

**UNIVERZA V LJUBLJANI**  
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

**VPLIV PROCESNIH PARAMETROV NA POTEK  
ALKOHOLNE FERMENTACIJE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Matjaž Berlot

Ljubljana, september 2013



Izjavljam, da sem avtor predloženega dela in da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Matjaž Berlot



## **Zahvala**

Raziskovalni del doktorske naloge sem večinoma izvedel na Katedri za kemijsko, biokemijsko in ekološko inženirstvo, na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, v Ljubljani. Za vodenje in koristne nasvete se zahvaljujem prof. dr. Marinu Beroviču, prav tako pa se iskreno zahvaljujem somentorici prof. dr. Tatjani Košmerl za neprecenljivo pomoč in nasvete pri doktorskem delu. Zahvaljujem se tudi Klemenu Lisjaku, Klemenu Birtiču, Dušanu Komelu in Mirjanu Švaglju. In nenazadnje, iz srca hvala moji družini, ki je verjela vame in mi tudi v najtežjih trenutkih stala ob strani.



## Povzetek

Odstotek znižanja etanola po fermentativni poti je v principu mogoče znižati z regulacijo metabolizma vinskih kvasovk z odpiranjem metabolne poti biosinteze glicerola, ki predstavlja v vinih polnost in s tem dodano tržno vrednost. V svojih raziskavah sem preizkusil predvsem tiste fizikalne parametre, ki ne vplivajo na kemijsko sestavo vina.

S temperaturnimi šoki na vcepku pri 45 °C s tremi različnimi kvasovkami (Anchor VIN7, Anchor NT116 in Anchor NT202) in v dolžini temperaturnega šoka 10, 20 in 30 min, sem preučil vpliv temperature in njenih sprememb. Ob tem sem ugotovil, da je najvišja učinkovitost postopka s kvasovkami Anchor NT202.

S temperaturnimi šoki sem dosegel večjo homogenost vcepka in večjo metabolno aktivnost vinskih kvasovk. Odkril sem, da so tako tretirane celice s tem pridobile spominski efekt toplotnega šoka pri katerega so preživele le temperaturno odporne celice, ki so za zaščito spremembe celičnega metabolizma in redoks ravnotežja proizvajale do 35 % povišano koncentracijo regulatorja glicerola. S tem je pri isti temperaturi fermentacije sočasno uspel zmanjšati koncentracijo etanola za 6 - 10 %.

Preučil sem vpliv sprememb povišanja temperature od 18 - 26 °C in 18 - 34 °C, med postopkom fermentacije v eksponentni fazi rasti mikroorganizma. Ugotovil sem, da se v ciklu anaerobnega kvasnega metabolizma zaradi serije reduktivnih reakcij, vrednost redoks potenciala med procesom alkoholne fermentacije znatno znižuje. Padec redoks potenciala je predvsem očiten v fazi produkcije etanola v anaerobni fazi rasti, kjer se aktivirajo encimski kompleksi kvasovk in se začne presnova sladkorjev po glikolitični poti.

Raziskal sem vpliv nizkih enosmernih galvanskih tokov jakosti 10 in 20  $\mu\text{A}$  v dolžini celotnega procesa fermentacije. Količina nastalega biomase, glicerola, etanola in višjih alkoholov se povečuje z višanjem jakosti električnega toka. Tako lahko pri nižjih temperaturah z uporabo električnega toka dosežemo podobne rezultate kot pri povišani temperaturi. Pri študiju vpliva homogenega magnetnega polja 6 in 12 mT na metabolizem vinskih kvasovk sem v produkciji kvasne biomase, porabi glukoze in fruktoze ugotovil zaviralni efekt. Zaznana je tudi počasnejša kinetika z manjšo aktivnostjo kvasovk v produkciji etanola in glicerola. Homogeno magnetno polje pa pozitivno vpliva na biosintezo glutationa. Vpihovanje  $\text{CO}_2$  ima zaviralen učinek. V procesu katabolizma sladkorja se ogljikov dioksid sprošča v encimatskih reakcijah dekarboksilacije s pomočjo encimov dekarboksilaz. S tem je posredno upočasnen metabolizem kvasovk. Ob tem sem ugotovil, da ima vpihovanje ogljikovega dioksida pozitiven vpliv na povišano biosintezo glicerola.

Preveril sem tudi možnosti usmerjanja fermentacijskega procesa v smeri zelenega redoks potenciala s pomočjo spreminjanja temperature, električnih impulzov, magnetnega polja in vpihovanja  $\text{CO}_2$ . Ugotovil sem, da celični metabolizem najtežje sledi usmerjenem redoks potencialu v eksponentni fazi rasti. Preučil sem uporabo posameznih fizikalnih parametrov in njihovih kombinacij v smislu sinergističnega vpliva galvanskega in magnetnega polja, temperature in uporabe pulzov ogljikovega dioksida.

V sklopu raziskav kinetike bioprocesa sem postavil nestrukturiran modelom pri treh različnih temperaturah (15, 20, 25 °C) in z njim interpretiral eksperimentalne podatke.

**Ključne besede:** temperaturni šok, magnetno polje, električni impulzi, glicerol

## Abstract

The reduction of ethanol in the grape must alcohol fermentation in principle could be reduced by regulating the metabolism of wine yeast in the direction of activating the metabolic pathways of glycerol biosynthesis which is on one side representing the fullness of the wine, its quality and on the other side the added market value. In present research the metabolism of wine yeast was regulated using those physical parameters that do not affect the chemical composition or wine quality.

Inoculum temperature shocks at 45 °C using three different yeasts (Vin7 Anchor, Anchor Anchor NT116 and NT202) and the intervals of the shock temperature of 10, 20 and 30 min were examined and the maximum efficiency of the yeast Anchor NT202 was found. The temperature shocks produced more homogeneous inoculum with expressed increase metabolic activity of wine yeast. The cells treated with thermo shock acquired memory effect of thermal shock that induce heat - resistant survived cells, which were, to protect the change in cell metabolism and redox balance, produced for a 35% increased concentration of redox regulator - glycerol and in the same experiment this cells reduced ethanol for 6 - 10 %.

The effect of temperature rise from 18 to 26 °C and from 18 to 34 °C, during the exponential growth phase of the wine yeast cells was studied. In anaerobic yeast, in the process of alcoholic fermentation metabolic cycle, series of reactions reducing the value of the redox potential significantly lowered. Drop in the redox potential is particularly evident in the stage production of ethanol where the activated yeast enzyme complexes are metabolized the sugars by glycolytic path.

The experiments where the effect of low intensity direct current galvanic currents 10 and 20  $\mu$ A during the whole fermentation period in the length of the entire fermentation process shown the stimulating effect in biomass , glycerol , ethanol and higher alcohols production. Thus experiments performed at lower temperatures using electric current shown similar results as at those at elevated temperatures. In the study of the impact of a homogeneous magnetic field of 6 and 12 mT on wine yeast metabolism biomass production, consumption of glucose and fructose inhibitory effect. In this process it was also detected slower process kinetics with a lower activity of the yeast in ethanol and glycerol production. Homogeneous magnetic field has a positive effect on the biosynthesis of glutathione production.

CO<sub>2</sub> injection has a dampening effect. In the process of catabolism of sugar, carbon dioxide released in the enzymatic decarboxylation reaction by means of the decarboxylase enzyme indirectly reduced metabolic activities of wine yeast, while the injection of carbon dioxide had positive effect on the glycerol biosynthesis.

The possibility of directing the fermentation process in the direction of the desired redox potential by changing temperature, electrical impulses, magnetic field and CO<sub>2</sub> injection was studied. Cellular metabolism was found the most hardly directed specially in the exponentially growth phase. The application of specific physical parameters and combinations thereof in terms of the synergistic effect of galvanic and magnetic fields, temperature, and the use of pulses of carbon dioxide were studied.

For the fermentation process kinetics studies, at three different process temperatures (15, 20, 25 °C), the non-structural model was used for well interpretation of the experimental data.

**Key words:** temperature shock, magnetic field, electric pulses, glycerol

# Kazalo

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 SAUVIGNON.....	1
1.2 NAMEN DELA.....	2
<b>2. PREGLED OBJAV.....</b>	<b>3</b>
2.1 GROZDNI MOŠT.....	3
2.1.1 Kemijska sestava grozdnega mošta in vina.....	3
2.2 VINSKE KVASOVKE.....	7
2.2.1 Morfologija vinskih kvasovk.....	7
2.2.2 Življenjske stopnje kvasovk pri fermentaciji.....	9
2.2.3 Kinetika rasti.....	10
2.3 METABOLIZEM VINSKIH KVASOVK IN BIOKEMIJA ALKOHOLNE FERMENTACIJE.....	12
2.3.1 Vpliv temperature na proces alkoholne fermentacije.....	13
2.3.2 Fermentacija.....	14
2.3.3 Glikoliza.....	15
2.3.4 Fermentacija grozdnega mošta.....	18
2.3.5 Cikel trikarboksilnih kislin – TCA cikel.....	20
2.3.6 Regulacija metabolnih poti presnove sladkorjev.....	21
2.3.7 Odziv kvasnih celic na stres.....	22
2.3.8 Pomen glicerola v tehnologiji pridelave vin in faktorji, ki vplivajo na povečanje tvorbe glicerola.....	26
2.3.9 Metabolizem glicerola v kvasnih celicah.....	29
2.3.10 Glavne značilnosti alkoholne fermentacije.....	30
2.3.11 Vpliv temperaturnega šoka na potek fermentacije.....	31
2.3.12 Vpliv galvanskega polja.....	32
2.3.13 Prevodnost vina.....	43
2.3.14 Vpliv magnetnega polja.....	49
2.4 MATEMATIČNI MODELI.....	52
2.4.1 Mehanistični model.....	54
2.4.2 Eksperimentalni model.....	54
2.4.3 Kombiniran model.....	54
2.4.4 Biokemijske reakcijske mreže – Modeli črne skrinje.....	58
<b>3. MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>61</b>

3.1 MATERIALI.....	61
3.1.1 Mikroorganizem.....	61
3.1.2 Substrat.....	61
3.1.3 Kemikalije.....	61
3.1.4 Oprema.....	62
3.2 METODE.....	65
3.2.1 Fermentacija.....	65
3.2.2 Analitske metode.....	66
<b>4. REZULTATI Z RAZPRAVO.....</b>	<b>70</b>
4.1 VPLIV TEMPERATURE NA POTEK FERMENTACIJE.....	70
4.2 VPLIV TEMPERATURNIH ŠOKOV NA VCEPKU NA POTEK FERMENTACIJE.....	79
4.3 VPLIV TEMPERATURNIH NIHANJ MED FERMANTACIJO NA POTEK FERMENTACIJE.....	87
4.4 VPLIV ELEKTRIČNIH IMPULZOV NA POTEK FERMENTACIJE.....	94
4.5 VPLIV MAGNETNEGA POLJA NA POTEK FERMENTACIJE.....	98
4.6 VPLIV VPIHOVANJA CO <sub>2</sub> NA POTEK FERMENTACIJE.....	104
4.7 VPLIV KOMBINACIJ NA POTEK FERMENTACIJE.....	108
4.8 REGULIRANA FERMENTACIJA.....	116
4.9 MODEL ČRNE SKRINJE.....	123
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>126</b>
<b>6. ZAKLJUČKI.....</b>	<b>133</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>135</b>

## Kazalo slik

Slika 1: Cikel rasti mikroorganizma v šaržni kulturi .....	11
Slika 2: Metabolizem kvasovke v aerobnih in anaerobnih razmerah.....	13
Slika 3: Shematični prikaz bioprocesa glikolize .....	16
Slika 4: Shematični prikaz sinteze jantarne in $\alpha$ -ketogluterjeve kisline.....	19
Slika 5: Shematski prikaz TCA cikla ali Krebsovega cikla .....	21
Slika 6: Shematični prikaz produkcije glicerola .....	27
Slika 7: Reakcije glicerolnega metabolizma kvasovke <i>S. cerevisiae</i> .....	29
Slika 8: Redoks potenciala v moštu in vinu brez dodatka $\text{SO}_2$ in z njim .....	40
Slika 9: Koraki sistematičnega pristopa k izgradnji modela.....	55
Slika 10: Primer sistema, kjer obravnavamo mikroorganizem kot črno skrinjo.....	58
Slika 11: 10 L mešalni bioreaktor.....	63
Slika 12: Shema poteka eksperimentalnega dela .....	65
Slika 13: HPLC meritve.....	67



# 1. UVOD

Vino je naravna pijača, ki jo pridobivamo z vodeno alkoholno fermentacijo grozdja plemenite vinske trte *Vitis vinifera*.

Vino je imelo v zgodovini pomembno vlogo, o čemer pričajo številni zapisi o vinu. Eden najbolj poznanih izrekov o vinu pa je - *In vino veritas*.

Slovenija je nedvomno tradicionalna vinogradniška država. V naše kraje so vinsko trto in s tem vinogradništvo prinesli že Kelti. Rimljani pa so vinsko trto močno razširili, vinogradništvo pa izboljšali in izpopolnili. Vzpon vinogradništva se je na področju Slovenije pričel v 11. stoletju.

Leta 1866 je Louis Pasteur v svoji znameniti študiji o vinu »Étude sur le vin« pojasnil biološki proces fermentacije grozdnega mošta s pomočjo kvasovk v vino.

Etanol je poleg CO<sub>2</sub> produkt primarnega metabolizma ter je pokazatelj kakovosti vina. Vinu daje telo in okus. Vina z večjo vsebnostjo etanola so biološko stabilnejša in se lažje hranijo. Posamezni predstavniki višjih alkoholov vstopajo v reakcije s kislinami vina in pri tem nastajajo estri, ki sodelujejo pri nastajanju cvetice. Nekateri od višjih alkoholov se nahajajo v grozdju, od koder prehajajo v vino, drugi nastajajo kot sekundarni produkti alkoholne fermentacije, največji del pa nastaja iz aminokislin. Glicerol se v vinu pojavlja kot glavni sekundarni produkt alkoholne fermentacije. Vina z več glicerola so polna in harmonična v okusu. Acetaldehid nastane kot vmesni produkt pri alkoholni fermentaciji, ki z redukcijo prehaja v etanol.

## 1.1 SAUVIGNON

Sorta grozdja Sauvignon izvira iz Francije, razširjena pa je po vsem svetu. Pri nas so jo dolgo imenovali muškatni silvanec. Sorta je bujne rasti, zato zahteva temeljito pletje in druga zelena dela v vinogradu. Cvetica in aroma vina sauvignon se razlikuje glede na tip tal, letnik, čas trgatve in način kletarjenja. Ustrezajo ji tudi hladnejše jeseni. Tedaj sta muškatna cvetica in aroma še posebej izraženi. V vinu sauvignon zlahka zaznamo vonj po bezgovem cvetju, pokošeni travi, črnem ribezu, papriki, kosmuljah, beluših. Kisline so zmerne in uravnotežene, sauvignon se lahko dobro stara.

## 1.2 NAMEN DELA

Raziskave in razvoj fermentacijske tehnologije v vinarstvu so ena izmed najbolj zanimivih smeri sodobne procesne biotehnologije.

Globalno segrevanje atmosfere se v grozdju odraža v večjih koncentracijah sladkorjev, ki vodi do hiperprodukcije etanola do 18 %, kar predstavlja najvišjo mejo zmogljivosti vinskih kvasovk in globalno predstavlja izjemen tehnološki problem. Sodobno vinarstvo zato pospešeno išče nove tehnološke možnosti zmanjšanja stopenj etanola v vinih. Po fermentativni poti je mogoče zmanjšati vsebnost etanola z regulacijo metabolizma vinskih kvasovk in odpiranjem metabolne poti biosinteze glicerola. Glicerol predstavlja v vinih polnost in s tem posebno kakovost, kar vinom dviguje njihovo tržno vrednost.

Namen mojega raziskovalnega dela je bil preizkusiti in uporabiti metode biokemijskega inženirstva ter jih povezati z metodami klasične enologije, ki omogočajo vodenje alkoholne fermentacije mošta in vplivajo na povečanje kakovosti vin. Na osnovi lastnih rezultatov ob uporabi različnih fizikalnih metod, ki vplivajo na regulacijo metabolizma kvasovk, sem želel ugotovitve povezati v funkcionalno celoto tehnološkega postopka. Potek procesa alkoholne fermentacije grozdnega mošta v vino in spremljanje metabolne aktivnosti vinskih kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* sem z ozirom na izvedene tehnološke posege in regulacije v procesu nastajanja vina spremljal in vrednotil z meritvami redoks potenciala, kot glavnega parametra. S tem namenom sem raziskal vpliv temperature in spreminjanja temperature med procesom fermentacije, vpliv temperaturnih šokov na vcepku in njihov možni vpliv med fermentacijo na proces nastajanja metabolitov, še posebej glicerola, vpliv galvanskega ter magnetnega polja na potek fermentacije z možnostjo njune uporabe v usmerjanju procesa nastajanja vina, ter vpliv vpihovanja CO<sub>2</sub> na potek fermentacije. Moje eksperimentalne rezultate sem želel povezati z modelom črne skrinje in s tem ovrednotiti proces alkoholne fermentacije. Kinetični modeli fermentacije lahko pripomorejo k boljši kontroli in napovedim procesa vinske fermentacije, kakor tudi k možnosti vpliva na potek fermentacije z namenom izboljšanja končnega produkta. Z modelom bi lahko napovedovali hitrosti porabe substrata in nastajanja produkta in biomase v odvisnosti od ostalih procesnih parametrov. Primerjava posameznih redoks profilov fermentacijskega procesa z organoleptičnimi analizami vzorcev vina vodi do postavitve tehnološkega optimuma, ki je karakterističen za posamezne vinske sorte. Znanja o kinetičnih parametrih, ki zaznamujejo proces, ter empirične izkušnje iz eksperimentov, izvedenih v laboratoriju, omogočajo pristop k razvoju novih znanj potrebnih za načrtovanje in vodenje procesa alkoholne fermentacije.

## 2. PREGLED OBJAV

### 2.1 GROZDNI MOŠT

Mošt je vmesni proizvod med grozdom in vinom. Je tekoči del notranje vsebine jagode in po svoji kemijski sestavi enak soku grozdne jagode, ki izpolnjuje ves notranji del jagode in zlasti najbogatejši osrednji del. Pri stiskanju grozdja lahko pride do poškodbe trdih delov grozdja in posledično do vnosa nekaterih snovi, ki se praviloma ne pojavljajo v grozdni jagodi. Po stiskanju lahko vsebuje mošt še trde delce pečk in kože. Med predelavo pa lahko s površine grozdne jagode v mošt pridejo tudi prah, zemlja, ostanki škropiv, številni mikroorganizmi ter ostale komponente, ki vplivajo na motnost mošta. V fizikalno-kemijskem pogledu je grozdni sok vodna raztopina, v kateri so raztopljene organske in anorganske snovi, voda pa je topilo teh sestavin (Šikovec, 1993).

#### 2.1.1 Kemijska sestava grozdnega mošta in vina

Vino je sestavljeno iz primarnih spojin: vode in etanola. Vendar pa je osnovna cvetica vina odvisna še od dodatnih 20 ali več spojin (Jackson, 2008).

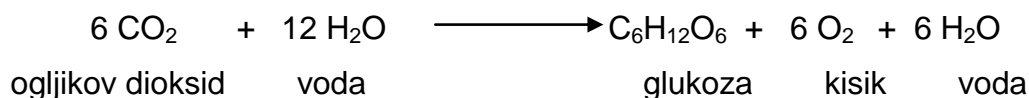
Grozdni mošt je vodna raztopina sladkorjev in drugih snovi z vsebnostjo vode 75-85 % (Bavčar, 2009).

Voda kot topilo za snovi, ki se nahajajo v grozdni jagodi, igra pomembno vlogo v življenjskih funkcijah tega organa vinske trte. Vsebnost vode v vinu je zaradi procesov, ki potekajo med alkoholno fermentacijo, večja kot v moštu. V največji meri so v moštu zastopani saharidi, ki nastajajo v grozdni jagodi med procesom fotosinteze (Sponholz, 1989).

#### OGLIJKOVI HIDRATI

Nastanek ogljikovih hidratov je kot pri vseh rastlinah s klorofilom, rezultat procesa fotosinteze. Ta proces se pri grozdu v največji meri odvija v listih in delno tudi v ostalih zelenih delih vinske trte, vključno z grozno jagodo, dokler je še zelena in ima v sebi klorofil.

Predstavljajo do 20 % celotne sestave mošta (Jackson, 2008).



## Monosaharidi

### *Pentoze*

Med monosaharidi grozdja in mošta imajo pentoze manjši pomen kot heksoze. Nahajajo se večinoma v obliki anhidridov, več ali manj polimeriziranih kot pentozani. V obliki anhidridov so lahko pentoze v kombinaciji s heksozami kot heksozo-pentozani ali pentozo-heksozani (Muštović, 1985).

Kvasovke jih ne morejo uporabiti kot substrat. Glavne pentoze v vinu so arabinoza, ksiloza in ramnoza. Največjo koncentracijo v vinih dosega arabinoza (Bavčar, 2009).

### *Heksoze*

Najpomembnejši in tudi količinsko najbolj zastopani ogljikovi hidrati v moštu so heksoze. Ti sladkorji nastajajo v listih vinske trte, kot produkti procesa fotosinteze in so glavni substrat za kvasovke pri alkoholni fermentaciji. Pomembni heksozi sta glukoza in fruktoza, ki sta sestavljeni iz šestih ogljikovih atomov, imata enaki empirični formuli, ločita pa se po poziciji funkcionalne karbonilne skupine. Skupna koncentracija glukoze in fruktoze znaša med 150 in 300 g/L. Na njuno koncentracijo vpliva večje število dejavnikov, med njimi sorta, stopnja zrelosti grozdja, klima, tla, agrotehnični ukrepi in prisotnost plesni (Bavčar, 2009).

### *D-glukoza* (dekstroza, grozdni sladkor)

D-glukoza je podvržena razgradnji z mnogimi mikroorganizmi. Najpomembnejše so vsekakor predstavnice kvasovk (rodova *Saccharomyces*, *Kloeckera*), ki med procesom alkoholne fermentacije proizvajajo: etanol, glicerol, CO<sub>2</sub> in drugo. Bakterije mlečnokislinske fermentacije jo spremenijo v mlečno kislino, CO<sub>2</sub> in vodo. Tudi predstavniki posameznih plesni uporabljajo ta sladkor za proizvodnjo raznih snovi, kot so citronska kislina in druge (Radovanović, 1986).

### *D-fruktoza* (levuloza, sadni sladkor)

D-fruktoza je pri rastlinah zelo razširjena in pogosto spremlja glukozo. Tudi fruktoza je substrat v nekaterih fermentacijah, med katerimi je najpomembnejša alkoholna fermentacija. Večina kvasovk hitreje razgrajuje glukozo kot pa fruktozo (Radovanović, 1986).

## Disaharidi

### **Saharoza**

Saharoza je optično aktiven diglikozid, sestavljen iz glukoze in fruktoze. Glukoza in fruktoza sta povezani preko kisikovega atoma med prvim ogljikovim atomom v molekuli glukoze in drugim ogljikovim atomom v molekuli fruktoze (Bavčar, 2009).

V pogledu sladkosti zavzema mesto med glukozo in fruktozo. Danes je dokazano, da se saharoza nahaja v vsaki sorti grozdja. Količine tega disaharida so običajno zelo majhne v primerjavi s količinami glukoze in fruktoze (Radovanović, 1986).

## **KISLINE V MOŠTU**

V moštu in vinu najdemo predvsem organske kisline, te pa so v vinu različnega izvora. Vinska in jabolčna kislina sta rezultat nepopolne oksidacije sladkorjev in iz grozdne jagode prehajata v mošt. Njuna koncentracija je odvisna od sorte, klime, vzgoje in nege trte ter dozorelosti grozdja (Bavčar, 2009).

Odvisno od sorte, se vsebnost kislin giblje v širokih mejah, med 3 do 12 g/L, najpogosteje pa od 4 do 8 g/L, izraženo kot vinska kislina. Vrednost kislosti se giblje med pH 2,5 in 3,8. V okviru iste sorte pa lahko na kislinsko stanje mošta vplivajo tudi klimatski in geomorfološki dejavniki. Kislinsko stanje grozdnega soka se spreminja v procesu razvoja grozdne jagode in zorenja grozdja. Kislost mošta ima velik pomen tudi za vino, ker posamezne kisline prehajajo iz mošta in skupaj s kislinami, ki nastajajo naknadno, prevzemajo zelo pomembno vlogo, predvsem v formiranju različnih estrov, ki vplivajo na okus vina, kot tudi v nizu kemijskih in biokemijskih procesov (Radovanović, 1986).

### ***Vinska kislina***

Vinska kislina se nahaja v grozdju v koncentracijah 5-10 g/L in je običajno najbolj zastopana kislina, tako v moštu, kot v vinu. Skupaj z jabolčno kislino pogosto dosežeta 90 % vseh nehlapnih kislin. Njena koncentracija je odvisna od sorte, ker pa je slabo topna, se izloča kot sol tartrat - vinski kamen (Bavčar, 2009; Jackson, 2008).

### ***Jabolčna kislina***

Jabolčne kislne je v grozdju 1-4 g/L mošta. Koncentracija je odvisna od sorte, od temperature v času dozorevanja in končnega volumna jagode. Njena koncentracija se med dozorevanjem grozdja znižuje, če je zunanja temperatura višja. Mikrobiološko je nestabilna, saj jo mlečnokislinske bakterije spremenijo v mlečno kislino v procesu biološkega razkisa (Bavčar, 2009).

### ***Citronska kislina***

V fazi razvoja in zorenja grozdne jagode najdemo v moštu citronske kisline do 0,7 g/L. Za citronsko kislino je značilno, da nastaja pod vplivom plesni *Botrytis cinerea*. V vinih je stabilna, neobstoja je le v primeru aktivnosti mlečnokislinskih bakterij (Bavčar, 2009).

## **FENOLNE SNOVI**

Senzorične lastnosti vina, barva, okus, procesi stabilizacije in staranja so v tesni povezavi s prisotnostjo fenolnih spojin. Po novejših podatkih predstavljajo večino fenolov grozdju in vinu flavonoidi in neflavonoidi (Jackson, 2008).

Bistvena razlika v barvi belih in rdečih vinskih sort je, da vsebujejo rdeče vinske sorte antocianine ali rdeča barvila, ki jih bele vinske sorte ne akumulirajo v jagodni kožici. Fenoli imajo sposobnost, da sprožijo koagulacijo beljakovin, s tem so soudeleženi pri spontanem bistrenju vina. Poleg tega pa sodelujejo v prehranski vrednosti vina, saj njihova večja prisotnost v rdečih vinih povečuje baktericidni učinek vina (Muštović, 1985).

Splošno so fenoli ciklične benzenove spojine z eno ali več hidroksilnimi skupinami. Izhajajo predvsem iz grozdja, v manjši meri se med pridelavo ekstrahirajo tudi iz lesene posode. Delimo jih na dve skupini (Bavčar, 2009; Jackson, 2008)

- flavonoidi: antocianini, flavonoli in flavan-3-oli,
- neflavonoidi: derivati hidroksicimetnih kislin in hidroksibenzojevih kislin

## **AROMATIČNE SNOVI**

V vinu je dokazanih več kot 800 spojin, ki vplivajo na vonj, okus in aromo. Na naše čutilne receptorje delujejo hkrati. Spojine morajo biti hlapne in hkrati v zadostnih koncentracijah, da lahko v grozdju, moštu ali vinu delujejo na naše receptorje zaznave. Spojine, ki so odgovorne za vonj, so predvsem alkoholi, kisline, aldehidi, ketoni, terpeni, pirazini in merkaptani (Bavčar, 2009).

Vonj kake kemijske snovi je odvisen od molekulske mase, polarnosti in oblike molekule. Intenzivnost zaznave je odvisna od temperature. Čim nižjo temperaturo ima mošt ali vino, tem manj pride do izraza cvetica. Prisotnost topnega ogljikovega dioksida lahko precej pospeši sprostitvev hlapnih snovi in s tem oblikovanje cvetice (Šikovec, 1993).

Končna aroma vina je sestavljena iz sortno značilnih aromatičnih snovi grozdja, od katerih moramo nekatere odšteti, ker se izgubijo med vinifikacijo, in druge prišteti, ker nastanejo kot produkt alkoholne fermentacije in zorenja vina. Na splošno velja, da na sestavo aromatičnih snovi pomembno vpliva sestava aminokislin mošta, ker v resnici lahko aromatične snovi nastajajo iz ogljikovega ogrodja aminokislin, sladkorjev in kislin (Šikovec, 1993).

## 2.2 VINSKE KVASOVKE

Znanja o mikrobiologiji vinskih kvasovk in njihovi uporabi v vinarstvu izvirajo iz študij Louisa Pasteurja. Pasteur je ugotovil, da so kvasovke mikroorganizmi, ki povzročajo alkoholno fermentacijo grozdnega mošta v vino. Od Pasteurja naprej je postal študij mikrobiologije alkoholne fermentacije intenziven in vedno boljše je pojasnjeval kompleksnost ekologije vinskih kvasovk. Kvasovke imajo velik pomen v vinarstvu, ker:

- vodijo proces vinske fermentacije,
- z avtolizo vplivajo na kakovost vina.

Fermentacija sladkorja v etanol je osnovni bioproces pretvorbe mošta v vino, ki ga preučujejo že okrog 150 let, od prvih raziskav Louisa Pasteurja (Amerine, 1985). Med fermentacijo kvasovke kot substrat porabljajo sladkor v moštu in ga presnavljajo v etanol, CO<sub>2</sub> in druge metabolite, ki prispevajo k strukturi in senzorični kakovosti vina. V osnovi delimo kvasovke, ki so sposobne fermentacije sladkorja v alkohol v dve skupini (Boulton in sod., 1996):

- v močnovrelne kvasovke, ki fermentirajo sladkor v moštu v etanol in CO<sub>2</sub>, imajo hitrejši metabolizem, so odporne na koncentracije etanola več kot 6 vol.% in ne tvorijo produktov, ki so v vinu nezaželeni. Takšne kvasovke so predstavniki rodu *Saccharomyces* in so v vinarstvu zaželeni
- v šibkovrelne kvasovke predstavniki rodov *Kloeckera*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Torulaspota*, *Pichia*, *Dekkera*, *Candida...*, ki med vrenjem tvorijo poleg etanola številne spojine, ki so komponente kvara vina (acetaldehid, etil acetat, H<sub>2</sub>S...). Običajno ne uspevajo pri koncentracijah etanola več kot 5 vol.% in imajo počasnejši metabolizem v primerjavi z močnovrelnimi kvasovkami (Šikovec, 1980).

### 2.2.1 Morfologija vinskih kvasovk

Vinske kvasovke so enocelični mikroorganizmi, ki sodijo v veliko skupino gliv. Pod mikroskopom jih spoznamo po obliki okroglih, jajčastih in elipsoidnih celic, ki imajo premer od 4 do 16 µm (Judež, 1981).

#### Celična stena

Celična stena je tanka (100-200 nm) plast, ki obsega med 15-25 % suhe mase celotne celice. Glavne strukturne komponente celične stene kvasovk so polisaharidi, ki sestavljajo 80-90 % stene (Walker, 1998). Je multifunkcionalna organela, ki ščiti celico, ji daje obliko, omogoča

kontakt med celicami, dovoljuje sprejem snovi od zunaj in omogoča vezavo nanjo ter vključuje specializirane encimske aktivnosti (Fleet, 1991).

Kemijska sestava celične stene kvasovk rodu *Saccharomyces* je odvisna od uporabljenega seva, starosti kvasnih celic in rastnih razmer. Komponente glukana, ki so delno urejene v mikrofilamentno mrežo, dajejo kvasovki trdnost. Prisotni so tako  $\beta$ -1,6- kot tudi  $\beta$ -1,3-glukani, ki se razlikujejo po topnosti v kislinah in alkalijah. Manani so sestavljeni iz glavne in dveh stranskih verig. Vrsta *Saccharomyces cerevisiae* vsebuje 2-4 % hitina, ki je razporejen po celotni celični steni, največ ga je v brstnih brazgotinah. V celični steni so še proteini, lipidi in fosfati (Košmerl, 1996).

### **Plazemska membrana**

Plazemska membrana je 8-10  $\mu$ m sloj med celično zunanostjo in notranostjo. Njena funkcija je regulacija vstopa hranil in izstopa metabolitov. Omogoča tudi sintezo komponent celične stene in izhod ekstracelularnih encimov. Sestavljena je iz lipidov in proteinov v približno enakem razmerju. Plazemska membrana kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* je sestavljena iz 40 % lipidov in 50 % proteinov. Glukani in manani so prisotni v majhnih količinah. Glavni fosfolipidi membrane so: glicerolfosfolipidi, sfingolipidi in steroli. Prisotni fosfolipidi zagotavljajo oviro med zunanostjo in notranostjo ter obratno. Plazemska membrana predstavlja čvrsto, hidrofobno pregrado med citoplazmo in okoljem izven celice zaradi njenih fosfolipidov in sterolov. Plazemska membrana ima osmotske lastnosti. Zaradi svojega sistema permeaz, membrana kontrolira izmenjavo snovi med celico in medijem (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).

Transportni sistem sladkorjev skozi membrano še ni povsem pojasnjen. Obstajata najmanj dva načina transporta: visoko afinitetni sistem in nizko afinitetni sistem. Nizko afinitetni sistem igra veliko vlogo v lag-fazi in njegova aktivnost se zmanjša v stacionarni fazi. Visoko afinitetni sistem deluje pri velikih koncentracijah glukoze, kot v primeru grozdnega mošta (Salmon in sod., 1993).

### **Citoplazma in organele v citoplazmi**

Med plazemsko membrano in membrano jedra se nahajajo citoplazma, citosol in organele. Te organele so: endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat, vakuole in mitohondriji. Od citosola so organele ločene z membrano. Citosol je pufrna raztopina s pH med 5 in 6, vsebuje topne encime, glikogen in ribosome.

Encimi, ki sodelujejo pri glikolizi in pri alkoholni fermentaciji, se nahajajo v citosolu.

Endoplazmatski retikulum je sistem dveh membran, ki deli citoplazmo. Povezan je s citoplazemsko membrano in jedrno membrano. Njegova funkcija je, da zagotavlja prepoznavanje proteinov, ki jih sintetizirajo ribosomi.

Golgijev aparat je sestavljen iz sklada membranskih ovojnic in vključenih mehurčkov. Ima dvojno funkcijo, in sicer je odgovoren za glikolizo proteinov in za razvrstitev preko

mehurčkov ali direktno v vakuolo ali v plazemsko membrano. Vakuole so organele sferičnih oblik, obdane z enojno membrano. Vakuole igrajo pomembno vlogo pri prepuščanju celičnih proteinov. Imajo pa tudi sekundarno funkcijo in sicer skladiščijo metabolite pred njihovo uporabo (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).

Mitochondriji se nahajajo neposredno ob celični membrani v obliki podolgovatih ali okroglih struktur z jasno izraženima dvema membranama, od katerih tvori notranja značilne invaginacije - kriste (Raspor, 1996). Mitochondriji zavzemajo po ocenah 12 % celotne prostornine celice. Njihovo obliko in število pogojujejo spremembe v celičnem ciklusu in fiziološkem stanju organizma, ki je odvisno od okolja. Delovna funkcija mitochondrija je vezana na posedovanje encimov, ki vodijo cikel trikarboksilnih kislin (TCA). Prav tako poteka na notranji membrani transport elektronov in oksidativna fosforilacija, ki napaja celico s potrebno energijo (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).

V številnih kvasovkah so pogosto prisotne lipidne kapljice. Sodelujejo v metabolizmu nekaterih substratov. Urejene transportne poti potekajo od jedra preko endoplazmatskega retikuluma v Golgijev aparat in od tu v vakuole ali pa z vezikli na citoplazmino membrano in v zunanje okolje celice (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).

### **Jedro**

Jedro je sferoidne oblike s približno 1,5  $\mu\text{m}$  premera. Jedrna plazma je ločena od citoplazme z jedrnim ovojem iz dveh membran, ki vsebuje 50-100 nm velike pore. Velikost in število por je odvisno od rastnih razmer in faze rasti, v kateri se celica nahaja. V času intenzivne rasti ga lahko lociramo med vakuolo in brstom ali pa ob največji vakuoli v mirujočih celicah. Procesi mitoze in mejoze potekajo v jedrni regiji. Različne rodove kvasovk karakterizirata različno število in velikost kromosomov (Raspor, 1996).

## **2.2.2 Življenjske stopnje kvasovk pri fermentaciji**

Vinske kvasovke ima več razvojnih stopenj, ki so povezane z vrenjem mošta in zorenjem vina (Judež, 1981):

- **razmnoževanje**; v glavnem z brstenjem. Hitrost razmnoževanja vinskih kvasovk je odvisna v glavnem od življenjskih razmer. V času brstenja potekajo v kvasovki pomembni procesi, od katerih je najbolj pomembna pretvorba sladkorja v etanol in ogljikov dioksid. Nastali alkohol postane inhibitor, ki jih ovira pri razmnoževanju.

- **intenzivno vrenje**; razmnoževanje kvasovk se zmanjšuje zaradi vse večje količine alkohola. Pri intenzivnem vrenju si kvasovke nakopičijo v notranjosti rezervne snovi, posebno glikogen. V tej fazi se nahajajo vsaka zase, ker ogljikov dioksid razbija večje kolonije.

- **stradanje**; ko kvasovkam v vinu začne primanjkovati sladkorjev, porabljajo za prehrano svoje rezervne snovi, predvsem glikogen. Kvasovke se počasi zmanjšujejo, citoplazma pa dobi izrazito zrnato strukturo.

- **stanje odmiranja in razpadanja**; če kvasovke dalj časa nimajo hrane, poginejo. Mrtve kvasovke razpadejo.

- **razpadanje, avtoliza**; v končni stopnji fermentacije mošta nastopi avtoliza kvasovk. Notranja struktura celice se poruši. Celične komponente, proteini, lipidi, nukleinske kisline, polisaharidi so podvrženi endogeni encimski razgradnji v produkte, ki imajo pomemben vpliv na senzorično kakovost vina, hkrati pa predstavljajo podlago za razvoj mlečnokislinskih bakterij in tudi nezaželenih tehnoloških kvarljivcev (Charpentier in Feuillat, 1993).

- **oksidativno stanje**: po koncu vrenja, v nepolnem ali odprtem sodu, ko je dostop zraka večji, ustvarijo kvasovke na površini vina prevleko. Tako prevleko tvorijo oksidativne kvasovke. V tem stanju nastaja ester iz očetne kisline in alkohola, kar daje vinu posebno cvetico (Judež, 1981).

### 2.2.3 Kinetika rasti

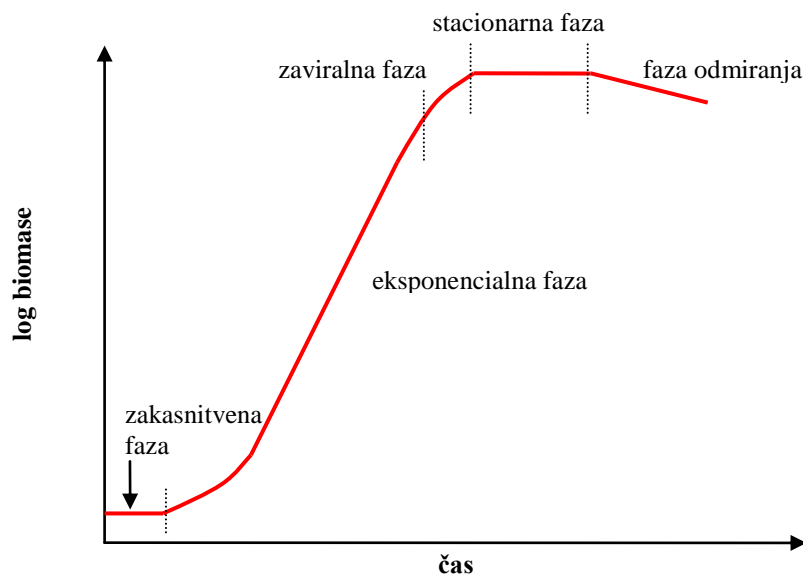
Med potekom fermentacije grozdnega mošta v vino populacija kvasovk naraste z gostote  $10^4$ - $10^6$  celic/mL na  $10^8$ - $10^9$  celic/mL (Bely in sod., 1990). Rast v šaržni kulturi lahko opišemo s tipično rastno krivuljo s štirimi fazami:

- lag-faza (zakasnitvena)
- eksponencialna faza
- stacionarna faza
- faza odmiranja

Kinetiko rasti opisujemo z različnimi termini:

- dolžina trajanja zakasnitvene faze
- specifična konstanta rasti
- maksimalna celična populacija
- dolžina trajanja stacionarne faze in faze odmiranja

Te značilnosti se spreminjajo s fermentacijo in so odvisne od številnih dejavnikov. Prenehanje rasti kvasovk pa ni nujno povezano tudi s prenehanjem metabolizma v celicah (Fleet in Heard, 1993).



**Slika 1:** Cikel rasti mikroorganizma v šaržni kulturi

Potek rasti kvasovk sledi običajnim fazam, zakasnitveni fazi, eksponencialni fazi, stacionarni fazi in nadalje zmanjšanju koncentracije kvasovk - fazi odmiranja. Med fermentacijo se kvasovke razmnožujejo z brstenjem. Na začetku fermentacije je njihovo razmnoževanje intenzivnejše in se tvori manj etanola. Nadalje se razmnoževanje postopoma zmanjšuje in nastaja več etanola (intenzivno vrenje - eksponencialna faza rasti). Kvasovke v eksponencialni fazi rasti skladiščijo energijo v obliki glikogena in trehaloze znotraj celice. Naraščajoča koncentracija etanola med fermentacijo deloma upočasnjuje rast kvasovk. Etanol deluje uničujoče na membrano in proteine kvasovk. Mikroorganizem se na takšne razmere odziva s sintezo trdnejše celične membrane. Ko kvasovke v vinu nimajo več dovolj sladkorjev, začnejo porabljati lastne rezervne snovi, predvsem glikogen (stacionarna faza rasti). Ob porabi hranil se skupaj s toksičnim učinkom etanola začne faza odmiranja biomase (Judež, 1981).

Potek fermentacije je mogoče zasledovati preko merjenja biomase (merjenje živih celic sposobnih rasti in razmnoževanja, suhe mase celic, štetjem pod mikroskopom), merjenja produkcije CO<sub>2</sub>, etanola in porabe sladkorjev. Številni dejavniki vplivajo na celično rast in kinetiko fermentacije. Ti dejavniki so predvsem: temperatura fermentacije, sestava mošta, vsebnost žveplovega dioksida, vrsta selekcionirane kulture kvasovk, interakcija z drugimi mikroorganizmi in avtoliza kvasovk (Judež, 1981).

## **2.3 METABOLIZEM VINSKIH KVASOVK IN BIOKEMIJA ALKOHOLNE FERMENTACIJE**

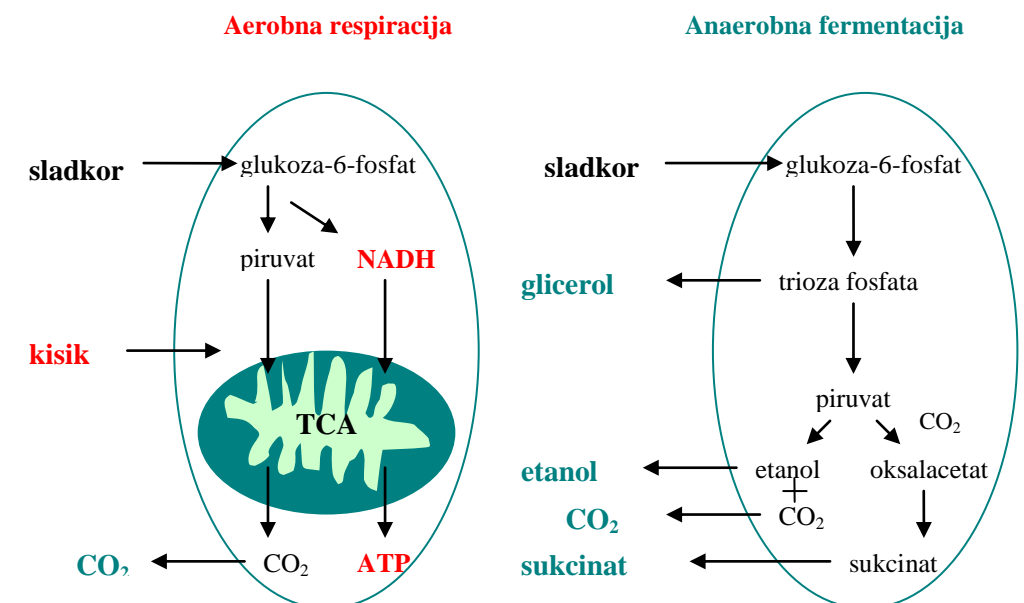
Hitrost razmnoževanja vinskih kvasovk je odvisna od življenjskih razmer. V času brstenja potekajo v kvasovki številni procesi, od katerih je najbolj pomembna pretvorba sladkorjev v alkohol in ogljikov dioksid. Nastali alkohol postane za kvasovko strup in jo ovira v razmnoževanju. Pri intenzivnem delovanju kvasovk se razmnoževanje zmanjšuje, nastaja pa več alkohola. V tem stanju si nakopičijo v notranjosti rezervne snovi, posebno glikogen. Ko kvasovke v vinu nimajo več dovolj sladkorjev, porabljajo glikogen. Kvasovke se počasi zmanjšujejo, citoplazma pa dobi izrazito zrnato strukturo. Kljub stradanju kvasovke ne odmrejo hitro. Mrtve kvasovke nato razpadajo, kar je zelo škodljivo za vino, zato ga čim prej pretočimo. Po koncu vrenja in v nepolnem ali odprtem sodu, ko je dostop zraka večji, nastane pri 13 vol.% alkohola in pri povišani temperaturi, na površini vina prevleka - kožica (solera). Tako prevleko tvorijo oksidativne kvasovke, ki tvorijo iz očetne kisline in etanola ester etil acetat, ki spominja na vonj lepila (Judež, 1981).

Najpomembnejši izvor energije pri kvasovkah vrste *Saccharomyces cerevisiae* je glukoza. Glikoliza je glavna metabolna pot za pretvorbo glukoze do piruvata, pri kateri vzporedno nastaja energija v obliki ATP in se tvorijo intermediati ter reduktivna moč v obliki NADH za biosintezne metabolne poti. Ločimo dva osnovna metabolna modela nadaljnje razgradnje piruvata za produkcijo energije:

- aerobni proces - respiracija: nastajanje biomase
- anaerobni proces - fermentacija: nastajanje etanola

Ob tem poteka razgradnja glukoze do piruvata po enaki poti v anaerobnih in aerobnih razmerah. Med glikolizo poteka razgrajevanje glukoze preko fruktoza-1,6-difosfata in gliceraldehid-3-fosfata do piruvata (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).

Ob prisotnosti kisika vstopa piruvat v mitohondrij, kjer se oksidativno dekarboksilira v acetil-CoA s piruvat-dehidrogenaznim kompleksom encimov. Ta reakcija poveže glikolizo s ciklom trikarboksilnih kislin, v katerem se acetil CoA oksidira in daje kot končni produkt dve molekuli CO<sub>2</sub> in reduktivne ekvivalente v obliki NADH in FADH<sub>2</sub>. Cikel trikarboksilnih kislin je amfibolna metabolna pot razgradnje piruvata, ker združuje kombinacijo katabolnih in anabolnih funkcij. Med alkoholno fermentacijo sladkorjev, kvasovke reoksidirajo NADH v NAD<sup>+</sup> v dvostopenjski reakciji iz piruvata, ki se prvotno dekarboksilira s pomočjo piruvat dekarboksilaze. Temu sledi redukcija acetaldehida, katalizirana z alkohol dehidrogenazo (ADH). Hkrati s to reakcijo nastaja iz dihidroxiacetonfosfata tudi glicerol, kar zagotavlja nastanek NAD<sup>+</sup> (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).



**Slika 2:** Metabolizem kvasovke v aerobnih in anaerobnih razmerah

([http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast\\_Biol/03%20Yeast%20Metabolism.pdf](http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/03%20Yeast%20Metabolism.pdf))

Biokemijske reakcije, ki potekajo med fermentacijo grozdnega mošta s pomočjo vinskih kvasovk, se delijo v tri sklope (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a):

- aerobni proces - respiracija
- biokemija alkoholne fermentacije
- metabolizem dušikovih spojin

### 2.3.1 Vpliv temperature na proces alkoholne fermentacije

Temperatura vpliva na vse življenjske funkcije kvasovk, s tem pa tudi na sam proces alkoholne fermentacije. Kvasovke lahko prenesejo zelo nizke temperature, tudi do  $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Veliko bolj so kvasovke občutljive na visoke temperature. Njihova vzdržljivost na visokih temperaturah je odvisna od stanja, v katerem se nahajajo, kot tudi od sestave medija. Tako so v suhem stanju veliko bolj odporne na višje temperature kot pa v vlažnem stanju. Tudi v vegetativni obliki slabše prenašajo visoke temperature kot pa v obliki spor. Za potek alkoholne fermentacije so večjega pomena temperature, ki vplivajo na dihanje in na fermentacijsko aktivnost. Respiracijska aktivnost, pri kateri se kvasovke razmnožujejo, se povečuje z naraščanjem temperature do  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Fermentacijska aktivnost vpliva na začetek, intenziteto in konec fermentacije. Obnašanje kvasovk v odvisnosti od temperature je odvisno od več dejavnikov (Amerine, 1980):

- vrste ali seva kvasovk,
- stopnje prezračenja mošta,

- vsebnosti nastalega alkohola,
- koncentracije dodanega žveplovega dioksida.

Glede na te dejavnike so optimalne temperature za aktivnost kvasovk od 30-36 °C. Najbolje je, če vzdržujemo konstantno temperaturo med celotno fermentacijo.

Temperatura, pri kateri kvasovke izgubijo moč in se fermentacija konča, se smatra za kritično temperaturo in je nekje med 37 in 40 °C.

Temperatura vpliva tudi na tvorbo sekundarnih produktov. Pri višjih temperaturah nastaja več produktov, kot so glicerol, očetna kislina, aceton, 2,3-butandiol, piruvat,  $\alpha$ -ketoglutarna kislina.

Poznavanje teh pojavov nam daje možnost, da fermentacijo reguliramo v praktični pridelavi vin tako, da omogočimo optimalne razmere za najugodnejši začetek fermentacije, pravilni potek in uspešen zaključek (Fleet in sod., 1993).

### 2.3.2 Fermentacija

Fermentacija je oblika metabolizma, kjer se sprošča energija, substrat (glukoza, donor elektronov) in produkt (etanol, akceptor elektronov) pa sta organski komponenti. Od dihanja se bistveno razlikuje po tem, da ne potrebuje kisika. Čeprav obstaja več vrst fefermentacije, je najbolj poznana prav alkoholna fermentacija. Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* imajo tudi sposobnost dihanja, vendar kot glavni način metabolizma uporabljajo alkoholno fermentacijo (Jackson, 2008).

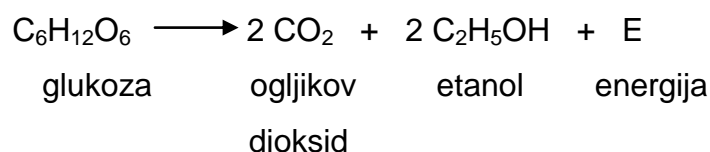
Poznamo:

- spontano ali naravno fermentacijo, kjer naravna populacija kvasovk (kvasovk šibkega in močnega vrenja) prisotna na površini grozdne jagode in pecljev začne fermentacijo mošta v vino.
- vodeno fermentacijo, kjer ločimo relativno čisto fermentacijo in absolutno čisto fermentacijo. V obeh primerih se v mošt doda vcepke selekcioniranih kvasovk (kvasovke, pridobljene s postopki selekcije, so kvasovke močnega vrenja in ne tvorijo spojin, ki so komponente kvara vina). V primeru absolutno čiste fermentacije se mošt pred dodatkom vcepka in vrenjem pasterizira in tako uniči naravno prisotno populacijo mikroorganizmov. Selekcionirane kvasovke omogočajo hiter začetek fermentacije, v primeru relativno čiste fermentacije že v začetku bioprocasa fermentacije presegajo v koncentraciji naravno populacijo mikroorganizmov v moštu in s svojo aktivnostjo močno zavrejo njihovo razmnoževanje (zavrejo tudi razmnoževanje mikroorganizmov, povzročiteljev kvara vina) (Šikovec, 1980).

Da se doseže zahtevano kakovost vina, je treba zagotoviti selekcionirane fermentacijske razmere, ki omogočajo razvoj in pravilno biokemijsko aktivnost kvasovk močnega vrenja.

Na začetku fermentacija vinskega mošta poteka zelo živahno in traja približno 6-10 dni. To imenujemo burna fermentacija. Nato vre mošt počasneje - mirna fermentacija, na koncu popolnoma preneha. Tiha fermentacija traja od 4 do 8 tednov (Judež, 1981).

Pri vrenju se spreminjajo sladkorji v alkohol in ogljikov dioksid po Gay-Lussacovi enačbi:

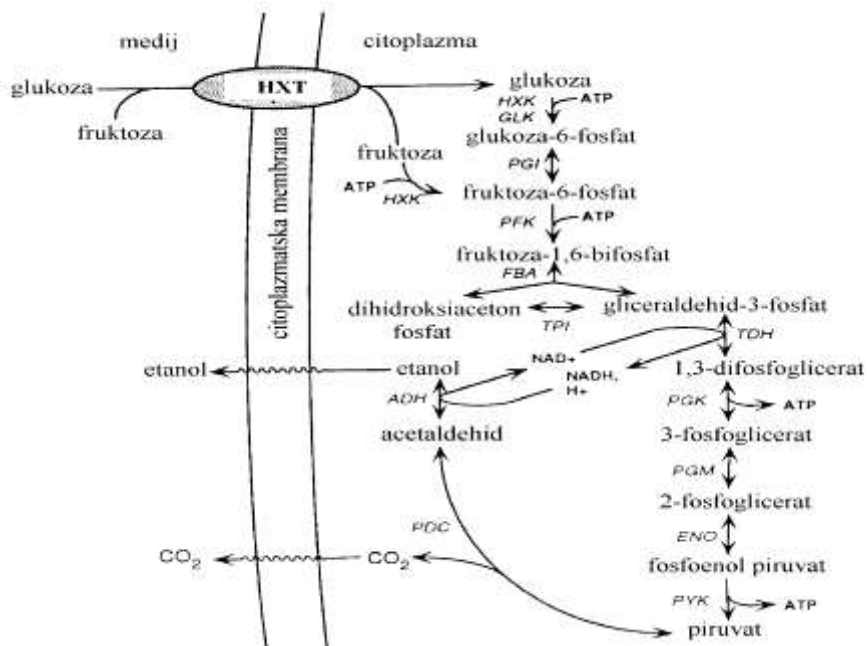


### 2.3.3 Glikoliza

Njena glavna naloga je razgrajevanje glukoze na preprostejše molekule. To je stopenjski proces, ki ga katalizira poliencimski sistem, ki ga sestavlja 13 glavnih in nekaj ko-encimov. Ta proces glikolize se imenuje EMP-pot (Embden-Mayerhof-Parnas) (Karlson, 1980).

Poznamo nekaj faz, ki karakterizirajo ta proces:

1. pretvorba glukoze v aktivno obliko glukoza-1-fosfat. Če se glikolizna pot prične z razgradnjo škroba ali glikogena, ta faza istočasno vsebuje tudi hidrolitično razgradnjo polisaharidov kot tudi aktiviranje glukoze v procesu fosforilacije.
2. transformacija aktivne oblike glukoze v 2 mola trifosfata (fosfotrioz).
3. vzporedni proces dehidrogenacije fosfotrioz v fosfoglicerinsko kislino in sinteza 1 mola ATP-ja.
4. pretvorba fosfoglicerinske kisline v piruvat, pri čemer nastane 1 mol ATP-ja.
5. sprememba piruvata v mlečno kislino (celice mišičnega tkiva) in etanol (kvasovke). V obeh procesih sodeluje 1 mol reducirane oblike  $\text{NADH}^+$ .



**Slika 3:** Shematični prikaz bioprocasa glikolize. Pomen kratic na sliki: HXT (prenašalni protein za heksozo), HXX (heksokinaza), GLK (glukokinaza), PGI (fosfoglukozna izomeraza), PFK (fosfofruktokinaza), FBA (aldolaza), TPI (triozafosfat izomeraza), TDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza), PGK (fosfoglicerat kinaza), PGM (fosfoglicerat mutaza), ENO (enolaza), PYK (piruvat kinaza), PDC (piruvat dekarboksilaza), ADH (alkohol dehidrogenaza) (Boulton in sod., 1996)

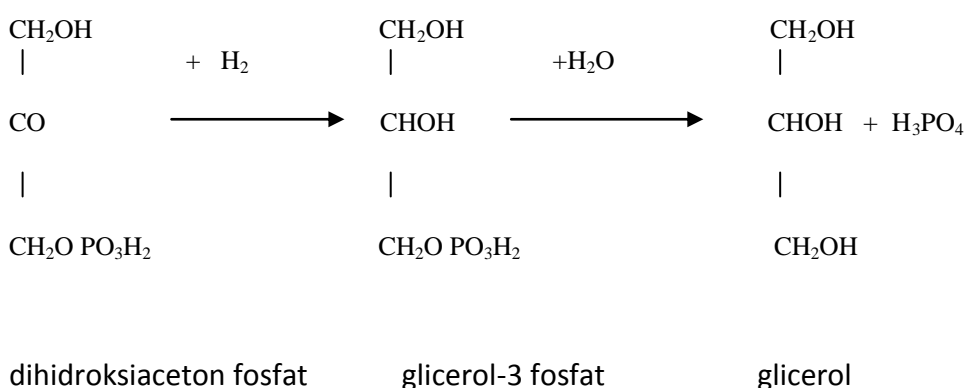
Če v procesu glikolize sodeluje škrob ali glikogen in ne prosta glukoza, se ta polisaharida razgradita. Prvo fazo glikogenolize katalizira encim fosforilaza. Kot rezultat te transformacije se pojavi aktivna oblika glukoze, D-glukoza-1-fosfat. Reakcija glikogenolize je reverzibilna. Ravnotežje te reakcije je pomaknjeno v desno, to je v smeri nastajanja D-glukoze-1-fosfata. D-glukoza-1-fosfat podleže procesu izomeracije in preide v D-glukozo-6-fosfat (Karlson, 1980).

V citosolu pride do fosforilacije glukoze. Donor fosfata je ATP. To omogočata dva encima: heksokinaza, ki jo inhibira produkt glukoza-6-fosfat, in glukokinaza, ki je zelo specifična in deluje na glukozo. Glukoza-6-fosfat je metabolno aktivna oblika glukoze, ki lahko vstopa v mnoge metabolne poti. Glukoza-6-fosfat s pomočjo delovanja fosfoglukozne izomeraze preide v fruktoza-6-fosfat. Pri procesu fosforilacije, ob prisotnosti 1 mola ATP-ja in  $Mg^{2+}$  iona kot aktivatorja, fruktoza-6-fosfat preide v fruktozo-1,6-difosfat. To reakcijo katalizira encim fosfofrukto-kinaza. Prenos fosfata je ireverzibilen in je zato odločilen za skupno hitrost celotne glikolize. Na fosfofruktokinazo delujejo pomembni regulacijski mehanizmi. ATP v večjih koncentracijah sterično inhibira encim, inhibicija pa se poveča ob prisotnosti citrata. Sterični aktivatorji so ADP in AMP. Pri aerobnih razmerah in veliki množini ATP v celici se razgradnja glukoze ustavlja, ker deluje ATP kot inhibitor, medtem ko se pri anaerobnih

razmerah in istočasni potrebi po energiji porablja ATP in nastaja ADP. S tem se aktivira fosfofrukto kinaza in hitrost glikolize se poveča (Karlson, 1980).

Anaerobna pretvorba glukoze v etanol s kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae* je redoks nevtralna in  $\text{NAD}^+$ , ki se porablja v začetku procesa Embden-Meyerhof-Parnasove metabolne poti, se regenerira ob nastanku etanola. Kadar intermediati EMP metabolne poti postanejo prekursorji za sintezo celičnega materiala, je to ravnotežje porušeno. Presežek nastalega NADH se ne spreminja nazaj v  $\text{NAD}^+$ . To lahko povzroči zaustavitev metabolizma, če ne obstaja proces, pri katerem se  $\text{NAD}^+$  regenerira. Med anaerobno rastjo se NADH ne more oksidirati s kisikom, ampak se regenerira z nastankom sekundarnih produktov, kot je glicerol v primeru *Saccharomyces cerevisiae* (Oura, 1977).

Reduktivna moč NADH, ki nastane pri glikolizi, se mora transformirati v končni akceptor elektronov, ki regenerira  $\text{NAD}^+$ . Pri alkoholni fermentaciji to ni piruvat, ampak acetaldehid, produkt dekarboksilacije piruvata, ki deluje kot končni akceptorji elektronov. Za razliko od glikolize vsebuje alkoholna fermentacija dve dodatni encimski reakciji. Pri prvi reakciji, katalizirani s piruvat dekarboksilazo, se dekarboksilira piruvična kislina. Pri drugi reakciji pa se acetaldehid reducira v etanol z NADH. To reakcijo katalizira alkohol dehidrogenaza, katere aktivna stran vsebuje  $\text{Zn}^{2+}$  ion (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).



Pri tej reakciji nastaja glicerol-3-fosfat. S pomočjo fosfataze se ob poteku hidrolize iz glicerol-3-fosfata izloči fosforna kislina. Končni produkt reakcije pa je glicerol, glavni predstavnik sekundarnih produktov alkoholne fermentacije. Glicerol nastaja v začetku procesa fermentacije, preden nastanejo večje količine acetaldehida, pravzaprav v fazi nastanka piruvične kisline. S pojavom acetaldehida se vodik porablja za njegovo redukcijo in ne za redukcijo gliceraldehid-3-fosfata in nastanek glicerola (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a,b).

## 2.3.4 Fermentacija grozdnega mošta

Fermentacija grozdnega mošta je anaerobni proces presnove, ki daje energijo v obliki ATP. Pri tem nastajajo produkti alkoholne fermentacije, npr, mlečna kislina in etanol. Mikroorganizmi lahko izkoriščajo ATP, ki je nastal z vrenjem, za rast in razmnoževanje (Karlson, 1980).

Pri anaerobni razgradnji ogljikovih hidratov do piruvata v celici kvasovk, potekajo iste reakcije kot pri glikolizi. V tem procesu sodeluje isti encimski sistem, kot pri glikolizi, ki je sestavljen iz 13 glavnih in večjega števila drugih encimov, ki katalizirajo anaerobno razgradnjo ogljikovih hidratov do končnega produkta etanola. V procesu alkoholne fermentacije se pojavi piruvat kot centralni intermediat (Karlson, 1980).

Piruvat se s pomočjo dekarboksilacije in redukcije ob prisotnosti encima alkohol dehidrogenaze pretvori v etanol. V prvi fazi reakcije piruvat ob prisotnosti encima piruvat dekarboksilaze, ki ima koencim TPP in aktivator  $Mg^{2+}$ , prehaja v acetaldehid, pri čemer se sprošča 1 mol  $CO_2$ . To je oksidativna dekarboksilacija (Karlson, 1980).

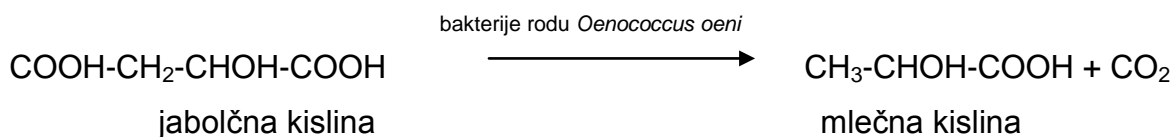
Produkt, acetaldehid, se ne prenese na lipoamidno skupino, ampak se odcepi. Alkohol dehidrogenaza z NADH reducira acetaldehid v etanol. S to reakcijo se NADH ponovno oksidira v  $NAD^+$ . S tem je zaključen proces alkoholne fermentacije. Energijska bilanca vrenja sta 2 molekuli ATP za eno molekulo glukoze (Karlson, 1980).

Pred nastankom acetaldehida, opravlja vlogo akceptorja vodika dihidroksiaceton fosfat. Pri tej reakciji nastaja glicerol-3-fosfat. S pomočjo fosfataze se ob poteku hidrolize iz glicerol-3-fosfata izloči fosforna kislina. Končni produkt reakcije je glicerol, ki je glavni predstavnik sekundarnih produktov alkoholne fermentacije. Glicerol nastaja v začetku procesa fermentacije, preden nastanejo večje količine acetaldehida, pravzaprav v fazi nastanka piruvične kisline (Karlson, 1980).

### 2.3.4.1 Zmanjšanje kislin in jabolčno-mlečnokislinska fermentacija

Med potekom fermentacije prihaja do sprememb v koncentraciji kislin v moštu. Zaradi tvorbe etanola se slabša topnost vinske kisline, ki se začne izločati v obliki kalijevih in kalcijevih soli. Izločanje vinske kisline je močno odvisno od temperature fermentacije, površinske obdelave fermentorskih posod ter interference kristalizacije s polisaharidi in drugimi koloidnimi spojinami. Mlečnokislinske bakterije dodatno prispevajo k zmanjšanju kislin v mediju. V mladih vinih jabolčno kislino pretvarjajo v mlečno kislino in ogljikov dioksid. Proces biološkega razkisa ima pomembno pozitivno vlogo pri izoblikovanju arome vina. Mlečnokislinske bakterije pretvorijo jabolčno kislino v piruvično kislino z encimi malat

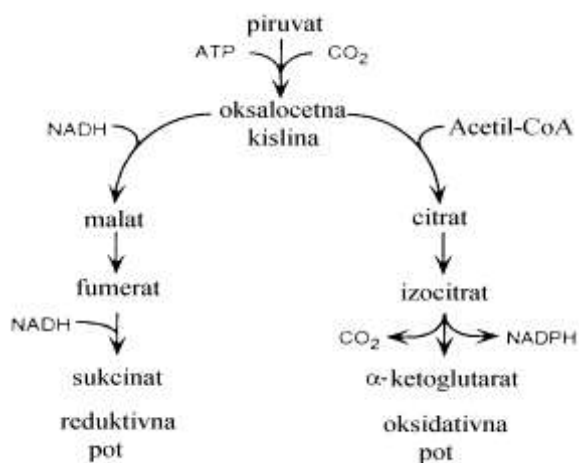
dehidrogenazami. Nadalje piruvično kislino z encimi mlečnokislinskimi dehidrogenazami reducirajo v mlečno kislino (Judež,1981).



### 2.3.4.2 Sekundarni produkti glicerol-piruvične fermentacije

Poleg glicerola, kot enega najpomembnejših sekundarnih produktov alkoholne fermentacije, nastajajo tudi drugi sekundarni produkti: očetna in jantarna kislina ter 2,3-butandiol. Vsi ti produkti nastajajo v procesu alkoholne fermentacije iz dela acetaldehida, preden se metabolizira v etanol. Na začetku procesa, takoj po dekarboksilaciji piruvične kisline, se nastali acetaldehid ne reducira takoj v alkohol, ampak se porablja za nastanek sekundarnih produktov (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).

Kadar nastane glicerol iz molekule piruvata, se ta ne more transformirati v etanol. V anaerobnih razmerah je oksalacetat oblika, v kateri vstopa piruvat v cikel trikarboksilnih kislin, ki poteka v citosolu. Piruvat karboksilaza katalizira nadaljno karboksilacijo piruvata v oksalacetat. V anaerobnih razmerah se cikel trikarboksilnih kislin ne more popolnoma zaključiti, ker je za aktivnost encima sukcinat dehidrogenaza potrebna prisotnost FAD, ki je striktno respiratorni koencim. Veriga reakcij je tako prekinjena pri sukcinatu, ki se tako akumulira (0,5-1,5 g/L). NADH, ki nastaja od oksalacetata do sukcinata v tem delu Krebsovega cikla, se reoksidira z nastankom glicerola iz dihidroksiacetona (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).



**Slika 4:** Shematični prikaz sinteze jantarne in  $\alpha$ -ketogluterjeve kisline (Boulton in sod., 1996)

Ker ima  $\alpha$ -ketoglutarat dehidrogenaza zelo nizko aktivnost v anaerobnih razmerah, se oksidativne reakcije Krebsovega cikla prekinejo pri  $\alpha$ -ketoglutaratu. Reduktivna pot cikla trikarboksilnih kislin vodi do nastanka jantarne kisline (Slika 4) (Boulton in sod., 1996).

Pri kvasovkah je to najbrž glavna metabolna pot, ker lahko le oksidativna pot Krebsovega cikla skrbi za vzdrževanje redoks ravnotežja  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  med fermentacijo (Oura, 1977).

Izmed sekundarnih produktov so pomembne ketonske spojine (piruvična kislina,  $\alpha$ -ketoglutarjeva kislina) in acetaldehid. Njihovo izločanje je največje med fazo bujne rasti kvasovk in začne padati proti koncu fermentacije. Acetaldehid se sprošča v prisotnosti prekomernih količin žveplovega dioksida v moštu. Zvišana pH in fermentacijska temperatura, anaerobne razmere ter pomanjkanje vitaminov (tiamina in pantotenske kisline) povečajo produkcijo ketonskih kislin. Dodajanje tiamina v mošt omejuje akumulacijo ketonskih spojin v vinu (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a,b).

Drugi sekundarni produkti fermentacije, ki prav tako izhajajo iz piruvične kisline, so: očetna kislina, mlečna kislina, 2,3-butandiol, diacetil in acetoin (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a,b).

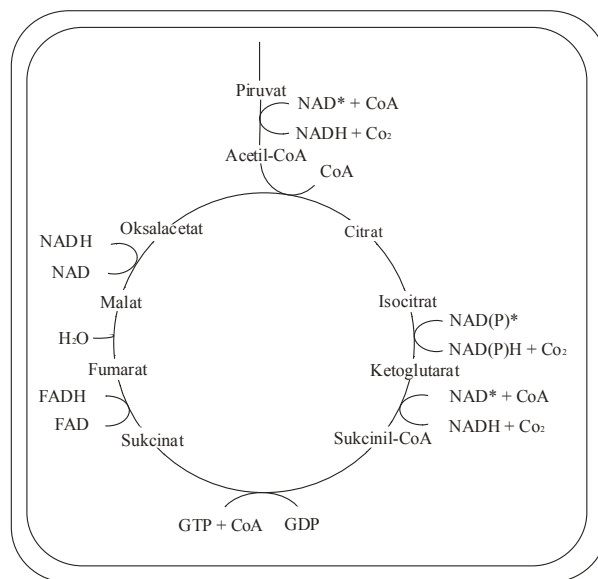
### 2.3.5 Cikel trikarboksilnih kislin – TCA cikel

Cikel trikarboksilnih kislin ali TCA cikel (Krebsov cikel) igra pomembno vlogo v oksidativni rasti in metabolizmu kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Ta presnovna pot zagotavlja reduktivne ekvivalente, ki se porabljajo v dihalni verigi, kjer nastaja energija v obliki ATP. Prav tako ima TCA cikel pomembno vlogo v procesih biosinteze, posebej v tistih, kjer nastajajo aminokisline. Manjšo vlogo ima TCA cikel v centralnem, anaerobnem metabolizmu, natančneje pri tvorbi energije med anaerobno fermentacijo (Camarasa in sod., 2003).

Tradicionalno je cikel trikarboksilnih kislin (TCA cikel) označen kot katabolna metabolna pot, zaradi svoje vloge pri aerobnih procesih, pri katerih poteka popolna oksidacija piruvata do  $\text{CO}_2$ , z vzporedno tvorbo energije ATP. V TCA ciklu nastajajo tudi prekursorji za biosinteze in pri anaerobnih razmerah je to edina funkcija TCA cikla. Iz tega sledi, da TCA cikel lahko okarakteriziramo kot anabolno pot. Anabolne reakcije so odgovorne za nastanek biomase (Schulze, 1995).

V mnogih raziskavah je bilo ugotovljeno, da se vsi encimi TCA cikla nahajajo in delujejo v mitohondrijih, torej pod anaerobnimi razmerami (Wales, 1980). Piruvat se v mitohondrije transportira z nosilcem, temu sledi v reakciji, katalizirani s piruvat dehidrogenazo (PHD) konverzija v acetil-CoA. Nastali acetil-CoA vstopa v TCA cikel s kondenzacijo z oksalacetatom. Z vidika mikrobne fiziologije lahko TCA cikel opišemo z dvema ireverzibilnima reakcijama:

- kondenzacijo acetil-CoA in oksalacetata v citrat;
- dekarboksilacijo in oksidacijo  $\alpha$ -ketoglutarata v sukcinil-CoA



**Slika 5:** Shematski prikaz TCA cikla ali Krebsovega cikla (Schulze, 1995)

### 2.3.6 Regulacija metabolnih poti presnove sladkorjev

Kvasovke lahko razvrstimo v različne skupine glede na to, ali energijo proizvajajo s pomočjo aerobnih ali anaerobnih procesov. Pomembno je, da so procesi večinoma regulirani z vplivom zunanjih dejavnikov, od katerih sta najpomembnejša razpoložljivost glukoze in kisika. Kvasovke se lahko prilagodijo različnim ravninam, tudi znotraj ene vrste. Tako lahko, glede na razmere iz okolice, same prilagajajo metabolno pot, po kateri razgrajuje glukozo. Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* lahko glukozo, odvisno od prisotnosti kisika in izvora ogljika, porabljajo na več različnih načinov.

#### 2.3.6.1 Regulacija med fermentacijo in nastajanjem biomase: Pasteurjev in Crabtree efekt

Pasteur je podal primerjavo med aerobno in anaerobno rastjo kvasovk. Pri majhnih koncentracijah glukoze v mediju, kvasovke koristno porabljajo sladkor z nastajanjem biomase in s fermentacijo. Prezračevanje povzroča naraščanje nastale biomase in zmanjšanje količine nastalega etanola in porabe sladkorja. Pasteur je tako sklepal, da proces dihanja zavira alkoholno fermentacijo. Pasteurjev efekt je bil razložen na več načinov. Eden od njih razlaga, da gre za tekmovanje dveh encimov, ki katalizirata ali aerobni ali anaerobni proces presnove piruvata. Piruvat dekarboksilaza, ki je vključena v fermentativno pot, ima manjšo afiniteto do piruvata kot piruvat dehidrogenaza. Pasteurjev efekt razlaga inhibicijo glikoliznih encimov z ATP (Schulze, 1995).

ATP, ki nastaja pri oksidativni fosforilaciji, zavira posebej fosfofrukto kinazo. Kot posledica tega se nabira fosforilirana heksoza. Membranski transport sladkorjev tako upočasnjuje glikolizo (Slika 3 - glikoliza). Pri velikih koncentracijah glukoze pa kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* presnavljajo sladkorje le po fermentativni poti. Tudi v prisotnosti

kisika je respiracija nemogoča. Ta fenomen je raziskal Crabtree in ga imenujemo tudi katabolna represija z glukozo, Pasteurjevemu nasprotni efekt ali Crabtree efekt. Kvasovke jasno kažejo ta efekt z naslednjimi znaki: degeneracija mitohondrijev, padec razmerja celičnih sterolov in maščobnih kislin in preprečitev obeh sintez Krebsovega cikla mitohondrijskih encimov in sestavnih delov dihalne verige. Z 9 g sladkorja na liter dosežemo Crabtree efekt pri kvasovkah vrste *Saccharomyces cerevisiae*.

V grozdnem moštu so kvasovke pri kateri koli koncentraciji prisotnega kisika sposobne le fermentirati velike koncentracije glukoze in fruktoze (Schulze, 1995).

### **2.3.6.2 Regulacija med alkoholno in glicerol-piruvično fermentacijo: nastajanje glicerola**

Vina vsebujejo približno 8 g glicerola na 100 g etanola. Med fermentacijo mošta se pretvori približno 8 % sladkorjev v glicerol-piruvični fermentaciji in 92 % alkoholni fermentaciji. Med fermentacijo prvih 100 g sladkorjev nastaja večina glicerola, nato se tvorba glicerola upočasni. Alkoholna in glicerol-piruvična fermentacija tako potekata ves čas vzporedno (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).

Piruvična kislina nastaja pri glikolizi. Če se ta molekula nadalje ne porabi pri alkoholni fermentaciji, sodeluje pri nastanku sekundarnih produktov fermentacije. V tem primeru nastaja molekula glicerola z redukcijo dihidroksiacetona. Nastajanje glicerola tako drži v ravnotežju kvasni endocelularni oksidacijsko-redukcijski potencial ali  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ravnotežje. Ta *varnostni ventil* preprečuje presežek NADH, ki se pojavlja ob koncu sinteze aminokislin in proteinov (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).

Glicerol je kvantitativno najpomembnejši sekundarni produkt alkoholne fermentacije. Nastaja iz dihidroksiaceton fosfata, ki se reducira v glicerol-3-fosfat s pomočjo glicerol-3-fosfat dehidrogenaze (GPDH). Glicerol-3-fosfat se nato spremeni v glicerol s pomočjo specifičnih fosfataz. Nastanek glicerola igra pomembno vlogo pri vzpostavljanju notranjega celičnega redoks ravnotežja  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  in osmotskega tlaka (Hohmann, 1997).

### **2.3.7 Odziv kvasnih celic na stres**

Alkoholna fermentacija je dinamični proces, med katerim je sadni sok podvržen nenehnim spremembam, ki so odvisne od zunanjih fizikalnih faktorjev in biološke aktivnosti mikroorganizmov, ki sodelujejo v fermentaciji. Ker se okolica in s tem razmere okolice nenehno spreminjajo, mora organizem znotraj celice vzdrževati fizikalne in kemijske parametre znotraj meja, da bi tako dosegel optimalne razmere za metabolno aktivnost. Kot enocelični organizem, so kvasne celice direktno izpostavljene faktorjem iz okolja. Enocelični organizmi so tako razvili vrsto mehanizmov, ki omogočajo zaznavanje zunanjih sprememb, ki prihajajo iz okolja in hitro adaptiranje na te spremembe, s tem da ohranjajo integriteto celice

in metabolnih aktivnosti. Ekstremne razmere ali neuspela adaptacija kvasnih celic na te razmere, vodijo v smrt celice ali pa v zmanjšanje rasti, odvisno od razmer (Hohmann, 1997).

Razen reakcije na temperaturne spremembe, so za spremembe redoks ravnotežja odgovorni še drugi parametri, ki zahtevajo specifično adaptacijo mikroorganizma, ki zagotavlja celično rast in preživetje (Hohmann, 1997):

- oksido-reduktivno okolje,
- razpoložljivost hranil v mediju,
- osmotski tlak,
- pH rastnega substrata,
- prisotnost večjih koncentracij za rast zavirajočih ali toksičnih snovi, kot sta etanol ali soli,
- vpliv nastalega CO<sub>2</sub>,
- vpliv svetlobe.

Naravna biološka odstopanja in odpornost vinskih kvasovk proti stresnim razmeram sta še posebej pomembna dejavnika v vinarstvu. Upočasnjena ali celo prekinjena fermentacija ali nastajanje neželenih arom, so fenomeni, ki so pogosto povezani z nezmožnostjo odziva in adaptacije kvasovk na neželene stresne razmere za rast (Bisson, 1999).

Kvasovke so sposobne, da se hitro in učinkovito odzovejo na spremembe v svojem okolju. Tako celice zagotavljajo optimalno rast pri najljubših razmerah in preživetje pri neugodnih okoliščinah, ki jih ogrožajo. Ko so celice izpostavljene zunanjim spremembam tlaka se skrčijo in kot posledica padca osmotskega tlaka, celice tvorijo več glicerola in ga akumulirajo (Siderius, 2000).

Celice kvasovk se odzovejo na stres tako, da povečajo produkcijo in intracelularno akumulacijo glicerola za izenačenje osmotskega tlaka (Bely, 2007).

### **2.3.7.1 Možnosti izboljšave delovnega organizma**

Izboljšava delovnega organizma vključuje fenotipske spremembe, kot so povečana produkcija zelenih metabolitov, odstranitev neželenih metabolitov ali sprememba celične morfologije, ki omogoči lažjo ločitev organizma od produkta (Queener in sod., 1986).

Z izjemo živilske industrije zelo malo komercialnih procesov uporablja divje tipe sevov, izoliranih neposredno iz narave. Uporabljajo mutante, ki so prilagojeni na specifičen proces. Ena od glavnih motivacij za razvoj industrijskih sevov je ekonomika, kajti donos ciljnih produktov pri divjih tipih je prenizek za komercialno biosintezo. Obsežen program razvoja mutantnih sevov lahko traja tudi več let, donosi pa se lahko povečajo tudi za 100 in več krat.

Uspešnost programa je odvisna od delovnega seva, procesa in narave ciljnega produkta, ki jo pridobivamo (Crueger in sod., 1990).

Za stroškovno upravičen proces so potrebni sevi z izboljšanimi bioprocenimi lastnostmi. Odvisno od sistema so zaželeni sevi, ki imajo krajši čas rasti, ne tvorijo neželenih barvil in drugih stranskih produktov, imajo zmanjšane potrebe po kisiku ali lahko uporabljajo cenejše substrate (Queener in sod., 1986)

Naravni izolati pogosto tvorijo mešanico kemijsko podobnih spojin, praviloma pa želimo mutante, ki tvorijo le eno spojino (Crueger in sod., 1990).

### ***Povečanje produkcije sekundarnih metabolitov***

Bioaktivne molekule so močno oksidirane in gledano z metabolnega stališča zelo energetsko potratne molekule, zato jih izolati iz narave tvorijo v majhnih količinah (Prosser in sod., 1991).

- Produkcijo sekundarnih metabolitov nadzira pet različnih skupin genov (Crueger in sod., 1990):
  - Strukturni geni-kodirajo encime za biosintezo sekundarnih metabolitov.
  - Regulatorni geni-sekundarnega metabolizma.
  - Geni za odpornost-dajejo odpornost proizvajalcem antibiotikov na lastne metabolite.
  - Geni za permeabilnost-nadzorujejo privzem in izločanje spojin.
  - Regulatorni geni-primarnega metabolizma in tako posredno tudi sekundarnega.
  
- Spremembe v metabolizmu, ki lahko povzročijo povečanje donosa sekundarnega metabolita (Döhren in sod., 1997; Oksman-Caldentey in sod., 2004):
  - Eliminacija ozkih grl pri sintezi prekurzorjev oziroma gradbenih elementov, kateri tvorijo sekundarni metabolit.
  
- Odprava negativne katabolične regulacije (Baltz in sod., 1996)
  - Dvignjena odpornost organizma na lasten ciljni metabolit.
  - Odsotnost negativne povratne regulacije (angl. *feed-back regulation*) sekundarnih metabolitov na lastno sintezo.
  - Povečano izražanje biosinteznih genov vključenih v pot.
  - Zmanjšan katabolizem (razgradnja) ciljne spojine.
  - Zmanjšan pretok metabolitov skozi biosintezne poti, ki jih lahko naš ciljni metabolit deli z ostalimi sekundarnimi metaboliti.
  - Povečana prepustnost membrane za prekurzorje želenega produkta.

Obstaja več osnovnih genskih pristopov za izboljšanje donosa ciljnega produkta pri biosinteznih postopkih, kot so npr. mutageneza, rekombinacija in kloniranje (Baltz, 1986a). Selekcije mutageneze in genske rekombinacije so znane in uporabne metode za izboljšanje produkcije sekundarnih metabolitov pri aktinomicetah. Vendar ne dajo informacij o genih, ki so pomembni za visoko produkcijo sekundarnih metabolitov. Gre za naključne mutacije, ki jih navadno ni mogoče definirati (locirati) (Baltz in sod., 1996).

### ***Stresne razmere in odziv mikroorganizmov***

Stres povzroči vsak odmik od optimalnih razmer (npr. fizikalni, kemijski, biološki), ki vplivajo na rast in preživetje celic. Blag, t.i. subletalni stres ne povzroči izgube živosti celic, a lahko vpliva na njihovo fiziologijo, kar se odrazi v rasti celic. Zmerni stres zmanjša rast in tudi živost celic. Močan, t.i. letalni stres pa povzroči nepopravljive poškodbe celice ter smrt večine mikrobne populacije (Vorob'eva, 2004; Youself in sod., 2003).

### ***Definicija in mehanizem splošnega stresnega odziva***

Preživetje organizmov v naravi je odvisno od njihove sposobnosti zaznavanja in ustreznega odzivanja na spremembe okolja. Pri izpostavitvi celic potencialno škodljivim kemičnim in fizikalnim vplivom okolja se sprožijo molekularni mehanizmi stresnega odziva, ki poleg zaščite in popravila že nastalih molekularnih poškodb pridobijo večjo odpornost celic proti novim stresnim razmeram (Abee in sod., 1999). Celica se dinamično prilagodi preko izražanja genov, vključenih v obrambni mehanizem, sinteze novih proteinov in spremembe encimske aktivnosti. Spremembe se odrazijo v prilagoditvi celičnega metabolizma, vzdrževanju homeostaze, zmanjšanju reprodukcije, zmanjšanju vsebnosti nukleinskih kislin (RNA, DNA), spremembah celične velikosti oz. prehodu v odpornejše fiziološke oblike (Youself in sod., 2003).

Specifični stresni odgovor se sproži pri izpostavitvi celice določenim in že znanim stresnim razmeram ter vključuje npr. odziv na toplotni, hladni, kislinski, ozmotski stres; stradanje; prisotnost reaktivnih kisikovih zvrsti, metalov, ionov, poškodbe DNA. Prilagoditev na spremembe okolja, s katerimi celica še ni bila seznanjena (t.i. navzkrižna prilagoditev), sproži splošni stresni odgovor celice preko signalne transdukcije, induciranih mutacij, prehoda v odpornejše oblike, pridobljene odpornosti proti antibiotikom, prehoda v stacionarno fazo, itd. Vedno pomembnejši oz. bolje poznan postaja odziv celic na nivoju mikrobne populacije, kot so celično signaliziranje, nastanek biofilmov in programirana celična smrt (Hohnson in sod., 2003).

## **Toplotni stres**

- Tarčne snovi in mehanizem celičnega odziva

V celici je veliko toplotno občutljivih snovi, med katerimi so najpomembnejši ribosomi, nukleinske kisline, citoplazemski in membranski proteini. Ribosomi lahko pri povišani temperaturi zaradi koagulacije beljakovinskih podenot izgubijo specifično sekundarno in terciarno strukturo. Visoke temperature povzročijo povečano občutljivost nukleinskih kislin ter vplivajo na tekočnost membrane ter membranskih proteinov. Glavni vzrok celične smrti po izpostavitvi visokim temperaturam še ni povsem pojasnjen (Abee in sod., 1999).

Visoka temperatura sproži mehanizme celičnega prilagajanja, kar vodi v univerzalno obrambo funkcij in homeostaze, čeprav se posamezne komponente zaznavanja in odzivanja preko signalne transdukcije razlikujejo celo v isti vrsti bakterij. Odziv na toplotni stres vključuje indukcijo specifičnega seta genov, ki kodirajo proteine toplotnega stresa (angl. *heat shock protein*, HSP) (Abee in sod., 1999).

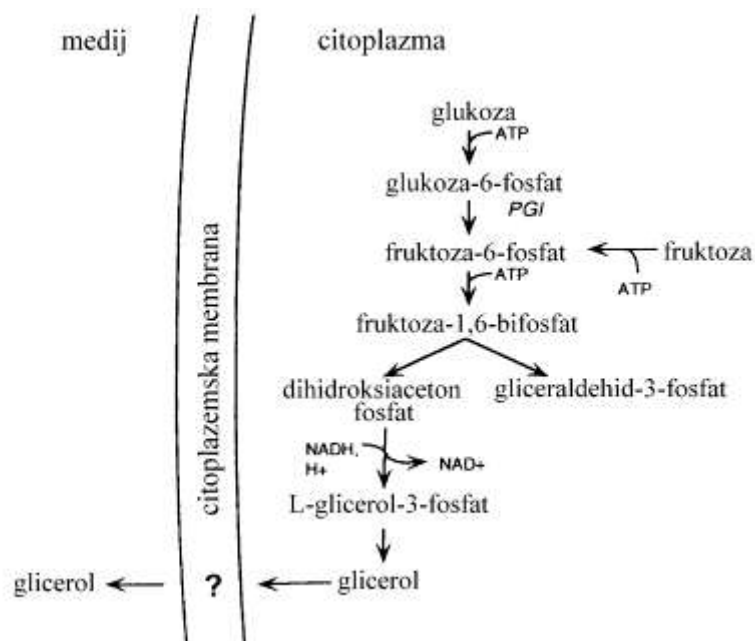
### **2.3.8 Pomen glicerola v tehnologiji pridelave vin in faktorji, ki vplivajo na povečanje tvorbe glicerola**

Glicerol je sladek alkohol, ki nastaja kot stranski produkt fermentacije, s kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae*. V vinu se koncentracija giblje v mejah od 1 do 15 g/L (Scanes in sod., 1998; Remize in sod., 1999). Vinu daje poln, prijeten in harmoničen okus. Obsežnejše študije so pokazale, da se odvisno od seva kvasovk, medija in procesnih razmer, 4-10 % razpoložljivih sladkorjev spremeni v glicerol (Radler in Schütz, 1982), kar predstavlja 7 do 10 % nastalega etanola (Ciani in Ferraro, 1996). Večje koncentracije vplivajo na viskoznost in gladkost vina. Visoka specifična gostota in viskoznost prispevata k polnosti, mehkoobi in kompleksnosti vina (Boulton in sod., 1996).

V fizioloških procesih, ki se odvijajo v kvasovkah vrste *Saccharomyces cerevisiae*, igra glicerol pomembno vlogo. S tvorbo glicerola kvasovke kompenzirajo osmotski tlak, nadzirajo raven fosfata v citosolu in vzdržujejo  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  redoks ravnotežje (Hohmann, 1997).

Usmerjene fermentacije s *Saccharomices cerevisiae* v smeri produkcije večjih količin glicerola so še posebej zanimive za industrijo hrane in pijač (Pretorius in Van der Westhuizen, 1991). To lahko dosežemo z genetskimi manipulacijami kvasovk ali pa s kontrolo zunanjih razmer.

Optimalna temperatura za največjo proizvodnjo glicerola s komercialnimi sevi kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* se giblje med 22-32 °C (Scanes, 1998).



**Slika 6:** Shematični prikaz produkcije glicerola (Boulton in sod., 1996)

Temperatura procesa fermentacije je eden izmed najbolj učinkovitih parametrov, ki vplivajo na proces biosinteze glicerola v vinih. Temperatura je tisti dejavnik, s katerim v procesnem inženirstvu v vinarstvu lahko najbolj učinkovito vodimo ali kontroliramo proces alkoholne fermentacije grozdnega mošta v vino (Torija in sod., 2003).

Povečana produkcija glicerola je primerna za izboljšanje kakovosti vin. Pozitivno pri tem je, da višja produkcija glicerola ni v povezavi z višjo produkcijo acetaldehida, ki v vinih ni zaželen (Remize, 1999).

V tehnologiji pridelave vrhunskih vin predstavlja glicerol eno izmed najbolj pomembnih nehlapnih spojin, ki prispevajo k mehkoobi, polnosti in sladkosti vin. Povečana produkcija glicerola ugodno vpliva tudi na senzorične lastnosti vina (Scanes in sod., 1998). Med parametre, ki pospešujejo povišanje biosinteze glicerola med alkoholno fermentacijo, prištevajo tudi značilnosti izbranega seva kvasovk in mešanje (Radler in Schütz, 1982). Rezultati raziskav so pokazali, da s postopnim povišanjem temperature, počasi narašča vsebnost glicerola v nastajajočem vinu (Ough in sod., 1972; Rankine in Bridson, 1971).

Različne študije so pokazale, da počasno zviševanje temperature vpliva na tvorbo glicerola (Ough, 1972; Torija in sod., 2003). Prav tako so ugotovili, da na izločanje glicerola vpliva tudi mešanje (Radler in Schütz, 1982) ter izbrani sev kvasovk. Produkcija glicerola v alkoholnih fermentacijah pravzaprav predstavlja aktivnost mikroorganizma, s katero razpolaga mikroorganizem pri vzpostavljanju osmotske stabilnosti kvasovk in vzpostavitve redoks ravnotežja (Hohmann, 1998), kjer predstavlja glikoliza nevtralno redoks komponento,

predstavlja povečana produkcija kvasne biomase, s spremljajočo produkcijo NADH, povišano produkcijo glicerola. Znano je, da so različne vrste mikroorganizmov sposobne pri različnih stresnih razmerah producirati glicerol, kot substanco pomembno za izravnavo redoks ravnotežja. Regulacija redoks ravnotežja med alkoholno fermentacijo s *Saccharomyces cerevisiae*, poteka preko glicerol-3-fosfat dehidrogenaze (NAD<sup>+</sup>) (André, 1991).

V skladu z Arrheniusovo enačbo, vpliva povišanje temperature fermentacije v eksponentalni fazi rasti kvasovk na hitrejši potek biosinteze etanola, sočasno pa tudi na biosintezo glicerola. Količina glicerola, ki ob tem nastaja, je odvisna od konstantne fermentacijske temperature. Če v eksponentalni fazi rasti pride do nenadnega večjega povišanja fermentacijske temperature ali temperaturnega šoka, mikroorganizem izpade iz svojega redoks ravnotežja in začne, za izravnavanje ravnotežja novonastale redoks situacije, ob tem intenzivno producirati glicerol kot sredstvo za vzpostavitev novonastalega ravnotežja. Na ta način se prilagodi novemu okolju (Hemming, 1991). Če pa pride ponovno do namenskega temperaturnega šoka, mikroorganizem ponovno reagira na enak način, s produkcijo glicerola, ki pa ni več tako intenzivna kot v prvem primeru (Kukec, 2002).

NAD<sup>+</sup>, ki se prvotno porablja med Embden-Meyerhoff-Parnasovo (EMP) metabolno potjo, se regenerira, medtem ko nastaja etanol. Kadar intermediati v EMP metabolni poti nastopijo kot prekursorji za sinteze celičnega materiala, je ta bilanca motena, ker se presežek nastalega NADH ne more spremeniti nazaj v NAD<sup>+</sup>. To povzroča zaustavitev metabolizma, v primeru, ko ne nastopi regeneracija NAD<sup>+</sup>. Med anaerobno rastjo se NADH ne more oksidirati s kisikom, ampak to poteče z vzporednim nastankom reduciranih stranskih produktov, kot je glicerol v primeru *Saccharomyces cerevisiae* (Oura, 1977). Glicerol nastaja z redukcijo dihidroksiacetofosfata v glicerol-3-fosfat. Ta reakcija je katalizirana z NAD<sup>+</sup>-odvisno glicerol-3-fosfat dehidrogenazo (Costenoble, 2000).

Glicerol je analog trehalozi in tako deluje kot osmotska zaščita mikroorganizma pred različnimi osmotskimi šoki. V kvasnem metabolizmu igra glicerol pomembno vlogo, posebej v medijih z nizkim osmotskim potencialom in pri anaerobnih razmerah. V anaerobnih razmerah nastaja glicerol zaradi reoksidacije NADH, ki je nastal v procesu anabolizma in med sintezo nekaterih organskih kislin (Nevoight, 1997).

Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* tvorijo glicerol kot osmoregulator, s katerim regulira spremembo redoks potenciala pri zelo majhnih razpoložljivih koncentracijah kisika (Costenoble, 2000).

Znano je tudi, da kadar so kvasovke izpostavljene različnim šokom iz okolja ali veliki koncentraciji sladkorja v okoliškem mediju, proizvajajo večje količine glicerola. Aktivnost encima glicerol-3-fosfat dehidrogenaze (GPDH), izpostavljenega temperaturnemu šoku,

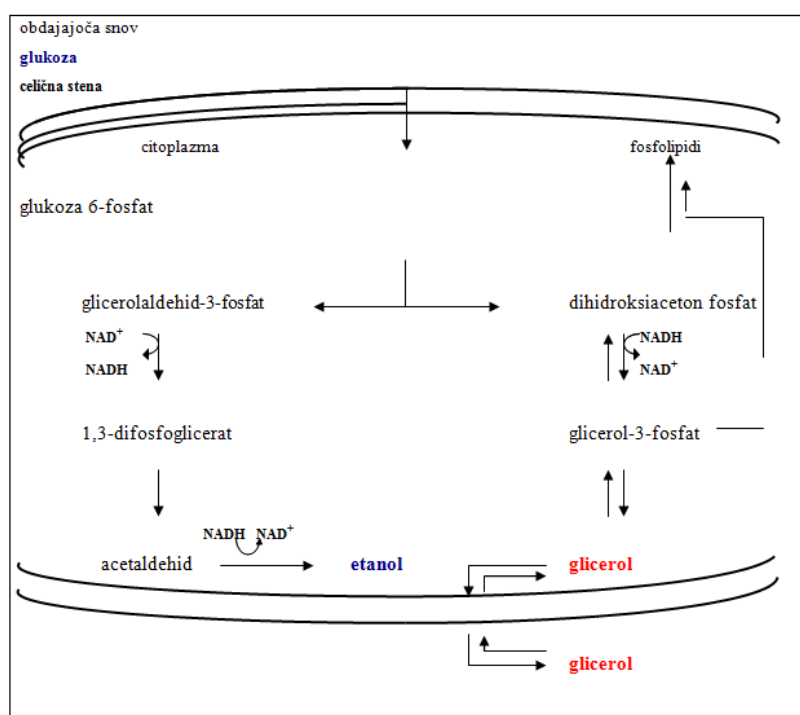
naraste za 1,15- do 1,25-krat, v primerjavi z aktivnostjo encima, ki ni bil izpostavljen temperaturnemu šoku (Omori, 1996).

Dodatek žveplovega dioksida povečuje koncentracijo nastalega glicerola, ker disulfid veže acetaldehid, ki potem ni na voljo, da bi odstranjeval NADH za produkcijo etanola. Presežek NADH se zato oksidira vzporedno z redukcijo dihidroksiacetonfosfata v glicerol-3-fosfat in se potem defosforilira v glicerol (Rankine, 1971; Ough, 1972).

Akumulacija glavnega stranskega produkta fermentacije - glicerola ima izvor v potrebi, da obdrži ugodno redoks ravnotežje in prav tako njegovo funkcijo kot osmoregulator (Jackson, 2008).

### 2.3.9 Metabolizem glicerola v kvasnih celicah

Glicerol nastaja v citosolu kvasne celice. Glukoza se fosforilira takoj, ko vstopi v celico in se nato spreminja po normalnih stopnjah glikolize do dihidroksiaceton fosfata in gliceraldehid-3-fosfata v ekvimolarnih količinah. Večina dihidroksiaceton fosfata se nato spremeni v glicerolaldehid-3-fosfat z interkonvertnim encimom triozafosfat izomerazo. Ta encim ima večjo afiniteto do dihidroksiaceton fosfata, kot pa do gliceraldehid-3-fosfata. Etanol nastane iz gliceraldehid-3-fosfata preko piruvata in v tem procesu se NADH reducira v NAD<sup>+</sup>. Dihidroksiaceton fosfat se spremeni v glicerol v dvostopenjski reakciji, ob sodelovanju NADH-odvisne glicerol-3-fosfat dehidrogenaze in fosfataze (Scanes, 1998).



**Slika 7:** Reakcije glicerolnega metabolizma kvasovke *S. cerevisiae* (Scanes, 1998)

Sinteza glicerola in njegovo kopičenje sta namenjeni zaščiti celic kvasovk pred poškodbami, ki jih povzročajo toplotni in osmotski stres (Ding in sod., 2009).

Kvasovke morajo biti odporne proti različnim stresom (predvsem osmotski in etanolni), da lahko zaključijo fermentacijo (Carraso, 2001).

### **2.3.10 Glavne značilnosti alkoholne fermentacije**

Pri alkoholni fermentaciji se zaradi nastajajočega CO<sub>2</sub> prostornina mošta poveča, zato sod, v katerem poteka vrenje, ne smemo nikdar napolniti do roba. Vedno pustimo za približno za eno desetino praznega prostora, da je vrenje nemoteno. Vrelni plini, ki izhajajo ob vrenju, povečujejo tlak v moštu. Slednje najlažje opazimo, če se spozabimo in sod zapremo. Sod, zaradi povečevanja notranjega tlaka preko kritične mase, dobesedno raznese. Ob vrenju nastane iz 1 kg sladkorja 249 L plina. Izstopni plin fermentacije je težji od zraka in se nabira pri tleh, zato je zelo važno, da se iz kleti odvaja s prezračevanjem. Mošt med vrenjem spremeni intenziteto barve in postane močno moten. Količina sladkorjev se med vrenjem zmanjšuje, tvori se alkohol, spreminja se okus in aroma mošta-sladek, sortno značilen. Najbolj očitna sprememba se dogaja v relativni gostoti mošta. Pred alkoholnim vrenjem ima mošt pri 20 °C relativno gostoto od 1,06 do 1,10, odvisno od vsebnosti sladkorjev. Po alkoholnem vrenju se relativna gostota mošta spremeni - pade pod 1,00 (Šikovec, 1993).

Temperatura mošta se med vrenjem zelo poveča. Vinogradnikom svetujejo vrenje pri nižji temperaturi, predvsem pri pridelavi belih vin, pod 15 °C. Pri pridelavi rdečih vin je povišana temperatura med alkoholnim vrenjem zelo priporočljiva, saj se zaradi višje temperature barvila in fenoli lažje in hitreje ekstrahirajo. Po novem pa tudi pri rdečih vinih svetujejo nekoliko nižjo vrelni temperaturo. Prednosti vrenja pri nižjih temperaturah so velike. Mošti ne povrevajo burno, vina so bolj sveža, ker ostane v njih več topnega ogljikovega dioksida, ohranijo se aromatične snovi, zmanjšanje koncentracije kislin med vrenjem je manjše, vina so bolj polna (Šikovec, 1993).

Med vrenjem se zmanjša vsebnost kislin, predvsem na račun izločanja vinske kisline v obliki vinskega kamna.

Alkoholno vrenje je sprva počasno, nato preide v burno, zatem se umiri in preide v tiho vrenje. Čas od začetka vrenja do burnega vrenja ali eksponencialne faze rasti mora biti čim krajši, traja lahko več dni. Burno vrenje traja od šest do deset dni, včasih več, tiho vrenje ali stacionarna faza rasti pa lahko traja tudi cel mesec, odvisno od vrelni temperature vrenja in sladkorne stopnje (Šikovec, 1993).

### 2.3.11 Vpliv temperaturnega šoka na potek fermentacije

Med najpomembnejšimi procesnimi parametri, ki vplivajo na potek fermentacije in kakovost končnega produkta, so temperatura, koncentracija sladkorjev, parcialni tlak raztopljenega kisika in CO<sub>2</sub> ter mešanje. Pri razgradnji reducirajočih sladkorjev v procesu metabolizma vinskih kvasovk nastajajo številni metabolni produkti kot so etanol, višji alkoholi in trikarboksilne kisline TCA cikla. Njihova prisotnost vpliva na kakovost vina, njihov nastanek in prisotnost pa pogojujeta aktivnost cikla metabolizma in fiziološko stanje mikroorganizma (Boulton in sod., 1996).

Temperatura, pri kateri poteka proces fermentacije, vpliva na metabolizem kvasovk in s tem na sam potek vinske fermentacije. Optimalna temperatura, kot tudi temperaturni minimum in maksimum, ki ju kvasovke še lahko tolerirajo, so različni glede na to, kateri proces spremljamo, naj bo to dihanje, fermentacija, celična rast ali alkoholna toleranca. Temperaturni optimum je delno odvisen tudi od sestave fermentacijskega medija. Previsoke temperature povzročijo odmiranje kvasnih celic, vodijo do zaustavitve fermentacije. Nizke temperature lahko povzročajo probleme z začetkom fermentacije, kot je na primer adaptacija mikroorganizma na obstoječe razmere in s tem podaljšanje lag-faze rasti mikroorganizma. Ne glede na optimum za celično rast ali fiziološko aktivnost mikroorganizma, moramo najti ustrezno temperaturo, pri kateri ne prihaja do zastojev fermentacije ali do izgub alkohola in aromatičnih snovi pri nizkih ali visokih temperaturah (Boulton in sod., 1996).

Občutljivost kvasovk na fermentacijsko temperaturo je odvisna tudi od količine med fermentacijo nastalega etanola, ki zavira rast celic (inhibicija rasti s produktom). Ta negativni efekt, ki vpliva na celično rast, sekundarno vpliva na produkcijo etanola, je večji pri višji temperaturi. Temperatura vpliva tudi na nastanek sekundarnih produktov fermentacije, kot so glicerol, jantarna in citronska kislina (Kukec, 2003).

Temperaturni šoki omogočajo povečanje tvorbe glicerola od 80 % do 100 %, oziroma od 6 do 12 g·L<sup>-1</sup>. Ta postopek povečanja tvorbe glicerola je mogoče uporabiti pri vseh sortah mošta in za vse vrste vin (Berovič, 2004).

Večina višjih alkoholov nastaja med alkoholno fermentacijo in dosega koncentracije v mejah med 150 in 550 mg/L. Višji alkoholi so prekursorji za tvorbo arome vina. Višji alkoholi in njihovi estri imajo intenzivni vonj in igrajo pomembno vlogo pri nastajanju arom vina. Med najbolj zastopanimi sta izoamilalkohol in 1-propanol. V majhnih koncentracijah, manj kot 300 mg·L<sup>-1</sup>, sodelujeta pri kompleksnosti arom vina. Višji alkoholi nastajajo v ciklu kvasnega metabolizma direktno iz sladkorjev ali pa iz aminokislin grozdja po Erlichovi reakciji. Ta reakcija je posledica aktivnosti FAD<sup>+</sup> dehidrogenaze, ki oksidira aminokislino v imino kislino.

Te se hidrolizirajo v  $\alpha$ -keto kislino, ki je v nadaljevanju izpostavljena delovanju dekarboksilaze s pomočjo koencima tiaminpirofosfat (TPP). Po tej poti iz levcina nastaja izoamilalkohol (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).

Ob dvigu temperature od 18 na 34 °C je zaradi intenzivnega vrenja potrebno uporabiti na vrhu fermentorja refluks hladilnik s hlajenjem na temperaturo 4 °C. Ta dodatek preprečuje izgubo aromatičnih snovi in vlage, ki tvorijo bogastvo vinske cvetice in bi jih intenziven tok 100 % vlažnega ogljikovega dioksida odnašal iz nastajajočega vina (Kukec, 2002).

Alkoholna fermentacija je kombinacija kompleksnih interakcij med raznolikostjo mošta, vrsto kvasovk in tehnologijo vina in posledica tega je kakovost vina. S spremembo temperature fermentacije se spremeni tudi sestava vina. Pri nizkih temperaturah je stopnja etanola višja. Pri povišani temperaturi pa se poveča količina sekundarnih metabolitov. Temperatura direktno vpliva na koncentracijo glicerola. Temperatura fermentacije se lahko uporablja za kontrolo nekaterih kemijskih karakteristik vin, kot npr. koncentracije etanola in glicerola (Torija in sod., 2003).

S temperaturnim šokom povečamo produkcijo glicerola in trehaloze. Glicerol pa je podoben trehalozi in se lahko akumulira v celicah kvasovk v velikih koncentracijah, brez strupenih in inhibitornih efektov. Temperaturni šok povzroči, da kvasovke producirajo proteine. Kvasovke producirajo večjo količino glicerola med različnimi stresi oziroma zaradi večje koncentracije glukoze.

### **2.3.12 Vpliv galvanskega polja**

Uporaba različnih kovin v fermentacijski tehniki povzroča nastanek šibkih galvanskih tokov. Z uvajanjem enosmernega električnega toka v grozdní mošt se poveča metabólna aktivnost vinskih kvasovk sorazmerno s tem pa se poveča tudi količina nastalih produktov.

#### **2.3.12.1 Oksidacijsko-redukcijski potencial v vinu**

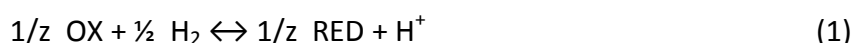
Po kemijski sestavi vino vsebuje različne sestavine od katerih so mnoge podvržene redukcijsko-oksídacijskim reakcijam. Redoks potencial je posledica poteka oksídacijskih in redukcijskih reakcij, ki v danem sistemu težijo k ravnotežju. Na osnovi vrednosti redoks potenciala v določenem trenutku lahko ugotovimo, v katero smer se posamezne reakcije odvijajo. Glede na njegovo vrednost lahko ukrepamo in te reakcije tudi reguliramo. Poznavanje potenciala je zelo pomembno za vina in razvijanje cvetice (Šikovec, 1993).

Redoks potencial v mikroorganizmih nastane zaradi oksídacijsko-redukcijskih reverzibilnih parov, irreverzibilnih reductentov ter prostega kisika in vodika. Odvisen je od vrednosti pH,

raztopljenega kisika, ravnotežne konstante in redoks potenciala tekočine. Posamične raziskave so pokazale, da s pomočjo redoks potenciala dobimo več informacij o oksidativnem stanju v aerobnih in delno aerobnih mikroorganizmih kot s koncentracijo raztopljenega kisika (Berovič, 1987).

Oksidant je spojina, ki druge spojine oksidira, sama pa se reducira. Reducent pa je spojina, ki druge spojine reducira.

V vinu to ponazorimo na sledeči način:



kjer je: OX = oksidirana oblika  
 RED = reducirana oblika  
 z = število elektronov

Konstanta sistema je:

$$K = \frac{\overline{(\text{RED})}^{1/z} \cdot \overline{(\text{H}^+)}}{\overline{(\text{OX})}^{1/z} \cdot p_{\text{H}_2}^{1/2}} \quad (2)$$

Kjer je: K...konstanta ravnotežja  
 z...število elektronov  
 p...parcialni tlak vodika

Pri prenosu elektronov ali molekul kisika in vodika nastane elektromotorna sila, ki je proporcionalna razliki potencialov. Intenziteto lahko merimo potenciometrično, pri čemer je vedno potrebno izmeriti tudi vrednost pH (Šantek, 1993).

Redoks potencial je definiran kot napetost med referenčno elektrodo (Ag/AgCl ali kalomelova elektroda) in indikatorsko elektrodo (Pt elektroda) v raztopini. Inertna elektroda v raztopini lahko sprošča ali sprejema elektrone. Količina sprejetih elektronov je ekvivalentna toku. Redoks potencial postaja pozitiven ali negativen. Merilo elektronskega procesa je torej razlika med tokom elektronov na elektronskem donorju in elektronskem akceptorju. Iz Nernstove enačbe (Berovič, 1987) je razvidno, da je vrednost redoks potenciala odvisna od aktivnosti oksidantov in reducentov ter od vrednosti pH. Redoks potencial daje informacijo o aktivnosti elektronov, pH pa informacijo o aktivnosti vodikovega iona ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ). Vrednost pH raztopine se spreminja glede na rast mikroorganizma.

Redoks potencial je podan z Nernstovo enačbo:

$$E_h = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \frac{a(\text{red})}{a(\text{ox})} \quad (3)$$

$E_h$ ....redoks potencial (mV)

$E_0$ ....standardni potencial sistema pri 25 °C, kjer so aktivnosti vseh reaktantov 1 (mV)

$R$ ....plinska konstanta (8,314 J/g K)

$T$ ....temperatura (K)

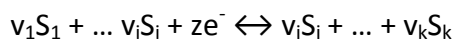
$z$ ....število elektronov (/)

$F$ ....Faraday-eva konstanta (96500 J)

$a(\text{Ox})$ ....aktivnost oksidantov (mg/L)

$a(\text{Red})$ ....aktivnosti reducentov (mg/L)

V bolj kompleksnih redoks sistemih, v katerih je prisotnih več oksidantov in reducentov, ki med seboj reagirajo po shemi:



velja:

$$E_h = E^0 + \frac{RT}{zF} \ln \left( \frac{\prod_i a_{ox}^{v_{ox}}}{\prod_i a_{red}^{v_{red}}} \right) \quad (4)$$

$\pi_a$ ....produkt aktivnosti vseh prisotnih oksidantov oziroma reducentov

Vrednost redoks potenciala  $E_h$  je odvisna od razmerja aktivnosti oksidiranih in reduciranih sestavin substrata, števila izmenjanih elektronov, temperature in od konstante sistema  $E_0$ .

### 2.3.12.2 Redoks potencial v biotehnologiji

Redoks potencial igra pomembno vlogo v življenjskem procesu vseh živih organizmov. Zato ni presenetljivo dejstvo, da je vse odkar je Priestley odkril in izoliral kisik, bilo narejenih ogromno teoretičnih in eksperimentalnih študij oksidativnih in redukcijskih procesov na mikroorganizmih (Hewitt, 1950).

Redoks potencial v mikrobnih kulturah predstavlja vsoto vseh oksidacijsko-redukcijskih procesov v posameznih fermentacijah, v katerih je bistvenega pomena metabolizem mikrobnih celic in je posledica reverzibilnih oksidacijsko-redukcijskih reakcij, ireverzibilnih redukcij ter delovanja prostega kisika in vodika. V mikroorganizmih nastane zaradi oksidacijsko-redukcijskih reverzibilnih parov, ireverzibilnih reducentov ter prostega kisika in vodika. Posamezne raziskave so pokazale, da s pomočjo redoks potenciala dobimo več informacij o oksidativnem stanju v aerobnih in delno aerobnih mikroorganizmih kot z merjenjem parcialnega tlaka raztopljenega kisika (Berovič, 1987).

Biološke raztopine so ekstremno kompleksen medij, v katerem poteka veliko število ireverzibilnih, sočasnih, zaporednih in paralelnih kemijskih in bioloških reakcij. Ugotovili so, da kljub kompleksnosti reakcij, ki določajo redoks potencial v določenih bioloških sistemih, redoks potencial predstavlja parameter, ki lahko daje koristne informacije o metabolizmu v mikrobnih kulturah (Kjaergaard, 1977).

Redoks potencial je funkcija temperature, vrednosti pH, koncentracije raztopljenega kisika, ravnotežne konstante in oksidacijsko-redukcijskega potenciala tekočine (Ishizaki in sod., 1974).

Fizikalni parametri, kot so temperatura, tlak, mešanje in prezračevanje, močno vplivajo na volumski transportni koeficient kisika v tekoči fazi, zato s povečanjem teh parametrov, povečamo parcialni tlak raztopljenega kisika. S povečanjem parcialnega tlaka kisika vplivamo na povečanje potencialne razlike med parcialnim tlakom kisika v tekočini in parcialnim tlakom kisika v celici mikroorganizma. To močno vpliva na metabolne in encimatske aktivnosti v mikroorganizmu (Kjaergaard, 1977).

Regulacija redoks potenciala je možna tudi z dodajanjem reducenta ali oksidanta v sistem. Regulacija in ohranjanje konstantnega redoks potenciala ni možno, dokler celice niso prešle vsaj del eksponentne faze rasti (Šantek, 1993).

Pri prenosu kisika v aerobnih in fakultativno aerobnih kulturah, mora obstajati potencialna razlika med koncentracijo kisika v celici in koncentracijo kisika v okoliškem mediju. Koncentracija kisika se zmanjšuje od raztopine proti celici in zato je intercelularni redoks potencial mikroorganizma vedno nekoliko bolj negativen kot ekstracelularni redoks potencial. V anaerobnih mikroorganizmih povzročajo večje koncentracije kisika ireverzibilne poškodbe celice in nujno je zagotoviti anaerobne razmere za rast. Če jih ni mogoče zagotoviti v okolju, fakultativni anaerobi porabijo kisik v začetni fazi procesa in s tem ustvarijo anaerobne razmere za gojenje. V drugih primerih pa kisik odstranimo iz okolja (Jacob, 1970).

Redoks potencial lahko se lahko koristno uporablja namesto meritev parcialnega tlaka raztopljenega kisika. Redoks potencial ima prednosti, zaradi katerih je bolj uporaben in bolj zanesljiv procesni parameter pri izjemno nizkih parcialnih tlakih kisika, kot pa meritev parcialnega tlaka raztopljenega kisika (Dahod, 1982).

V proizvodnji inosina z bakterijo vrste *Bacillus subtilis* je Shibai s sodelavci (1974) naredil korak naprej in določil  $p_{O_2crit}$  z meritvami raztopljenega kisika, redoks potenciala, celične respiratorne stopnje in kontrole pH ter temperature biosinteze. Ko je koncentracija raztopljenega kisika dosegla vrednost nad  $1 \cdot 10^{-2}$ , je postala zveza med redoks potencialom in logaritmom parcialnega tlaka raztopljenega kisika ( $p_{O_2}$ ) linearna. Redoks potencial se je

opazno znižal zaradi fizioloških sprememb v celicah, dihanje celic pa je bilo oteženo pri  $E_h = -180$  mV (Shibai in sod., 1974).

Meritve celičnega redoks potenciala so uspešno uporabili pri spoznavanju fiziološkega stanja mikroorganizmov (Graindorge in sod., 1994; Kwong in Rao, 1991; Kwong in Rao, 1992; Oktybarsky in Smirnova, 1989), za optimizacijo učinkovitosti procesa (Du Prez in sod., 1989; Kwong in Rao, 1992), za kontrolo procesa (Graindorge in sod., 1994) in za spremljanje procesa (Kaake in sod., 1992; Linko, 1992; Mosey, 1985).

Ishizaki, Shibai in Hirose so poskušali vzpostaviti zvezo med redoks potencialom in drugimi spremenljivkami, kot so pH in parcialni tlak raztopljenega kisika. Ugotovili so, da je naklon krivulje redoks potenciala odvisen od uporabljenega mikroorganizma in razmer fermentacije ( $T, pO_2...$ ) (Ishizaki in sod., 1974).

V pretvorbi L-sorboze v 2-keto-L-glukonsko kislino, z uporabo mutanta bakterij rodu *Pseudomonas* (Tengerdy, 1961) so redoks potencial uporabili za ugotavljanje celične potrebe po kisiku. Pri biosintezi antibiotikov levorina A in levorina B z vrsto *Actinomyces levoris*, so Sukharevich in sodelavci 1970 ugotovili, da več levorina A nastaja pri višjih vrednostih redoks potenciala, med tem ko nastaja več levorina B pri nižjih vrednostih redoks potenciala. Podobni rezultati so bili dobljeni tudi v primeru aminokislinske fermentacije z vrsto *Corynebacterium glutamicum* (Radjai in sod., 1984), kjer se je izkazalo, da je bila največja produkcija lizina pri rahlem pomanjkanju kisika, pri redoks potencialu med -230 in -210 mV.

Vrednost redoks potenciala lahko kontroliramo in reguliramo s pomočjo dodajanja različnih substanc ali pa s pomočjo spreminjanja procesnih parametrov, kot je intenzivnost mešanja (Berovič, 1999). V procesu submerzne fermentacije citronske kisline z plesnijo vrste *Aspergillus niger*, pri kateri so uporabili kot substrat melaso iz sladkorne pese, so z uporabo prezračevanja in mešanja, vzdrževali določen profil redoks potenciala z dvema maksimumoma (260 in 280 mV) in dvema minimuma (180 in 80 mV); s tem so dosegli ponovljivost in visoko produktivnost procesa (Berovič in Cimerman, 1998).

Za določen optimalni proces z nekim mikroorganizmom je značilna krivulja redoks potenciala. Zelo nizki redoks potenciali označujejo reduktivno stanje fermentacijske brozge. Reduktivno stanje respiratornega sistema pomeni, da se v sistemu odvijajo intenzivne metabolne aktivnosti. Zaradi tega nekatere mikrobiološke biosintezne reakcije najugodnejše potekajo pri vrednostih redoks potenciala, ki so blizu minimalnih vrednosti. Ta ugotovitev se je izkazala za točno v proizvodnji citronske kisline (Matkovics in Kowacs, 1957; Radjai in sod., 1984, Berovič, 1999), v fermentativni proizvodnji riboflavina (Kramli in Szabo, 1959), aminokislin (Kwong in Rao, 1991, 1992), ksilitola (Deok-Kun in sod., 1997) in v fermentativni tehnologiji proizvodnje vina (Dikanović-Lučan in Palić, 1995). Nizke vrednosti redoks

potenciala pa predstavljajo tudi ugodno okolje za rast in preživetje kulture bakterij vrste *Escherichia coli* (Bagramyan in sod., 2000).

V devedesetih letih je bilo več študij namenjenih meritvam redoks potenciala v anaerobnih bioloških procesih (Beck in Schink; 1995; Heppner *Aspergillus niger*, 1992). Nekatere raziskave opisujejo tudi pomen meritev redoks potenciala v celični fiziologiji in interpretaciji meritev pri gojenju evkariotskih celic (Hwang in Sinskey, 1991) in v hibridnih kulturah fiziologije živih celic (Eyer in Heinzle, 1996; Higerada in sod., 1997).

### 2.3.12.3 Redoks potencial v vinarstvu

Meritve oksidacijsko-redukcijskega potenciala so v vinarstvu pričeli uporabljati leta 1932 in z njim pojasnili veliko pojavov pri zorenju in staranju vina. V vinu se oksidirajoče in reducirajoče snovi nahajajo v določenem ravnotežju. Optimalna vrednost Eh vina je vrednost, pri kateri se v vinu optimalno oblikuje okus, aroma in kakovost vina. Vrednost Eh vina je specifična za vsako sorto.

Čeprav je Clark (1923) uvedel vrednost rH, jo je kasneje tudi preklical in zahteval, da se je ne bi smelo več uporabljati. Vrednosti rH se gibljejo med 0 in 42, računajo pa se po spodnji enačbi (Jacob, 1970).

$$rH = \frac{Eh}{0,03} + 2pH \quad (5)$$

V vinu poteka veliko oksidacijskih in redukcijskih reakcij med posameznimi spojinami. V vinu ločimo organske in anorganske redoks sisteme. Redoks sistem anorganske narave predstavlja prehod iz reducirane v oksidirano obliko s sproščanjem elektronov, s sprejemanjem elektronov pa se vrača v reducirano obliko. Najpogostejše so spojine težkih kovin - železa, bakra, cinka in njihove soli, ki pod določenimi razmerami prehajajo v oksidirano stanje in obratno nazaj v reducirano. Redoks sisteme organske narave pa predstavljajo etanol, organske kisline, polifenoli. To so reducirane oblike, njihove oksidirane oblike pa so acetaldehid in očetna kislina, keto kisline, dihidroaskorbinska kislina in kinoni. Redoks sistemi organske narave prehajajo iz ene v drugo obliko. Te oksidacijsko-redukcijske reakcije se odvijajo pod vplivi encimov (Muštović, 1985).

Poznavanje vrednosti redoks potenciala merjenega vzorca nam daje okvirno informacijo o redoks reakcijah, ki v tem trenutku v vinu potekajo in vplivajo na kakovost in stabilnost vina. Na splošno ima vino reduktivni značaj. Vrsta kemijskih, encimskih in bioloških procesov v vinu je povezana z redukcijsko-oksidacijskim stanjem vina. V tehnologiji vina je mogoče uporabiti redoks potencial na eni strani kot merilo za kontrolo dejanskih potreb po dodajanju žveplove (IV) kisline v mošt ali vino po končani fermentaciji, po drugi strani pa kot fiziološki

dejavnik, pomemben za regulacijo kondenzacije in polimerizacije fenolnih spojin in spremljanje poteka procesa.

Med zorenjem, skladiščenjem in staranjem vina, imajo oksidacijsko-redukcijski procesi izjemno vlogo za končno kakovost vina. Vrednosti redoks potenciala v vinih se gibljejo v mejah od 50 do 230 mV. Oksidirana in pokvarjena vina pa kažejo višje vrednosti redoks potenciala (nad 320 mV). Stopnja oksidacije in redukcije vina je odvisna od temperature in vrednosti pH. Na splošno lahko rečemo, da ima zrelo vino reduktivni značaj (Farkaš, 1988). Po svoji kemijski sestavi vino vsebuje raznovrstne spojine, od katerih so mnoge podvržene redukcijsko-oksidacijskim reakcijam, ki v danem sistemu težijo k ravnotežju. Na osnovi vrednosti redoks potenciala v določenem trenutku, lahko ugotovimo, v katero smer se posamezne reakcije odvijajo. Glede na njegovo vrednost lahko pravilno ukrepamo in z dodatki reguliramo te reakcije. Poznavanje redoks potenciala je zelo pomembno za razvijanje cvetice vina (Šikovec, 1993).

Vrednost redoks potenciala nam daje informacije o (Šantek, 1993):

- potek reakcije: ali poteka oksidacija ali redukcija,
- dobivamo vpogled v trenutno stanje vina, ki ga lahko primerjamo z drugimi vini,
- vrednost redoks potenciala v moštu in vinu je pomembna za razvoj ali inhibicijo rasti kvasovk,
- pri določenem redoks potencialu nastajajo usedline, še posebno, če so prisotni kovinski ioni.

V grozdnem moštu predstavlja vrednost izmerjenega redoks potenciala podatek o oksidativnem stanju fermentacijskega medija - grozdnega mošta, ki je izredno pomemben dejavnik za nadaljnji potek kvasnega metabolizma in s tem za vrsto kemijskih, encimskih in bioloških procesov, ki se dogajajo v moštu. Podatek o oksidativno-reduktivnem stanju mošta nam daje možnost regulacije procesa v smeri zagotavljanja za rast in razmnoževanje kvasovk ugodnega okolja, ki vodi do kakovosti vina (Šikovec, 1993).

Vrednost redoks potenciala v moštu in vinu je v tesni povezavi z mnogimi procesi v postopku pridelave vina. Takoj po stiskanju grozdja je redoks potencial okrog 325 mV, a že po 12 h na zraku, v kontaktu s kisikom, se zaradi tvorbe peroksidnih enot v moštu, povzpne na 454 mV. Med fermentacijo pa se redoks potencial zmanjša tudi do vrednosti - 200 mV. Alkoholna fermentacija poteka pri relativno nizkem redoks potencialu, kar lahko po eni strani razložimo s porabo kisika s strani kvasovk v času njihovega razmnoževanja in z dejstvom, da iz kvasnih celic prehajajo v vino nekatere reducirajoče snovi, kot sta glutation in cistein. Po končani fermentaciji, v času hranjenja vina, je vrednost redoks potenciala odvisna od prepustnosti sodov. Na začetku, pri mladih vinih, ki jih hranimo v lesenih sodih, se vrednosti redoks potenciala gibljejo med -300 in -350 mV, medtem ko se staranje v tankih iz nerjavnega jekla

odvija pri redoks potencialu okrog -140 do -150 mV. V procesu hranjenja vina imajo na redoks potencial vpliv razni posegi, ki jih izvajamo na vinu. Posebno vlogo pri tem ima žveplov dioksid. S svojimi reduktivnimi lastnostmi veže potencialne oksidante in s tem v veliki meri zniža redoks potencial vina. Čeprav se ti dve snovi razlikujeta po načinu delovanja, predstavljata učinkovit regulator oksidacijsko-redukcijskih procesov in ju prištevamo v skupino redoks regulatorjev (Wondra, 1997).

Pretakanje vina v prisotnosti zraka, filtracije in razna bistrenja prav tako vplivajo na velikost redoks potenciala. Neposredno po raztapljanju kisika v moštu, vrednost redoks potenciala ne naraste takoj, ampak šele po času nekaj ur, odvisno od časa trajanja izpostavljenosti mošta kisiku iz zraka. Primarna oksidacija z molekularnim kisikom teče relativno počasi in do intenzivnejših oksidacijskih reakcij prihaja šele po nastanku intermediarnih peroksidnih enot pri tako imenovanih sekundarnih oksidacijah. Pri primarni oksidaciji fenolov v odgovarjajoče kinone nastaja  $H_2O_2$ , ki v sekundarni oksidaciji katalizira pretvorbo etanola v acetaldehid (Kukec in sod., 2002).

Rast in metabolizem kvasnih celic med procesom fermentacije grozdnega mošta lahko opišemo s serijo oksidacijsko-redukcijskih reakcij. Redoks potencial v fermentacijskem sistemu predstavlja odvisno spremenljivko, ki nam daje informacije o trenutnem dogajanju v sistemu. S spreminjanjem zunanjih spremenljivk, kot so temperatura fermentacije, količina prisotnega kisika in  $CO_2$  v sistemu, dodajanja reducirajočih snovi (žveplove (IV) kisline) v grozdni mošt in kasneje v vino, lahko vplivajo na spremembo vrednosti redoks potenciala in s tem neposredno na potek fermentacije. Merjenje redoks potenciala je relativno hitra in zanesljiva metoda, ki omogoča vpogled v oksidacijsko oziroma redukcijsko sposobnost vina in je tako zelo uporabna kot kvalitativni in kvantitativni dejavnik v spremljanju procesa vinske fermentacije in analize vina. Ker je redoks potencial tesno povezan s številnimi kemijskimi reakcijami, ki potekajo v vinu, pa naj bodo spontane ali inducirane, nam poznavanje le-tega omogoča dobro kontrolo celotnega procesa vinske fermentacije (Kukec in sod. 2002).

Raziskave redoks potenciala vina se izvajajo z uporabo platinske elektrode. Redoks potencial vina je odvisen od pH (Ribéreau-Gayon, 1973), zato je priporočljivo vzporedno z meritvami redoks potenciala opravljati tudi meritve pH vrednosti. Deibner in Mourgues sta ugotovila, da se vrednost redoks potenciala spremeni za 60 mV na enoto pH (Deibner in Mourgues, 1969).

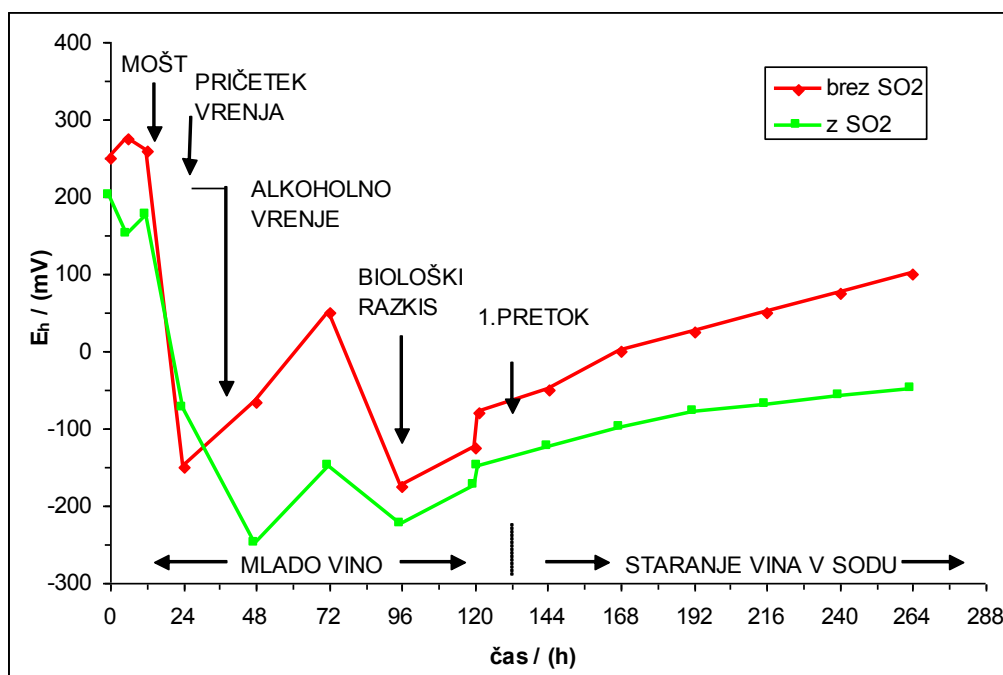
Oksidacijsko-redukcijske reakcije igrajo pomembno vlogo v procesu nastajanja in zorenja vina. Ravnotežje oksidiranih in reduciranih substanc je zelo pomembno za optimalni okus in aromo vina. Merjenje teh parametrov omogoča pomemben vpogled v proces razvoja vina in omogoča optimizacijo razmer med zorenjem vina (Tomlinson in Klimartin, 1997).

Z dodatkom žveplovega dioksida v grozdni sok, se vrednost merjenega redoks potenciala zmanjša in fermentacijski proces se upočasni. Z ozirom na vrednost redoks potenciala obstajajo velike razlike med posameznimi vrstami kvasovk. Področje delovanja kvasne

aktivnosti je v mejah od -200 do 350 mV. Nad to vrednostjo deluje kisik toksično in inhibitorno, pod vrednostjo -200 mV pa je parcialni tlak raztopljenega kisika prenizek za normalne življenjske razmere za kvasovke (Judež, 1981).

Alkoholna fermentacija poteka pri relativno nizkih vrednostih redoks potenciala, pretežno zaradi sproščanja redoks komponent (cistein, glutation) iz kvasnih celic v vino. Razen tega pa tudi intenzivna rast kvasnih celic, ob porabljanju raztopljenega kisika, ki ga spremlja nastajanje ogljikovega dioksida, kot tudi nastajanje redoks spojin, povzročajo zmanjšanje vrednosti redoks potenciala (Dikanović-Lučan in Palić, 1992). Redoks potencial, kot tudi parcialni tlak raztopljenega kisika, se zmanjšujeta med procesom vinske fermentacije. Po nekajdnevni fermentaciji kažejo bela vina višje vrednosti redoks potenciala (340 mV in 3,49 mgO<sub>2</sub>/L), kot pa rdeča vina (305 mV in 0,7 mgO<sub>2</sub>/L) (Dikanović-Lučan in Palić, 1995).

Pri oceni vzporednih poskusov z zdravim, hitro predelanim grozdem ob takojšnjem začetku alkoholnega vrenja brez dodatka reducirajočih žveplovih spojin, je bilo ugotovljeno, da so bila vina brez žveplanja mošta senzorično boljša. Pri nagnitem ali drugače poškodovanem grozdu pa moramo upoštevati, da se brez žveplanja ob dostopu kisika oziroma zraka v tej prvi fazi hitro razvijejo v moštu ali drozgi prisotni kvarljivi mikroorganizmi, kot so očetno in mlečnokislinske bakterije, šibkovrelne in oksidativne kvasovke. Če je že na samem grozdu preveč kvarljivcev, močan dodatek SO<sub>2</sub> zniža redoks potencial in poseže selektivno v sestavo patogene mikroflore, ki potrebuje kisik za svoj razvoj in delovanje (Šikovec, 1993).



Slika 8: Redoks potenciala v moštu in vinu brez dodatka SO<sub>2</sub> in z njim (Šikovec, 1993)

V prvi razvojni fazi, ko imamo opravka z drozgo - moštom se lahko v prvih urah raztopi 200 mg kisika na liter, ko že doseže nasičenost. Meritve v tej fazi so težko izvedljive, ker potekata vzporedno procesa topnosti kisika in vezave kisika na posamezne sestavine. Običajno se v normalnih razmerah predelave tehnološko zrelega in zdravega grozdja raztopi v 1 litru mošta 80 do 100 mg kisika, kar ustreza vrednosti redoks potenciala približno 200 mV. Dodane kvasovke se ob topnem kisiku brez žveplanja mošta hitreje razmnožujejo in prej začnejo z alkoholnim vrenjem ob manjšem nastanku acetaldehida in piruvata, kot vzporednima stranskima produktoma fermentacije. Hiter začetek alkoholnega vrenja in ugodna kemijska sestava mošta ter temperatura med vrenjem, omogočajo kvasovkam ustrezen metabolizem, kjer nastane čim manj aldehydov, zlasti acetaldehida in piruvata, ki so veliki porabniki žvepla (Vannini in sod., 1994).

Drugo fazo - alkoholno vrenje - štejemo za nastanek vina. Iz slike vidimo, da je za to fazo značilna močna reduktivnost. Vrednost redoks potenciala pade pod optimalno vrednost, ker porabijo kvasovke del kisika za svoje razmnoževanje. Preostali delno topni kisik se izgubi, ker ga sproščeni ogljikov dioksid izrine iz mošta. Mošt je zaradi nastalega CO<sub>2</sub> zaščiten pred dodatno topnostjo kisika iz zraka. Tretja razvojna faza - po končanem alkoholnem vrenju do ustekleničenja - vina in naprej je časovno najdaljša. V tej fazi se kisik v vinu topi počasneje kot v moštu ali drozgi. Zmogljivost topnosti kisika je namreč odvisna od prejšnje obremenjenosti vina s kisikom (Šikovec, 1993).

Yu in sodelavci (2007) so raziskovali vpliv redoks potenciala na produkcijo etanola s kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Stalne vrednosti redoks potenciala (-50 mV, -100 mV, -150 mV, -230 mV) so bile pridobljene s spreminjanjem hitrosti stresa in stopnje zračenja ves čas fermentacijskih poskusov. Rezultati so pokazali, da je raven redoks potenciala vplivala na rast celic, nastanek etanola, nastanek glicerola, izločanje organskih kislin, in smrtnost celic. Ugotovili so, da je najbolj ugoden redoks potencial za proizvodnjo etanola pri -150 mV, glede na vse dejavnike kot so biomasa, etanol, produkcija glicerola. Rezultati pomenijo tudi, da je redoks potencial močno orodje za natančno kontrolo fermentacije etanola (Yu in sod., 2007).

Raziskave meritev redoks potenciala v vinu se nadaljujejo. Več raziskav je bilo opravljenih na proučevanju povezave med izmerjenimi vrednostmi redoks potenciala in senzoričnimi lastnostmi vin iz področja bivše Jugoslavije (Dikanović-Lučan in Palić, 1992). Parcialni tlak raztopljenega kisika je faktor, ki vpliva na vrednost redoks potenciala (Ribéreau-Gayon, 1973). Znižanje redoks potenciala med procesom vinske fermentacije zaznamo po postopku dodajanja SO<sub>2</sub> ali pa askorbinske kisline v grozdni mošt ali vino (Deibner in Mourgues, 1969).

Molekularni kisik, O<sub>2</sub>, ki ga je v zraku skoraj 21 vol.%, je ob prisotnosti encimov (oksidaze, oksigenaze) močno oksidacijsko sredstvo. Če so v moštu ali vinu prisotni ioni težkih kovin, ki

delujejo kot katalizatorji, pospeševalci prenosa kisika, lahko pride do neposredne oksidacije posameznih kemijskih sestavin mošta in vina. Vrednost rH označuje oksidacijsko-redukcijsko stanje v vinu (rH med 0 in 42), zato je pomemben parameter pri spremljanju zorenja vina. Čim večja je rH vrednost, toliko več oksidativnih spojin vsebuje mošt oziroma vino. V vinu so oksidirajoče in reducirajoče spojine v nekem ravnotežju, zato je rH (odvisno od sorte), kjer se optimalno oblikuje njegova aroma, v območju med 17,5 in 19 (Šikovec, 1993).

Reducirajoče lastnosti svežega mošta se izgubijo, če ga izpostavimo zraku, kar povzroči dvig vrednosti redoks potenciala. Reducirajoče snovi se v moštu in vinu v stiku s kisikom oksidirajo, zlasti polifenoli in askorbinska kislina. Oksidacijsko-redukcijski potencial mošta takoj po stiskanju znaša približno 200 do 300 mV, po daljši izpostavitvi zraku pa lahko naraste celo nad 400 mV. Posledica tega je nastajanje peroksidnih snovi. Pri belih vinih je pomembno, da je mošt čim krajši čas izpostavljen stiku s trdnimi delci grozdja, ker ti vsebujejo oksidirajoče snovi (polifenolne snovi iz pecljevine, kože grozdnih jagod in pečk) in encime (oksidaze, oksigenaze), ki posredujejo pri prenosu kisika iz zraka na posamezne sestavine. Posledica oksidacije polifenolov je zvišanje vrednosti oksidacijsko-redukcijskega potenciala. Prav tako lahko pride v grozdnem moštu ob daljši izpostavljenost večji koncentraciji kisika do hitrega razmnoževanja bakterij in šibkovrelnih kvasovk, ki tvorijo nezaželene presnovne produkte. Zlasti se v tem primeru poveča vsebnost acetaldehida, ki je največji porabnik žveplovega dioksida, poveča se tudi vsebnost hlapnih kislin, lahko pa nastajajo tudi biogeni amini in mikotoksini, ki močno zmanjšajo kakovost vina (Bandel, 1996).

Med potekom alkoholnega vrenja se oksidacijsko-redukcijski potencial zniža do vrednosti (od -250 do -300 mV). V tej fazi kvasovke pretvarjajo sladkor preko številnih vmesnih produktov v alkohol in ogljikov dioksid. Za to fazo je značilna močna reduktivnost procesa. Čim krajša je predfermentativna faza, tem manj acetaldehida bo v moštu nastalo. Zlasti prosti acetaldehid, ki ni nevtraliziran z žveplovim dioksidom, povzroča v vinu oksidativen vonj in okus. Več ko nastane acetaldehida,  $\alpha$ -ketoglutarjeve kisline, piruvata med alkoholnim vrenjem, večje so potrebe po dodajanju žveplovega dioksida, če želimo ohraniti vino v optimalnem redukcijskem območju. Za zmanjšanje možnosti oksidacije je potrebno vse tehnološke postopke opraviti čim hitreje in s tem omejiti dostop zraka v sistem (Kukec in sod., 2002).

Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* so občutljive na kisik in glukozo, ki direktno ali pa indirektno, preko katabolne represije mehanizma, kontrolira dve možni katabolni poti za glukozo. Ena od teh je parcialna oksidacija po fermentativni poti, pri kateri nastaja majhna količina energije (2 mol ATP/mol glukoze) (Furukawa in sod., 1983).

Glede na Pasteurjev efekt, je kisik znan kot inhibitor, ki zavira fermentacijsko pot pri biosintezi etanola (Sols, 1967), kar se kaže v padcu porabe sladkorjev in nastanka ogljikovega dioksida ter v povečanju celične rasti mikroorganizma. V prisotnosti večjih koncentracij

glukoze glukozni efekt preide Pasteurjev efekt in fermentativna pot postane dominantna, v primeru, ko so koncentracije glukoze in kisika velike (Furukawa in sod., 1983).

Čeprav konverzija sladkorja v etanol ne zahteva kisika, je znano, da so majhne količine kisika nujno potrebne za celično rast (Fiechter, 1975).

### 2.3.13 Prevodnost vina

Mošt in vino imata zaradi disociacije ionov ionsko ali električno prevodnost. Prevodnost je odvisna od koncentracije elektrolitov, ki so v moštu ali vinu. Prevodnost narašča z večanjem koncentracije elektrolita (Kjaergaard, 1977).

Z višanjem temperature se poveča elektrolitska disociacija, zmanjša viskoznost in poveča električna prevodnost mošta in vina. S tehnološkega vidika te lastnosti omogočajo avtomatsko kontrolo tehnološkega procesa med vrenjem, staranjem vina, prav tako pa lahko prevodnost uporabimo v samem tehnološkem procesu. Energija električnega polja lahko inhibira ali stimulira delovanje določenih encimov, lahko pa se spremeni katalitično delovanje posameznega encima. Z metodo elektroforeze se lahko loči posamezne encime in koloide vina (Kjaergaard, 1977).

Če vino ali mošt (elektrolit) damo v električno polje, kationi kot pozitivno nabiti ioni prehajajo k negativni katodi, medtem ko anioni prehajajo k pozitivni anodi. Sočasno se vzpostavi tudi električni tok, zato vino kot elektrolit prevaja električni naboj.

Hitrost premikanja iona je odvisna od jakosti električnega polja, v katerem se nahaja vino. Na samo mobilnost iona v vinu vplivajo viskoznost, gostota, temperatura in velikost difuzije snovi v vinu. Poleg navedenih razlogov je hitrost gibanja iona odvisna od vrste elektrolitov vina, tako da dobiva isti ion različne hitrosti gibanja.  $\text{OH}^-$  in  $\text{H}^+$  ioni se zaradi svojega naboja gibljejo hitreje od ostalih ionov. Tako se hidroksidni ion giblje trikrat hitreje od kalijevega iona. Gostota elektrolita kot je vino ima določen razpon, tako da so razlike hitrosti gibanja ionov v vinu relativne. Gibanje ionov sestavlja tok električnega naboja. Ta velikost je definirana kot električni naboj, ki v enoti časa preide skozi enoto površine. Količina električnega naboja je ekvivalentna prenosu ionov.

Prevodnost elektrolita, kot je vino, je recipročna vrednosti upora. Najboljšo prevodnost elektrike in glede na to najmanjši specifični upor imajo suha vina. Slabšo prevodnost imajo vina, ki vsebujejo sladkorje, ker sladkor ne prevaja elektrike. Beljakovine imajo  $\text{NH}_2$  skupine, ki so sposobne sprejemati protone in s tem se nabijejo pozitivno. Beljakovine in druge molekule, ki imajo karboksilne skupine ( $\text{COOH}$ ), dajo negativno nabite ione ( $\text{COO}^-$ ), ko se ionizirajo. Stopnja protonizacije in ionizacije je odvisna od vrednosti pH. V kislem so beljakovine pozitivno nabite, v alkalnem pa negativno (Kjaergaard, 1977).

### 2.3.13.1 Električna stimulacija

Električna stimulacija pomeni umetno dodajanje elektrenine v sistem. Uporabljamo lahko enosmerne (DC) ali izmenične (AC) tokove z različno dolgimi pulzi. Pri odmerjanju jakosti toka se moramo zavedati morebitnih nezaželenih vplivov na tkivo. Napetosti, ki so manjše od 50 V/cm, rezultirajo v manj resnih poškodbah, kot je pretrganje membrane. Pri napetostih pod 1,5 V/cm pa lahko pride do motenj ionov po apoplastu, simplastu in membrani. Mikrotokovi stimulirajo produkcijo ATP-ja, ki predstavlja celično energijo, ki je potrebna, da celica normalno funkcionira (Novak, 1988).

Električna stimulacija lahko spremeni potek vseh procesov, ki so v zvezi z endogenimi električnimi tokovi. Vpliva na embrionalno in regenerativno rast, polarnost in diferenciacijo ter migracijo celic. Lokalnim razlikam v ionskem okolju, ki so posledica električne stimulacije, sledi sprememba membranskega potenciala. Zavedati se moramo tudi stranskih produktov električne stimulacije, kot je elektroliza elektrod in vode, sproščanje različnih produktov stranskih reakcij, vpliv sproščene toplote in lokalna poraba kisika (Novak, 1988).

Nosilci električnega toka v bioloških sistemih so ioni. Dinamika električnih tokov je ena osnovnih značilnosti bioloških sistemov, njihova regulacija pa življenjskega pomena za vsako celico. Regulacija ionskih tokov ima hranilno, signalno in organizacijsko vlogo.

Za razumevanje aktivnih električnih procesov v celicah je najprej potrebno pokazati na dve električni lastnosti membran:

1. za ione nepermeabilen lipidni dvosloj lahko loči naboj. Ta dvosloj izraža prvo lastnost - KAPACITIVNOST.
2. ionski kanali v membrani zagotavljajo prehod anorganskim ionom, ki nosijo električni naboj preko membrane. Ti kanali pa izražajo drugo lastnost - KONDUKTIVNOST.

To sta osnovni električni lastnosti membran in pogojujeta skoraj vse električne fenomene v živalskih in rastlinskih celicah. Razlike v električnih potencialih pa nastanejo na vseh površinah in v vseh raztopinah, kjerkoli so razlike v absorpciji ali mobilnosti ionov (Novak, 1988).

Bioelektrični potenciali izhajajo iz dveh značilnosti bioloških membran:

- asimetrična porazdelitev ionov ekstra- in intracelularno,
- selektivna permeabilnost membrane.

Kratek stik električnih fluksov preprečujejo velike membranske upornosti, ki nudijo specifično upornost v velikosti  $10^4 \Omega/\text{cm}^2$ . Membrane so debeline nekaj nanometrov.

Dokler je membranski potencial okrog celotne celice enak (pri konstantni prevodnosti), tok ne more steči. Če se iz kakršnegakoli razloga membranski potencial ( $V_m$ ) lokalno poveča ali zmanjša in ni v ravnotežju s potencialom ( $E_x$ ) za določen ion  $x$ , lahko nastali gradient postane osnova za  $E_{mf}$  (električna gonilna sila), ki deluje na ta ion.  $E_{mf_x}$  ustreza razliki med membranskim potencialom in ravnotežnim potencialom za določen ion:

$$E_{mf_x} = V_m - E_x \quad (6)$$

Ion  $x$  bo vzdolž membrane v elektrokemijskem ravnotežju kadar bo  $V_m = E_x$ .  $E_{mf}$  je lahko osnova za transcelularni tok.

Bioelektrični tokovi potekajo ekstra in intracelularno in igrajo pomembno vlogo pri diferenciaciji, rasti in regeneraciji celic, tkiv in organov. Biološke tekočine vsebujejo veliko vode, ionov, polarnih molekul, proteinov, lipidov, hormonov in koloidnih delcev. Pri nizkih tokovnih gostotah je konduktivnost linearna, pri visokih tokovnih gostotah pa se začnejo nelinearnosti (Novak, 1988).

Membrane se obnašajo kot porozna trdna snov nasproti pravokotnim poljem in kot viskozna tekočina nasproti poljem, ki so vzporedna z membrano. Membrane so nehomogene tvorbe in je vpliv električnih polj na posamezne dele lahko različen.

Električna polja vplivajo na selektivni transport ionov ali molekul skozi membrane, tako da spremenijo zgradbo slojev na površini membrane. Rezultat sprememb v transportu molekul ali ionov preko celičnih membran se odraža v delovanju celic in organov (Novak, 1988).

Ioni in molekule se porazdelijo glede na njihove diferencialne mobilnosti in koncentracije.

Povprečna gonilna hitrost  $\vec{V}$  je:

$$\vec{V} = \mu_i \cdot \vec{E} \quad (7)$$

$\mu_i$  ....mobilnost

$\vec{E}$  ....gradient električnega polja

Električno polje vzdolž membrane je odvisno le od spremembe napetosti, medtem ko je polje v citoplazmi odvisno od gostote toka in vrste iona:

$$E = \rho \cdot J \quad (8)$$

$E$ ....električno polje

$\rho$  ....specifična upornost

$J$ ....gostota toka

Za vodikove in kalcijeve ione je upornost citoplazme tisočkrat večja kot za mobilne kalijeve ali natrijeve ione. Napetostni gradienti nastanejo na nivojih citoplazme, celice, tkiva, organa in organizma. V možganih vretenčarjev naj bi šibki napetostni gradienti od 2 do 6 V/m koordinirali elektrofiziološko in nevrokemično aktivnost možganskih celic (Novak, 1988).

Citoplazma, telesne tekočine, kutikula imajo določen električni upor do električnih fluksov. Električni pretok je povezan z nastankom električnih polj tako, da napetostno odvisni procesi ionski tokovi sodelujejo pri organizaciji bioloških procesov.

Upornost sistema se zelo poveča, če je okoli celic ovoj zraka, če so interni intracelularni prostori zelo tesni in če so celice zelo ozke ter podolgovate. Električna polja so zato velika (Novak, 1988).

Gostoto električnega toka znotraj homogene tekočine lahko izrazimo:

$$\vec{J} = \sum_j q_j \cdot \mu_j \cdot C_j \cdot \vec{E} \quad (9)$$

$\vec{J}$  ....gostota električnega toka

$q_j$  ....naboj iona j

$\mu_j$  ....mobilnost iona j

$C_j$  .....koncentracija iona j

$\vec{E}$  ....električno polje

Yun s sodelavci (1998) je z elektrostimulacijo kvasnih dehidrogenaz v suspenziji celic poskusil vplivati na alkohol dehidrogenaze *in vitro* z uporabo metilenskega modrila kot akceptorja. Jakost električnega polja je bila 10, 20 in 30 V/cm pri frekvenci 50 Hz. Razen dviga temperature, niso opazili velikih sprememb v kinetiki. Avtorji so zaključili, da šibek enosmeren in močnejši izmenični tok vpliva na mesto dehidrogenaze, ki se nahaja ob ali v celični membrani (Yun, 1998).

Grosse s sododelavci (1988) je za elektrostimulacijo mikroorganizmov v laboratorijskem bioreaktorju uporabil pulzirajoč elektromagnetno inducirani tok velikosti 1,5 mV/cm. Za mikroorganizem so uporabili močno aktivno vrsto *Streptomyces noursei* ZIMET 43716, ki se uporablja za produkcijo antibiotika. Poskusi so potekali paralelno, v bioreaktorjih z in brez elektrostimulacije. V začetni fazi je produkcija antibiotika potekala hitreje v bioreaktorju A, to je v reaktorju z elektrostimulacijo, kot v reaktorju B (kontrola). Po začetni fazi je produkcija v bioreaktorju A padala, produkcija v bioreaktorju B pa je bila stabilna do konca poskusa (Grosse in sod., 1988).

Alvarez s sodelavci (2003) je raziskoval vpliv rastnih razmer, vrst medija in električnih pulzov na kvasovke vrste *Yersinia enterocolitica*. Faza rasti, temperatura, vrednost pH in frekvenca pulza ni vplivala na občutljivost *Yersinia enterocolitica* na električne pulze. Zmanjšanje prevodnosti medija je povečalo odpornost celic *Yersinia enterocolitica*. Inaktivacija *Yersinia enterocolitica* pa se je povečala z močjo polja in časom delovanja (Alvarez in sod., 2003).

Jacob s sodelavci (1981) je raziskoval inaktivacijo kvasnih celic s pomočjo električnega toka v različnih fazah rasti. Zasedovali so kinetiko vzpostavitve prvotnega stanja po električnem pulzu. Ločili so dve stopnji vzpostavitve prvotnega stanja (Jacob in sod., 1981).

Primerjalne študije opisujejo deaktivacijo celic, ki nastopi zaradi delovanja električnih pulzov brez vidnih morfoloških sprememb. Preživele celice se prilagodijo delovanju električnega polja (E) in času delovanja pulza (t). Gram (+) bakterije in kvasovke so manj občutljive na delovanje nizkega električnega toka kot Gram (-) bakterije. Pri delovanju visokega električnega toka je stopnja preživetja pod 1 % za vse mikroorganizme. Dobljeni rezultati potrjujejo, da električno delovanje selektivno vpliva na spremembe membrane celic (Hülshager in sod., 1983).

Karba s sodelavci (1991) je raziskovala *in vitro* vplive nizkega konstantnega enosmernege toka od 0.2 do 1 mA na kvasovke vrste *Candida albicans*. Uporabili so dva sistema za uvajanje električnega toka: Pt-Ir elektrode, ki so jih potopili neposredno v medij, in mostove agarja, ki so preprečili vpliv elektrokemijskih reakcij na kovinskih elektrodah na rast mikroorganizmov. Ugotovili so, da nizki enosmerni tok inhibira rast kvasovk vrste *Candida albicans*. Inhibicija je bila sorazmerna z jakostjo električnega toka in njegovim časom delovanja.

Pri Pt-Ir elektrodah nastanejo neporasle cone okoli elektrod, poleg tega pa so opazne spremembe v vrednosti pH in nastajanje plinov. Vse te spremembe so dokaz elektrokemijskih reakcij na kovinskih elektrodah. Z nastankom stranskih produktov se močno spremeni rastni medij okoli kulture, to pa vpliva na rast mikroorganizma. Inhibicija rasti se pojavi na obeh elektrodah. Elektrokemijske reakcije v mikroampernem območju pa lahko ostanejo neopažene, še posebno *in vivo*, kjer se produkti reakcij hitro odstranjujejo.

Stopnja strupenosti stranskih produktov, ki jih navajajo različni avtorji, je različna. Zaradi tega se morajo raziskave omejiti na sistem, kjer se reakcije na elektrodah potekajo ločeno od ravnega medija. Rezultati eksperimentov z agarnimi mostički so pokazali, da nizek konstanten enosmerni tok inhibira rast kvasovk vrste *Candida albicans*. Med 0 in 1 mA so opazili sorazmerno, skoraj linearno, povečanje inhibicije. Po prenehanju delovanja električnega toka se celice začnejo ponovno deliti. Nizek enosmeren tok ima statičen efekt na rast kvasovk *Candida albicans*. Pod vplivom toka celice niso uničene, zaustavljena je samo njihova delitev. Pri eksperimentih z agarnimi mostički je vrednost pH ravnega medija ostala nespremenjena ne glede na jakost in čas delovanja električnega toka.

Delovanje električnega polja lahko združuje električne in toplotne pojave. Ti dejavniki vplivajo na celično membrano in njene proteine. Rezultati vključujejo spremembe v prepustnosti celične membrane in disfunkciji membranskih proteinov, še posebno tistih, ki so napetostno občutljivi. Stopnja okvare proteinskih kanalov ni neposredno povezana s toplotno poškodbo proteinov. Poškodbe kanalov so odvisne od inducirane površinskega membranskega potenciala. Število nabitih delcev, ki delujejo kot napetostni senzor v kanalih, se zmanjša po potencialnem membranskem šoku. Šok povzroči elektrostrukturne spremembe v membranskih proteinih. Študije so pokazale, da lahko s pomočjo zunanjega električnega polja spremenimo funkcijo napetostno občutljivih membranskih proteinov (Chen in sod., 1998).

Sunek električnega polja je netermičen proces, ki s kratko trajajočimi pulzi deaktivira mikroorganizme. Celična deaktivacija je povezana s poškodbo membrane. Uporabljeno električno polje inducira površinski membranski potencial celice. Inducirana potencialna razlika na membrani je sorazmerna z velikostjo električnega polja. Ko membranski potencial doseže kritično vrednost (približno 1 V za lipidno dvoslojno membrano), se membrana pretrga. Če električno polje izklopimo pred kritično vrednostjo, se bo membrana vrnila v prvotno stanje.

Različne skupine mikroorganizmov so različno občutljive na električne pulze zaradi različne gradbe membrane in celične stene. Pri tem ima vlogo tudi oblika in velikost celice.

Aronsson s sodelavci (2001) je raziskovala vplive sunkov električnega polja na štiri mikroorganizme: *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* in *Saccharomyces cerevisiae*. Spreminjali so jakost električnega polja, število pulzov in čas delovanja pulza. Vsi štiri mikroorganizmi so bili izpostavljeni tudi temperaturnemu šoku, da bi lahko razlikovali med vplivi sunkov električnega polja in nastale toplote.

Rezultati raziskav kažejo, da je deaktivacija mikroorganizmov povzročena s pulzi električnega polja odvisna od jakosti polja, trajanja pulza in števila pulzov. *E. coli* je veliko manj občutljiva na električne pulze kot *S. cerevisiae*, medtem ko sta *L. innocua* in *L. mesenteroides* najbolj odporna mikroorganizma v raziskavi. Teorija membranskega potenciala trdi, da je inducirani membranski potencial odvisen od velikosti celice. Večja celica ima manjši kritični potencial in je zato tudi najbolj občutljiva. Grahl in Märkl (1996) sta določila kritično jakost električnega polja za *E. coli* (13,7 kV/cm) in *S. cerevisiae* (4,7 kV/cm). Ker so kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* največje med proučevanimi mikroorganizmi, so zato tudi najbolj občutljive. Kljub temu je imelo samo 0,1 % vseh kvasnih celic okvare, ki se jih lahko opazi pod elektronskim mikroskopom. Harrison s sod. je ugotovil, da pretrganje membrane ni najvažnejši dejavnik za inaktivacijo kvasovk (Aronsson in sod., 2001).

Donsi in sodelavci so proučevali mikrobno inaktivacijo kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Glavni parametri proučevanja so bili električna poljska jakost, skupni čas uporabe električnih impulzov in začetna mikrobna koncentracija (Donsi in sod., 2007).

Molinari in sodelavci (2004) so proučevali inaktivacijo treh sevov kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* z pulznim električnim poljem, v različnih fazah rasti in različno začetno velikostjo vcepka. Pogoj je bil električno polje jakosti 8-11 kV/cm. V vseh poskusih se je populacija kvasovk zmanjšala (Molinari in sod., 2004).

### 2.3.14 Vpliv magnetnega polja

V zadnjih 20 letih je bilo veliko raziskav o vplivu magnetnega polja na žive mikroorganizme (Deutmeyer, 2011; Ji, 2009; Fojt, 2009; Okuno, 1991; Motta, 2001; Motta, 2004, Strašak, 2002). Raziskave so pokazale, da magnetno polje vpliva na biološke funkcije organizmov. Do teh sprememb prihaja zaradi spremenjene koncentracije hormonov, spremenjene aktivnosti encimov in sprememb v transportnem sistemu. Strašak in sodelavci (2002) so proučevali vpliv nizkega magnetnega polja na gram negativno bakterije vrste *Escherichia coli*. Med poskusom je skupina raziskovalcev sledila dinamiki rasti bakterij in oksidacijsko redukcijski potencial v homogenem in nehomogenem magnetnem polju. Poskus je potekal pri različnih gostotah magnetnega polja od 2,7-10 mT, poleg tega pa so bili tudi različni časi izpostavljenosti mikroorganizmov magnetnemu polju. Pri poskusu so merili hitrost rasti in aktivnost bakterij. Dokazali so, da magnetno polje vpliva na počasnejšo rast bakterij v eksponencialni fazi rasti v primerjavi s kontrolno kulturo, ki ni bila izpostavljena magnetnemu polju, ostali parametri pa so bili enaki (sobna temperatura, enako kompleksno gojišče na agarnih ploščah). Ugotovljeno je bilo, da magnetno polje na bakterije deluje baktericidno, le del mikroorganizmov magnetno polje ubije, ostali se normalno razvijajo. Teorije, ki poskušajo razložiti, zakaj magnetno polje nekatere bakterije ubije, izhajajo iz domnev, da prihaja do spremembe permeabilnosti ionskih kanalov v membrani in s tem do sprememb v transportnem sistemu. Drugi možen učinek, ki vpliva na umrljivost bakteriji pod vplivom magnetnega polja, pa je nastanek prostih radikalov. Pri prejšnjih preizkusih je bilo dokazano, da magnetno polje ne vpliva na spremembe na DNA (Strašak, 2002).

Gorobets in sodelavci so proučevali vpliv absorpcije bakrovih ionov iz raztopine s kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae* pod vplivom magnetnega polja. Kvasovke so bile pri temperaturi 28 °C gojene v aerobnih razmerah na mineralnem gojišču z 1 % glukoze. Po 27 h so fermentacijsko brozgo filtrirali, sprali s sterilno fiziološko raztopino, kvasovke pa prestavili v raztopino, ki je vsebovala CuSO<sub>4</sub>. Raztopina s kvasovkami je bila nato izpostavljena magnetnemu polju. Eksperiment je pokazal, da so kvasovke, ki so bile izpostavljene magnetnemu polju, iz raztopine odstranile 37 % bakrovih ionov več kot kultura kvasovk, ki ni bila izpostavljena magnetnemu mediju, ampak le mehničnemu mešanju brez magnetnega polja (Prpar, 2006).

Okuno je s sodelavci (1991) proučeval vplive visoke jakosti magnetnega polja na rast bakterij vrste *E. coli*, ki so bile pri 37 °C podvržene homogenemu magnetnemu polju z gostoto magnetnega polja 11,7 T. Bakterije so bile magnetnemu polju izpostavljene v dveh različnih medijih; v kompleksnem in sintetičnem mediju. Vzporedno pa je potekal tudi kontrolni poizkus v obeh medijih pri geomagnetnem polju. Raziskave so pokazale večjo hitrost rasti bakterij v kompleksnem gojišču, ki je bil izpostavljen magnetnemu polju, kot pri bakterijah, ki niso bile izpostavljene magnetnemu polju. V sintetičnem gojišču je bila rast bakterij pod magnetnim poljem v primerjavi s kontrolo počasnejša. Po mnenju raziskovalcev naj bi magnetno polje vplivalo na strukturo in permeabilnost membrane ter konformacijske spremembe v encimih (Okuno in sod., 1991).

Ishizaki je s sodelavci (2001) raziskoval vpliv magnetnega polja na bakterije v celotni rastni krivulji. Že v predhodnih raziskavah je s sodelavci dokazal, da imajo bakterije, ki jih izpostavimo magnetnemu polju, 2- do 25-krat hitrejši razvoj v primerjavi s tistimi, ki niso izpostavljene magnetnemu polju. S tem poizkusom so sledili vplivu magnetnega polja na rast bakterije vrste *E. coli* v celotni rastni krivulji. Jakost nehomogenega magnetnega polja je bila med 5,2 in 6,1 T. Iz poizkusa lahko razberemo, da je med rastjo razlika v številu bakterij v mediju, ki je bil oziroma ni bil izpostavljen magnetnemu polju najmanjša v začetni fazi rasti, medtem ko je v ostalih fazah rasti bakterije viden močan vpliv magnetnega polja na rast (Ishizaki in sod., 2001).

Z raziskovanjem vpliva magnetnega polja na kvasovke se je ukvarjal tudi Motta. Kvasovke vrste *S. cerevisiae* so bile izpostavljene magnetnemu polju z jakostjo 110 in 220 mT. Kvasovke so bile za 24 h izpostavljene magnetnemu polju v sintetičnem tekočem mediju, ki je vseboval 2 % glukoze. Poizkus je potekal pri 25 °C. Med preizkusom so s spektrofotometrom merili nastanjene biomase in sproščanje CO<sub>2</sub>, ki nastaja kot produkt razgradnje sladkorja. Poizkus je pokazal, da je sproščanje CO<sub>2</sub> in večanje biomase pri kvasovkah, ki so izpostavljene magnetnemu polju, večje kot pri kontrolnih fermentacijah, ki potekajo brez prisotnosti magnetnega polja (Motta, 2001).

Motta je podal še nekatera nova odkritja o vplivu magnetnega polja na kvasovke in njihov metabolizem. Med 24-urnim preizkusom, so bile kvasovke vrste *S. cerevisiae* izpostavljene magnetnemu polju jakosti 220 mT. Merili so nastajanje biomase, porabo glukoze ter nastajanje etanola. Kvasovke so bile pred inokulacijo za 18 h pri temperaturi 27 °C postavljene v stresalnik. V fazi eksponencialne rasti pa so jih za 24 h premestili v 120 mL stekleno cevko, kjer je pod vplivom magnetnega polja potekala fermentacija pri temperaturi 24 °C. Vsaki dve uri so odvzemali po 1,5 mL vzorca in določali biomaso, koncentracijo etanola in glukoze. Rezultati raziskave so pokazali, da je poraba glukoze pri izpostavljeni kulturi 1,3-krat večja v primerjavi s kontrolo. Pri poizkusih, ki so jih opravili pod vplivom magnetnega polja, se je porabila skoraj celotna količina sladkorja, medtem ko je pri kontroli v raztopini ostalo približno 10 g/L glukoze v enakem časovnem intervalu. Koncentracija etanola in biomase je bila pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni magnetnemu polju, 3,4- in 3-krat

večja v primerjavi s kontrolno raztopino. Kvasovke so po 24 h pri povečani koncentraciji etanola še vedno kazale naraščajoč trend rasti (Motta, 2004).

Fojt in sodelavci (2009) so poskušali ugotoviti morfološki učinek magnetnega polja na dveh različnih bakterijskih sevih. Odkrili niso nikakršnih sprememb na površini in v obliki celic. (Fojt in sod., 2009)

Magnetno polje na zemlji ima jakost  $5 \cdot 10^{-5}$  T. Magnetno polje se lahko izmeri bodisi z gostoto magnetnega pretoka ali kot jakost magnetnega polja (Funk in sod., 2008).

Ji in sodelavci (2009) so proučevali vpliv statičnega magnetnega polja na bakterije vrste *E. coli*. Kulturo so izpostavili statičnemu magnetnemu polju (450 mT). Ugotovi so, da magnetno polje zavira rast in tudi razmnoževanje (Ji in sod., 2009).

Gomez in sodelavci (2004) poročajo o učinkih rasti, ki jih povzroča statično in sinusno magnetno polje z frekvenco 50 Hz na kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* WS8105-1C. Magnetno polje so generirali s parom tuljav Helmholtz (premer 40 cm) s 154 obrati bakrene žice. Poskusi so bili izvedeni na 0,35 in 2,45 mT, kvasovke pa so bili izpostavljene magnetnemu polju med 24 in 72 h. Rast so spremljali z merjenjem optične gostote pri 600 nm. Ugotovili so, da statično in sinusno magnetno polje 50 Hz (0,35 in 2,45 mT) ne povzročata sprememb v rasti kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* (Gomez in sod., 2004).

Liu in sodelavci (2009) so delali eksperimente pri alkoholni fermentaciji z imobiliziranimi kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae* v magnetnih delcih. Ti imobilizirani magnetni delci, utrjeni v 2 % raztopini  $\text{CaCl}_2$ , so bili stabilni in so imeli visoko aktivnost fermentacije etanola. Na fermentacijo etanola so vplivale začetna hitrost nalaganja delcev, koncentracija sladkorja in stopnja redčenja (Liu in sod., 2009).

Santos in sodelavci 2010, so proučevali učinek magnetnega polja na produkcijo glutationa s kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754. Za nadzor poskusov so opravili tudi eksperimente brez uporabe magnetnega polja. Rezultati so pokazali ugodne spremembe v produkciji glutationa in koncentracije biomase zaradi uporabe magnetnega polja. V vseh poskusih je bila količina proizvedene biomase višja kot v kontrolnih poskusih brez uporabe magnetnega polja. Pravtako je produkcija glutationa višja v poskusih z uporabo magnetnega polja. Najvišja produkcija glutationa in biomase je bila pri magnetnem polju z 25,0 mT za 16 h. Koncentracija glutationa je bila višja za 39 %, koncentracija biomase pa za 19,6 % v primerjavi s kontrolnim vzorcem. S statistično analizo so ugotovili, da je indukcija magnetnega polja pomemben dejavnik pri produkciji oziroma ohranjanju glutationa, prav tako pa so opazili, da z nižjo indukcijo, dosežemo višjo produkcijo glutationa (Santos in sod., 2010).

Strašak s sodelavci (2007) je proučeval vpliv 50 Hz magnetnega polja na rast kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Magnetno polje je ustvarjal s cilindrično tuljavo, ki povzroča magnetno polje gostote do 10 mT. Trajanje izpostavljenosti so spreminjali do 24 min, izpostavljenost pa je potekala pri laboratorijski temperaturi (24-26 °C). Ugotovili so, da magnetno polje zmanjša število kvasovk in upočasnil njihovo rast. Zdi se, da magnetno polje denaturira del kvasovk, vendar večji del njih preživi in nadaljuje rast (Strašak in sod., 2007).

Deutmeyer in sodelavci (2011) so proučevali vpliv statičnega homogenega magnetnega polja in statičnega nehomogenega magnetnega polja. Ugotovili so, da homogeno magnetno polje ne vpliva na rast kvasovk, medtem ko nehomogeno magnetno polje povečuje produkcijo etanola (Deutmeyer in sod., 2011).

## **2.4 MATEMATIČNI MODELI**

Potek alkoholne fermentacije je zanimivo vprašanje že od časa alkimistov. S prvim popisom fermentacije, ki ga je leta 1815 naredil Gay-Lussac, se je začel razvoj modeliranja kinetike fermentacije vina (Radovanovič, 1986). Monod je z enačbo, ki popisuje hitrost rasti mikroorganizma in porabo substrata, postavil temelje za nadaljnji razvoj modeliranja (Monod, 1949). Z modifikacijo Monodove enačbe in nadaljnjim razvojem enačb so se ukvarjali številni raziskovalci, kot so Teissier, Edwards, Luong, Hinshelwood, Ghose, Tyagi, Aiba,... (Blanco in sod., 2005).

Za fermentacijo vina so Cramer in sodelavci (2001) razvili fizikalno-matematični model, kateri napoveduje porabo sladkorja. Osnovan je na eksperimentalnih podatkih z različnimi začetnimi koncentracijami dušika in sladkorja v grozdnem soku. Model temelji na predpostavkah, da je:

- rast kvasovk omejena z dušikom,
- hitrost porabe sladkorja in proizvodnje etanola izključno povezana s številom živih celic in
- hitrost odmiranja celic sorazmerna vsebnosti alkohola (Cramer in sod., 2001).

Pizzaro in sodelavci (2007) so naredili model, zasnovan na kinetiki sladkorja in stehiometrije, kateri je opisal anaerobni metabolizem kvasovk vrste *S. cerevisiae*. Model se je uporabil za napoved normalne in počasne fermentacije pri običajnih fermentacijskih razmerah. Vpliv temperature in začetne koncentracije dušika sta bila modelirana s faktorjem učinkovitosti. Model vsebuje malo parametrov za tvorbo glukoze, fruktoze in etanola v laboratorijski in industrijski fermentaciji (Pizzaro in sod., 2007).

Scaglia in sodelavci (2009) so razvili izboljšan fenomenološki model, ki popisuje fermentacijo mošta v mešalnem bioreaktorju pod vodenimi razmerami in konstantno temperaturo. Model dobro napoveduje spreminjanje bioprocenih spremenljivk (Scaglia in sod., 2009).

Prav tako so se s popisom temperature ukvarjali tudi Tronchoni in sodelavci (2009), ki so proučevali vpliv temperature, v območju od 12 °C - 28 °C, na porabo glukoze in fruktoze. Z različnimi matematičnimi krivuljami (sigmoidna, eksponentna in linearno padajoča funkcija) so poskušali popisati dobljene podatke o porabi sladkorja (Tronchoni in sod., 2009).

Kinetika nastajanja biomase je bila predmet proučevanja Gutiérreza in njegovih sodelavcev (2010). Za popis rastnih krivulj so uporabili že obstoječe modele, kateri so vsebovali inhibicijske faktorje za biomaso in substrat. Eksperimentalne razmere so bili enaki kot v tehnologiji pridelave vin. Predlagani model dobro opiše eksperimentalne podatke za rast biomase, nastajanje glicerola in acetaldehida (Gutiérrez in sod., 2010).

Poleg temperature in različnih začetnih koncentracij sladkorja lahko modeli upoštevajo tudi vsebnost dušika. S takim modelom so se ukvarjali Coleman in sodelavci (2007). Ugotovili so, da lahko neprimerna temperatura in nezadostna količina dušika povzročita počasnejšo fermentacijo (Coleman in sod., 2007).

Vmesna stopnja med nestrukturiranim in strukturiranim modelom je model črne skrinje (black box). Alkoholno fermentacijo sta z modelom črne skrinje popisala Roels (Roels, 1983) in Nissen (Nissen in sod., 1997) v svojih delih.

Nadgradnja modelov črnih skrinj so strukturni modeli. Ti modeli, ki temeljijo na metabolizmu mikroorganizma, se v zadnjem času vedno bolj uporabljajo. Nadgradnja strukturnih modelov so modeli, ki v svojem popisu upoštevajo tudi encime in njihovo kinetiko.

Kinetiko in čas fermentacije lahko opišemo kot funkcijo sestave mošta in temperaturnih razmer. Goelzer in sodelavci (2008) so razvili programsko opremo, zasnovano na fiziološkem modelu aktivnosti kvasovk, kateri je vseboval tudi matematični model prenosa toplote (Goelzer in sod., 2008).

Vargas je s sodelavci (2011) potrdil model, ki povezuje genski zapis in metabolne poti, z uporabo kinetičnih zvez. Model, ki ga je razvil, lahko služi za nadaljnji razvoj metabolnega inženirstva, katerega cilj je napovedovanje vsebnosti etanola v mešalnih bioreaktorjih (Vargas in sod., 2011).

## **MATEMATIČNI MODELI**

K matematičnemu modeliranju lahko v glavnem prispevamo na dva osnovna, med seboj bistveno različna načina, tretji pristop pa predstavlja kombinacijo prvih dveh. Na osnovi teh pristopov lahko razdelimo matematične modele na (Plazl, 2004):

- mehanistične
- eksperimentalne in
- kombinirane

### **2.4.1 Mehanistični model**

Mehanistične modele predstavljajo tisti modeli, ki so inženirju razumljivi, in ki direktno ne uporabijo nobene meritve sistema. Seveda pa tovrstni modeli uporabljajo meritve sistema posredno za določitev vrednosti procesnih parametrov. Razvoj mehanističnih modelov temelji na osnovi matematičnega zapisa naravnih fenomenov oz. pojavov in mehanizmov, kot so prenos snovi, toplote in gibalne količine. Za mehanistične izraze se uporablja izraz fenomenološki oziroma teoretični modeli. V literaturi je za tovrstne modele uveljavljen tudi naziv v originalu *white box models* (Plazl, 2004).

### **2.4.2 Eksperimentalni model**

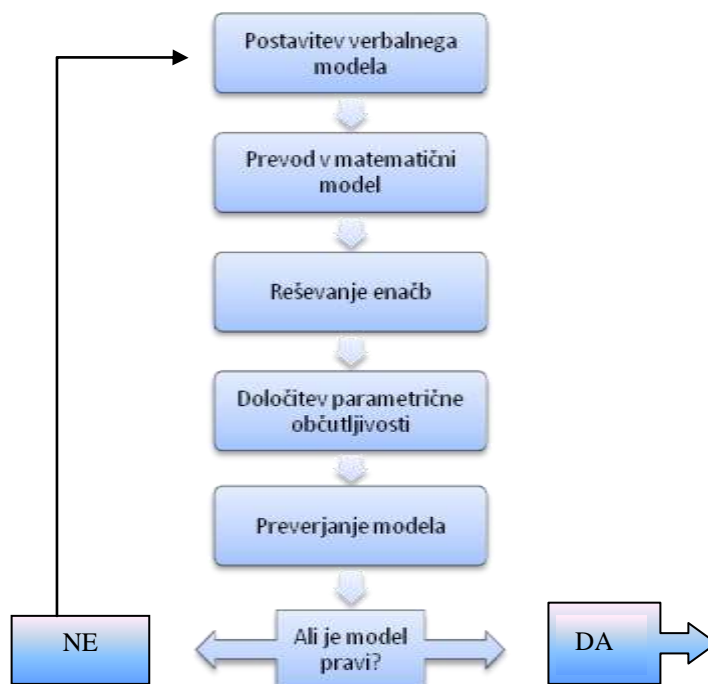
Drugi, alternativni pristop mehanističnega razvoja matematičnega modela je posledica pomanjkanja inženirskega znanja o realnem procesu. V tem primeru uporabimo za izgradnjo modela izmerjene podatke vhodov in izhodov procesnega sistema. Matematično strukturo in njene parametre določimo tako, da so odzivi modela čimbolj podobni merjenim odzivom ob enakih vodenih razmerah. Glavna naloga tovrstnega modeliranja je torej zbiranje uporabnih informacij za identifikacijo modela, ki so posledica stimuliranja oz. vzbujanja sistema. Ker je spoznavanje procesa možno le na osnovi eksperimentalnih podatkov oz. vhodno-izhodnih informacij, ne pa tudi iz osnovnih fizikalno-kemijskih mehanizmov, se tovrstni modeli imenujejo eksperimentalni modeli oziroma modeli črnih skrinj - *black box models*. Eksperimentalni modeli se uporabljajo na zelo različnih področjih, zavedati pa se moramo, da so uporabni le kot celota (Plazl, 2004).

### **2.4.3 Kombiniran model**

Modeli, ki so po svoji naravi in značilnosti zgolj mehanistični ali eksperimentalni, so v procesnem inženirstvu zelo redki. V praksi se v večini uporablja kombinirano modeliranje, ki temelji na dobrih lastnostih mehanističnega in eksperimentalnega pristopa k izgradnji

modelov. Te kombinirane modele imenujemo tudi modeli sivih skrinj - *grey box models* (Plazl, 2004).

Matematični model lahko definiramo kot niz odnosov med našim interesom in študijem sistema. Ni nujno, da so ti odnosi v obliki enačb, lahko so v obliki tabel, grafov,... Sistematični pristop k modeliranju je razvrščen v šest korakov postopka modeliranja, ki so shematsko prikazani na sliki 9:



**Slika 9:** Koraki sistematičnega pristopa k izgradnji modela (prirejeno po Roels, 1983)

Za modeliranje celokupnih procesov (npr. rast mikroorganizma in tvorba produkta) ni treba v celoti in natančno opisati posameznih metabolnih poti, saj izjemna kompleksnost in medsebojna odvisnost teh reakcij to praktično onemogočata. Običajno se v modelih, ki opisujejo rast, cele metabolne poti združujejo v posamezne reakcije, v nekaterih primerih pa je celoten proces rasti opisan z eno samo reakcijo. Ključna za pravilno modeliranje mikrobnih procesov je določitev najpomembnejših reakcij, vključno z njihovo stehiometrijo, ter reakcijske kinetike. Skladno z osnovnim namenom modeliranja je zelo primerna uporaba makroskopskega in nestrukturiranega opisa, ki predstavlja tipično inženirsko aproksimacijo za opis kinetike rasti povprečne celice v populaciji celic (Plazl, 2004).

Biokemijski sistem lahko ločimo na dva interakcijska podsistema. To sta biološka faza ali mikroorganizem in okoliška faza ali medij (hranljiva podlaga). Mikroorganizem porablja

substrat in ga pretvarja v produkt. Pri tem sprošča toploto, katera se sprošča v okoliški medij, ki pa ima za cilj ohranjanje konstantne temperature. Kot posledica interakcij med tema fazama lahko pride do dodatnih učinkov, kot so spreminjanje pH, ionske jakosti, reoloških sprememb,... Če se bolj poglobimo v analizo biokemijskega sistema, pridemo na nivo posameznih stopenj, katere predstavljajo kompleksen in večkomponentni sistem, kateri je povrhu velikokrat še nehomogen. Tu se odvija veliko število kemijskih reakcij. Poleg tega lahko pride do cele vrste genetskih sprememb na mikroorganizmu, s čimer se celokupna situacija še bolj zaplete. Upoštevati je potrebno še različno starost celic. Vse to vodi do zaključka, da je nerealno iskati tak kinetični model, kateri bi vseboval vse lastnosti nekega sistema. Zato je potrebno poiskati model, kateri bi na čim bolj enostaven in čim bolj realen način opisal proučevan proces (Mamilović, 1990).

### **VRSTE MATEMATIČNEGA MODELA**

Fermentacijske modele lahko grobo razdelimo na štiri skupine, glede na njihov obseg podatkov v modelu. Najenostavnejši opis je tako imenovan nestrukturiran model, kjer je biomasa opisana kot ena sama spremenljivka (pogosto celokupna koncentracija biomase) in kjer ni upoštevno ločevanje med celicami. To pomeni, da se predpostavi homogeno populacijo celic. Te modele lahko naprej razširimo v ločene modele, kjer so posamezne celice v populaciji opisane kot spremenljivka. V strukturiranih modelih pa je biomasa opisana z več kot eno spremenljivko; upošteva se struktura biomase (Nielsen, 2003).

### **ENAČBA HITROSTI PRODUKCIJE BIOMASE**

Kadar so izpolnjeni vsi pogoji za razvoj mikroorganizma, se lahko postavi izraz, v katerem je hitrost rasti proporcionalna koncentraciji biomase  $X$  (Monod, 1949):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (10)$$

$\mu$  = specifična hitrost rasti, (1/h)

Zgornji izraz pri konstantni specifični hitrosti rasti  $\mu$ , lahko enostavno integriramo in dobimo:

$$X = X_0 \exp(\mu t) \quad (11)$$

Ta izraz prikazuje eksponentno obliko rasti. Kadar razmere, v katerih se razvija mikroorganizem, niso konstantni (šaržni proces), zgornji izraz ni zadovoljiv. Do odstopanja od eksponentne oblike pride zaradi padanja koncentracije hranljive snovi ali naraščanja koncentracije snovi, katere so toksične za mikroorganizem. Z drugimi besedami to pomeni, da specifična hitrost rasti  $\mu$  zaradi raznih inhibicijskih efektov zmanjšuje svojo vrednost s časom, od maksimalne vrednosti do nič (Žnidaršič Plazl, 2005).

Monodov model (1942), ki je osnovan na empiričnih opažanjih, da se specifična hitrost rasti biomase  $\mu$  pri majhnih koncentracijah limitnega substrata  $S$  zmanjša, je povsem analogen encimski kinetiki Michaelisa in Mentenove (Žnidaršič Plazl, 2005):

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad (12)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} X \quad (13)$$

$\mu_{max}$  = maksimalna specifična hitrost rasti mikroorganizma (1/h)

$K_S$  = afiniteta mikroorganizma do substrata, konstanta nasičenja ( $\text{kg}/\text{m}^3$ )

$K_S$  je empirično določena vrednost, ki ne predstavlja konstante nasičenja za porabo substrata, temveč je celokupna konstanta nasičenja za celoten proces rasti.

### **ENAČBA HITROSTI NASTAJANJA PRODUKTA**

Najenostavnejši izraz za hitrost nastajanja produkta velja v primerih, ko je poznana stehiometrijska zveza med hitrostjo nastajanja produkta in hitrosti porabe substrata ali hitrosti nastajanja biomase. V tem primeru lahko zapišemo:

$$\frac{dP}{dt} = - \frac{1}{(Y_{P/S})} \frac{dS}{dt} \quad (14)$$

oziroma

$$\frac{dP}{dt} = \frac{1}{Y_{P/X}} \frac{dX}{dt} \quad (15)$$

To je tako imenovani tip fermentacije po Gadenu (Gaden, 1959).

## ENAČBA HITROSTI PORABE SUBSTRATA

Mikroorganizem potrebuje substrat za opravljanje treh glavnih funkcij:

- Sinteze novega celičnega materiala
- Sinteze ekstracelularnih produktov
- Oskrba z energijo, s katerimi se obdržijo funkcije mikroorganizma

Najenostavnejši primer enačbe za hitrost porabe substrata je enačba, katera vzame v obzir Monodovo kinetiko. Predpostavimo, da je poraba substrata linearno povezana z rastjo biomase preko izkoristka  $Y_{x/s}$ , ki je konstanten v času bioprocesa, kar zapišemo:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} \quad (16)$$

V primeru eksponentne rasti lahko privzamemo, da je  $Y_{x/s}$  konstanten, v realnih procesih pa je  $Y_{x/s}$  zelo kompleksna funkcija obratovalnih razmer, ki se med procesom spreminja. Omenimo še, da lahko izkoristek, kot je definiran, vedno preverimo med eksperimentom in je tako dober pokazatelj dogajanja med rastjo.

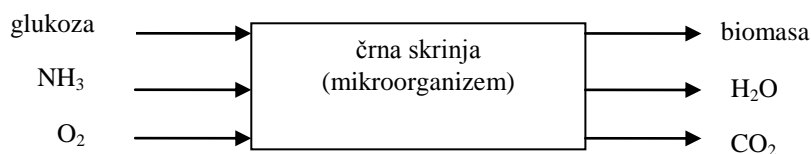
Če upoštevamo še porabo substrata za vzdrževanje procesov v celicah, dobimo naslednji izraz:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \frac{dX}{dt} - m_s X \quad (17)$$

$m_s$  = koeficient vzdrževanja ( $\text{kg}_{\text{substrata}}/\text{kg}_{\text{biomase h}}$ )

### 2.4.4 Biokemijske reakcijske mreže – Modeli črne skrinje

Najprej si oglejmo model, ki predpostavlja, da je mikroorganizem črna skrinja, za katero ne vemo, kaj se dogaja v njej (nestrukturirani model). Primer preprostega sistema, kjer obravnavamo mikroorganizem kot črno skrinjo, je prikazan na sliki 10. Imamo en vir ogljika (glukoza), en vir dušika (amonijak), sprejemnika elektronov ( $\text{O}_2$ ) in produkte: biomaso,  $\text{CO}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$ .



**Slika 10:** Primer sistema, kjer obravnavamo mikroorganizem kot črno skrinjo.

Na osnovi tega lahko zapišemo elementarno matriko sistema. Matrika, pomnožena z vektorjem hitrosti porabe / nastanka komponent, da vrednost 0 (zaradi ohranitve kemijskih elementov), kar lahko zapišemo:

$$E \cdot q = 0 \quad (18)$$

ELEMENTARNA MATRIKA							HITROST PORABE / NASTANKA	
(E)							(q <sub>i</sub> )	
	biomasa	glukoza	NH <sub>3</sub>	O <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O		
C	1	1	0	0	1	0	•	q <sub>biomasa</sub>
H	1,8	2	3	0	0	2		q <sub>glukoza</sub>
N	0,2	0	1	0	0	0		q <sub>NH<sub>3</sub></sub>
O	0,5	1	0	2	2	1		q <sub>O<sub>2</sub></sub>
								q <sub>CO<sub>2</sub></sub>
							q <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	= 0

Navadno normiramo komponente, ki vsebujejo ogljik, na 1 ogljikov atom. Rešitev te matrične enačbe je sistem povezav med posameznimi hitrostmi tvorbe oziroma porabe komponent in je iskani model (Podgornik, 1996).

Za reševanje modela črne skrinje elementarno matriko E razdelimo na dve podmatriki. Izberemo komponente, katere lahko izmerimo in tiste, ki jih želimo izračunati. Matriko razdelimo na dve podmatriki, kateri pomnožimo s pripadajočimi fluksi (q<sub>m</sub> za merjene flukse in q<sub>c</sub> za računane). Prva podmatrika je sestavljena iz merljivih komponent (E<sub>m</sub>), druga pa iz spojin, ki jih želimo izmeriti (E<sub>c</sub>).

$$E_m q_m + E_c q_c = 0 \quad (19)$$

Ko je število merjenih hitrosti enako prostostni stopnji, je E<sub>c</sub> kvadratna matrika in je rang E<sub>c</sub> enak številu fluksov, ki jih lahko izračunamo. Poleg omenjenega pogoja determinanta E<sub>c</sub> ne sme biti enaka 0. V primeru, da imamo oba omenjena pogoja, lahko izračunamo flukse q<sub>c</sub> po sledeči enačbi (Nielsen, 2011):

$$q_c = -(E_c)^{-1} \cdot (E_m) \cdot q_m \quad (20)$$

Poleg kemijskih elementov lahko vključimo v elementarno matriko tudi naboj komponent. To je še posebej uporabno, če želimo uporabiti vrednost pH za napovedovanje poteka nekaterih spojin.

Ta način modeliranja ima še druge prednosti:

- ugotovimo lahko, ali so zajete vse potrebne spojine,
- ugotovimo, katere spojine moramo meriti,
- preverjamo pravilnost delovanja senzorjev (v vsakem trenutku mora biti nekega atoma 100 %)
- sklepamo lahko na sestavo nezajete spojine, ki je v modelu prvotno nismo upoštevali.

Slabost teh modelov pa je v tem, da navadno zahtevajo mnogo meritev, ki jih težko izvajamo (Podgornik, 1996).

## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Mikroorganizem

Za fermentacije mošta v vino sem uporabil starter kulturo, seve kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* ANCHOR VIN 7, ANCHOR NT116 in ANCHOR NT202.

#### 3.1.2 Substrat

Uporabil sem grozdni mošt sorte Sauvignon iz vinorodnega okoliša Štajerska Slovenija (Vinska klet Ptuj). Moštu sem dodal biološki aktivator GO-FERM (Danstar Ferment AG, Švica) v koncentraciji 0,3 g/L. Moštu, ki sem ga uporabil za fermentacije v laboratorijskem merilu, nisem dodajal žveplovega dioksida. Mošt ni bil filtriran pred postopkom izvedbe fermentacije. Grozdni mošt je bil do uporabe zamrznjen pri temperaturi -20 °C.

#### 3.1.3 Kemikalije

**Spojine standarda za umeritev HPLC sistema:**

- glukoza, (Sigma Aldrich, St. Luis, ZDA, PA) ( $\geq 99,5$  %)
- fruktoza, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA) (99 %)
- glicerol, (Kemika, Zagreb, Hrvaška, PA)
- etanol, (Sigma Aldrich, St. Luis, ZDA, PA) (99,5 %)
- vinska kislina, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA) (99,5 %)
- jabolčna kislina, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA) (99,5 %)
- mlečna kislina, (Sigma Aldrich, St. Luis, ZDA, PA) ( $\geq 98$  %)
- očetna kislina, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA) (99,5 %)

**Spojine za določitev glutationa:**

- metanol (Sigma Aldrich, St. Luis, ZDA, PA) ( $\geq 99,9$  %)
- interni standard (*N*-acetil-L-cistein) 27 mg/L
- natrijev acetat

**Mobilna faza za HPLC sistem:**

- demineralizirana voda

### **Podatki o biološkem aktivatorju:**

#### **- GO-FERM:**

Sestava: deaktivirane kvasovke, vitamini (pantotenat, biotin), mikroelementi (cink, mangan), aminokisliline

Proizvajalec: Danstar Ferment AG, Alpenstrasse 12, 6300 Zug, Švica

Uvoznik: Mikro+Polo d.o.o., Zagrebška cesta 22, 2000 Maribor

Distributer: Jurana d.o.o., Limburška cesta 64a, 2000 Maribor

#### **- Fermaid E Blanc:**

Sestava: deaktivirane kvasovke, diamonijev fosfat, amonijev sulfat, tiamin hidroklorid

Proizvajalec: Danstar Ferment AG, Alpenstrasse 12, 6300 Zug, Švica

Uvoznik: Mikro+Polo d.o.o., Zagrebška cesta 22, 2000 Maribor

Distributer: Jurana d.o.o., Limburška cesta 64a, 2000 Maribor

### **Podatki o glutationu:**

- L-glutation reduciran, (SIGMA-ALDRICH, Japonska)

Pri študiji vpliva magnetnega polja na glutation je bil moštu dodan glutation v koncentraciji 50 mg/L.

## **3.1.4 Oprema**

### **Bioreaktor:**

10 L mešalni bioreaktor (STR), (Chemap AG, Švica), s standardno konfiguracijo, s tremi diskastimi Rushtonovimi turbinami.

### **Instrumentacija bioreaktorja**

- redoks elektroda (Mettler Toledo, Švica), pH elektroda (Mettler Toledo, Švica).
- Računalniška kontrola in zajem podatkov Consort D130 (Belgija) in VisiDAQ-Genie, Professional V3.11 (Advantech).
- Refluks hladilnik



**Slika 11:** 10 L mešalni bioreaktor v magnetnem polju  
(Chemap AG, Švica)

Med fermentacijo sem *on-line* spremljal redoks potencial, pH in temperaturo (kontrolni sistem in program Consort D130), ter koncentracijo ogljikovega dioksida v plinski fazi (računalniška kontrola VisiDAQ-Genie). Reaktorji so bili opremljeni s sterilizabilnimi Mettler Toledo pH elektrodami, redoks elektrodami in avtomatsko enoto za kontrolo in regulacijo temperature ter refluks hladilnikom.

Kinetiko razgradnje substratov in nastanka metabolitov sem zasledoval *off-line* s tekočinsko kromatografijo (HPLC).

Zaradi intenzivnega vrenja je bilo potrebno uporabiti na vrhu bioreaktorja refluks hladilnik, ki preprečuje izgubo aromatičnih snovi, ki tvorijo bogastvo vinske cvetice in bi jih intenziven tok 100 % vlažnega ogljikovega dioksida odnašal iz nastajajočega vina. Na refluks hladilnik je bil povezan tudi merilnik, s katerim sem meril koncentracijo ogljikovega dioksida nad raztopino mošta. Ker je bil tok ogljikovega dioksida med vrenjem intenziven in bi bil prevelik za merilno območje merilnika, sem površino substrata prepiloval s konstantnim pretokom 0,5 L/min plinastega dušika. Pri izvedbi fermentacij sem uporabil tudi prepilovanje površine nad tekočim substratom s plinastim dušikom ter tako preprečil nezaželeno oksidacijo.

#### **- HPLC izokratski sistem:**

HPLC izokratski sistem sestavlja: HPLC črpalka Knauer tipa 364.00, injekcijski ventil z 20 µL injekcijsko zanko, kolona Phenomenex Rezex RHM Monosaccharide H+ (00H-0132-K0), RI diferencialni refraktometer (Knauer, Berlin, Nemčija) in UV-VIS detektor (Knauer, Berlin, Nemčija). Sistem je bil podprt z računalnikom s programsko opremo za zajemanje in obdelavo podatkov Eurochrom 2000.

**Tehnica Sartorius 1872 MP 8-2, Švica**

#### **Merjenje biomase:**

- nuča in oprema za nučiranje
- pipeta (25 mL)
- filter papir (velikost por 0,45 µm)
- avtomatska tehnica s segrevanjem Mettler Toledo HR83

#### **Določitev glutationa**

- epruvete (20 mL)
- pipete (0,5 mL, 2 mL)
- filter papir (velikost por 0,45 µm)
- viala

#### **Oprema za indukcijo galvanskega polja**

- generator električnega toka LBK, Švedska
- generator magnetnega polja - napajalnik HP 6554A
- tuljava

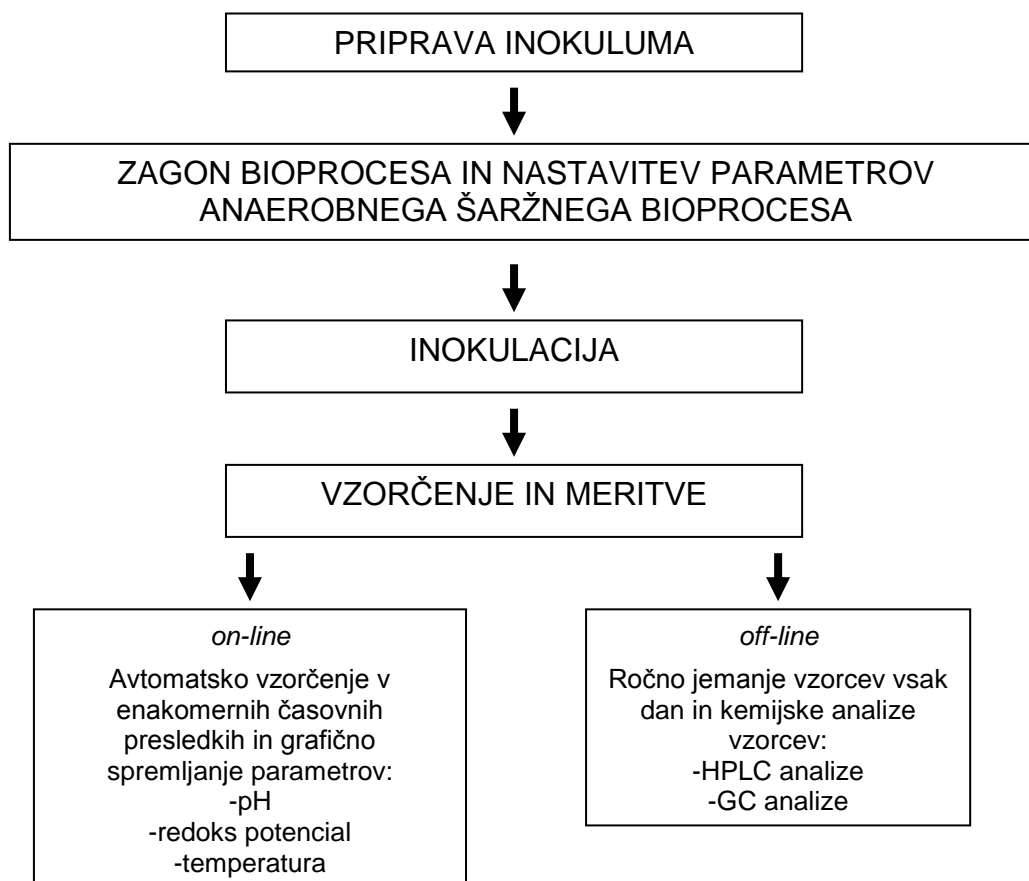
**Inkubator:** Innova 4230, ZDA

**Računalniški program:** Berkeley Madonna™

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Fermentacija

Potek eksperimentalnega dela:



Slika 12: Shema poteka eksperimentalnega dela

#### Priprava starter kulture

Vcepek sem pripravil tako, da sem v 30 mL destilirane vode in 30 mL mošta dodal 3 g (0,3 g/L) GO-FERM-a ter 3 g (0,3 g/L) starter kulture kvasovk vrste *Sacharomyces cerevisiae*. Vcepek sem rehidriral 20 min pri temperaturi 35 °C. Po 20 min sem vcepku dodal 60 mL mošta (temperatura 18°C), ter počakal 20 min. Nato pa dodal še 120 mL mošta, ter spet počakal 20 min. Tako pripravljen vcepek sem nato dal v bioreaktor.

#### Kalibracija pH in redoks merilnih instrumentov

Kalibracijo pH in redoks merilnih instrumentov in elektrod sem izvedel s pomočjo kalibracijskih pufrov (pH 2/4; ORP 220/468 mV) po dvotočkovnem postopku s pomočjo sistema Consort D130.

### **Inokulacija substrata:**

Grozdni mošt sem pretočil v bioreaktor, ga ogrel na temperaturo fermentacije (15, 18, 20, 25 °C) in inokuliral s pripravljeno starter kulturo. Površino nad gladino grozdnega mošta sem prepiloval z dušikom ter s tem preprečil dostop kisika in nezaželeno oksidacijo.

## **3.2.2 Analitske metode**

### **3.2.2.1 Določanje suhe biomase**

Iz bioreaktorja sem odvzel 25 mL vzorca, ter ga s pomočjo nuče prefiltriral skozi membranski filter z velikostjo por 0,45 µm, ki sem ga predhodno stehtal. Filter papir z biomaso sem sušil pri konstantni temperaturi 105 °C in stehtal na avtomatski tehnici s segrevanjem Mettler Toledo HR83.

Koncentracijo suhe biomase sem izračunal po enačbi:

$$X \text{ (g/L)} = \frac{b-a}{V} \quad (21)$$

*a*...masa filter papirja (g)

*b*...masa filter papirja z vzorcem (g)

*V*...volumen vzorca (mL)

### **3.2.2.2 HPLC analiza**

S pomočjo HPLC analize sem v okviru izokratskega HPLC sistema kvalitativno in kvantitativno določil koncentracije reducirajočih sladkorjev (glukoze in fruktoze), glicerola, etanola in vsebnost organskih kislin (vinske, jabolčne, mlečne, očetne). Reducirajoče sladkorje, glicerol in etanol sem meril z RI diferencialnim refraktometrom, kisline pa z UV-VIS detektorjem.

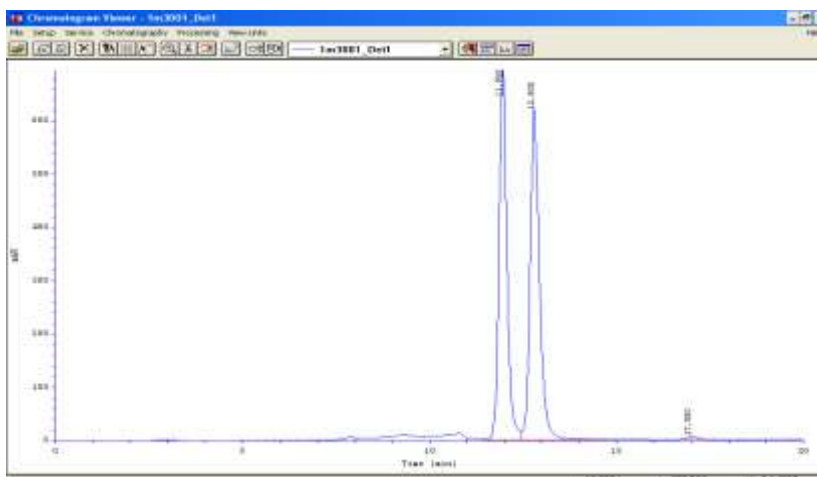
Ob tem sem določil zadrževalne čase in optimalno ločevanje komponent. Koncentracije sem določeval s pomočjo metode zunanjih standardov. S pripravo standardov različnih koncentracij za posamezne spojine sem izdelal umeritvene krivulje spojin. Izračunal sem naklone premic umeritvenih krivulj standardov in preko njih preračunal koncentracije merjenih spojin v preiskovanih vzorcih po enačbi:

$$c_i = A_i \cdot F_i \quad (22)$$

*c<sub>i</sub>*...koncentracija spojine v vzorcu

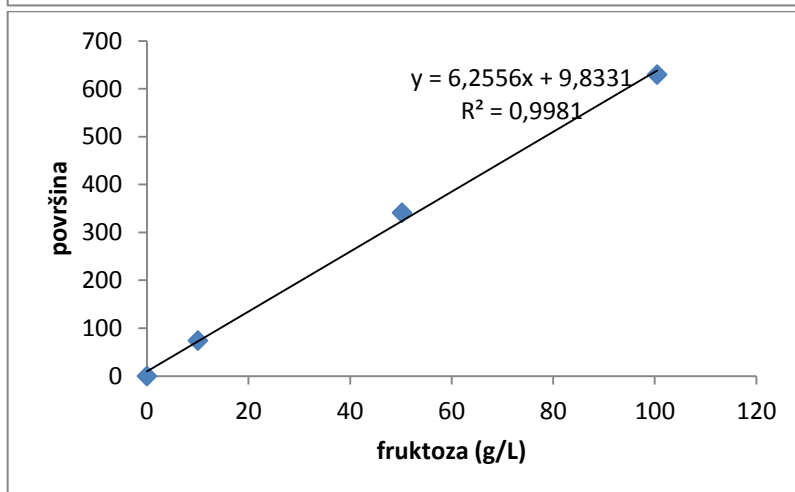
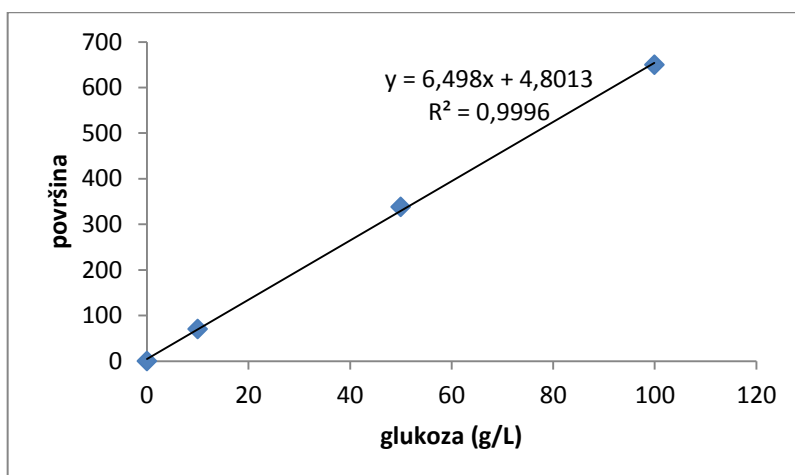
*A<sub>i</sub>*...ploščina kromatografskega vrha spojine

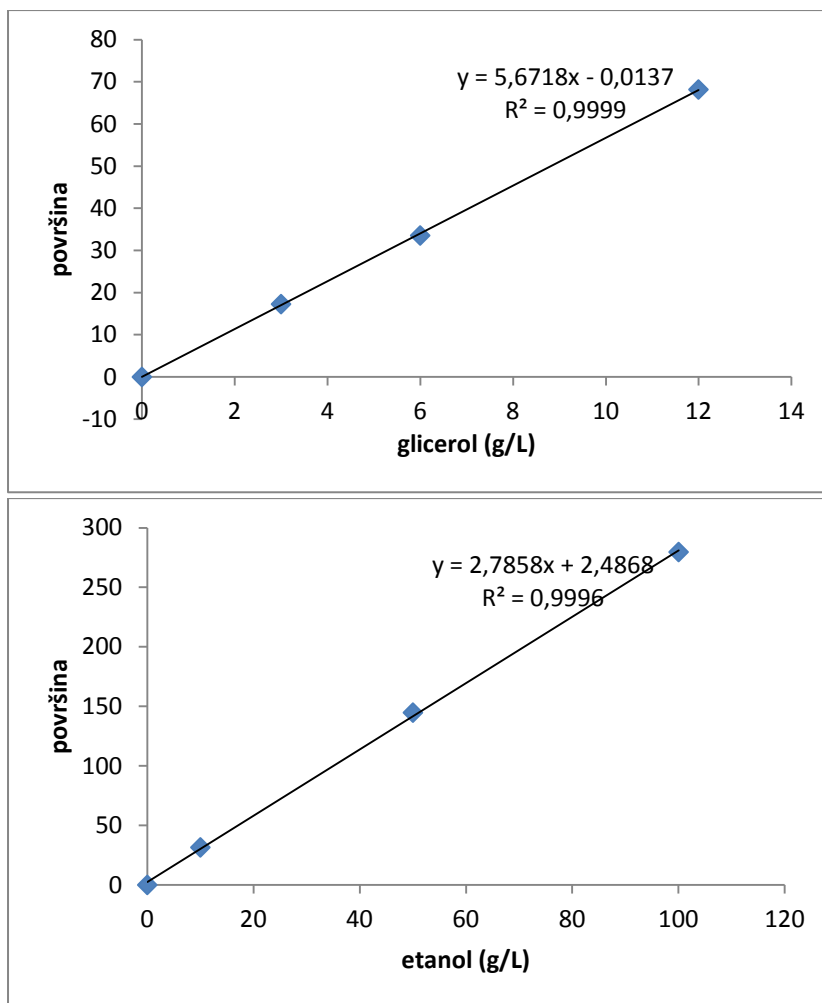
*F<sub>i</sub>*...koeficient umeritvene krivulje



**Slika 13:** HPLC meritve (glukoza, fruktoza, glicerol)

Za ločevanje sem uporabil kolono Phenomenex Rezex RHM Monosaccharide H+ (300 x 7,8 mm). Kot mobilno fazo sem uporabil demineralizirano vodo. Pretok mobilne faze je bil 0,5 mL/min, temperatura kolone pa 65 °C. Vzorce fermentacijske brozge sem pred vnosom v HPLC filtriral s filtri (velikost por 0,45 µm) in po potrebi razredčil.





**Graf 1- 4:** Umeritvene krivulje spojin za HPLC analizo

### 3.2.2.3 Plinska kromatografija (GC)

Višje alkohole sem določeval s pomočjo plinskega kromatografa Hewlett Packard 6890, Nemčija. Vzorce sem predhodno predestiliral ter filtriral s filtri (velikost por 45  $\mu\text{m}$ ), ter jih analiziral s plinskim kromatografom. Kvalitativno in kvantitativno sem določal prisotnost višjih alkoholov, ki v vini predstavljajo prekurzorje arome: 1-propanol, 2-butanol in izoamilalkohol (3-metil-1-butanol). Z isto metodo sem določal tudi prisotnost acetaldehida v vinu. Koncentracije višjih alkoholov in acetaldehida sem preračunal iz rezultatov grafično-integracijskega zapisa iz plinskega kromatografa.

Tlak plinov med procesom določitve je bil:  $\text{N}_2$  (Messer, Avstrija) 5 bar,  $\text{H}_2$  (Messer, Avstrija) 5 bar, zrak (Messer, Avstrija) 5 bar. Kolona za ločevanje je bila HP-INNOWAX crosslynked polietilenglikol, Nemčija. Uporabil sem plamensko-ionizacijski detektor (FID).

Najugodnejši temperaturno-časovni profil kolone za ločevanje v mojem primeru je bil:

- začetna temperatura: 40 °C, 3 min,
- korak dviga temperature: 25 °C/min,
- končna temperatura 180 °C, 3 min.

Temperatura injektorja je bila 180 °C, temperatura detektorja pa 200 °C.

S pripravo standardov različnih koncentracij za posamezne spojine sem izdelal umeritvene krivulje spojin. Izračunal sem naklone premic umeritvenih krivulj standardov in preko njih preračunal koncentracije merjenih spojin v preiskovanih vzorcih.

### 3.2.2.4 Določanje glutationa s HPLC analizo (Janeš in sod., 2010)

#### Priprava vzorca za HPLC analizo:

V 20 mL epruveto sem dal približno 17,5 mL metanola in dodal 0,2 mL internega standarda. Prvo sem dodal 2 mL vzorca in nato še metanol do skupnega volumna 20 mL. Raztopino sem filtriral s filtrom (velikost por 0,45 µm). Nato sem v vialo odpipetiral 0,5 mL filtrata in temu dodal 0,5 mL natrijevega acetata. Vzorec je tako pripravljen za HPLC analizo z detekcijo fluorescence.

Analize glutationa so bile opravljene na Kmetijskem inštitutu Slovenije.

### 3.2.2.5 Spremljanje tvorbe CO<sub>2</sub>

Med fermentacijo v steklenih fermentorjih sem spremljal sproščanje CO<sub>2</sub>. Količino sproščenega CO<sub>2</sub> sem določil z merjenjem izgube mase bioreaktorja pred posameznim vzorčenjem (Dixon in Kell, 1989).

### 3.2.2.6 Odvzem in shranjevanje vzorcev

Volumen vzorca fermentacijske brozge ob vzorčenju je bil okrog 100 mL. Po odvzemu sem vzorec filtriral skozi beli filtrirni trak, filtrat pa sem shranil v prahovki pri temperaturi -20 °C.

### 3.2.2.7 Simulacija modelov

Simulacije modelov so bile narejene z matematičnim orodjem Berkeley Madonna™. Berkeley Madonna je program za numerično reševanje sistemov navadnih diferencialnih enačb.

### 3.2.2.8 Statistična obdelava rezultatov

Eksperimente sem izvajal v treh paralelkah. Izračunal sem povprečne vrednosti posameznih rezultatov X:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (23)$$

n...število vzorcev

X<sub>i</sub>...vrednost i-te meritve

## 4. REZULTATI Z RAZPRAVO

Meritve redoks potenciala v tehnologiji vinarstva predstavljajo tehnološko uporabno indikacijo fiziološke aktivnosti kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Na vrednost redoks potenciala med procesom fermentacije v največji meri vplivajo produkti njihovega metabolizma. Z ozirom na reduktivnost in oksidativnost v moštih in vinih, lahko meritve redoks potenciala omogočijo relativno enostaven in hiter vpogled v stanje stabilnosti vina. Redoks potencial predstavlja stabilen in karakterističen signal poteka fermentacije.

V alkoholni fermentaciji grozdnega mošta sem preučil povezavo med potekom fermentacijskega procesa, kakovostjo končnega produkta in potekom redoks potenciala. Dobljene podatke sem uredil in uporabil za vodenje procesa fermentacije.

### 4.1 VPLIV TEMPERATURE NA POTEK FERMENTACIJE

Temperatura predstavlja tisti fizikalni parameter, ki spada med najpomembnejše procesne spremenljivke, ki lahko vplivajo na potek fermentacije in na kakovost končnega produkta. Za delovanje vinskih kvasovk je temperatura izrednega pomena, saj vpliva na njeno rast in s tem na samo trajanje fermentacije. Alkoholna fermentacija se pri nizki temperaturi upočasni in povzroči zastoj procesa, previsoke temperature pa sicer pospešijo fermentacijo, vendar jo lahko zaradi motenja delovanja encimov in membran kvasovk tudi zaustavijo (Bavčar, 2009).

V prvem delu raziskovalnega dela sem med fermentacijo mošta sorte sauvignon študiral vpliv temperature na potek fermentacije in metabolizem kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*.

Iz rezultatov eksperimentov dela fermentacij pri različnih temperaturah je dobro razvidno naraščanje encimske in metabolne aktivnosti z dvigom temperature fermentacije.

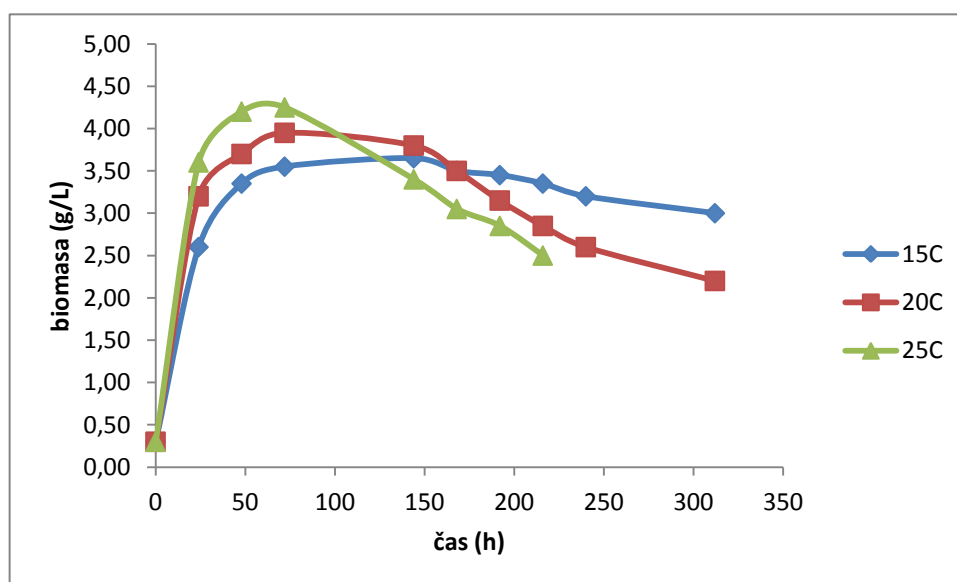
V temperaturnem območju od 15 do 35 °C velja, da višja temperatura v korelaciji z Arrheniusovo temperaturno odvisnostjo povzroči hitrejši potek fermentacije in s tem tudi hitrejšo kinetiko ter hitrejši metabolizem sladkorjev. Pri višjih ali visokih temperaturah del celic kvasne populacije odmre, to so običajno premlade ali prestare celice, ki niso odporne na temperaturne spremembe. Nižje temperature pa preživi večje število delujočih kvasnih celic, zato je njihova koncentracija ob koncu fermentacije večja. Iz tega sledi, da je ostanek reducirajočih sladkorjev ob koncu fermentacije obratno proporcionalen s fermentacijsko temperaturo (Boulton, 1996). Temperatura fermentacije vpliva tudi na tvorbo sekundarnih produktov, kot so glicerol, očetna kislina, aceton, piruvat in  $\alpha$ -ketoglutarjeva kislina (Cottrell in McLellan, 1986).

Eksperiment sem izvedel kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae* (ANCHOR VIN 7) pri treh različnih temperaturah (15, 20 in 25 °C) z moštom sorte sauvignon. Prostor nad moštom sem prepilhoval z dušikom, ter tako preprečil dostop kisika. Potek fermentacije sem spremljal

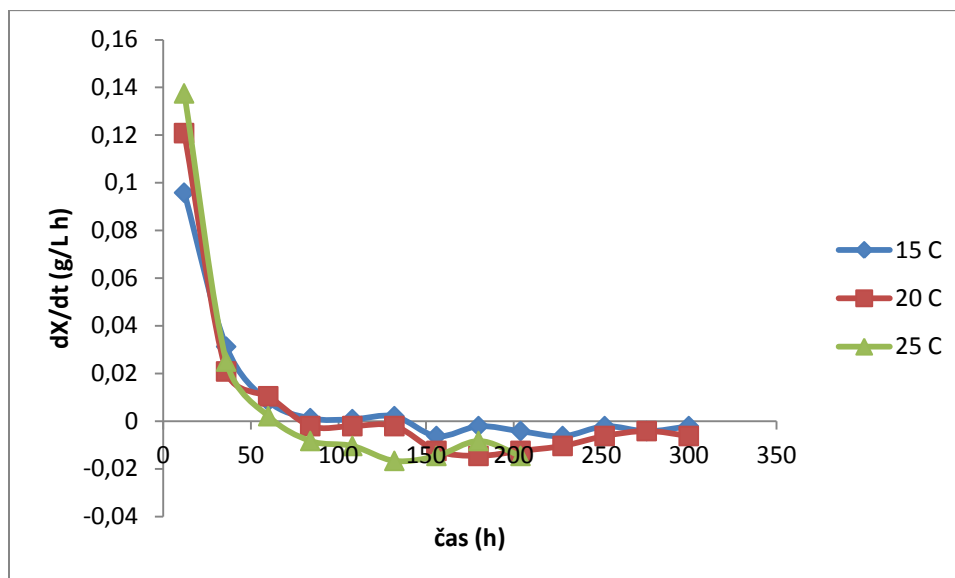
s pomočjo *on-line* meritev CO<sub>2</sub>, redoks potenciala in pH. Ob tem sem meril tudi spreminjanje koncentracij biomase, reducirajočih sladkorjev (glukoza in fruktoza), glicerola ter etanola. Fermentacije so potekale 13-14 dni, vzorce pa sem jemal vsakih 24 h, koncentracijo ogljikovega dioksida v plinski fazi sem beležil s programom Visidaq-Genie, redoks potencial ter pH pa s programom Consort D130.

V prvem delu eksperimenta sem preučil vpliv temperature na izločanje CO<sub>2</sub> in fermentacijo. Med fermentacijami pri različnih temperaturah (15, 20 in 25 °C) sem meril vrednosti CO<sub>2</sub> ter spremljal razgradnjo reducirajočih sladkorjev in nastajanje glicerola in etanola.

Nastajanje CO<sub>2</sub> in etanola je povezano z intenziteto razgradnje sladkorjev, kar je tudi posledica rasti biomase. Naraščanje tvorbe CO<sub>2</sub> sledi podobni kinetiki kot naraščanje biomase (Graf 5). Biomasa prav tako kot CO<sub>2</sub> narašča hitreje pri višji temperaturi. Razlike v količini nastale biomase med posameznimi fermentacijami so bile zelo majhne, in sicer razlika med koncentracijama biomase pri 15 °C in 25 °C je znašala 0,6 g/L, razlika v količini nastalega CO<sub>2</sub> pa 13,6 % (Graf 5 in Graf 6).



**Graf 5:** Koncentracije biomase pri temperaturah 15, 20 in 25 °C



**Graf 5a:** Hitrosti nastajanja biomase pri temperaturah 15, 20 in 25 °C

Iz Grafa 5a so vidne razlike v hitrostih nastajanja biomase. Najvišja hitrost nastajanja biomase je pri temperaturi 25 °C in sicer 0,14 g/L h.

Lag faze ali faze prilagajanja nisem zaznal. Kvasovke sem najprej rehidriral ter jih potem dodal v mošt v bioreaktorju, tako da je prilagajanje mikroorganizma na nove življenjske razmere pri vseh fermentacijah potekalo zelo hitro. Tudi količina CO<sub>2</sub> je začela naraščati, kar kaže na takojšnjo metabolno aktivnost.

Povečanje količine in hitrost nastalega CO<sub>2</sub> sovpada z eksponentno fazo rasti mikroorganizma. Maksimalna količina sproščenega CO<sub>2</sub> je izmerjena na dan, ko maksimum doseže tudi biomasa. Z višanjem temperature torej raste koncentracija biomase in CO<sub>2</sub>, trajanje fermentacije pa se krajša.

Stacionarna faza rasti, ki je sledila eksponenti, je trajala od 72 do 144 h. Pri najvišji temperaturi so kvasovke po burni fermentaciji v stacionarno fazo prišle že po 72 h, najpočasnejši prehod iz eksponentne faze v stacionarno fazo rasti pa je bil v primeru najnižje temperature. Glede na tvorbo CO<sub>2</sub> lahko prav tako zaključim, da so bile kvasovke v tem času že v stacionarni fazi, a so bile še vedno metabolno aktivne, saj je CO<sub>2</sub> še nastajal.

Faza odmiranja lahko traja tudi več tednov. Najprej se je pojavila pri temperaturi 25 °C, ker so kvasovke po hitri in burni fermentaciji pri tej temperaturi tudi najhitreje porabile glukozo in fruktozo.

Vinske kvasovke izkoriščajo energijo, ki jo pridobijo iz glukoze v procesu respiracije in fermentacije. V tehnologiji vina sta obe zelo pomembni. V prvi stopnji, ki se pojavi pred in na začetku alkoholne fermentacije, kvasovke v aerobnih razmerah izkoristijo energijo predvsem

za življenje in razmnoževanje, medtem ko v anaerobnih razmerah poteka pretvorba glukoze do etanola in CO<sub>2</sub>.

Zaradi dejstva, da v fermentativni tehnologiji *on-line* meritve redoks potenciala predstavljajo parameter, ki v aerobnem ali anaerobnem bioprocesu prikazuje aktivnost mikroorganizma (Pivec, 2005), sem meril nastajanje CO<sub>2</sub> ter redoks potencial.

V vseh treh fermentacijah je bil prehod iz aerobne faze v anaerobno fazo hiter. Najhitrejši je bil pri najvišji temperaturi, kar se je odrazilo na padcu redoks potenciala in na pospešenem izločanju CO<sub>2</sub> (Graf 6).

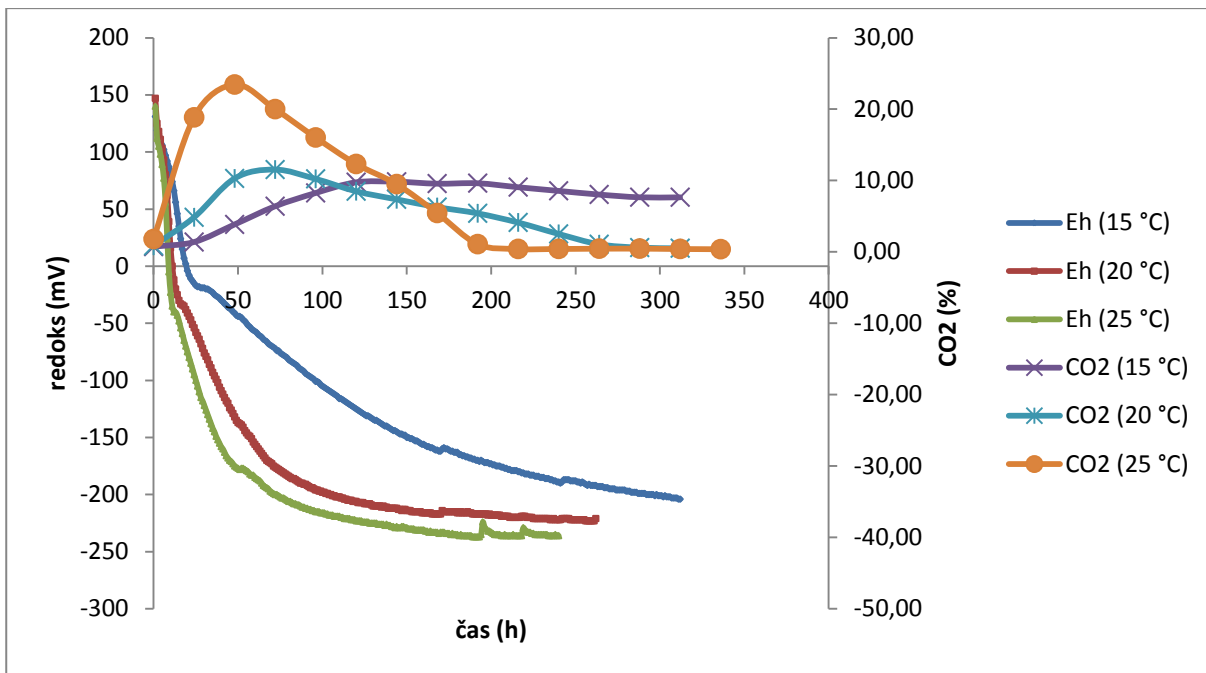
Kisik se porablja v kratki aerobni fazi, v kateri nastaja biomasa. Z začetkom faze rasti redoks potencial pade, zaradi procesa biosinteze etanola. To se zgodi v prvih 24 h, skladno s tem začne postopoma naraščati tudi količina CO<sub>2</sub>. Ta padec je prisoten pri vseh treh fermentacijah, nadaljnji potek redoks potenciala ter sproščanje CO<sub>2</sub> pa je odvisno od same temperature posamezne fermentacije (Graf 6).

Pri fermentaciji, ki je potekala pri 15 °C, je bila faza prehoda iz aerobnega v anaerobni metabolizem zaznana v času 26 do 32 h od začetka fermentacije. Redoks potencial je iz začetnih 131 mV po 26 urah padel na -20 mV. Po tem času se redoks potencial do 32. ure ne spreminja. Zaznana je le majhna metabolna aktivnost. Po fazi prehoda je sledil postopen padec redoks potenciala. Razlika v redoks potencialu med 32. in 168. uro, ko redoks potencial najbolj pada, znaša  $\Delta E_h = -140$  mV. Začel je nastajati etanol (Graf 9), kar je spremljalo tudi pospešeno izločanje CO<sub>2</sub>. Koncentracija CO<sub>2</sub> je po 144 h dosegla maksimum 9,85 % in nato začela zelo počasi padati. Po 168 h je sprememba redoks potenciala in CO<sub>2</sub> nakazovala, da sta mikrobna aktivnost in rast kvasovk prešli v stacionarno fazo (Graf 6).

Pri fermentaciji pri temperaturi 20 °C hiter padec redoks potenciala iz začetnih 147 mV na -176 mV v 72 h kaže na intenzivno vrenje. Skladno s tem po 72 h tudi koncentracija CO<sub>2</sub> doseže svojo največjo vrednost 11,54 %. Po tem maksimumu se je začela količina CO<sub>2</sub> postopoma nižati vse do 288. ure, ko se sproščanje CO<sub>2</sub> ustavi. Razlika v padcu redoks potenciala je od 72. do 288. ure znašala  $\Delta E_h = -45$  mV.

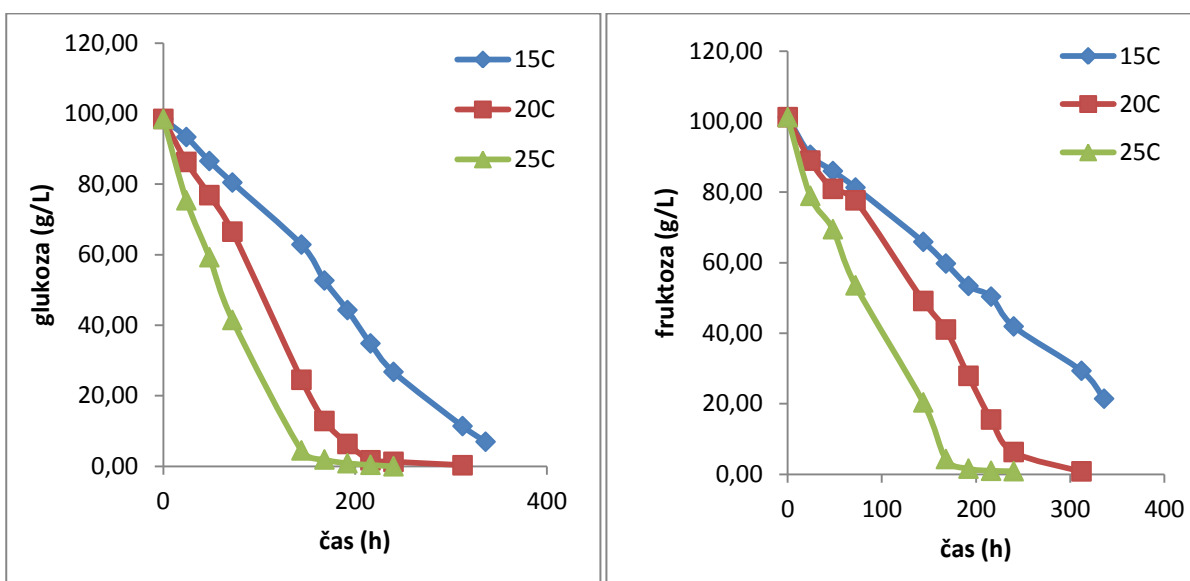
Intenzivno vrenje je bilo pri vseh treh fermentacijah (15, 20 in 25 °C) zaznано takrat, ko se je izločilo največ CO<sub>2</sub>. V tem obdobju je bila tudi razgradnja sladkorjev najbolj intenzivna in je nastalo največ etanola. Pri temperaturi 25 °C je koncentracija glukoze in fruktoze (Graf 7 in Graf 8) dosegla 0 g/L po 168 h, po tem času se je zaključilo tudi nastajanje CO<sub>2</sub> (Graf 6).

Pri temperaturi 20 °C je razgradnja potekala počasneje kot pri 25 °C. Najprej je 0 g/L po 216 h dosegla glukoza, nekaj dni kasneje pa še fruktoza. Tukaj je razgradnja potekala počasneje, vendar je bila končna koncentracija etanola podobna kot pri višji temperaturi. CO<sub>2</sub> je padel na 0 % po 288 h, torej ko se je porabila vsa fruktoza.

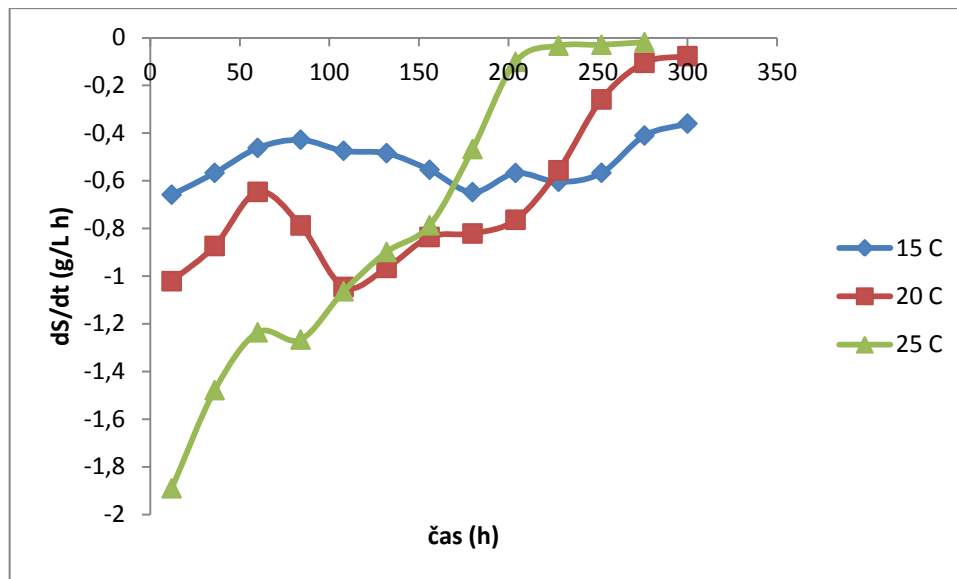


**Graf 6:** Redoks potencial in tvorba CO<sub>2</sub> v % nasičenja pri temperaturah 15, 20 in 25 °C

Pri najnižji temperaturi 15 °C koncentracija glukoze in fruktoze ni dosegla 0 g/L, kar kaže na upočasnen metabolizem sladkorjev. Etanol je v tem primeru dosegel najmanjšo koncentracijo 80,28 g/L (Graf 9). Količina sproščenega CO<sub>2</sub> ni padla pod 7,5 % zaradi še neporabljenega sladkorja (Graf 6). Višanje temperature je vplivalo na hitrejši metabolizem in s tem na hitrejši proces metabolne razgradnje sladkorjev in sinteze etanola.



**Graf 7 in Graf 8:** Poraba glukoze in fruktoze med fermentacijo pri različnih temperaturah



**Graf 8a:** Hitrost porabe sladkorjev med fermentacijo pri različnih temperaturah

Graf 8a nam prikazuje hitrosti porabe sladkorjev pri treh različnih temperaturah. Hitrosti porabe substrata  $-dS/dt$  so pričakovano najvišje pri temperaturi 25 °C.

Izločanje  $CO_2$  se je v vseh treh eksperimentih začelo takoj po začetku fermentacije, vendar je bila tvorba najbolj intenzivna pri najvišji temperaturi (Graf 6).

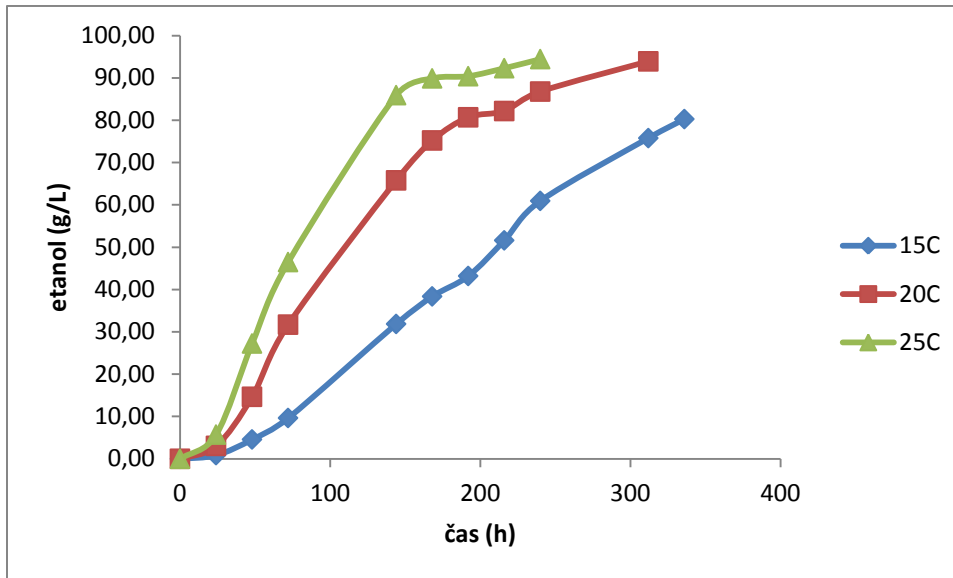
Pri fermentaciji z najnižjo temperaturo 15 °C je vrenje potekalo najpočasneje, količina izločenega  $CO_2$  je dosegla najvišjo vrednost in sicer 9,85 % po 144 h trajanja fermentacije. Pri tej temperaturi se količina  $CO_2$  ni spustila pod 7,5 %, kar nakazuje, da je v primerjavi s fermentacijama pri 20 in 25 °C to fermentacijo preživel večje število delujočih kvasnih celic. Pri fermentaciji pri 20 °C je bil maksimum 11,5 % izločenega  $CO_2$  dosežen po 72 h, potem se je njegova količina počasi zniževala do 288. ure, ko se je fermentacija zaključila.

Pri fermentaciji pri najvišji temperaturi 25 °C, 48 h po začetku je bila količina izločenega  $CO_2$  največja 23,45 %. Po tem maksimumu se je začela nižati in po 216 h dosegla 0 %, kar je pomenilo konec fermentacije (Graf 6).

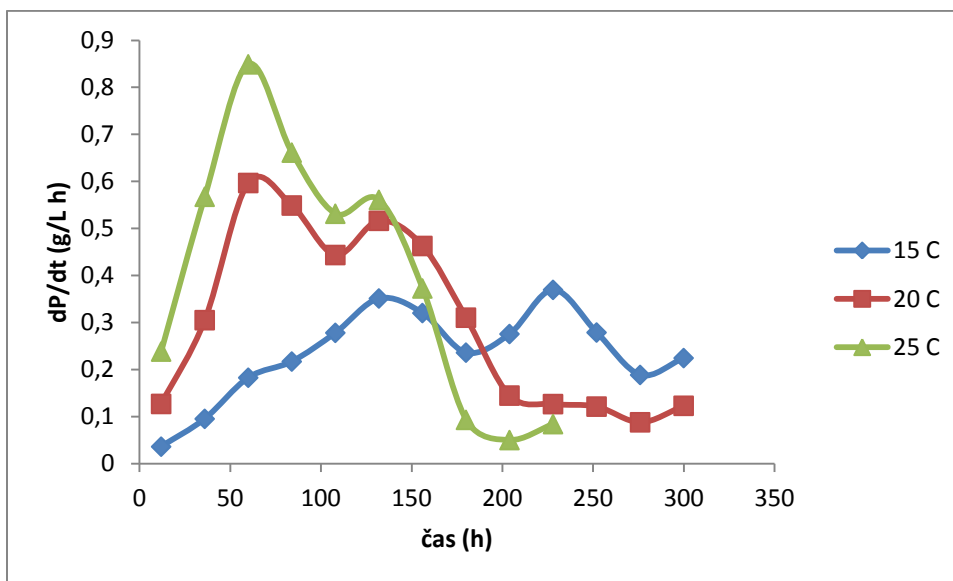
Pri 25 °C je bil kvasni metabolizem še hitrejši in bolj intenziven kot pri 20 °C. Povečanje količine  $CO_2$  sovpada s potekom kvasnega metabolizma sladkorjev (Graf 7 in Graf 8) in nastajanjem reduktivnih spojin, kar se odraža na padcu redoks potenciala v časovnem obdobju 48 h. Začetni redoks potencial je iz 140 mV padel na -175 mV. V tem času je koncentracija sproščenega  $CO_2$  dosegla najvišjo vrednost. Po tej vrednosti 23,45 % se je začel  $CO_2$  hitro nižati, redoks potencial pa je padel na konstantno vrednost -230 mV (Graf 6).

Graf 6 prikazuje odvisnost tvorbe  $CO_2$  od redoks potenciala pri različnih temperaturah. Rezultati meritev redoks potenciala pri različnih temperaturah kažejo, da dvig temperature

fermentacije vpliva na znižanje redoks potenciala, na drugi strani pa je tudi količina izločenega CO<sub>2</sub> višja pri višji temperaturi.



**Graf 9:** Nastajanje etanola med posameznimi fermentacijami.

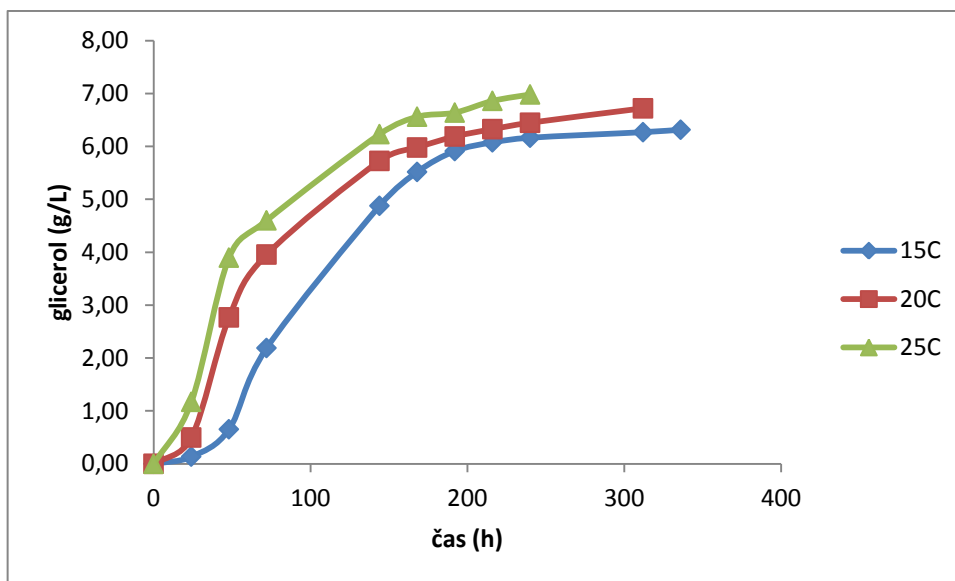


**Graf 9a:** Hitrost nastajanja etanola med posameznimi fermentacijami

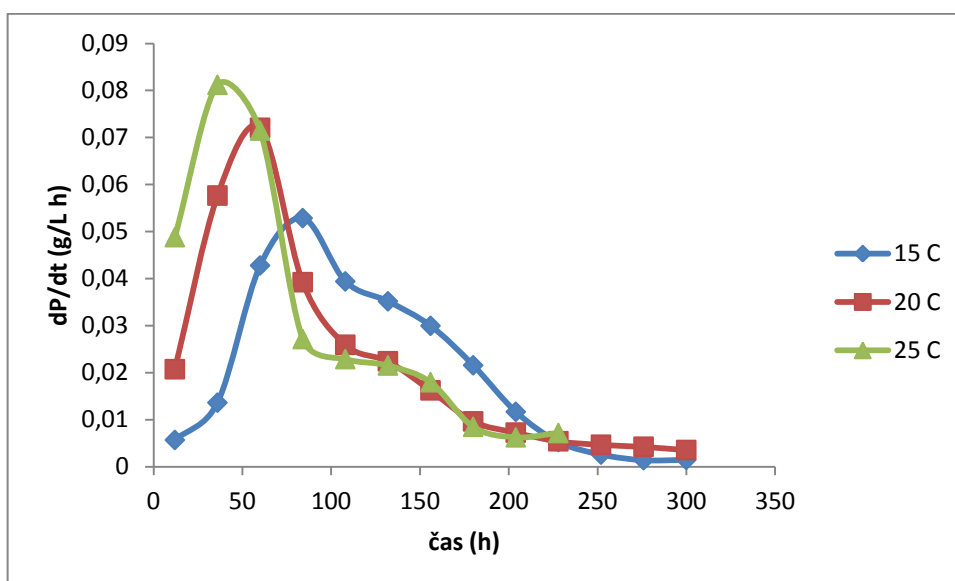
Graf 9a nam prikazuje hitrosti nastajanja etanola. Hitrosti nastajanja etanola so najvišje pri temperaturi 25 °C. Največja hitrost nastajanja etanola je 0,85 g/L h.

V eksponentni fazi rasti kvasovk je bil padec redoks potenciala uravnotežen z intenzivnejšo tvorbo glicerola (Graf 10). Glicerol je začel nastajati v času, ko se je redoks potencial začel nižati. Višje temperature fermentacije vplivajo na kinetiko kvasnega metabolizma in s tem na hitrejši potek tvorbe etanola, sočasno pa tudi na povečano tvorbo glicerola.

Največ glicerola je nastalo pri najvišji temperaturi. Deleži glicerola glede na nastali etanol so 7,8 % (15 °C), 7,2 % (20 °C) in 7,4 % (25 °C).



**Graf 10:** Nastajanje glicerola med posameznimi fermentacijami



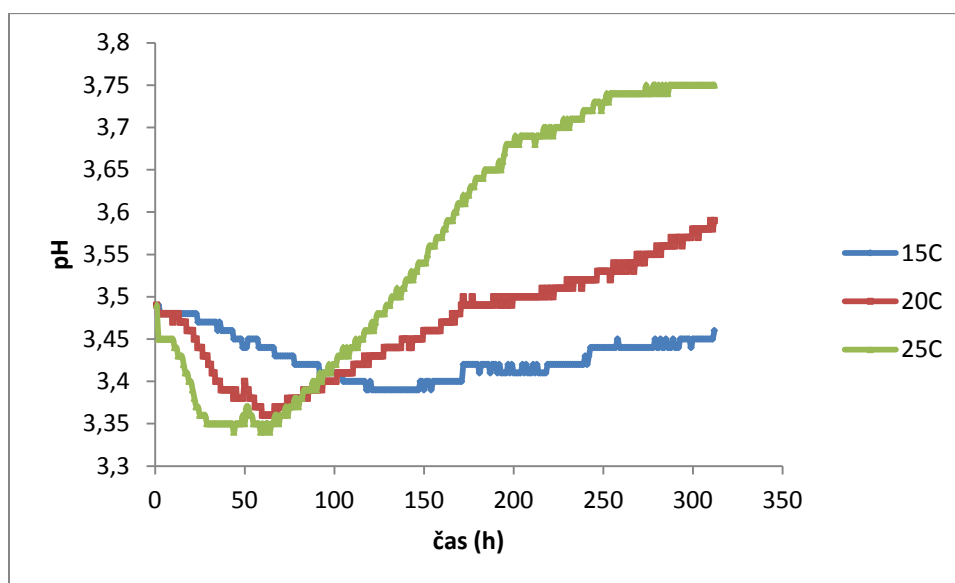
**Graf 10a:** Hitrosti nastajanja glicerola med posameznimi fermentacijami

Graf 10a nam prikazuje hitrosti nastajanja glicerola. Hitrosti nastajanja glicerola so najvišje pri temperaturi 25 °C. Največja hitrost nastajanja glicerola je 0,08 g/L h pri temperaturi 25 °C; pri temperaturi 15 °C je največja hitrost 0,05 g/L h; pri temperaturi 20 °C pa 0,07 g/L h.

**Tabela 1:** Acetaldehid in višji alkoholi pri fermentacijah pri 15, 20 in 25 °C

	acetaldehid (g/L)	1-propanol (g/L)	2-butanol (g/L)	izoamilalkohol (g/L)
15 °C	0,0064	0,0089	0,0255	0,1241
20 °C	0,0071	0,0103	0,0311	0,1311
25 °C	0,0075	0,0122	0,0343	0,1389

Hitrejša kinetika se odraža tudi pri sekundarnih metabolitih. Z višanjem temperature se poveča produkcija višjih alkoholov in acetaldehida.



**Graf 11:** Spreminjanje pH pri različnih temperaturah

V pH profilu so vidne razlike za uporabljene temperature. Pri vseh treh profilih pH vrednost najprej pada, nato pa začne naraščati. Razlika v končnih vrednostih pH je 0,3. Največje razlike so na koncu fermentacije, kar je posledica večjih vsebnosti kislin.

**Tabela 2:** Koncentracije kislin pri fermentacijah pri 15, 20 in 25 °C

	vinska (g/L)	jabolčna (g/L)	mlečna (g/L)	ocetna (g/L)
15 °C	2,0	2,9	2,3	0,19
20 °C	2,1	2,5	2,4	0,23
25 °C	2,5	2,4	3,1	0,27

Vsebnosti vinske, mlečne in oetne kisline so najvišje pri največji temperaturi. Jabolčne kisline pa je pri isti temperaturi najmanj. Iz tega sklepamo, da pri višji temperaturi mlečnokislinske bakterije pretvorijo več jabočne kisline v mlečno.

## **4.2 VPLIV TEMPERATURNIH ŠOKOV NA VCEPKU NA POTEK FERMENTACIJE**

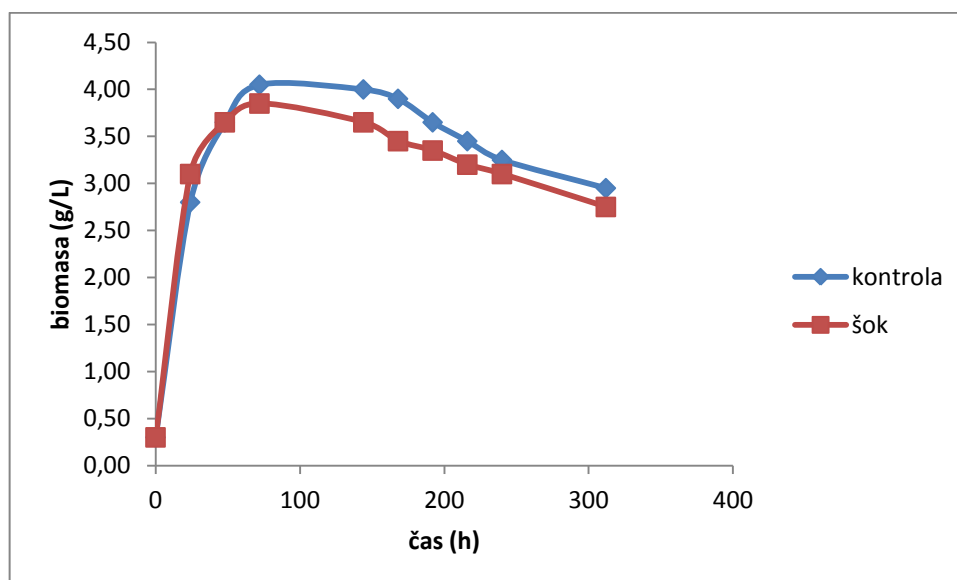
### **A) TEMPERATURNI ŠOKI NA VCEPKU S TREMI RAZLIČNIMI KVASOVKAMI**

V tem sklopu eksperimentov sem uporabil tri različne kvasovke in sicer: ANCHOR VIN 7, ANCHOR NT116 in ANCHOR NT202. Temperaturni šoki so bili izvedeni v dveh kopelih (45 in 80 °C).

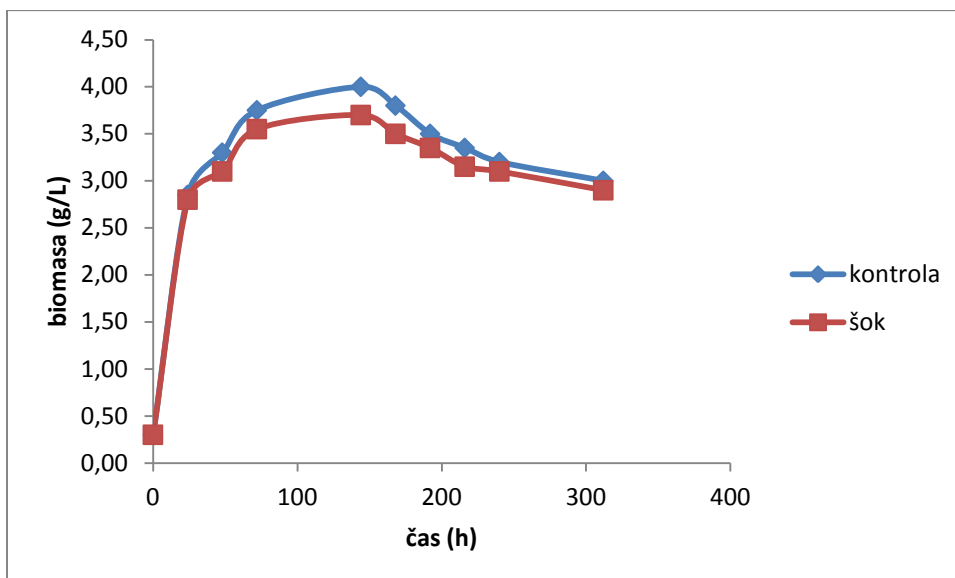
Grafi 12-14 prikazujejo naraščanje biomase med fermentacijo. Biomasa nekoliko hitreje narašča pri fermentaciji, kjer nisem uporabil temperaturnega šoka na vcepku. Izvedeni so bili 20-minutni temperaturni šoki pri temperaturi 45 °C.

V začetni fazi, ko je v sistemu še prisotna manjša koncentracija kisika, potekata intenzivnejša rast in razmnoževanje kvasovk, ob tem nastaja količina biomase, ki fermentira po anaerobni poti glukozo in fruktozo v etanol in ostale alkohole. V tem času kvasovke veliko bolje izkoriščajo energijo kot kasneje med anaerobnim procesom (Ribéreau-Gayon, 1998).

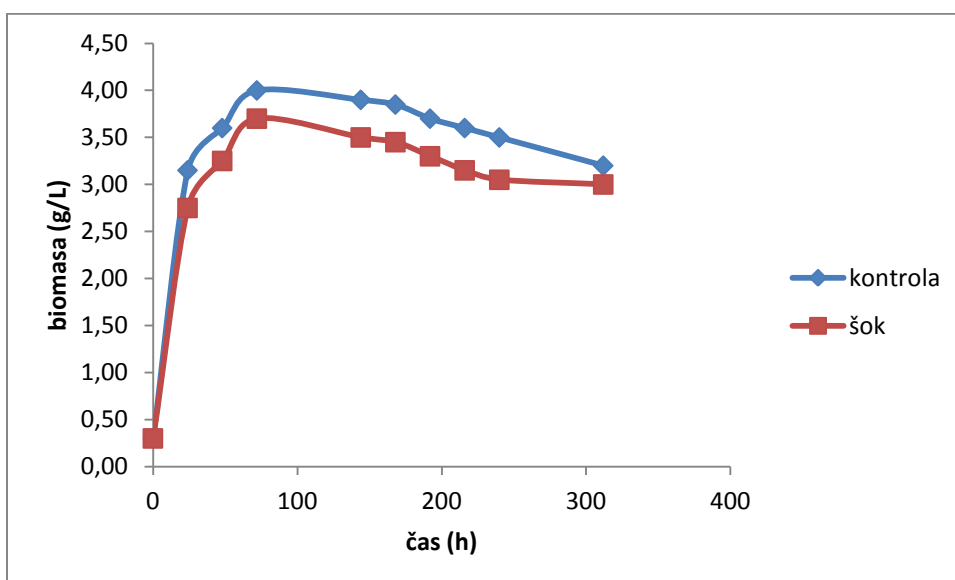
Z zvišanjem temperature lahko v začetni fazi fermentacije povečamo aktivnost in učinkovitost kvasnih celic v njihovem metabolizmu. S tem skrajšamo lag-fazo in povišamo hitrosti razgradnje sladkorjev in nastanka etanola.



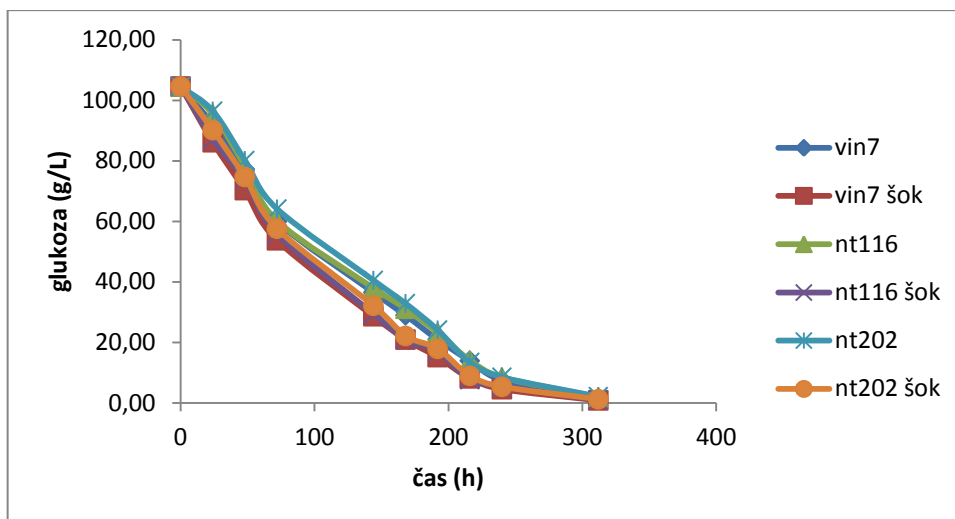
**Graf 12:** Koncentracije biomase za kvasovke ANCHOR VIN 7



**Graf 13:** Koncentracije biomase za kvasovke ANCHOR NT116



**Graf 14:** Koncentracije biomase za kvasovke ANCHOR NT202

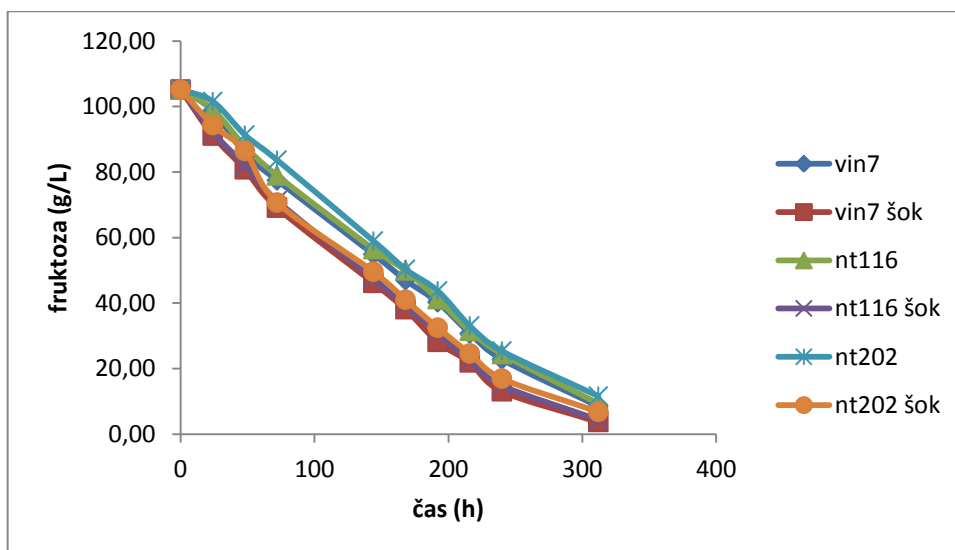


**Graf 15:** Hitrost porabe glukoze med fermentacijo s tremi različnimi kvasovkami pri 18 °C

Na grafih 15 in 16 so predstavljene porabe glukoze in fruktoze med fermentacijami, kjer je bil uporabljen vcepki, na katerem je bil izvršen 20-minutni temperaturni šok pri 45 °C. Hitrost porabe sladkorjev je večja pri fermentacijah, kjer je bil uporabljen vcepki, na katerem je bil izvršen 20-minutni temperaturni šok pri 45 °C. Vse fermentacije so bile izvedene pri 18 °C.

Hitrosti porabe glukoze so nekoliko večje kot hitrosti porabe fruktoze. Razlika je tudi na koncu fermentacije, kjer pri fermentacijah ostane nekaj fruktoze.

Uporaba temperaturnega šoka na vcepku nekoliko poveča hitrost porabe sladkorjev.



**Graf 16:** Hitrost porabe fruktoze med fermentacijo s tremi različnimi kvasovkami pri 18 °C

### Vpliv temperaturnih šokov na potek fermentacije

Izvedel sem fermentacije z in brez uporabe temperaturnih šokov na vcepku. Temperaturne šoke na vcepku pa sem izvedel s tremi različnimi kvasovkami (ANCHOR VIN 7, ANCHOR

NT116 in ANCHOR NT202). Pri višji temperaturi je večja metabolna aktivnost kvasovk, prav tako pa večjo metabolno aktivnost kvasovk dosežemo s temperaturnimi šoki na vcepku, ki se odraža kot večanje hitrosti rasti biomase in kot večja produkcija glicerola.

Po temperaturnem šoku kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* tvorijo večje količine glicerola, ki regulira osmotski tlak in vpliva na znižanje redoks potenciala (Berovič, 2004).

Temperatura, pri kateri poteka proces fermentacije, vpliva na povišanje metabolizma kvasovk in s tem na sam potek alkoholne fermentacije. Fermentativni metabolizem kvasnih celic lahko poteka znotraj velikega temperaturnega intervala. Maksimalna temperatura preživelosti znaša za kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* je okoli 45 °C, minimalna pa celo okoli 0 °C (Omori, 2003).

V temperaturnem območju od 15 °C do 35 °C velja pravilo, da višja temperatura povzroča hitrejši potek fermentacije in s tem hitrejšo kinetiko ter pospešeni metabolizem sladkorjev. Vpliv temperaturnega šoka pri 45 °C se je na nastanek glicerola izkazal kot zelo uspešen postopek. Aktivnost glicerol-3-dehidrogenaze v kvasnih celicah, ki so bile izpostavljene temperaturnemu šoku, je ob tem narasla za 1,15- do 1,25-krat v primerjavi s celicami, ki niso bile izpostavljene temperaturnemu šoku (Omori, 2003).

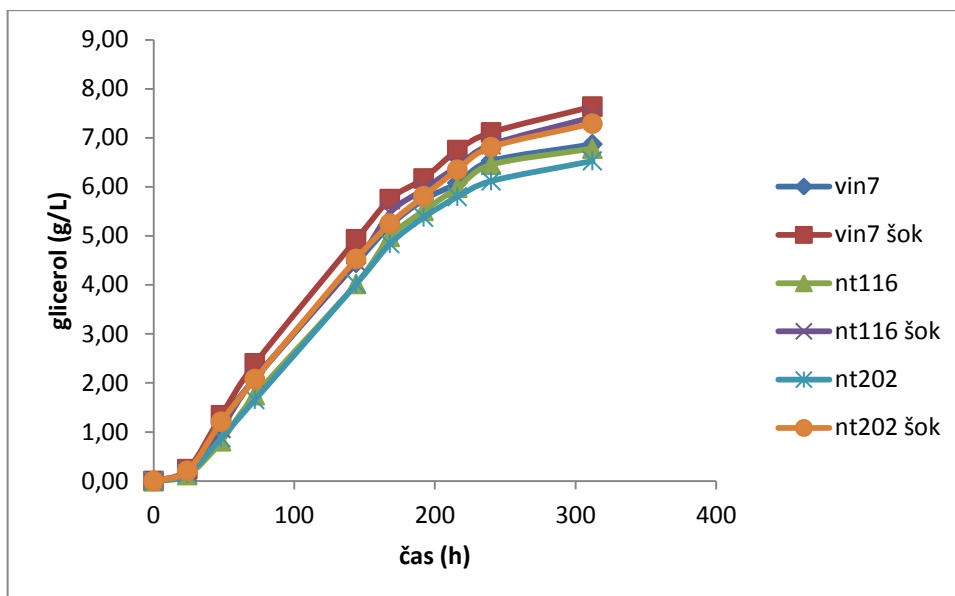
V eksperimentalnem delu sem spremljal vpliv temperaturnih šokov na potek fermentacije grozdnega mošta. Prostor nad moštom sem prepiloval z dušikom in s tem preprečil dostop kisika v grozdní mošt. Eh in pH vrednosti sem beležil s programom Consort D130.

Kvasovke sem rehidriral po standardnem postopku, opisanem v poglavju Materiali in metode. Izvedel sem 20-minutne temperaturne šoke na vcepku pri temperaturi 45 °C, ter tako pripravljeno startersko kulturo uporabil v fermentacijah.

Prilagajanje mikroorganizma na nove življenske razmere v bioreaktorju je v vseh primerih potekala hitro. Z začetkom faze rasti, kmalu po dodatku kvasovk v mošt, vrednost redoks potenciala naglo pade. V tem obdobju je redoks potencial padal in sicer bolj intenzivno pri fermentacijah, kjer je bil izveden temperaturni šok na vcepku. Koncentracija reducirajočih sladkorjev je v tem času začela padati.

Redoks potencial med eksperimentom pada zaradi tvorbe reducirajočih spojin. Padeč vrednosti je odvisen od konstante hitrosti rasti in od fizioloških lastnosti kvasovk. Po začetnem strmém padcu se redoks potencial stabilizira.

Začetna vrednost redoks potenciala znaša okoli 120 mV, nato pa začne padati. Pri višji temperaturi redoks potencial hitreje pada kot pri nižji temperaturi, kar je posledica kinetike fermentacije. Redoks potencial pri višji temperaturi doseže nižjo vrednost in s tem je tudi razlika v vrednosti redoks potenciala večja. Hitrejšo kinetiko in s tem hitrejši padeč redoks potenciala dosežemo s temperaturnimi šoki na vcepku. Z uporabo temperaturnega šoka na vcepku je končna vrednost redoks potenciala za vse tri uporabljene kvasovke nižja.



**Graf 17:** Hitrost nastajanja glicerola pri 18 °C in treh različnih kvasovkah, izpostavljenih temperaturnemu šoku

Glicerol vinu daje poln, prijeten in harmoničen okus in je zato zelo pomembna spojina v vinu. Koncentracija in hitrost nastajanja glicerola med fermentacijo narašča. Veča se z višanjem temperature oziroma z uporabo temperaturnih šokov na vcepku (Graf 17).

Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* tvorijo večje količine glicerola, kot osmoregulatorja, s katerim regulirajo spremembe redoks potenciala v procesu biosinteze etanola. Kinetika nastanka glicerola je dvofazna, z visoko stopnjo nastajanja med fazo rasti kvasovk in manj intenzivno v stacionarni fazi rasti kvasovk. Količina nastalega glicerola je povezana z razliko vrednosti med začetnim in končnim redoks potencialom in sicer se največ glicerola producira v primeru, ko je padec vrednosti redoks potenciala med fermentacijo največji.

Iz grafa 17, ki prikazuje odvisnost koncentracije glicerola od časa fermentacije, vidimo, da se z uporabo temperaturnega šoka na vcepku producira več glicerola, saj kvasovke producirajo večje količine glicerola.

Pri kvasovkah Anchor VIN7 se količina glicerola z uporabo temperaturnega šoka na vcepku poveča za 11,2 %; pri kvasovkah NT116 za 9,6 % ter pri kvasovkah NT202 za 11,6 % (Graf 17).

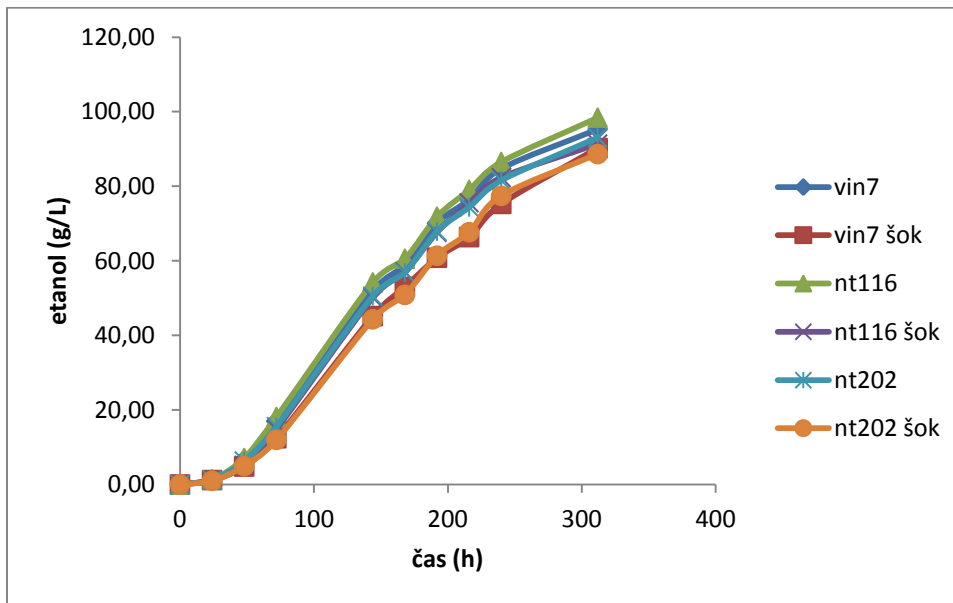
**Tabela 3:** Delež glicerola glede na nastali etanol pri fermentacijah z tremi različnimi kvasovkami in temperaturnimi šoki

	VIN7	VIN7 šok	NT116	NT116 šok	NT202	NT202 šok
% glicerola	7,2	8,5	6,8	8,1	7,0	8,2

**Tabela 4:** Maksimalne hitrosti nastajanja glicerola med fermentacijo

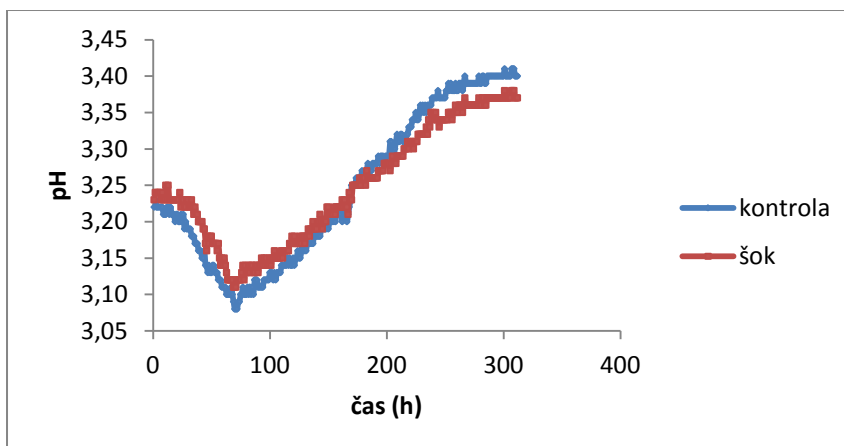
	VIN7	VIN7 šok	NT116	NT116 šok	NT202	NT202 šok
dP/dt (g/L h)	0,039	0,045	0,039	0,046	0,038	0,041

Iz Tabele 4 vidimo, da so maksimalne hitrosti produkcije glicerola večje pri fermentacijah, katerih vcepek je bil izpostavljen temperaturnemu šoku.

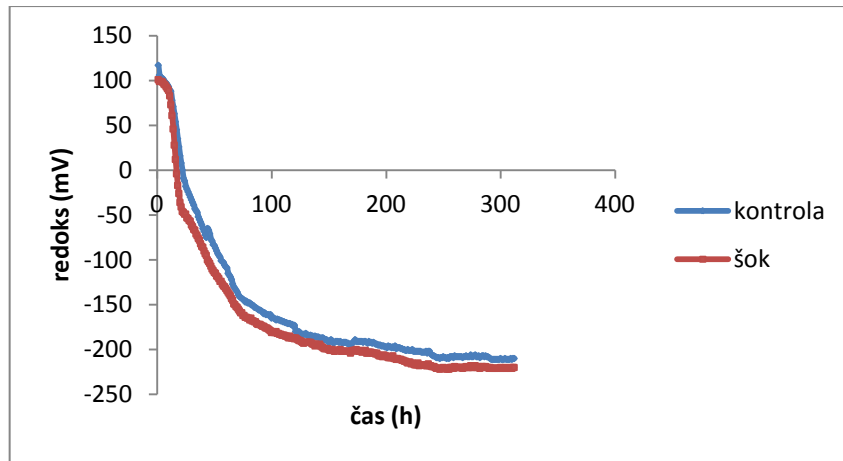


**Graf 18:** Hitrost nastajanja etanola pri 18 °C in treh različnih kvasovkah

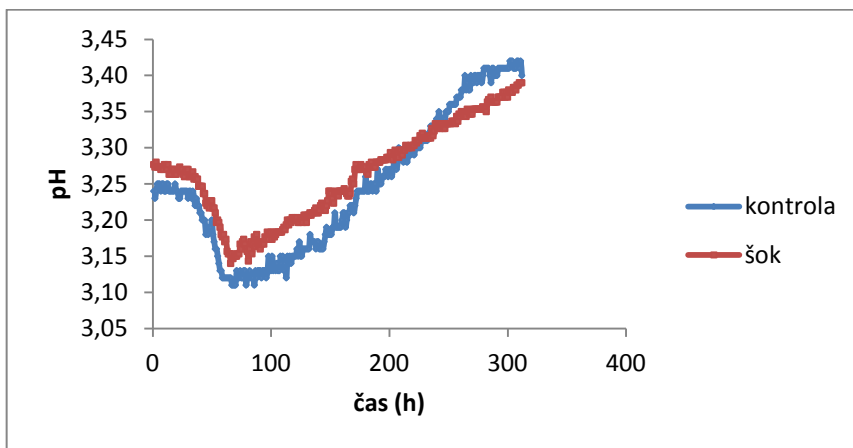
Graf 18 nam prikazuje naraščanje koncentracije etanola med fermentacijami. Prav tako kot pri glicerolu tudi pri etanolu vidimo, da pri višji temperaturi dosežemo večje koncentracije etanola. Z uporabo temperaturnega šoka smo nekoliko zmanjšali koncentracijo etanola (4,8-7,2 %), ne glede na to, katere kvasovke smo uporabili.



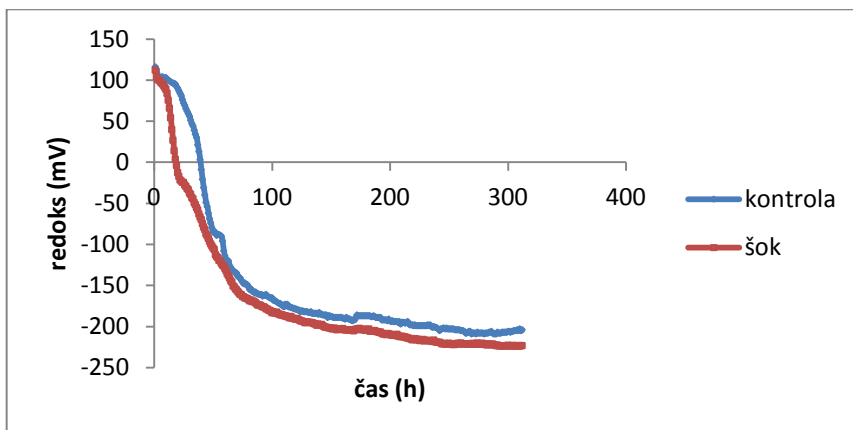
**Graf 19:** pH med fermentacijo za kvasovke ANCHOR VIN7



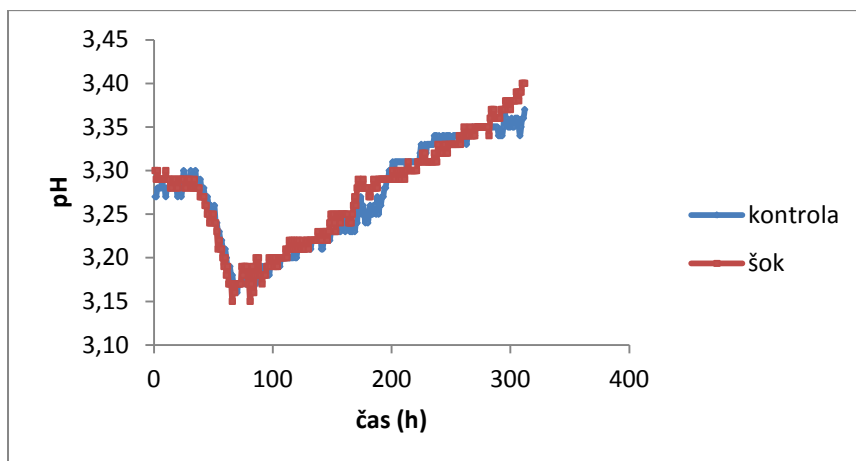
**Graf 20:** Redoks potencial med fermentacijo za kvasovke ANCHOR VIN7



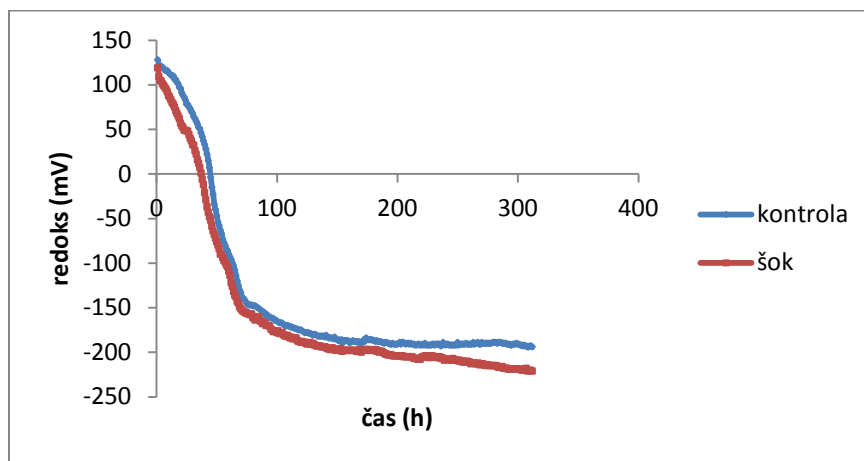
**Graf 21:** pH med fermentacijo za kvasovke ANCHOR NT116



**Graf 22:** Redoks potencial med fermentacijo za kvasovke ANCHOR NT116



**Graf 23:** pH med fermentacijo za kvasovke ANCHOR NT202



**Graf 24:** Redoks potencial med fermentacijo za kvasovke ANCHOR NT202

Pri vseh treh kvasovkah (ANCHOR VIN7, ANCHOR NT116, ANCHOR NT202) imamo praktično enak redoks profil. Redoks potencial hitreje pada in doseže nižje vrednosti pri fermentacijah, pri katerih je bil vcepki izpostavljen temperaturnemu šoku na vcepku. Pri pH profilih ni mogoče opaziti velikih razlik.

**Tabela 5:** Koncentracije kislin pri fermentacijah z tremi različnimi kvasovkami in temperaturnimi šoki

	vinska (g/L)	jabolčna (g/L)	mlečna (g/L)	očetna (g/L)
VIN7	2,1	2,8	2,5	0,29
VIN7 šok	1,8	2,4	3,0	0,35
NT116	2,1	2,8	2,5	0,20
NT116 šok	1,9	2,6	3,1	0,38
NT202	2,2	3,0	2,6	0,27
NT202 šok	1,9	2,4	3,3	0,39

Vsebnosti vinske, mlečne in očetne kisline so podobne pri vseh treh kvasovkah. Razlog za zmanjšanje jabolčne kisline z uporabo temperaturnega šoka, je v tem da mlečnokislinske bakterije pretvorijo več jabočne kisline v mlečno.

**b) TEMPERATURNI ŠOKI NA VCEPKU (različni časi temperaturnih šokov)**

Temperaturni šoki so bili izvedeni v kopeli na 45 °C. Uporabljen sev kvasovk je bil Anchor VIN 7.

**Tabela 6:** Koncentracije glicerola, etanola in deleži glicerola glede na etanol pri temperaturnih šokih na vcepku

temp. (C)	dolžina temp šoka (min)	glycerol (g/L)	etanol (g/L)	% glicerola
18	0	6,3	89	7,1
18	10	8,4	83	10,1
18	20	8,4	83	10,1
18	30	8,2	81	10,1
22	0	7,8	104	7,5
22	10	10,3	98	10,5
22	20	10,1	98	10,3
22	30	10,0	97	10,3

Koncentracije glicerola se je z uporabo temperaturnega šoka na vcepku povečala do 35 %. Sočasno pa je koncentracija etanola pri isti temperaturi fermentacije zmanjšala 6 - 10 %.

**4.3 VPLIV TEMPERATURNIH NIHANJ MED FERMANTACIJO NA POTEK FERMANTACIJE**

Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* producirajo glicerol kot osmoregulator, s katerim regulirajo spremembe redoks potenciala pri zelo majhnih razpoložljivih koncentracijah kisika (Costenoble in sod., 2000).

V tem sklopu eksperimentov sem preizkusil možnosti povečanja tvorbe glicerola v fermentaciji vina z uporabo temperaturnih šokov pri 26 in 34 °C. Temperaturni šoki omogočajo povečanje tvorbe glicerola od 80 % do 100 %, oziroma od 6 do 12 g/L. Ta postopek povečanja tvorbe glicerola je mogoče uporabiti pri vseh sortah mošta in za vse vrste vin (Berovič in sod., 2004).

S tem sklopom eksperimentov sem želel prikazati vpliv povišane temperature in temperaturnega šoka na biosintezo glicerola. Povišanje temperature fermentacije (temperaturni šok med fermentacijo) v eksponencialni fazi rasti vpliva na povišanje hitrosti kvasnega metabolizma, s tem na hitrejši potek sinteze etanola, istočasno pa tudi na povišano biosintezo glicerola, ki postane intenzivnejša v primeru uporabe temperaturnih šokov (Omori

in sod., 1996). Na ta način deluje nastali glicerol kot osmoregulator, ki ga mikroorganizmi producirajo za vzpostavitev redoks ravnotežja.

Znano je tudi, da kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* proizvajajo večje količine glicerola, kadar so izpostavljene različnim dejavnikom iz okolja ali veliki koncentraciji sladkorja v mediju. Aktivnost encima glicerol-3-fosfat dehidrogenaze (GPDH), izpostavljenega temperaturnemu šoku, naraste za 1,15- do 1,25-krat, v primerjavi z aktivnostjo encima, ki ni bil izpostavljen temperaturnemu šoku (Omori in sod., 1996).

Rezultati eksperimentov, izvedenih v sklopu fermentacij pri različnih temperaturah (15, 20 in 25 °C), ki sem jih opisal v poglavju 4.1., so pokazali, da je količina nastalega glicerola sorazmerna z zvišanjem fermentacijske temperature in z nižjo končno vrednostjo redoks potenciala po končani fermentaciji. Ob višji temperaturi fermentacije in večji spremembi med začetno in končno vrednostjo redoks potenciala, kvasovke tvorijo večjo količino glicerola in tako uravnavajo nastalo razliko redoks ravnotežja v sistemu (Kukec in sod., 2003). Potek dela je obsegal tri eksperimente. Najprej sem izvedel eksperiment pri konstantni temperaturi 18 °C. V drugem in tretjem eksperimentu sem v zgodnji eksponencialni fazi rasti kvasovk izvedel temperaturni šok iz 18 na 26 °C in iz 18 na 34 °C. Do 24. ure je eksperiment potekal pri isti temperaturi (18 °C) kot pri kontrolni fermentaciji. Temperaturni šok pa je bil izveden med 24. in 48. uro eksperimenta. Po 24-urnem temperaturnem šoku je fermentacija potekala pri temperaturi 18 °C do konca. Sev kvasovk, s katerim so bile izvedene fermentacije, je bil ANCHOR VIN7.

Glicerol je sladek alkohol, ki nastaja kot stranski produkt vinske fermentacije s kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae*. V vinu se koncentracija glicerola giblje v mejah od 1 do 15 g/L. Obsežnejše študije so pokazale, da se odvisno od seva kvasovk, medija in procesnih razmer, 4 - 10 % ogljika spremeni v glicerol, kar predstavlja 7 do 10 % koncentracije nastalega etanola. Večje koncentracije vplivajo na viskoznost in gladkost vina (Cianni in Ferraro, 1996).

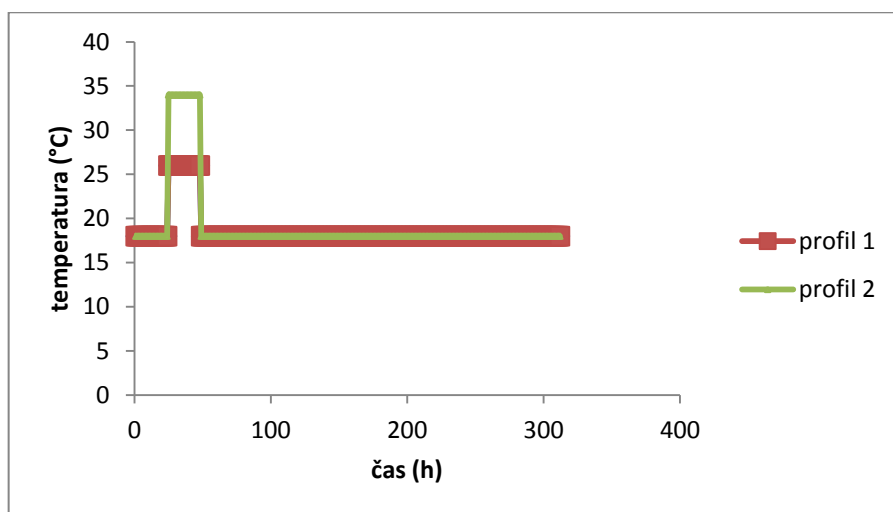
V fizioloških procesih kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* igra glicerol zelo pomembno vlogo. S tvorbo glicerola kvasovke kompenzirajo osmotski tlak, nadzirajo raven fosfata v citosolu in vzdržujejo  $NAD^+/NADH$  redoks ravnotežje (Hohmann, 1997). Regulacija redoks ravnotežja pri *Saccharomyces cerevisiae* poteka preko glicerol-3-fosfat dehidrogenaze (Hemming in Adler, 1991). Povečana tvorba glicerola ugodno vpliva tudi na senzorične lastnosti vina (Pretorius in Van der Westhuizen, 1991).

Začetni izmerjeni redoks potencial fermentacije pri 18 °C je znašal 120 mV. Do te stopnje se je med pretokom mošta v bioreaktor raztopila manjša količina kisika. V naslednjih 24 h je vrednost redoks potenciala začela hitro padati. Kvasni metabolizem je prešel iz aerobne začetne faze, v kateri je potekalo intenzivno razmnoževanje kvasovk in s tem nastanek biomase, v anaerobni metabolizem, ko se je začela anaerobna razgradnja sladkorjev in nastajanje etanola.

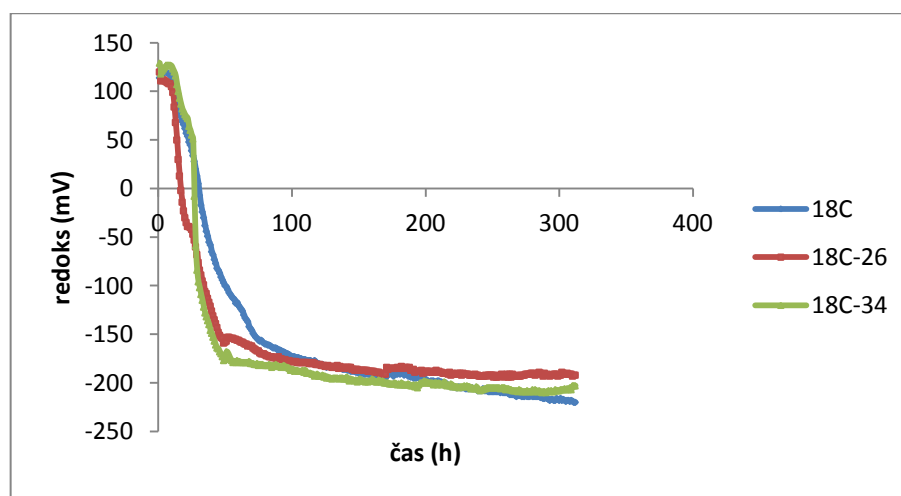
Po približno 100 h od začetka fermentacije je redoks potencial padel za  $\Delta E_n=300$  mV. V tem času je potekala intenzivna fermentacija sladkorjev po glikolitični poti. Po doseženi minimalni

vrednosti redoks potenciala pri -170 mV, je redoks potencial ostal približno konstanten. V času, ko je redoks potencial močno padel, so kvasovke kot osmoregulator začele tvoriti glicerol (Graf 26, Graf 30).

Graf 26 prikazuje temperaturni profil med fermentacijo s temperaturnim šokom. Sprememba temperature je povzročila motnjo metabolizma kvasovk in povzročila spremembo redoks ravnotežja. Zaradi temperaturnega šoka morajo kvasne celice razviti mehanizem, s katerim se zaščitijo. Da bi kvasne celice preprečile hitro difuzijo vode iz celice v okoliški medij, tvorijo glicerol, ki regulira intra- in ekstracelularno okolico (Larsson, 1986). Hitra sprememba temperature povzroča aktivacijo encima triozafosfat izomeraze, ki ima večjo afiniteto do dihidroksiaceton fosfata, kot do glicerolaldehid-3-fosfata. Dihidroksiaceton fosfat se v dvostopenjski reakciji spremeni v glicerol. Na ta način kvasne celice uravnavajo redoks ravnotežje in se odzivajo na hiperosmotski stres (Scanes in sod., 1998).

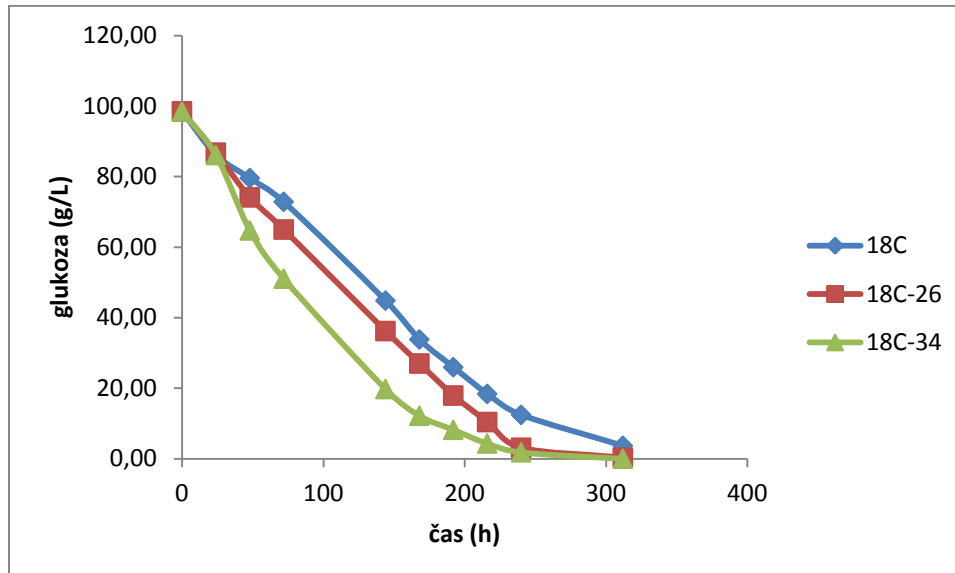


**Graf 25:** Temperaturni profil med fermentacijo s temperaturnim šokom



**Graf 26:** Redoks potencial med fermentacijo pri temperaturi 18 °C - z in brez uporabe temperaturnih šokov

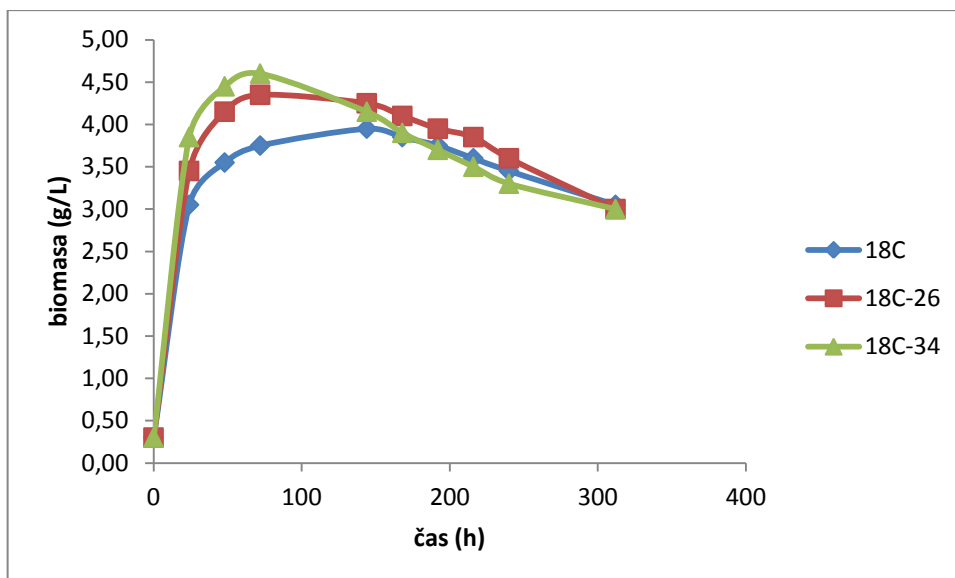
Padcu redoks potenciala zaradi spremembe v metabolizmu, ki jo je povzročil dvig temperature na 26 °C oziroma na 34 °C, je sledil majhen dvig redoks potenciala za nekaj mV in ponoven padec.



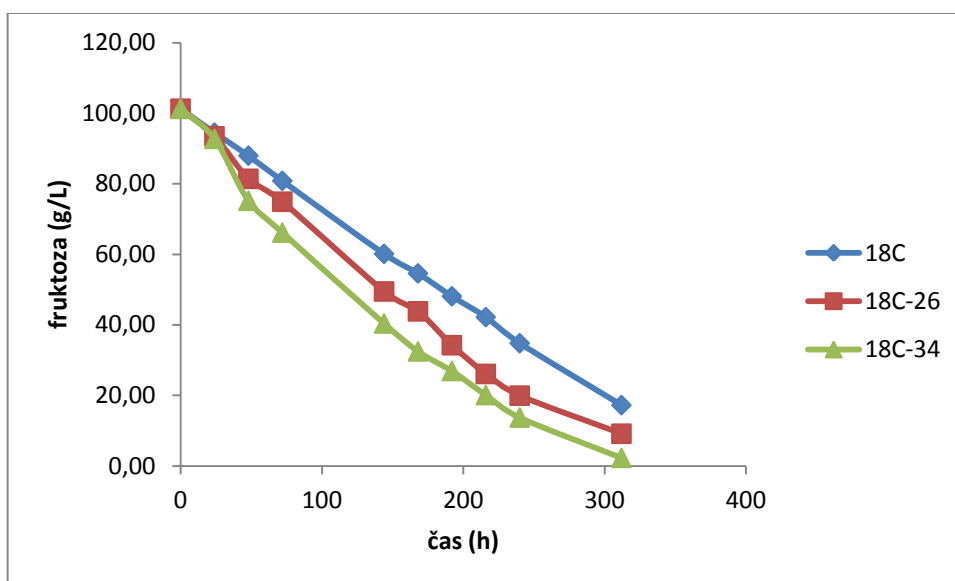
**Graf 27:** Hitrost porabe glukoze pri temperaturi 18 °C - z in brez uporabe temperaturnih šokov

Poraba reducirajočih sladkorjev se je v primeru fermentacij s temperaturnim šokom začela hitreje, kot v primeru fermentacije pri konstantni temperaturi (Graf 27). Na hitrejši metabolizem je vplivala povišana temperatura v začetni fazi razmnoževanja kvasovk in fermentacije. Na hitrejši kvasni metabolizem kaže tudi hitrejši padec redoks potenciala v primeru temperaturnih šokov (Graf 26). V obeh primerih se je poraba sladkorjev zaključila prej.

Zaradi motnje kvasnega metabolizma, povzročene s temperaturnim šokom, je alkoholna fermentacija stekla, ko je nastala večja količina biomase in so kvasovke prilagodile mehanizem delovanja v novonastalem okolju. Pri konstantni temperaturi je rast kvasne biomase dosegla maksimum kasneje (Graf 28). Temperaturni šok je torej vplival na pospešeno rast in razmnoževanje biomase, kasneje pa tudi na hitrejši metabolizem reducirajočih sladkorjev.

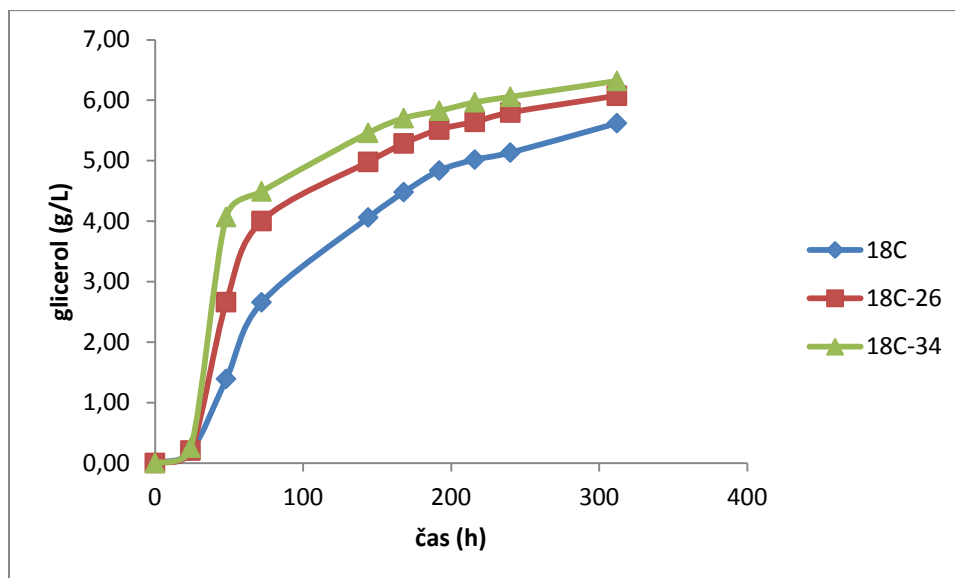


**Graf 28:** Hitrost nastajanja biomase pri temperaturi 18 °C - z in brez uporabe temperaturnih šokov



**Graf 29:** Hitrost porabe fruktoze pri temperaturi 18 °C - z in brez uporabe temperaturnih šokov

Razgradnja sladkorjev in nastajanje etanola sta zaradi dviga temperature v začetni fazi, v primeru povzročitve temperaturnih šokov stekli hitreje, kot pri konstantni temperaturi. Čeprav je etanol v vseh primerih začel nastajati že takoj od začetka fermentacije, je bilo nastajanje etanola hitrejše v primeru fermentacij s temperaturnim šokom. Maksimalna koncentracija etanola je bila v primeru temperaturnega šoka na 34 °C, in sicer 96,17 g/L. Pri temperaturnem šoku na 26 °C je etanola nastalo 91,87 g/L. Najmanj etanola je nastalo pri konstantni temperaturi 18 °C in sicer 82,61 g/L.

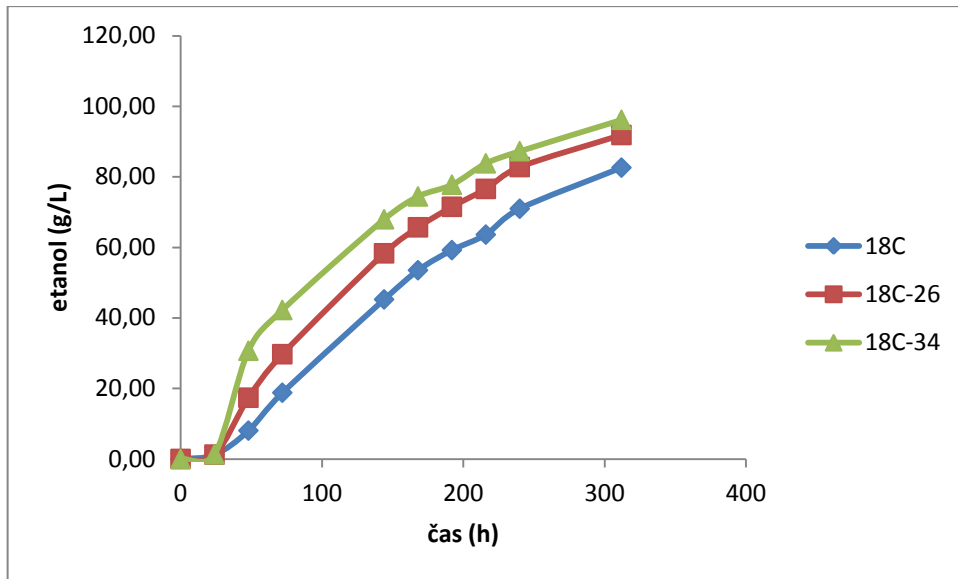


**Graf 30:** Biosinteza glicerola pri temperaturi 18 °C - z in brez uporabe temperaturnih šokov

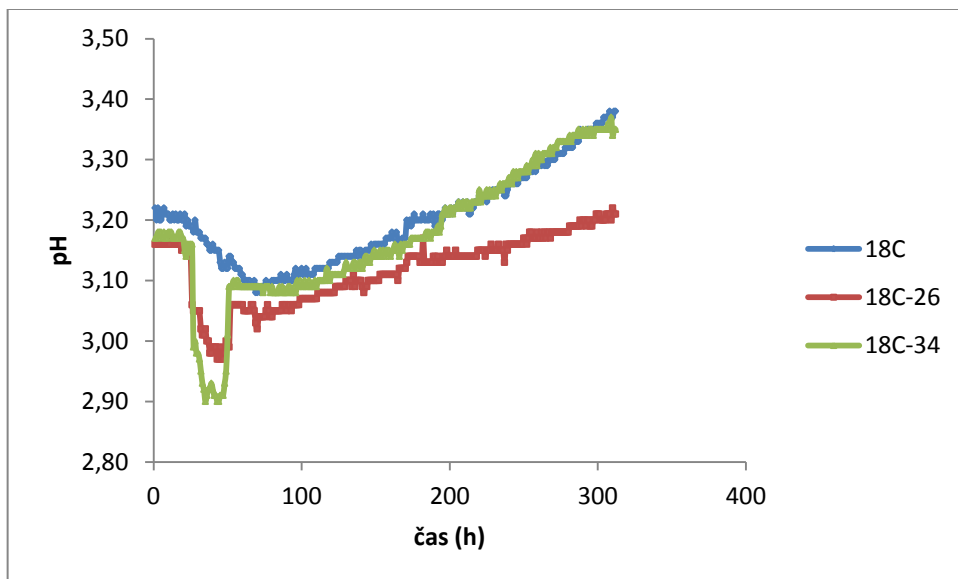
V primeru fermentacije s temperaturnim šokom se je tvorba glicerola pričela takoj po temperaturnem šoku. V primeru fermentacije pri konstantni temperaturi se je intenzivnejša tvorba glicerola začela kasneje in doseglo končno koncentracijo 5,62 g/L. Tvorba glicerola se je zaradi temperaturnega šoka (26 °C) povečala za 8 % v primerjavi z glicerolom izločenim pri konstantni temperaturi. V primeru temperaturnega šoka (34 °C) je končna koncentracija glicerola narasla za 13 %. Z višjo temperaturo šoka je tvorba glicerola večja in hitrejša. Prav tako se je povečala tudi tvorba etanola. Koncentracija se je zaradi temperaturnega šoka (26 °C) povečala za 11,2 % v primerjavi z etanolom izločenim pri konstantni temperaturi. V primeru temperaturnega šoka (34 °C) je končna koncentracija etanola narasla za 16,4 %. Z višjo temperaturo šoka je tvorba etanola večja in hitrejša. Deleži glicerola glede na nastali etanol so 6,8 % (18 °C), 6,6 % (18-26 °C) in 6,6 % (18-34 °C).

**Tabela 7:** Maksimalne hitrosti nastajanja glicerola med fermentacijo

	18 °C	18-26 °C	18-34 °C
dP/dt (g/L h)	0,051	0,079	0,088



**Graf 31:** Hitrost nastajanja etanola pri temperaturi 18 °C - z in brez uporabe temperaturnih šokov



**Graf 32:** pH med fermentacijo pri temperaturi 18 °C - z in brez uporabe temperaturnih šokov

Profili pH so si podobni. Bistvene razlike so v začetni fazi fermentacije, kjer je vidno občutno znižanje pH vrednosti za fermentaciji, na katerih je bil izveden temperaturni šok. V vseh treh profilih pH vrednost najprej pada, nato pa začne naraščati. Razlika v končnih vrednostih pH je 0,2.

**Tabela 8:** Koncentracije kislin pri fermentacijah s temperaturnimi nihanjem med fermentacijo

	vinska (g/L)	jabolčna (g/L)	mlečna (g/L)	ocetna (g/L)
18 °C	2,0	2,9	2,8	0,19
18 °C-26 °C	2,7	2,8	2,7	0,23
18 °C-34 °C	2,5	1,9	2,3	0,29

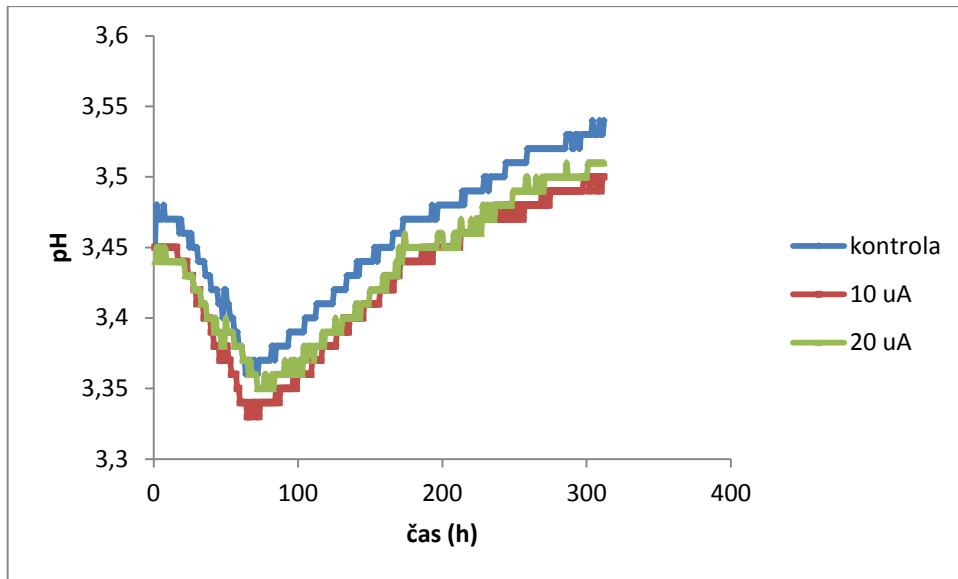
Z uporabo temperaturnih nihanj se znižata koncentraciji jabolčne in mlečne kisline. Povečata pa se koncentraciji vinske in očetne.

#### **4.4 VPLIV ELEKTRIČNIH IMPULZOV NA POTEK FERMENTACIJE**

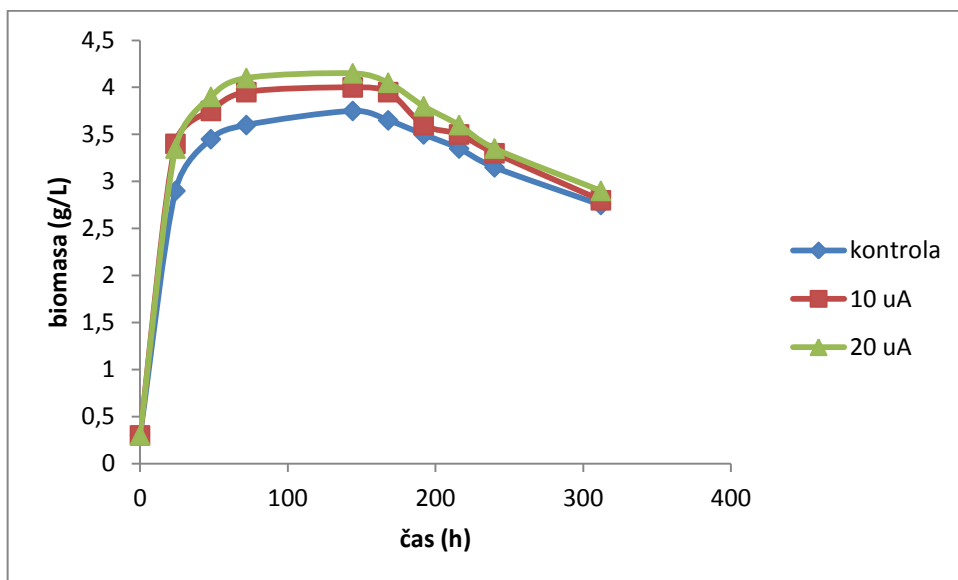
Naraščanje metabolne aktivnosti sem zasledoval s pomočjo meritev redoks potenciala. Začetni redoks potencial mošta, izmerjen pred dodatkom kvasovk, je znašal okrog 150 mV. Meritve so potekale pri isti temperaturi fermentacije mošta. Temperatura med potekom fermentacije je bila konstantna 18 °C.

Adaptacija mikroorganizma na nove življenske razmere v bioreaktorju je v vseh primerih potekala hitro. V tem obdobju je redoks potencial padal in sicer bolj intenzivno pri višjem električnem toku. Redoks potencial med eksperimentom pada zaradi tvorbe reducirajočih spojin. Padec vrednosti je odvisen od hitrosti rasti in od fizioloških lastnosti kvasovk. Po začetnem strmem padcu se redoks potencial stabilizira. Rast kvasovk se je zaključila, ko se je v rastnem mediju nakopičila večja količina etanola, ki je povzročila inhibicijo rasti. Redoks potencial je padel na najnižjo izmerjeno vrednost. Največji padec redoks potenciala je bil pri fermentaciji z električnim tokom jakosti 20  $\mu$ A.

pH niha med vrednostima 3,25 in 3,45. Sprememba vrednosti pH med fermentacijo lahko vpliva na nastanek stranskih produktov fermentacije. Vrednost pH vpliva na lag fazo rasti kvasovk ter na njihovo fermentacijsko aktivnost. Vpliv pH na rast in fermentacijsko aktivnost kvasovk pa je odvisen tudi od koncentracij reducirajočih sladkorjev in etanola.

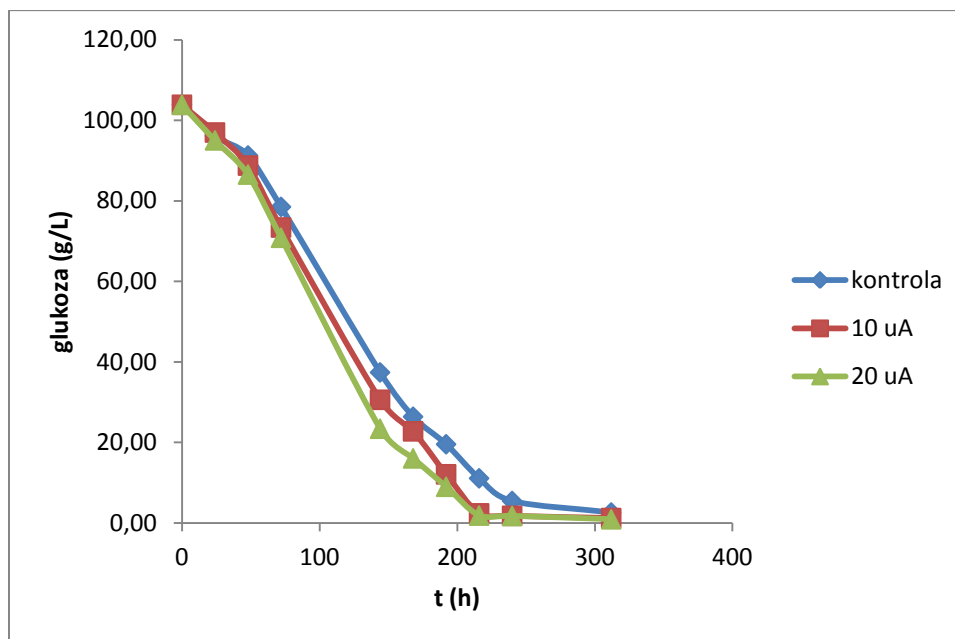


**Graf 33:** pH med fermentacijo pri temperaturi 18 °C - z in brez uporabe električnih impulzov



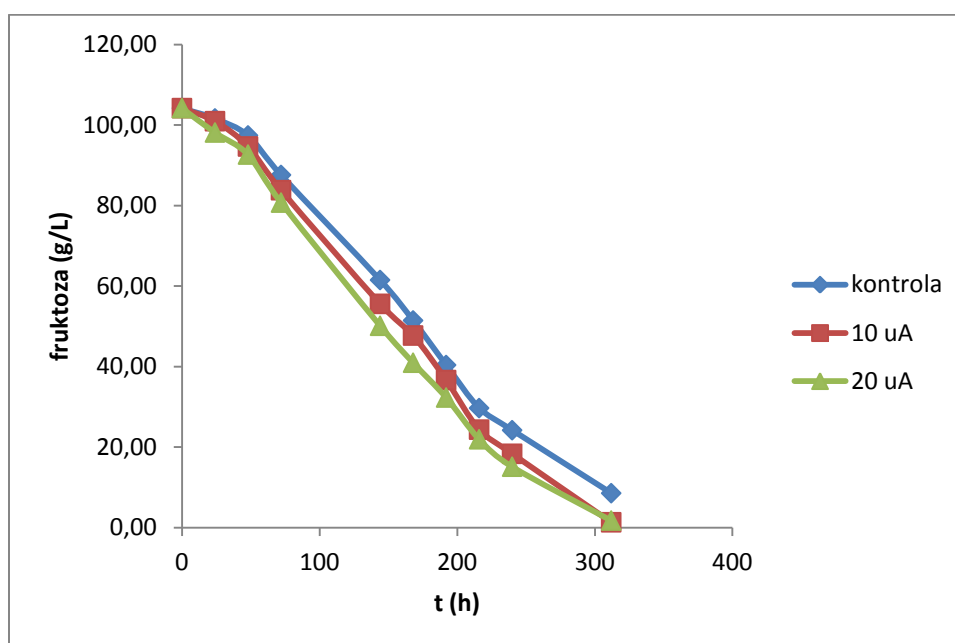
**Graf 34:** Hitrost nastajanja biomase med fermentacijo pri temperaturi 18 °C - z in brez uporabe električnih impulzov

Zaradi motnje kvasnega metabolizma, povzročene z električnimi impulzi, je alkoholna fermentacija stekla, ko je nastala večja količina biomase in so se kvasovke prilagodile mehanizem delovanja v novonastalem okolju. Pri kontrolni fermentaciji je rast kvasne biomase počasnejša (Graf 34). Električni impulzi so torej vplivali na pospešeno rast biomase, kasneje pa tudi na hitrejši metabolizem reducirajočih sladkorjev.



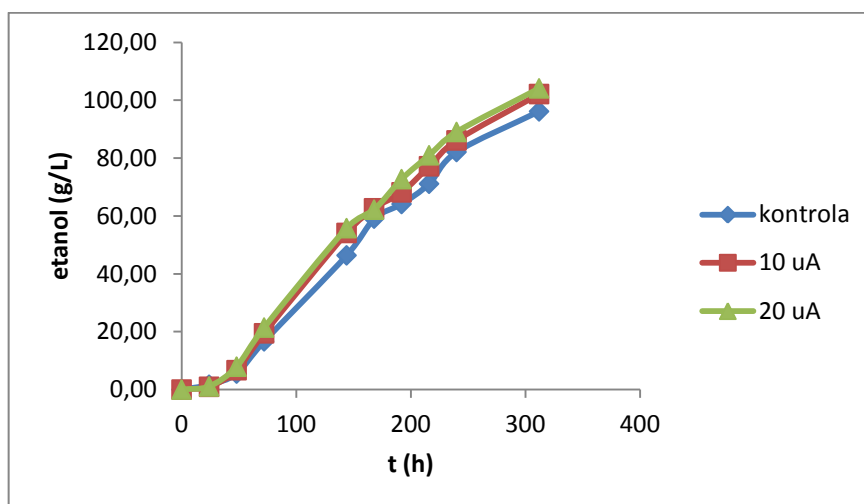
**Graf 35:** Hitrost porabe glukoze pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo električnih impulzov

Poraba reducirajočih sladkorjev se je v primeru fermentacij z električnimi impulzi začela hitreje, kot v primeru kontrolne fermentacije. Na hitrejši kvasni metabolizem kaže tudi hitrejši padec redoks potenciala v primeru uporabe električnih impulzov (Graf 39). V obeh primerih se je poraba sladkorjev zaključila prej.



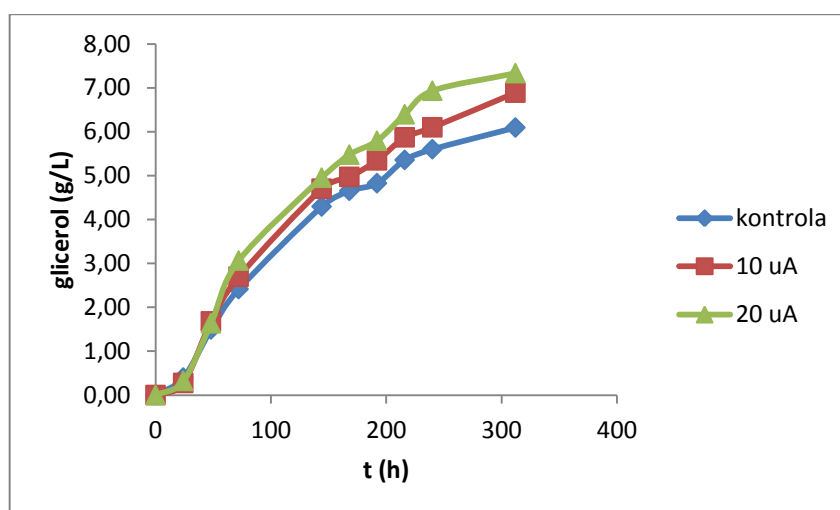
**Graf 36:** Hitrost porabe fruktoze pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo električnih impulzov

Etanol je najpomembnejši produkt fermentacije mošta v vino. Na produkcijo etanola vpliva tudi električni tok, ki vpliva na metabolizem kvasovk. Z električnimi impulzi povečamo prepustnost celičnih membran za izločanje produktov. Z večanjem jakosti enosmernega električnega toka se povečuje tudi hitrost nastajanja etanola. Največja hitrost je pri toku  $20 \mu\text{A}$ .



**Graf 37:** Hitrost nastajanja etanola pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo električnih impulzov

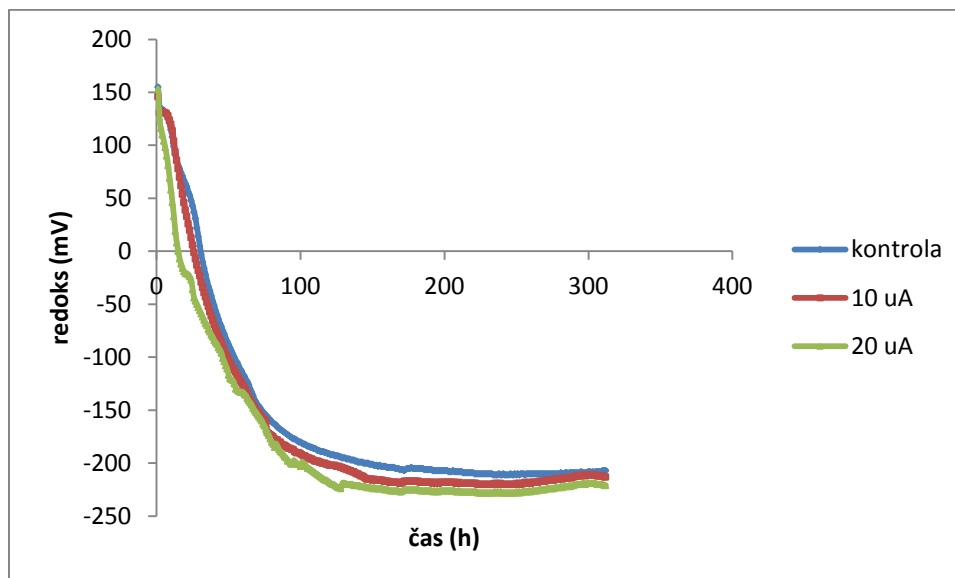
Koncentracija in hitrost nastajanja glicerola med fermentacijo naraščajo z večanjem jakosti električnega toka. Največja koncentracija glicerola je bila pri  $20 \mu\text{A}$ . Vzrok za povečano koncentracijo glicerola je v tem, da električni impulzi vplivajo na prepustnost celičnih membran. Deleži glicerola glede na nastali etanol so 6,3 % (kontrola), 6,7 % ( $10 \mu\text{A}$ ) in 7,0 % ( $20 \mu\text{A}$ ).



**Graf 38:** Hitrost nastajanja glicerola pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo električnih impulzov

**Tabela 9:** Maksimalne hitrosti nastajanja glicerola med fermentacijo

	kontrola	10 $\mu$ A	20 $\mu$ A
dP/dt (g/L h)	0,042	0,050	0,057



**Graf 39:** Redoks potencial pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo električnih impulzov

Iz grafa redoks potenciala vidimo, da električni impulzi vplivajo na kinetiko fermentacije. Redoks potencial hitreje pada pri fermentacijah z uporabo električnih impulzov.

**Tabela 10:** Koncentracija kislin pri fermentacijah z uporabo električnih impulzov

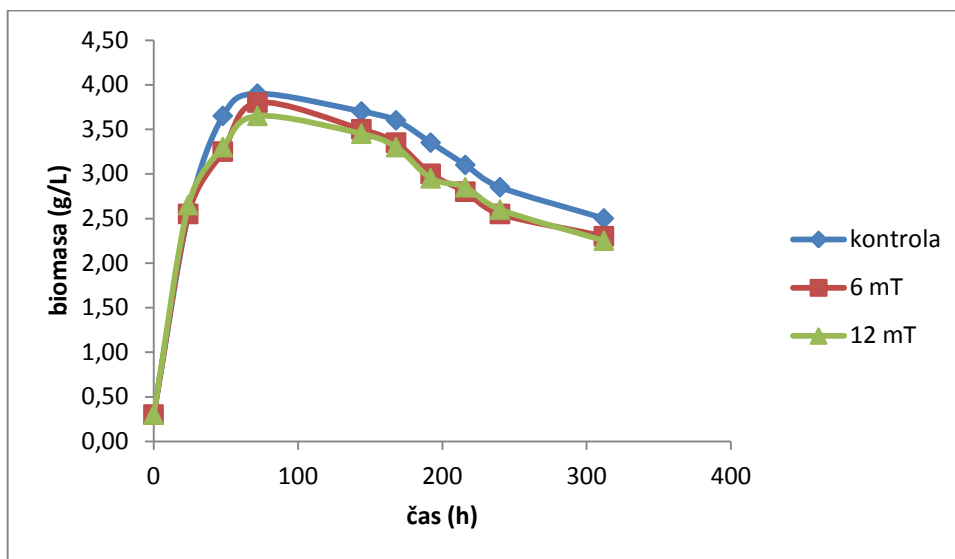
	vinska (g/L)	jabolčna (g/L)	mlečna (g/L)	ocetna (g/L)
kontrola	2,2	3,4	2,5	0,25
10 $\mu$ A	1,6	3,2	2,5	0,25
20 $\mu$ A	1,7	3,0	2,5	0,25

Vsebnosti vinske in mlečne kisline se z električnimi impulzi zmanjšajo. Iz tega lahko zaključimo, da je pri fermentacijah z električnimi impulzi pospešena kristalizacija. Medtem ko so koncentracije mlečne in ocentne kisline nespremenjene.

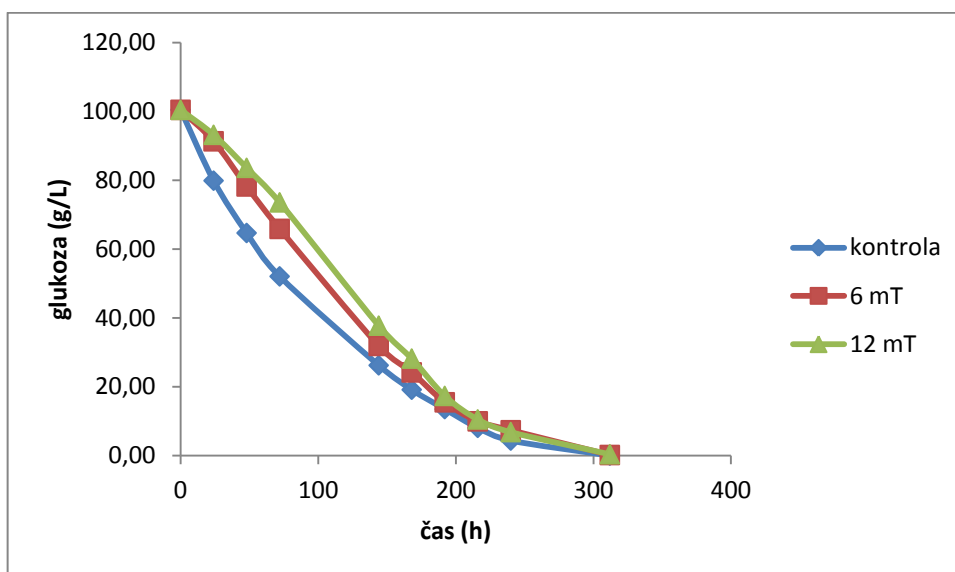
## **4.5 VPLIV MAGNETNEGA POLJA NA POTEK FERMENTACIJE**

Zaradi motnje kvasnega metabolizma, povzročene z magnetnim poljem, je alkoholna fermentacija stekla, ko je nastala večja količina biomase in so kvasovke prilagodile mehanizem delovanja v novonastalem okolju. Pri kontrolni fermentaciji je rast kvasne biomase hitrejša kot pri fermentacijah z uporabo magnetnega polja (Graf 40). Magnetno

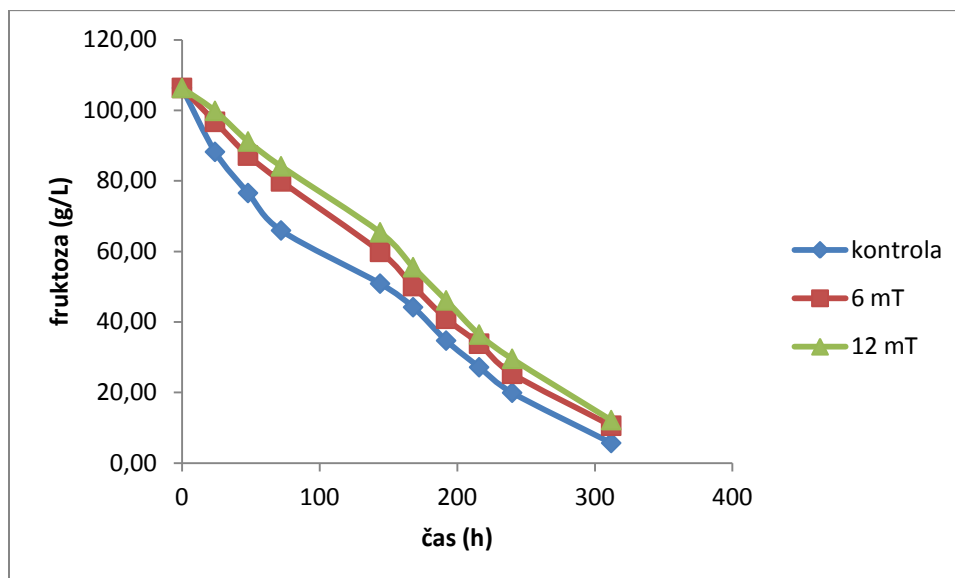
polje torej vpliva na upočasnjeno rast in razmnoževanje biomase, kasneje pa tudi na počasnejši metabolizem reducirajočih sladkorjev.



**Graf 40:** Hitrost nastajanja biomase pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo magnetnega polja

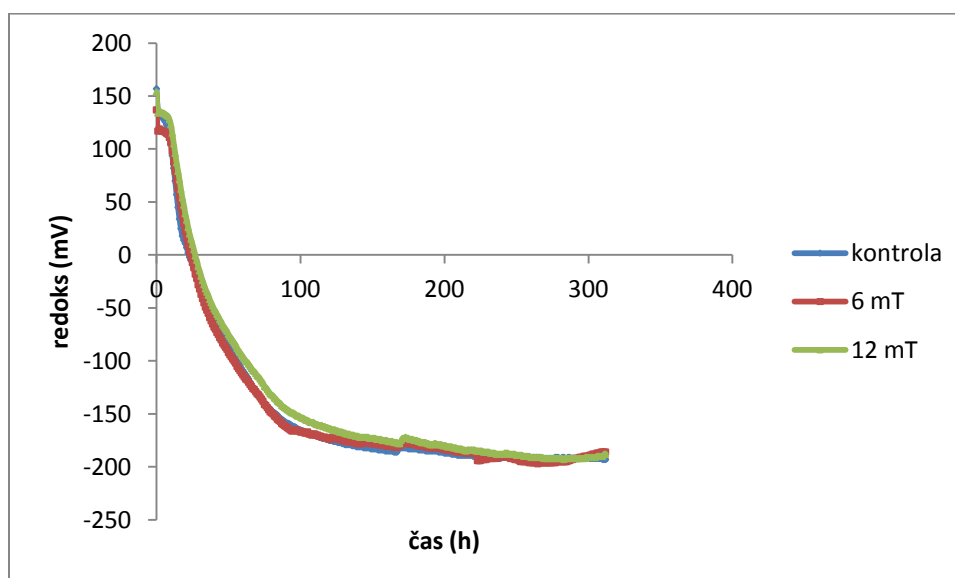


**Graf 41:** Hitrost porabe glukoze pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo magnetnega polja

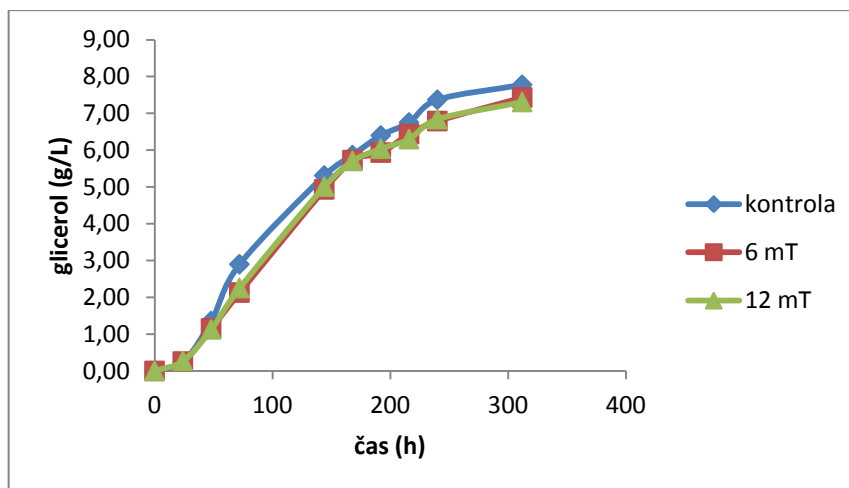


**Graf 42:** Hitrost porabe fruktoze pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo magnetnega polja

Poraba reducirajočih sladkorjev se je v primeru fermentacij z magnetnim poljem med fermentacijo pričela počasneje, kot v primeru kontrolne fermentacije. Statično magnetno polje (6 oziroma 12 mT) zaviralno vpliva na metabolizem, saj je poraba reducirajočih sladkorjev počasnejša (Graf 41 in Graf 42). Na počasnejši kvasni metabolizem kaže tudi počasnejši padec redoks potenciala v primeru uporabe statičnega magnetnega polja (Graf 43), čeprav so razlike minimalne.



**Graf 43:** Redoks potencial pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo magnetnega polja

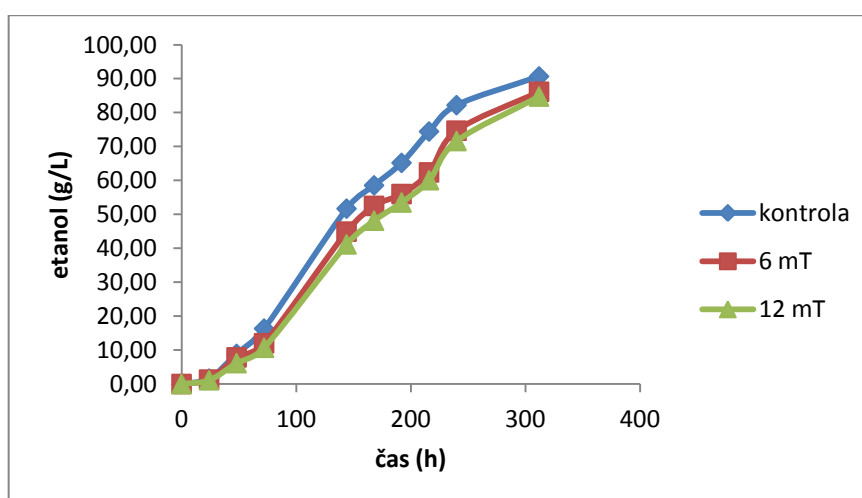


**Graf 44:** Hitrost nastajanja glicerola pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo magnetnega polja

Iz grafa 44, ki prikazuje odvisnost koncentracije glicerola od časa fermentacije, vidimo, da se z uporabo statičnega magnetnega polja producira manj glicerola, saj magnetno polje vpliva inhibitorno na kvasovke, in posledično le-te producirajo manjše količine glicerola. V kontrolni fermentaciji je končna koncentracija glicerola 7,78 g/L, medtem ko je v fermentaciji z magnetnim poljem (12 mT) 7,31 g/L. Deleži glicerola glede na nastali etanol so 8,6 % (kontrola), 8,3 % (6 mT) in 8,6 % (12 mT).

**Tabela 11:** Maksimalne hitrosti nastajanja glicerola med fermentacijo

	kontrola	6 mT	12 mT
dP/dt (g/L h)	0,042	0,050	0,057



**Graf 45:** Hitrost nastajanja etanola pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo magnetnega polja

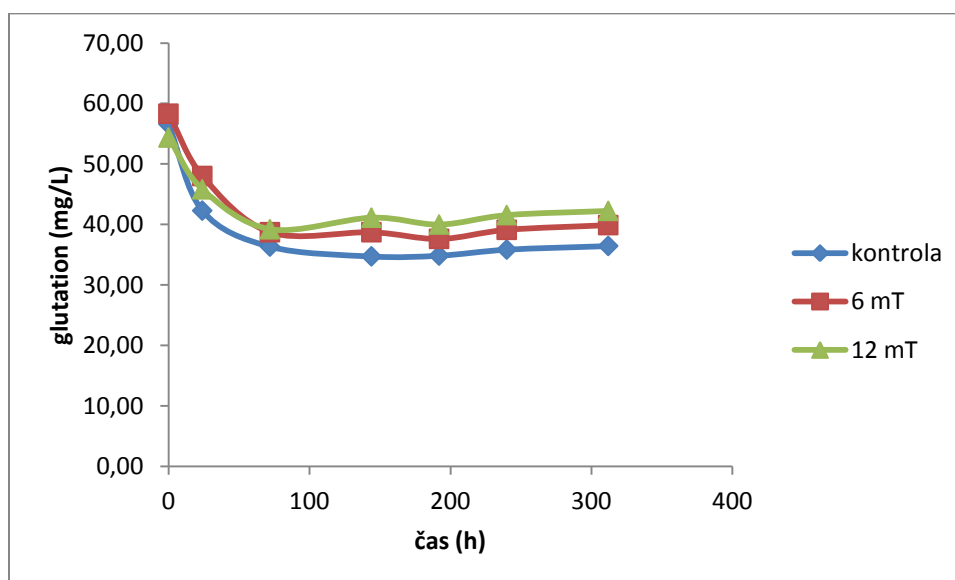
**Tabela 12:** Acetaldehid in višji alkoholi pri fermentacijah pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo magnetnega polja

	acetaldehid (g/L)	1-propanol (g/L)	2-butanol (g/L)	izoamilalkohol (g/L)
kontrola	0,0067	0,0086	0,0293	0,1254
6 mT	0,0069	0,0093	0,0295	0,1255
12 mT	0,0070	0,0093	0,0296	0,1258

Magnetno polje praktično ne vpliva na produkcijo višjih alkoholov in acetaldehida.

Glutation ali  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cisteinilglicin je najbolj razširjena neproteinska tiolna spojina, ki je prisotna v živih organizmih. Sestavljen je iz treh aminokislin – glutaminske kisline, cisteina in glicina. Glutaminska kislina in cistein sta med seboj povezana z  $\gamma$ -peptidno vezjo, katera preprečuje hidrolizo glutaciona z večino od peptidaznih encimov, zato se ne oksidira tako hitro kot njegova prekurzorja - cistein in  $\gamma$ -glutamylcistein (Anderson, 1998).

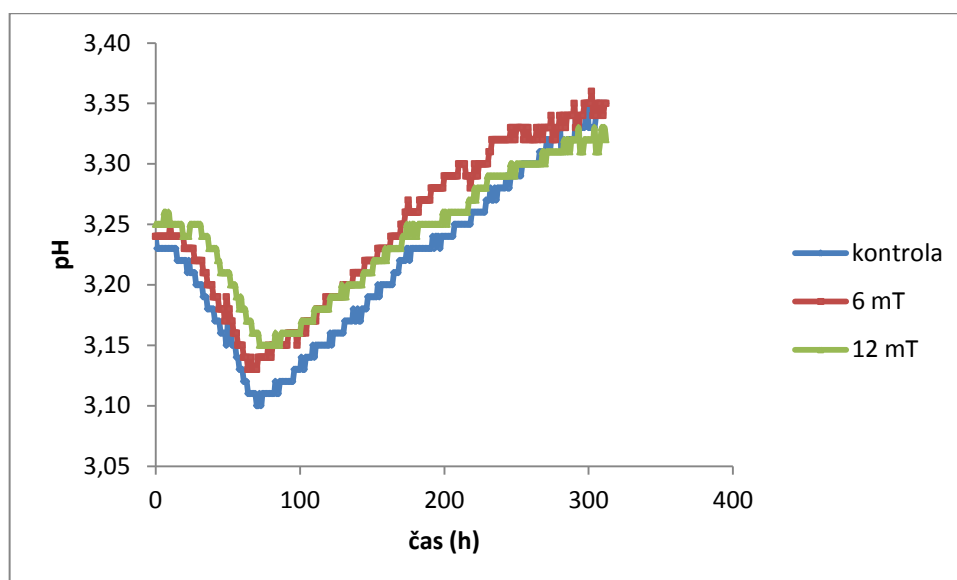
V celicah se pojavlja v reducirani obliki in oksidirani obliki kot glutacion disulfid (Fahey, 2001). Tvorba glutaciona je povezana tudi z celičnim obrambnim mehanizom, saj nekatere vrste kvasovk tvorijo velike znotrajcelične koncentracije glutaciona pri pomanjkanju hranil in oksidativnem stresu kot tudi med razmnoževanjem (Rollini in Manzoni, 2006).



**Graf 46:** Koncentracija glutaciona pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo magnetnega polja

Vloga in uporaba glutationa v vinarstvu je v zadnjem času predmet številnih raziskav, saj je eden od najpomembnejših antioksidantov. V vinarstvu ima pomembno vlogo pri kontroli oksidativnega kvara vina, ki je pomemben problem v pridelavi belih vin, saj vodi v izgubo značilne arome ter neznačilnega starikavega tona in neželjenih barvnih odtenkov. Glutacion igra pri oksidaciji mošta in vina ključno vlogo, saj veže oksidacijske produkte, ki se tvorijo med oksidacijo fenolnih spojin ter zaščiti številne aromatične spojine v vinu pred oksidacijo (Du Toit in sod., 2007).

Kljub zaviralnemu vplivu statičnega magnetnega polja, ki se kaže v produkciji biomase, porabi reducirajočih sladkorjev ter produkciji etanola (Graf 45) in glicerola, pa statično magnetno polje stimulira oziroma ohranja večje koncentracije glutationa v vinu. Končna koncentracija glutationa v kontrolni fermentaciji je 36,43 mg/L, medtem ko je v fermentaciji z magnetnim poljem (12 mT) 42,23 mg/L (Graf 46).



**Graf 47:** pH pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo magnetnega polja

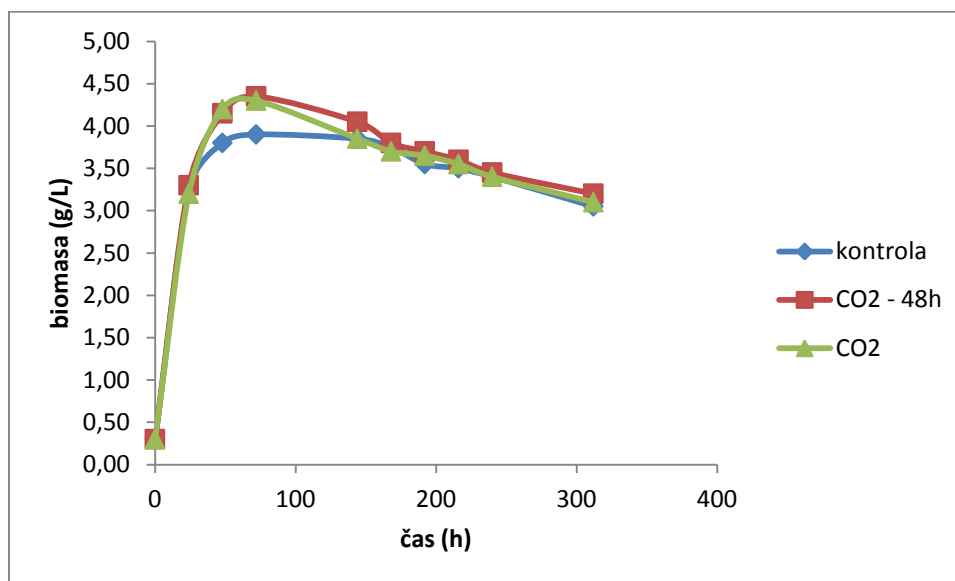
**Tabela 13:** Koncentracija kislin pri fermentacijah z uporabo magnetnega polja

	vinska (g/L)	jabolčna (g/L)	mlečna (g/L)	ocetna (g/L)
kontrola	2,0	2,4	2,9	0,16
6 mT	1,6	2,5	2,4	0,17
12 mT	1,6	2,6	2,6	0,19

Vsebnosti vinske in mlečne kisline se z uporabo magnetnega polja zmanjšata, medtem ko se z uporabo magnetnega polja koncentraciji jabolčne in ocetne kisline povečajo.

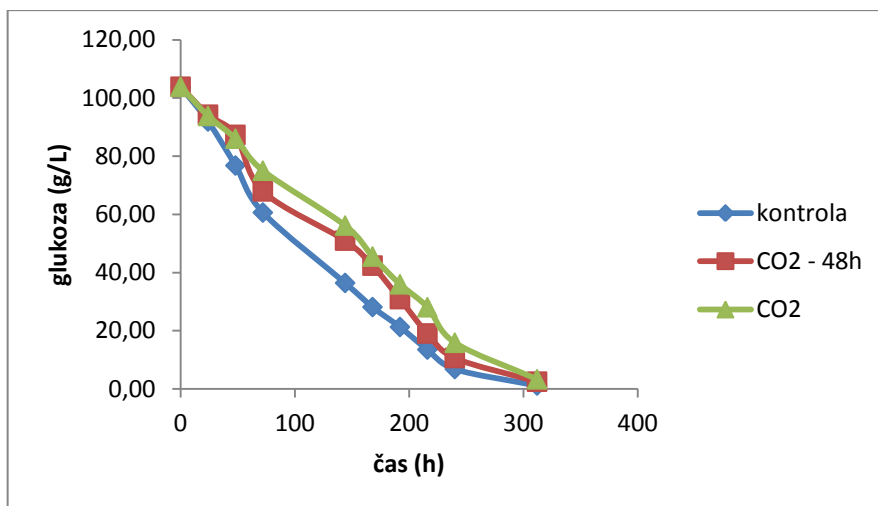
## 4.6 VPLIV VPIHOVANJA CO<sub>2</sub> NA POTEK FERMENTACIJE

V tem sklopu sem študiral vpliv CO<sub>2</sub> pulzov med fermentacijo na potek fermentacije vina. Zaradi motnje kvasnega metabolizma, povzročene s CO<sub>2</sub> impulzi, je alkoholna fermentacija stekla, ko so kvasovke prilagodile mehanizem delovanja v novonastalem okolju. Pri kontrolni fermentaciji je bila rast kvasovk manjša (Graf 48). CO<sub>2</sub> pulzi so torej vplivali na pospešeno rast in razmnoževanje kvasovk, posledično pa na povečanje biomase.

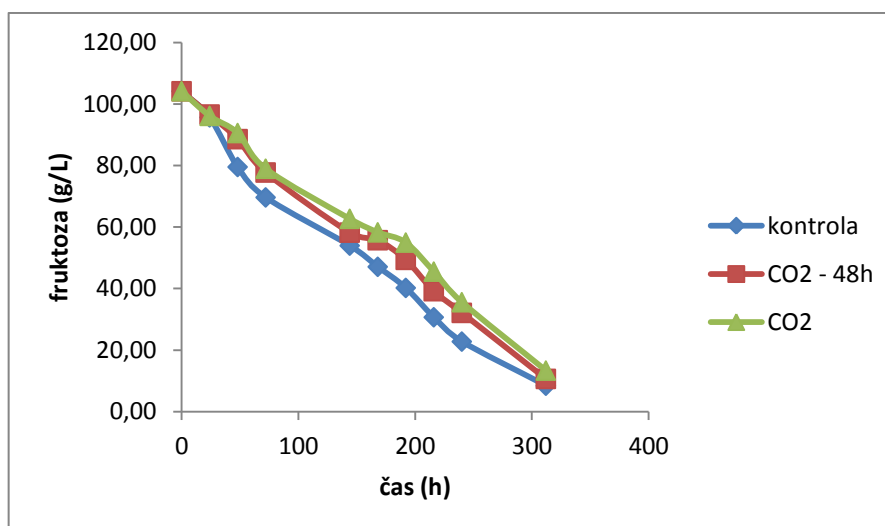


**Graf 48:** Hitrost nastajanja biomase pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo vpihovanja CO<sub>2</sub>

Poraba reducirajočih sladkorjev se je v primeru fermentacij s CO<sub>2</sub> pulzi med fermentacijo začela počasneje, kot v primeru kontrolne fermentacije. CO<sub>2</sub> pulzi zaviralno vplivajo na metabolizem kvasovk, saj je poraba reducirajočih sladkorjev počasnejša. Na počasnejši kvasni metabolizem kaže tudi počasnejši padec redoks potenciala v primeru uporabe CO<sub>2</sub> pulzov (Graf 54). V obeh primerih se je poraba sladkorjev zaključila kasneje (Graf 49 in Graf 50).

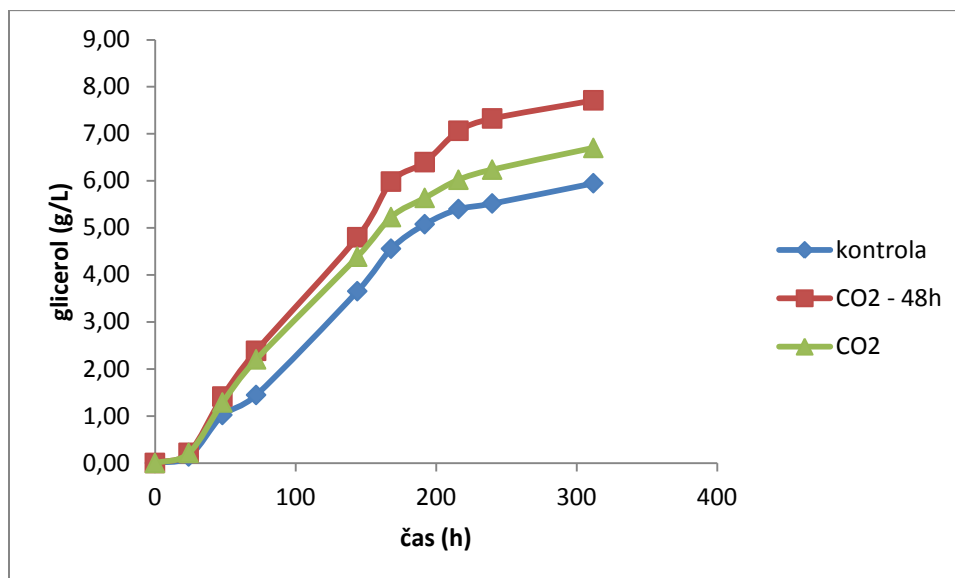


**Graf 49:** Hitrost porabe glukoze pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo vpihovanja CO<sub>2</sub>



**Graf 50:** Hitrost porabe fruktoze pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo vpihovanja CO<sub>2</sub>

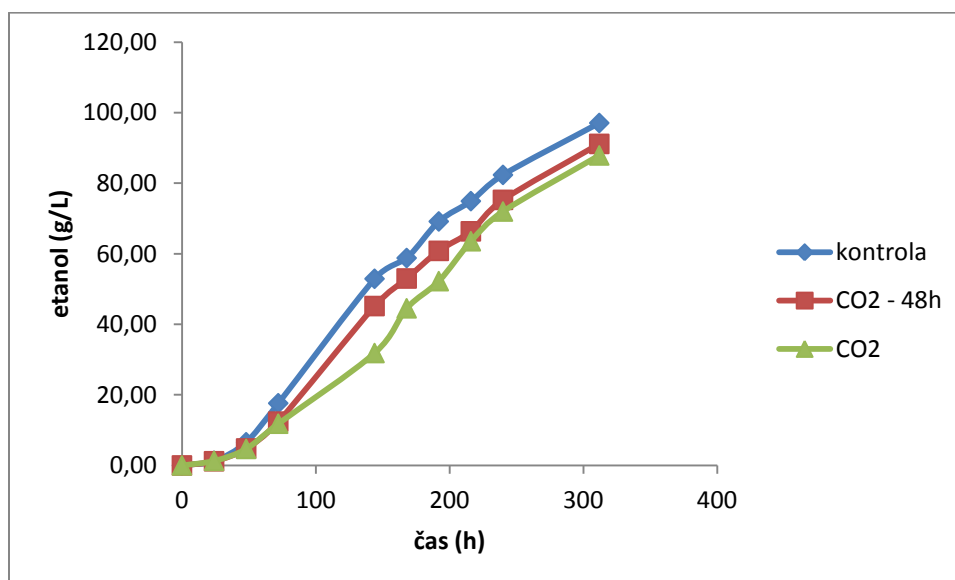
Iz grafa 51, ki prikazuje odvisnost koncentracije glicerola od časa fermentacije, vidimo, da se z uporabo CO<sub>2</sub> pulzov producira občutno več glicerola, saj CO<sub>2</sub> pulzi pozitivno vplivajo na produkcijo glicerola. V kontrolni fermentaciji je končna koncentracija glicerola 5,95 g/L, medtem ko je v fermentaciji z CO<sub>2</sub> pulzi med 24. in 72. uro 7,71 g/L. Deleži glicerola glede na nastali etanol so 6,1 % (kontrola), 8,5 % (CO<sub>2</sub> - 48h) in 7,6 % (CO<sub>2</sub>).



**Graf 51:** Hitrost nastajanja glicerola pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo vpihovanja CO<sub>2</sub>

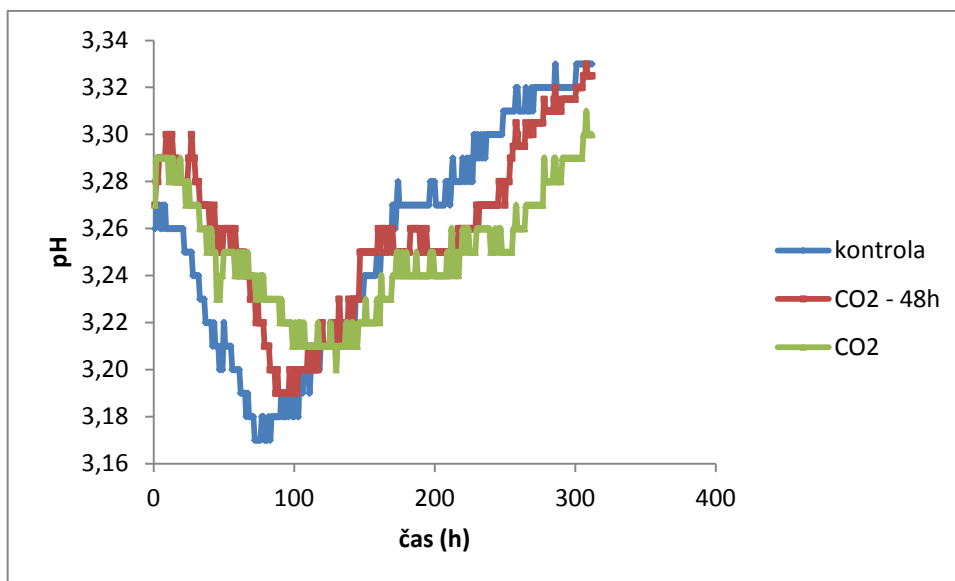
**Tabela 14:** Maksimalne hitrosti nastajanja glicerola med fermentacijo

	kontrola	CO <sub>2</sub> – 48h	CO <sub>2</sub>
dP/dt (g/L h)	0,037	0,045	0,041

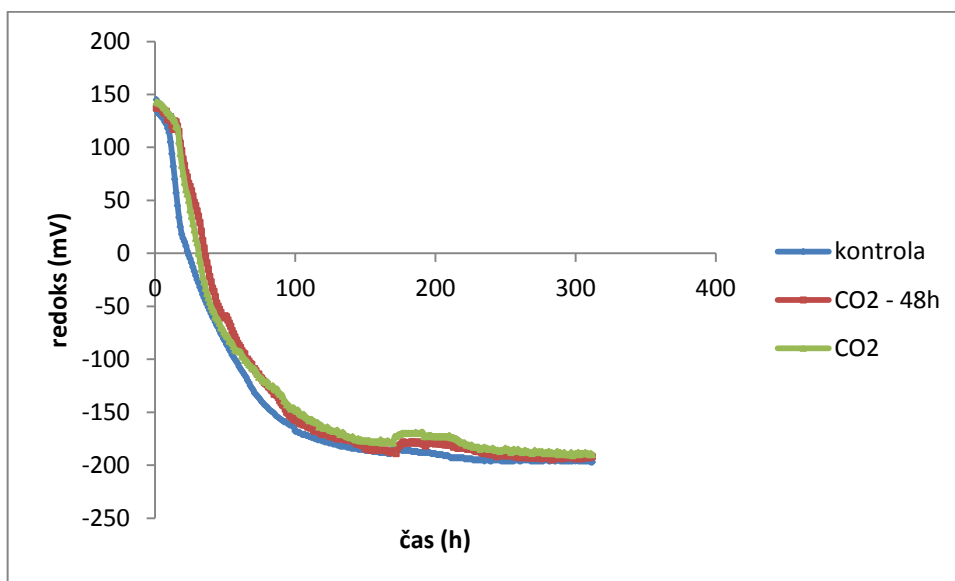


**Graf 52:** Hitrost nastajanja etanola pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo vpihovanja CO<sub>2</sub>

Etanol je najpomembnejši produkt fermentacije. Na produkcijo etanola vplivajo tudi CO<sub>2</sub> pulzi. Z uporabo CO<sub>2</sub> pulzov se produkcija etanola zmanjša.



**Graf 53:** pH pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo vpihovanja CO<sub>2</sub>



**Graf 54:** Redoks potencial pri kontrolni fermentaciji in fermentacijah z uporabo vpihovanja CO<sub>2</sub>

Iz grafa redoks potenciala je vidno, da CO<sub>2</sub> rahlo zaviralno vpliva na kinetiko fermentacije.

**Tabela 15:** Koncentracija kislin pri fermentacijah z vpihovanjem CO<sub>2</sub>

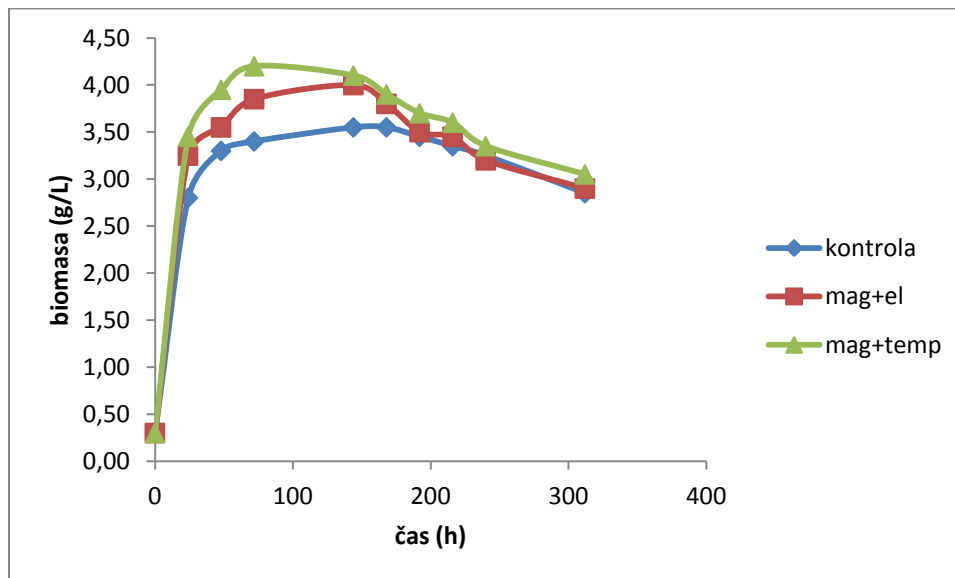
	vinska (g/L)	jabolčna (g/L)	mlečna (g/L)	ocetna (g/L)
kontrola	1,9	3,0	2,5	0,26
CO <sub>2</sub> -48 h	1,5	2,9	2,1	0,23
CO <sub>2</sub>	1,7	2,9	2,4	0,23

Z vpihovanjem CO<sub>2</sub> se vsebnosti vinske in mlečne kisline zmanjšata, medtem ko magnetno polje ne vpliva na koncentracijo jabolčne in očetne kisline.

## 4.7 VPLIV KOMBINACIJ NA POTEK FERMENTACIJE

V tem sklopu raziskav sem preizkusil kombinacije različnih vplivov na potek fermentacije vina (temperaturno nihanje, električni impulzi, magnetno polje, vpihovanje CO<sub>2</sub>). Temperatura, pri katerih so potekale vse fermentacije (kontrolne in kombinacije), je bila 18 °C, uporabljen sev kvasovk pa ANCHOR VIN 7.

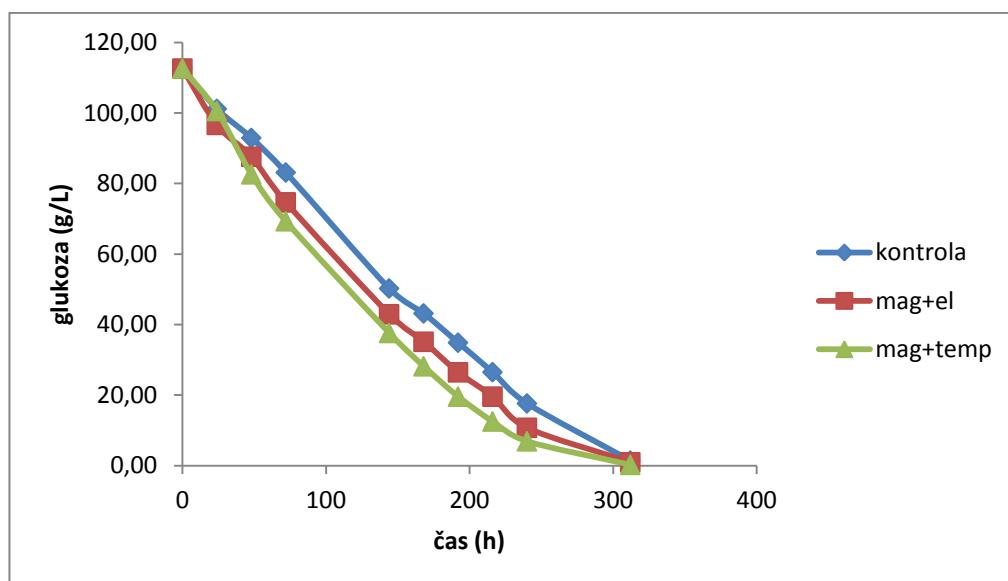
### 4.7.1 Kombinacija vpliva magnetnega polja in temperature oziroma električnih impulzov



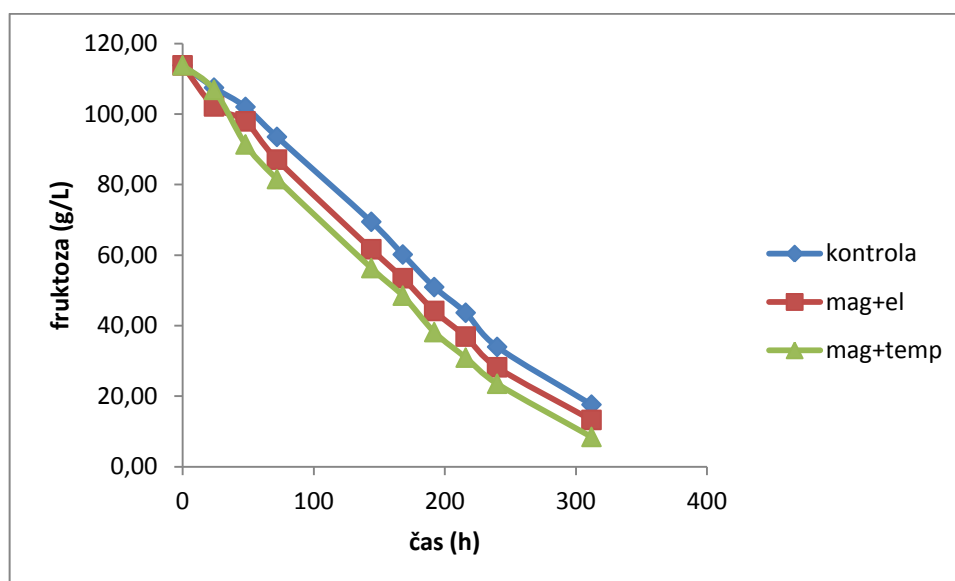
**Graf 55:** Koncentracija biomase v odvisnosti od časa

Graf 55 nam prikazuje nastajanje biomase v odvisnosti od časa. Največ biomase nastane pri kombinaciji vpliva temperature in magnetnega polja (sprememba temperature 18-26 °C in magnetno polje 12 mT), nekoliko manj pa pri kombinaciji vpliva električnega in magnetnega polja (električni impulzi 20 µA in magnetno polje 12 mT). Iz dobljenih rezultatov je razvidno,

da imata temperatura in električno polje večji vpliv na produkcijo biomase, kot pa magnetno polje in temperatura.

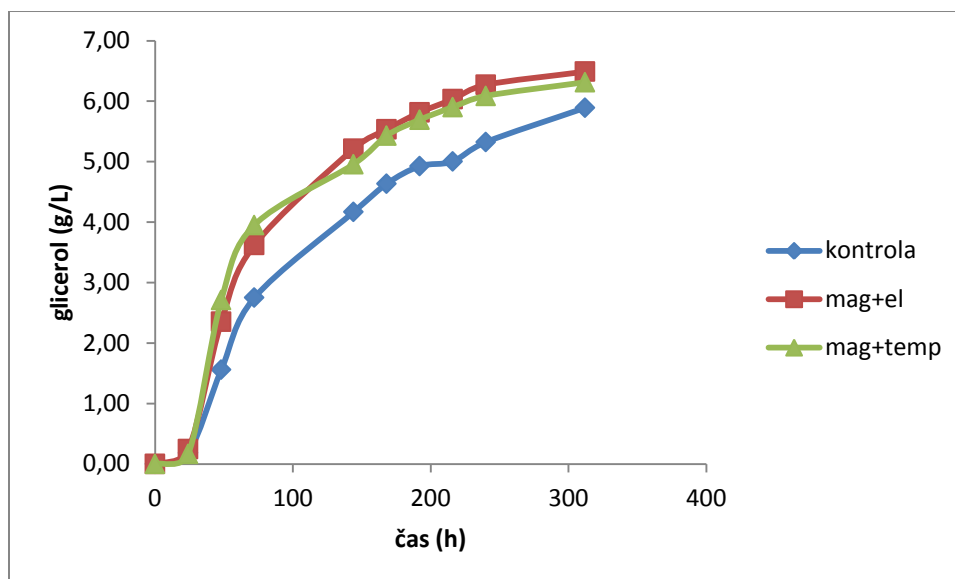


**Graf 56:** Koncentracija glukoze v odvisnosti od časa



**Graf 57:** Koncentracija fruktoze v odvisnosti od časa

Grafa 56 in 57 nam prikazujeta porabo glukoze in fruktoze za tri različne fermentacije. Hitrost porabe reducirajočih sladkorjev je največja pri kombinaciji vpliva temperature in magnetnega polja, nekoliko počasnejša pa pri kombinaciji vpliva električnega in magnetnega polja. V obeh kombinacijah vplivov je poraba reducirajočih sladkorjev hitrejša kot pri kontrolni fermentaciji.



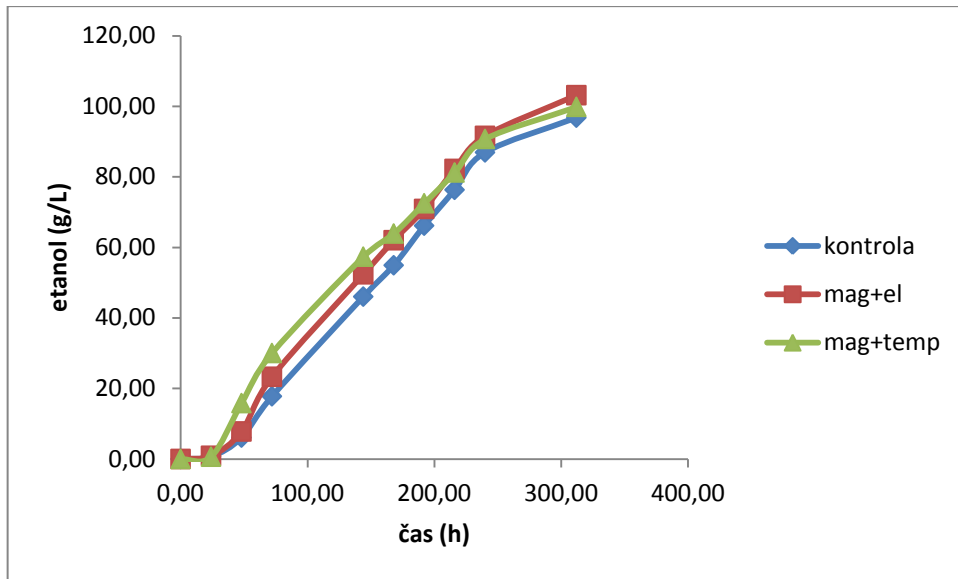
**Graf 58:** Koncentracija glicerola v odvisnosti od časa

V grafu 58 je prikazana odvisnost koncentracije glicerola od časa. Največ glicerola nastane pri kombinaciji vpliva električnega in magnetnega polja (6,49 g/L), nekoliko manj pa pri kombinaciji vpliva temperature in magnetnega polja (6,31 g/L). Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da temperatura in električno polje stimulirata produkcijo glicerola. Magnetno polje pa zavira produkcijo glicerola. Deleži glicerola glede na nastali etanol so 6,1 % (kontrola), 6,3 % (mag+el) in 6,3 % (mag+temp).

**Tabela 16:** Maksimalne hitrosti nastajanja glicerola med fermentacijo

	kontrola	mag+el	mag+temp
dP/dt (g/L h)	0,054	0,070	0,079

Podobno lahko vidimo tudi pri vplivu na koncentracijo etanola. Graf 59 nam prikazuje odvisnost koncentracije etanola od časa. Iz grafa je razvidno, da nastane največ etanola pri kombinaciji vpliva električnega in magnetnega polja (103,16 g/L), nekoliko manj pa pri kombinaciji vpliva temperature in magnetnega polja (99,85 g/L). Pri kontrolni fermentaciji pa je končna koncentracija etanola 96,78 g/L. Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da imata temperatura in električno polje večji vpliv na produkcijo etanola kot pa magnetno polje, saj temperatura in električno polje povečujeta produkcijo etanola, magnetno polje jo pa znižuje.

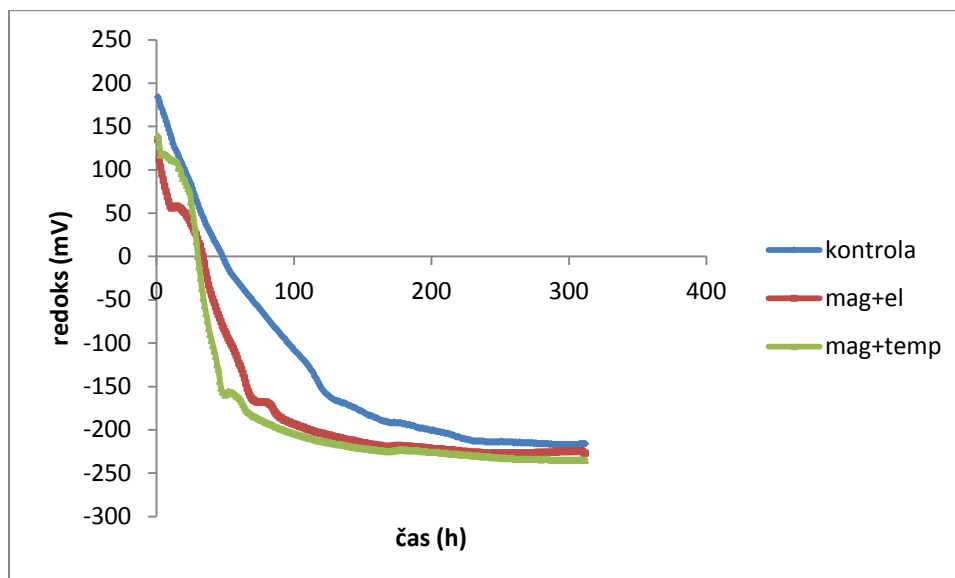


**Graf 59:** Koncentracija etanola v odvisnosti od časa



**Graf 60:** pH v odvisnosti od časa

Graf 60 nam prikazuje časovni potek sprememb pH ob uporabi kombinacij. Opaziti je mogoče, da različni vplivi ne vplivajo bistveno na potek vrednosti pH. Pri kombinaciji magnetnega polja in temperature je odstopanje najbolj vidno, saj že sama temperatura vpliva na vrednost pH.



**Graf 61:** Redoks potencial v odvisnosti od časa

Graf 61 nam prikazuje potek redoks potenciala med različnimi fermentacijami. Iz grafa je razvidno, da je najbolj počasna kinetika pri kontrolni fermentaciji, kar je razvidno tudi iz HPLC meritev. Kot je bilo prikazano že v predhodnih eksperimentih, temperatura in električni impulzi bistveno vplivajo na potek biosinteze.

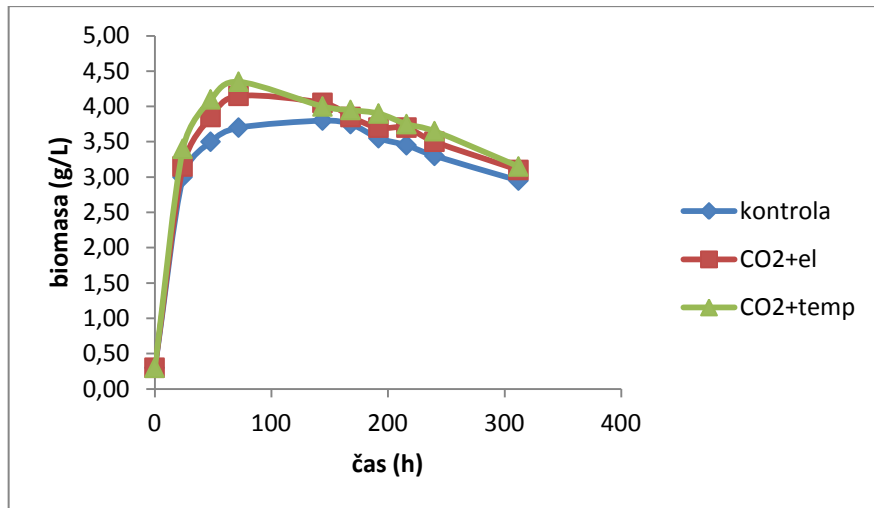
**Tabela 17:** Koncentracija kislin pri fermentacijah z kombinacijami vplivov

	vinska (g/L)	jabolčna (g/L)	mlečna (g/L)	ocetna (g/L)
kontrola	2,2	2,6	2,5	0,30
mag-el	2,0	2,4	2,3	0,36
mag-temp	2,1	2,4	2,3	0,35

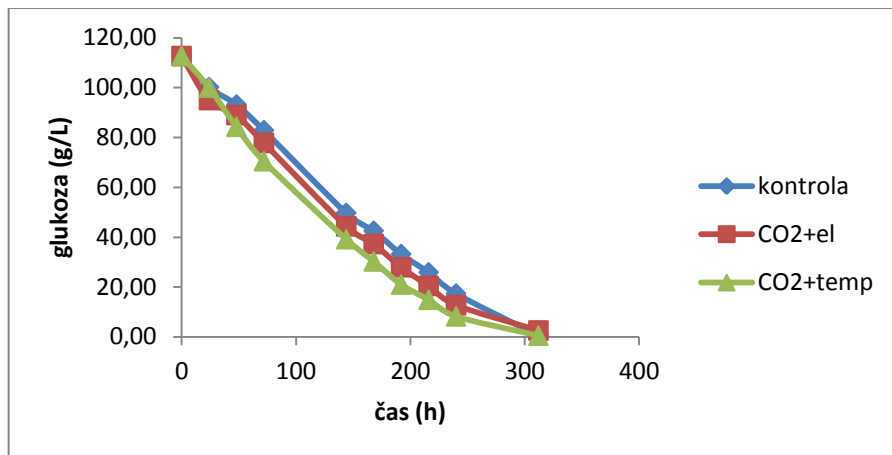
Vsebnosti vinske, mlečne in jabolčne kisline so nekoliko zmanjšane z uporabo obeh kombinacij vplivov, medtem ko se je koncentracija ocetne kisline povečala.

#### 4.7.2 Kombinacija vpihovanja CO<sub>2</sub> in temperature oziroma električnih impulzov

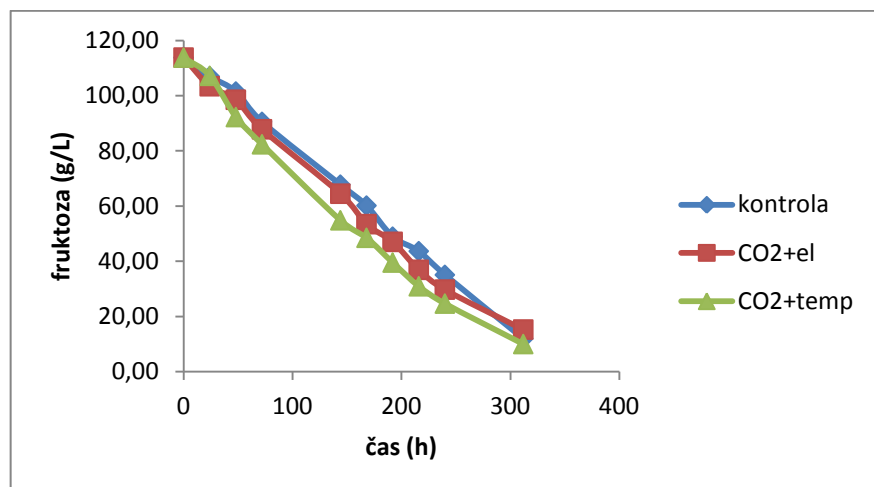
Graf 62 nam prikazuje odvisnost koncentracije biomase od časa. Iz grafa je razvidno, da nastane največ biomase pri kombinaciji vpliva temperature in vpihovanja CO<sub>2</sub> (sprememba temperature 18-26 °C in vpihovanje CO<sub>2</sub> med 24. in 48. uro fermentacije), nekoliko manj pa pri kombinaciji vpliva električnega polja in vpihovanja CO<sub>2</sub> (električni impulzi 20 μA in vpihovanje CO<sub>2</sub> med 24. in 48. uro fermentacije). Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da vsi trije vplivi povečujejo produkcijo biomase.



**Graf 62:** Koncentracija biomase v odvisnosti od časa

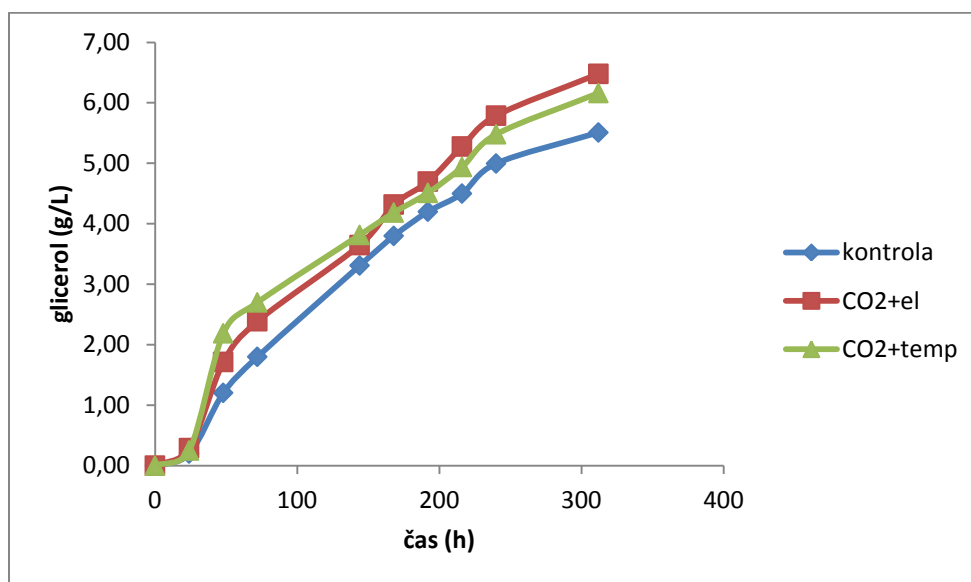


**Graf 63:** Koncentracija glukoze v odvisnosti od časa



**Graf 64:** Koncentracija fruktoze v odvisnosti od časa

Grafa 63 in 64 nam prikazujeta porabo glukoze in fruktoze pri treh različnih fermentacijah. Kinetika porabe reducirajočih sladkorjev je najhitrejša pri kombinaciji vpliva temperature in vpihovanja CO<sub>2</sub>, nekoliko počasnejša pa pri kombinaciji vpliva električnega polja in vpihovanja CO<sub>2</sub>. V obeh kombinacijah vplivov je poraba reducirajočih sladkorjev hitrejša kot pri kontrolni fermentaciji.

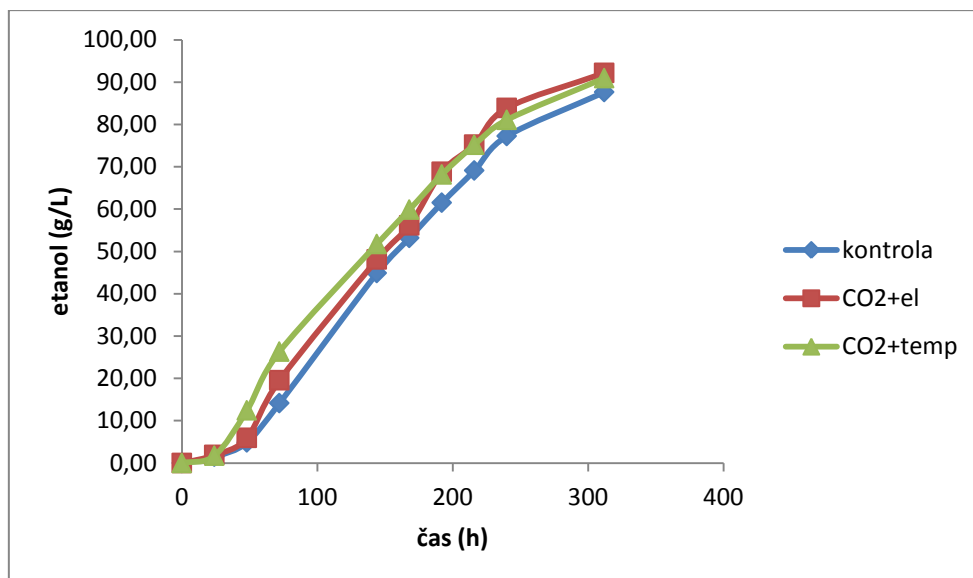


**Graf 65:** Biosinteza glicerola v odvisnosti od časa ob uporabi kombinacije regulatornih parametrov

Graf 65 nam prikazuje odvisnost spreminjanja koncentracije glicerola od časa. Največ glicerola nastane pri kombinaciji vpliva električnega polja in vpihovanja CO<sub>2</sub> (6,48 g/L), manj pa pri kombinaciji vpliva temperature in vpihovanja CO<sub>2</sub> (6,16 g/L). Pri kontrolni fermentaciji pa je koncentracija glicerola 5,51 g/L. Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da imajo kombinacije uporabljenih vplivov (temperatura, električno polje in vpihovanje CO<sub>2</sub>) pozitiven vpliv, saj povečujejo produkcijo glicerola. Deleži glicerola glede na nastali etanol so 6,3 % (kontrola), 7,0 % (CO<sub>2</sub>+ el) in 6,8 % (CO<sub>2</sub>+ temp).

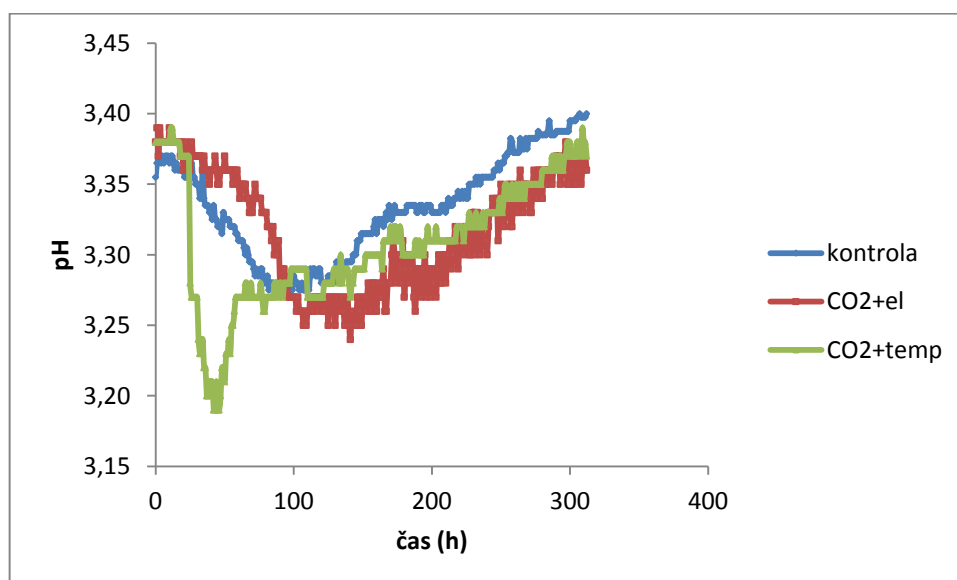
**Tabela 18:** Maksimalne hitrosti nastajanja glicerola med fermentacijo

	kontrola	CO <sub>2</sub> +el	CO <sub>2</sub> +temp
dP/dt (g/L h)	0,033	0,043	0,0051

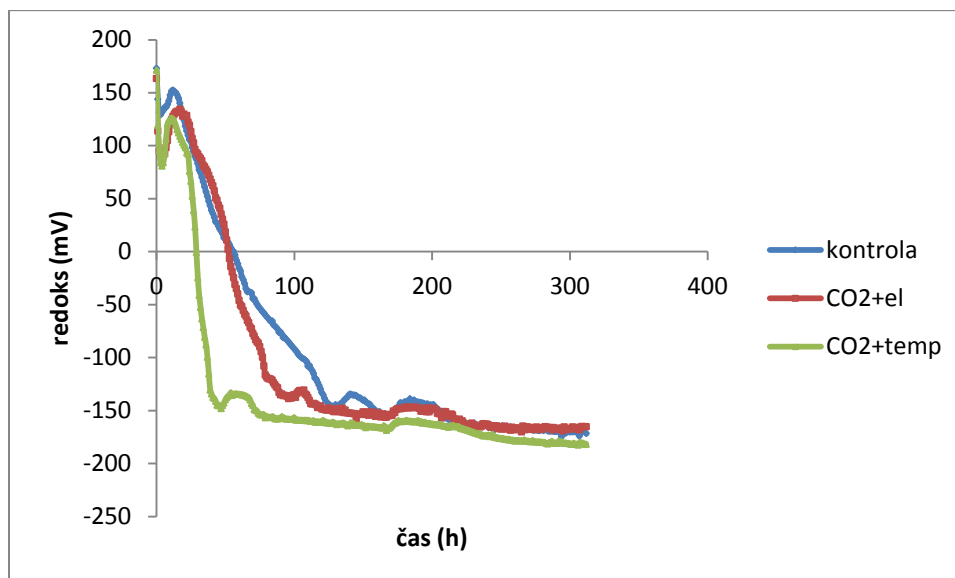


**Graf 67:** Biosinteza etanola v odvisnosti od časa ob uporabi kombinacije regulatornih parametrov

Podobno lahko vidimo tudi pri vplivu na koncentracijo etanola. Graf 66 nam prikazuje odvisnost koncentracije etanola od časa. Iz prikazanega je razvidno, da nastane največ etanola (91,18 g/L) pri kombinaciji vpliva električnega polja in vpihovanja CO<sub>2</sub>, nekoliko manj (90,95 g/L) pa pri kombinaciji vpliva temperature in vpihovanja CO<sub>2</sub>. Pri kontrolni fermentaciji pa je končna koncentracija etanola 87,65 g/L.



**Graf 67:** pH v odvisnosti od časa



**Graf 68:** Redoks potencial v odvisnosti od časa

Graf 68 nam prikazuje potek redoks potenciala med različnimi fermentacijami. Iz grafa je razvidno, da je najbolj počasna kinetika pri kontrolni fermentaciji, nekoliko hitrejša je kinetika kombinacije vplivov električnega polja in vpihovanja CO<sub>2</sub>, najhitrejša pa kombinacija vplivov temperature in vpihovanja CO<sub>2</sub>. Inhibitorni učinek CO<sub>2</sub> ni viden zaradi povišane temperature (26 °C od 24. do 48. ure fermentacije).

**Tabela 19:** Koncentracija kislin pri fermentacijah s kombinacijami vplivov

	vinska (g/L)	jabolčna (g/L)	mlečna (g/L)	ocetna (g/L)
kontrola	2,1	2,8	2,5	0,33
temp-CO <sub>2</sub>	2,1	2,4	2,5	0,41
el-CO <sub>2</sub>	2,1	2,4	2,3	0,38

Vsebnosti vinske in mlečne kisline so podobne pri vseh fermentacijah. Z obema kombinacijama vplivov se je nekoliko zmanjšala koncentracija jabolčne kisline in povečala koncentracija očetne kisline.

## 4.8 REGULIRANA FERMENTACIJA

V prejšnjih sklopih svojega raziskovalnega dela sem ugotovil, da *on-line* meritve redoks potenciala omogočajo dober vpogled v metabolno aktivnost kvasovk, kakor tudi v oksidacijsko-redukcijske sposobnosti vina. Zato sem želel v tem sklopu preveriti, kakšne so možnosti usmerjanja kvasnega metabolizma z uporabo različnih fizikalnih parametrov in njihovih kombinacij na potek procesa vinske fermentacije. Z načrtno regulacijo in

usmerjanjem fermentacije po znanem trajektoriju redoks potenciala uspešne fermentacije bi bilo mogoče z različnimi fizikalnimi parametri usmerjati potek fermentacije v smer biosinteze želenih spojin ali pa vsaj boljših, kot bi jih sami sebi usmerjena fermentacija lahko ustvarila. S tako regulacijo bi bilo možno vplivati na potek fermentacij slabih letnikov v smislu zmanjšanja razlik v izkoristku bioprocesa in kakovosti končnega pridelka. S tem ni rečeno, da je možno ustvarjati iz slabih letnikov najboljše, je pa možno iz slabih pridobiti najboljše kar se da (Berovič 1999). V prikazanem poglavju sem želel preveriti možnost regulacije redoks potenciala glede na rezultate predhodnih meritev. S tem sem želel preveriti, ali se lahko s pomočjo *on-line* vrednosti redoks potencial približamo izbranemu profilu redoks potenciala, ki bi predstavljal optimalen potek fermentacije, glede na vhodne spremenljivke in na končno kakovost vina.

Regulacijo sem izvedel s pomočjo spreminjanja temperature fermentacije, indukcije električnih in magnetnih impulzov ter uvajanja CO<sub>2</sub>. Odziv mikroorganizma sem spremljal s pomočjo *on-line* meritev redoks potenciala in pH ter *off-line* meritev koncentracije metabolitov, ki so najpomembnejši za proces in za kakovost vina (glukoza, fruktoza, etanol, glicerol).

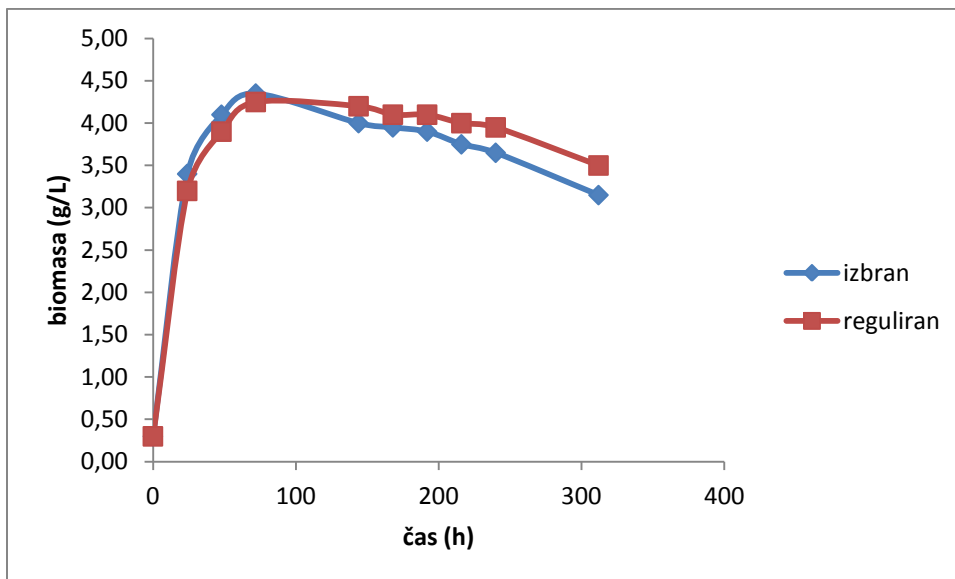
Na podlagi Arrheniusove enačbe je znano, da je temperatura eden izmed najpomembnejših fizikalnih parametrov v katerikoli kemijski in biokemijski reakciji, tako tudi v metabolizmu kvasnih celic. Višja temperatura (15-25 °C) je dejavnik, ki pozitivno vpliva na kvasni metabolizem in s tem na hitrost kemijskih reakcij. To potrjujejo tudi rezultati eksperimentov vodenja fermentacij pri različnih temperaturah, pri katerih je razvidno naraščanje encimske aktivnosti z dvigom temperature (sklop 4.1).

Prav tako kot temperatura imajo na potek fermentacije pomemben vpliv tudi električni impulzi. Iz rezultatov eksperimentov vodenja fermentacij z električnimi impulzi je razvidno, da uporaba električnih impulzov vpliva na hitrejšo kinetiko in večje koncentracije metabolitov (sklop 4.4).

Ogljikov dioksid zavira metabolno aktivnost kvasovk. CO<sub>2</sub> je produkt fermentacije. V procesu katabolizma sladkorja se sprošča v encimskih reakcijah dekarboksilacije s pomočjo encimov dekarboksilaz. Vnos CO<sub>2</sub> v sistem najverjetneje povzroča inhibicijo encimov (dekarboksilaz) s produktom. Z vnosom CO<sub>2</sub> se med fermentacijo vrši pritisk proti dekarboksilaciji piruvata (piruvat dekarboksilaza) v acetaldehid. Posledica je ovirana reoksidacija NADH koencimov in nadalje reakcije encimov (dehidrogenaz), kjer igra NAD<sup>+</sup> vlogo prejemnika elektronov. Tako je posredno upočasnen metabolizem kvasovk (Bisson, 1993).

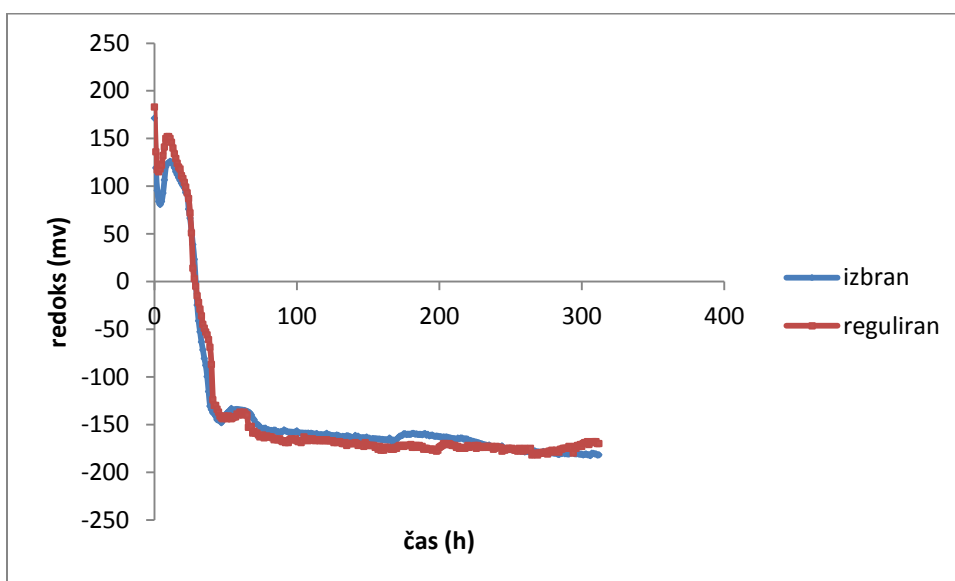
Izkazalo se je, da se s pomočjo spreminjanja temperature, električnih impulzov ter vpihovanja CO<sub>2</sub> lahko vpliva na spreminjanje redoks potenciala in s tem na potek fermentacijskega procesa, vendar pa ni možno v celoti slediti določeni redoks krivulji, ki sem jo izbral kot optimalno za proces. Razlika, ki v tem primeru nastane med izbrano in

regulirano krivuljo redoks potenciala, pa je zanemarljiva, če primerjamo še rezultate kinetike razgradnje in nastanka za proces pomembnih reaktantov in produktov. Regulacija s pomočjo teh parametrov je torej možna, vendar so možne tudi še izboljšave.



**Graf 69:** Koncentracija biomase v odvisnosti od časa

izbrana fermentacija: 18 °C, temp. šok 26 °C (24-48 h), CO<sub>2</sub> pulzi (24-72 h) regulirana fermentacija: 18 °C, temp. šok 26.°C (3-7 h), CO<sub>2</sub> pulzi (24-48 h), el. impulzi (20-48 h)

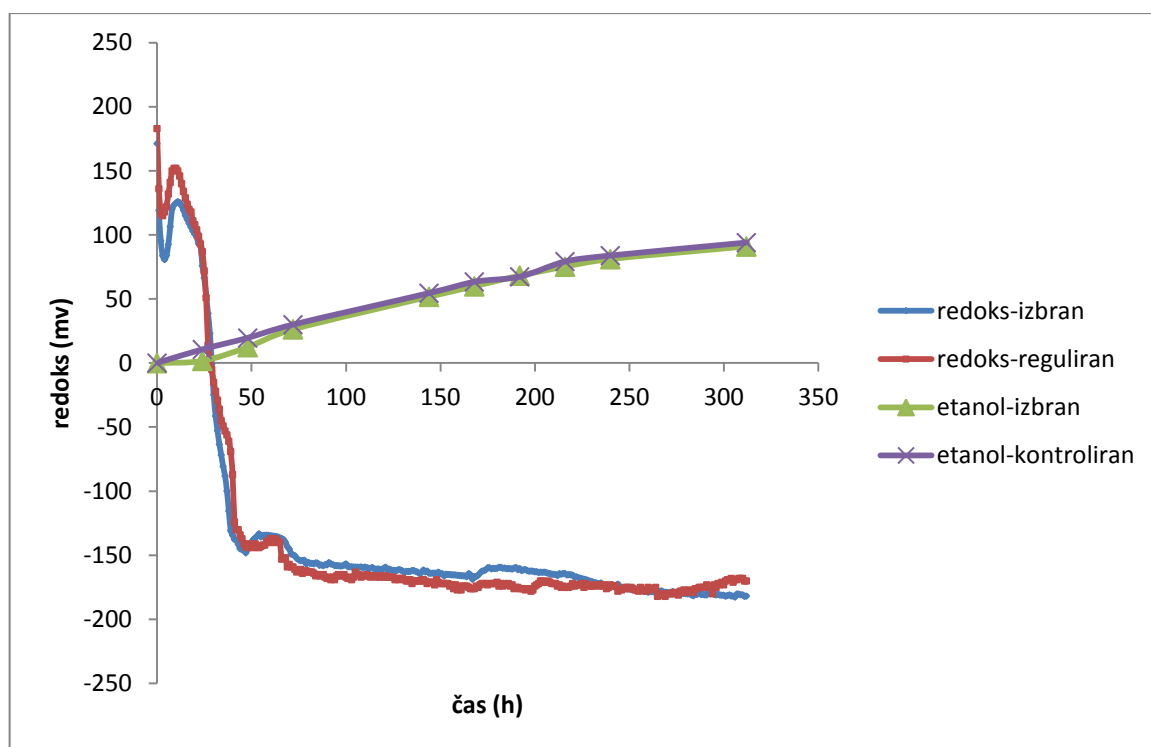


**Graf 70:** Redoks potencial v odvisnosti od časa

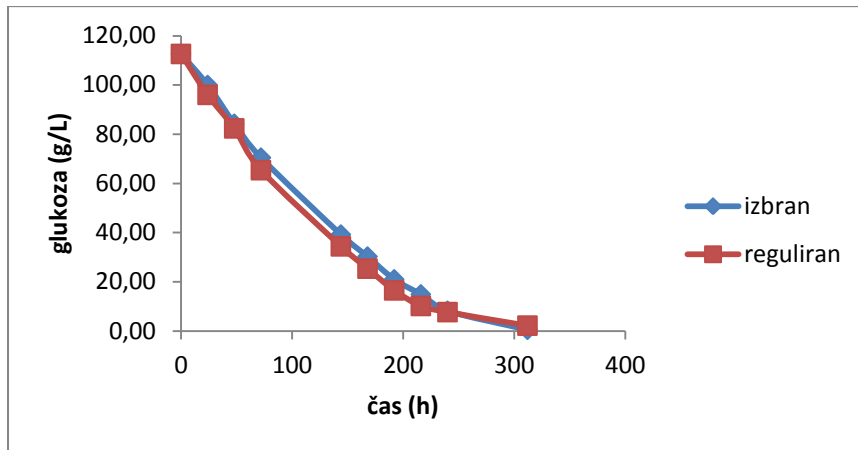
Ker je fermentacija, ki smo jo izbrali kot vzorčno fermentacijo, potekala pri 18 °C, smo tudi regulirano fermentacijo začeli pri 18 °C. Ker je bila vrednost redoks potenciala pri izbrani fermentaciji nekoliko nižja in je začela hitro padati, sem po 3 h zvišal temperaturo na 26 °C. Po koncu temperaturne spremembe pa je začel redoks potencial hitro padati (po 7 h).

Profil redoks krivulje je zelo podoben za obe fermentaciji - izbrano in regulirano. Padec redoks potenciala izbrane in kontrolirane fermentacije je bil po 48 h praktično enak.

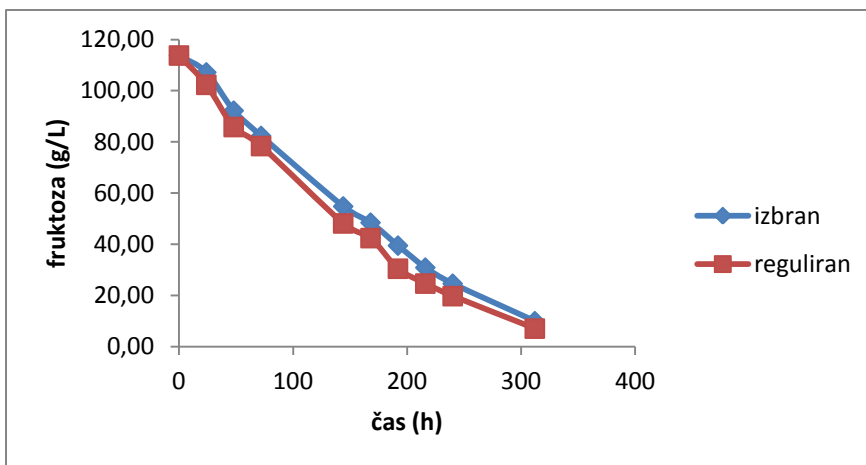
Med fermentacijo, ki smo jo regulirali s spreminjanjem temperature, električnimi impulzi in vpihovanjem CO<sub>2</sub> je redoks potencial padel na nekoliko nižjo vrednost, vendar je razlika minimalna, kar je razvidno tudi iz grafa 70. Upočasnitev kvasnega metabolizma je mogoče opaziti tudi na grafu 75 ki prikazuje nastanek etanola med obema fermentacijama. V času po 48 h je opaziti upočasnjeno nastajanje etanola, kar bi lahko bilo odraz znižane kvasne aktivnosti zaradi vpihovanja CO<sub>2</sub>.



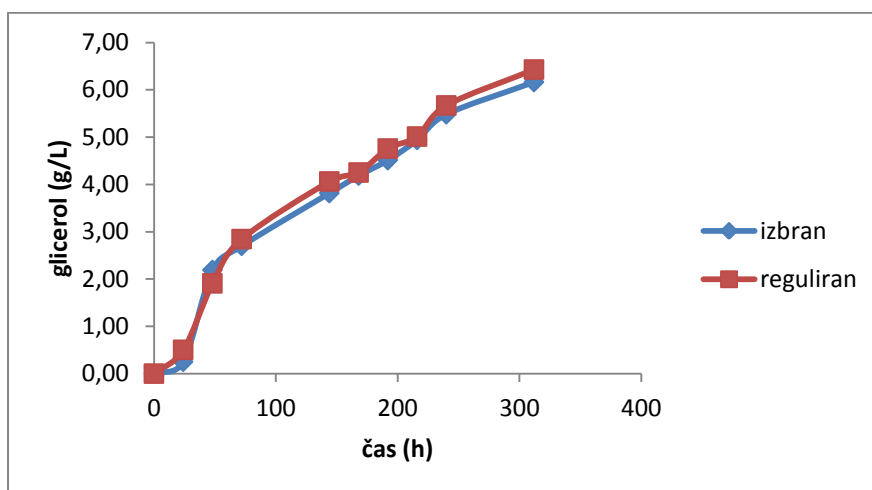
**Graf 71:** Redoks potencial in koncentracija etanola v odvisnosti od časa



**Graf 72:** Poraba glukoze med fermentacijo

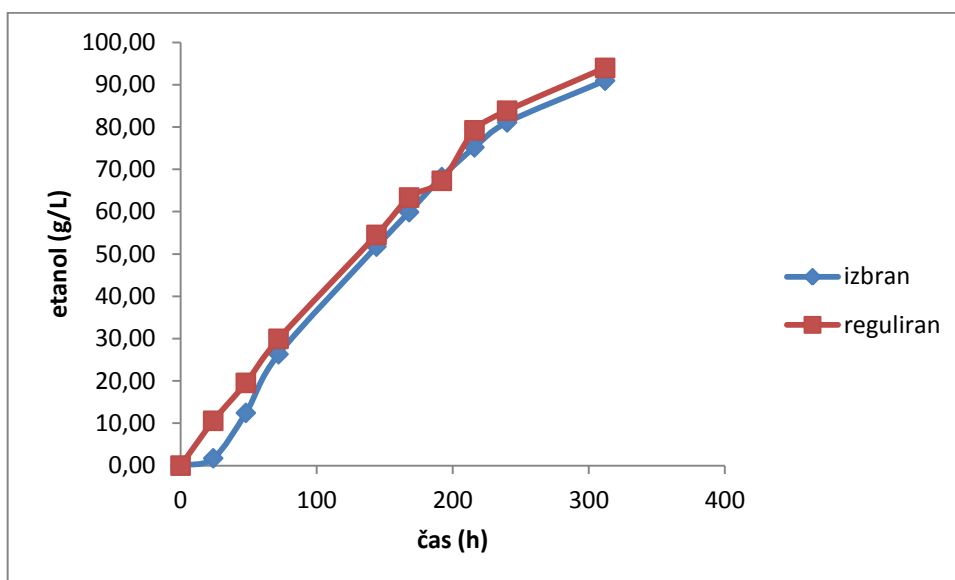


**Graf 73:** Koncentracija fruktoze v odvisnosti od časa



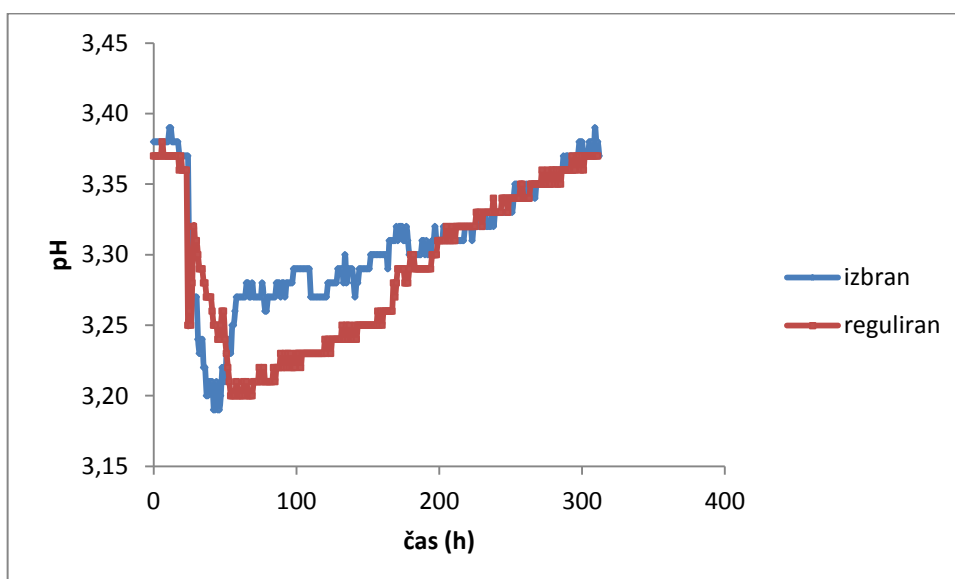
**Graf 74:** Koncentracija glicerola v odvisnosti od časa

Kinetika nastanjanja glicerola, kot najpomembnejšega sekundarnega produkta fermentacije, je med fermentacijama podobna. V primeru regulirane fermentacije je opazna motnja v naraščanju koncentracije glicerola v začetni fazi. Končna koncentracija glicerola je v primeru regulirane fermentacije višja za 0,3 g/L (Graf 74). Deleža glicerola glede na nastali etanol so 6,8 % (izbran) in 6,8 % (kontroliran).



**Graf 75:** Koncentracija etanola v odvisnosti od časa

Graf 75 nam prikazuje koncentracije etanola pri izbrani in regulirani fermentaciji. Pri regulirani fermentaciji so koncentracije etanola nekoliko višje. Razlog je v tem, ker pri regulirani fermentaciji kvasovke silimo k določenemu redoks potencialu.



**Graf 76:** pH v odvisnosti od časa

pH mošta v obeh eksperimentih (z in brez regulacije) na začetku fermentacije najprej pade zaradi metabolne aktivnosti kvasovk in produkcije CO<sub>2</sub>, ki se raztaplja v mediju. Potem pa začne vrednost pH postopoma naraščati zaradi produkcije etanola in izločanja vinske kisline (Graf 76).

Med primerjavo kinetik nastajanja primarnih in sekundarnih produktov fermentacij in porabe glukoze in fruktoze nisem opazil bistvenih razlik. Končna koncentracija etanola je bila v primeru regulirane fermentacije višja za 3,02 g/L, kar je za končno koncentracijo etanola v vinu praktično zanemarljiva razlika. Omeniti velja še hitrejšo produkcijo etanola (graf 80) v začetnih urah, ki jo je povzročil dvig temperature (18-26 °C od 3.-7. ure fermentacije).

Iz rezultatov eksperimentov sem ugotovili, da je mogoče pospeševati hitrost fermentacije mošta z regulacijo temperature fermentacije in jo s pomočjo vpihovanja CO<sub>2</sub> zniževati. Vpihovanje CO<sub>2</sub> med bioprocesom ima zaviralen učinek na hitrost poteka vrenja. Z vnosom ogljikovega dioksida v bioproces fermentacije lahko prekinemo ali upočasnimo potek fermentacije, kar je posebej primerno v tehnologiji pridelave sladkih in polsladkih vin z ustrezno (omejeno) vsebnostjo etanola.

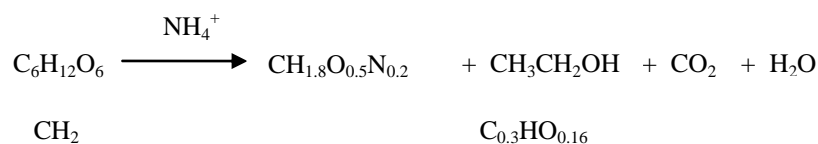
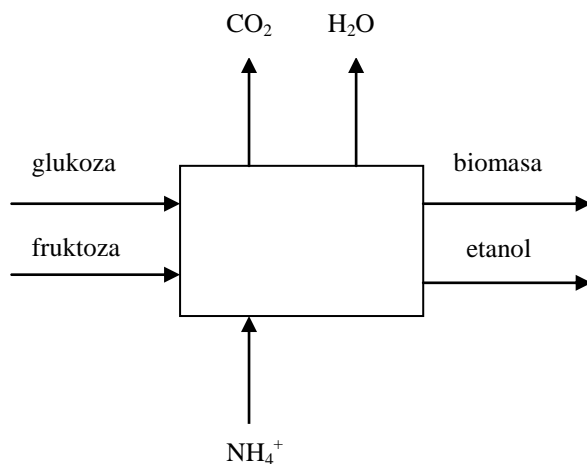
**Tabela 20:** Koncentracija kislin pri izbrani in regulirani fermentaciji

	vinska	jabolčna	mlečna	ocetna
izbrana	2,1	2,4	2,5	0,41
regulirana	1,9	2,5	2,5	0,44

Vsebnosti jabolčne in mlečne kisline so praktično enako za izbrano in regulirano fermentacijo. Pri regulirani fermentaciji je nekoliko zmanjšana koncentracija vinske kisline in nekoliko povečana koncentracija ocetne kisline.

## 4.9 MODEL ČRNE SKRINJE

Za popis podatkov spreminjanja koncentracij etanola pri treh različnih temperaturah (15, 20 in 25 °C) sem uporabil model črne skrinje.



	biomasa	glukoza	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	CO <sub>2</sub>	etanol	H <sub>2</sub> O	•	q <sub>biomasa</sub>	q <sub>glukoza</sub>	q <sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub>	q <sub>CO<sub>2</sub></sub>	q <sub>etanol</sub>	q <sub>H<sub>2</sub>O</sub>	= 0
C	1	1	0	1	0,3	0								
H	1,8	2	4	0	1	2								
O	0,5	1	0	2	0,16	1								
N	0,2	0	1	0	0	0								

$$\begin{aligned}
 & r_{AX} (\lambda_C + 1,8\lambda_H + 0,5\lambda_O + 0,2\lambda_N) + \\
 & r_{AG} (\lambda_C + 2\lambda_H + \lambda_O) + \\
 & r_{ANH_4^+} (4\lambda_H + \lambda_N) + \\
 & r_{ACO_2} (\lambda_C + 2\lambda_O) + \\
 & r_{Aet} (0,3\lambda_C + \lambda_H + 0,16\lambda_O) + \\
 & r_{AH_2O} (2\lambda_H + \lambda_O) = 0
 \end{aligned}$$

prostostne stopnje 6-4=2

$$\lambda_H=1$$

$$\lambda_C + 1,8\lambda_H + 0,5\lambda_O + 0,2\lambda_N = 0$$

$$\lambda_C + 2\lambda_H + \lambda_O = 0 \longrightarrow$$

$$4\lambda_H + \lambda_N = 0 \longrightarrow$$

$$\lambda_C + 2\lambda_O = 0 \longrightarrow$$

$$0,3\lambda_C + \lambda_H + 0,16\lambda_O = 0$$

$$2\lambda_H + \lambda_O = 0 \longrightarrow$$

$$\lambda_N = -4\lambda_H = -4$$

$$\lambda_C = -2\lambda_O = 4$$

$$\lambda_O = -2\lambda_H = -2$$

$$r_{AX} (4 + 1,8 - 1 - 0,8) +$$

$$r_{AG} (4 + 2 - 2) +$$

$$r_{ANH_4^+} (4 - 4) +$$

$$r_{ACO_2} (4 - 4) +$$

$$r_{AEt} (1,2 + 1 - 0,32) +$$

$$r_{AH_2O} (2 - 2) = 0$$

$$4r_{AX} + 4r_{AG} + 1,88r_{AEt} = 0$$

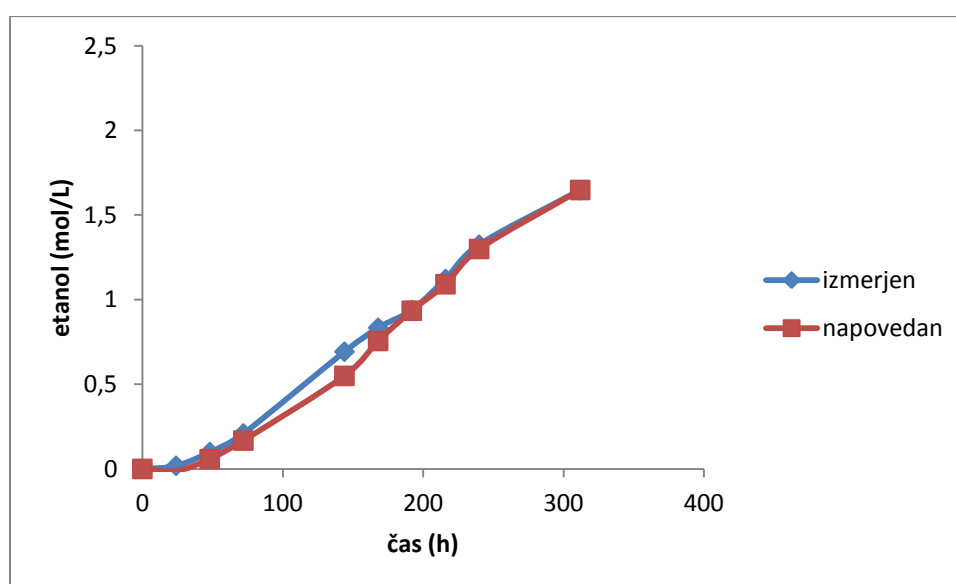
$$-1,88r_{AEt} = 4r_{AX} + 4r_{AG} / 1,88$$

$$r_{AEt} = -2,13 (r_{AX} + r_{AG})$$

$$\frac{dP}{dt} = -2,13 \left( \frac{dX}{dt} + \frac{dS}{dt} \right)$$

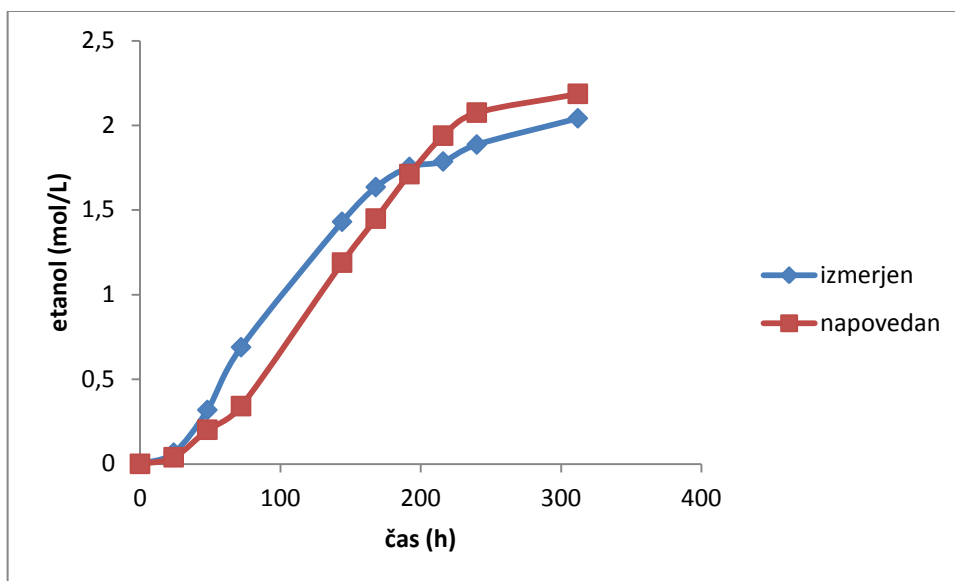
**Uporaba modela za popis fermentacij:**

**Fermentacija pri 15 °C:**



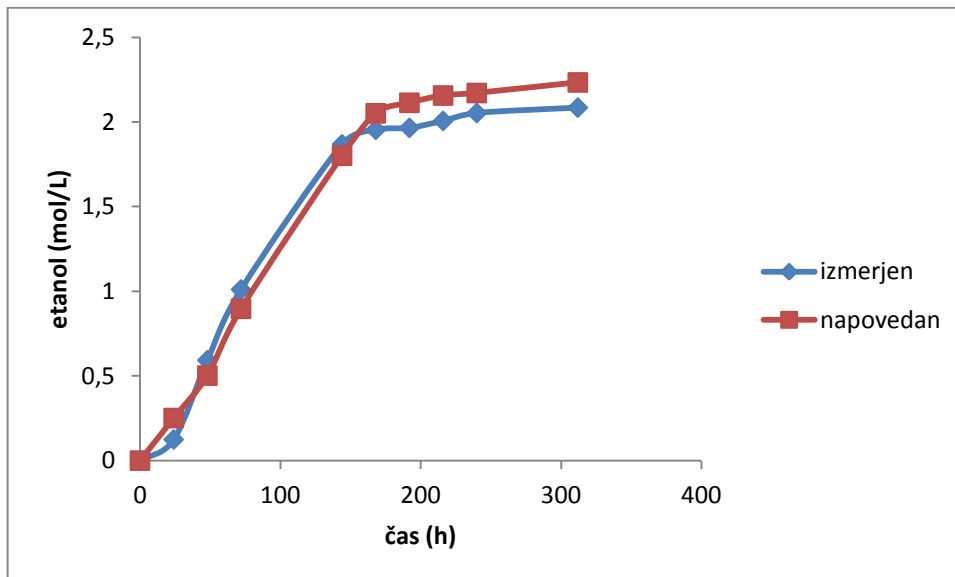
**Graf 77:** Eksperimentalni podatki in model za fermentacijo pri 15 °C

### Fermentacija pri 20 °C:



**Graf 78:** Eksperimentalni podatki in model za fermentacijo pri 20 °C

### Fermentacija pri 25 °C:



**Graf 79:** Eksperimentalni podatki in model za fermentacijo pri 25 °C

Na grafih 77-79 so prikazani eksperimentalni podatki in napovedane vrednosti za koncentracijo etanola za tri različne temperature (15, 20 in 25 °C). Model zadovoljivo popiše izmerjene vrednosti.

## 5. DISKUSIJA

Vino je kompleksen sistem, sestavljen iz številnih komponent, ki v vinu obstajajo v oksidirani ali reducirani obliki. Redukcija ene komponente povzroči oksidacijo druge, dokler ni doseženo ravnotežje v sistemu. Med fermentacijo grozdnega mošta, ki poteka brez prisotnosti kisika, nastajajo v seriji biokemijskih reakcij glikolitične poti razgradnje sladkorja, številne reduktivne komponente, ki vplivajo na spremembo redoks potenciala.

V primeru alkoholne fermentacije grozdnega mošta na padec redoks potenciala pomembno in odločujoče vpliva fiziologija kvasovk ter številne kompleksne oksidativne in reduktivne spojine, ki v ciklu kvasnega metabolizma nastajajo ali se spreminjajo iz ene v drugo obliko. Povečanje koncentracije etanola in glicerola, kot pomembnih reduktivnih produktov fermentacije ter spremembe koncentracij organskih kislin, prispevajo k znižanju redoks potenciala med fermentacijo le manjši del. Večji del prispeva pretvorba acetaldehida v etanol, največji del pa prispeva mikroorganizem in njegov aktivni metabolni sistem.

Anaerobna konverzija glukoze v etanol s kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae* je redoks nevtralna in  $\text{NAD}^+$ , ki se porablja v začetku Embden-Meyerhof-Parnasove (EMP) metabolne poti, se regenerira ob nastanku etanola. Kadar intermediati EMP metabolne poti postanejo prekursorji za sintezo celičnega materiala, je to ravnotežje porušeno. Presežek nastalega  $\text{NADH}$  se ne spreminja nazaj v  $\text{NAD}^+$ . To lahko povzroči zaustavitev metabolizma, če ne obstaja proces, pri katerem se  $\text{NAD}^+$  regenerira (Oura, 1977).

Med anaerobno rastjo se  $\text{NADH}$  ne more oksidirati s kisikom, ampak se regenerira z nastankom sekundarnih produktov, kot je glicerol v primeru kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Reducirajoča moč  $\text{NADH}$ , ki nastane pri glikolizi, se mora transformirati v elektron akceptor, ki regenerira  $\text{NAD}^+$ . Pri alkoholni fermentaciji je to acetaldehid. Med alkoholno fermentacijo kvasovke reoksidirajo  $\text{NADH}$  v  $\text{NAD}^+$  v dvostopenjski reakciji od piruvata, ki se dekarboksilira do acetaldehida. Temu sledi redukcija acetaldehida, katalizirana z alkohol dehidrogenazo, ki vodi do nastanka etanola (Oura, 1977).

Presežek  $\text{NADH}$  se med anaerobnim procesom regenerira z nastankom glicerola, kar zagotavlja nastanek  $\text{NAD}^+$ . Glicerol tako nastaja v začetku fermentacije, preden nastanejo večje količine acetaldehida. S pojavom acetaldehida, se prosti vodikovi ioni  $\text{H}^+$  začnejo porabljati za njegovo redukcijo do etanola in ne za redukcijo glicerolaldehid-3-fosfata do nastanka glicerola (Oura, 1977).

Zaradi serije reduktivnih reakcij v ciklu anaerobnega kvasnega metabolizma, se vrednost redoks potenciala med procesom alkoholne fermentacije znatno znižuje. Padec redoks potenciala je predvsem očitno v fazi, ko kvasovke preidejo iz aerobne faze rasti v anaerobno fazo, kjer se aktivirajo encimski kompleksi kvasovk in se začne presnova sladkorjev po glikolitični poti. Med procesom glikolize pride do padca vrednosti redoks potenciala zaradi

nastajanja reduktivnih spojin, ki nastajajo v ciklu kvasnega metabolizma in se iz kvasne celice transportirajo v vino (etanol, glicerol...).

### **Vpliv temperature**

Temperatura v skladu z Arrheniusovo enačbo pozitivno vpliva na hitrost kemijskih reakcij. Iz rezultatov eksperimentov poteka fermentacij pri različnih temperaturah je z višanjem temperature fermentacije vidno naraščanje metabolne in encimske aktivnosti. Naraščanje metabolne aktivnosti se dobro odraža na krivuljah redoks potenciala izmerjenih pri različnih temperaturah (Graf 6).

Z višanjem temperature je vidno tudi naraščanje hitrosti nastajanja etanola (Graf 9a) in naraščanje hitrosti nastajanja glicerola (Graf 10a). Največja hitrost nastajanja glicerola je 0,08 g/L h pri temperaturi 25 °C; pri temperaturi 15 °C je največja hitrost 0,05 g/L h; pri temperaturi 20 °C pa 0,07 g/L h.

Med eksperimenti pri treh različnih temperaturah (15, 20, 25 °C) je potekala največja metabolna aktivnost kvasovk vrste *Sacharomyces cerevisiae* pri temperaturi 25 °C. Večanje metabolne aktivnosti kvasovk z večanjem temperature se je v sistemu odražalo kot večanje hitrosti rasti biomase, hitrejša poraba reducirajočih sladkorjev ter povečana produkcija etanola (graf 10). Etanol je produkt primarnega metabolizma, ki poleg CO<sub>2</sub> nastaja v procesu fermentacije in je pokazatelj hitrosti bioprocasa (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a,b).

Največja metabolna aktivnost in hitrost generacije energije (v obliki ATP molekul) je v primeru produkcije etanola pri temperaturi 25 °C, kar se odraža tudi v najhitrejši produkciji biomase, najhitrejši razgradnji reducirajočih sladkorjev in nastanku sekundarnih metabolitov. Hitrost porabe substrata se je s povečanjem temperature fermentacije povečala. Hitrosti porabe glukoze med fermentacijami pri različnih temperaturah so nekoliko večje od hitrosti porabe fruktoze. Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* so bolj glukofilne kot fruktofilne, razlog je v nekoliko večji afiniteti transportnih encimov do glukoze v primerjavi s fruktozo (Berthels in sod., 2004; Tronchoni in sod., 2009).

Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* producirajo pri spremembi redoks ravnotežja večje količine glicerola, s katerim regulirajo spremembe redoks potenciala v procesu sinteze etanola. Kinetika nastanka glicerola je dvofazna, z visoko stopnjo nastajanja glicerola med fazo rasti kvasovk in manj intenzivno fazo nastajanja v stacionarni fazi rasti kvasovk. Večje količine glicerola nastajajo pri višji temperaturi fermentacije. Količina glicerola se povečuje z znižanjem vrednosti redoks potenciala med in po končani fermentaciji, kar pomeni, da se največ glicerola izloči pri temperaturi 25 °C, to je v primeru, ko je padec vrednosti redoks potenciala med fermentacijo največji (Kukec, 2003).

### **Vpliv temperaturnih šokov**

Stresni parametri, kot so osmotski stres, oksidativni stres, temperaturni šoki, pomanjkanje hranilnih snovi in toksičnost etanola, zahtevajo specifično adaptacijo mikroorganizma za zagotovitev celične rasti in preživetja. Prvi stres predstavlja že rehidracija in inokulacija

starter kulture, ki sta povezani s hiperosmotskim tlakom. Po adaptaciji celic na novo okolje sledijo stresne razmere, vezane na samo alkoholno fermentacijo.

Da bi kvasovke preprečile posledice temperaturnega šoka na fiziološke lastnosti in s tem na potek metabolizma, razvijejo mehanizme, s katerimi v okolico tvorijo snovi, ki uravnavajo redoks ravnotežje. Kvasovke tako v primeru temperaturnega šoka v začetni fazi fermentacije začnejo tvoriti glicerol, ki regulira intra- in ekstracelularno okolico, kar je nujno za rast in delovanje pri stresnih razmerah.

Omeniti je potrebno dve pomembni funkciji v povezavi s sintezo glicerola v kvasni celici. To sta uravnavanje redoks ravnotežja in odziv na hiperosmotski stres. Osmotski šok je eden najpogostejših stresov v kvasni celici, zato je nujno potrebno, da celica razvije mehanizem, da bi se uprla temu šoku in preživela te razmere. Ena posledic hiperosmotskega šoka je hitra difuzija vode iz celice v okoliški medij. Da bi to preprečila, kvasovka producira glicerol, kot tudi druge poliole, kot so arabitol, manitol, mezoeritrol in druge. Te spojine regulirajo intra- in ekstracelularno okolico, kar je nujno za rast pri osmotskih stresnih razmerah. Med procesom nastanka glicerola se NADH oksidira in nastaja  $\text{NAD}^+$  (Van Dijken in Scheffers, 1986).

V eksperimentih vpliva temperature na potek kvasnega metabolizma sem ugotovil, da je pri višjih temperaturah padec redoks potenciala večji, ter da nastajajo večje količine glicerola.

Nato sem želel preveriti prilagajanje metabolizma kvasovk v stresnih razmerah z dvigom temperature na 26 in 34 °C. Če v eksponencialni fazi rasti pride do nenadnega povišanja temperature fermentacije ali temperaturnega šoka, mikroorganizem izpade iz svojega redoks ravnotežja in začne, zaradi izravnavanja novonastale redoks situacije intenzivno producirati glicerol. Na ta način se prilagodi novemu okolju. Ob motnji v procesu metabolizma s hitro spremembo fermentacijske temperature, je sprememba redoks potenciala uravnotežena z nastankom glicerola.

Tvorba glicerola se je zaradi temperaturnega šoka (26 °C) povečala za 8 % v primerjavi z glicerolom izločenim pri konstantni temperaturi. V primeru temperaturnega šoka (34 °C) je končna koncentracija glicerola narasla za 13 %. Z višjo temperaturo šoka je tvorba glicerola večja in hitrejša.

Pravtako se je povečala tudi tvorba etanola. Koncentracija se je zaradi temperaturnega šoka (26 °C) povečala za 11,2 % v primerjavi z etanolom izločenim pri konstantni temperaturi. V primeru temperaturnega šoka (34 °C) je končna koncentracija etanola narasla za 16,4 %. Z višjo temperaturo šoka je tvorba etanola večja in hitrejša.

Koncentracija izločenega glicerola se v primeru enojnega temperaturnega šoka poveča za 25 % in v primeru dvojnega temperaturnega šoka za 60 % v primerjavi z glicerolom, izločenim pri konstantni temperaturi. Pri dvojnem temperaturnem šoku v zgodnji eksponencialni fazi so večje koncentracije izločenega glicerola, do  $11,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Z uporabo enega temperaturnega šoka je nastalo glicerola 8,2 g/L, medtem, ko je v primeru fermentacije pri konstantni temperaturi le 6,6 g/L (Berovič in sod., 2007).

Količina glicerola, ki ob tem nastaja, je odvisna od konstantne fermentacijske temperature mošta. V primeru uporabe temperaturnih šokov, ko v prvi tretjini eksponentialne faze rasti kvasovk pride do prvega temperaturnega šoka, mikroorganizem izpade iz svojega redoks ravnotežja in začne ob tem intenzivno tvoriti glicerol kot sredstvo za vzpostavitev novonastalega redoks ravnotežja. S tem se prilagodi novemu okolju. Po naslednjem, drugem zaporednem temperaturnem šoku, mikroorganizem ponovno reagira s povečano tvorbo glicerola, ki pa je manjše intenzitete, kot pri predhodnem šoku. To velja enako za vse nadaljnje nenadne temperaturne šoke, ki si sledijo v zaporedju (Berovič, 2004; Kukec, 2003).

Metabolizem kvasnih celic lahko poteka znotraj dokaj velikega temperaturnega intervala. Maksimalna fermentacijska temperatura za kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* se giblje blizu 40-45 °C, minimalna temperatura pa lahko doseže celo 0 °C. V temperaturnem območju od 15 °C do 35 °C velja pravilo, da višja temperatura povzroča hitrejši potek fermentacije in s tem hitrejši metabolizem sladkorjev, hitrejši zaključek fermentacije in višje vsebnosti produktov. Nižje temperature so vzrok za večje število delujočih kvasnih celic ob koncu fermentacije. Iz tega sledi, da je ostanek reducirajočih sladkorjev ob koncu fermentacije obratno proporcionalen s fermentacijsko temperaturo (Boulton in sod., 1996).

Pri kvasovkah Anchor VIN7 se količina glicerola z uporabo temperaturnega šoka na vcepku poveča za 11,2 %; pri kvasovkah NT116 za 9,6 % ter pri kvasovkah NT202 za 11,6 % (Graf 18), kar potrjuje tudi literatura.

Temperaturni šoki predstavljajo lahek način za povečati koncentracijo glicerola v vinih. Temperaturni šoki so bili uporabljeni na dveh različnih kvasovkah, s katerimi se je koncentracija glicerola povečala za 44 % oziroma za 28 % (Sevda in sod., 2011).

Povišanje temperature fermentacije v eksponentialni fazi rasti vpliva na povišanje hitrosti metabolizma kvasovk, s tem na hitrejši potek sinteze etanola, sočasno pa tudi na povišano sintezo glicerola, ki postane intenzivnejša v primeru uporabe temperaturnih šokov (Omori, 1996).

Z višanjem temperature v intervalu od 15 °C do 35 °C se povečujejo tudi koncentracije nastalega glicerola, acetoina, 2,3-butandiola in acetaldehida. Koncentracije očetne kisline in drugih hlapnih kislin so se izkazale za večje pri temperaturi 25 °C, kot pri temperaturah 15 °C ali 35 °C, vendar so kljub temu v mejah normale. Višje temperature prav tako vodijo do biosinteze večjih koncentracij piruvične in  $\alpha$ -ketoglutarjeve kisline. Tudi nastanek višjih alkoholov je temperaturno pogojen. Pri višjih temperaturah nastajajo večje koncentracije višjih alkoholov. Podobne raziskave v temperaturnem intervalu med 10 in 35 °C so pokazale, da največje koncentracije izoamilalkohola, aktivnega amil alkohola in izobutanola nastajajo pri 24 °C, medtem ko *n*-propanol dosega pri tej temperaturi najmanjše koncentracije (Ough, 1980).

Temperaturni šok stimulira produkcijo glicerola. Velike količine trehaloze se akumulirajo v celicah med temperaturnim šokom, vendar se koncentracija hitro zmanjša, ko je vzpostavljena prejšnja temperatura (Omori, 1996). Temperaturni šok kvasnih celic v predkulturi je učinkovita in preprosta metoda za povečanje koncentracije glicerola v vinu (Calvarheiro, 1999).

S temperaturnimi šoki pridobimo visoko produktivne kvasovke. Preživele celice izoliramo kot temperaturno odporne mutante. Rezultati so pokazali, da je temperaturni šok učinkovita metoda za izboljšanje kvasovk. Produkcija glicerola s HSR se je povečala za 1,8- do 2-krat (Omori, 1996).

### **Vpliv električnih impulzov**

Uporaba enosmernega električnega toka prav tako predstavlja uporabno aplikacijo za kontroliran potek vinske fermentacije.

Z enosmernim električnim tokom lahko v moštu povečamo metabolno aktivnost vinskih kvasovk, sorazmerno s tem pa se poveča tudi količina nastalega etanola in glicerola. Količina nastalega glicerola se povečuje z višanjem jakosti električnega toka. Z uporabo električnih impulzov vrednosti 20  $\mu\text{A}$ , se količina glicerola poveča za 20 % v primerjavi z kontrolno fermentacijo. Tako lahko pri nižjih temperaturah z uporabo električnega toka dosežemo podobne rezultate kot pri povišani temperaturi. Z višanjem električnega toka se večja koncentracija biomase, sorazmerno s tem pa se večja poraba substrata. Padec redoks potenciala se poveča sorazmerno s povečanjem koncentracije produktov.

V literaturi je veliko govora o vplivu električnega toka višjih jakosti (Molinari in sod., 2004; Donsi in sod., 2007; Marselles-Fontanet in sod., 2008).

Organizacija in funkcija proteinske nanostrukture v membranah je povezana z lastnostmi lipidnega dela membrane. Potencialne razlike, ki nastanejo na membrani, generirajo nastanek električnega polja, iz česar lahko razberemo organizacijske in funkcionalne lastnosti proteinskih enot. Veliko proteinskih enot ima različen raspored naboja. Obstajajo mesta s prevladujočim pozitivnim oziroma negativnim nabojem. Na stiku dveh različno nabitih mest se lahko generira veliko električno polje. Močno električno polje, ki se lahko vzpostavi v proteinskih enotah, kot je protonska ATP-aza, uravnava kemijske reakcije, ki so povezane s transportom protonov in dehidracijo (Coster, 2002).

Celice kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* so bile v eksponencialni fazi rasti veliko bolj občutljive na električni tok kot celice v stacionarni fazi. (Jacob in sod., 1981).

### **Vpliv CO<sub>2</sub> pulzov**

V literaturi je veliko napisanega o inhibitornem učinku CO<sub>2</sub> na rast in metabolizem bakterij in kvasovk (Dixon in Kell, 1989; Shang in sod., 2003).

Iz dobljenih rezultatov smo ugotovili, da je z vpihovanjem CO<sub>2</sub> mogoče spreminjati hitrost fermentacije. Vpihovanje CO<sub>2</sub> ima zaviralen učinek na potek fermentacije, saj je ogljikov dioksid produkt fermentacije. V procesu katabolizma sladkorja se sprošča v encimskih reakcijah dekarboksilacije s pomočjo encimov dekarboksilaz. Vnos ogljikovega dioksida v sistem povzroča inhibicijo encimov s produktom. Z vnosom CO<sub>2</sub> se med fermentacijo vrši pritisk proti dekarboksilaciji piruvata (piruvat dekarboksilaza) v acetaldehid. Posledica je ovirana reoksidacija NADH koencimov in nadaljnje reakcije encimov. Tako je posredno upočasnen metabolizem kvasovk (Jones in Greenfield., 1982).

Zaviralen vpliv vpihovanja ogljikovega dioksida je viden tudi iz grafov redoks potenciala, grafov porabe glukoze in fruktoze ter nastanka etanola. Ima pa vpihovanje ogljikovega dioksida pozitiven vpliv na glicerol, saj se produkcija glicerola poveča (graf 51).

### **Vpliv magnetnega polja**

Eden izmed sklopov raziskav je bil vpliv homogenega magnetnega polja. Če primerjamo meritve redoks potenciala med fermentacijami vidimo, da je pri fermentacijah z uporabo homogenega polja zaznana počasnejša kinetika z manjšo aktivnostjo kvasovk. Pri fermentaciji z uporabo homogenega magnetnega polja je produkcija biomase zmanjšana za 11 %. Počasnejša kinetika je prav tako vidna pri porabi glukoze in fruktoze. Zmanjšana je tudi produkcija glavnega produkta etanola in glicerola.

Pozitivno pa homogeno magnetno polje vpliva na koncentracijo glutationa, saj se pri fermentacijah z uporabo homogenega polja (6, 12 mT) v vinu ohrani več glutationa (graf 46). Pri višji jakosti magnetnega polja je bila hitrost rasti biomase in sproščanja CO<sub>2</sub> večja kot pri magnetnemu polju nižje jakosti (Motta, 2001).

Rezultati raziskave so pokazali, da je poraba glukoze pri izpostavljeni kulturi 1,3-krat večja v primerjavi s kontrolo. Pri poizkusih, ki so jih opravili pod vplivom magnetnega polja, se je porabila skoraj celotna količina sladkorja, medtem ko je pri kontroli v raztopini ostalo približno 10 g/L glukoze v enakem časovnem intervalu. Koncentracija etanola in biomase je bila pri vzorcih, ki so bili izpostavljeni magnetnemu polju, 3,4- in 3-krat večja v primerjavi s kontrolno raztopino (Motta, 2004).

Muniz in sodelavci (2007) so proučevali vpliv statičnega magnetnega polja gostote 220 mT na šaržni fermentaciji kvasovk. Ugotovili so, da statično magnetno polje poveča rast biomase za 35 %, poraba glukoze pa se poveča za 30 % (Muniz in sod., 2007).

Santos in sodelavci 2010, so proučevali učinek magnetnega polja na produkcijo glutationa s kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754. Za nadzor poskusov so opravili tudi eksperimente brez uporabe magnetnega polja. Rezultati so pokazali ugodne spremembe v produkciji glutationa in koncentracije biomase zaradi uporabe magnetnega polja. V vseh poskusih je bila količina proizvedene biomase višja kot v kontrolnih poskusih brez uporabe magnetnega polja (Santos in sod., 2010).

### **Kontrolirana fermentacija**

Poskus regulacije fermentacijskega procesa v smeri želenega redoks potenciala, ki sem ga izvedel s pomočjo spreminjanja temperature, električnih impulzov in vpihovanja CO<sub>2</sub> med alkoholno fermentacijo je pokazal, da je moč vplivati na spreminjanje redoks potenciala in s tem na potek fermentacijskega procesa, vendar pa ni možno v celoti slediti določeni redoks krivulji, ki smo jo izbrali kot optimalno za proces. Razlika, ki v tem primeru nastane med izbrano in regulirano krivuljo redoks potenciala, pa je zanemarljiva, če primerjamo še rezultate reaktantov in produktov.

### **Modeliranje**

Za napoved poteka kinetike fermentacije se lahko uporabljajo različni matematični modeli, ki so lahko nestrukturirani ali strukturirani. Na kinetiko fermentacije imajo vpliv različni parametri. Glede na njihov vpliv se nastavijo enačbe. Na fermentacijo v tehnologiji vina vpliva sestava mošta in prisotnost mikroorganizmov.

Z modelom črne skrinje sem dobro popisal eksperimentalne podatke pri treh različnih temperaturah (15, 20, 25 °C). Pri popisu podatkov ni prišlo do večjih odstopanj.

## 6. ZAKLJUČKI

V svojem doktorskem delu sem raziskoval vpliv temperature, temperaturnih šokov na vcepku, temperaturnih nihanj med fermentacijo, električnih impulzov, magnetnega polja in vpihovanja CO<sub>2</sub>, kot možnih metod za regulacijo metabolizma vinskih kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v alkoholni fermentaciji grozdnega mošta Sauvignon v tehnologiji vinarstva. *Off-line* sem meril spreminjanje koncentracije biomase in spreminjanje koncentracije reducirajočih sladkorjev ter drugih za proces fermentacije pomembnih komponent (etanola, glicerol, vinska kislina, jabolčna kislina, očetna kislina, citronska kislina, jabolčna kislina).

- Temperatura v skladu z Arrheniusovo enačbo pozitivno vpliva na hitrost kemijskih reakcij. Iz rezultatov eksperimentov poteka fermentacij pri različnih temperaturah je z višanjem temperature fermentacije vidno naraščanje metabolne in encimske aktivnosti. Z višanjem temperature je vidno tudi naraščanje hitrosti nastajanja etanola in naraščanje hitrosti nastajanja glicerola. Večanje metabolne aktivnosti kvasovk z večanjem temperature se je v sistemu odražalo kot večanje hitrosti rasti biomase, hitrejša poraba reducirajočih sladkorjev, povečana produkcija etanola ter povečana produkcija sekundarnih metabolitov (glicerol in višji alkoholi).
- S temperaturnimi šoki dosežemo večjo homogenost vcepka in večjo metabolno aktivnost vinskih kvasovk. S tem postopkom deaktiviramo in eliminiramo neaktivne premlade in prestare kvasovke. Ta postopek je bil najbolj učinkovit pri kvasovkah Anchor NT202. Pri kvasovkah Anchor VIN7 se količina glicerola z uporabo temperaturnega šoka na vcepku poveča za 11,2 %; pri kvasovkah NT116 za 9,6 % ter pri kvasovkah NT202 za 11,6 %. Produkcija glicerola je večja pri fermentacijah, katerih vcepek je bil izpostavljen temperaturnemu šoku v eni kopeli, saj je bil čas povišane temperature večji. Koncentracije glicerola se je z uporabo temperaturnega šoka na vcepku povečala do 35 %.
- Z temperaturnimi nihanji sem dosegel motnjo v procesu metabolizma, ter s tem dosegel, da so kvasovke izpadle iz svojega redoks ravnotežja, ter posledično začele producirati večje količine glicerola. Tvorba glicerola se je zaradi temperaturnega šoka (26 °C) povečala za 8 % v primerjavi z glicerolom izločenim pri konstantni temperaturi. V primeru temperaturnega šoka (34 °C) je končna koncentracija glicerola narasla za 13 %. Z višjo temperaturo šoka je tvorba glicerola večja in hitrejša. Pravtako se je povečala tudi tvorba etanola. Koncentracija se je zaradi temperaturnega šoka (26 °C) povečala za 11,2 % v primerjavi z etanolom izločenim pri konstantni temperaturi. V primeru temperaturnega šoka (34 °C) je končna koncentracija etanola narasla za 16,4 %. Z višjo temperaturo šoka je tvorba etanola večja in hitrejša.

- Uporaba enosmernega električnega toka prav tako predstavlja uporabno aplikacijo za kontroliran potek vinske fermentacije. Z enosmernim električnim tokom lahko v moštu povečamo metabolno aktivnost vinskih kvasovk, sorazmerno s tem pa se poveča tudi količina nastalega etanola in glicerola. Količina nastalega glicerola se povečuje z višanjem jakosti električnega toka. Z uporabo električnih impulzov vrednosti 20  $\mu\text{A}$ , se količina glicerola poveča za 20 % v primerjavi z kontrolno fermentacijo.
- Iz dobljenih rezultatov sem ugotovil, da je z vpihovanjem  $\text{CO}_2$  mogoče spreminjati hitrost fermentacije. Vpihovanje  $\text{CO}_2$  ima zaviralen učinek na potek fermentacije, saj je ogljikov dioksid produkt fermentacije. Zaviralen vpliv vpihovanja ogljikovega dioksida je viden tudi iz grafov redoks potenciala, grafov porabe glukoze in fruktoze ter nastanka etanola. Ima pa vpihovanje ogljikovega dioksida pozitiven vpliv na glicerol, saj se produkcija glicerola poveča.
- Pri fermentaciji z uporabo homogenega magnetnega polja je produkcija biomase zmanjšana za 11 %. Počasnejša kinetika je prav tako vidna pri porabi glukoze in fruktoze. Zmanjšana je tudi produkcija glavnega produkta etanola in glicerola. Pozitivno pa homogeno magnetno polje vpliva na koncentracijo glutationa, saj se pri fermentacijah z uporabo homogenega polja (6, 12 mT) v vinu ohrani več glutationa.
- Poskus regulacije fermentacijskega procesa v smeri zelenega redoks potenciala, ki sem ga izvedel s pomočjo spreminjanja temperature, električnih impulzov in vpihovanja  $\text{CO}_2$  med alkoholno fermentacijo je pokazal, da je moč vplivati na spreminjanje redoks potenciala in s tem na potek fermentacijskega procesa, vendar pa ni možno v celoti slediti določeni redoks krivulji, ki smo jo izbrali kot optimalno za proces. Regulacija je najbolj zahtevna v eksponencialni fazi, kjer celični metabolizem najtežje sledi izbranemu redoks potencialu.
- V sklopu raziskav kinetike bioprocesa sem z modelom črne skrinje (angl. *black box model*) dobro popisal eksperimentalne podatke pri treh različnih temperaturah (15, 20, 25 °C).

## 7. LITERATURA

- Abee T., Wouters J. A. 1999. Microbial stress response in minimal processing. *Inter. J. Food Microbiol.* 50: 65-91.
- Aiba S., Shoda M., Nagatani M. 1968. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioengineer.* 10: 845-864.
- Akashi K., Ikeda S., Shibai H., Kobayashi K., Hirose Y. 1978. Determination of redox potential levels critical for cell respiration and suitable for L-leucine production, *Biotechnol. Bioeng.* 20: 27-41.
- Alvarez I., Raso J., Sala F. J., Condon S. 2003. Inactivation of *Yersinia enterocolitica* by pulsed electric fields. *Food Microbiol.* 20: 691-700.
- Amerine M. A. 1980. Major changes in the processing of wines in California, *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* 180: 1860-1960.
- Amerine M. A. 1985. Winemaking. Iz: *World's debt to Pasteur*. Koprowski H. (ed). New York. Alan R. Liss Inc. str. 67-81.
- Anderson M. E. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*, 111-112: 1-14.
- André L., Hemming A., Adler L. 1991. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD+). *FEBS Lett.* 286: 13-17.
- Aronsson K., Lindgren M., Johansson B. R., Rönner U. 2001. Inactivation of microorganisms using pulsed electric fields: the influence of process parameters on *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*, *Innovat. Food Sci. Emerg. Tech.* 2: 41-54.
- Bagramyan K., Galstyan A., Trchounian A. 2000. Redox potential is a determinant in the *Escherichia coli* anaerobic fermentative growth and survival effects of impermeable oxidant. *Bioelectrochem.* 51 (2): 151-156.
- Bandel G. 1996. Vpliv rH vrednosti na kakovost vina. *Dipl.delo.*, Ljubljana, Slovenija.
- Bavčar D. 2009. Kletarjenje danes. Čzd Kmečki Glas d.o.o., Ljubljana.

- Beck S., Schink B. 1995. Acetate oxydation trough a modified citric acid cycle in *Propionibacterium-Freudenreichii*. *Arch. Microbiol.* 163: 182-187.
- Bely M., Sablayrolles J. M., Barre P. 1990. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 41: 319-324.
- Bely M., Stoeckle P., Masneuf-Pomarède I., Dubourdieu D. 2007. Impact of mixed *Torulasporea delbrueckii-Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 122: 312-320.
- Berovič M. 1987. Measurement of Redox Potential, Boris Kidrič Institute of Chemistry, Bioreactor Engineering Course, 327-345.
- Berovič M. 1999. Scale-up of citric acid fermentation by redox potential control. *Biotechnol. Bioeng.* 64 (5): 552-557.
- Berovič M., Cimerman A. 1998. Postopek za submerzno biosintezo citronske kisline z glivo *Aspergillus niger* na substratu iz melase sladkorne pese: številka patenta 9111816, datum objave 28.II.1998: številka prijave 1816/91, datum prijave 20.XI.1991. Ljubljana. Urad Republike Slovenije za intelektualno lastnino.
- Berovič M., Kukec A., Wondra M., Košmerl T., Čelan T. 2004. Postopek povečanja tvorbe glicerola v fermentaciji vina z uporabo temperaturnih šokov ter naprave in instrumenti v zvezi s tem : S.I.P-200400108.
- Berovič M., Herga M. 2007. Heat shock on *Saccharomyces cerevisiae* inoculum increases glycerol production in wine fermentation. *Biotechnol. Lett.* 29 (6): 891-894.
- Berovič M., Pivec A., Košmerl T., Wondra M., Čelan Š. 2007. Influence of heat shock on glycerol production in alcohol fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 103 (2): 135-139.
- Berthels N. J., Cordero Otero R. R., Bauer F. F., Thevelein J. M., Pretorius I. S. 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilization during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Research.* 4: 683-689.
- Bisson L. F. 1993. Yeasts - Metabolism of sugars. Iz: Wine microbiology and biotechnology. Fleet G.H. (ed.) Chur. Harwood Academic Publishers. str. 55-75.
- Bisson L. F., 1999. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (1): 107-119.
- Blanco M., Peinado A. C., Mas J. 2006. Monitoring alcoholic fermentation by joint use of soft and hard modelling methods. *Anal. Chem. Acta.* 556: 364-373.

- Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F., Kunkee R. E. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, Chapman&Hall. 604 str.
- Camarasa C., Grivet J. P., Dequin S. 2003. Investigation by <sup>13</sup>C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiol.* 149: 2669-2678.
- Carrasco P., Querol A., del Olmo M. 2001, Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch Microbiol.* 175: 450-457.
- Carvalho F., Roseiro J. C., Girio F. M. 1999. Interactive effects of sodium chloride and heat shock on trehalose accumulation and glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* 16: 543-550.
- Charpentier C., Feuillat M. 1993. Yeasts autolysis. Iz: Wine-microbiology and biotechnology. Fleet G.H. (ed). Chur, Harwood Academic Publishers. str. 225-242.
- Chen W., Han Y., Chen Y., Xie J. T., 1998. Field-induced electroconformational damages in cell membrane proteins: a new mechanism involved in electrical injury. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 47 (2): 237-245.
- Ciani M., Ferraro L. 1996. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Appl. Environ. Microb.* 62 (1): 128-132.
- Ciani M., Beco L., Comitini F., 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 108 (2): 239-245.
- Coleman R., Fish R., and Block D. 2007. Temperature-dependent kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5875-5884.
- Costenoble R., Valadi H., Gustafsson L., Niklasson C., Franzen C. J. 2000. Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 16: 1483-1495.
- Coster H., Chilcott T. 2002. Electric field effects in proteins in membranes, *Bioelectrochem.* 56: 141-146.
- Cottrell T. H. E., McLellan M. R. 1986. The effect of the fermentation temperature on chemical and sensory characteristics of wines from seven grape cultivars grown in New York State. *Am. J. Enol. Vitic.* 37: 190-194.
- Cramer A., Vlassides S., Block D. 2001. Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Biotechnol. Bioengineer.* 77: 47-60.

- Dahod S. K. 1982. Redox potential as a better substitute for dissolved oxygen in fermentation process control. *Biotechnol. Bioeng.* 24 (9): 2123-2125.
- Deibner L., Mourgues J. 1969. Wein, Obstbau Fruchtverwert. *Mitt. Rebe.* 19: 289.
- Deok-Kun O., Sang-Yong K., Jung-Hoe K. 1997. Increase of xylitol production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*. *Biotechnol. Bioeng.* 58 (4): 440-444.
- Deutmeyer A., Raman R., Murphy P., Pandey S., 2011. Effect of magnetic field on the fermentation kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Advan. Biosci. Biotechnol.* 2: 207-213.
- Dikanović-Lučan Ž., Palić A. 1995. Redox potential in wine making process: A review. *Bulletin de L'O.I.V.* 68: 762-779.
- Dixon N. M., Kell D. B. 1989. The control and measurement of CO<sub>2</sub> during fermentations. *J. Microbiol. Methods.* 10: 155-176.
- Du Prez J. C., Van Driessel B., Prior B. A. 1989. The relation between redox potential and D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.* 10: 901-906.
- Du Toit W. J., Lisjak K., Stander M., Prevoo D. 2007. Using LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen. *J. Agricult. Food Chem.* 55 (8): 2765-2769.
- Erasmus D. J., Cliff M., van Vuuren H. J. J. 2004. Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of Icewine. *Am. J. Enol. Vitic.* 55 (4): 371-378
- Eyer K., Heinzle E. 1996. *On-line* estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 277-283.
- Fahey R. C. 2001. Novel thiols in prokaryotes. *Annual Review Microbiol.*, 55: 333-356.
- Farkaš J. 1988. Iz: Technology and biochemistry of wine. Vol 1 & 2. Switzerland. Gordon and Breach Science Publishers.

- Fichtner A. 1975. Iz: *Methods in Cell Biology*. D.M. Prescott (ed). New York. Academic. Vol. 11. str. 97.
- Fleet G. H. 1991. Cell wall. Iz: *The yeast, Vol.4: Yeasts Organelles*. London. Academic Press. str. 199-277.
- Fleet G. H., Heard G. M. 1993. Yeasts - growth during fermentation. Iz: *Wine-microbiology and biotechnology*. Chur. Harwood Academic Publishers. str. 27-54.
- Fleet G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86: 11-22.
- Furukawa K., Heinzle E., Dunn I. J. 1983. Influence of oxygen on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2293-2317.
- Gaden E. L. 1959. Fermentation process kinetics. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Engineer.* 1 (4): 413-429.
- Ghose T. K., Tyagi R.D. 1979. Rapid ethanol formation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrat inhibition and optimization of fermentor design. 21 (8): 1401-1420.
- Goelzer A., Charnomordic B., Colombié S., Fromion V., Sablayrolles J.M. 2009. Simulation and optimization software for alcoholic fermentation in winemaking conditions. *Food Control.* 20: 635-642.
- Gorobets S. 2003. Intensification of the process of sorption of copper ions by yeast of *Saccharomyces cerevisiae* 1968 by means of a permanent magnetic field. *J. magnetism and magnetic materials.*
- Grahl T., Märkl H. 1996. Killing of microorganisms by pulsed electric fields. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 45: 148-157.
- Graindorge P., Charbonnier S., Magnin J. P., Mauvy C., Cheruy A. 1994. A software sensor of biological-activity based on a redox probe for the control of *Thiobacillus ferrooxidans* cultures. *J. Biotechnol.* 35 (1): 87-96.
- Grosse H., Bauer E., Berg H. 1988. Electrostimulation during fermentation, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 20: 279-285.
- Gutiérrez P., Roldán A., Caro I., Pérez L. 2010. Kinetic study of the velum formation by *Saccharomyces cerevisiae* during the biological aging of wines. *Process Biochem.* 45: 493-499.

- Heppner B., Zellner G., Diekmann H. 1992. Start-up and operation of a propionate degrading fluidized bed reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 810-816.
- Hewitt L. F. 1950. Oxidation-reduction potentials in bacteriology and biochemistry, 6th ed. Edinburgh. Livingstone.
- Higerada A. E., Possani L. D., Ramirez O. T. 1997. The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 56: 555-563.
- Hohmann S. 1997. Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. Iz: *Yeast stress Response*. Hohmann S. (ed). New York. Springer. str. 101-145.
- Hohmann S., Krantz M., Nordlander B. 2007. Yeast osmoregulation, *Methods Enzymol.* 428: 29-45.
- Hohnson, E. A. 2003. Microbial adaptation and survival in foods. Iz: Microbial stress adaptation and food safety. Youself, A.E., Juneja, V.K. (eds.) Boca Ration (etc.). CRC Press. str. 75-103.
- Hülshager H., Potel J., Niemann E. G., 1983. Electric field effects on bacteria and yeast cells. *Radiat. Environ. Biophys.* 22: 149-162.
- Hwang C., Sinskey A. J. 1991. The role of oxidation-reduction potential in monitoring growth of cultured mammalian cells. Iz: Spier R. E., Griffiths J. F., Meignier B. (eds). *Production of biologicals from animal cells in culture*. Oxford. Butterworth-Heinemann. str. 548-568.
- Ishizaki Y., Horiuchi S., Okuno K., Ano T., Shoda M. 2001. Twelve hours exposure to inhomogeneous high magnetic field after logarithmic growth phase is sufficient for drastic suppression of *Escherichia coli* death. *Bioelectrochem.* 54 (2): 101-105.
- Ishizaki A., Shibai H., Hirose Y. 1974. Basic aspects of electrode potential change in submerged fermentation. *Agric. Biol. Chem.* 38: 2399-2406.
- Jackson R. S. 2008. Wine science: principles and applications. San Diego, Academic Press: str. 350-358.
- Jacob H. E. 1970. Iz *Methods in Microbiology*. Vol. 2. (ed). Norris J. R., Ribbons D. W., London. Academic Press.

- Jacob H. E., Förster W., Berg H. 1981. Microbiological implications of electric field effects. II. Inactivation of yeast cells and repair of their cell envelope. *Zeitschrift Für Allgemeine Mikrobiologie*. 21 (3): 225-233.
- Janeš L., Lisjak K., Vanzo A. 2010. Determination of glutathione content in grape juice and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*. 674: 239-242.
- Judež M. 1981. Klasično in sodobno vinarstvo. Ljubljana. Državna založba Slovenije. 391 str.
- Kake R. H., D. J. Roberts, T. O. Stevens, R. L. Crawford, D. L. Crawford. 1992. Bioremediation of soils contaminated with the herbicide 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (dinoseb). *Appl. Enviro. Microbio*. 58 (5): 1683-1689.
- Karba R., Gubina M., Vodovnik L. 1991. Growth inhibition in *Candida albicans* due to low intensity constant direct current, *Journal of Bioelectricity*. 10: 1-15
- Karlson P. 1980. Biokemija. Ljubljana. Državna založba Slovenije. 443 str.
- Kjaergaard L. 1977. *The redox potential: Its use and control in biotechnology*. *Adv. Biochem. Eng.* 7: 131-149.
- Košmerl T. 1996. Flokulacija med izolati vinskih kvasok v Sloveniji. *Mag. delo*. Ljubljana. Slovenija.
- Kramli A., Szabo S. 1959. *Acta. Biol. Acad. Sci. Hung.* 6: 171-185.
- Kukec A., Berovič M., Wondra M., Čelan Š., Košmerl T. 2003. Influence of temperature shock on the glycerol production in cv. Sauvignon blanc fermentation. *Vitis*. 42 (4): 205-206.
- Kwong S. C. W., Rao G. 1991. The utility of culture redox potential for identifying metabolic state changes in amino acid fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 38: 1034-1040.
- Kwong S. C. W., Rao G. 1992. Effect of reducing agents in an aerobic amino acid fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 851-857.
- Lee J.M., Pollard J.F., Coulman G.A. 1983. Ethanol fermentation with cell recycling: Computer simulation. *Biotechnol. Bioengineer.* 25 (2): 497-511.

- Linko S. 1992. Production of *Phanerochaete-chrysosporium* lignin peroxidase. *Biotechnol. Adv.* 10 (2): 191-236.
- Luedeking R., Piret E.L. 1959. A kinetic study of the lactic acid formation. Batch process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Technol. Engineer.* 1 (4): 393-412.
- Luong J. H. T. 1985. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioengineer.* 27 (3): 280-285.
- Matkovicz B., Kovacz E. 1957. Untersuchung der zitronensäureproduction und der potentialveränderung in oberflächen and tiefkulturen. *Naturwissenschaften.* 44: 447-451.
- Monod J. The Growth of Bacterial Cultures. 1949. *Annual Review Microbiol.* 3: 371-394.
- Mosey F. 1985. Redox potentials in waste water treatment *Chem. Eng.* 414: 21-24.
- Motta M. A. 2001. Changes in *Saccharomyces cerevisiae* development induced by magnetic fields, *Biotechnol. Prog.* 17: 970-973.
- Motta M. A. 2004. Static magnetic fields enhancement of *Saccharomyces cerevisiae* ethanolic fermentation, *Biotechnol. Prog.* 20: 393-396.
- Muniz J. B., Marcelino M., da Motta M., Schuler A., da Motta M. A. 2007. Influence of static magnetic fields on *S. cerevisiae* biomass growth, *Braz. Arch. Bio. Tech.* 50 (3): 515-520.
- Muštovič S. 1985. Vinarstvo sa enohemijom i mikrobiologijom: proizvodnja kvalitet, kontrola od čokota do čaše. Privredni pregled. Beograd, str. 229-275.
- Nevoigt E., Stahl U. 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 231-241.
- Nieuwoudt H. H., Prior B. A., Pretorius I. S., Bauer F. F. 2002. Glycerol in South African table wines: an assessment of its relationship to wine quality. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 23: 22-30.
- Novak T. 1988. Vpliv električnega toka na produkcijo renina z glivo *Mucor pusillus*. *Dipl. delo.* Ljubljana. Slovenija.
- Nicolini G., Versini L., Corradin L., Grandi C. 1997. Un nuovo metodo valutativo dell'azoto assimilabile nei mosti e neivini base Trento D.O.C. Proceeding. S. Michele all'Adige, 7 Novembre, 1997.

- Nissen T. L., Shulze U., Nielsen J., Villadsen J. 1997. Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* 143: 203-218.
- Nielsen J., Villadsen J. 2003. Bioreaction Engineering Principles. Third Edition. Plenum Publishers New York.
- Oh D. K., Kim K. Y., Kim J. H. 1998. Increase of xylitol production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*. *Biotechnol. Bioeng.* 58 (4): 440-444.
- Oktyabrsky O. N., Smirnova G. V. 1989. Dynamics of redox potential in bacterial cultures growing on medium containing different sources of carbon, energy and nitrogen. *Acta Biotechnol.* 9: 203-209.
- Okuno K. 1991. Effect of super high magnetic field on the growth of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 13 (10): 745-750.
- Omori T., Ogawa K., Umemoto Y., Yuki K., Kajihara Y., Shimoda M., Wada H. 1996. Enhancement of glycerol production by brewing yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with heat shock treatment. *J. Ferment. Bioeng.* 82: 187-190.
- Ough C. S., Fong D., Amerine M. A. 1972. Glycerol in wine: determination and some factors affecting. *Amer. J. Enol. Vitic.* 23: 1-5.
- Oura E. 1977. Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochem.* 12: 19-21.
- Pizzaro F., Varela C., Martabit C., Bruno C. 2007. Coupling kinetic expressions and metabolic networks for predicting wine fermentations. *Biotechnol. Bioengineer.* 98:986.
- Plazl I., Lakner M. 2004. Uvod v modeliranje procesov. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.
- Podgornik A. 1996. Matematično modeliranje bioprosesov. Biotehnologija ur. Raspor P.. BIA d.o.o.. Ljubljana: 523-539
- Pretorius I. S., Van der Westhuizen T. J. 1991. The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry – A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 12: 3-31.
- Prpar S. 2006, Vpliv razmerja glukoza/fruktoza na potek alkoholne fermentacije s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. dipl. delo. Ljubljana. Slovenija.

- Radjai M. K., Hatch R. T., Cadman T. W. 1984. Optimization of amino acid production by automatic self-tuning digital control of redox potential. *Biotechnol Bioeng Symp.* 14: 657-679.
- Radler F., Schütz H. 1982. Glycerol production in various strains of *Saccharomyces*. *Am. J. Enol. Vitic.* 33: 36-40.
- Radovanović V. 1986. Tehnologija vina. Beograd. Građevinska knjiga. 686 str.
- Rankine B. C., Bridson D. A. 1971. Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation. *Am. J. Enol. Vitic.* 22: 2-12.
- Raspor P. 1996. Kvasovke. Iz: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ed). Ljubljana. BIA. Str. 70-90.
- Remize F., Roustan J. L., Sablayrolles J. M., Barre P., Dequin S. 1999. Glycerol overproduction by engineered *S. cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 143-149.
- Ribéreau-Gayon J. 1976. Iz: Sciences et techniques du vin. Paris. Dunod.
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. 2000a. *Handbook of Enology, Vol. 1, The Microbiology of Wine and Vinifications*. New York. John Wiley & Sons. 493 str.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2000b. *Handbook of Enology, Vol. 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. New York. John Wiley & Sons. 441 str.
- Roels J. A. 1983. Energetics and kinetics in biotechnology. *Elsevier Biomedical Press*. Amsterdam.
- Jones R. P., Greenfield P. F. 1982. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme Microbial Technol.* 4 (4): 210-223.
- Rollini M., Manzoni M. 2006. Influence of different fermentation parameters on glutathione volumetric productivity by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.*, 41: 1501-1505.

- Salmon J. M., Vincent O., Mauricio J. C., Bely M. 1993. Sugar-transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* 44 (1): 56-64.
- Scaglia G.J.E., Aballay P.M., Mangual C.A., Vallejo M.D., Ortiz O.A. 2009. Improved phenomenological model for an isotheraml winemaking fermentation. *Food Control.* 20:887-895.
- Scanes K. T., Hohmann S., Prior B. A. 1998: Glycerol production by yeast *S. cerevisiae* and its relevance to wine: A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 19: 17-24.
- Sevda S. B., Rodrigues L., Joshi C. 2011: Influence of heat shock on yeast cell and its effect on glycerol production in guava wine production. *J. Biochem. Tech.* 3 (1): 230-232.
- Shang L., Jiang M., Ryu C. H., Chang H. N., Cho S. H., Lee J. W. 2003. Inhibitory effect of carbon dioxide on the fed-batch culture of *Ralstonia eutropha*: Evaluation by CO<sub>2</sub> pulse injection and autogenous CO<sub>2</sub> methods. *Biotechnol. Bioengineer.* 83: 312-320.
- Shibai H., Ishizaki A., Kobayashi K., Hirose Y. 1974. Simultaneous measurement of dissolved oxygen and oxidation-reduction potentials in the aerobic culture. *Agric. Biol. Chem.* 38: 2407-2411.
- Shibai H., Ishizaki A., Hyrose Y. 1975. *Proceedings of the First International Congress of the IAMS.* Business Center for Academic Societis. Japan Press. 5:154.
- Siderius M., Van Wuytswinkel O., Reijenga K. A., Kelders M., Mager W. H. 2000. The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Molecular Microbiol.* 36 (6): 1381-1390.
- Sponholz W. R. 1989. Der Traubenmost. Iz: *Chemie des Weines.* Stuttgart. Verlag Eugen Ulmer. str. 45-183.
- Štašak L., Vetterl V., Šmarda J. 2002. Effect of low-frequency magnetic fields on bacteria *Escherichia coli.* *Bioelectrochem.* 55: 161-164.
- Šantek M. 1993. Iz: Uvod u fiziku vina. Zagreb. Školska knjiga.
- Šikovec S. 1980. Sodobno kletarjenje. Iz: ČZP Kmečki glas. Ljubljana. 255 str.
- Šikovec S. 1993. Vinarstvo od grozdja do vina. Iz: ČZP Kmečki glas. Ljubljana. 284 str.

- Tengerdy R. P. 1961. Redox potential changes in 2-keto-L-gulonic acid fermentation. Correlation between redox potential and dissolved oxygen concentration. *J. Biochem. Microbiol. Eng.* 3: 241-253.
- Tomlinson J. W., Klimartin P. A. 1997. Measurement of the redox potential of wine. *Journal of Applied Electrochemistry.* 27: 1125-1134.
- Torija J. M., Rozes N., Poblet M., Guillamon J. M., Mas A. 2003: Effects of fermentation temperature on the population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food. Microbiol.* 80: 47-53.
- Trochoni J., Gamero A., Arroyo- López F. N., Barrio E., Querol A. 2009. Differences in the glucose and fructose consumption profiles in diverse *Saccharomyces* wine species and their hybrids during grape juice fermentation. *Inter. J. Food Microbiol.* 134: 237-243.
- Van Dijken J. P., Scheffers W. A. 1986. Redox balances in the metabolism of sugars by yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 32: 199-224.
- Vannini L., Simone G., Norscia P., Romano P., Suzzi G. 1994. Acetaldehyde production as a selective characteristic in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ind. Bevande.* 23: 414-417.
- Vargas F., Pizzaro F., Pérez-Correa J. R., Agosin E. 2011. Expanding a dynamic flux balance model of yeast fermentation to genome-scale. *BMC Systems Biotechnol.* 5: 75-87.
- Vorob'eva L. I. 2004. Stressors, stress reactions, and survival of bacteria: a review. *Applied Biochem. and Microbiol.* 40: 217-224.
- Wales D. S., Cartledge T. G., Lloyd D. 1980. Effects of glucose repression and anaerobiosis on the activities and subcellular distribution of tricarboxylic acid cycle and associated enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 116: 93-98.
- Walker G. M. 1998. *Yeast physiology and biotechnology*. New York. John Willey and Sons. 279 str.
- Wang D., Xu Y., Hu J., Zhao G. 2004. Fermentation kinetics of different sugars by apple wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* 110 (4): 340-346.
- Wondra M. 1997. Vpliv oksidantov na prehitro staranje stekleničenega vina. Iz: Bitenčevi živilski dnevi '97. Ljubljana. str. 212-217.

Yalcı, S. K., Özbaş Z. Y. 2005. Determination of growth and glycerol production kinetics of a wine yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* Kalecik 1 in different substrate media. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 1303-1310.

Youself A. E., Courtney, P. D. 2003. Basic of stress adaptation and implications in new-generation foods. Iz: Microbial stress adaptation and food safety. Youself A.E., Juneja V.K. (eds.). Boca Ration (etc.). CRC Press: str. 1-30.

Yun S. E., Haiying Y., Berg H. 1998. Electric field effects with alcohol dehydrogenase. *Electrobiol. Magnetobiol.* 17 (3): 421-426.

Žnidaršič Plazl P., Podgornik H. 2005. Vaje iz biotehnologije. Univerza v Ljubljani. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

[http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast\\_Biol/03%20Yeast%20Metabolism.pdf](http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/03%20Yeast%20Metabolism.pdf)