena rast pa se linearno manjša z višanjem vsebnosti etanola, pri čemer je 14 % (v/v) zgornja meja za večino sevov. pH jabolčnega vina vpliva na prisotnost mlečnokislinskih vrst bakterij. V jabolčnih vinih, ki imajo pH pod 3,5, običajno prevladuje vrsta *O. oeni*, medtem ko lahko v vinih z višjim pH preživijo in rastejo tudi vrste rodov *Lactobacillus* in *Pediococcus*. Z višanjem koncentracije glukoze se aktivnost jabolčno-mlečnokislinske fermentacije zmanjšuje, in sicer zaradi zmanjšanega delovanja encima acetaldehyd dehidrogenaza. Posledično se v celicah kopiči NAD(P)H. Za rast *O. oeni* je nujno potrebna prisotnost štirih aminokislin, in sicer arginina, glutaminske kisline, triptofana in izolevcina, za optimalno rast pa potrebujejo še valin, metionin, cistein, levcin, aspartaginska kislina in histidin. Zaradi fermentacijskega metabolizma mlečnokislinske bakterije slabo rastejo v aerobnih pogojih (Bauer in Dicks, 2004).

V jabolčnem vinu se večinoma pojavljajo striktno heterofermentacijske mlečnokislinske bakterijske vrst *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii* in *L. brevis*, ter fakultativno heterofermentacijski vrsti *Lactobacillus plantarum* in *L. pentosus*. Rasti v jabolčnem vinu so zmožne tudi homofermentacijske mlečnokislinske bakterije iz rodu *Pediococcus*, vendar so običajno prisotne v majhnem številu. V splošnem velja podatek, da jabolčno-mlečnokislinska fermentacija poteka, ko populacija mlečnokislinskih bakterij doseže koncentracijo 10^5 CFU na mililiter. Ta se zaradi prisotnih živih, vendar nekultivabilnih celic (celic VNBC), v praksi redkeje zazna z metodo gojenja na ploščah (Beech, 1972; Unden in Zaunmüller, 2009).

2.5 LASTNOSTI JABOLČNEGA VINA

2.5.1 Senzorične lastnosti

Ključne olfaktorne lastnosti, ki dajejo jabolčnemu vinu sadni vonj in vonj po jabolkih, imajo molekule iz skupine etilnih estrov in alkilnih estrov ocetne kisline, ki nastajajo med procesom etanolne fermentacije kvasovk. Gre za molekule, kot so etil acetat, etil propanoat, 2-metilpropil acetat, etil butanoat, idr. (Villiére in sod., 2012).

Estri so molekule, ki se v fermentiranih pijačah pojavljajo v nizkih koncentracijah, vendar imajo pomembno vlogo pri oblikovanju profila okusov, saj dajejo značilen sadni priokus. Tvorijo se v reakciji med alkoholom in funkcionalnimi skupinami karboksilnih kislin, pri čemer se izloči molekula vode. Reakcija lahko poteka encimsko, z esterazami in alkoholnimi acetiltransferazami, med alkoholno fermentacijo kvasovk, ali kemijsko, med procesom staranja jabolčnega vina, z esterifikacijo pri nizkem pH. Kvalitativno najpogosteji ester v vinu je etil acetat, ki daje pri majhnih koncentracijah sadni priokus, pri velikih pa nezaželen okus po topilu oz. odstranjevalcu laka za nohte (Sumby in sod., 2010). V študiji, ki so jo opravili de la Roza in sod. (2003), so prišli do ugotovitve, da se etil acetat najverjetneje tvori iz monosaharidov in da na hitrost njegovega nastanka vpliva koncentracija etanola. Na razvoj in koncentracijo estrov v vinu sicer vplivajo različni dejavniki procesa etanolne fermentacije, kot so količina prekurzorjev, ki so prisotni v sadju, temperatura fermentacije, sevi kvasovk, prisotnost hranil, posebej dušikovih spojin, ter proces staranja, v katerem prihaja do hidrolize estrov (Sumby in sod., 2010).

Na arome v vinu vplivajo tudi mlečnokislinske bakterije med jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo, med katero lahko povečajo oz. zmanjšajo koncentracijo estrov, aldehidov, glikoliziranih molekul in 2,3-butandiola (Sumby in sod., 2010).

2.5.2 Antioksidanti

Polifenoli so molekule, ki so zelo razširjene v rastlinah. Delujejo kot lovilci prostih radikalov in kelatorji kovinskih ionov, ki imajo katalitično sposobnost oksidacije lipidov. Antioksidativna sposobnost polifenolov je odvisna od njihove strukture. V jabolčnem vinu

antioksidante v največji meri predstavljajo fenolne kisline, kot so hidroksi- in dihidroksicimetna kislina, protokatehuska, hidro- in kavna, izo- in klorogenska, hidrokumarna, ferulna, ter derivati ferulne, kavne in kumarne kisline. Sledijo flavonoidi, kot so (+)-catehin, (-)-epikatehin, trimer C1 in procianidini, hlapni fenoli, kot sta catehol in tirozol, ter dihidrokalkoni, kot je floridzin. Različne metode za merjenje antioksidativne aktivnosti dajejo nekoliko različne rezultate, v splošnem pa je fenolni profil in s tem antioksidativna sposobnost jabolčnega vina, zelo podoben fenolnemu profilu belega vina (Pacinelli Lobo in sod., 2009).

2.6 KVAR JABOLČNEGA VINA

2.6.1 Upočasnjena ali zaustavljena fermentacija

Upočasnjena ali zaustavljena fermentacija je pojav, pri katerem pride do upočasnjene fermentacije ali do predčasne prekinitve fermentacije, posledica česar so večje vsebnosti ostankov sladkorjev v jabolčnem vinu ob koncu fermentacijskega procesa. Končni produkt je zato mikrobiološko nestabilen (Maisonnave in sod., 2013).

Glavni vzrok za upočasnjeno ali zaustavljeni fermentaciji je neustrezno razmerje med glukozo in fruktozo v jabolčnem vinu, do katerega pride zaradi preferenčne porabe glukoze na začetku alkoholne fermentacije s strani kvasovk (Rodicio in Heinisch, 2009; Ultee in sod., 2013). Dokazani so bili tudi številni drugi dejavniki, ki vplivajo na razvoj zastale fermentacije, kot so pomanjkanje dušika, kisika ali vitaminov, velika vsebnost etanola in prisotnost stranskih metabolitov fermentacije, kot so npr. acetna kislina in maščobne kisline, ki inhibirajo aktivnost in rast kvasovk (Maisonnave in sod., 2013).

2.6.2 Tvorba biogenih aminov

Biogeni amini so organske molekule, ki jih pogosto najdemo v fermentiranih proizvodih. Proizvajajo jih mlečnokislinske bakterije, kot so vrste *Oenococcus oeni*, *Lactobacillus hilgardii*, *L. fructivorans*, *L. brevis*, *Pediococcus parvulus*, idr., in sicer z dekarboksilacijo aminokislín, kot so histidin, tirozin in ornitin, v procesu jabolčno-mlečnokislinske fermentacije. Nekateri biogeni amini, kot npr. histamin, tiramin, beta-feniletilamin in triptamin, so bioaktivne molekule, ki vplivajo na centralni živčni ali žilni sistem. Pri velikih koncentracijah teh molekul v hrani/pijači obstaja možnost zastrupitve, zmerne koncentracije pa povzročajo občutljivost na hrano/pijačo, glavobole, oteženo dihanje, hiper-/hipotenzijo ali alergijske reakcije (Costantini in sod., 2013; Gardini in sod., 2016).

Najnevarnejši biogeni amini so histamin, ki ima strupene učinke zaradi vazo- in psihoaktivnih lastnosti, ter tiramin in diamini, kot sta putrescin in kadaverin, ki delujejo kot prekurzorji karcinogenih nitrozaminov. Najpogostejsi biogeni amin v jabolčnem vinu, ki ostane v vinu prisoten tudi po dozorevanju, je putrescin, ki nastane med alkoholno fermentacijo iz arginina. V jabolčnem vinu je prisoten v velikih koncentracijah in sam po

sebi sicer ni strupen, lahko pa poveča strupeni učinek ostalih biogenih aminov (Costantini in sod., 2013).

2.6.3 Bolezen jabolčnega vina

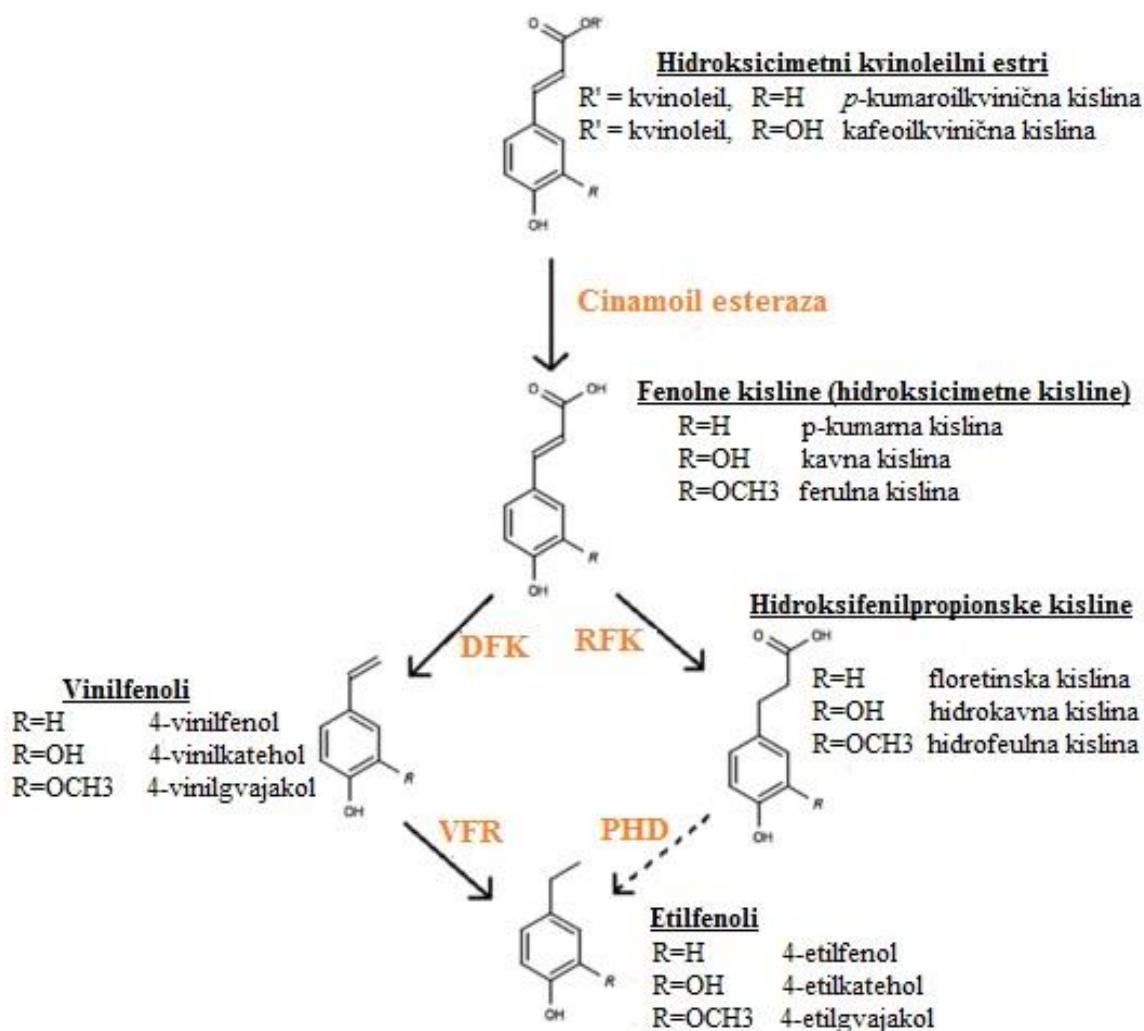
Bolezen jabolčnega vina (ang. cider-sickness) je kvar, ki je značilen za sladka jabolčna vina, katerih pH je višji od 3,7. Pri takih jabolčnih vinih pride do povečane vsebnosti acetaldehyda, v velikih količinah nastaja CO₂, ki močno poveča tlak v sodih/steklenicah, pijača se obarva belkasto, hkrati pa nastaja tudi pena. Senzorične lastnosti kvara so vonj po bananinem olupku, gnilih limonah ali malinah (Coton in sod., 2006).

Obstajata dve hipotezi za mikrobiološki vzrok kvara, in sicer prisotnost bakterije *Acetobacter rancens*, ki pretvarja D- in L-mlečno kislino v acetaldehyd, ter kvasovke *Zymomonas mobilis* var. *pomaceae*, ki je zmožna fermentirati glukozo v etanol in CO₂ z akumulacijo acetaldehyda preko Entner-Doudoroff-ove metabolne poti. Izvor *Z. pomaceae* v jabolčnem vinu še ni pojasnjen, najverjetnejše pa izvira iz zemlje, glede na podatke o njeni prisotnosti v primeru piva. Rast *Z. pomaceae* je med alkoholno fermentacijo in v prisotnosti SO₂ inhibirana, ko pa se koncentracija kvasovk zmanjša, se njena populacija močno poveča (Coton E. in Coton M., 2003).

2.6.4 Tvorba hlapnih fenolov

Hlapni fenoli so molekule, ki jih s senzoričnega stališča v alkoholnih pijačah povezujejo z živalskimi, konjskimi, ostrimi vonji oz. vonji po usnju (Buron in sod., 2011). Nastanejo ob hidrolizi višjih alkoholov ali v metabolizmu kvasovk, ko sta vrsti *Dekkera anomala* in *D. bruxellensis*, in mlečnokislinskih bakterij, kot je vrsta *Lactobacillus collinoides* (Rodríguez in sod., 2009; Wedral in sod., 2010; Buron in sod., 2012).

Za biosintezo hlapnih fenolov (sl. 3) je potrebna prisotnost hidroksicimetnih kislin (kavna, ferulna in *p*-kumarna kislina), ki nastanejo iz hidroksicimetnih estrov s cinamoil esterazami. Njihovo prisotnost so dokazali pri mlečnokislinski bakteriji *L. collinoides* (Buron in sod., 2012). V sintezo 4-vinil derivatov, kot so 4-vinilfenol (4-VF), 4-vinilkatehol (4-VK) in 4-vinilgvajakol (4-VG), je vključen encim dekarboksilaza fenolne kisline, v sintezo 4-etil derivatov, kot so 4-etilfenol (4-EF), 4-etilkatehol (4-EK) in 4-etilgvajakol (4-EG) iz vinilfenolov, pa encim vinilfenol reduktaza (Buron in sod., 2011).



Slika 3: Biosintezna pot hlapnih fenolov iz hidroksicimetnih estrov v jabolčnem vinu (Buron in sod., 2012)

Okrajšave: dekarboksilaza fenolnih kislin (DFK), vinilfenol reduktaza (VFR), reduktaza fenolne kisline (RFK), putativna hidroksifenilpropionska dekarboksilaza (PHD)

Buron in sod. (2011, 2012) so dokazali, da kvasovke v jabolčnem vinu niso sposobne pretvorbe klorogenske kisline v kavno, ter da tudi mlečnokislinske bakterije, razen vrste *L. collinoides*, nimajo cinamat esterazne aktivnosti. Kvasovke vrst *Lachancea cidri*, *Saccharomyces uvarum* in *Pichia membranifaciens* so sposobne pretvorbe prekurzorjev v vinilfenole v majhnih količinah, kvasovki vrst *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia guilliermondii* pa v velikih količinah. Izmed vseh kvasovk so produkcije etilfenolov sposobne le kvasovke vrst *Dekkera anomala* in *D. bruxellensis*, med mlečnokislinskimi bakterijami pa le vrsta *L. collinoides*, ki prodirira etilfenole hitreje od kvasovk rodu *Dekkera*. Bakterije vrst *Lactobacillus brevis*, *L. mali* in *Leuconostoc mesenteroides/pseudomesenteroides* imajo aktivna encima dekarboksilazo in reduktazo fenolne kisline. Kvasovka *S. cerevisiae* prodirira vinilfenole večinoma v stacionarni fazi rasti, vrsta *L. brevis* pa v zgodnji, eksponentni fazi rasti. Vrsta *D. anomala* prodirira etilfenole v pozni eksponentni oz. zgodnji stacionarni fazi rasti.

2.6.5 Sluzavost

Vizualna sprememba jabolčnega vina, kot je sluzavost, je posledica nastanka ekstracelularnih polisaharidov. Povzročajo jo nekateri pediokoki, med njimi najpogosteje vrsti *Pediococcus parvulus* (Garai-Ibane in sod., 2010) in *P. damnosus* (Unden in Zaunmüller, 2009), laktobacili, kot sta vrsti *Lactobacillus suebicus* (Ibarburu in sod., 2015) in *L. sicerae* sp. nov. (Puertas in sod., 2014), ter vrsta *Bacillus licheniformis* (Larin in sod., 2002). Vzrok za produkcijo eksopolisaharidov, kot so npr. dekstran, levan in fruktan, s strani različnih skupin mlečnokislinskih bakterij, lahko povzroči presežek heksoz v jabolčnem vinu (Unden in Zaunmüller, 2009).

2.6.6 Tvorba ocetne kislino

Prisotnost ocetnokislinskih bakterij v jabolčnem vinu nakazuje na navzkrižno kontaminacijo prostorov/opreme v času predelave jabolk, pogosteje pa se kontaminacija pojavi v času zorenja oz. shrambe, ko pride do nenadzorovanega stika jabolčnega vina z zrakom. Ocetnokislinske bakterije pretvarjajo etanol v ocetno kislino preko acetaldehida in so dobro prilagojene na okolja s povečanimi vrednostmi sladkorjev in etanola. S kvarom jabolčnega vina so povezane ocetnokislinske bakterije rodov *Acetobacter*, *Gluconobacter* in *Gluconacetobacter*. Med sabo se razlikujejo v odpornosti na etanol in zmožnosti izkoriščanja le-tega kot edinega vira ogljika. Vrste rodu *Acetobacter* pogosteje izolirajo iz vina, medtem ko so vrste rodu *Gluconobacter* pogosteje prisotne na grozdnih jagodah in v vinskem moštu. Glavni produkti, povezani s kvarom zaradi ocetnokislinskih bakterij, so ocetna kislina, acetaldehid in etil acetat (Bartowsky in Henschke, 2008).

V vinu lahko ocetno kislino v anaerobnih pogojih, v tako imenovanem efektu po Custerju, producira tudi kvasovka *Dekkera bruxellensis*, s čimer poruši redoks ravnotežje in inhibira alkoholno fermentacijo (Wedral in sod., 2010).

2.6.7 Tvorba gvajakola

Gvajakol je molekula, ki povzroča kvar kislih sadnih sokov, iztoničnih vod, limonad, ipd. Produktu prida močan »medicinski« vonj, pri čemer pa kvara ni mogoče zaznati vizualno. Sposobnost tvorbe gvajakola imajo nekatere bakterije rodov *Alicyclobacillus*, *Streptomyces*, vrste *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, kvasovke *Rhodotorula rubra* in *Sporotrichum thermophile*, ter nitasta gliva *Paecilomyces variotii* (Withuhn in sod., 2012).

Najpomembnejši mikroorganizem, povezan s kvarom sladkih pijač z nižjim pH, je termofilna bakterija *Alicyclobacillus acidoterrestris*, ki tvori spore, odporne na toploto, ki lahko kalijo pri pH 3,0 – 4,5. Za rod je značilna prisotnost ω -alicikličnih kislin v celični membrani, po čemer je tudi dobil ime. Za nekatere seve *A. acidoterrestris* so dokazali, da lahko prisotnost *p*-kumarne kisline, ki je naravno prisotna tudi v jabolčnem soku (Beech, 1972), povzroči zmanjšanje živosti vegetativnih celic oz. inaktivacijo spor (Bevilacqua in

sod., 2015; Eisele in Semon, 2005).

Najverjetnejša prekurzorja gvajakola sta vanilin in vanilinska kislina, ki nastaneta pri metabolizmu ferulne kisline, prisotne v sadju, ki poteka pri nekaterih bakterijah in plesnih. Producija gvajakola je hitrejša in večja v primeru, ko je prekurzor za sintezo vanilinska kislina, ki je lahko naravno prisotna v sadnih sokovih kot derivat lignina (Withuhn in sod., 2012). Eisele in Semon (2005) sta uporabila standardno metodo za določanje mejnih vrednosti spojin, ki vplivajo na senzorične lastnosti in določila povprečni prag zaznave gvajakola v jabolčnem soku, in sicer $0,91 \mu\text{g/L}$ za vonj in $0,24 \mu\text{g/L}$ za okus.

2.6.8 Tvorba akroleina

Heterofermentativna mlečnokislinska bakterija *Lactobacillus collinoides* ima v jabolčnem vinu vlogo kvarljivca, ki pretvarja glicerol, katerega v alkoholni fermentaciji proizvajajo kvasovke, v 3-hidroksi-propionaldehid. Ta je prekurzor akroleina, ki daje končnemu produktu grenak priokus. Poleg glicerola je za pretvorbo potrebna tudi prisotnost glukoze, in sicer je optimalno razmerje glicerol:glukoza enako tri (Sauvageot in sod., 2000).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Laboratorijski pribor

Pri raziskovalnem delu smo uporabili sledeč laboratorijski pribor:

- avtoklavirni samolepilni trak,
- avtomatske pipete (Eppendorf, Gilson),
- digitalne avtomatske pipete (Eppendorf),
- spatula po Drigalskem (Golias),
- filtri različnih premerov por (Sartorius),
- kovinske žlice in pincete,
- laboratorijska steklovina: erlenmajerice, čaše, epruvete, steklenice z zamaškom na navoj (Schott Duran), merilni valji, nuča za filtracijo,
- laboratorijske rokavice iz lateksa in nitrila (Kimtech),
- mikrocentrifugirke različnih volumnov (Eppendorf),
- mikrotitrskie plošče (Thermo scientific, Life science products),
- muha za magnetno mešalo,
- multikanalna pipeta (Eppendorf),
- nastavki za pipete različnih volumnov (Eppendorf, Gilson),
- nosilec za agarozni gel in glavnicički,
- parafilm (Bemis),
- PCR folija (Eppendorf),
- plastične cepilne zanke (Golias),
- plastične falkonke (15 mL in 50 mL),
- plastične petrijevke,
- plastične posodice,
- plastične vrečke,
- polavtomatska pipeta (Eppendorf),
- skalpel,
- steklena objektna in krovna stekelca za mikroskopiranje,
- stojala za mikrocentrifugirke.

3.1.2 Laboratorijske aparature

Pri raziskovalnem delu smo uporabili sledeče laboratorijske aparature:

- anaerobni lonci (Oxoid),
- avtoklav (Sutjeska),
- brezprašna komora - laminarij (SMBC 122AV),
- centrifuge (5415 C Eppendorf, Sigma 2-15, Mini Spin plus, Centric 322A),
- digestorij,

- dokumentacijski sistem za elektroforezne gele (BioRad),
- elektroforezne kadičke (BioRad),
- fotoaparat za fotografiranje agaroznega gela (Canon),
- generator za elektroforezo (BioRad),
- hladilniki in zamrzovalne skrinje (Gorenje),
- inkubator (Kambič),
- magnetno mešalo (IKA),
- mikrovalovna pečica (Sanyo),
- naprava za PCR (Biorad – iCycler, Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400),
- naprava za elektroforezo v pulzirajočem polju (BioRad – CHEF-DR® III System),
- pH meter s kombinirano stekleno elektrodo (Shimadzu UV-160 A),
- računalnik,
- stresalnik (INFORS HT),
- svetlobni mikroskop (Leica),
- tehnice (Exacta, Mono BIOC),
- termoblok (Eppendorf),
- vodna kopel (Julabo, Kambič),
- vrtinčnik (IKA, Yellowline TTS 2).

3.1.3 Mikrobiološka gojišča

3.1.3.1 Selektivna gojišča za izolacijo mikroorganizmov

Pri raziskovalnem delu smo za gojenje kvasovk uporabili gojišča YPD in DRBC, za gojenje mlečnokislinskih bakterij gojišče MRS (de Man in sod., 1960), ter etanolni/karbonatni agar po Frauterju (Frauters, 1986) za gojenje mikroorganizmov, ki so sposobni rasti v pogojih, podobnih tistim v jabolčnem vinu.

Sestava selektivnega trdnega gojišča YPD s kloramfenikolom (100 mg/L):

- agar YPD (Sigma): 37,5 g,
- bakteriološki agar (BioLife): 15 g,
- kloramfenikol (založna koncentracija 100 g/L v etanolu*): 750 µL.

*Založno raztopino kloramfenikola (Fluka) smo pripravili tako, da smo v 7,5 mL 100 % etanola (Sigma) raztopili 0,75 g kloramfenikola.

Sestava selektivnega trdnega gojišča DRBC s kloramfenikolom:

- agar DRBC (Sigma-Aldrich): 15,75 g,
- kloramfenikol (Oxoid)*: 3 mL.

*Rehidracija ene viale kloramfenikola (Oxoid) s 3 mL 100 % etanola.

Sestava selektivnega trdnega gojišča MRS s cikloheksimidom (10 mg/mL):

- agar MRS (Merck Millipore): 51,15 g,
- cikloheksimid (Merck Millipore) - založna koncentracija 1 g/L: 7,5 mL.

Sestava selektivnega etanolno/karbonatno trdnega gojišča po Frauterju (Frauters, 1986):

- kvasni ekstrakt (Oxoid): 7,5 g,
- CaCO₃ (Oxoid): 15 g,
- bakteriološki agar (BioLife): 15 g,
- 100 % etanol (Sigma): 7,5 g.

Gojišča smo pripravili tako, da smo v suhe steklenice natehtali potrebno količino reagentov, dodali 750 mL destilirane vode, jih raztopili z magnetnim mešalom, ter avtoklavirali pri tlaku 1,1 bar in temperaturi 110 °C za 15 min. Po avtoklaviranju smo gojišča ohladili na 50 °C in v gojišči YPD ter DRBC aseptično dodali ustrezен volumen sterilnega kloramfenikola, v gojišče MRS ustrezен volumen sterilnega cikloheksimida, v gojišče po Frauterju pa ustrezен volumen 100 % etanola. Nato smo jih razlili v sterilne plastične petrijevke in pustili nekaj časa, da so se primerno strdila in da je izhlapela odvečna vлага.

3.1.3.2 Selektivna gojišča za potrditev prisotnosti vrste

Selektivno gojišče BCA za potrditev prisotnosti vrste *Bacillus cereus* (Oxoid)

Gojišče smo pripravili tako, da smo 20,5 g dehidriranega gojišča BCA raztopili v 475 mL destilirane vode (Millipore) in ga sterilizirali z avtoklaviranjem pri tlaku 1,1 bar in temperaturi 110 °C za 15 min. Ohlajenemu gojišču (50 °C) smo dodali eno vialo Polimixina B (Oxoid) in 25 mL sterilne emulzije jajčnega rumenjaka, premešali ter aseptično razlili v sterilne plastične petrijevke.

Selektivno tekoče gojišče BAT za potrditev prisotnosti vrst *Alicyclobacillus* spp. (Merck Millipore)

Tekoče gojišče smo pripravili tako, da smo 14,5 g dehidriranega gojišča BAT raztopili v 500 mL destilirane vode (Millipore) in ga sterilizirali z avtoklaviranjem pri tlaku 1,1 bar in temperaturi 110 °C za 15 min. Ohlajenemu gojišču (50 °C) smo umerili pH iz 5,3 na 4,0 ± 0,2 z 1 M H₂SO₄, ter ga aseptično prelimi v sterilne steklene epruvete.

3.1.4 Pufri

Fosfatni pufer PBS (10x)

Fosfatni pufer PBS smo pripravili tako, da smo v suho stekleno posodo zatehtali 80 g NaCl (Merck), 2 g KCl (Sigma-Aldrich), 7,4 g Na₂HPO₄ x H₂O (Merck) in 2,4 g KH₂PO₄ (Merck), dodali približno 750 mL destilirane vode, da smo na magnetnem mešalu raztopili sestavine in umerili pH na 7,4. Nato smo dopolnili z destilirano vodo do oznake 1 L ter

avtoklavirali pri tlaku 1,1 bar in temperaturi 110 °C za 15 min. Po avtoklaviranju smo pufer ohladili na sobno temperaturo in ga do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

Fosfatni pufer PBS (1x) s 15 % glicerolom za shranjevanje sevov

1x fosfatni pufer PBS s 15 % glicerolom smo pripravili tako, da smo v 85 mL sterilnega 1x pufra PBS aseptično dodali 15 mL sterilnega 100 % glicerola ter do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

Pufer TAE (50x)

50x pufer TAE smo pripravili tako, da smo v suho stekleno posodo zatehtali 242 g baze Tris in 37,2 g Na₂EDTA x 2H₂O in dolili nekaj destilirane vode (Millipore), da smo sestavini raztopili na magnetnem mešalu. Nato smo dodali 57,1 mL ocetne kisline, dopolnili z destilirano vodo do 1 L in sterilizirali pri temperaturi 110 °C in tlaku 1,1 bar za 15 min. Ohljen pufer smo shranili v hladilniku pri 4 °C.

Pufer EDTA

EDTA smo pripravili tako, da smo v približno 90 mL destilirane vode ob stalnem mešanju z magnetnim mešalom raztopili ustreznno količino EDTA in med mešanjem postopoma dodajali NaOH zrnca, da smo zvišali pH na 7,5 oz. 9,0. Mešanico smo nato dopolnili z destilirano vodo do oznake 100 mL in jo sterilizirali v avtoklavu pri tlaku 1,1 bar in temperaturi 110 °C za 15 min.

Pufer CPESa

CPESa smo pripravili tako, da smo v suho steklenico zatehtali 12,3 g citronske kisline, 21,4 g Na₂HPO in 219 g sorbitola ter ob stalnem mešanju z magnetnim mešalom raztopili v 500 mL destilirane vode. Sterilnost smo dosegli z avtokloviranjem pri tlaku 1,1 bar in temperaturi 110 °C za 15 min.

Pufer CPEa

CPEa smo pripravili tako, da smo v suho steklenico zatehtali 24,5 g citronske kisline in 42,7 g Na₂HPO ter ob stalnem mešanju z magnetnim mešalom raztopili v 1000 mL destilirane vode.

3.1.5 Reagenti za izolacijo DNA

3.1.5.1 Izolacija kvasne DNA z MasterPure Yeast DNA Purification Kit (Epicentre)

Sestava:

- raztopina za lizo kvasnih celic,
- reagent za precipitacijo proteinov MPC,
- RNaza A (5µg/µL),
- izopropanol (Merck),

- 70 % etanol,
- TE pufer.

3.1.5.2 Izolacija bakterijske DNA s PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Thermo Fisher Scientific)

3.1.6 Reagenti za PCR

Mešanica za PCR

Mešanica za PCR je bila pripravljena iz pufra PCR, MgCl₂, mešanice dNTP, začetnih oligonukleotidov in polimeraze DNA, ki smo jo dodali tik pred uporabo.

Preglednica 1: Sestava mešanice za PCR z začetnimi in končnimi koncentracijami reagentov

Reagent	Začetna koncentracija	Končna koncentracija
Pufer PCR – 5 x GoTaq® Flexi Buffer (Promega)	5 x	1 x
MgCl ₂ (Promega)	25 mM	2 mM
Mešanica dNTP (Sigma)	2,5 mM	0,2 µM
Začetni oligonukleotidi (Sigma Aldrich)	10 µM	0,5 µM
Polimeraza DNA – GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega)	5 U/µL	0,5 U/µL

Mešanico dNTP smo pripravili tako, da smo iz založne raztopine vsakega dNTP (dATP, dCTP, dGTP in dTTP) odpipetirali 10 µL in dodali 360 µL vode PCR (Sigma Aldrich).

Začetni oligonukleotidi

Začetne oligonukleotide smo po navodilih proizvajalca rehidrirali z vodo PCR (Sigma Aldrich) in premešali na vrtinčniku. Za uporabo v reakciji PCR smo rehidrirane začetne oligonukleotide redčili z vodo PCR (Sigma Aldrich) v razmerju 5:100.

Preglednica 2: Sekvenca, smer, velikost in funkcija začetnih oligonukleotidov za PCR in sekvenciranje

Začetni oligonukleotid	Nukelotidno zaporedje (5'-3')	Smer	Velikost pomnožka (bp)	Funkcija
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	sprednji		regija ITS - med 18S rDNA in 28S rDNA geni (Valles in sod., 2007)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	zadnji	400 – 850	
NL-1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG	sprednji		regija D1/D2 26S rDNA
NL-4	GGTCCGTGTTCAAGACGG	zadnji	680	(Kurtzman in Robnett, 1998)
				Se nadaljuje ...

... nadaljevanje preglednice 2: Sekvenca, smer, velikost in funkcija začetnih oligonukleotidov za PCR in sekvenciranje

Začetni oligonukleotid	Nukelotidno zaporedje (5'-3')	Smer	Velikost pomnožka (bp)	Funkcija
(GTG) _{5x}	GTGGTGGTGTTGGTG	sprednji in zadnji	različne velikosti	regije IRS – ponavljajoča se zaporedja v bakterijskem genomu (Versalovic in sod., 1994)
27 F 518 R	AGAGTTGATCCTGGCTAG GTATTACCGCGGCTGCTGG	sprednji zadnji	490 – 528	bakterijski gen za 16S rRNA (Edwards in sod., 1989)

3.1.7 Reagenti za agarozno gelsko elektroforezo

Molekulski označevalec dolžin pomnožkov DNA

Sestava molekulskega označevalca dolžin pomnožkov DNA:

- DNA lestvica - GeneRulerTM 100 bp/Mix (Thermo Scientific): 100 µL,
- nanašalni pufer, 6 x (Thermo Scientific): 100 µL,
- voda za PCR (Sigma Aldrich): 350 µL.

Ustrezne količine sestavin smo odpipetirali v mikrocentrifugirko in mešanico premešali na vrtinčniku. Tako pripravljen molekulski označevalec smo shranili v hladilniku pri 4 °C.

Raztopina etidijevega bromida (Thermo Scientific)

Za barvanje agaroznih gelov po postopku agarozne elektroforeze smo pripravili raztopino etidijevega bromida s koncentracijo 0,5 µg/mL.

3.1.8 Reagenti za restrikcijo regije ITS kvasovk

Sestava:

- restriktijski encim (Thermo Scientific),
- pufer za encim (Thermo Scientific).

Preglednica 3: Prepoznavna mesta restriktijskih encimov

Encim	Prepoznavno mesto (5'-3')
CfoI/HhaI (Thermo Scientific)	GCG↓C
HaeIII (Thermo Scientific)	GG↓CC
HinfI (Thermo Scientific)	G↓ANTC

3.1.9 Mešanica ExoSAP za encimsko čiščenje PCR pomnožkov

- Rakova alkalna fosfataza (Fermentas): 150 µL,
- 10 x SAP defosforilacijski pufer (Fermentas): 30 µL,
- eksonukleaza I, 20 U/µL (New England Biolabs): 7,5 µL.

Ustrezne količine sestavin smo prenesli v mikrocentrifugirko, dobro premešali na vrtinčniku in mešanico shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.1.10 Reagenti za izolacijo DNA za kariotipizacijo

3.1.10.1 Reagenti za izolacijo DNA:

- 50 mM EDTA, pH = 7,5,
- 50 mM EDTA, pH = 9,0,
- 0,5 M EDTA, pH = 9,0,
- 1 M EDTA, pH = 7,5,
- pufer CPESa,
- pufer CPES,
- pufer CPEa,
- pufer CPE,
- DTT (Sigma),
- agarosa LMP,
- Novo Zym 234,
- proteinaza K,
- raztopina 3.

Sestava pufra CPES:

- pufer CPESa: 1,5 mL,
- 1M EDTA, pH = 7,5: 1,5 mL,
- zrno DTT.

Sestava pufra CPE:

- 20 mL pufra CPEa: 20 mL,
- 1 M EDTA, pH = 7,5: 20 mL.

Sestava raztopine 3:

- 90,0 mL 0,5 M EDTA, pH = 9,0,
- 1 mL 1 M baze Tris/HCl, pH = 8,0,
- 5 mL 20 % Na-lauril-sarkozina,

- 4 mL sterilne destilirane vode.

Pred uporabo smo k 40 mL raztopine 3 dodali 40 mg proteinaze K oz. ustrezeno razmerje raztopina 3:proteinaza K glede na potreben volumen.

1 M bazo Tris/HCl pH = 8,0 smo pripravili tako, da smo v 20 mL destilirane vode ob stalnem mešanju raztopili 2,42 g baze TRIZMA in s pomočjo koncentriranega HCl uravnali pH na 8,0 ter raztopino avtoklavirali pri tlaku 1,1 bar in temperaturi 110 °C za 15 min.

20 % Na-lauril-sarkozin smo pripravili iz trdnega reagenta z dodatkom vode, pri čemer smo sterilnost dosegli s filtriranjem s Sartoriusovim nitrozo-celuloznim filtrom premera por 0,2 µm.

Agaroza LMP

Agarozo LMP smo pripravili tako, da smo zatehtali 110 mg agaroze LMP, dodali 8,2 mL destilirane sterilne vode in jo za nekaj sekund segrevali v mikrovalovni pečici, da se je popolnoma raztopila. Nato smo jo inkubirali na 42 °C in ji pred uporabo dodali 32 mg Novo Zym 234.

3.1.10.2 Reagenti za elektroforezo v pulzirajočem polju

Sestava:

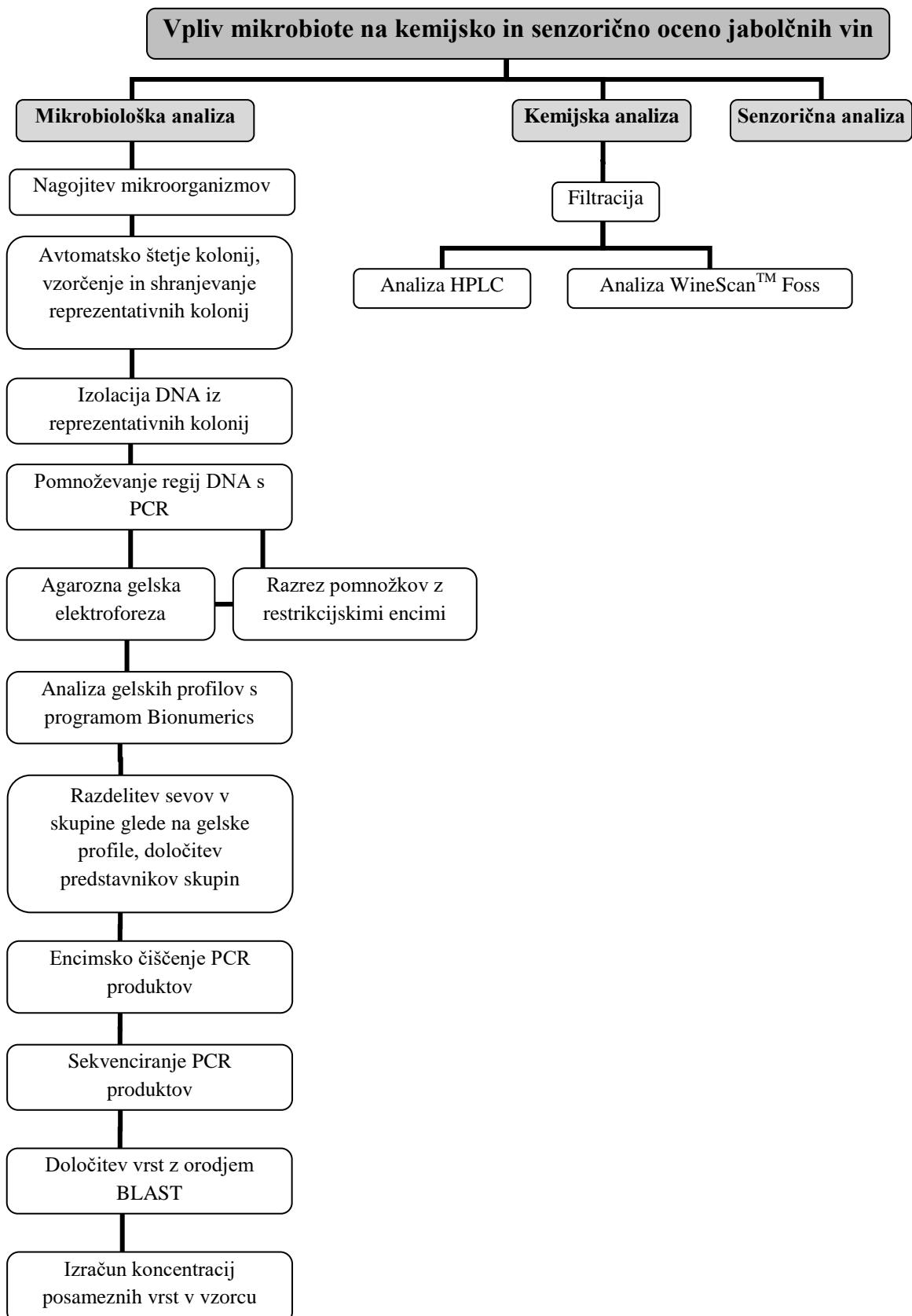
- agarosa Na-LKB,
- agarosa NA,
- 5x pufer pufer TBE,
- destilirana voda.

Pufer TBE (5x)

5x pufer TBE smo pripravili tako, da smo v suho steklenico natehtali 108,0 g baze TRIS, 55,0 g borove kisline, 7,4 g EDTA, dolili destilirano vodo do oznake 1 L in premešali na magnetnem mešalu, da so se vse sestavine dobro raztopile. Sterilnost smo dosegli z avtokloviranjem pri tlaku 1,1 bar in temperaturi 110 °C za 15 min.

3.2 METODE

Raziskovalno delo je bilo razdeljeno na tri dele, in sicer na mikrobiološki del, ki je potekal v več fazah, na kemijski del, ki je zajemal kemijsko analizo jabolčnega vina s pomočjo metod HPLC in WineScan™ Foss, ter na senzorični del. Celoten postopek raziskovalnega dela je prikazan na sl. 4.



Slika 4: Shema poteka raziskovalnega dela

3.2.1 Mikrobiološki del

3.2.1.1 Vzorčenje jabolčnega vina in odvzem brisov površine sodov

Pri vzorčenju jabolčnega vina in brisov površine sodov smo se ravnali po Pravilniku o načinu ... (2005). Vzorčenje jabolčnega vina je potekalo dan pred mikrobiološko analizo, in sicer smo vzorčili v 50 mL falkonke v dveh paralelkah. Odvzem brisov smo izvedli sočasno z vzorčenjem jabolčnega vina na površini velikosti 4x5 cm, v okolini pipe oz. vrhnje luknje za polnjenje soda. Pri brisanju smo obračali palčko, ki smo jo nato shranili v posodici za bris s 5 mL sterilne fiziološke raztopine. Vse vzorce smo do mikrobiološke analize hranili v hladilniku pri temperaturi do 8 °C.

3.2.1.2 Nacepljanje plošč z vzorci jabolčnega vina in brisi

Vzorce jabolčnega vina smo redčili z redčitveno vrsto do 10^{-3} . S pripravljenimi redčitvami in nerazredčenim vzorcem smo aseptično nacepili štiri sterilna selektivna gojišča za izolacijo mikroorganizmov v treh ponovitvah. Gojišča smo nacepili tako, da smo odpipetirali po 100 µL vzorca/redčitve in ga po gojišču razmazali s plastično spatulo po Drigalskem. Vzorce brisov smo nacepljali in inkubirali po istem postopku kot vzorce jabolčnega vina, z razliko, da smo na gojišča nacepili le nerazredčen in 10x razredčen vzorec v dveh ponovitvah. Nacepljena in zapakirana gojišča smo prenesli v inkubator, nastavljen na temperaturo 28 °C in v teh razmerah inkubirali dva do tri dni. Gojišči YPD, DRBC in gojišče po Frauterju smo inkubirali aerobno, v anaerobni lonec z gojišči MRS pa smo dodali generator anaerobnih razmer in posodo neprodušno zaprli.

3.2.1.3 Štetje kolonij in morfološko razvrščanje kolonij v skupine

Po inkubaciji smo pregledali plošče z gojišči ter izločili neštevne plošče, na števnih pa smo s pomočjo računalniškega programa prešeli število kolonij. Na teh ploščah smo glede na morfološke značilnosti določili skupine kolonij, prešeli število predstavnikov in po enega iz vsake skupine shranili v fiziološki raztopini s 15 % glicerolom pri T -80 °C.

3.2.1.4 Izolacija DNA

DNA smo izolirali iz reprezentativnih kolonij, shranjenih v fiziološki raztopini s 15 % glicerolom pri T -80 °C. Mikrotitrskie plošče smo prenesli na sobno temperaturo, da so se vzorci odtalili, jih premešali na vrtinčniku in prenesli po 50 µL biomase v svežo mikrocentrifugirko.

Izolacija kvasne DNA

Izolacijo kvasne DNA smo izvedli po protokolu MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit, proizvajalca Epicentre. Preneseni biomasi smo dodali 50 µL raztopine za lizo kvasnih celic in 0,2 µL RNaze A (5 µg/µL), resuspendirali na vrtinčniku in tako pripravljene mešanice inkubirali v vodni kopeli pri 65 °C za 15 min. Po inkubaciji smo mešanice za 5

min postavili na led, dodali 25 µL reagenta za precipitacijo proteinov MPC, premešali z vrtinčnikom za 10 s in ostanke celic odcentrifugirali pri 3000 obr/min za 10 min. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko, dodali 100 µL izopropanola ter premešali z obračanjem. DNA smo scentrifugirali pri 3000 obr/min za 10 min, supernatant smo zavrgli. Pelet smo sprali z 200 µL 70 % etanola, ki smo ga nato odstranili ter pustili na zraku, da je preostanek izhlapel. DNA smo na koncu resuspendirali v 10 µL pufra TE.

Izolacija bakterijske DNA

Izolacijo bakterijske DNA smo izvedli po protokolu PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent®, proizvajalca Thermo Fisher Scientific. Preneseno biomaso smo centrifugirali pri 3000 obr/min za 5 min, ostranili supernatant in pelet resuspendirali v 20 µL reagenta PrepMan, premešali na vrtinčniku ter segrevali 10 min pri 100 °C. Biomaso smo nato ponovno centrifugirali pri 3000 obr/min za 15 min. Za reakcijo PCR smo uporabili supernatant.

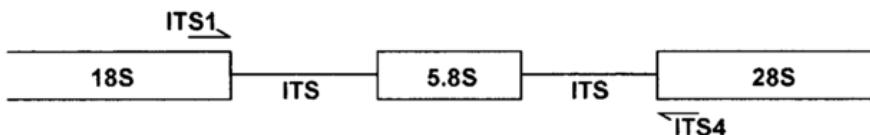
3.2.1.5 Pomnoževanje odsekov DNA s PCR

Pred začetkom dela smo odmrznili vse reagente, razen polimeraze Taq, ki smo jo hranili na ledu. Vse reagente razen polimeraze Taq, smo pred dodatkom v mešanico PCR zvrtinčili. Končno mešanico PCR smo na hitro premešali na vrtinčniku, jo takoj odpipetirali v pripravljene ploščice PCR, v katere smo predhodno dodali DNA in jih prenesli v ogreto napravo PCR ter vključili primeren protokol za pomnožitev, naveden v preg. 4.

Preglednica 4: Protokoli za pomnoževanje DNA

Oligonukleotidni začetniki	Začetna denaturacija	Denaturacija	Prileganje	Podaljševanje	Končno podaljševanje
ITS1, ITS4 (Esteve-Zarzoso in sod., 1999)	95 °C 5 min	94 °C 1 min	55,5 °C 2 min	72 °C 2 min	72 °C 10 min
35 ciklov					
NL-1, NL-4 (Versalovic in sod., 1994)	95 °C 7 min	90 °C 30 sec	40 °C 1 min	65 °C 8 min	65 °C 16 min
30 ciklov					

Za pomnoževanje kvasne DNA za RFLP smo uporabili začetna oligonukleotida ITS1 in ITS4, ki pomnožita dve variabilni regiji ITS in ohranjeno regijo 5.8S rRNA gena (sl. 5; White in sod., 1990). Za identifikacijo kvasovk s sekvenciranjem smo uporabili začetna oligonukleotida NL-1 in NL-4, ki se vežeta na regijo D1/D2, ki kodira zapis za 26S rRNA (Kurtzman in Robnett, 1998).



Slika 5: rDNA regija, ki se pomnožuje z začetnimi oligonukleotidi ITS1 in ITS4 (Guillamón in sod., 1998)

Za združevanje genetsko podobnih bakterij v skupine smo uporabili mikrosatelitski marker (GTG)_{5x}, ki se veže na ponavljajoča zaporedja, raztresena znotraj bakterijskega genoma, in omogoča pomnoževanje fragmentov različnih velikosti (Versalovic in sod., 1994). Predstavnike teh skupin smo identificirali na podlagi sekvenciranja 16S rDNA, za kar smo uporabili univerzalna bakterijska začetna oligonukleotida 27F in 518R (Pérez-Martín in sod., 2014; Sánchez in sod., 2010; Edwards in sod., 1989).

3.2.1.6 Restriktijska analiza pomnožkov ITS

Z restriktijskimi encimi smo rezali pomnožke ITS kvasovk. Za restrikcijo smo uporabili tri encime: *CfoI* oz. *HhaI*, *HaeIII* in *HinfI* (Esteve-Zarzoso in sod., 1999; Valles in sod., 2007). Po navodilih proizvajalca smo pripravili ustrezne restriktijske mešanice in je po 5 µL dodali k 5 µL PCR pomnožkov ter inkubirali dve do tri ure pri 37 °C.

3.2.1.7 Agarozna gelska elektroforeza

Za preverjanje uspešnosti izolacije DNA smo uporabljali 1,5 % agarozni gel, za preverjanje uspešnosti pomnoževanja s PCR pa 2,5 % agarozni gel. Pripravili smo ju tako, da smo v steklenico zatehtali ustrezeno količino agaroze (4,5 g za 2,5 % in 2,7 g za 1,5 % agarozni gel), dolili 180 mL 1x pufra TAE, ter jo raztopili v mikrovalovni pečici. Raztopljeno agarozo smo ohladili na 50 °C in jo razlili v pripravljen nosilec z glavnički. Ko se je gel strdil (po približno 15 min), smo odstranili glavniček, nosilec z gelom vstavili v elektroforetsko kadičko, napolnjeno z 1x pufrom TAE, v luknjice nanesli vzorce z dodanim 6x nanašalnim pufrom in lestvico DNA ter nastavili pogoje elektroforeze: 180 V, 400 mA, 45 min. Po končani elektroforezi smo gel pobarvali z etidijevim bromidom in ga obdelali z računalniškim programom Quantity One 4.2.3.

3.2.1.8 Encimsko čiščenje produktov PCR in priprava vzorcev za sekvenciranje

Po protokolu smo si pripravili ustrezeno količino mešanice ExoSAP. V mikrotitersko ploščo smo prenesli po 3,7 µL pomnožkov PCR in 1,3 µL mešanice ExoSAP ter inkubirali 30 minut pri 37 °C in nato 5 minut pri 95 °C. Po inkubaciji smo v mikrotitrsko ploščo dodali še po 5 µL začetnih oligonukleotidov za sekvenciranje. Tako pripravljene plošče smo dobro zatesnili ter jih do pošiljanja shranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.2.1.9 Kariotipizacija

Izolacija DNA za kariotipizacijo

Za izolacijo DNA smo uporabili 48 ur stare čiste kulture na trdnem gojišču, ki smo jih v aseptičnih pogojih resuspendirali v sterilni destilirani vodi v mikrocentrifugirkah, dobro homogenizirali na vrtinčniku in centrifugirali pri 4000 obr/min za 5 min. Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant, po potrebi ponovili postopek spiranja ter dodali 1 mL 50 mM EDTA pH = 7,5, resuspendirali in centrifugirali pri 4000 obr/min za 5 min in odstranili supernatant. K biomasi smo dodali po 75 µL raztopine CPES, premešali na vrtinčniku, dodali po 165 µL agarosa/Novo Zym raztopine, ogrete na 42 °C, ter nadalje inkubirali pri tej temperaturi, da smo preprečili strjevanje. Vsebino v mikrocentrifugirki smo prenesli v blok formerje, te pa v hladilnik za 20 min, da so se strdili. Strjene blokce smo nato prenesli v tubice, napolnjene s pufrom CPE, jih inkubirali eno uro pri 30 °C brez stresanja, nato pa odstranili CPE pufer in blokce trikrat po 15 min spirali z 50 mM EDTA, pH = 9,0. Po zadnjem odlitju EDTA smo v tubice dodali 1 mL raztopine 3 s proteinazo K in blokce ob rahlem mešanju inkubirali preko noči pri 50 °C oz. 2-3 h pri 37 °C. Po inkubaciji smo odlili raztopino z encimom, inkubirali blokce za eno uro v 50 mM EDTA, pH = 9,0, nato odlili 50 mM EDTA in blokce shranili v 0,5 M EDTA, pH = 9,0.

Gelska elektroforeza v pulzirajočem polju – PFGE

Nosilni gel smo pripravili tako, da smo v suho steklenico zatehtali 1 g agaroze NA, dolili 10 mL 5x pufra TBE in 90 mL destilirane vode ter za nekaj sekund segrevali v mikrovalovni pečici, da se je agarosa popolnoma raztopila. Nato smo gel ohladili na 50 °C in ga vlili v pripravljen kalup za pripravo nosilnega gela na pleksi steklu z dodanim glavnikom. Ko se je gel popolnoma strdil, smo s krovnim stekelcem odrezali tanke rezine blokcev (okoli 1 mm debele), jih prenesli v odprtine v nosilnem gelu in nato napolnili preostali prostor luknjic z gelom za zalihte luknjic, ohlajenim na 50 °C. Tega smo pripravili tako, da smo v čisto steklenico zatehtali 0,01 g agaroze Na-LKB, dolili 10 mL destilirane vode ter za nekaj sekund segrevali v mikrovalovni pečici, da se je agarosa popolnoma raztopila. Tako pripravljen gel smo vstavili v aparaturo skupaj s pleksi stekлом in izbrali program za ločbo kromosomov vrste *Saccharomyces cerevisiae*: pulzni čas: 60-120 s, skupni čas: 24 h, napetostni gradient: 6 V/cm, temperatura: 14 °C.

3.2.1.10 Sekveniranje

Encimsko očiščene pomnožke PCR smo poslali na sekvencianje v komercialno podjetje Macrogen na Nizozemsko.

3.2.2 Fizikalno - kemijske analize jabolčnega vina

3.2.2.1 Fizikalno-kemijske analize jabolčnega vina z aparaturom WineScanTM Foss

Vzorce jabolčnega vina za fizikalno-kemijske analize smo pripravili tako, da smo jih prefiltrirali skozi 1,2 µm filter za filtriranje mošta (Sartorius), s pomočjo nuče za vakuumsko filtriranje (Sartorius). Od tega smo odpipetirali po 1,5 mL za analizo HPLC in po 50 mL za analizo WineScanTM Foss FTIR tehnologijo (analiza WSC).

Analizo WSC jabolčnih vin so opravili na Kmetijsko-gozdarskem zavodu Nova Gorica (KGZ NG) in je obsegala naslednje parametre: relativna gostota, koncentracije etanola, skupnega suhega ekstrakta, reducirajočih sladkorjev, sladkorja prostega ekstrakta, glicerola, metanol, etil acetata, skupnih kislin, hlapnih kislin, jabolčne kisline, mlečne kisline, citronske kisline, vinske kisline, raztopljenega CO₂, pH ter indeks FC za določitev skupnih polifenolov v vinu.

3.2.2.2 Analiza HPLC

S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti smo določili koncentracijo hlapnih fenolov, ki nastanejo ob pretvorbi hidroksicimetnih kislin, kot so 4-vinilfenol, 4-vinilgvajakol, 4-etilfenol in 4-etilgvajakol po metodi, kot jo je opisal avtor Kosel (2014).

3.2.2.3 Določanje vsebnosti biogenih aminov

Vsebnost biogenih aminov v jabolčnem vinu so določili na Kmetijsko-gozdarskem zavodu Nova Gorica po modificirani metodi iz Priročnika mednarodnih metod za analizo vina in mošta z oznako OIV-MA-AS315-18, opisani v diplomskem delu avtorice Rakar (2013). Po tej metodi se biogeni amini določajo z metodo HPLC po derivatizaciji z ortoftalaldehidom, pri čemer derivati oddajajo fluorescenco pri določeni valovni dolžini.

3.2.2.4 Senzorična analiza

Senzorično analizo so izvajali trije člani komisije, ki so za vrednotenje senzoričnih lastnosti uporabili nestrukturirano točkovno lestvico (od 0 do 2 točk, od 0 do 4 točk ali od 0 do 6 točk), ki so jo opisali Golob in sod. (2006). Uporabljena merila za ocenjevanje so bila vezana na uporabo 20-točkovnega modificiranega sistema po Buxbaumu, ki je sicer uradna metoda za ocenjevanje vina (Pravilnik o postopku ..., 2000).

Uporabljena merila za ocenjevanje posameznih lastnosti:

- bistrost jabolčnega vina (0-2 točki),
- barva jabolčnega vina (0-2 točki),
- vonj (0-4 točke),
- okus jabolčnega vina (0-6 točk),
- harmonija (0-6 točk).

4 REZULTATI

4.1 VZORČENJE

Vzorčenje je potekalo na srednje- in višjeležečih kmetijah na Koroškem, v času pozne zime in zgodnje pomladi, in sicer od začetka marca do začetka aprila. Vzorčili smo jabolčno vino po zaključeni fermentaciji, namenjeno uživanju, in bris odprtine na vrhu soda oz. pipe za točenje, v katerem je bilo shranjeno jabolčno vino. Vzorce jabolčnega vina smo odvzeli na 11 lokacijah, vzorce brisov pa sočasno z vzorci jabolčnega vina na 9 lokacijah. V pregл. 5 so prikazani geografski podatki o legi kmetij, ki so prikazane tudi na zemljevidu v pril. B, ter podatki o sortah uporabljenih jabolk in predelovalni opremi.

Preglednica 5: Lokacijski in predelovalni podatki o kmetijah, na katerih je potekalo vzorčenje

Kmetija	GPS podatki	Sorte jabolk	Način stiskanja	Tip posod
Brajel	46°37'58"-38' S, 15°4'27"-31" V, 800 m nad. v.	bobovec, carjevič, lesnika, krivopecelj, mošancelj	lesena stiskalnica na hidravliko	leseni sodi
Grablar	46°34' 5-7" S, 14°53'21"-24" V, 650 m nad. v.	bobovec, carjevič, lesnika, kanadka, krivopecelj, mošancelj, topaz	lesena stiskalnica na kamen	leseni sodi
Jež	46°31'10-11" S, 14°52'11"-14" V, 700 m nad. v.	bobovec, carjevič, lesnika, kanadka, krivopecelj, mošancelj, topaz	lesena stiskalnica na hidravliko	leseni sodi
Kos	46°34'32-35" S, 14°53'45-49" V, 650 m nad. v.	ananasova reneta, bobovec, carjevič, lesnika, krivopecelj, mošancelj	lesena stiskalnica na hidravliko	leseni sodi
Kajžar	46°31'22-25" S, 14°51'29-32" V, 600 m nad. v.	ananasova reneta, bobovec, carjevič, lesnika, krivopecelj, mošancelj	lesena stiskalnica na hidravliko	sodi iz nerjavečih materialov
Marin-Miler	46°34'19-21" S, 14°52'34-36" V, 640 m nad. v.	bobovec, carjevič, lesnika, kanadka, krivopecelj, mošancelj	lesena kasetna stiskalnica na hidravliko	sodi iz nerjavečih materialov
Naddvor	46°31'59"-32'2" S, 14°56'38-42" V, 600 m nad. v.	bobovec, carjevič, elstar, lesnika, krivopecelj, mošancelj, topaz	lesena stiskalnica na hidravliko	leseni sodi
Osojnik	46°26'25-29" S, 14°48'30-34" V, 860 m nad. v.	bobovec, carjevič, lesnika, kanadka, krivopecelj, mošancelj, topaz	lesena stiskalnica na hidravliko	leseni sodi

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje preglednice 5: Lokacijski in pridelovalni podatki o kmetijah, na katerih je potekalo vzorčenje

Kmetija	GPS podatki	Sorte jabolk	Način stiskanja	Tip posod
Pustnik	46°30'53-56" S, 14°51'28-32" V, 500 m nad. v.	ananasova reneta, bobovec, carjevič, domaći kosmač, lesnika, kanadka, krivopecelj, mošancelj, topaz	lesena kasetna stiskalnica na hidravliko	leseni sodi
Zgornji Reht	46°31'37-40" S, 14°49'34-37" V, 700 m nad. v.	bobovec, carjevič, elstar, lesnika, kanadka, krivopecelj, topaz	lesena stiskalnica na hidravliko	leseni sodi
Šibovnik	46°31'28-32" S, 14°56'5-8" V, 500 m nad. v.	bobovec, carjevič, lesnika, kanadka, krivopecelj, mošancelj, topaz	lesena stiskalnica na hidravliko	leseni sodi

4.2 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA JABOLČNIH VIN

4.2.1 Izolacija kvasovk in bakterij iz vzorcev jabolčnega vina in brisov sodov

Iz vzorcev jabolčnega vina in vzorcev brisov sodov smo pripravili redčitvene vrste in s pripravljenimi redčitvami in nerazredčenim vzorcem nacepili štiri različna trdna gojišča, in sicer: YPD in DRBC s kloramfenikolom za rast kvasovk, MRS s cikloheksimidom za rast mlečnokislinskih bakterij in gojišče po Frauterju za rast mikroorganizmov, ki rastejo v pogojih, podobnih tistim v jabolčnem vinu. Nacepljena gojišča smo inkubirali dva do tri dni pri temperaturi 28 °C aerobno/anaerobno. V pril. A so zbrani primeri gojišč YPD, MRS in gojišča po Frauterju po inkubaciji, nacepljenih z različnimi redčitvami vzorcev jabolčnega vina ter brisov odprtine oz. pipe soda. Na njih lahko opazimo veliko mikrobnost, ki je na nivoju morfologije kolonij.

Na selektivnih gojiščih BCA za potrditev prisotnosti bakterije *Bacillus cereus* in BAT za potrditev prisotnosti vrst *Alyciclobacillus*, ni bilo prisotne rasti kvarljivcev v nobenem vzorcu jabolčnega vina.

4.2.2 Koncentracija kvasovk in bakterij v vzorcih jabolčnih vin

Po pregledu plošč smo na števnih ploščah določili število kolonij z avtomatskim števcem kolonij s programom Quantity One 4.2.3 in na podlagi teh rezultatov izračunali povprečno koncentracijo s standardnim odklonom kvasovk in bakterij v jabolčnih vinih. Končni izračuni so prikazani v pregl. 6.

Preglednica 6: Povprečno št. kolonijskih enot in standardni odklon kvasovk, zrastlih na gojišču YPD in bakterij, zrastlih na gojišču MRS v vzorcih jabolčnega vina

Vzorec	Kvasovke	Bakterije		
	Povprečno št. kolonijskih enot (CFU/mL)	Standardni odklon (+/- CFU/mL)	Povprečno št. kolonijskih enot (CFU/mL)	Standardni odklon (+/- CFU/mL)
Brajel	$2,83 \times 10^4$	$1,54 \times 10^4$	$1,31 \times 10^5$	$1,02 \times 10^5$
Grablar	$8,33 \times 10^4$	$1,16 \times 10^4$	$3,00 \times 10^6$	nd
Jež	$2,35 \times 10^4$	$1,90 \times 10^4$	$8,12 \times 10^4$	$4,50 \times 10^4$
Kos	$3,26 \times 10^4$	$3,16 \times 10^4$	$1,39 \times 10^5$	$9,03 \times 10^4$
Kajžar	$3,40 \times 10^3$	nd	$3,60 \times 10^5$	$5,66 \times 10^4$
Naddvor	$1,84 \times 10^4$	$1,31 \times 10^4$	$4,73 \times 10^5$	$7,75 \times 10^5$
Osojnik	$1,23 \times 10^4$	$1,77 \times 10^4$	$1,52 \times 10^5$	$1,72 \times 10^5$
Pustnik	$1,02 \times 10^5$	$4,87 \times 10^4$	$3,11 \times 10^4$	$3,75 \times 10^4$
Šibovnik	$4,13 \times 10^3$	$1,12 \times 10^3$	$6,41 \times 10^3$	$3,18 \times 10^3$
Zgornji Reht	$1,17 \times 10^4$	$2,78 \times 10^3$	$1,02 \times 10^4$	$9,98 \times 10^3$

Okrajšave: ni določeno (nd)

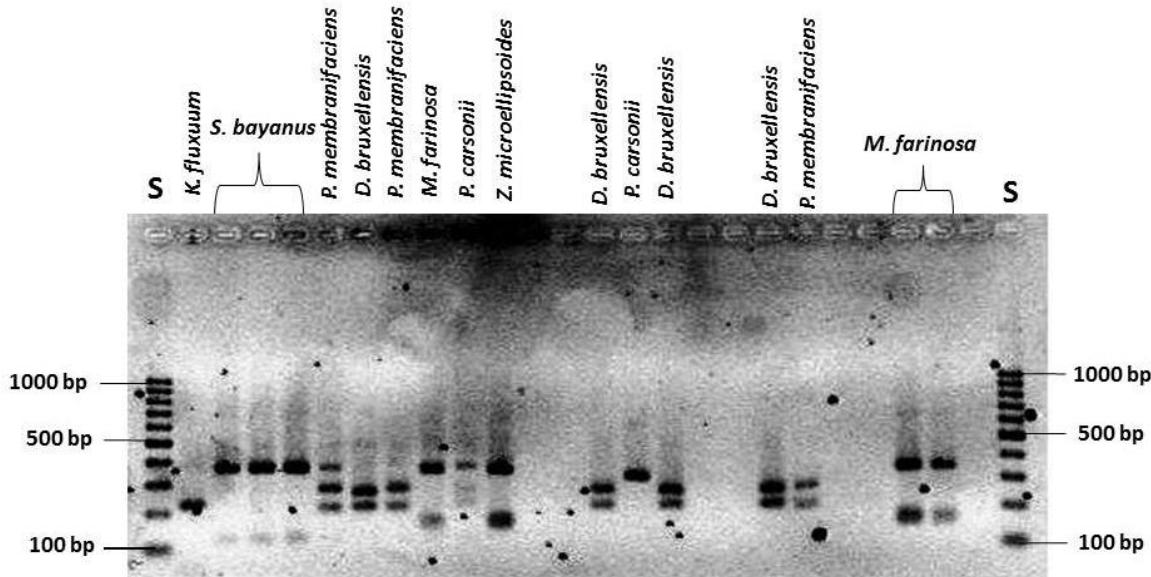
Največje povprečno število CFU kvasovk je bilo v vzorcu jabolčnega vina z lokacije Pustnik ($1,02 \times 10^5$ CFU/mL), najnižje pa v vzorcu z lokacije Kajžar ($3,40 \times 10^3$ CFU/mL). Razlika med njima je obsegala dve potenci. Največje povprečno število CFU bakterij je bilo v vzorcu jabolčnega vina z lokacije Grablar ($3,00 \times 10^6$ CFU/mL), najnižje pa v vzorcu z lokacije Šibovnik ($6,41 \times 10^3$ CFU/mL). Razlika med njima je obsegala tri potence. Povprečna števila CFU bakterij so bila večinoma večja od povprečnega števila CFU kvasovk, razen v vzorcih z lokacij Pustnik in Zgornji Reht. Največja razlika med povprečnim št. CFU kvasovk in bakterij je bila v vzorcu z lokacije Grablar ($2,9 \times 10^6$ CFU/mL). V primeru vzorca jabolčnega vina z lokacije Marin-Miler so bile vse plošče z gojišči YPD in MRS neštevne, zato za ta vzorec nismo izračunali povprečnega števila CFU kvasovk in bakterij.

4.2.3 Restrikskijska analiza regije ITS kvasovk

Po štetju kolonij na ploščah smo na vsaki števni plošči prešteli kolonije, ki so glede na morfološke lastnosti sodile v isto skupino. Iz vsake skupine smo odvzeli po eno reprezentativno kolonijo in jo shranili pri -80°C v 1 mL ploščah z mikrotiterskim formatom. Skupno smo shranili 581 reprezentativnih kolonij iz gojišč YPD, 466 reprezentativnih kolonij iz gojišč MRS in 236 reprezentativnih kolonij iz gojišč po Frauterju. Število morfoloških skupin na posameznih ploščah gojišč YPD se je gibalo od ena do dvajst s povprečjem 4,5, na gojiščih MRS od ena do osem s povprečjem 3,4, na Frauterjevih gojiščih pa od ena do enajst s povprečjem 3,5.

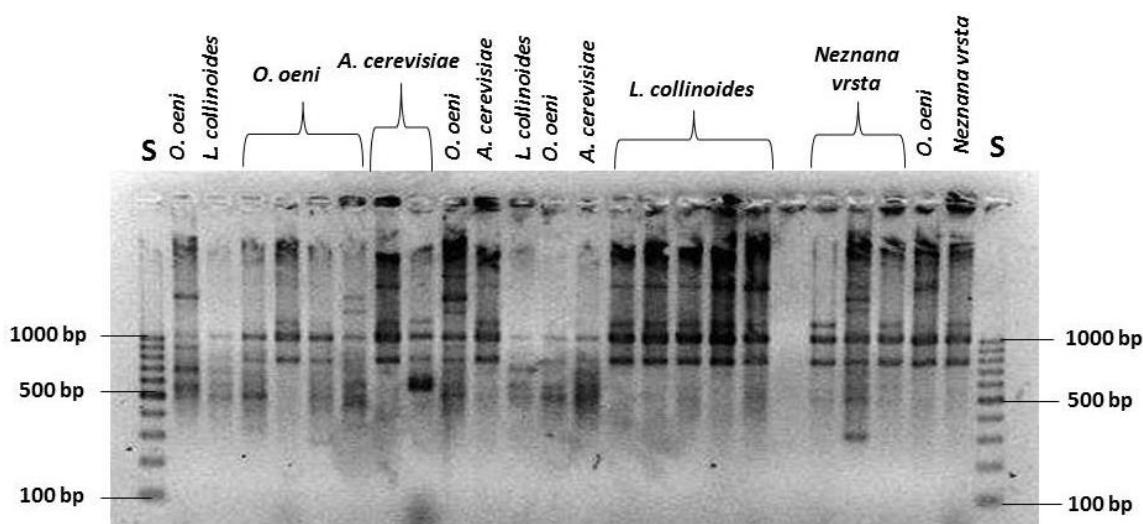
Iz reprezentativnih kolonij smo v naslednjem koraku izolirali DNA kvasovk s kitom za izolacijo DNA kvasovk, MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit, in DNA bakterij z reagentom za izolacijo bakterijske DNA, PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent®. Skupno smo uspešno izolirali DNA iz 407 reprezentativnih kolonij iz gojišč YPD, 454 reprezentativnih kolonij iz gojišč MRS in 229 reprezentativnih kolonij iz gojišč po Frauterju.

Izolirano DNA vzorcev smo pomnožili v reakciji PCR. Z začetnimi oligonukleotidi ITS1 in ITS4 smo pomnožili regijo ITS DNA kvasovk in z začetnimi oligonukleotidi (GTG)_{5x} različno dolge fragmente bakterijske DNA. Pomnožke ITS kvasovk smo nato razrezali v reakcijah s po dvema različnima restrikcijskima encimoma in jih tako kot PCR pomnožke bakterij ločili z agarozno gelsko elektroforezo. Na sl. 6 in 7 sta prikazana primera agaroznih gelov s PCR pomnožki, slikanih pod UV svetlogo.



Slika 6: Primer ločevanja restrikcijskih fragmentov pomnožkov PCR regije ITS kvasovk z agarozno gelsko elektroforezo

Oznake: S, standardna lestvica 1 kb (Thermo Scientific)



Slika 7: Primer ločevanja pomnožkov DNA bakterij, pomnoženih z mikrosatelitskim začetnim oligonukleotidom (GTG)_{5x} z agarozno gelsko elektroforezo
 Oznake: S, standardna lestvica 1 kb (Thermo Scientific)

4.2.4 Identifikacija prisotnih vrst v jabolčnem vinu

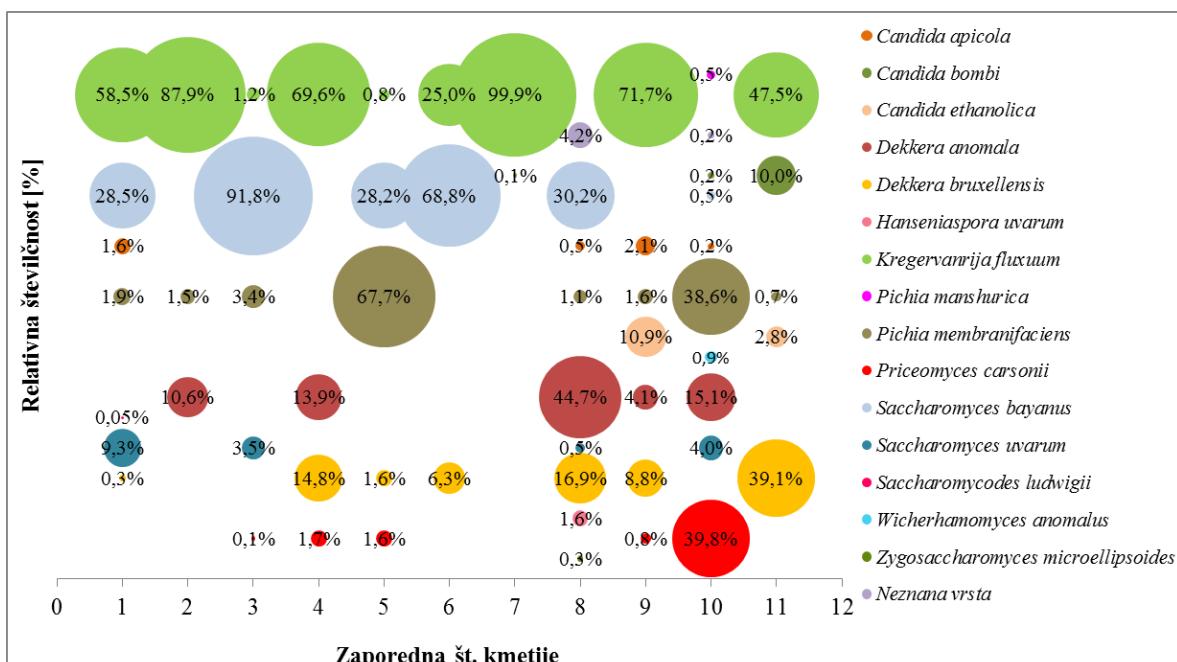
Z računalniškim programom BioNumerics 7.5 smo z drevesom podobnosti razvrstili restriktijske fragmente kvasovk oz. pomnožkov PCR bakterij v genetsko podobne skupine. Restriktijske profile pomnožkov kvasovk smo razvrstili v 20 skupin, profile pomnožkov PCR reprezentativnih kolonij iz gojišč MRS v 25 skupin, profile pomnožkov PCR reprezentativnih kolonij iz gojišč po Frauterju pa v 29 skupin. Iz vsake skupine smo izbrali po enega predstavnika, katerih črtno kodo, značilno za posamezno skupino mikroorganizmov (regijo D1/D2 kvasovk oz. regijo 27-518 16S rDNA bakterij), smo poslali na sekvenciranje v komercialno podjetje. Določena nukleotidna zaporedja posameznih sevov smo vnesli v program BioNumerics, v katerem smo obdelana zaporedja z orodjem BLAST primerjali z zanimimi zaporedji v bazi podatkov NCBI GenBank in tako identificirali prisotne vrste.

Na podlagi števila morfoloških skupin in števila kolonij v teh morfoloških skupinah na posameznih ploščah smo za vsak vzorec preračunali relativno številčnost posameznih identificiranih vrst ter koncentracijo določene vrste v CFU/mL v vzorcu jabolčnega vina oz. CFU/cm² v vzorcu brisa, glede na skupno koncentracijo vseh vrst tega vzorca. Relativna številčnost predstavlja frekvenco pogostnosti izolacije posamezne vrste iz vzorca jabolčnega vina oz. število celic posamezne vrste v vzorcu glede na skupno število celic.

4.2.4.1 Kvasovke

Izmed 401 reprezentativnih kolonij iz enajstih vzorcev jabolčnih vin, ki so zrastle na gojiščih YPD, smo skupno identificirali petnajst vrst kvasovk in te so: *Candida apicola*, *C. bombi*, *C. ethanolica*, *Dekkera anomala*, *D. bruxellensis*, *Hanseniaspora uvarum*,

Kregervanrija fluxuum, *Pichia manshurica*, *P. membranifaciens*, *Priceomyces carsonii*, *Saccharomyces bayanus*, *S. uvarum*, *Saccharomyces ludwigii*, *Wicherhamomyces anomalus* in *Zygosaccharomyces microellipsoides*. V skupino »neznana vrsta« smo uvrstili tri reprezentativne kolonije kvasovk iz ene skupine profilov pomnožkov PCR, ki je nismo uspeli identificirati. Na sl. 8 so prikazane relativne številčnosti vrst kvasovk v vzorcih jabolčnih vin, na sl. 9 pa njihove koncentracije.

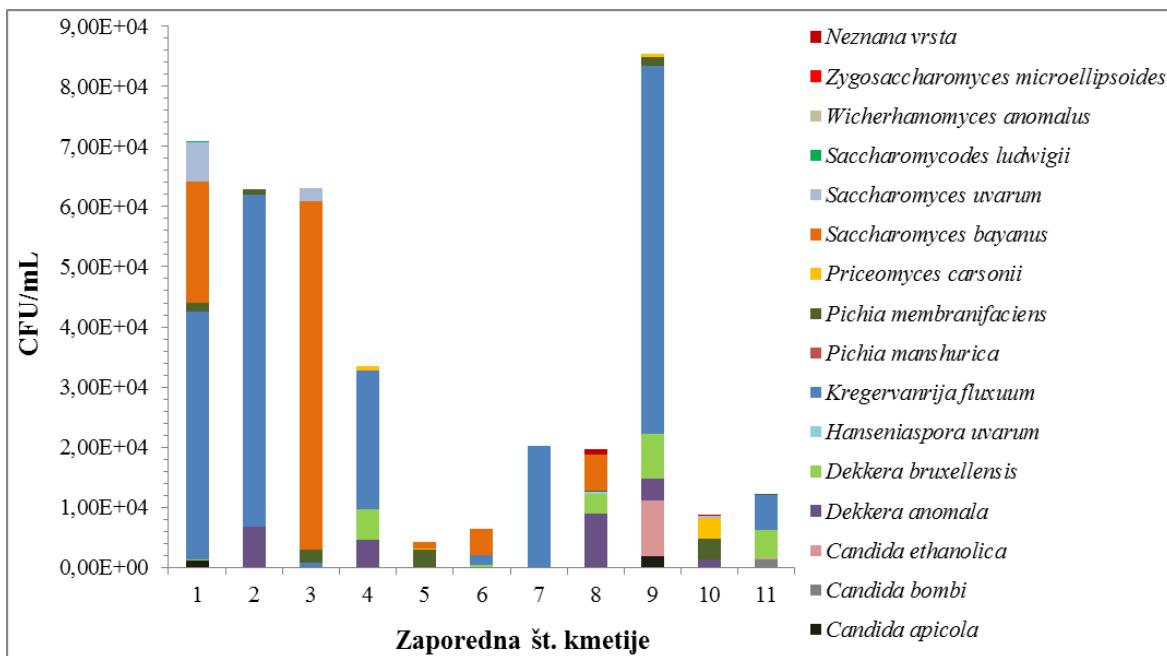


Slika 8: Relativna številčnost vrst kvasovk v jabolčnih vinih

Legenda zaporednih št. kmetij: 1 – Brajel, 2 – Grablar, 3 – Jež, 4 – Kos, 5 – Kajžar, 6 - Marin-Miler, 7 – Naddvor, 8 – Osojnik, 9 – Pustnik, 10 – Šibovnik, 11 - Zg. Reht

Največja pestrost vrst kvasovk je bila prisotna v vzorcu z lokacijo Šibovnik, v katerem smo identificirali deset vrst. Najmanjšo pestrost vrst kvasovk je imel vzorec z lokacije Naddvor, v katerem smo identificirali dve vrsti. V več kot polovici vzorcev jabolčnih vin je imela največjo relativno številčnost (od 47,5 % do 99,9 %) vrsta *K. fluxuum*. Predstavljala je večinski delež prisotnih vrst v teh vzorcih, razen v vzorcu z lokacije Zg. Reht, kjer je imela podobno veliko relativno številčnost tudi vrsta *D. bruxellensis* (39,1 %). Vrsto *K. fluxuum* smo identificirali v vseh vzorcih, razen v vzorcih z lokacij Osojnik in Šibovnik. V vzorcih z lokacij Jež in Marin-Miler je imela največjo relativno številčnost vrsta *S. bayanus* (91,8 % in 68,8 %), v vzorcu z lokacije Kajžar vrsta *P. membranifaciens* (67,7 %), v vzorcu z lokacije Osojnik *D. anomala* (44,7 %) in v vzorcu z lokacije Šibovnik *P. carsonii* (39,8 %). V vzorcu z lokacije Šibovnik je imela podobno veliko relativno številčnost tudi vrsta *P. membranifaciens* (38,6 %).

H. uvarum, ki je značilno prisotna v prvi fermentacijski fazi rasti, je bila identificirana le v vzorcu z lokacije Osojnik. V vzorcih z lokacij Grablar, Kos, Naddvor, Pustnik in Zg. Reht nismo identificirali nobene izmed vrst *Saccharomyces*, značilnih za drugo fermentacijsko fazo. V vseh vzorcih, razen v vzorcih z lokacij Jež in Naddvor, je bila prisotna vsaj ena izmed vrst *D. anomala* in *D. bruxellensis*, ki sta značilni za zadnjo fazo fermentacije.



Slika 9: Koncentracije posameznih vrst kvasovk (CFU/mL) glede na lokacijo vzorcev jabolčnega vina
 Legenda zaporednih št. kmetij: 1 – Brajel, 2 – Grablar, 3 – Jež, 4 – Kos, 5 – Kajžar, 6 - Marin-Miler, 7 – Naddvor, 8 – Osojnik, 9 – Pustnik, 10 – Šibovnik, 11 - Zg. Reht

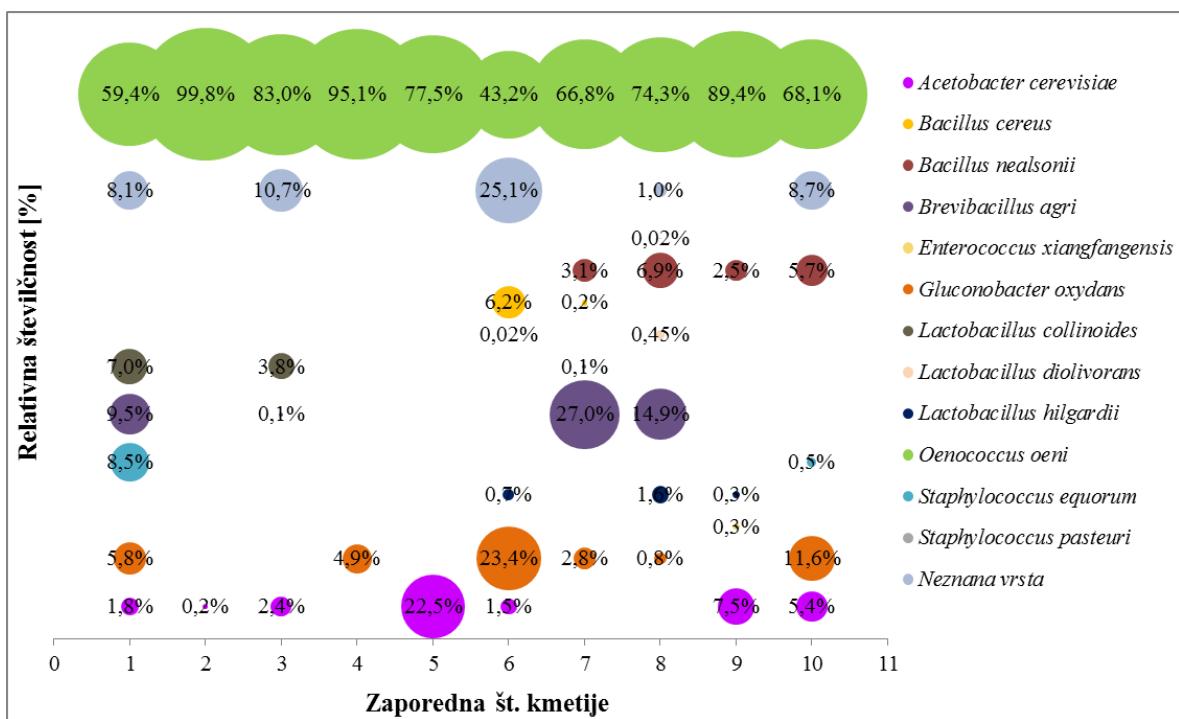
Največje skupno število kolonijskih enot vseh identificiranih vrst je imel vzorec jabolčnega vina z lokacije Pustnik ($8,6 \times 10^4$ CFU/mL), najmanjšo pa vzorec z lokacije Kajžar ($4,3 \times 10^3$ CFU/mL). Izmed vseh vzorcev, v katerih je imela vrsta *K. fluxuum* najvišjo relativno abundanco, je imela le v vzorcu z lokacije Zg. Reht manjšo koncentracijo ($5,8 \times 10^3$ CFU/mL), kot je bila skupna koncentracija ostalih identificiranih vrst ($6,4 \times 10^3$ CFU/mL). V vzorcih z lokacij Brajel, Grablar, Kos, Naddvor in Pustnik je bila koncentracija vrste *K. fluxuum* z najvišjo relativno abundanco ($4,1 \times 10^4$ CFU/mL; $5,5 \times 10^4$ CFU/mL; $2,3 \times 10^4$ CFU/mL; $2,0 \times 10^4$ CFU/mL in $6,1 \times 10^4$ CFU/mL) večja kot skupna koncentracija ostalih identificiranih vrst ($2,9 \times 10^4$ CFU/mL; $7,6 \times 10^3$ CFU/mL; $1,0 \times 10^4$ CFU/mL; $2,2 \times 10^1$ CFU/mL in $2,4 \times 10^4$ CFU/mL). V vzorcih z lokacij Jež in Marin-Miler je bila vrsta *S. bayanus* z največjo relativno številčnostjo identificirana v večji koncentraciji ($5,8 \times 10^4$ CFU/mL in $4,4 \times 10^3$ CFU/mL) kot je bila skupna koncentracija ostalih identificiranih vrst ($5,2 \times 10^3$ CFU/mL in $2,0 \times 10^3$ CFU/mL). Tudi v vzorcih z lokacij Kajžar in Šibovnik sta bili koncentraciji vrst *P. membranifaciens* in *P. carsonii* z največjimi relativnimi številčnostmi ($2,9 \times 10^3$ CFU/mL in $3,4 \times 10^3$ CFU/mL) večji kot skupni koncentraciji ostalih identificiranih vrst v teh vzorcih ($1,4 \times 10^3$ CFU/mL in

$1,9 \times 10^3$ CFU/mL), medtem ko je bila v vzorcu z lokacije Osojnik koncentracija vrste *D. anomala* z največjo relativno številčnostjo ($8,8 \times 10^3$ CFU/mL) nižja od skupne koncentracije ostalih identificiranih vrst ($1,1 \times 10^4$ CFU/mL). V vzorcu z lokacije Šibovnik sta bili vrsta *P. carsonii* z največjo relativno številčnostjo ($3,4 \times 10^3$ CFU/mL) in vrsta *P. membranifaciens* ($3,3 \times 10^3$ CFU/mL) identificirani v približno enakih koncentracijah.

H. uvarum je bila v vzorcu z lokacije Osojnik identificirana v nizki koncentraciji ($3,1 \times 10^2$ CFU/mL) glede na skupno koncentracijo vseh identificiranih vrst ($2,0 \times 10^4$ CFU/mL). Skupna koncentracija vrst *Saccharomyces* je bila v vseh vzorcih, razen v vzorcih z lokacij Osojnik ($6,0 \times 10^3$ CFU/mL) in Šibovnik ($3,8 \times 10^2$ CFU/mL) visoka glede na skupno koncentracijo vseh identificiranih vrst ($2,0 \times 10^4$ CFU/mL in $8,60 \times 10^3$ CFU/mL). Obratno so bile koncentracije vrst *Dekkera* pri vseh vzorcih, razen pri vzorcu z lokacije Osojnik ($1,2 \times 10^4$ CFU/mL), nizke glede na skupno koncentracijo identificiranih vrst.

4.2.4.2 Bakterije

Izmed 319 reprezentativnih kolonij, ki so zrastle na gojiščih MRS v anaerobnih razmerah in 94 reprezentativnih kolonij, ki so zrastle na gojiščih po Frauterju v aerobnih razmerah, iz enajstih vzorcev jabolčnih vin, smo skupno identificirali dvanajst vrst bakterij in te so: *Acetobacter cerevisiae*, *Bacillus cereus*, *B. nealsonii*, *Brevibacillus agri*, *Enterococcus xiangfangensis*, *Gluconobacter oxydans*, *Lactobacillus collinoides*, *L. diolivorans*, *L. hilgardii*, *Oenococcus oeni*, *Staphylococcus equorum* in *S. pasteuri*. V skupino »neznana vrsta« smo uvrstili bakterije iz 43 reprezentativnih kolonij (38 iz gojišč MRS in 5 iz gojišč po Frauterju) iz skupno 30 skupin profilov pomnožkov PCR (15 iz gojišč MRS in 3 iz gojišč po Frauterju), ki jih nismo uspeli identificirati. Na sl. 10 so prikazane relativne številčnosti bakterij v vzorcih jabolčnega vina, na sl. 11 pa njihove koncentracije.

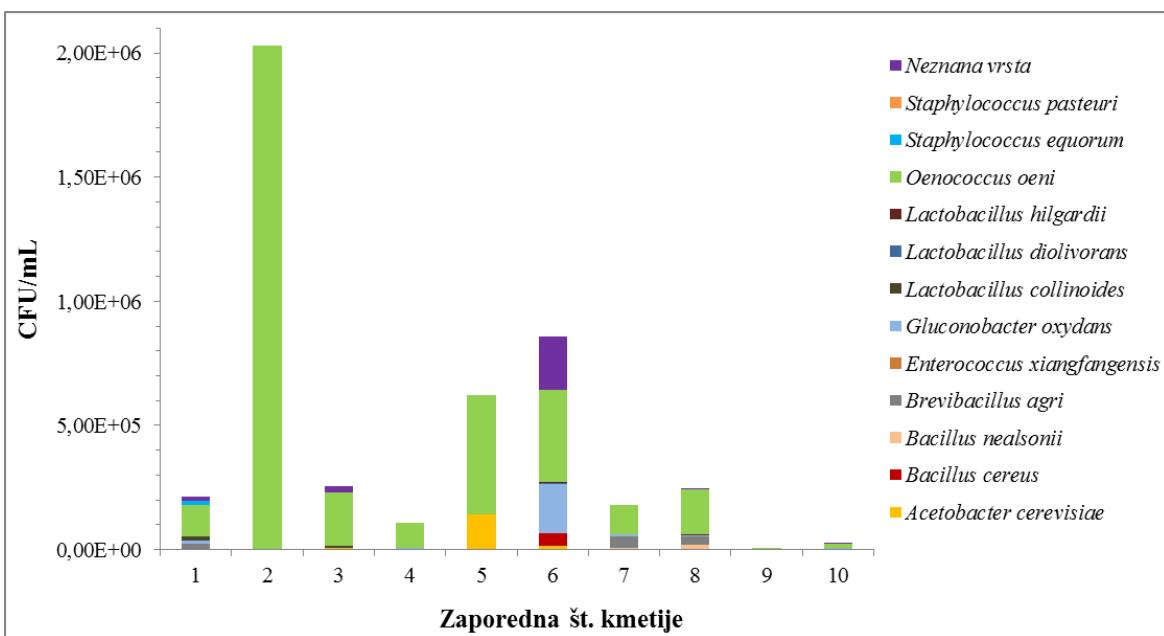


Slika 10: Relativna številčnost bakterij v jabolčnih vinih

Legenda zaporednih št. kmetij: 1 – Brajel, 2 – Grablar, 3 – Jež, 4 – Kos, 5 – Kajžar, 6 - Naddvor, 7 – Osojnik, 8 – Pustnik, 9 – Šibovnik, 10 - Zg. Reht

Največja pestrost vrst bakterij je bila prisotna v vzorcu z lokacije Pustnik, v katerem smo identificirali osem vrst. Najmanjšo pestrost vrst bakterij so imeli vzorci z lokacij Grablar, Kos in Kajžar, v katerih smo identificirali po dve vrsti. V vseh vzorcih jabolčnega vina je imela največjo relativno številčnost vrsta *O. oeni* (od 43,2 % do 99,8 %), ki je predstavljala večinski delež prisotnih vrst v vseh vzorcih, razen v vzorcu z lokacije Naddvor, kjer sta podoben skupni delež predstavljal vrsti *G. oxydans* (23,4 %) in neznana vrsta (25,1 %).

V sedmih vzorcih jabolčnih vin smo identificirali vrsto *A. cerevisiae* z relativnimi številčnostmi od 0,2 % do 22,5 % in v šestih vzorcih vrsto *G. oxydans* z relativnimi številčnostmi od 0,8 % do 23,4 %, ki spadata v skupino ocetnokislinskih bakterij. V vzorcih z lokacij Naddvor in Osobjek smo identificirali potencialno patogeno vrsto *B. cereus*, z relativnimi številčnostmi 6,2 % in 0,2 %. Vrsta *L. collinoides* je bila identificirana v treh vzorcih jabolčnih vin z relativnimi številčnostmi 0,1 %, 4,2 % in 7,0 %.



Slika 11: Koncentracije posameznih vrst bakterij (CFU/ml) glede na lokacijo vzorev jabolčnega vina
 Legenda zaporednih št. kmetij: 1 – Brajel, 2 – Grablar, 3 – Jež, 4 – Kos, 5 – Kajžar, 6 - Naddvor, 7 – Osojnik,
 8 – Pustnik, 9 – Šibovnik, 10 - Zg. Reht

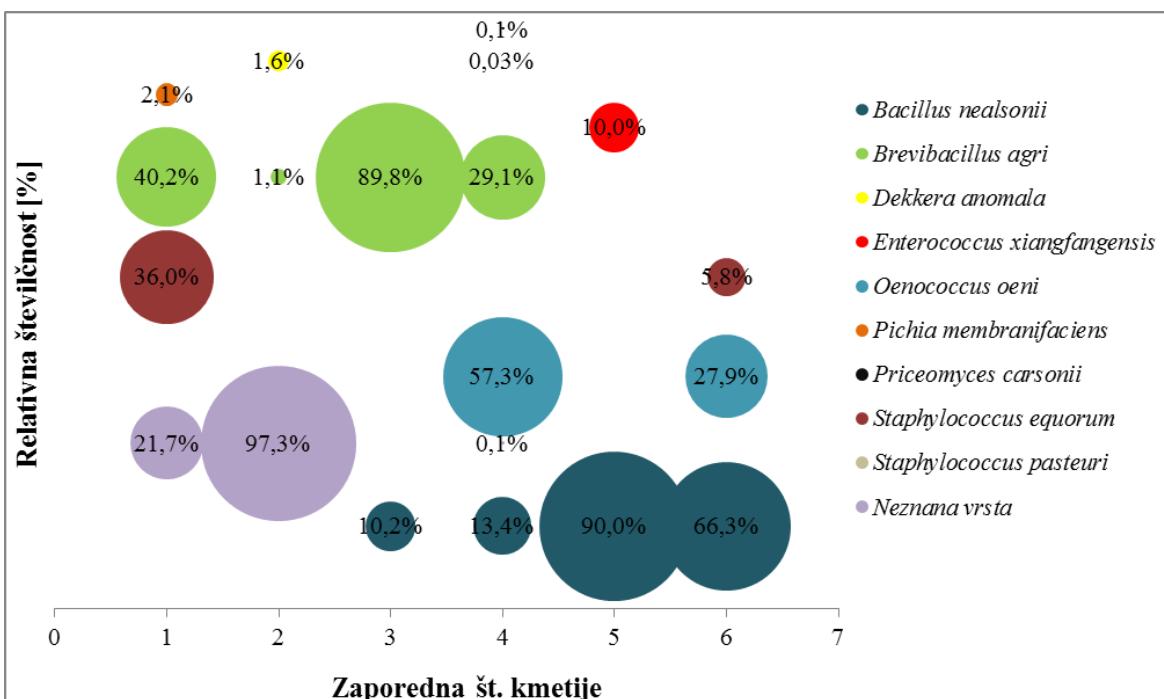
Največje skupno število kolonijskih enot vseh identificiranih vrst je imel vzorec jabolčnega vina z lokacije Grablar ($2,0 \times 10^6$ CFU/mL), najmanjšo pa vzorec z lokacije Šibovnik ($5,7 \times 10^3$ CFU/mL). Skupna koncentracija ostalih identificiranih vrst ($4,9 \times 10^5$ CFU/mL) je presegla koncentracijo vrste *O. oeni* z največjo relativno številčnostjo ($3,7 \times 10^5$ CFU/mL) le v vzorcu z lokacije Naddvor.

V vzorcu z lokacije Kajžar je bila vrsta *A. cerevisiae* identificirana v veliki koncentraciji ($1,4 \times 10^5$ CFU/mL) glede na koncentracijo druge identificirane vrste *O. oeni* ($4,8 \times 10^5$ CFU/mL), v vzorcu z lokacije Naddvor pa vrsta *G. oxydans* ($2,0 \times 10^5$ CFU/mL) glede na skupno koncentracijo vseh identificiranih vrst ($8,6 \times 10^5$ CFU/mL). V slednjem vzorcu je bila v veliki koncentraciji glede na skupno koncentracijo identificiranih vrst identificirana tudi vrsta *B. cereus* ($5,3 \times 10^4$ CFU/mL), medtem ko je bila v vzorcu z lokacije Osojnik identificirana v zanemarljivi koncentraciji ($3,6 \times 10^2$ CFU/mL) glede na skupno koncentracijo vseh identificiranih vrst ($1,8 \times 10^5$ CFU/mL). V vzorcu z lokacije Brajel sta bili vrsti *G. oxydans* in *L. collinoides* identificirani v podobnih koncentracijah ($1,3 \times 10^4$ CFU/mL in $1,5 \times 10^4$ CFU/mL).

4.2.4.3 Mikroorganizmi sposobni rasti na etanolu kot edinem viru ogljika

Na gojišču z etanolom kot edinem viru ogljika (gojišče po Frauterju) so zrastle tako kvasovke kot bakterije. Izmed 94 reprezentativnih kolonij iz vzorcev jabolčnih vin, ki so zrastle na gojiščih po Frauterju, smo identificirali šest vrst bakterij in te so: *Bacillus nealsonii*, *Brevibacillus agri*, *Enterococcus xiangfangensis*, *Oenococcus oeni*,

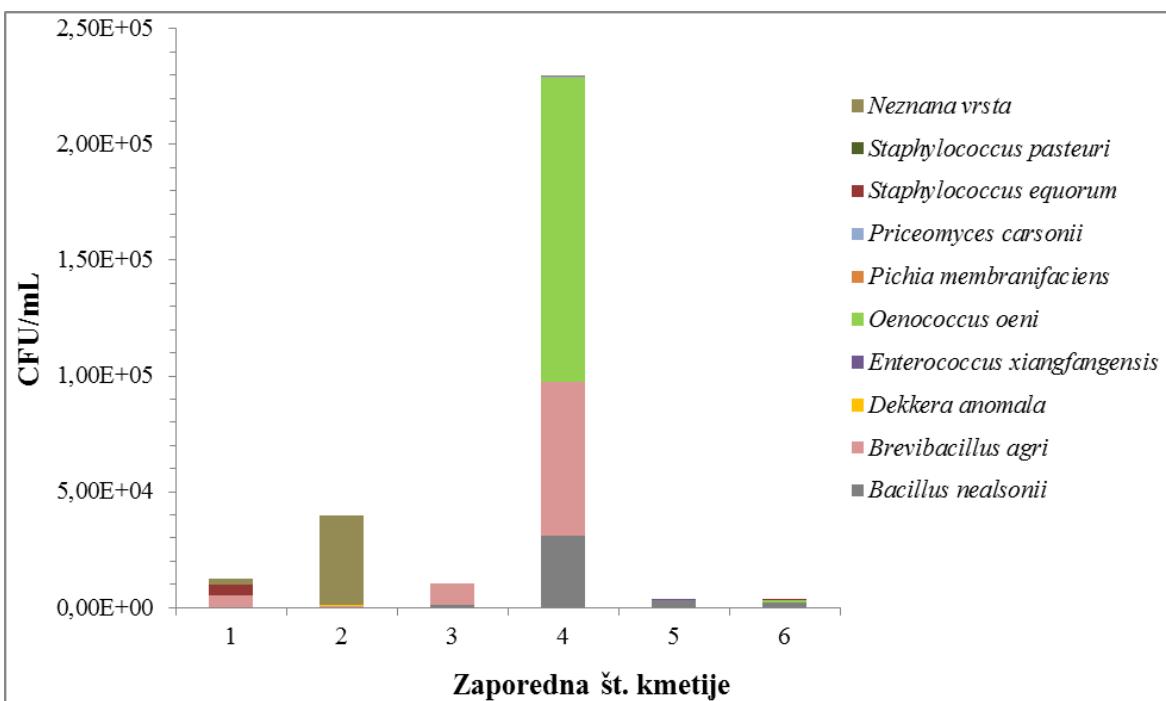
Staphylococcus equorum in *S. pasteurii*, ter tri vrste kvasovk: *Dekkera anomala*, *Pichia membranifaciens* in *Priceomyces carsonii*. V skupino »neznana vrsta« smo uvrstili pet reprezentativnih kolonij iz treh skupin bakterijskih profilov pomnožkov PCR, ki jih nismo uspeli identificirati. Na sl. 12 so prikazane relativne številnosti bakterij in kvasovk v vzorcih jabolčnega vina, na sl. 13 pa njihove koncentracije.



Slika 12: Relativna številnost bakterij in kvasovk v jabolčnih vinih

Legenda zaporednih št. kmetij: 1 – Brajel, 2 – Jež, 3 – Osojnik, 4 – Pustnik, 5 – Šibovnik, 6 – Zg. Reht

Največjo pestrost identificiranih vrst je imel vzorec z lokacijo Pustnik, v katerem smo identificirali šest vrst, najmanjšo pa vzorec z lokacijo Šibovnik, v katerem smo identificirali dve vrsti. Relativne številnosti identificiranih vrst so se med vzorci precej razlikovale. Vrsta *B. agri* je imela največjo relativno številnost v vzorcih z lokacij Brajel (40,2 %) in Osojnik (89,8 %), vrsta *O. oeni* v vzorcu z lokacije Pustnik (57,3 %), vrsta *B. nealsonii* v vzorcih z lokacij Šibovnik (90,0 %) in Zg. Reht (66,3 %), v vzorcu z lokacije Jež pa je bila najpogostejsa neznana vrsta (97,3 %). Kvasovke so imele v primerjavi z bakterijami (od 0,03 % do 90 %) zelo nizke relativne številnosti (od 0,1 % do 2,1 %).



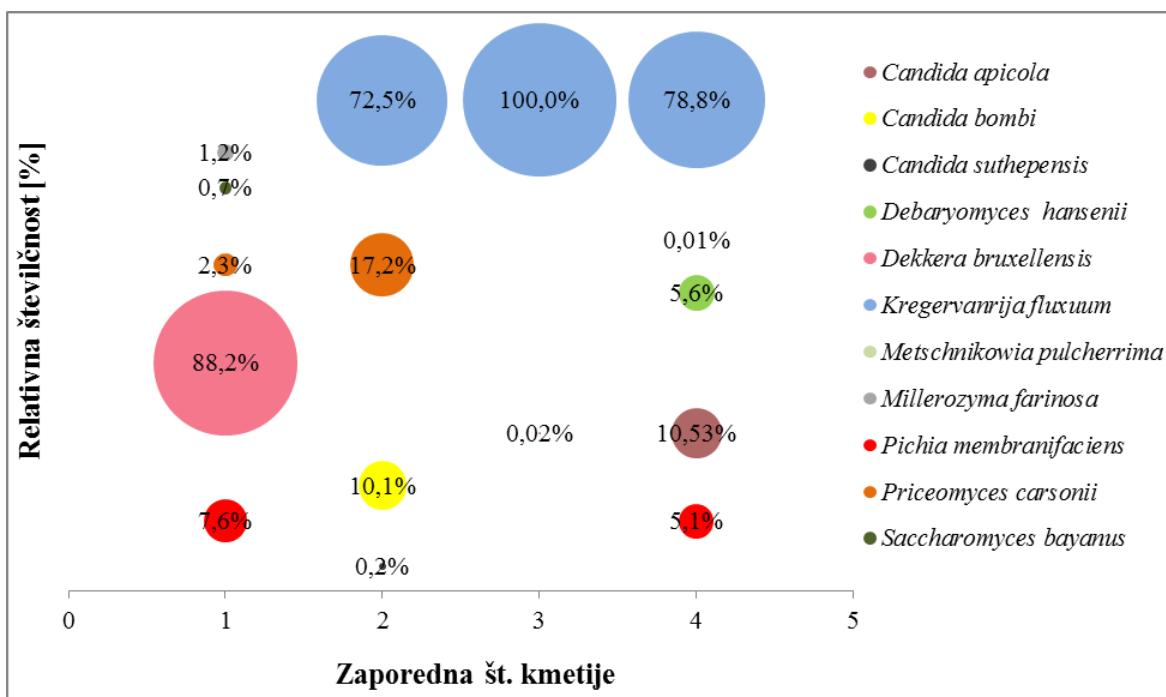
Slika 13: Koncentracije posameznih vrst bakterij in kvasovk glede na lokacijo vzorca jabolčnega vina
Legenda zaporednih št. kmetij: 1 – Brajel, 2 – Jež, 3 – Osojnik, 4 – Pustnik, 5 – Šibovnik, 6 – Zg. Reht

Največje skupno število kolonijskih enot vseh identificiranih vrst je imel vzorec jabolčnega vina z lokacije Pustnik ($2,3 \times 10^5$ CFU/mL), najnižjo pa vzorec z lokacije Zg. Reht ($3,5 \times 10^3$ CFU/mL). Vse vrste kvasovk so bile identificirane v nizkih koncentracijah (od $1,4 \times 10^2$ CFU/mL do $6,6 \times 10^2$ CFU/mL) glede na skupne koncentracije identificiranih vrst (od $3,5 \times 10^3$ CFU/mL do $2,3 \times 10^5$ CFU/mL). V vzorcu z lokacije Brajel je skupna koncentracija ostalih identificiranih vrst v vzorcu ($7,5 \times 10^3$ CFU/mL) presegla koncentracijo vrste *B. agri* ($5,0 \times 10^3$ CFU/mL) z največjo relativno številčnostjo. Nasprotno, v vzorcih z lokacij Jež, Pustnik in Zg. Reht, skupna koncentracija ostalih identificiranih vrst ($1,1 \times 10^3$ CFU/mL; $9,8 \times 10^4$ CFU/mL in $1,2 \times 10^3$ CFU/mL) ni presegla koncentracije neznane vrste ($3,9 \times 10^4$ CFU/mL), vrste *O. oeni* ($1,3 \times 10^5$ CFU/mL) in vrste *B. nealsonii* ($2,3 \times 10^3$ CFU/mL) z največjimi relativnimi številčnostmi.

4.2.5 Identifikacija prisotnih vrst na površini sodov

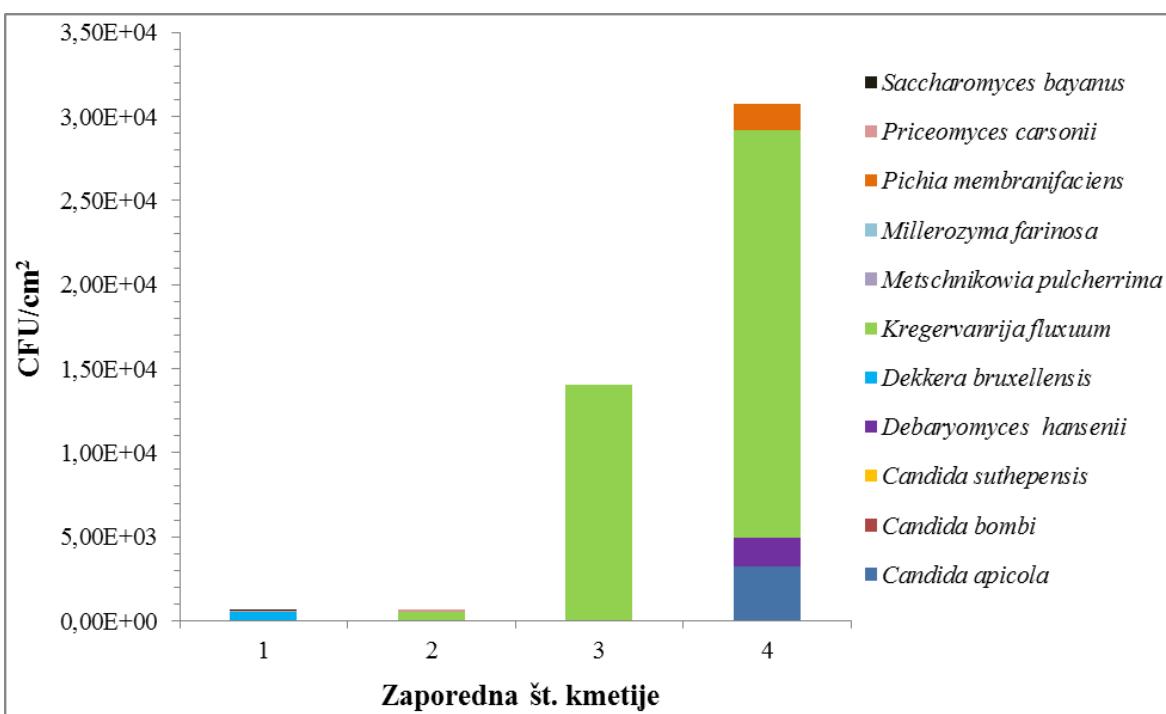
4.2.5.1 Kvasovke

Izmed 180 reprezentativnih kolonij iz vzorcev brisov sodov, ki so zrastle na gojiščih YPD, smo skupno identificirali enajst vrst kvasovk in te so: *Candida apicola*, *C. bombi*, *C. suthepensis*, *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera bruxellensis*, *Kregenvanrija fluxuum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Millerozyma farinosa*, *Pichia membranifaciens*, *Priceomyces carsonii* in *Saccharomyces bayanus*. Na sl. 14 so prikazane relativne številčnosti kvasovk v vzorcih brisov, na sl. 15 pa njihove koncentracije.



Slika 14: Relativna številčnost kvasovk na površini sodov (brisni)
 Legenda zaporednih št. kmetij: 1 – Brajel, 2 – Grablar, 3 – Kajžar, 4 - Marin-Miler

Pestrost vrst kvasovk na površini soda, odvzetih z brisom je bila manjša kot pestrost vrst kvasovk v jabolčnem vinu. Največja pestrost vrst kvasovk je bila prisotna v vzorcih z lokacij Brajel in Marin-Miler, v katerih smo identificirali po pet vrst, najmanjša pa v vzorcu z lokacije Kajžar, v katerem smo identificirali dve vrsti. Vrsta *K. fluxuum* je bila identificirana v vzorcih z lokacij Grablar, Kajžar in Marin-Miler, v katerih je imela tudi največjo relativno številčnost (od 72,5 % do 100,0 %). V vzorcu z lokacije Brajel je imela največjo relativno številčnost vrsta *D. bruxellensis* (88,2 %).



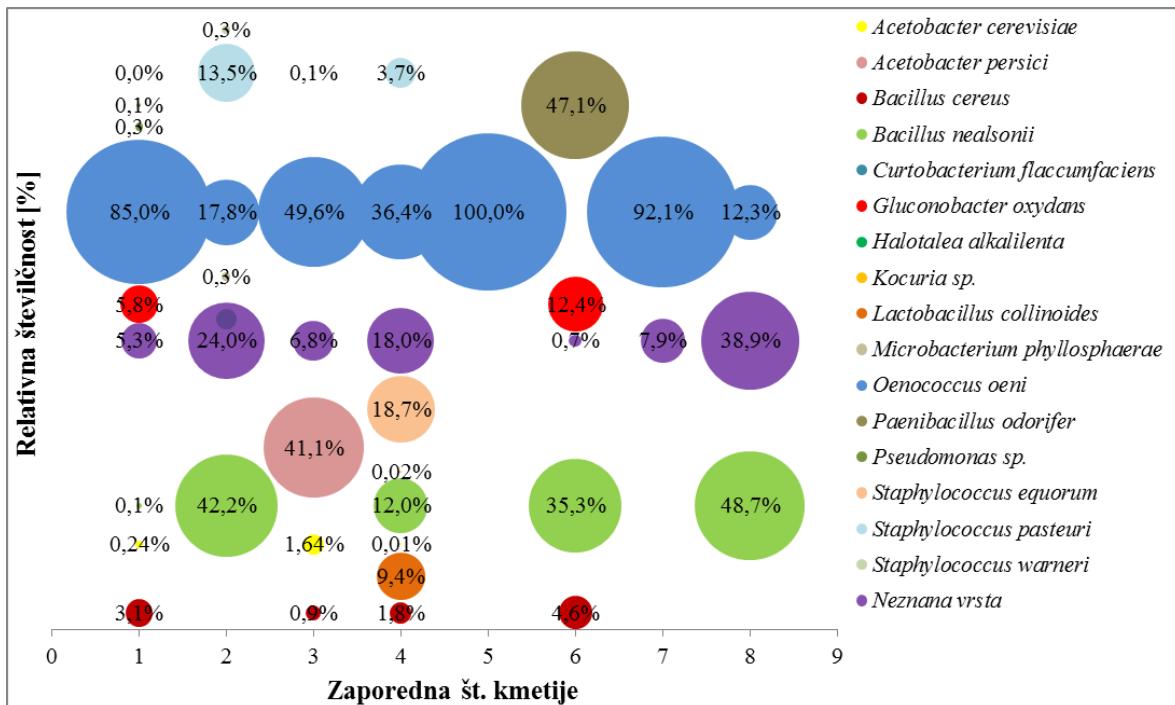
Slika 15: Koncentracije posameznih vrst kvasovk glede na lokacijo vzorca brisa površine soda
 Legenda zaporednih št. kmetij: 1 – Brajel, 2 – Grablar, 3 – Kajžar, 4 - Marin-Miler

Največjo skupno koncentracijo vseh identificiranih vrst je imel vzorec jabolčnega vina z lokacije Marin-Miler ($3,08 \times 10^4$ CFU/cm²), najmanjšo pa vzorec z lokacije Brajel ($5,87 \times 10^2$ CFU/cm²). V vzorcu z lokacije Brajel skupna koncentracija ostalih identificiranih vrst ($69,2$ CFU/cm²) ni presegla koncentracije vrste *D. bruxellensis* ($5,18 \times 10^2$ CFU/cm²) z največjo relativno abundanco. Tudi v vzorcih z lokacij Grablar, Kajžar in Marin-Miler skupne koncentracije ostalih identificiranih vrst ($1,82 \times 10^2$ CFU/cm²; $2,13$ CFU/cm² in $6,53 \times 10^3$ CFU/cm²) niso presegle koncentracije vrste *K. fluxuum* z največjo relativno številčnostjo ($4,80 \times 10^2$ CFU/cm²; $1,41 \times 10^4$ CFU/cm² in $2,42 \times 10^4$ CFU/cm²).

4.2.5.2 Bakterije

Izmed 147 reprezentativnih kolonij iz vzorcev jabolčnih vin, ki so zrastle na gojiščih MRS v anaerobnih razmerah in 142 reprezentativnih kolonij, ki so zrastle na gojiščih po Frauterju v aerobnih razmerah, smo skupno identificirali šestnajst vrst bakterij in te so: *Acetobacter cerevisiae*, *A. persici*, *Bacillus cereus*, *B. nealsonii*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Gluconobacter oxydans*, *Halotalea alkalilenta*, *Kocuria* spp., *Lactobacillus collinoides*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Oenococcus oeni*, *Paenibacillus odorifer*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus equorum*, *S. pasteurii* in *S. warneri*. V skupino »neznana vrsta« smo uvrstili 46 reprezentativnih kolonij (19 iz gojišč MRS in 27 iz gojišč po Frauterju) iz skupno 21 skupin (10 iz gojišč MRS in 11 iz gojišč po Frauterju) bakterijskih profilov pomnožkov PCR, ki je nismo uspeli identificirati. Na sl. 16

so prikazane relativne številnosti bakterij v vzorcih brisov, na sl. 17 pa njihove koncentracije.

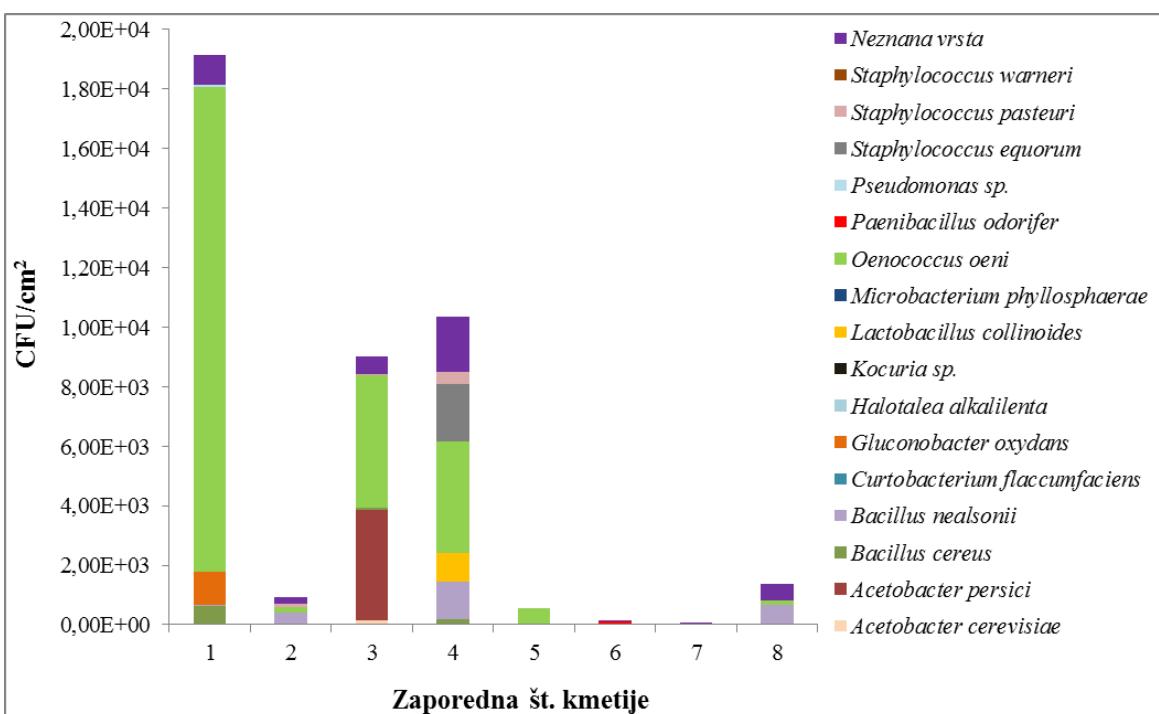


Slika 16: Relativna številnost bakterij na površini sodov (brisovi)

Legenda zaporednih št. kmetij: 1 – Brajel, 2 – Grablar, 3 – Kajžar, 4 – Marin-Miler, 5 - Naddvor, 6 – Osojnik, 7 – Pustnik, 8 – Šibovnik

Največja pestrost vrst bakterij je bila prisotna v vzorcih brisa površine soda z lokacij Brajel in Marin-Miler, v katerih smo identificirali po devet vrst bakterij, najmanjšo pestrost vrst bakterij pa je imel vzorec z lokacije Naddvor, v katerem smo identificirali eno vrsto. V vzorcih z lokacij Brajel, Kajžar, Marin-Miler, Naddvor in Pustnik je imela največjo relativno številčnost vrsta *O. oeni* (od 36,4 % do 100,0 %). V vzorcu z lokacije Kajžar je podoben delež predstavljal vrsta *A. persici* (41,1 %), v vzorcu z lokacije Marin-Miler pa so večji skupni delež (59,9 %) predstavljale vrste *S. equorum*, *B. nealsonii*, *L. collinoides* in neznana vrsta. V vzorcih z lokacij Grablar in Šibovnik je imela največjo relativno številčnost vrsta *B. nealsonii* (42,2 % in 48,7 %), v vzorcu z lokacije Osojnik pa vrsta *P. odonifer* (47,1 %).

V vzorcu z lokacije Kajžar smo identificirali vrsto *A. persici* z relativno številčnostjo 41,1 %. Vrsto *A. cerevisiae* smo identificirali v treh vzorcih z relativnimi številčnostmi od 0,01 % do 1,6 %, vrsto *G. oxydans* pa v dveh vzorcih z relativnima številčnostima 5,8 % in 12,4 %. Vrsto *L. collinoides* smo identificirali le v vzorcu z lokacije Marin-Miler, in sicer z relativno številčnostjo 9,4 %. Vrsto *B. cereus* smo identificirali v štirih vzorcih, njihove relativne številčnosti so bile od 0,9 % do 4,6 %.



Slika 17: Koncentracije posameznih vrst bakterij glede na lokacijo vzorca brisa površine soda
 Legenda zaporednih št. kmetij: 1 – Brajel, 2 – Grablar, 3 – Kajžar, 4 – Marin-Miler, 5 - Naddvor, 6 – Osojnik, 7 – Pustnik, 8 – Šibovnik

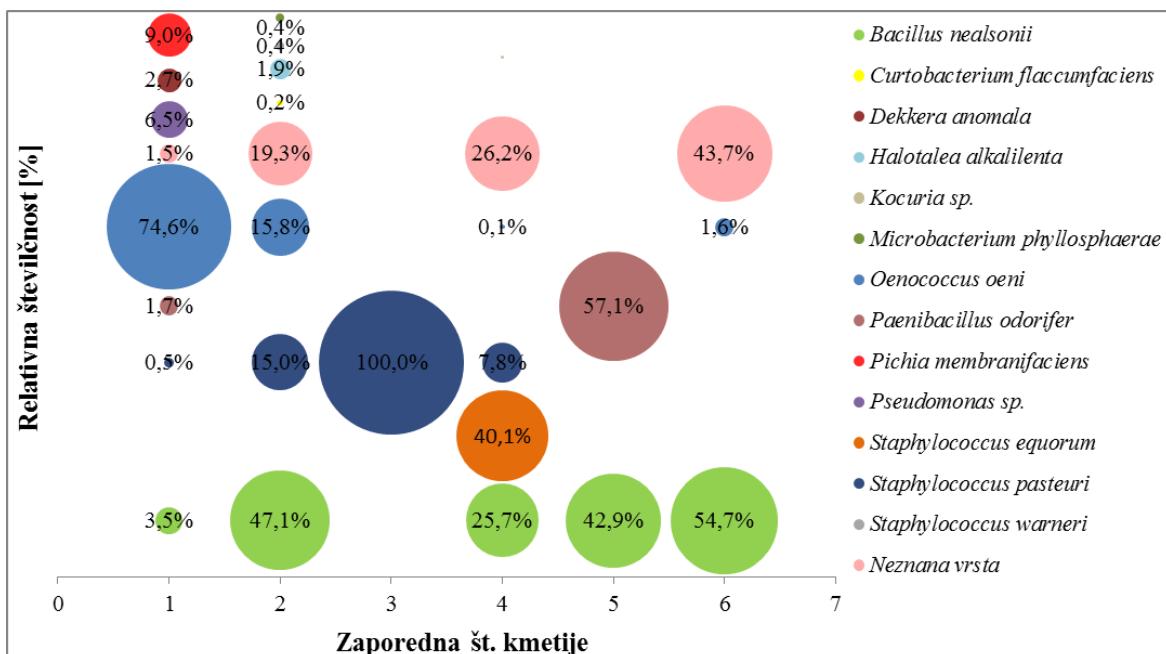
Največjo skupno koncentracijo vseh identificiranih vrst je imel vzorec brisa površine soda z lokacije Brajel ($1,9 \times 10^4$ CFU/cm²), najmanjšo pa vzorec z lokacije Pustnik ($5,3 \times 10^1$ CFU/cm²). Skupna koncentracija ostalih identificiranih vrst ($2,8 \times 10^3$ CFU/cm² in $4,2 \times 10^3$ CFU/cm²) ni presegla koncentracije vrste *O. oeni* z največjo relativno številčnostjo ($1,6 \times 10^4$ CFU/cm² in $4,8 \times 10^1$ CFU/cm²) v vzorcih z lokacij Brajel in Pustnik. V vzorcih z lokacij Kajžar in Marin-Miler je skupna koncentracija ostalih prisotnih vrst ($4,6 \times 10^3$ CFU/cm² in $6,6 \times 10^3$ CFU/cm²) presegla koncentracijo vrste *O. oeni* z največjo relativno številčnostjo ($4,5 \times 10^3$ CFU/cm² in $3,8 \times 10^3$ CFU/cm²). V vzorcih z lokacij Grablar in Šibovnik je skupna koncentracija ostalih prisotnih vrst ($5,3 \times 10^2$ CFU/cm² in $7,0 \times 10^2$ CFU/cm²) presegla koncentracijo vrste *B. nealsonii* z največjo relativno številčnostjo ($4,0 \times 10^2$ CFU/cm² in $6,6 \times 10^2$ CFU/cm²). V vzorcu z lokacije Osojnik je skupna koncentracija ostalih prisotnih vrst ($5,6 \times 10^1$ CFU/cm²) presegla koncentracijo vrste *P. odorifer* z največjo relativno številčnostjo ($4,5 \times 10^1$ CFU/cm²).

Vrsta *A. persici* je bila v vzorcu z lokacije Kajžar identificirana v veliki koncentraciji ($3,7 \times 10^3$ CFU/cm²) glede na skupno koncentracijo identificiranih vrst bakterij ($9,0 \times 10^3$ CFU/cm²), *A. cerevisiae* pa v vzorcih z lokacij Brajel, Kajžar in Marin-Miler v zelo majhnih koncentracijah ($4,6 \times 10^1$ CFU/cm²; $1,5 \times 10^2$ CFU/cm² in $1,3 \times 10^2$ CFU/cm²) glede na skupno koncentracijo vseh identificiranih vrst ($1,9 \times 10^4$ CFU/cm²; $9,0 \times 10^3$ CFU/cm² in $1,0 \times 10^4$ CFU/cm²). Vrsta *G. oxydans* je bila v vzorcu z lokacije Osojnik identificirana v zanemarljivi koncentraciji ($1,2 \times 10^1$ CFU/cm²), v vzorcu z

lokacije Brajel pa v veliki ($1,1 \times 10^3$ CFU/cm 2) glede na skupno koncentracijo prisotnih vrst ($1,9 \times 10^4$ CFU/cm 2). Vrsta *L. collinoides* je bila v vzorcu z lokacije Marin-Miler identificirana v koncentraciji $9,7 \times 10^2$ CFU/cm 2 . Vrsta *B. cereus* je bila v vseh štirih vzorcih identificirana v zanemarljivi koncentraciji glede na skupno koncentracijo vseh identificiranih vrst, največjo je dosegla v vzorcu z lokacije Brajel ($5,9 \times 10^2$ CFU/cm 2).

4.2.5.3 Mikroorganizmi sposobni rasti na etanolu kot edinem viru ogljika

Na gojišču z etanolom kot edinem viru ogljika (gojišče po Frauterju) so zrastle tako kvasovke kot bakterije. Izmed 131 reprezentativnih kolonij iz vzorcev brisov površine sodov, ki so zrastle na gojiščih po Frauterju smo identificirali enajst vrst bakterij in te so: *Bacillus nealsonii*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Halotalea alkalilenta*, *Kocuria* spp., *Microbacterium phyllosphaerae*, *Oenococcus oeni*, *Paenibacillus odorifer*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus equorum*, *S. pasteuri* in *S. warneri*. Identificirali smo tudi dve vrsti kvasovk, in sicer: *Dekkera anomala* in *Pichia membranifaciens*. V skupino »neznana vrsta« smo uvrstili 27 reprezentativnih kolonij iz enajstih skupin bakterijskih profilov pomnožkov PCR, ki jih nismo uspeli identificirati. Na sl. 18 so prikazane relativne številčnosti bakterij in kvasovk v vzorcih brisov površine sodov, na sl. 19 pa njihove koncentracije.

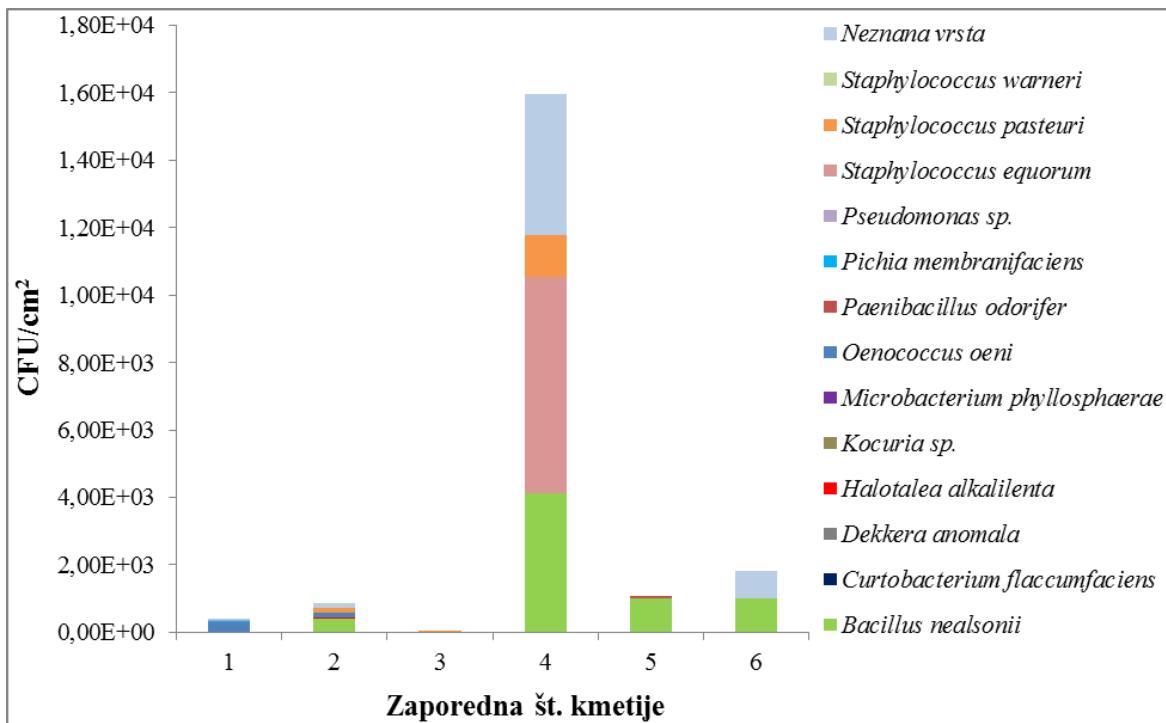


Slika 18: Relativna številčnost bakterij in kvasovk v vzorcih brisov površine sodov

Legenda zaporednih št. kmetij: 1 – Brajel, 2 – Grablar, 3 – Kajžar, 4 – Marin-Miler, 5 – Osojnik, 6 – Šibovnik

Največjo mikrobnjo pestrost sta vsebovala vzorca z lokacij Brajel in Grablar, v katerih smo identificirali po osem vrst, najmanjšo pa je imel vzorec z lokacije Kajžar, v katerem smo

identificirali eno vrsto. V vzorcih z lokacij Grablar in Šibovnik je imela največjo številčnost vrsta *B. nealsonii* (47,1 % in 54,7 %), v vzorcu z lokacije Marin-Miler vrsta *S. equorum* (40,1 %), v vzorcu z lokacije Brajel vrsta *O. oeni* (74,6 %), vrsta *P. odonifer* pa je bila najpogosteša v vzorcu z lokacije Osojnik (57,1 %). Vrsta *S. pasteuri* je bila edina identificirana vrsta v vzorcu z lokacije Kajžar. Obe kvasovki sta bili identificirani v vzorcu z lokacije Brajel, in sicer vrsta *D. anomala* z relativno številčnostjo 2,7 %, vrsta *P. membranifaciens* pa z 9,0 %.



Slika 19: Koncentracije posameznih vrst bakterij in kvasovk glede na lokacijo vzorca brisa površine sodov
Legenda zaporednih št. kmetij: 1 – Brajel, 2 – Grablar, 3 – Kajžar, 4 – Marin-Miler, 5 – Osojnik, 6 – Šibovnik

Skupne koncentracije identificiranih mikrobnih vrst v vzorcih brisov površine sodov so bile večje kot skupne koncentracije v vzorcih jabolčnega vina. Največjo koncentracijo identificiranih vrst je vseboval vzorec z lokacije Marin-Miler ($1,6 \times 10^4$ CFU/cm²), najnižjo pa vzorec z lokacije Kajžar ($7,5$ CFU/cm²). V vzorcih z lokacije Brajel in Šibovnik skupna koncentracija ostalih identificiranih vrst ($9,4 \times 10^1$ CFU/cm² in $8,2 \times 10^2$ CFU/cm²) ni presegla koncentracije vrste *O. oeni* ($2,8 \times 10^2$ CFU/cm²) oz. *B. nealsonii* ($9,9 \times 10^2$ CFU/cm²) z največjima relativnima številčnostima. Nasprotno je v vzorcih z lokacij Grablar in Marin-Miler skupna koncentracija ostalih identificiranih vrst ($4,6 \times 10^2$ CFU/cm² in $9,6 \times 10^3$ CFU/cm²) presegla koncentracijo vrste *B. nealsonii* ($4,1 \times 10^2$ CFU/cm²) oz. *S. equorum* ($6,4 \times 10^3$ CFU/cm²) z največjima relativnima številčnostima. V vzorcu z lokacije Šibovnik je bila razlika med koncentracijo vrste *B. nealsonii* ($9,9 \times 10^2$ CFU/cm²) z največjo relativno številčnostjo in neznano vrsto

($7,9 \times 10^2$ CFU/cm 2) majhna. Kvasovki *D. anomala* in *P. membranifaciens* sta bili v vzorcu z lokacije Brajel identificirani v nizkih koncentracijah ($1,0 \times 10^1$ CFU/cm 2 in $3,3 \times 10^1$ CFU/cm 2) glede na skupno koncentracijo vseh identificiranih vrst ($3,7 \times 10^2$ CFU/cm 2).

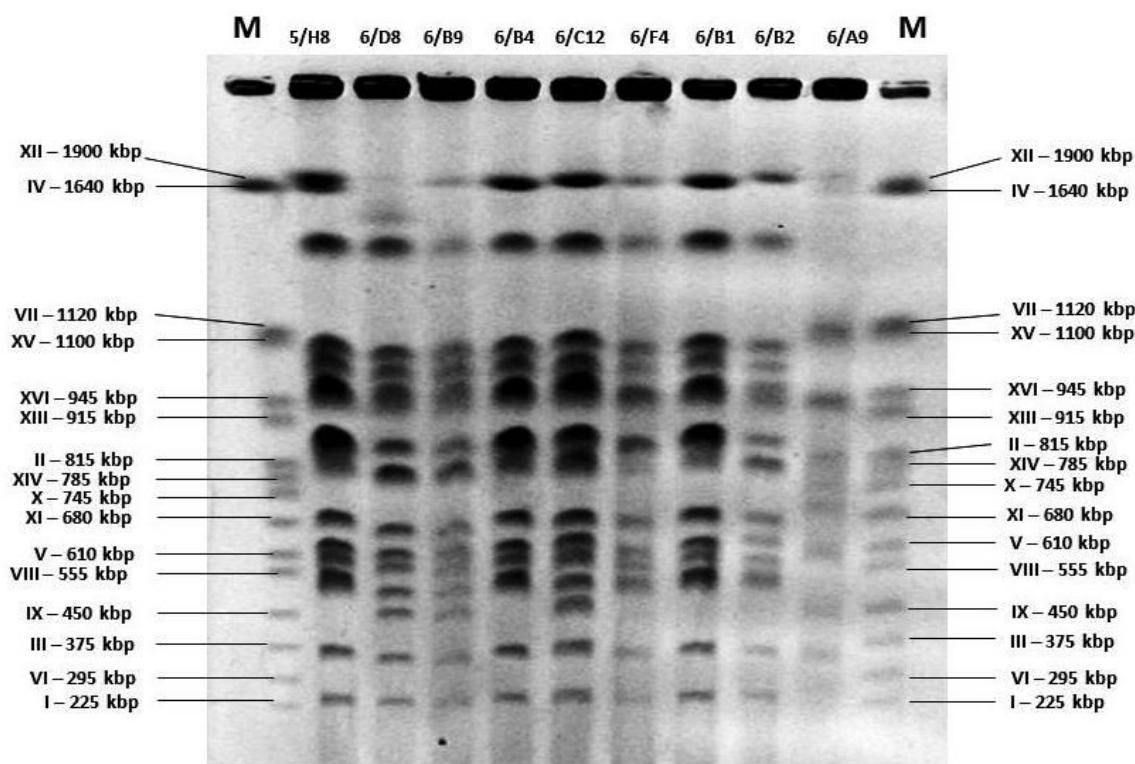
4.2.6 Elektroforetska kariotipizacija sevov *Saccharomyces*

Po identifikaciji smo iz sevov, ki so sodili v rod *Saccharomyces*, izolirali kromosomske DNA v agaroznih blokcih in jih ločili z elektroforezo v pulzirajočem polju, s čimer smo dobili različne kariotype. Značilnost fermentacije jabolčnega vina je, da za razliko od večine vinskih fermentacij poteka pri nizkih temperaturah, zato je vodilna kvasovka fermentacije jabolčnega vina kriotolerantna vrsta *Saccharomyces uvarum*, ki je prevladovala tudi v fermentacijah jabolčnega vina koroške regije. Od *Saccharomyces cerevisiae* se razlikuje po tem, da producira manj acetne kisline in etanola, na račun glicerola in jantarne kisline, ter da proizvaja večje količine jabolčne kisline, ki je kasneje ni sposobna razgraditi (Almeida in sod., 2014). Predvidevali smo, da ima jabolčno vino značilen okus tudi zaradi metabolnega delovanja te vrste.

Izmed 19 sevov, pri katerih smo izvedli kariotipizacijo, smo na podlagi kariotypov določili tri različne vrste *Saccharomyces*, in sicer *S. cerevisiae* (stolpec 10 na sl. 20), *S. uvarum* (stolpci 3, 4 in 6 na sl. 20) in *S. kudriavzevii* (stolpci 2, 5, 7, 8 in 9 na sl. 20) (González in sod., 2006; Fischer in sod., 2000; Naumov in sod., 2001). V pregledniku 7 so prikazani rezultati kariotipizacije vseh sevov.

Preglednica 7: Rezultati identifikacije sevov *Saccharomyces* z elektroforetsko kariotipizacijo

Vrsta	Oznaka seva
<i>S. cerevisiae</i>	6/A9
<i>S. kudriavzevii</i>	5/G4, 5/H8, 6/A2, 6/A4, 6/B1, 6/B2, 6/B4, 6/F4
<i>S. uvarum</i>	5/C8, 5/G8, 6/A10, 6/B7, 6/B9, 6/C3, 6/C4, 6/C9, 6/C12, 6/D12



Slika 20: Elektroforetski kariotipi izbranih sevov *Saccharomyces* spp.

Oznake: M, označevalec dolžin fragmentov

4.2.7. Sposobnost rasti vrst *Saccharomyces* pri nizkih temperaturah

Da bi preverili sposobnost rasti vrst *Saccharomyces*, prisotnih v fermentaciji, in s tem njihov biotehnološki potencial za druge aplikacije, smo preverili sposobnost teh sevov, da rastejo pri nizkih temperaturah, kot sta 4 °C in 15 °C, v primerjavi s kontrolno temperaturo 26 °C. Kriotolerantne vrste imajo biotehnološki potencial predvsem s stališča konstruiranja medvrstnih hibridov, ki bi fermentiranim pijačam lahko doprinesli določeno pestrost okusov. Rezultati inkubacije pri različnih temperaturah so prikazani v pregл. 8.

Preglednica 8: Rezultati rasti sevov *Saccharomyces* pri različnih temperaturah

Sev	1/F3	5/C8	5/G4	5/G8	5/H8	6/A4	6/A9	6/A10	6/A12	6/B1
4 °C	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
15 °C	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
26 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Sev	6/B2	6/B4	6/B6	6/B7	6/B8	6/B9	6/B11	6/B12	6/C3	6/C4
4 °C	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
15 °C	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
26 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje preglednice 8: Rezultati rasti sevov *Saccharomyces* pri različnih temperaturah

Sev	6/C9	6/C12	6/D8	6/D10	6/D12	6/E5	6/E12	6/F4	6/H1
4 °C	-	+	-	+	-	-	-	+	-
15 °C	-	-	-	+	+	+	-	-	+
26 °C	-	+	+	+	+	+	-	+	+

Nekateri sevi, kot so 5/G4, 5/G8, 6/A10, 6/B1, 6/B12, 6/C3 in 6/D10, so bili sposobni rasti pri vseh treh temperaturah inkubacije, medtem ko nekateri sevi, kot so 5/C8, 6/C4, 6/C9 in 6/E12, niso zrastli pri nobeni temperaturi. Veliko sevov je bilo zmožnih rasti pri 4 °C (5/G4, 5/G8, 6/A10, 6/A12, 6/B1, 6/B7, 6/B12, 6/C3, 6/C12, 6/D10 in 6/F4), nekateri pa so rastli le pri 26 °C (5/H8, 6/B6, 6/B9 in 6/D8). Sposobnost rasti pri različnih temperaturah je vrstno določena, in sicer sta vrsti *S. kudriavzevii* in *S. uvarum* psihrotolerantni, vrsta *S. cerevisiae* pa je termotolerantna (de Garcia in sod., 2013).

4.3 FIZIKALNO - KEMIJSKE ANALIZE

4.3.1 Vsebnost biogenih aminov

Vsebnost histamina, ki spada med biogene amine, so nam na Kmetijsko-gozdarskem zavodu (KGZ) Nova Gorica izmerili z metodo derivatizacije z OPA in detekcije s HPLC. V preg. 9 so prikazani rezultati analize vsebnosti histamina.

Preglednica 9: Rezultati kemijske analize histamina (biogeni amini)

Vzorec	Vsebnost histamina (mg/L)
Brajel	11,8
Grablar	0,8
Jež	0,5
Kos	0,8
Kajžar	0,8
Marin-Miler	0,9
Naddvor	0,6
Osojnik	0,7
Pustnik	0,8
Zgornji Reht	1,2
Šibovnik	0,3

Glede na Pravilnik o pogojih ... (2004), je največja dovoljena koncentracija histamina v vinu 2 mg/L. Vzorec jabolčnega vina z lokacije Brajel je imel močno povečano vsebnost histamina (11,8 mg/L) v primerjavi s preostalimi vzorci in je celo presegal mejo nevarnosti za zaužitje. Največjo vsebnost histamina izmed ostalih vzorcev je sicer vseboval vzorec z lokacije Zg. Reht (1,2 mg/L), najmanjšo pa vzorec z lokacije Šibovnik (0,3 mg/L).

4.3.2 Fizikalno-kemijski parametri z analizo WineScanTM Foss

S to analizo so nam na KGZ Nova Gorica izmerili osnovne fizikalno-kemijske parametre jabolčnega vina, kot so relativna gostota, pH, vsebnosti alkohola, reducirajočih sladkorjev, ekstrakta, glicerola, skupnih in hlapnih kislin, metanola, etil acetata, raztopljenega CO₂, ter nekaterih posameznih organskih kislin. Rezultati analize so prikazani v pregl. 10.

Preglednica 10: Rezultati analize WineScanTM Foss jabolčnega vina

Oznaka vzorca	/	Parameter /Enota						
		RG	ALK	SSE	RS	SPE	GLIC	MeOH*
		vol.%	g/L	g/L	g/L	g/L	mg/L	mg/L
Brajel	0,998	5,95	20,65	1,38	19,27	3,74	0	65,5
Grablar	1,000	4,72	21,50	0,53	20,97	2,94	30	54,8
Jež	1,000	5,92	23,24	0,36	22,88	3,77	70	61,3
Kos	0,998	7,08	23,78	0,57	23,21	4,62	40	44,0
Marin-Miler	0,999	5,76	21,27	0,60	20,67	3,38	10	65,4
Naddvor	0,999	5,74	21,20	0,32	20,88	4,01	30	59,8
Osojnik	1,010	4,79	42,16	16,30	25,86	2,85	10	92,3
Pustnik	0,999	5,31	20,44	0,03	20,41	4,09	10	67,3
Šibovnik	1,010	4,22	41,68	22,92	18,76	2,08	0	110,0
Zg. Reht	1,000	5,54	23,08	0,25	22,83	3,60	50	71,6

Se nadaljuje ...

... nadaljevanje preglednice 10: Rezultati analize WineScanTM Foss jabolčnega vina

Parameter /Enota

Oznaka vzorca	SK	HK	pH	JK	MK	CK	VK	CO₂	FC indeks*
	g/L	g/L	/	g/L	g/L	g/L	g/L	mg/L	/
Brajel	4,59	1,35	3,76	0,27	2,62	0,31	0,36	655	14,5
Grablar	5,62	0,90	3,78	0,28	4,27	0,24	0,38	548	21,9
Jež	8,61	1,81	3,52	4,21	0,30	0,43	0,30	613	11,4
Kos	6,00	1,15	3,76	0,42	3,19	0,34	0,53	440	20,8
Kajžar	5,19	0,67	3,69	0,68	2,65	0,29	0,49	698	12,5
Marin-Miler	6,58	0,61	3,57	3,89	0,79	0,44	0,51	654	12,2
Naddvor	4,51	0,94	3,87	0,18	3,22	0,27	0,40	598	23,7
Osojnik	10,49	1,02	3,43	7,28	0,56	0,72	0,89	923	13,2
Pustnik	4,25	0,79	3,78	0,15	3,60	0,16	0,94	673	53,9
Šibovnik	6,44	0,60	3,49	4,52	0,17	0,58	1,05	1100	5,3
Zg. Reht	5,54	0,54	3,75	1,72	2,23	0,44	0,48	716	19,6

*orientacijske oz. informativne vrednosti

Okrajšave: relativna gostota (RG), alkohol (ALK), skupni suhi ekstrakt (SSE), reducirajoči sladkorji (RS), sladkorja prosti ekstrakt (SPE), skupne kisline (SK), hlapne kisline (HK), jabolčna kislina (JK), mlečna kislina (MK), citronska kislina (CK), vinska kislina (VK), glicerol (GLIC), topni oz. raztopljen (CO₂), metanol (MeOH), etil acetat (EtAC), ocena vsebnosti fenolov (FC indeks)

Vse relativne gostote (RG) naših vzorcev so se gibale okoli vrednosti 1, vrednosti večje od 1 sta imela vzorca z lokacij Osojnik in Šibovnik, ki sta imela glede na ostale vzorce tudi povečane vsebnosti skupnega suhega ekstrakta (42,16 g/L in 41,68 g/L), reducirajočih sladkorjev (16,30 g/L in 22,92 g/L), sladkorja prostega ekstrakta (25,86 g/L in 18,76 g/L) ter CO₂ (923 mg/L in 1100 mg/L) in etil acetata (92,3 mg/L in 110,0 mg/L). Ta v večjih koncentracijah neugodno vpliva na vonj/okus jabolčnega vina. Glede na Pravilnik o pogojih ... (2004) velja za suha mirna vina, da smejo vsebovati največ 9 g/L reducirajočih sladkorjev, ki predstavljajo preostali nepovreti sladkor v vinu, ter najmanj 16 g/L sladkorja prostega ekstrakta. Po tem pravilniku imata vzorca z lokacij Osojnik in Šibovnik presežek reducirajočih sladkorjev za sladkorno kategorijo suho jabolčno vino.

Vzorec z lokacije Kos je imel v primerjavi z ostalimi vzorci povečano vsebnost alkohola (7,08 vol. %), ki je glede na Pravilnik o pogojih ... (2004) v mejah normale, saj je zahteva za minimalni volumski delež naravnega alkohola v vinskem moštu 6,3 – 8,5 %. Glede na ta kriterij so imela vsa jabolčna vina premajhno vsebnost alkohola, vendar pa je običajna vsebnost alkohola v jabolčnem vinu 5-8 % (Pacinelli Lobo in sod., 2016).

Vzorec z lokacije Jež je imel v primerjavi z ostalimi vzorci povečano vsebnost metanola

(70 mg/L), ki je bila kljub temu v mejah normale, ki je 10-100 mg/L (Jarvis, 2003) oz. maksimalno 150 mg/L glede na Pravilnik o pogojih ... (2004). Večjo koncentracijo metanola je vseboval tudi vzorec z lokacije Zg. Reht (50 mg/L). Vzorca z lokacij Brajel in Šibovnik nista imela prisotnega metanola v mejah detekcije.

Razlike v koncentraciji prisotnega glicerola v vzorcih so bile majhne. Najmanjšo vsebnost je imel vzorec z lokacije Šibovnik (2,08 g/L), največjo pa vzorec z lokacije Kos (4,62 g/L). Minimalna koncentracija glicerola v vinu glede na Pravilnik o pogojih ... (2004) je sicer 4 g/L, kar pomeni, da so ta kriterij dosegli vzorci z lokacij Kos, Kajžar, Naddvor in Pustnik.

Indeks FC podaja oceno vsebnosti fenolov. Vzorec jabolčnega vina z lokacije Pustnik je imel glede na ostale vzorce povečano vrednost indeksa FC (53,9), vzorec z lokacije Šibovnik pa zmanjšano (5,3).

Vzorca jabolčnega vina z lokacij Jež in Osojnik sta imela nekoliko večjo vsebnost skupnih kislin (8,61 g/L in 10,49 g/L), posledično tudi nekoliko nižji pH (3,52 in 3,43) v primerjavi z ostalimi vzorci, ki pa je bil vseeno v mejah normale, in sicer 3,0-4,4 (Beech, 1972). Vsi vzorci so imeli koncentracijo skupnih kislin več kot 3,5 g/L, kar je glede na Pravilnik o pogojih ... (2004) minimalna priporočena koncentracija za mirna vina.

Vsebnosti hlapnih kislin so bile med vzorci primerljive, največjo vsebnost je dosegel vzorec z lokacije Jež (1,81 g/L), najmanjšo pa vzorec z lokacije Zg. Reht (0,54 g/L). Maksimalna koncentracija hlapnih kislin glede na Pravilnik o pogojih ... (2004) je 1,0 g/L za suha mirna vina. To vrednost so presegli vzorci z lokacij Brajel, Jež, Kos in Osojnik.

Vzorci jabolčnega vina z lokacij Jež, Marin-Miler, Osojnik in Šibovnik so vsebovali večjo vsebnost jabolčne kisline (4,21 g/L, 3,89 g/L, 7,28 g/L, 4,52 g/L) in hkrati manjšo vsebnost mlečne kisline (0,30 g/L, 0,79 g/L, 0,56 g/L, 0,17 g/L). Največjo koncentracijo mlečne kisline je vseboval vzorec z lokacije Grablar (4,27 g/L).

4.3.3 Vsebnost hlapnih fenolov

Z analizo HPLC smo določili vsebnost štirih hlapnih fenolov v jabolčnem vinu in to so: 4-vinilfenol (4-VF), 4-vinilgvajakol (4-VG), 4-etilfenol (4-EF) in 4-etylgvajakol (4-EG), ki v povečanih koncentracijah neugodno vplivajo na vonj in okus jabolčnega vina. Rezultati meritev vsebnosti hlapnih fenolov so prikazani v pregl. 11.

Preglednica 11: Koncentracije 4-vinilfenola (4-VF), 4-vinilgvajakola (4-VG), 4-etilfenola (4-EF) in 4-etylgvajakola (4-EG) v jabolčnih vinih z enajstih lokacij v µg/L

Vzorec	Brajel	Grablar	Jež	Kos	Kajžar	Marin-Miler
4-VF	91	/	/	/	/	/
4-VG	/	/	/	/	/	/
4-EF	2125	1542	/	3737	2197	2814
4-EG	970	352	/	2521	660	1130
Vzorec	Naddvor	Osojnik	Pustnik	Zg. Reht	Šibovnik	
4-VF	/	536	/	/	265	
4-VG	/	/	/	/	146	
4-EF	1158	6537	4493	5863	294	
4-EG	276	1114	2124	2512	168	

López in sod. (2002) so s prilagojeno metodo plinske kromatografije določili koncentracije pomembnih senzoričnih molekul staranega rdečega vina, med njimi tudi za štiri hlapne fenole, ki smo jih določali v naši analizi. Mejne koncentracije zanje so sledeče: 440 µg/L za 4-etilfenol, 180 µg/L za 4-vinilfenol, 33 µg/L za 4-etilgvajakol in 40 µg/L za 4-vinilgvajakol. V ekstraktno revnejšem vinu je lahko prag zaznave hlapnih fenolov tudi do trikrat nižji kot v ekstraktno zelo bogatem rdečem vinu z izrazito sortnostjo, sadnostjo in lesnim karakterjem.

Molekula 4-vinilfenol (4-VF) je bila v mejah detekcije prisotna v vzorcih z lokacij Brajel, Osojnik in Šibovnik. Največjo koncentracijo je dosegla v vzorcu z lokacije Osojnik (536 µg/L). V vseh vzorcih je bila koncentracije te molekule večja od praga zaznave, ki je 180 µg/L. Molekula 4-vinilgvajakol (4-VG) je bila v mejah detekcije prisotna le v vzorcu z lokacije Šibovnik, in sicer v koncentraciji 146 µg/L. Molekuli 4-etilfenol (4-EF) in 4-etylgvajakol (4-EG) sta bili prisotni v vseh vzorcih jabolčnega vina. Prva je bila prisotna v večjih koncentracijah v vzorcih z lokacij Osojnik (6537 µg/L), Pustnik (4493 µg/L) in Zg. Reht (5863 µg/L), druga pa v vzorcih z lokacij Kos (2521 µg/L), Pustnik (2124 µg/L) in Zg. Reht (2512 µg/L). Pri vzorcu z lokacije Jež je prišlo do napake pri analizi, zato za ta vzorec ni podanih rezultatov.

4.4 SENZORIČNA ANALIZA

Senzorična analiza je bila opravljena na Oddelku za živilstvo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani, v sodelovanju z dvema zunanjima izvajalcema. Ocenjevanje jabolčnih vin je potekalo po 20-točkovni Buxbaumovi metodi, ki je uradna metoda za določitev senzorične kakovosti vin v Sloveniji, in nam poda oceno splošnega skupnega vtisa. Vzorci jabolčnih vin za senzorično analizo so bili odvzeti naknadno, v kasnejšem časovnem obdobju kot vzorci za ostale analize. Rezultati senzorične analize so prikazani v pregl. 12.

Preglednica 12: Rezultati senzorične analize jabolčnega vina

Povprečje ocen

Vzorec	Bistrost (0-2 točki)	Barva (0-2 točki)	Vonj (0-4 točke)	Okus (0-6 točk)	Harmonija (0-6 točk)	Skupaj (0-20 točk)	Opombe
Grablar	1,7	1,8	1,7	3,0	3,2	11,3	vonj in okus po etil acetatu, tuj vonj starikav vonj in okus, neharmoničen, rahlo moten
Jež	1,5	1,5	2,7	4,2	3,7	13,5	starikav vonj in okus, brez kislin, rahlo moten.
Kos	1,5	1,5	2,3	3,1	3,0	11,4	starikav vonj in okus, brez kislin, rahlo moten.
Marin-Miler	2,0	1,8	3,2	5,0	4,9	16,9	
Naddvor	1,5	1,5	2,7	3,7	3,3	12,7	mešanica, starikav vonj in okus
Osojnik	1,7	2,0	1,7	3,0	2,8	11,1	hlapni fenoli, vonj po hlevu, tuj vonj in okus po konjih
Pustnik	1,5	1,2	3,0	3,2	3,4	12,3	trpek, neharmoničen, premalo saden
Šibovnik	1,9	2,0	3,0	3,7	4,2	14,8	neharmoničen, čuti se kislina, starikav vonj in okus

Po slovenski zakonodaji morajo namizna vina doseči 12,1-14,0 točk. Z največ točkami je bil ocenjen vzorec z lokacije Marin-Miler (16,9 točk), z najmanj pa vzorec z lokacije Osojnik (11,1 točk).

5 RAZPRAVA

5.1 SESTAVA MIKROBIOTE TRADICIONALNIH JABOLČNIH VIN

V enajstih vzorcih fermentiranih jabolčnih vin, pripravljenih za uživanje, ki so bili pridelani po tradicionalni metodi brez uporabe starter kultur, in večinoma z uporabo tradicionalne lesene opreme na srednje- in višjeležečih kmetijah na Koroškem, smo identificirali predstavnike vrst kvasovk vseh fermentacijskih stopenj. To so vrste, ki so prisotne na začetku fermentacijske faze (*Hanseniaspora uvarum*, *Candida* spp., *Starmerella* spp., *Pichia* spp.), vrste rodu *Saccharomyces*, ki so prisotne v drugi fermentacijski fazni ter vrste rodu *Dekkera*, ki so prisotne v zaključni fermentacijski fazi (Morrissey in sod., 2004). V vzorcih brisov površine sodov smo identificirali vrste iz rodov *Candida*, ter vrste *Debaryomyces hansenii*, *Dekkera bruxellensis*, *Kregervanrija fluxuum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Millerozyma farinosa*, *Pichia membranifaciens*, *Priceomyces carsonii* in *Saccharomyces bayanus*. Kvasovke v jabolčnih vinih smo identificirali v koncentracijah od $4,3 \times 10^3$ CFU/mL (vzorec z lokacije Kajžar) do $8,6 \times 10^4$ CFU/mL (vzorec z lokacije Pustnik), pri čemer smo v posameznih vzorcih identificirali najmanj dve (vzorec z lokacije Naddvor) in največ deset vrst (vzorec z lokacije Šibovnik). Skupno smo v vzorcih jabolčnih vin identificirali 15 vrst, v vzorcih brisov površine sodov pa 11 vrst kvasovk.

Najpogostejsa vrsta kvasovk v vzorcih jabolčnih vin in brisov površine sodov je bila *K. fluxuum*, ki je bila pri večini vzorcev prisotna tudi v največji koncentraciji. Gre za tipsko vrsto rodu, ki zajema tri vrste (*K. fluxuum*, *K. delftensis* in *K. pseudodelftensis*), in je bila po stari nomenklaturi imenovana *Pichia fluxuum* (anamorf *Candida vini*). Vrste rodu *Kregervanrija* so nefermentativne (le za en sev so dokazali šibko fermentacijo glukoze), asimilirajo glukozo, manitol, etanol, ribitol in jantarno kislino, ter tvorijo mreno na površini tekočih gojišč. Vrsto *K. fluxuum* so izolirali iz vina, grozdnega soka ter smole hrastov v Kaliforniji (Kurtzman, 2006; Wu in sod., 2006), nikoli pa še ni bila izolirana iz jabolčnega vina, zato tudi ni pojasnjena njihova vloga v fermentaciji jabolčnega vina. V proizvodnji piva jo povezujejo s kvarom, in sicer naj bi bila odgovorna za nastanek vonja po estrih (Kurtzman, 2006). Sklepamo lahko, da gre za vrsto, ki preživi na površini predelovalne opreme, ki najverjetneje prestavlja tudi njen vir prisotnosti v jabolčnem vinu.

Kvasovke *K. fluxuum* nismo identificirali le v vzorcih z lokacij Osojnik in Šibovnik. V prvem smo v največji koncentraciji identificirali vrsto *Dekkera anomala*, v drugem pa *Priceomyces carsonii*, ki spada v nedavno poimenovan rod *Priceomyces*. Ta zajema šest vrst, predhodno uvrščene v robove *Candida* in *Pichia*. Za predstavnike rodu je znano, da ne fermentirajo sladkorjev, asimilirajo pa organske kisline, poliole in sladkorje (Kurtzman in Suzuki, 2010). V vzorcih jabolčnih vin z lokacij Jež in Marin-Miler je bila v največji koncentraciji prisotna kvasovka *Saccharomyces bayanus*, v vzorcu z lokacije Kajžar pa *Pichia membranifaciens*.

Vrsta *Zygosaccharomyces microellipsoides*, ki je bila v zelo nizki koncentracija identificirana v vzorcu jabolčnega vina z lokacije Osojnik, je bila do sedaj identificirana v jabolčnem soku, kjer večinoma predstavlja kvarljivca, saj je kot ostale predstavnice rodu *Zygosaccharomyces* zmožna rasti v okolju z nizko vsebnostjo vode (nizka a_w vrednost) in v prisotnosti nekaterih konzervansov, kot je npr. SO₂ (Esteve-Zarzoso in sod., 2003). *Wickerhamomyces anomalus* je novo ime za vrsto *Pichia anomala* (Kurtzman, 2011) in je bila prav tako v zelo nizki koncentraciji identificirana v vzorcu z lokacije Šibovnik. V vzorcu brisa površine soda z lokacije Brajel je bila v zelo nizki koncentracija prisotna vrsta *Millerozyma farinosa*, ki spada v nedavno imenovan rod kvasovk (Kurtzman in Suzuki, 2010), za katerega je značilna fermentacija glukoze, v nekaterih primerih tudi galaktoze in trehaloze, ter asimilacija sladkorjev, poliolov in organskih kislin. Rod vključuje dve vrsti, ki sta predhodno spadali v rod *Pichia*, in to sta *M. farinosa*, ki je tipska vrsta rodu ter *M. acaciae*. *Starmerella bacillaris* je sinonim za kvasovko *Candida zemplinina* (Duarte in sod., 2012), ki je pogosto prisotna v grozdnem moštu v velikih koncentracijah, in sicer 10⁴ do 10⁶ celic/mL. Njen potencialni rezervoar predstavlja tudi površine v prostorih za pridelavo vina. Gre za prevladujočo vrsto na začetku fermentacije vina, ki je sicer fruktofilna in preferira fruktozo pred glukozo, ter je zaradi visoke tolerance zmožna producirati relativno velike koncentracije etanola (Masneuf-Pomareda in sod., 2015).

Bakterije so bile v vseh vzorcih jabolčnega vina, razen v vzorcih z lokacij Šibovnik, identificirane v večji koncentraciji kot kvasovke, in sicer od 2,5 x 10⁴ CFU/mL (vzorec z lokacije Zg. Reht) do 2,0 x 10⁶ CFU/mL (vzorec z lokacije Grablar). V posameznih vzorcih smo identificirali najmanj dve vrsti (vzorci z lokacij Grablar, Kos in Kajžar) in največ osem vrst (vzorec z lokacije Pustnik). Skupno smo v vzorcih jabolčnih vin identificirali 12 vrst, v vzorcih brisov površine sodov pa 16 vrst bakterij.

V vseh vzorcih jabolčnega vina je bila v največji koncentraciji prisotna bakterija *Oenococcus oeni*, prav tako v primeru vzorcev brisov površin sodov, z izjemo vzorcev z lokacij Grablar in Šibovnik. V slednjih sta bili v največjih koncentracijah prisotni vrsti *Bacillus nealsonii* in *Paenibacillus odonifer*. V sedmih vzorcih jabolčnih vin in v treh vzorcih brisov površine sodov smo identificirali vrsto *Acetobacter cerevisiae*, ter v 6 vzorcih jabolčnih vin in dveh vzorcih brisov površine sodov vrsto *Gluconobacter oxydans*, ki spadata v skupino ocetnokislinskih bakterij in sta nezaželeni v končnem produktu. Ker za rast potrebujeta zadostno količino kisika je vzrok, da sta zrastli na gojišču MRS pod anaerobnimi pogoji najverjetneje slabo tesnenje anaerbnih loncev med inkubacijo. Vrsto *A. cerevisiae* so Cleenwerck in sod. (2002) poimenovali kot novo vrsto znotraj rodu *Acetobacter*, na podlagi analize sevov izoliranih iz pivovarskih okolij. Koncentracija vrste *G. oxydans* je bila glede na skupno koncentracijo vseh identificiranih vrst velika v vzorcu jabolčnega vina z lokacije Naddvor, koncentracija vrste *A. cerevisiae* pa v vzorcu jabolčnega vina z lokacije Kajžar. V vzorcu brisa površine sodov s te lokacije smo v visoki koncentraciji identificirali tudi vrsto *Acetobacter persici*. Vrsto so leta 2012 opisali Iino in

sod., izolirali pa so jo iz površine breskve.

V vzorcih jabolčnih vin z lokacij Naddvor in Osojnik in v štirih vzorcih brisov površine sodov smo identificirali tudi vrsto *Bacillus cereus*, ki je lahko potencialno patogena. Kljub visoki identificirani koncentraciji glede na skupno koncentracijo vseh identificiranih vrst v vzorcu z lokacije Naddvor, ni bilo v nobenem izmed vzorcev jabolčnega vina prisotne rasti bakterije *B. cereus* na selektivnem gojišču BCA za potrditev prisotnosti te vrste. Najverjetnejši vzrok za ta pojav je, da je bila bakterija sicer prisotna, vendar pogoji gojenja niso bili ustrezni. V vsakem primeru so najverjetnejši izvor te bakterije tla oz. prst, ki je prišla v stik s sodi, v katerih je bilo shranjeno jabolčno vino.

Na gojišču z etanolom, kot edinim virom ogljika, smo identificirali tako kvasovke kot bakterije, vendar so bile koncentracije kvasovk v primerjavi s koncentracijo bakterij zelo nizke. V vzorcih smo v največji koncentraciji identificirali vrste *Bacillus agri* (vzorca jabolčnih vin z lokacij Brajel in Osojnik), *Bacillus nealsonii* (vzorca jabolčnih vin z lokacije Šibovnik in Zg. Reht), *Oenococcus oeni* (vzorec jabolčnega vina z lokacije Pustnik).

5.2 VPLIV MIKROBIOTE NA KEMIJSKE IN SENZORIČNE LASTNOSTI VZORCEV

V vseh vzorcih jabolčnega vina je bil v nizkih koncentracijah prisoten histamin, ki sodi med biogene amine. V vzorcu z lokacije Brajel je bila koncentracija histamina glede na ostale vzorce močno povečana in tudi nad dovoljeno mejo (2 mg/L) glede na Pravilnik o pogojih ... (2004). Ta vzorec je imel izmed vseh vzorcev jabolčnih vin v največji koncentraciji prisotno vrsto *Lactobacillus collinoides*, ki spada v skupino mlečnokislinskih bakterij, odgovornih za sintezo biogenih aminov v fermentiranih pihačah (Coton in sod., 2010).

Vzorca jabolčnih vin z lokacij Osojnik in Šibovnik sta imela glede na ostale vzorce povečano vsebnost skupnega suhega ekstrakta, ki ga po definiciji predstavljajo komponente vina (sladkorji, fiksne kisline, organske soli, idr.), ki so nehlapne pri 100 °C. Na osnovi tega parametra lahko sklepamo na začetno koncentracijo sladkorja v moštu, iz katerega je nastalo jabolčno vino (Košmerl in Kač, 2009b). Imela sta tudi povečano vsebnost reducirajočih sladkorjev, sladkorja prostega ekstrakta ter CO₂ in etil acetata, kar nakazuje na pojav upočasnjene oz. zaustavljene fermentacije. V vzorcu z lokacije Šibovnik je bila koncentracija identificiranih kvasovk večja kot koncentracija bakterij, v vzorcu z lokacije Osojnik je pa manjša. Ena izmed posebnosti teh dveh vzorcev je ta, da pri nobenem izmed njiju nismo identificirali prisotnosti sicer najpogosteje kvasovke *K. fluxuum*. Iz tega podatka bi lahko sklepali, da ima ta vrsta pomembno vlogo pri poteku alkoholne fermentacije, kljub temu da sama ni fermentativna. Možno je, da izloča sekundarne produkte, ki jih uporabijo vrste *Saccharomyces* oz. da izloča snovi, ki ugodno

vplivajo na rast drugih fermentativnih vrst.

Vzorec jabolčnega vina z lokacije Kos je imel največjo vsebnost alkohola. Ta rezultat se ujema tudi z rezultatom vsebnosti glicerola, ki je pri tem vzorcu največja, saj predstavlja glicerol molekulo, s katero kvasovke prilagajajo osmotski tlak in vzdržujejo NAD+/NADH redoks ravnotežje (Mager in Siderius, 2002). V tem vzorcu je bila v največji koncentraciji identificirana kvasovka *K. fluxuum*, v veliki koncentraciji pa sta bili identificirani tudi vrsti *D. anomala* in *D. bruxellensis*, ki sta značilno prisotni v zadnji fermentacijski fazi. Glede na podatek, da je bila povprečna koncentracija bakterij večja kot povprečna koncentracija kvasovk, ki pretvarjajo sladkor v alkohol ter glede na normalno vsebnost sladkorjev v primerjavi z ostalimi vzorci, tega pojava nismo uspeli pojasniti. Nasprotno je imel vzorec z lokacije Šibovnik najnižjo vsebnost alkohola in najnižjo vsebnost glicerola. V tem vzorcu sta bili v najvišji koncentraciji prisotni kvasovki *P. carsonii* in *P. membranifaciens*. Slednja je značilno prisotna v prvi fermentacijski fazi rasti. Kot že omenjeno, smo za ta vzorec predvidevali, da je prišlo do pojava zaustavljene fermentacije, kar ti podatki še dodatno potrjujejo.

Vzorec jabolčnega vina z lokacije Jež je imel največjo vsebnost metanola, ki je bila sicer še v mejah normalne vrednosti. Ker metanol nastaja z demetilacijo pektina, lahko sklepamo, da je bil v tem vzorcu večji delež le-tega. Torej, da je bilo v jabolčnem soku ob stiskanju prisotne veliko usedline. Pektinolitične encime producirajo le nekatere vrste kvasovk v odvisnosti od okolja in genetskega ozadja. Pektinesteraze, ki katalizirajo deesterifikacijo metil esterskih vezi galakturonskega ogrodja pektina, in s tem sprostitev kislih pektinov ter metanola, producirajo poleg rastlinskih patogenih bakterij in rastlin samih, tudi nekatere kvasovke, plesni in mlečnokislinske bakterije. Med njimi vrste rodu *Rhodotorula*, *S. cerevisiae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus japonicus*, *Penicillium frequentans*, *Penicillium occitanis*, *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris*, idr. (Jayani in sod., 2005). V vzorcu z lokacije Jež je imela najvišjo relativno abundanco vrsta *Saccharomyces bayanus*, pri kateri smo glede na kariotipizacijo sklepali, da gre najverjetneje za vrsto *S. uvarum*, za katero je značilna pektinolitična aktivnost (Naumov in sod., 2001).

Vzorca jabolčnega vina z lokacij Jež in Osojnik sta imela nekoliko večjo vsebnost skupnih kislin. Posledično sta imela tudi nekoliko nižji pH v primerjavi z ostalimi vzorci. Vzorci jabolčnih vin z lokacij Jež, Marin-Miler, Osojnik in Šibovnik so vsebovali večje vsebnosti jabolčne kisline in hkrati nižje vsebnosti mlečne kisline. Koncentracija jabolčne kisline se tekom alkoholne fermentacije spreminja v odvisnosti od biokemijskih poti, ki potekajo, saj jo lahko kvasovke razgrajujejo ali sintetizirajo. V splošnem se njena koncentracija zniža iz začetne koncentracije okoli 7 g/L v jabolčnem soku na okoli 200 mg/L in manj v zrelem jabolčnem vinu. Mlečna kislina se tvori iz jabolčne kisline med jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo, do koncentracije okoli 4 g/L. (Zhang in sod., 2008; Picinelli in sod., 2000). Pri vseh teh vzorcih, razen pri vzorcu z lokacije Šibovnik, je bila povprečna koncentracija

bakterij nižja v primerjavi s povprečno koncentracijo kvasovk. To lahko pomeni, da pri teh vzorcih jabolčno-mlečnokislinska fermentacija še ni bila dokončana.

Vzorec z lokacije Pustnik je imel glede na ostale vzorce povečano, vzorec z lokacije Šibovnik pa zmanjšano vrednost FC indeksa, ki podaja oceno vsebnosti fenolov. Vzorec z lokacije Pustnik je imel povečano vsebnost 4-etilfenola ($4493 \mu\text{g/L}$) in 4-etilgvajakola ($2124 \mu\text{g/L}$), vendar sta bili koncentraciji nižji, kot pri nekaterih drugih vzorcih. Vzorec z lokacije Šibovnik je imel najnižje vsebnosti obeh dveh molekul, edini pa je imel prisotno molekulo 4-vinilgvajakol. Poskuševalci so vonj po hlapnih fenolih zaznali le v primeru vzorca z lokacije Osojnik, zato lahko glede na podatke o pragu zaznave hlapnih fenolov iz študije, ki so jo opravili López in sod. (2002) in rezultati HPLC analize za vse vzorce jabolčnih vin rečemo, da gre za ekstraktno bogata jabolčna vina, saj so vsebnosti hlapnih fenolov zelo velike glede na določene meje zaznave. V vseh vzorcih z večjimi koncentracijami 4-EF (Osojnik, Pustnik in Zg. Reht), so bile v večjih koncentracijah prisotne vrste rodu *Dekkera*, ki sodelujejo v sintezi hlapnih fenolov.

5.3 BIOTEHNOLOŠKI POTENCIAL SEVOV RODU *SACCHAROMYCES*

Biotehnološki potencial predstavljajo mikroorganizmi, ki so sposobni rasti pri nizkih temperaturah, saj se pri tem sintetizirajo aromatske spojine, ki pozitivno vplivajo na vonj, okus in izgled končnega produkta. V primeru proizvodnje jabolčnega vina na tradicionalen način, je pomemben biotehnološki potencial sevov *Saccharomyces* predvsem zmožnost rasti pri nizkih temperaturah, pri katerih poteka alkoholna fermentacija v kleteh, in pa zmožnost prilagajanja na spremembo temperature, ki se pojavi ob prehodu iz jesenskega na zimski letni čas.

Nekateri izmed sevov so bili sposobni rasti le pri temperaturi 4°C , vendar bi bilo potrebno ta rezultat ponoviti in preveriti, saj je malo verjetno, da bi sevi kvasovk, izolirani iz okolja z višjo povprečno temperaturo, rastli le pri tako nizkih temperaturah inkubacije. Največji potencial so predstavljali sevi, ki so bili zmožni rasti pri vseh treh temperaturah inkubacije in to so sevi 5/G4, 5/G8, 6/A10, 6/B1, 6/B12, 6/C3 in 6/D10. Vsi ti sevi, razen sevov 6/B12 in 6/D10, so glede na kariotipizacijo pripadali vrstama *Saccharomyces kudriavzevii* in *S. uvarum*, za katere je značilna psihrotolerantna rast (de Garcia in sod., 2013).

6 SKLEPI

- Pri večini vzorcev analiziranega jabolčnega vina smo glede na sestavo mikrobne populacije, povprečno število kvasovk in bakterij ter kemijske parametre potrdili hipotezo o končanem procesu prve fermentacijske stopnje. Pri vzorcih z lokacij Osojnik in Šibovnik smo na podlagi rezultatov sklepali o pojavu upočasnjene oz. zaustavljene fermentacije.
- Pri vzorcih jabolčnega vina, kjer smo potrdili končano prvo fermentacijsko stopnjo, so prevladovale kvasovke vrste *Kregervanrija fluxuum*, medtem ko te vrste v vzorcih z zaustavljenou fermentacijo nismo zasledili.
- Glede na rezultate o številnosti CFU rodu *Saccharomyces* v jabolčnem vinu, ki vršijo alkoholno fermentacijo in CFU ne-*Saccharomyces* kvasovk rodu *Dekkera*, ki so značilne za končno fermentacijsko stopnjo, lahko pri večini vzorcev potrdimo, da se prisotnost vrst omenjenih dveh rodov izključuje.
- Skupno smo v vzorcih jabolčnih vin in brisih površine sodov identificirali tri vrste ocetnokislinskih bakterij: *Acetobacter cerevisiae*, *Acetobacter persici* in *Gluconobacter oxydans*. Njihova številčnost je bile glede na skupno koncentracijo vseh identificiranih vrst velika v vzorcih brisov z lokacij Brajel in Kajžar, ter v vzorcih jabolčnih vin z lokacij Kajžar in Naddvor. Ker ti vzorci niso vsebovali povišane vsebnosti ocetne kisline sklepamo, da so bile ocetnokislinske bakterije prisotne v kleteh in da je ponekod prišlo tudi do njihovega prenosa v jabolčna vina. Ob tem pogoj za njihov rast oz. kvar jabolčnega vina (še) niso bili primerni.
- V nekaterih vzorcih smo v nizkih koncentracijah identificirali vsto *Bacillus cereus*, ki je potencialno patogena.
- Nekateri sevi rodu *Saccharomyces* so biotehnološko uporabni, saj so izkazali rast pri nizkih temperaturah inkubacije.

7 POVZETEK

Jabolčno vino je zaradi nizke vsebnosti alkohola ter osvežilnega okusa priljubljena pijača v nekaterih državah Evrope, v nekaterih predelih Afrike, Amerike in Avstralije, medtem ko je v Sloveniji prisotna predvsem na Koroškem. Tam na višje- in srednjeležečih kmetijah večinoma še vedno nastaja v procesu tradicionalnega postopka fermentacije, brez dodanih komercialnih starterskih kultur. Zato jabolčno vino skupaj z okoljem in opremo za predelavo jabolčnega vina predstavlja vir številnih biotehnološko pomembnih vrst kvasovk in bakterij, ki s svojimi metabolnimi procesi vplivajo na kvaliteto in mikrobiološko stabilnost končnega produkta.

V okviru magistrskega dela smo v vzorcih jabolčnih vin skupno identificirali petnajst vrst kvasovk in dvanajst vrst bakterij, določili njihove relativne abundance in povprečne koncentracije, ter povezali njihovo vlogo z nekaterimi kemijskimi lastnostmi končnega proizvoda. V večini vzorcev jabolčnih vin sta prevladovali kvasovka *Kregervanrija fluxuum* in bakterija *Oenococcus oeni*. V splošnem je bila skupna koncentracija identificiranih vrst mlečnokislinskih bakterij večja od koncentracije kvasovk, kar pomeni, da je potekal proces zorenja jabolčnega vina oz. mlečnokislinske fermentacije, proces alkoholne fermentacije pa je bil zaključen. Pri dveh vzorcih smo zaradi povečanih vsebnosti reducirajočih sladkorjev, sladkorja prostega ekstrakta, CO₂ in etil acetata, sklepali na pojav upočasnjene oz. zaustavljene fermentacije, kar bi lahko glede na rezultate povezali z odsotnostjo kvasovke *K. fluxuum*. V jabolčnih vinih smo identificirali tudi nekatere mikroorganizme, ki povzročajo kvar končnega produkta, kot sta ocetnokislinski bakteriji *Acetobacter cerevisiae* in *Gluconobacter oxydans*, ter vrsto *Bacillus cereus*, ki lahko vpliva na varnost živila ob zaužitju. Vir omenjenih kvarljivcev so glede na rezultate identificiranih vrst brisov površine sodov najverjetneje kletni prostori in/ali oprema za predelavo jabolk. V enem izmed vzorcev smo določili prekomerno koncentracijo histamina glede na zakonsko dovoljeno mejo, kar je najverjetneje povezano z dejstvom, da je bila v tem vzorcu v največji koncentraciji prisotna mlečnokislinska bakterija *Lactobacillus collinoides*, ki je odgovorna za sintezo biogenih aminov v fermentiranih pijačah. Izmed 19 sevov, pri katerih smo izvedli kariotipizacijo, smo določili tri različne vrste *Saccharomyces*, in sicer *S. cerevisiae*, *S. uvarum* in *S. kudriavzevii*, pri čemer je bilo sedem izmed teh sevov sposobnih rasti pri nizkih temperaturah, kar nakazuje njihov biotehnološki potencial.

Ob koncu obdelave podatkov so ostala odprta nekatera vprašanja glede postopkov in vzrokov za rezultate, ki odstopajo, pojavili pa so se tudi številni predlogi za bodoče koristne raziskovalne projekte v smislu rešitve problematike kontaminacije jabolčnega vina in preučevanja biotehnološkega potenciala ter ohranitve sevov, shranjenih v mikrobiološki zbirki.

8 VIRI

- Almeida P., Gonçalves C., Teixeira S., Libkind D., Bontrager M., Masneuf-Pomarède I., Albertin W., Durrens P., Sherman D. J., Marullo P., Hittinger C. T., Gonçalve P., Sampaio J. P. 2014. A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum*. *Nature Communications*, 5: e4044, doi:10.1038/ncomms5044: 12 str.
- Bartowsky E. J., Henschke P. A. 2008. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 1: 60-70.
- Bauer R., Dicks L. M. T. 2004. Control of malolactic fermentation in wine: a review. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 25, 2: 74-88.
- Beech F. W. 1972. Cider making and cider research: a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 78, 6: 477-491.
- Bevilacqua A., Ciuffreda E., Sinigaglia M., Corbo M. R. 2015. Spore inactivation and DPA release in *Alicyclobacillus acidoterrestris* under different stress conditions. *Food Microbiology*, 46: 299-306.
- Buron N., Coton M., Desmarais C., Ledauphin J., Guichard H., Barillier D., Coton E. 2011. Screening of representative cider yeasts and bacteria for volatile phenol-production ability. *Food Microbiology*, 28, 7: 1243-1251.
- Buron N., Coton M., Legendre P., Ledauphin J., Kientz-Bouchart V., Guichard H., Barillier D., Coton E. 2012. Implications of *Lactobacillus collinoides* and *Brettanomyces/Dekkera anomala* in phenolic off-flavour defects of ciders. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 1-2: 159-165.
- Cleenwerck I., Vandemeulebroecke K., Janssens D., Swings J. 2002. Re-examination of the genus *Acetobacter*, with descriptions of *Acetobacter cerevisiae* spp. nov. and *Acetobacter malorum* spp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1551-1558.
- Costantini A., Pietroniro R., Doria F., Pessione E., Garcia-Moruno E. 2013. Putrescine production from different amino acid precursors by lactic acid bacteria from wine and cider. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 1: 11-17.
- Coton E., Coton M. 2003. Microbiological origin of "Framboisé" in French ciders. *Journal of the Institute of Brewing*, 109, 4: 299-304.
- Coton M., Laplace J. M., Auffray Y., Coton E. 2006. "Framboisé" spoilage in French ciders: *Zymomonas mobilis* implication and characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 39, 9: 972-979.
- Coton M., Romano A., Spano G., Ziegler K., Vetrana C., Desmarais C., Lonvaud-Funel A., Lucas P., Coton E. 2010. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiology*, 27, 8: 1078-1085.
- de Garcia V., Libkind D., Moliné M., Rosa C. A., Giraudo M. R. 2013. Cold-adapted yeasts in Patagonian habitats. V: Cold-adapted yeasts: biodiversity, adaptation strategies and biotechnological significance. Buzzini P., Margesin R. (eds.). Heidelberg, Springer Science & Business Media: 123-149.

- de la Roza C., Laca A., García L. A., Díaz M. 2003. Ethanol and ethyl acetate production during the cider fermentation from laboratory to industrial scale. *Process Biochemistry*, 38, 10: 1451-1456.
- de Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 23, 1: 130-135.
- Duarte F. L., Pimentel N. H., Teixeira A., Fonseca A. 2012. *Saccharomyces bacillaris* is not a synonym of *Candida stellata*: reinstatement as *Starmerella bacillaris* comb. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102, 4: 653-658.
- Eisele T. A., Semon M. J. 2005. Best estimated aroma and taste detection threshold for guaiacol in water and apple juice. *Journal of Food Science*, 70, 4: 267-269.
- Edwards U., Rogall T., Blöcker H., Böttger E. C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17, 19: 7843-7853.
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1: 329-337.
- Esteve-Zarzoso B., Zorman T., Belloch C., Querol A. 2003. Molecular characterisation of the species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 3: 404-411.
- Fischer G., James S. A., Roberts I. N., Oliver S. G., Louis E. J. 2000. Chromosomal evolution in *Saccharomyces*. *Nature*, 405: 451-454.
- Frauders J. 1986. Family VI acetobacteraceae. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holts J. G. (eds.). Baltimore, Williams and Wilkins: 267-278.
- Garai-Ibabe G., Areizaga J., Aznar R., Elizaquivel P., Prieto A., Irastorza A., Dueñas M. T. 2010. Screening and selection of 2-branched (1,3)-beta-D-glucan producing lactic acid bacteria and exopolysaccharide characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10: 6149-6156.
- Gardini F., Özogul Y., Suzzi G., Tabanelli G., Özogul F. 2016. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Frontiers in Microbiology*, 7: e1218, doi: 10.3389/fmicb.2016.01218: 18 str.
- Godec B. 2006. Jablanove sorte travniških sadovnjakov. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 57 str.
- Golob T., Bertoncelj J., Kropf U., Korošec M. 2006. Senzorična analiza živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81 str.
- González S. S., Barrio E., Gafner J., Querol A. 2006. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 6, 8: 1221-1234.
- Graça A., Santo D., Esteves E., Nunes C., Abadias M., Quintas C. 2015. Evaluation of microbial quality and yeast diversity in fresh-cut apple. *Food Microbiology*, 51: 179-185.

- Guillamón J. M., Sabaté J., Barrio E., Cano J., Querol A. 1998. Rapid identification of wine yeast species based on RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region. *Archives of Microbiology*, 169, 5: 387-392.
- Ibarburu I., Puertas A. I., Berregi I., Rodríguez-Carvajal M. A., Prieto A., Dueñas M. T. 2015. Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider. *International Journal of Food Microbiology*, 214: 54-62.
- Iino T., Suzuki R., Kosako Y., Ohkuma M., Komagata K., Uchimura T. 2012. *Acetobacter okinawensis* sp. nov., *Acetobacter papayae* sp. nov., and *Acetobacter persicus* sp. nov.; novel acetic acid bacteria isolated from stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 58, 3: 235-243.
- Jakubik U. 2011. Jabolčni sok, mošt, jabolčnik. Ljubljana, Kmečki glas: 20-35.
- Jarvis B. 2003. Chemistry and microbiology of cidermaking. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 2. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 1318-1323.
- Jayani R. S., Saxena S., Gupta R. 2005. Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, 40, 9: 2931-2944.
- Kosel J. 2014. Vpliv mešane fermentacije kvasovk *S. cerevisiae* in *D. bruxellensis* na biosintezo aromatskih snovi. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 117 str.
- Košmerl T., Kač M. 2009a. Določanje hlapnih kislin v vinu. V: *Osnove kemijske in senzorične analize mošta in vina: laboratorijske vaje pri predmetu Tehnologije predelave rastlinskih živil – vino*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 49-52.
- Košmerl T., Kač M. 2009b. Določanje relativne gostote, ekstrakta in alkohola v vinu. V: *Osnove kemijske in senzorične analize mošta in vina: laboratorijske vaje pri predmetu Tehnologije predelave rastlinskih živil – vino*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 37-43.
- Košmerl T., Kač M. 2009c. Določanje skupnih (titrabilnih) kislin v vinu. V: *Osnove kemijske in senzorične analize mošta in vina: laboratorijske vaje pri predmetu Tehnologije predelave rastlinskih živil – vino*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 32-36.
- Kurtzman C. P. 2006. New species and new combinations in the yeast genera *Kregervanrija* gen. nov., *Saturnispora* and *Candida*. *FEMS Yeast Research*, 6, 2: 288-297.
- Kurtzman C. P. 2011. Phylogeny of the ascomycetous yeasts and the renaming of *Pichia anomala* to *Wickerhamomyces anomalus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99, 1: 13-23.
- Kurtzman C. P., Suzuki M. 2010. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. *Mycoscience*, 51, 1: 2-14.

- Kurtzman C. P., Robnett C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 4: 331-371.
- Larpin S., Sauvageot N., Pichereau V., Laplace J. M., Auffray Y. 2002. Biosynthesis of exopolysaccharide by a *Bacillus licheniformis* strain isolated from ropy cider. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 1-2: 1-9.
- Lea A. G. H., Drilleau J. F. 2003. Cidermaking. V: Fermented beverage production. 2nd ed. Lea A. G. H., Piggott J. (eds.). New York, Springer Science & Business Media: 59-87.
- López R., Aznar M., Cacho J., Ferreira V. 2002. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 966, 1-2: 167-177.
- Mager W. H., Siderius M. 2002. Novel insights into the osmotic stress response of yeast: mini review. *FEMS Yeast Research*, 2: 251-257
- Maisonnave P., Sanchez I., Moine V., Dequin S., Galeote V. 2013. Stuck fermentation: development of a synthetic stuck wine and study of a restart procedure. *International Journal of Food Microbiology*, 163, 2-3: 239-247.
- Masneuf-Pomarede I., Juquin E., Miot-Sertier C., Renault P., Laizet Y., Salin F., Alexandre H., Capozzi V., Cocolin L., Colonna-Ceccaldi B., Englezos V., Girard P., Gonzalez B., Lucas P., Mas A., Nisiotou A., Sipiczki M., Spano G., Tassou C., Bely M., Albertin W. 2015. The yeast *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) shows high genetic diversity in winemaking environments. *FEMS Yeast Research*, 15: fov045, doi: 10.1093/femsyr/fov045: 11 str.
- Morrissey W. F., Davenport B., Querol A., Dobson A. D. 2004. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 3: 647-655.
- Naumov G. I., Nguyen H. V., Naumova E. S., Michel A., Aigle M., Gaillardin C. 2001. Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 3: 163-171.
- Pando Bedriñana R., Querol Simón A., Suárez Valles B. 2010. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous cider yeasts in a cellar from Asturias. *Food Microbiology*, 27, 4: 503-508.
- Picinelli A., Suárez B., Moreno J., Rodríguez R., Caso-García L. M., Mangas J. J. 2000. Chemical characterization of Asturian cider. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 9: 3997-4002.
- Picinelli Lobo A., Antón-Díaz M. J., Mangas Alonso J. J., Suárez Valles B. 2016. Characterization of Spanish ciders by means of chemical and olfactometric profiles and chemometrics. *Food Chemistry*, 213: 505-513.
- Picinelli Lobo A., García Y. D., Sánchez J. M., Madrera R. R., Valles B. S. 2009. Phenolic and antioxidant composition of cider. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 7-8: 644-648.

- Pérez-Martín F., Seseña S., Fernández-González M., Arévalo M., Palop M. L. 2014. Microbial communities in air and wine of a winery at two consecutive vintages. International Journal of Food Microbiology, 190: 44-53.
- Poolman B., Molenaar D., Smid E. J., Ubbink T., Abee T., Renault P. P., Konings W. N. 1991. Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. Journal of Bacteriology, 173, 19: 6030-6037.
- Pravilnik o načinu jemanja vzorcev vina in drugih proizvodov iz grozdja in vina ter vzorcev enoloških sredstev za analize in o postopku z odvetimi predmeti. 2005. Uradni list Republike Slovenije, 15, 94: 9822-9827.
- Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 43: 5336-5358.
- Pravilnik o postopku in načinu ocenjevanja mošta, vina in drugih proizvodov iz grozdja in vina. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 32: 3857-3863.
- Puertas A. I., Arahal D. R., Ibarburu I., Elizaquível P., Aznar R., Dueñas M. T. 2014. *Lactobacillus sicerae* spp. nov., a lactic acid bacterium isolated from Spanish natural cider. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64, 9: 2949-2955.
- Rakar A. 2013. Uvajanje metode HPLC za določanje biogenih aminov. Diplomsko delo. Nova Gorica, Fakulteta za znanosti v okolju: 46 str.
- Rodicio R., Heinisch J. J. 2009. Sugar metabolism by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* bacteria from wine and must. V: Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. König H., Unden G., Fröhlich J. (eds.). Heidelberg, Springer: 113-135.
- Rodríguez H., Curiel J. A., Landete J. M., de las Rivas B., de Felipe F. L., Gómez-Cordovés C., Mancheño J. M., Muñoz R. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 132, 2-3: 79-90.
- Sánchez A., Rodríguez R., Coton M., Coton E., Herrero M., García L. A., Díaz M. 2010. Population dynamics of lactic acid bacteria during spontaneous malolactic fermentation in industrial cider. Food Research International, 43, 8: 2101-2107.
- Sauvageot N., Gouffi K., Laplace J. M., Auffray Y. 2000. Glycerol metabolism in *Lactobacillus collinoides*: production of 3-hydroxypropionaldehyde, a precursor of acrolein. International Journal of Food Microbiology, 55, 1-3: 167-170.
- Savino M. J., Sánchez L. A., Saguir F. M., Manca de Nadra M. C. 2012. Lactic acid bacteria isolated from apples are able to catabolise arginine. World Journal Of Microbiology & Biotechnology, 28, 3: 1003-1012.
- Somrak E. 2014. Optimizacija proizvodnje jabolčnega vina. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 65 str.

- Suárez Valles B., Pando Bedriñana R., González García A., Querol Simón A. 2007. A molecular genetic study of natural strains of *Saccharomyces* isolated from Asturian cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 4: 778-786.
- Sumby K. M., Grbin P. R., Jiranek V. 2010. Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121, 1: 1-16.
- SURS. 2015. Kmetijska zemljišča v uporabi. Ljubljana, Statistični urad RS: baza podatkov.
- Ultee A., Wacker A., Kunz D., Löwenstein R., König H. 2013. Microbial succession in spontaneously fermented grape must before, during and after stuck fermentation. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 34, 1: 68-78.
- Unden G., Zaunmüller T. 2009. Metabolism of sugars and organic acids by lactic acid bacteria from wine and must. V: *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. König H., Unden G., Fröhlich J. (eds.). Heidelberg, Springer: 135-147.
- Valles B. S., Bedriñana R. P., Tascón N. F., Simón A. Q., Madrera R. R. 2007. Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology*, 24, 1: 25-31.
- Versalovic J., Schneider M., de Bruijn F. J., Lupski J. R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5, 1: 25-40.
- Villiére A., Arvisenet G., Lethuaut L., Prost C., Sérot T. 2012. Selection of a representative extraction method for the analysis of odourant volatile composition of French cider by GC-MS-O and GC \times GC-TOF-MS. *Food Chemistry*, 131, 4: 1561-1568.
- Vrščaj Vodošek T. 2007. Vpliv sorte, letnika in dodatka starterske kulture v mošt ali vino na potek jabolčno-mlečnokislinske fermentacije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 166 str.
- Wedral D., Shewfelt R., Frank J. 2010. The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 10: 1474-1479.
- Witthuhn R. C., van der Merwe E., Venter P., Cameron M. 2012. Guaiacol production from ferulic acid, vanillin and vanillic acid by *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 1: 113-117.
- White T. J., Bruns T. D., Lee S. B., Taylor J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: *PCR Protocols. A Guide to methods and applications*. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds.). San Diego, Academic Press: 315-322.
- Wu Z.W., Robert V., Bai F.Y. 2006. Genetic diversity of the *Pichia membranifaciens* strains revealed from rRNA gene sequencing and electrophoretic karyotyping, and the proposal of *Candida californica* comb. nov. *FEMS Yeast Research*, 6, 2: 305-311.
- Zhang H., Zhou F., Ji B., Nout R. M. J., Fang Q., Yang Z. 2008. Determination of organic acids evolution during apple cider fermentation using an improved HPLC analysis method. *European Food Research and Technology*, 227, 4: 1183-1190.

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila mentorici, doc. dr. Neži Čadež, za prevzem mentorstva, za vse nasvete, posredovano znanje, pomoč ter podporo pri delu v laboratoriju in pri pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se ji tudi za korekten pregled in popravo pisnega izdelka, ter za vse vzpodbudne besede v zvezi s študijem in zasebnim življenjem.

Somentorici, prof. dr. Tatjani Košmerl, se zahvaljujem za vso strokovno pomoč tekom izvedbe magistrske naloge ter za popravilo pisnega izdelka. Recenzentki, doc. dr. Poloni Zalar, se zahvaljujem za razumevanje in hitro recenzijo pisnega izdelka.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, še posebej Mateju Šerganu za določitev vsebnosti hlapnih fenolov v vzorcih jabolčnih vin, ter Mii Lačen za vso pomoč in nasvete pri delu v laboratoriju. Posebna zahvala gre gospe dr. Tjaši Jug, s Kmetijsko-gozdarskega zavoda Nova Gorica, za opravljene analize vsebnosti biogenih aminov in fizikalno-kemijskih lastnosti jabolčnih vin.

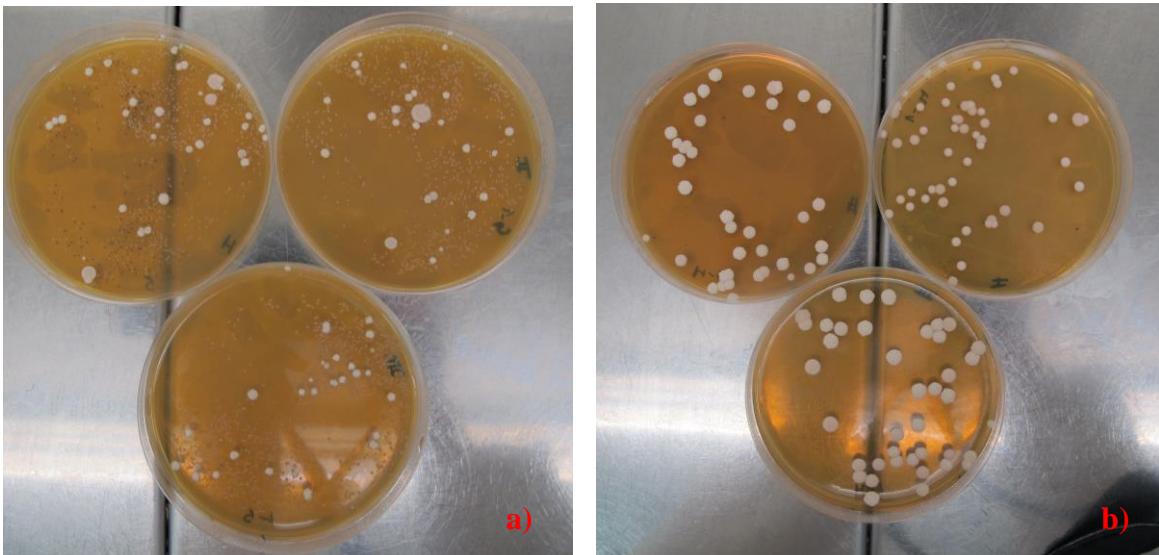
Iskrena zahvala tudi vsem lastnikom kmetij, ki so mi prijazno in velikodušno omogočili odvzem vzorcev jabolčnih vin ter mi izkazali podporo, zanimanje in zaupanje v mojo raziskavo.

Na koncu bi se najlepše zahvalila še družini in prijateljem za vso izkazano podporo, spodbudo in potrežljivost tekom mojega študija. Hvala Nejcu, da si verjel, da zmorem, še posebno takrat, ko sama nisem.

PRILOGE

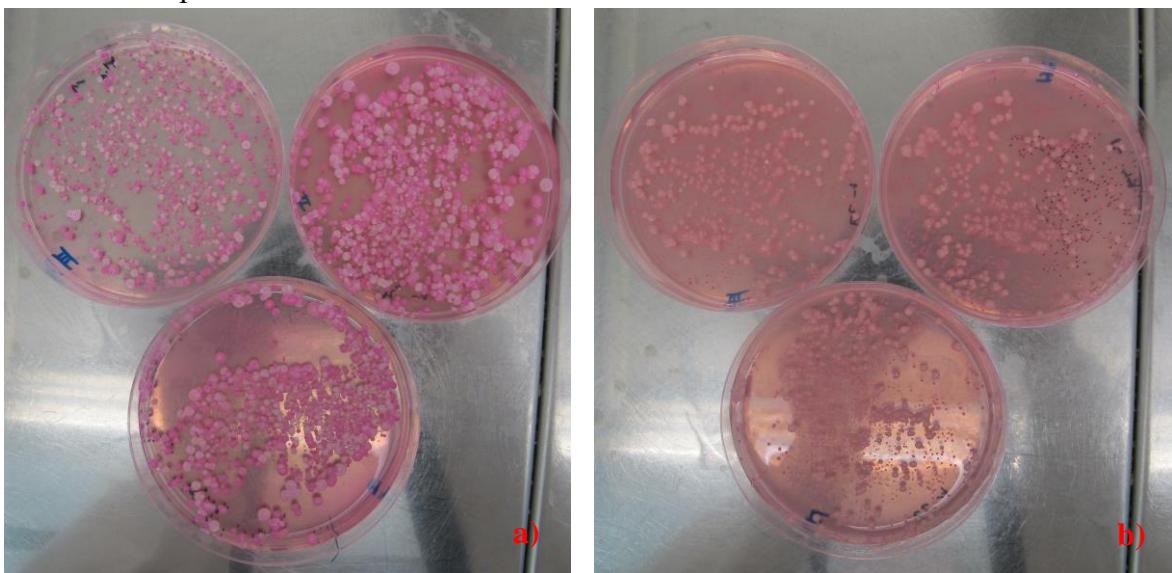
PRILOGA A: Slike trdnih gojišč YPD, MRS in gojišča po Frauterju, nacepljenih z različnimi redčitvami vzorcev jabolčnih vin in brisov površin sodov

Priloga A1: Primeri paralelk plošč z gojiščem YPD s kloramfenikolom, nacepljenih z vzorci jabolčnih vin



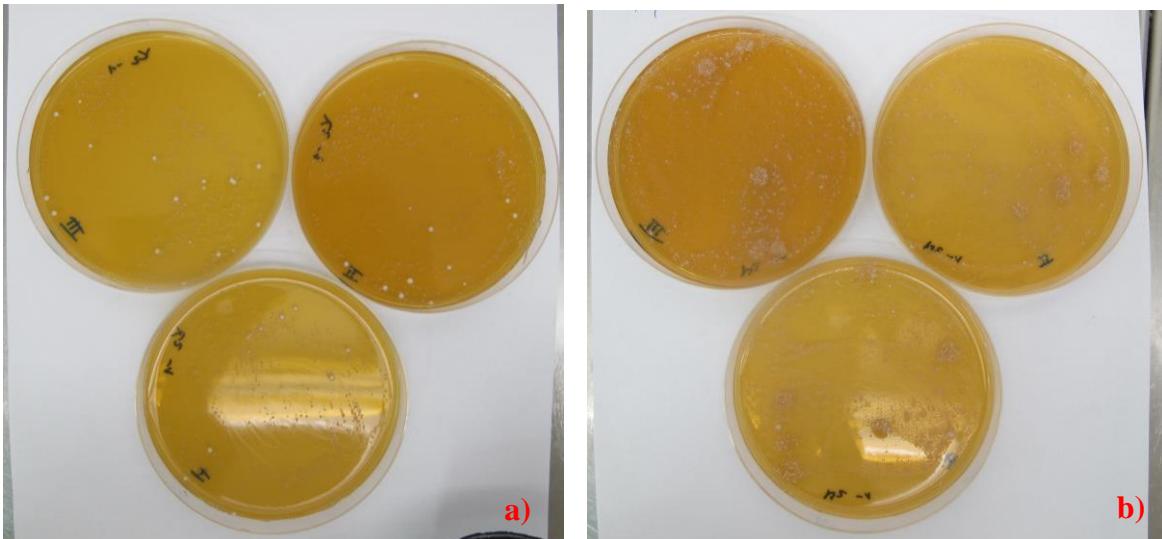
a) Gojišče YPD s kloramfenikolom z lokacije Grablar, redčitev 10^{-1} ; b) Gojišče YPD s kloramfenikolom z lokacije Kajžar, redčitev 10^{-1}

Priloga A2: Primeri paralelk plošč z gojiščem YPD s kloramfenikolom, nacepljenih z vzorci brisov površine sodov



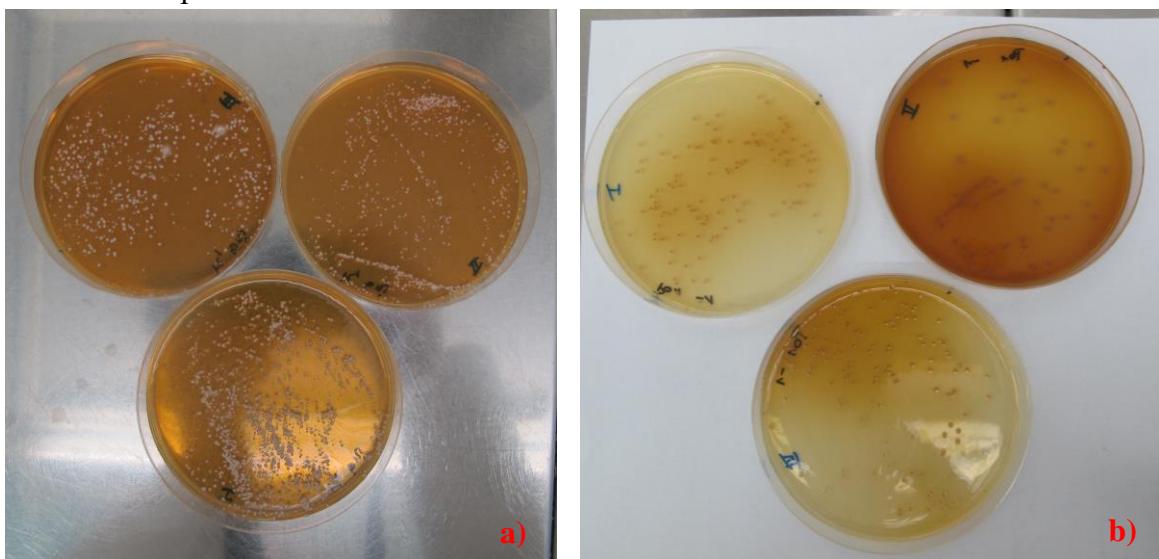
a) Gojišče YPD s kloramfenikolom z lokacije Marin-Miler, redčitev 10^{-1} ; b) Gojišče YPD s kloramfenikolom z lokacije Kajžar, redčitev 10^{-1}

Priloga A3: Primeri paralelk plošč z gojiščem MRS s cikloheksimidom, nacepljenih z vzorci jabolčnih vin



a) Gojišče MRS s cikloheksimidom z lokacije Kos, redčitev 10^{-1} ; b) Gojišče MRS s cikloheksimidom z lokacije Naddvor, redčitev 10^{-1}

Priloga A4: Primeri paralelk plošč z gojiščem MRS s cikloheksimidom, nacepljenih z vzorci brisov površin sodov



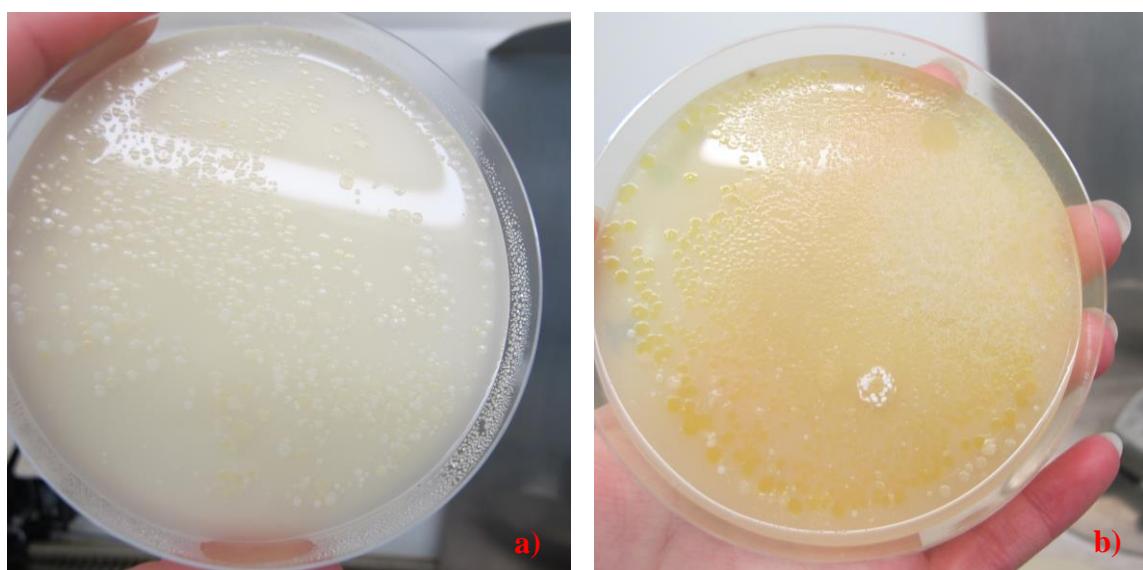
a) Gojišče MRS s cikloheksimidom z lokacije Marin-Miler, neredčen vzorec; b) Gojišče MRS s cikloheksimidom z lokacije Šibovnik, redčitev 10^{-1}

Priloga A5: Primera plošč z gojiščem po Frauterju, nacepljena z vzorci jabolčnih vin



a) Gojišče po Frauterju z lokacije Šibovnik, redčitev 10^{-2} ; b) Gojišče po Frauterju z lokacije Pustnik, redčitev 10^{-4}

Priloga A6: Primera plošče z gojiščem po Frauterju, nacepljena z vzorcem brisa površine suda



a) Gojišče po Frauterju z lokacije Marin-Miler, redčitev 10^{-1}

PRILOGA B: Prikaz lokacij vzorčenja na izrezu zemljevida Slovenije in prikaz podrobnih lokacij vzorčenja

