

UNIVERZITET CRNE GORE
Biotehnički fakultet Podgorica

Komisiji za doktorske studije

Crna Gora
UNIVERZITET CRNE GORE
BIOTEHNIČKI FAKULTET
Broj: 07-4930/12
12-12 2022

Predmet: Predlog Komisije za ocjenu podobnosti doktorske teze i kandidata

Predlažem Komisiji za doktorske studije Biotehničkog fakulteta da imenuje komisiju za ocjenu podobnosti doktorske teze „Uticaj selekcionisanih *Saccharomyces* i ne *Saccharomyces* kvasaca i malolaktičke fermentacije na aromatski profil crvenih vina različitih sorti vinove loze “ i kandidata MSci Jovane Kojić u sastavu:

1. Doc. dr Danijela Raičević, Biotehnički fakultet Univerziteta Crne Gore (naučna oblast: Tehnologija poljoprivredno-prehrambenih proizvoda) - mentor
2. Prof. dr Radmila Pajović-Šćepanović, redovni profesor Biotehničkog fakulteta Univerziteta Crne Gore (naučna oblast: Tehnologija poljoprivredno-prehrambenih proizvoda) – član.
3. Doc.dr Tatjana Popović, Biotehnički fakultet Univerziteta Crne Gore (naučna oblast: Vinogradarstvo) – član.

U Podgorici, 1.12.2022.

Mentor
Doc. dr Danijela Raičević

D Raičević

PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	M.Sc. Jovana Kojić
Fakultet	Biotehnički fakultet, Univerzitet Crne Gore
Studijski program	Biotehnika
Broj indeksa	02/2021
Ime i prezime roditelja	Ljubomir Raičević
Datum i mjesto rođenja	14.10.1986. Nikšić
Adresa prebivališta	Studentska 26, Podgorica
Telefon	+38267564583
E-mail	jovana_raicevic@yahoo.com
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	2021 - Doktorske studije Biotehnike, Biotehnički fakultet, Univerzitet Crne Gore 2017 - Master studije, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Srbija Odsek za bilja. Prosječna ocjena 9,86 (od mogućih 10,00) 2009 - Specijalista, smjer organska hemijska tehnologija, Tehnološko-metalurški fakultet Univerzitet Crne Gore u Podgorici Prosječna ocjena 10,00 (od mogućih 10,00) Naziv specijalističkog rada „Hemijski sastav i antimikrobno dejstvo eteričnih ulja komorača (<i>Foeniculum vulgare Mill</i>)”. 2008 - BSc Tehnološko-metalurški fakultet Univerzitet Crne Gore u Podgorici. Prosječna ocjena 9,88 (od mogućih 10,00) 2005 - Gimnazija “Stojan Cerović”, Nikšić. Nosilac diplome “Luča” Prosječna ocjena 5.00 2001 - OŠ “Olga Golović” Nikšić Nosilac diplome “Luča” Prosječna ocjena 5.00
Radno iskustvo	2022 – Tehnolog u RJ Prerada – šef pogona 13. jul Plantaže 2018 - 2022 Projektni menadžer za proizvodnju vina i jakih alkoholnih pića Sektor za razvoj, 13. jul Plantaže 2011 - 2018 Stručni saradnik za proizvodnju vina i jakih alkoholnih pića Sektor za razvoj, 13. jul Plantaže 2010 – 2011 Pripravnik u oblasti vinogradarstva i vinarstva Sektor za razvoj, 13. jul Plantaže
Popis radova	1. V. Maraš, J. Tello, A. Gazivoda, M. Mugoša, M. Perišić, J. Raičević, N. Štajner, R. Ocete, V. Božović, T. Popović, E. García-Escudero, M. Grbić, J.M. Martínez-Zapater, J. Ibáñez (2020): Population genetic analysis in old Montenegrin

- vineyards reveals ancient ways currently active to generate diversity in *Vitis vinifera*. *Scientific Report*, 10, 15000 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71918-7>. IF: 3.998
2. S. Radonjić, V. Maraš, **J. Raičević**, and T. Košmerl (2020): Wine or Beer? Comparison, Changes and Improvement of Polyphenolic Compounds during Technological Phases. *Molecules* 2020, 25, 4960. <https://doi.org/10.3390/molecules25214960>. IF: 3.267
 3. V. Maraš, T. Popović, A. Gazivoda, **J. Raičević**, V. Kodžulović, M. Mugoša, S. Šučur (2015): An overview on origin and characterisation of Montenegrin grapevine varieties. *VITIS*, 54: 135-137. IF:0.985.
 4. V. Maraš, V. Kodžulović, M. Mugoša, **J. Raičević**, A. Gazivoda, S. Šučur, M. Perišić (2017): Clonal selection of autochthonous grape variety Vranac in Montenegro. In: Badnjevic A. (eds) *CMBEBIH 2017. IFMBE Proceedings*, vol 62. Springer, Singapore. DOI.
 5. V. Maraš, M. Mugoša, S. Vujičić, **J. Raičević**, A. Gazivoda (2017): "Importance of autochthonous grapevine varieties for Montenegrin winegrowing and winemaking sector and company "13. jul Plantaže". Conference Proceedings at The First International Conference on Vranac and Other Montenegrin Autochthonous Grapevine Varieties 20-22.11.2017. Podgorica, Montenegro. p: 1.
 6. J. M. Martínez-Zapater, V. Maraš, **J. Raičević**, A. Gazivoda, E. G. Escudero, M. Grbić and J. Ibáñez (2017): "The history written in the grapevine genome: The case of Montenegrin varieties". Conference Proceedings at The First International Conference on Vranac and Other Montenegrin Autochthonous Grapevine Varieties 20-22.11.2017. Podgorica, Montenegro. p: 9.
 7. V. Maraš, M. Mugoša, V. Kodžulović, **J. Raičević**, A. Gazivoda, S. Šučur, M. Perišić, D. Raičević, T. Popović, M. Čizmović (2017): "Clonal selection of autochthonous grapevine varieties Vranac and Kratošija". Conference Proceedings at The First International Conference on Vranac and Other Montenegrin Autochthonous Grapevine Varieties 20-22.11.2017. Podgorica, Montenegro, p: 69.
 8. S. Šučur, V. Maraš, V. Kodžulović, **J. Raičević**, M. Mugoša, T. Jug and T. Košmerl (2016): The impact of different commercial yeasts on quality parameters of Montenegrin red wine – Vranac and Kratošija. *Biology Engineering and Medicine*, 1: DOI: 10.15761/BEM.1000105
 9. M. Bogičević, V. Maraš, M. Mugoša, V. Kodžulović, **J. Raičević**, S. Šučur and O. Failla (2015): The effect of early leaf removal and cluster thinning treatments on berry growth and grape composition in cultivars Vranac and Cabernet Sauvignon. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. 2:13 DOI:10.1186/s40538-015-0037-1

10. V. Maraš, T. Popović, A. Gazivoda, **J. Raičević**, V. Kodžulović, M. Mugoša, S. Šućur (2015): An overview on origin and characterisation of Montenegrin grapevine varieties, Proceedings Final Cost action FA1003 - GRAPENET Conference, (Lisbon - Portugal). VITIS - Journal of Grapevine Research. 54: 135-137.
11. V. Maraš, M. Tomić, V. Kodžulović, S. Šućur, **J. Raičević**, D. Raičević, M. Čizmović (2012): Research of origin and work on clonal selection of Montenegrin grapevine varieties Cv.Vranac and Cv.Kratosija. Agro-Knowledge Journal, 13 (1), 103-112.
12. S. Šućur, V. Maraš, Kodžulović, **J. Raičević**, A. Gazivoda, M. Mugoša, A. Savović and T. Košmerl (2015): Effect of microbiological and technological parameters on montenegrin red wines quality. Book of Proceedings VI International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2015" Jahorina, 15 - 18 October 2015, Bosnia and Herzegovina. pp. 260-266.
13. A. Gazivoda, A. Velimirović, V. Maraš, **J. Raičević**, S. Šućur, A. Pavićević, A. Karagianni, I. Livieratos (2014): Survey results of Citrus Tristeza Virus (CTV) in Crete and detection by direct Immunoprinting-ELISA method. Fifth International Scientific Agricultural Symposium "Agrosym 2014". 491-496. DOI: 10.7251/AGSY1404491G
14. V. Maraš, V. Kodžulović, **J. Raičević**, A. Gazivoda, M. Perišić (2014): Influence of Different Rootstock on Grape and Wine Quality of Montenegrin Autochthonous Grapevine Cultivar 'Vranac' First International Symposium on Grapevine Roots. Rauscedo, Italy. Acta Horticulturae (ISHS) 1136:45-50.
15. V. Maraš, N. Đorđević, A. Martinović, A. Ivetić, D. Drakić, **J. Raičević**, B. Gašović (2014): The impact of benurals addition on chemical composition and quality of ensiled grape Pomace, Proceedings II International Congress Food Technology, Quality and Safety and 16 International symposium Feed Technology Novi Sad, Serbia, 204 -210.
16. V. Maraš, B. Gašović, D. Drakić, **J. Raičević**, J. Đaković, V. Kodžulović, S. Šućur, N. Đorđević (2013): Influence of inoculation on grape pomace silage quality supplemented with non-protein nitrogen; Proceedings of 10th International Symposium "Modern Trends in Livestock Production" Belgrade, Serbia, 1133-1141.
17. V. Maraš, M. Tomić, A. Gazivoda, **J. Raičević**, S. Šućur, V. Kodžulović, A. Pavićević (2012): Research on origin and genetic sanitary evaluation of autochthonous grapevine varieties in Montenegro. Proceedings – International Symposium for Agriculture and Food, Skopje, Macedonia, 145-149.
18. V. Maraš, M. Tomić, V. Kodžulović, **J. Raičević**, S. Šućur,

	<p>(2012): Clonal selection and establishment of mother plantations of Vranac variety, Proceedings – International Symposium for Agriculture and Food, Skopje, Macedonia, 206-2014.</p> <p>19. M. Tomić, Ivan Kuljančić, V. Maraš, V. Kodžulović, J. Raičević, S. Šučur (2012): Effect of different buds load per vine on grapes and wine quality of kratosija variety, Proceedings – International Symposium for Agriculture and Food, Skopje, Macedonia, 261-265.</p>
NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	Uticaj selekcionisanih <i>Saccharomyces</i> i ne <i>Saccharomyces</i> kvasaca i malolaktičke fermentacije na aromatski profil crvenih vina različitih sorti vinove loze
Na engleskom jeziku	Influence of selected <i>Saccharomyces</i> and <i>non-Saccharomyces</i> yeasts and malolactic fermentation on the aromatic profile of red wines from different grape varieties
Obrazloženje teme	
<p>Posljednjih decenija, u Crnoj Gori proizvodnja vina sve više dobija na ekonomskom, turističkom i kulturnom značaju. Zahvaljujući dugoj istoriji i tradiciji u našoj zemlji, proizvodnja kvalitetnih vina se sve više povećava što omogućava naše jače i bolje pozicioniranje na vinskoj mapi Evrope i svijeta. Dominantno mjesto u sortimentu imaju autohtne sorte vinove loze koje se pominju još u 15. vijeku (Budvanski statut). Sorta Vranac je vodeća u proizvodnji crvenih vina, ali i u proizvodnji rakija (80%), prati je sorta Kratošija, a zatim druge internacionalne sorte (Raičević i sar., 2015; Pajović-Šćepanović i sar., 2016; Raičević i sar., 2017; Pajović-Šćepanović i sar., 2019, Raičević i sar., 2020, Maraš i sar., 2020). Od introdukovanih sorti naročito je zastupljen Cabernet Sauvignon i posljednjih godina sve više se gaji sorta Marselan (Rejonizacija vinogradarskih geografskih proizvodnih područja Crne Gore, 2017).</p> <p>Jedan od bitnih činilaca „dopadljivosti“ vina su aromatične materije koje se nalaze u njemu, a koje se sastoje od nekoliko stotina različitih jedinjenja, sa koncentracijama u rasponu od 0,1 µg/L do 100 mg/L (Belda i sar., 2017). Konačna aroma poznata je kao kombinacija isparljivih jedinjenja koja potiču iz grožđa (sortna ili primarna aroma), metabolizma kvasca i bakterija (fermentacija ili sekundarna aroma), kao i post-fermentativnih postupaka proizvodnje vina, uključujući procese starenja (tercijarna aroma) (Savoi i sar., 2017). Proizvodnja aktivnih jedinjenja primarne arome vina odvija se u egzokarpu bobica grožđa i njegova konačna koncentracija u vinu je uglavnom uslovljena sortom vinove loze, uz stepen zrelosti grožđa, agronomске i enološke prakse, kao što je i pokazano prilikom istraživanja francuskih sorti (Sémillon, Merlot, Chardonnay), italijanskih (Corvina, Negroamaro, Primitivo) i španskih (Tempanillo) (Hernandez-Orte i sar., 2015; Fragasso i sar., 2012; Mayr i sar. 2018). Neke aromatične sorte vinove loze imaju mirisne šire sa istim onim aromama koje možemo pronaći i u konačnom – finalnom vinu. Međutim, grožđe nekih sorti može dati izrazito mirisna vina bez obzira što im je šira bezmirisna. Njihova aroma potiče iz grožđa, ali je vezana u bezmirisnim aromatskim prekursorima. Iako isparljiva komponente iz grožđa imaju veći uticaj na senzorna svojstva, oni nastali tokom alkoholne fermentacije značajno doprinose aromi vina tako što povećavaju voćnost i kompleksnost. Međutim, tokom alkoholne fermentacije i odležavanja vina mogu nastati jedinjenja koja daju neželjene arome ili pak ona koja maskiraju sortne arome.</p> <p>Nedavne studije su pokazale da kvasci koji nisu <i>Saccharomyces</i> imaju različita enološka svojstva u poređenju sa onima <i>S. cerevisiae</i>. Ova činjenica se može koristiti za rješavanje specifičnih tehnoloških problema, a u cilju unaprjeđenja i obogaćivanja senzornih osobina vina (Canónico i</p>	

sar., 2019). Upotreba vrsta koje nisu *Saccharomyces* kao dio miješanih inokulanata zajedno sa *S. cerevisiae*, predlaže se kao način da se poboljša složenost vina (Ebeler i sar., 2009). Sprovedena su obećavajuća istraživanja o performansama fermentacije različitih sojeva, o njihovoj sposobnosti da poboljšaju aromu i složenost vina.

Proizvodnja vina pored alkoholne fermentacije, obuhvata i važan proces malolaktičke fermentacija (MLF) koju sprovode bakterije mliječne kiseline (LAB). Malolaktična fermentacija povećava mikrobiološku stabilnost i može uticati na ukus vina modifikacijom jedinjenja, kao što su diacetil, estri, viši alkoholi i isparljive kiseline pomoću LAB-a (Heinrich du Plessis i sar., 2017). Interakcije između *S. cerevisiae*, *ne-Saccharomyces* kvasaca i bakterija MLF-a još uvijek nisu tako dobro istražene kao interakcije između *S. cerevisiae* i bakterija MLF-a.

Takođe, suočavajući se sa sve drastičnijim klimatskim promjenama traže se nove metode u tehnologiji proizvodnje vina, kako bi se očuvale primarne arome te postigla ravnoteža alkohola i kiselina. Kao potencijalno rješenje nudi se primjena *ne-Saccharomyces* kvasaca uz upotrebu bakterija MLF-a.

Pregled istraživanja

Tradicionalni proces proizvodnje vina je rezultat bioloških interakcija između mikroorganizama (kvasaca, bakterija, gljivica) prirodno prisutnih na grožđu i u prostorijama podruma, koji pokreću alkoholnu (AF) kao i malolaktičku fermentaciju (MLF) (Beckner i sar., 2015). Alkoholnu fermentaciju uglavnom obavlja *Saccharomyces cerevisiae*, koji se naziva „vinski kvasac“, odgovoran za konverziju šećera u etanol i proizvodnju/oslobađanje brojnih sekundarnih metabolita povezanih sa senzornim karakteristikama vina (Berbegal i sar., 2017). Pored *S. cerevisiae*, grožđe prirodno sadrži i mješovite populacije drugih rodova i vrsta kvasca, uključenih, u različitoj mjeri, u proces alkoholne fermentacije (Mateo i sar., 2016). U procesu spontane fermentacije, početna faza je podstaknuta djelovanjem heterogene mješavine kvasaca koji pripadaju različitim vrstama *ne-Saccharomyces* koje obično karakteriše niska fermentaciona moc, dok se završni dio procesa odlikuje dominacijom sojeva *S. cerevisiae* (Morata i sar., 2019). U stvari, djelovanje *ne-Saccharomyces* je relevantno (preovlađujuće) tokom prve faze alkoholne fermentacije sve dok nivo alkohola ne dostigne 4% (v/v), kada većina *ne-Saccharomyces* vrsta više ne može da preživi (Pretorius i sar., 2020).

Generalno, vina se razlikuju po različitim koncentracijama isparljivih jedinjenja koja nastaju pod uticajem vrste korišćenog kvasca i uslova fermentacije. Dakle, biosinteza jedinjenja kao što su alkoholi, estri, kiseline ili aldehidi je čvrsto zavisna od vrste i soja kvasca i pozitivan ili negativan uticaj ovih molekula na aromu vina uslovljen je njihovom koncentracijom. Iz ovih razloga, sve veći broj istraživanja ima za cilj ispitivanje uticaja kvasaca koji nisu *Saccharomyces* rodova/vrsta. Često su u fokusu ispitivanja uticaj nekoliko *ne-Saccharomyces* rodova/vrsta i njihove performanse fermentacije (odabrani na osnovu njihove enološke važnosti): *Torulaspota delbrueckii*, *Lachancea thermotolerans*, *Hanseniaspora spp*, *Pichia spp*. i *Candida zemplinina*. Sa jedne strane aromatska jedinjenja dobijena od grožđa imaju glavnu ulogu u ekspresiji arome vine, dok sa druge strane tokom alkoholne fermentacije vinski kvasci uključujući i *ne-Saccharomyces* imaju velikog uticaja na aromu kroz različite cikluse *de novo* biosinteze određenih jedinjenja (sekundarnih aroma), ali takođe imaju uticaj i na hemiju primarnih jedinjenja kroz specifične enzimatske aktivnosti (Tufariello i sar., 2021).

U prošlosti su se vrste koje ne pripadaju *Saccharomyces* smatrale „lošim fermentorima“ zbog njihove opšte niske fermentativne efikasnosti, niske tolerancije na enološke aditive kao što je sumpor dioksid i zbog činjenice da proizvode sircetnu kiselinu u višim količinama. Međutim, posljednjih godina nekoliko eksperimenata podstaklo je istraživače i proizvođače da preispitaju djelovanje i doprinos vrsta koje nisu *Saccharomyces* u cilju poboljšanja procesa prerade grožđa i kvaliteta vina, naročito kada se ispituje njihova sinergija sa *S. cerevisiae* (Tristezza i sar., 2016;

Comitini i sar., 2017). U prošlosti, fermentacije koje nisu sprovedene sa *Saccharomyces* bile su generalno povezane sa visokim sadržajem isparljive kiseline, proizvodnjom etil acetata, neprijatnim ukusom i kvarenjem vina. Novija istraživanja su pokazala da bi isključiva upotreba *S. cerevisiae* mogla da dovede do senzornog osiromašnja vina u poređenju sa karakterističnim aromatičnim karakteristikama vina proizvedenih spontanom fermentacijom koju pokreću ne *Saccharomyces* kvasci (Jolly i sar., 2006). Iako je enološki potencijal sojeva *Saccharomyces* duboko istražen, oskudne su informacije vezane za uticaj različitih rodova/vrsta ne-*Saccharomyces* na aromatični profil vina (Jolly i sar., 2006; Morata i sar., 2018; Morata i sar., 2019).

Sprovedena su obećavajuća istraživanja o performansama fermentacije različitih sojeva, o njihovoj sposobnosti da kontrolišu kvarenje vina i da poboljšaju aromu i složenost vina. Različiti nivoi enzimskih aktivnosti i različite sposobnosti za proizvodnju sekundarnih metabolita koji karakterišu kvasce koji nisu *Saccharomices*, neki su od aspekata koje treba uzeti u obzir među kriterijumima za odabir sojeva i planiranje starter kultura (Alessandrini i sar., 2018).

U Tabeli 1. dat je pregled glavnih isparljivih organskih jedinjenja koja učestvuju u formiranju arome vina, a koja su pod uticajem metabolizma kvasaca (Tufariello i sar., 2021).

Tabela 1. Metaboliti u vinu proizvedeni od strane ne *Saccharomyces* kvasaca u mješovitim fermentacijama (Tufariello i sar., 2021).

Vrsta	Metabolit
<i>Hanseniaspora spp.</i>	acetatni estri C6 alkoholi sircetna kiselina jedinjenja sumpora
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	feniletanol acetatni estri i etil estri terpeni i norizoprenoidi sircetna kiselina
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	linalool viši alkoholi, estri acetatni estri laktoni 3-metiltio-1-propanol 4-metil-4-sulfanilpentan-2-on
<i>Lachancea thermotolerans</i>	estri, terpeni 3-metiltio-1-propanol
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	terpeni 4-metil-4-sulfanilpentan-2-on feniletanol β -damascenon etil oktanoat, etil acetat 2-feniletil acetat
<i>Candida zemplinina</i>	viši alkoholi etil estri terpeni

Pichia spp.

acetat estri
 terpeni
 3-merkaptotioheksil acetat
 isparljivi fenoli
 3-metil-1-propanol

Sposobnost proizvodnje viših alkohola je striktno zavisna od soja i ova osobina se može koristiti kao odlučujući karakter u selekciji kvasca za industrijske svrhe (Belda i sar., 2017). Što se tiče proizvodnje estara, u vinu postoje dvije grupe estara: etil estri i acetatni estri, obje grupe su odgovorne za voćne note vina.

Monoterpeni i isparljivi tioli su detektovani u grožđu kao bezmirisni prekursori nakon što se oslobađaju jedinjenja primarnih aroma usljed enzimske aktivnosti kvasca (Tufariello i sar., 2021). Malićanin i sar., (2020) su identifikovali 26 različitih isparljivih jedinjenja arome u vinima sorte Prokupac. Sva jedinjenja su, shodno hemijskoj strukturi, podijeljena u pet grupa: alkoholi (izobutil alkohol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 1-pentanol, (S)-2-metil-a-butanol, 1-heksanol, 2-metil-a-pentanol, 2-feniletanol, 4-metil-1-pentanol, 2-butanol); etil estri (etil butanoat, etil heksanoat, etil 3-metil pentanoat, etil oktanoat, etil-(4E)-dekanoat, etil dodekanoat, dietil sukcinat); acetati (2-fenil acetat, 2-metilbutil acetat, 3-metilbutil acetat, etil acetat); isparljive masne kiseline (oktanska kiselina, dekanska kiselina, heksanska kiselina); aldehidi (benzaldehyd). Karabegović i sar. (2021) iznose da je dokazano da prisustvo kvasaca *ne Saccharomyces* u početnoj fazi fermentacije sa kasnijom inokulacijom *S. cerevisiae* doprinosi povećanju kompleksnosti vina, kao i povećanju višeg sadržaja alkohola i ukupnih ekstrakata.

Malolaktička fermentacija je enzimska dekarboksilacija L-jabučne kiseline u L-mliječnu kiselinu i CO₂, a poželjna je u proizvodnji crvenih vina, punih bijelih i pjenušavih vina. Malolaktička fermentacija povećava mikrobiološku stabilnost, a bakterije *Oenococcus oeni* je vrsta poželjna za MLF zbog svoje otpornosti na teške uslove u vinu. Komercijalni sojevi *O. oeni* odabrani su zbog svojih enoloških parametara, uključujući odsutnost aminokiselinskih dekarboksila i važni su za doprinos poboljšanju kvaliteta vina (Encuentro i sar., 2006; Jeromel i sar., 2018; Moreno Aribas i sar., 2010). Različite strategije MLF-a se istražuju kao što su istovremeno izvođenje (na početku alkoholne fermentacije) i sekvencijalna inokulacija (nakon alkoholne fermentacije). Odabir kompatibilnih sojeva kvasca i LAB-a je od suštinskog značaja za uspješnu alkoholnu i malolaktičku fermentaciju, jer se pokazalo da određeni sojevi kvasca imaju negativan uticaj na rast LAB, a time i sprovođenja MLF. Međutim, neki LAB sojevi takođe mogu izazvati sporu fermentaciju ili pak zastoj u fermentaciji. Interakcije između *S. cerevisiae*, *ne-Saccharomyces* kvasaca i LAB nisu tako dobro istražene kao interakcije između *S. cerevisiae* i LAB. Još uvek postoji nedostatak razumijevanja kako specifični *ne-Saccharomyces* kvasci mijenjaju senzorna svojstva vina, kao i interakcije ovih *ne-Saccharomyces* sa kvascima *S. cerevisiae* u vinima od raznih sorti vinove loze. Malo se zna o interakcijama *Saccharomyces*, *ne-Saccharomyces* kvasac i bakterija mlečne kiseline, i kako njihove interakcije utiču na aromu vina i ukus (Heinrich du Plessis i sar., 2017).

Doprinos i uticaj različitih vrsta *ne Saccharomyces* kvasaca i bakterija malolaktičke fermentacije na aromu vina kontinuirano se proučava, međutim ovoj oblasti su još potrebne detaljne analize. Do sada su rezimirane najnovije informacije o odabranim *ne Saccharomyces* kvascima kao bioresursima za poboljšanje sortne i fermentativne arome vina. Upotreba i ponovna procjena *ne Saccharomyces* kvasaca i bakterija malolaktičke fermentacije odgovaraju potrebama proizvođača i potrošača da dobiju vina sa diferenciranim senzornim profilima.

Cilj i hipoteze

U cilju upoznavanja razvoja i ekspresije najboljeg aromatskog profila sortnih vina veći broj savremenih naučnih publikacija se bavi utvrđivanjem hemijskog sastava arome crvenih vina. Ovo istraživanje ima za cilj utvrđivanje uticaja selektovanih *Saccharomyces* i *ne Saccharomyces* kvasaca, kao

i uticaj bakterija malolaktičke fermentacije na sadržaj isparljivih jedinjenja koja doprinose aromi. Kroz naučno istraživanje ocjenice se i senzorne karakteristike vina sorti Vranac, Kratošija, Cabernet Sauvignon i Marselan dobijenih fermentacijom koju sprovode, *Saccharomyces cerevisiae* kvasci i sekvencijalnom fermentacijom ne *Saccharomyces* i *Saccharomyces cerevisiae* kvasaca i to u kombinaciji bez i sa bakterijama malolaktičke fermentacije za dirigovano izvođenje MLF-e. Zadatak istraživanja je definisanje aromatskog profila sorti Vranac i Kratošija, koji se do sada nije ispitivao, ali i aromatskog profila sorti Cabernet sauvignon i Marselan, koji ove sorte daju u agroekološkim uslovima Podgoričkog subregiona. Imajući u vidu sve veći uticaj klimatskih promjena na kvalitet grožđa i vina, u prvom planu na povećan sadržaj alkohola u vinima, jedan od ciljeva istraživanja je i utvrditi način izvođenja fermentacije, kako bi se postigla ravnoteža u sadržju alkohola i kiselina.

U vezi pomenutih ciljeva, polazne hipoteze ovog istraživanja su:

H01 – Ne *Saccharomyces* kvasci u sekvencijalnoj fermentaciji imaju značajan uticaj na razvoj isparljivih jedinjenja koja doprinose aromi u odnosu na *Saccharomyces* kvasac i prirodne kvasce na grožđu.

H02 – *Torulaspota delbrueckii* pojačava sorte arome i sadržaj estara u fermentaciji dok *Lachancea thermotolerans* proizvodi manje alkohola i više mliječne kiseline.

H03 – Inakulisane bakterije MLF-a sa *Saccharomyces* i u kombinaciji *Saccharomyces* sa ne *Saccharomyces* kvascima utiču na sadržaj isparljivih jedinjenja koja doprinose aromi vina

H04 – Senzorna analiza pokazaće da li se u sekvencijalnoj fermentaciji ne *Saccharomyces* i *Saccharomyces* kvasca uz inokulaciju bakterija malolaktičke fermentacije dobijaju kompleksnija vina u odnosu na vina dobijena fermentacijom samo *Saccharomyces* kvascima.

Istraživanja su od izuzetne važnosti sa aspekta upoznavanja i određivanja ključnih tačaka stvaranja isparljivih jedinjenja u toku fermentacije, definisanja aromatskog profila vina ispitivanih sorti, a sve u cilju dobijanja kvalitetnijeg proizvoda. Praćenje dinamike stvaranja isparljivih jedinjenja u fermentaciji koja doprinose aromi ukazaće na tačke gdje se može intervenisati u cilju njihovog razvoja i poboljšanja, te će se dobiti informacije o evoluciji i razvoju pojedinih aroma u procesu proizvodnje sortnih vina Vranac, Kratošija, Cabernet sauvignon i Marselan.

Materijali, metode i plan istraživanja

U ostvarivanju glavnih ciljeva i testiranja polaznih hipoteza ovog istraživanja prerađeno će biti grožđe četiri sorte Vranac, Kratošija, Cabernet sauvignon i Marselan. Po svakoj sorti urađeno će biti 8 različitih vinifikacije i to: kontrolna varijanta prirodnim kvascima koji se nalaze na grožđu sa i bez inokulacije bakterija MLF-e *Oenococcus oeni*, varijanta sa dodatkom *Saccharomyces cerevisiae* (komercijalni kvasac ICVD254) sa i bez inokulacije bakterija MLF-e, sekvencijalna fermentacija sa ne *Saccharomyces* *Torulaspota delbrueckii* (komercijalni proizvod Biodiva) i sa *Saccharomyces cerevisiae* sa i bez inokulacije bakterija MLF-e *Oenococcus oeni* i sekvencijalna fermentacija sa ne *Saccharomyces* *Lachancea thermotolerans* (komercijalni proizvod Laktia) sa *Saccharomyces cerevisiae* sa i bez inokulacije bakterija MLF-e *Oenococcus oeni*.

Kako bi se pratila dinamika razvoja pojedinih jedinjenja koja utiču na aromu, uzorci će biti uzeti 3., 5., 7. dan fermentacije, zatim nakon alkoholne i MLF fermentacije, nakon prvog pretakanja (odležavanja na finom talogu), te nakon dva mjeseca odležavanja.

Standardna hemijska analiza vina biće izvršena prema Međunarodnoj organizaciji za vinovu lozu i vino (OIV, 2012).

Ispitivaće se sadržaj 27 različitih isparljivih jedinjenja (izobutil alkohol, 2-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, 1-pentanol, 2- metil-1-butanol, n-heksanol, 2-feniletanol, 1-propanol, 2,3-butandiol, izoheksanol, 2-metil-1-pentanol, etil acetat, etil heksanoat, etil izoheksanoat, dietil sukcinat, etil oktanoat, etil dekanat, etil dodekanoat, 3-metil butil acetat, etil butanoat, etil 3-metil pentanoat, benzaldehid, sircetna kiselina, oktanoična kiselina, 4-hidroksi-2-butanon, izoamil acetoacetat). Isparljiva jedinjenja u vinu analiziraće se gasnom hromatografijom/masenom

spektrometrijom (GC/MS) i gasnom hromatografijom – detekcija jonizacije plamena (GC/FID). Senzornu ocjenu proizvedenog vina četiri različite sorte izvršiće ocjenjivači sa iskustvom u degustaciji vina i zvanično sertifikovani za senzorno ocjenjivanje vina.

Primjenom različitih statističkih testova će se obrađivati kompletni statistički podaci.

Planom je predviđeno da se vinifikacija uradi na oglednom imanju Biotehničkog fakulteta, Univerziteta Crne Gore za sorte Vranac i Kratošija, dok će vinifikacija sorti Cabernet sauvignon i Marselan biti urađena kod privatnog proizvođača. Ogled će biti sproveden u trajanju od dvije godine.

Očekivani naučni doprinos

Rezultati ovog istraživanja doprinijeće definisanju kvaliteta i aromatskog profila vina dobijenog fermentacijom prirodnim kvascima koji se nalaze na grožđu. Istraživanje će ukazati na uticaj *Saccharomyces* i *ne-Saccharomyces* kvasaca na sadržaj ispitivanih isparljivih jedinjenja koja doprinose aromi vina. Takođe, očekuje se da će rezultati pružiti informacije o razvoju hemijskih jedinjenja koja čine aromu vina kod četiri različite sorte u toku fermentacije. Na taj način će se dobiti informacije o evoluciji i razvoju pojedinih aroma u procesu proizvodnje sortnih vina Vranac, Kratošija, Cabernet sauvignon i Marselan. U toku istraživanja ispitaće se i uticaj bakterija MLF-a na sadržaj isparljivih jedinjenja koja doprinose aromi, ali i na senzorni profil vina. Rezultati istraživanja će ukazati na interakcije *Saccharomyces*, *ne-Saccharomyces* kvasaca i bakterija mliječne kiseline, i kako njihove interakcije utiču na aromu vina i ukus.

Istraživanje aromatskog profila autohtonih crnogorskih sorti Vranca i i Kratošije još uvijek nije rađeno, tako da će rezultati dati značajan doprinos boljem upoznavanju potencijala naših sorti. Rezultati dobijeni istraživanjem hemijskih jedinjenja koja učestvuju u formiranju arome vina kod introdukovanih sorti Cabernet sauvignon i Marselan u agroekološkim uslovima Podgoričkog subregiona, moguće će biti uporediti sa postojećim literaturnim podacima o ovim sortama, a samim tim o uticaju terroir-a na aromatski profil.

Imajući u vidu da je sorta Vranac potomak sorte Kratošija, a sorta Marselan potomak sorte Cabernet sauvignon, rezultati analize aromatskog profila ukazaće da moguće sličnosti vezane za potomstvo sorti.

Rezultati senzorne analize dobijenih vina biće od praktičnog značaja i od interesa za poboljšanje kvaliteta vina, ali i za moguća rješenja na modifikacije karaktera vina koje nastaju usljed sve većeg sadržaja alkohola što je posljedica klimatskih promjena.

Dobijeni rezultati će biti publikovani u međunarodnim časopisima sa impakt faktorom. Očekuje se da će iz ove doktorske disertacije proisteći nekoliko naučnih publikacija, kao i veći broj saopštenja na nacionalnim ili međunarodnim naučnim skupovima.

Spisak objavljenih radova kandidata

Kandidat do sad nije imao objavljenih radova na ovu temu. Eksperiment je u toku i pisanje prvog rada će početi u toku sledeće godine, dok će preliminarni rezultati biti prezentovani na jednom od budućih naučnih skupova.

Popis literature

1. Raičević, D., Pajovic-Šćepanović, R., Mijović, S. & Popović, T. Phenolic compounds of red wines in Podgorica subregion (Montenegro). *Agriculture and Forestry*, 61(4), 359-368, 2015, DOI: 10.17707/AgricultForest.61.4.41.
2. Pajović-Šćepanović, R., Krstić, M., Savković, S., Raičević, D. & Popović, T. Wine quality in Montenegro. *Agriculture & Forestry*, 62(3), 223-244, 2016, doi:10.17707/AgricultForest.62.3.19.
3. Raičević, D., Božinović, Z., Petkov, M., Ivanova-Petropulos, V., Kodžulović, V., Mugoša M., Šućur, S. & Maraš, V. Polyphenolic content and sensory profile of Montenegrin Vranac wines produced with different oenological products and maceration, *Macedonian Journal of*

- Chemistry and Chemical Engineering, 36 (2), 229-238, 2017, doi: 10.20450/mjcc.2017.1145.
4. Pajović Šćepanović, R., Wendelin, S., Raičević, D., & Eder, R. Characterization of the phenolic profile of commercial Montenegrin red and white wines. *European Food Research and Technology*, 245, 2233–2245, 2019, doi:10.1007/s00217-019-03330-z.
 5. Raicevic, D., Popovic, T., Ivanova-Petropulos, V., Petreska Stanoeva J. & Maras V. HPLC-DAD-ESI/MS Monitoring of Stilbenes Content in Vranac Red Wines Produced with Traditional and Modern Fermentation Methods, *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 39 (1), 49–58. 2020, DOI: <https://doi.org/10.20450/mjcc.2020.1970>.
 6. V. Maraš, J. Tello, A. Gazivoda, M. Mugoša, M. Perišić, J. Raičević, N. Štajner, R. Ocete, V. Božović, T. Popović, E. García-Escudero, M. Grbić, J.M. Martínez-Zapater, J. Ibáñez (2020): Population genetic analysis in old Montenegrin vineyards reveals ancient ways currently active to generate diversity in *Vitis vinifera*. *Scientific Report*, 10, 15000, 2020, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71918-7>. IF: 3.998
 7. Belda, I.; Ruiz, J.; Beisert, B.; Navascués, E.; Marquina, D.; Calderón, F.; Rauhut, D.; Benito, S.; Santos, A. Influence of *Torulaspora delbrueckii* in Varietal Thiol (3-SH and 4-MSP) Release in Wine Sequential Fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 2017, 257, 183–191. [CrossRef] [PubMed]
 8. Savoi, S.; Wong, D.C.J.; Degu, A.; Herrera, J.C.; Bucchetti, B.; Peterlunger, E.; Fait, A.; Mattivi, F.; Castellarin, S.D. Multi-Omics and Integrated Network Analyses Reveal New Insights into the Systems Relationships between Metabolites, Structural Genes, and Transcriptional Regulators in Developing Grape Berries (*Vitis vinifera* L.) Exposed to Water Deficit. *Front. Plant Sci.* 2017, 8, 1124. [CrossRef]
 9. Hernandez-Orte, P.; Concejero, B.; Astrain, J.; Lacau, B.; Cacho, J.; Ferreira, V. Influence of Viticulture Practices on Grape Aroma Precursors and Their Relation with Wine Aroma. *J. Sci. Food Agric.* 2015, 95, 688–701. [CrossRef] [PubMed]
 10. Fragasso, M.; Antonacci, D.; Pati, S.; Tufariello, M.; Baiano, A.; Forleo, L.R.; Caputo, A.R.; Notte, E.L. Influence of Training System on Volatile and Sensory Profiles of Primitivo Grapes and Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 2012. [CrossRef]
 11. Mayr, C.M.; De Rosso, M.; Dalla Vedova, A.; Flamini, R. High-Resolution Mass Spectrometry Identification of Secondary Metabolites in Four Red Grape Varieties Potentially Useful as Traceability Markers of Wines. *Beverages* 2018, 4, 74. [CrossRef]
 12. Beckner Whitener, M.E.; Carlin, S.; Jacobson, D.; Weighill, D.; Divol, B.; Conterno, L.; Du Toit, M.; Vrhovsek, U. Early Fermentation Volatile Metabolite Profile of Non-Saccharomyces Yeasts in Red and White Grape Must: A Targeted Approach. *LWT-Food Sci. Technol.* 2015, 64, 412–422. [CrossRef]
 13. Berbegal, C.; Spano, G.; Tristezza, M.; Grieco, F.; Capozzi, V. Microbial Resources and Innovation in the Wine Production Sector. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2017, 38, 156–166. [CrossRef]
 14. Mateo, J.J.; Maicas, S. Application of Non-Saccharomyces Yeasts to Wine-Making Process. *Fermentation* 2016, 2, 14. [CrossRef]
 15. Morata, A.; Escott, C.; Bañuelos, M.A.; Loira, I.; del Fresno, J.M.; González, C.; Suárez-Lepe, J.A. Contribution of Non-Saccharomyces Yeasts to Wine Freshness. A Review. *Biomolecules* 2019, 10, 34. [CrossRef] [PubMed]
 16. Pretorius, I.S. Tasting the Terroir of Wine Yeast Innovation. *FEMS Yeast Res.* 2020, 20. [CrossRef]
 17. Tufariello, M.; Capozzi, V.; Spano, G.; Cantele, G.; Venerito, P.; Mita, G.; Grieco, F. Effect of Co-Inoculation of *Candida zemplinina*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus*

- plantarum for the Industrial Production of Negroamaro Wine in Apulia (Southern Italy). *Microorganisms* 2020, 8, 726. [CrossRef]
18. Tufariello, M.; Fragasso, M.; Pico, J.; Panighel, A.; Castellarin, S.; Flamini, R.; Grieco, F. Influence of Non-Saccharomyces on Wine Chemistry: A Focus on Aroma-Related Compounds. *Molecules* 2021, 26
 19. Du Plessis, H.; Du Toit, M.; Nieuwoudt, H.; Van der Rijst, M.; Kidd, M.; Jolly, N. Effect of Saccharomyces, Non-Saccharomyces Yeasts and Malolactic Fermentation Strategies on Fermentation Kinetics and Flavor of Shiraz Wines. *Fermentation* 2017, 3, 64. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040064>
 20. Tristezza, M.; Tufariello, M.; Capozzi, V.; Spano, G.; Mita, G.; Grieco, F. The Oenological Potential of *Hanseniaspora uvarum* in Simultaneous and Sequential Co-Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* for Industrial Wine Production. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 670. [CrossRef] [PubMed]
 21. Comitini, F.; Capece, A.; Ciani, M.; Romano, P. New Insights on the Use of Wine Yeasts. *Curr. Opin. Food Sci.* 2017, 13, 44–49. [CrossRef]
 22. Jolly, N.P.; Augustyn, O.P.H.; Pretorius, I.S. The Role and Use of Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 2006, 27, 15–38. [CrossRef]
 23. Morata, A.; Escott, C.; Loira, I.; Del Fresno, J.M.; González, C.; Suárez-Lepe, J.A. Influence of Saccharomyces and Non-Saccharomyces Yeasts in the Formation of Pyranoanthocyanins and Polymeric Pigments during Red Wine Making. *Molecules* 2019, 24, 4490. [CrossRef] [PubMed]
 24. Morata, A.; Loira, I.; Tesfaye, W.; Bañuelos, M.A.; González, C.; Suárez Lepe, J.A. *Lachancea thermotolerans* Applications in Wine Technology. *Fermentation* 2018, 4, 53. [CrossRef]
 25. Canonico, L.; Solomon, M.; Comitini, F.; Ciani, M.; Varela, C. Volatile Profile of Reduced Alcohol Wines Fermented with Selected Non-Saccharomyces Yeasts under Different Aeration Conditions. *Food Microbiol.* 2019, 84, 103247. [CrossRef]
 26. Ebeler, S.E.; Thorngate, J.H. Wine Chemistry and Flavor: Looking into the Crystal Glass. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 8098–8108. [CrossRef]
 27. Alessandrini, M.; Battista, F.; Panighel, A.; Flamini, R.; Tomasi, D. Effect of Pre-Bloom Leaf Removal on Grape Aroma Composition and Wine Sensory Profile of Semillon Cultivar. *J. Sci. Food Agric.* 2018, 98, 1674–1684. [CrossRef] [PubMed]
 28. Benito, S. The Impact of *Torulaspora delbrueckii* Yeast in Winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018, 102, 3081–3094. [CrossRef] [PubMed]
 29. King, A.; Richard Dickinson, J. Biotransformation of Monoterpene Alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast Chichester Engl.* 2000, 16, 499–506. [CrossRef]
 30. Flamini, R.; Rosso, M.D.; Panighel, A.; Vedova, A.D.; Marchi, F.D.; Bavaresco, L. Profiling of Grape Monoterpene Glycosides (Aroma Precursors) by Ultra-High Performance-Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (UHPLC/QTOF). *J. Mass Spectrom.* 2014, 49, 1214–1222. [CrossRef] [PubMed]
 31. Malićanin, M.; Danilović, B.; Cvetković, D.; Stamenković-Stojanović, S.; Nikolić, N.; Lazić, M.; Karambegović, I. Modulation of Aroma and Sensory Properties of Prokupac Wines by a Bacillus-based Preparation Applied to Grape Prior to Harvest. *S.Afr.J.Enol.Vitic.* 2020, 41,2
 32. Karabegović, I., Malićanin, M., Danilović, B., Stanojević, J., Stamenković Stojanović, S., Nikolić, N., & Lazić, M. Potential of non-Saccharomyces yeast for improving the aroma and sensory profile of Prokupac red wine. *OENO One* 2021, 55(2), 181–195. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.2.3859>
 33. Jeromel, A., Kovačević Ganić, K., Mihaljević Žulj, M., Maslek, M., Puhelek, I., & Jagatić

<p>Korenika, A. M. Biogenic amine production during spontaneous and inoculated MLF of Zweigelt Wines. <i>Agriculturae Conspectus Scientificus</i> 2018, 83(3), 239–242. https://hrcak.srce.hr/205863.</p> <p>34. Moreno-Arribas, M.V., Smit, A.Y. & du Toit, M. Biogenic amines and the winemaking process. In <i>Understanding and Managing Wine Quality and Safety 2010</i>; Reynolds, A.G., Ed.; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, UK</p>		
SAGLASNOST PREDLOŽENOG/IH MENTORA I DOKTORANDA SA PRIJAVOM		
Odgovorno potvrđujem da sam saglasan sa temom koja se prijavljuje.		
Prvi mentor	doc. dr Danijela Raičević	<i>D. Raičević</i>
Drugi mentor		
Doktorand	M.Sc. Jovana Kojić	<i>J. Kojić</i>
IZJAVA		
Odgovorno izjavljujem da doktorsku disertaciju sa istom temom nisam prijavio/la ni na jednom drugom fakultetu.		
<p>U Podgorici, 01.12.2022.</p> <p align="right"><i>J. Kojić</i></p>		