

Dirigovanje simfonijom vina uz pomoć proučavanja genoma (genomike) kvasca

Naslov originala: Conducting Wine Symphonics with the Aid of Yeast Genomics

Izvor: <https://www.mdpi.com/>

Objavljeno: 19.12.2016. Macquarie University, Sydney, Australia

Obrada slika: Dijana Pantić

Prevod: Dragutin Mijatović

Ključne riječi: *Yeast, Saccharomyces, wine, alcohol, aroma, hybridisation, mutagenesis, genetic engineering or genome engineering techniques*

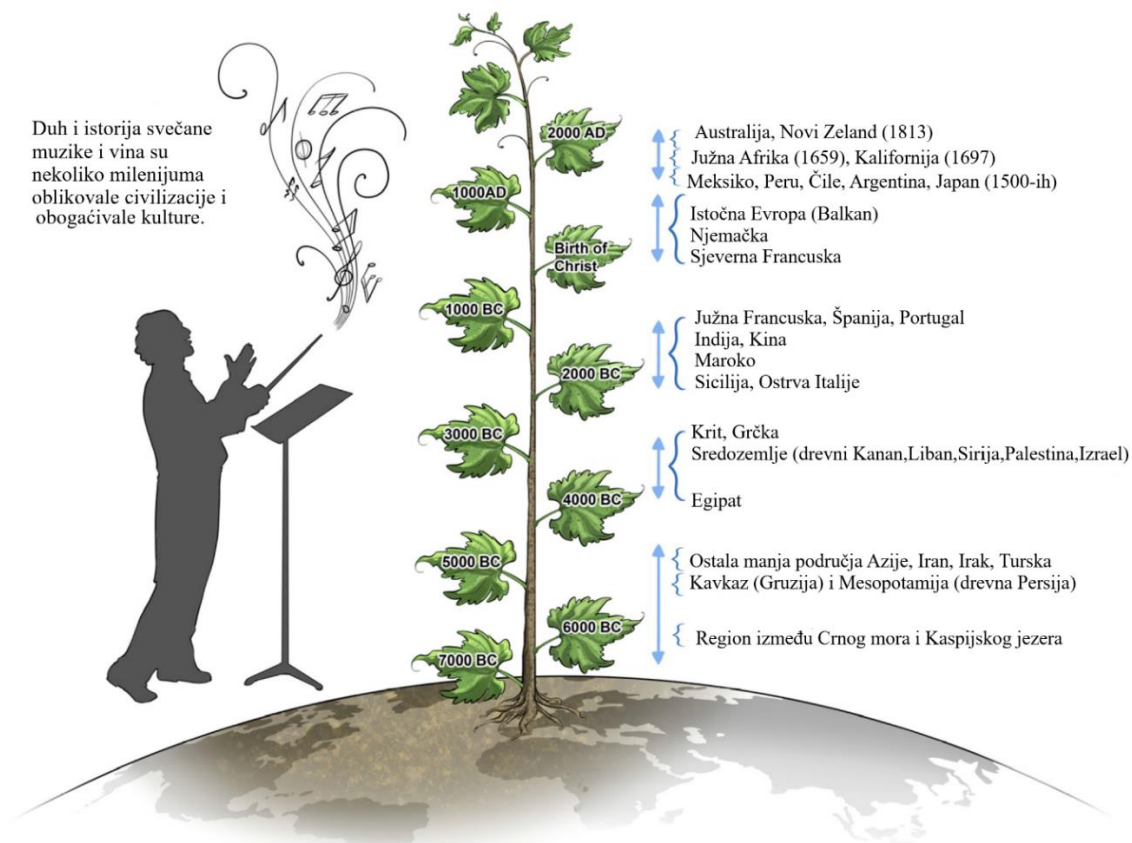
Rezime: Za savršeno balansirano vino može se reći da stvara simfoniju u ustima. Da bi se postiglo uzvišeno, kako u vinu, tako i u muzici, potrebna je mašta i iskusna orkestracija umjetničkog zanata. Inventivnost za vino počinje u vinogradu. Slično kompozitoru muzike, vinogradar proizvodi grožđe kroz mnoštvo specifikacija kako bi postigao kvalitetan rezultat. Različite sorte grožđa *Vitis vinifera* omogućavaju stvaranje vina različitih žanrova.

Slično muzičkom dirigentu, vinar odlučuje koji će žanr stvarati i razmatra resurse potrebne za ostvarenje potencijala grožđa. Primarno razmatranje je kvasac: da li treba inokulisati sok od grožđa ili ga prepustiti "divljim kvascima"; da li treba inokulisati specifičnim sojem *Saccharomyces* ili kombinacijom sojeva *Saccharomyces*; ili da li da nastavite sa ne-*Saccharomyces* vrstama? Dok različiti kvasci *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* obavljaju svoju ulogu tokom fermentacije, učinak nije završen sve dok „debeli dama“ (*S. cerevisiae*) nije otpjevala (groždani šećer je fermentisan do određene suvoće i alkoholna fermentacija je završena). Da li je vino harmonično ili ne harmonično? Hoće li potrošač tražiti još i ponoviti kupovinu?

Razumijevanje potreba potrošača omogućava vinogradarima da organizuju različite simfonije (stilove vina) koristeći jednostruke ili višestruke fermentacije (kvasce). Neki potrošači će izabrati zvukove filharmonijskog orkestra koji se sastoji od velikog broja raznovrsnih instrumentalista (kao što je slučaj sa vinom nastalim spontanom fermentacijom); neki će radije slušati manji ansambl (u slučaju vina proizvedenog upotrebom odabrane grupe ne-*Saccharomyces* i *Saccharomyces* kvasca); a drugi će favorizovati dobro poznati i pouzdani superzvučni sopran (*Saccharomyces cerevisiae*). Ali šta ako digitalni muzički sintisajzer - kao što je sintetički kvasac - postane dostupan da može proizvesti bilo koji muzički žanr sa najčistijim zvukom dodiranjem nekoliko tipki? Hoće li sintisajzer pokvariti karakter muzike i dovesti do gubitka mnogo hvaljene romantične mistike? Ili će muzički sintisajzeri podržati kompozitore i dirigente da kreiraju nove kompozicije i još kvalitetnije performanse koje će oduševiti publiku? Ovaj članak istražuje ova i druga relevantna pitanja u kontekstu proizvodnje vina i uloge koju kvasac i njegova genomika igraju u poboljšanju kvaliteta vina.

1. Povezivanje umjetnosti Bacha i zanata Bacchusa

Muzika i vino nalaze se u svakoj poznatoj kulturi - prošlosti i sadašnjosti - koje se značajno razlikuju između mjesta i vremena, i oblikuju civilizacije na vrlo prepoznatljive načine širom svijeta. Muzika je možda bila prisutna u populaciji predaka prije njihovog lutanja širom planete prije 50.000 godina, dok se istorija vinogradarstva proteže na gotovo 7.000 godina prije Hrista (*slika 1*). Tokom vijekova, istorija i duh muzike i vina spajali su se kako bi spojili umjetnost i zanat, i uveliko obogatili način na koji živimo danas.



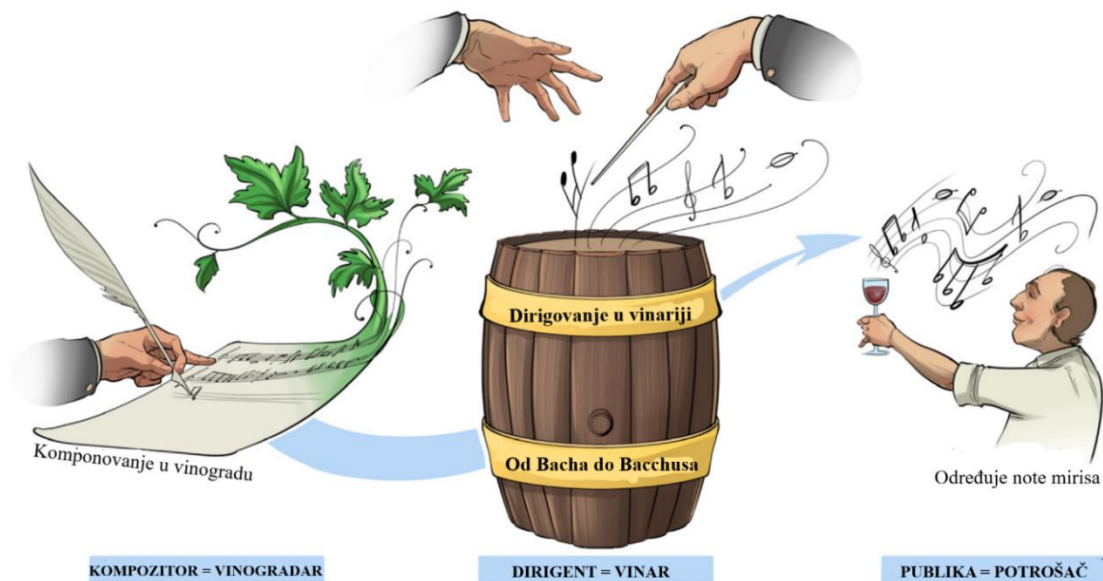
Slika 1. Širenje proizvodnje vina od plemenitih sorti grožđa (*Vitis vinifera*) iz prednje Azije (oko 6.500 godina prije Hrista) u druge dijelove svijeta. (Prilagođeno prema literaturnom izvoru [1]).

Umjetnost komponovanja i dirigovanja muzikom, kao i proizvodnja grožđa i proizvodnja vina smatraju se izrazima ljudske kreativnosti i mašte – te je i povlačenje metaforičnih paralela između muzike i vina sasvim prirodno (*slika 2*).

Beethoven je jednom rekao „muzika je vino koje nadahnjuje nove generacije koje dolaze“, i nastavio je opisivati sebe kao „Bacchus-a koji proizvodi slavno vino za čovječanstvo i čini ih duhovno pijanim“.

Nikada nećemo znati da li bi se Beethoven složio sa stavom da je, na primjer, Bachova umjetnost bila više muzički izražaj i primjena njegove mašte, osjećaja, misli i ideja dok se Bacchus-ov zanat više oslanjao na naučenu vještinu i iskustvo u stvaranju opipljivog proizvoda zvanog vino.

Ono što znamo je, međutim, da nam i zvuk muzike i okus vina pružaju zadovoljstvo na poseban čulni način. Sada se pojavljuju naučni dokazi koji pokazuju da su pravi ljubitelji vina sposobni da pouzdano povežu određena vina sa određenim muzičkim djelima [2,3,4].



Slika 2. Metaforička paralela između muzike i vina kao izraza ljudske kreativnosti i mašte. Vinogradar sastavlja note o vinu u vinogradu dok ih vinar interpretira i prevodi u originalnu kompoziciju sa svojim izabranim instrumentima u vinariji sa jednim ciljem da ispuni očekivanja svoje publike na specifično ciljanom potrošačkom tržištu.

Slično kompozitoru koji isprepliće elemente da bi stvorio originalnu muziku - melodiju, skrivenu harmoniju ili progresiju akorda, a ponekad i tekstove - vinogradar sastavlja vinske note u vinogradu. Primjenjujući svoj zanat na ono što priroda i zemlja već daje vinogradu, vinogradari njeguju svoje čokote kako bi proizveli grožđe - “note” za razne tipove i stilove vina.

Uvažavajući ono što je kompozitor napisao, dirigent ima slobodu da kreativno orkestrira originalnu kompoziciju svojim izborom instrumenata i da preuredi tempo kako bi zasitio muzički apetit svoje publike.

U vinariji vinar poštuje rezultat koji je ostvario vinogradar, i jedinstveno interpretira kompozicije grožđa provodeći različite aranžmane odabranih postupaka: pred fermentacija, sojevi kvasaca, uslovi fermentacije, tehnologije nakon fermentacije, materijal za pakovanje, kao i strategiju marketinga i maloprodaje za postizanje vlastite vizije.

U manjim operativnim postavkama, međusobno povezani izbori napravljeni na svakom koraku u lancu vrijednosti od grožđa do čaše vina mogu biti jednostavniji jer vinar može biti i kompozitor u vinogradu i dirigent u vinariji.

Dobra muzika i dobro vino zadovoljavaju različita čula na sličan način. Otvaranje boce vina u prijatnom društvu izaziva slično iskustvo i uvažavanje kao prisustvovanje koncertu i slušanje poznatog muzičkog djela, čak i kada postoji neizvjesnost da dvije predstave nikada neće biti iste (slika 3).

Naše individualne preferencije za određene muzičke žanrove i stilove vina se vremenom mijenjaju. Muzičari i vinari dobro znaju da, da bi zadržali svoju publiku i potrošače uključene u proces, njihova umjetnost i zanatstvo takođe treba da se razvija i napreduje kroz vrijeme.

Neke od ovih promjena će biti posljedica povlačenja sa tržištu, a druge će biti ugrožene silama novih tehnologija (slika 4). Rezultat ovih dinamičnih, trendovskih sila često pretvaraju današnju inovaciju u sutrašnju tradiciju. Međutim, sofisticirana publika i potrošači obično prihvataju uzbuđenje novih trendova, a da pritom ne gube svoju zahvalnost za šarm bezvremenskih klasika.

IZGLED

- Boja
- Nijansa
- Pjenušav
- Zamućen

- Maglovit
- Talog

AROMA

- Mlado svježe vino

BUKE

- Starije, složenije vino

UKUS

- Sladak
- Kiseo
- Gorak
- Slan
- Umami



NEPCE

- Proba (okus)
- Dodir (osjećaj usta)

SASTAV

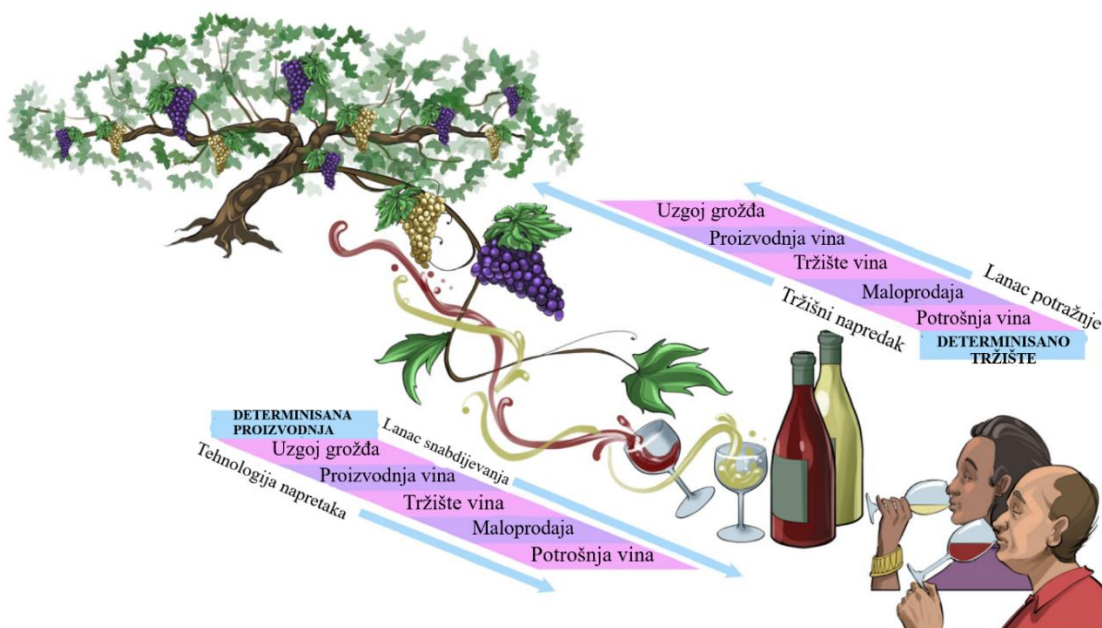
- Kiseline
- Šećer
- Gorčina
- Tanin
- Alkohol
- Vlažnost nepca
- Trajnost na nepcu

- Osjećaj usta
- Pjenušavost
- Voćni intezitet

SLOŽENOST

- Raznovrsnost
- Slojevi okusa

Slika 3. Različiti aspekti senzorskog kvaliteta vina. Slušanje muzike i ispijanje vina u prijatnim društvenim okruženjima očigledno manifestuju senzualna iskustva. Četiri čula su uključena u definisanje organoleptičkog kvaliteta vina: vid, miris, okus i dodir. Vinski žargon se koristi za opisivanje onoga što degustator vino osjeća (kao što je sažeto opisano u izvoru [5]): izgled (vid - npr. zamagljeno, maglovito, talog na dnu boce, dubina boje, nijansa, mjehurići), nos (miris) - ili aroma i buket) i nepce (okus i dodir - okus i osećaj usta). Termin aroma se obično koristi za opisivanje mirisa mladog, svježeg vina; **primarne arome** potiču iz fermentacije - tipično mladenačke sa svježim notama svježeg voća. Buket je termin za starije vino, manje svježeg, ali složenije; **sekundarne arome** potiču od sazrijevanja u hrastovom buretu, a **tercijarne arome** nastaju tokom starenja i čuvanja u flaši - razvijeno voće pokazuje više starosti, sa dinstanim ili sušenim voćem i drugim mirisima koji takođe traže pažnju. Pojam okus odnosi se na slatkoću, kiselost, gorčinu, slanost i okus umamija. Osjećaj usta odnosi se na tijelo i teksturu vina pod uticajem faktora kao što su alkoholna jačina (osjećaj toplote) i tanini (osjećaj suvosti). Sastav vina uključuje kiseline, šećer, gorčinu (povremeno), tanine (u crnom vinu), alkohol, vlažnost i trajnost na nepcu, osećaj usta, pjenu (pjenušavo vino), kao i intenzitet aroma i okusa voća i složenost (raznolikost i slojevi okusa).



Slika 4. Lanac vrijednosti u proizvodnji vina

Tradicionalni proizvodni pogled na lanac snabdevanja je u velikoj mjeri zamijenjen savremenijim tržišno orijentisanim pristupom u scenariju lanca potražnje. Ova promjena paradigme u vinskoj industriji stavila je vino kao proizvod u središte arene između sila tržišnog povlačenja i napretka tehnologije, gdje tradicija i inovacije moraju koegzistirati [6]. Savremeni potrošači traže vina koja su prijatna po svim senzornim aspektima, zdrava i proizvedena na ekološki održiv način i koja se prilagođavaju standardima neodređene mističnosti vina. U globalnoj ekonomiji u kojoj se kvalitet definiše kao zadovoljstvo „održivog potrošača i običnog potrošača“, to je borba za isporuku vina koja ispunjavaju ta očekivanja po konkurentnim odnosima kvalitet / cijena, dok ostaju profitabilna. Na žestoko konkurentnom tržištu sa stalno promjenjivim preferencijama potrošača, proizvođači moraju stalno biti u potrazi za načinima predviđanja novih tržišnih trendova i biti u mogućnosti isporučiti proizvode koji na vrijeme ispunjavaju očekivanja potrošača.

Veliki muzičari i vinari su u mogućnosti da pravovremeno interpretiraju dinamiku ovih međusobno povezanih faktora i da pravilno procijene kakve će biti buduće preferencije svoje ciljane publike i potrošačkih tržišta.

Uz vino, precizno tržišno predviđanje i fleksibilnost, zahtijevaju majstorsku orkestraciju harmoničnog spoja umjetničke intuicije, vještine majstora i logike naučnika - a to održava publiku na okupu, sa stalnim ovacijama i mogućnost prodaje vina na globalnom tržištu. U ovom kontekstu, ovaj članak nastoji osvijetliti predstave o fermentaciji klasičnih i trendovskih kvasaca u vinariji, i privući zvuk buduće muzike iz istraživačke laboratorije.

2. Prevođenje kompozicija grožđa u čarobne i karakteristične vinske žanrove

Slušajući nastup filharmonije, publika cijeni kvalitet i harmoniju mnoštva prijatnih zvukova, kao i osjećaj inspirisanog čitavim iskustvom. To se ne razlikuje od očekivanja i preferencija onih koji vole vino, koji često koriste pojmove kvaliteta i vrijednosti koji se odnose na određenu sortu, određeno vino (*slika 5*).

Potrošaču koji upoređuje različita vina za kupovinu, pojam kvaliteta se odnosi na „suštinski“ kvalitet vina, što znači kako ga vino zadovoljava po izgledu, mirisu i na nepcima, kao i sagledavanja vrijednosti vina [7].

Kada potrošači koriste termin vrijednost, ona se obično odnosi i na unutrašnju vrijednost i na sliku vina u odnosu na cijenu. Imidž proizvoda zavisi od toga koje se vino stavlja na tržište, porijeklo i regionalnost vina, koje su ekološki prihvatljive prakse vinarije, sa koliko je medalja vino nagrađeno, kako poznati somelijeri i drugi uticajni ljudi ocjenjuju vino i cijenu.

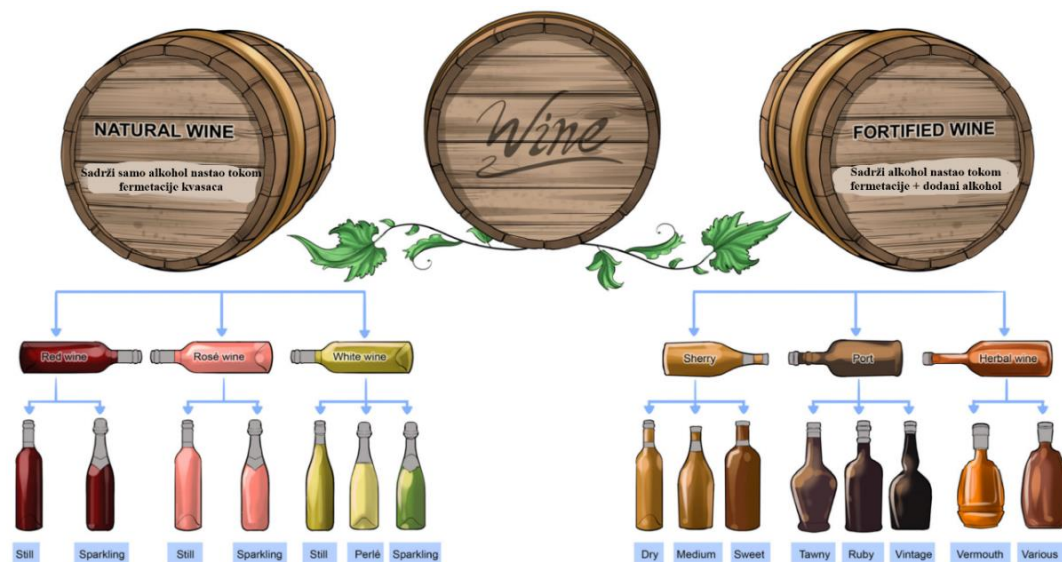
Potrošači će smatrati vino visokom vrijednošću ako je proizvod senzorno ugodan i prepoznatljiv, a percipiran je kao visok u slici po konkurentnoj cijeni [7].



Slika 5. Stablo kvaliteta sorti i sortnih vina [8]. U većini potrošačkih tržišta, sorte „Big Six-Velikih Šest“: Cabernet Sauvignon, Merlot, Pinot Noir, Chardonnay, Riesling i Sauvignon Blanc - smatraju se „plemenitim“ sortama od kojih se proizvode najtraženija sortna vina. Jedan nivo niže su tzv. Klasične sorte grožđa koje uključuju crne sorte: Cabernet Franc, Nebbiolo, Sangiovese, Syrah (ili Shiraz), Tempranillo i Touriga Nacional te bijele sorte Chenin Blanc, Gewürztraminer, Semillon i Viognier. Kategorija kultivara ispod uopšteno se naziva "zanimljivim" sortama i postoji dugačak popis tih sorti. Imidž i jačina nekih od tih takozvanih 'zanimljivih' sorti čvrsto su povezani sa određenim zemljama i regijama proizvodnje vina, naprimjer, italijanska Barbera, čileanski Carmenère, argentinski Malbec, južnoafrički Pinotage, urugvajski Tannat i kalifornijski Zinfandel. Na kraju tu je i kraći spisak sorti koje se koriste za masovnu proizvodnju vina (Aire, Chasselas, Clairette, Malvasia, Trebbiano, Aramon, Lambrusco, itd.

Slično muzičkim entuzijastima - mladim i starim, muškim i ženskim - koji se veoma razlikuju po svojim željama za različitim muzičkim žanrovima, čula potrošača vina nisu jednako osjetljiva ili prilagođena suptilnom asortimanu promjenjivih senzacija izazvanih različitim tipovima i stilovima vina (slika 6).

Neke od raznolikosti u senzornoj percepciji i preferencijama za različita vina među pojedincima i populacijama su kulturne - neke genetske i neke naučene - a neke preferencije su takođe pod uticajem pola, starosti i mode [5].



Slika 6. Opšti raspon tipova vina [9]. „Prirodno“ vino se uglavnom odnosi na tip vina koji sadrži alkohol koji nastaje tokom kvašćeve fermentacije šećera, dok se „jako“ vino odnosi na tip vina koje sadrže alkohol koji nastaje tokom fermentacije kvasca kao i dodat alkohol. Kategorija „prirodnog“ vina uključuje crno, rosé i bijelo vino koje može biti „mirno“ ili „pjenušavo“. "Jaki" tipovi vina uključuju Sherry, Port i nekoliko tipova biljnih vina, kao što je Vermouth.

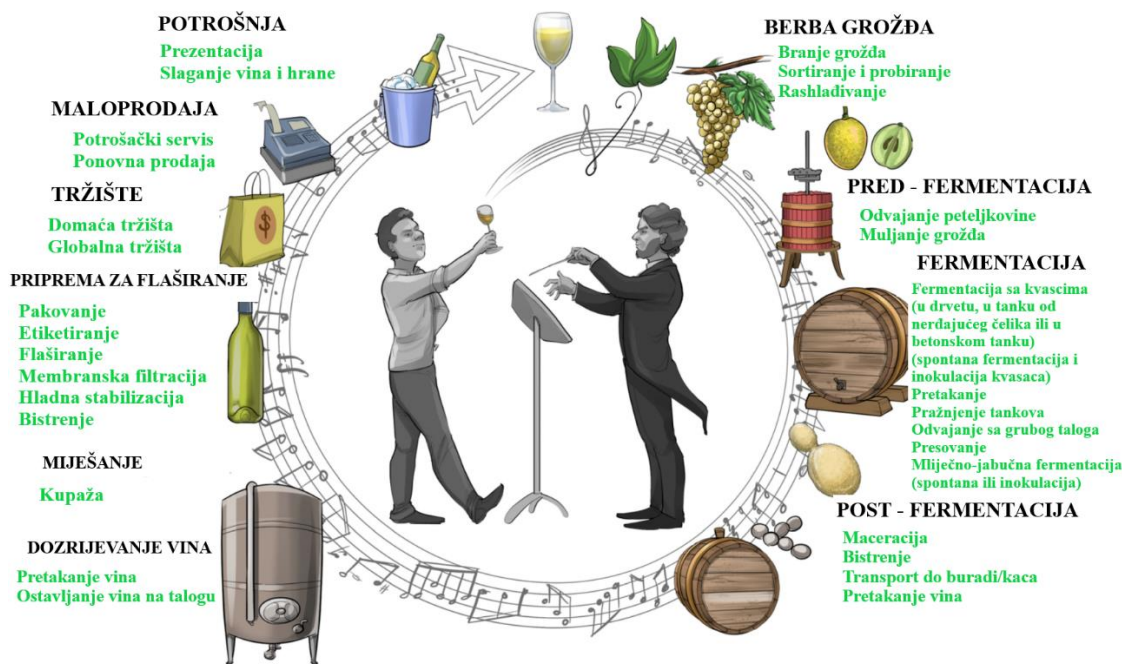
U proteklih 35 godina, globalna vinska industrija proizvodi oko 15% više vina od godišnje potrošnje i bori se da zadrži svoj udio od 11% na globalnom tržištu alkoholnih pića [8]. Po obimu pivo zauzima oko 80% tržišta alkoholnih pića, a alkoholna pića čine 9%. Vrijednost proizvodnje od 32 milijarde boca (ili ekvivalenta) vina koje se prodaju svake godine je oko 100 milijardi USD, što predstavlja oko četvrtinu ukupne vrijednosti globalnog tržišta alkoholnih pića [8].

Sve veći jaz između proizvodnje vina i potrošnje predstavlja stvarnu prijetnju profitabilnosti mnogih vinskih preduzeća u svim zemljama proizvođačima vina. Nije iznenađujuće da ovaj pritisak na tržištu pokreće vinogradare da teže ka dubljem razumijevanju i uvidu u očekivanja i preferencije pojedinaca i populacije na svojim ciljanim tržištima, tako da mogu dostaviti željena i prepoznatljiva vina u skladu sa potrebama potrošača.

Nije moguće orkestrirati privlačnu muziku iz loše komponovanog djela - slično, nemoguće je napraviti dobro vino od loše uzgojenog grožđa. Dakle, proces vinarstva zaista počinje u vinogradu sa optimalno zrelim grožđem na čokotu. Grožđe, kako se bere, sadrži potencijal vina, ali vinar ima ključnu ulogu u ostvarivanju tog potencijala u potpunosti.

Na svakom koraku procesa proizvodnje, proizvođač vina je dužan donositi dobro informisane, pronicljive odluke o tome koja će tehnika, tehnologija i praksa najbolje voditi proces kako bi se ispunio potencijal grožđa i postigao unaprijed određeni ishod.

Postoji pet osnovnih faza u procesu proizvodnje vina: (I) berba grožđa, muljanje (drobljenje) i presanje; (II) fermentacija; (III) bistrenje, pretakanje i stabilizacija; (IV) sazrijevanje i starenje; i (V) flaširanje, etiketiranje i pakovanje (*slika 7*). Međutim, postoje i varijacije i odstupanja na putu koji omogućavaju vinogradarima da sami stave svoj pečat na proizvodni lanac, čineći tako njihovo vino jedinstvenim [10,11,12].



Slika 7. Glavni koraci u proizvodnji crnog i bijelog vina [13]. Neki koraci i njihov redoslijed razlikuju se između proizvodnje crnog i bijelog vina.

Berba grožđa. Određivanje vremena za berbu grožđa je prvi korak i tačka odlučivanja u procesu proizvodnje vina [12]. Ova odluka je pod jakim uticajem vremenskih uslova i zahtjeva nauke (tj. hemijske analize) i staromodne degustacije grožđa.

Da li se grožđe bere ručno ili mašinski, u velikoj mjeri određuje kiselost, slatkoću, alkoholnu snagu, teksturu tanina, trpkost i okus vina [10]. Kada se grožđe dostavi u vinariju, sortiraju se grozdovi, a uklanja se trulo ili nedovoljno zrelo grožđe.

Drobljenje grožđa i presanje. Sledeći koraci uključuju uklanjanje peteljkovine, drobljenje (muljanje) i presanje (cijedenje) izmuljanog grožđa [12]. Tradicionalno gnječenje grožđa radničkim nogama uglavnom je zamijenjeno mehaničkim drobljenjem i presama grožđa „radi dobijanja šire“. Proizvodnja bijelog vina ne zahtijeva pokožicu bobice, sjemenke i peteljčice koje treba ukloniti odmah nakon drobljenja kako bi se spriječilo da neželjene boje i tanini dospiju u vinotokom fermentacije.

Proizvodnja crnog vina zahtijeva da, nakon drobljenja, pokožica bobice ostane u soku tokom procesa vinifikacije (fermentacije). Za vrijeme maceracije - vremenski period u kojem pokožica i sok od grožđa mogu međusobno djelovati - polifenolne materije koje čine antocijanini (pigmenti rastvorljivi u vodi), tanini i aktivna mirisna jedinjenja izlučuju se iz pokožice bobice, sjemenki i peteljkovine u širu, dajući crnom vinu njegovu boju, strukturu i aromu [11].

Početak spontane fermentacije se može odložiti hlađenjem kljuka - procesa koji se naziva "hladno potapanje" ili "hladna maceracija". Kratki periodi (obično ne duže od par dana) maceracije i hladno potapanje se takođe obavljaju za ograničeni raspon stilova bijelog vina, ali se ove prakse uglavnom primjenjuju u proizvodnji crnih vina.

U zavisnosti od sorte grožđa i željenog stila crvenog vina, dužina maceracije može se produžiti na period od nekoliko sedmica i jedna je od najuticajnijih mjera kontrole dostupnih vinaru da oblikuje stil krajnjeg proizvoda. Osim toga, način na koji se kljuk cijedi može značajno uticati na stil i kvalitet krajnjeg proizvoda.

Praksa presanja grožđa evoluirala je od tradicionalnog gnječanja grožđa nogama i presa sa košem do savremenih presa sa mjehurom kada se vazdušni jastuk puni vazduhom i nježno potiskuje grožđe prema unutrašnjem zidu perforiranog cilindra te serijskih ili kontinuiranih mehaničkih presa.

Grožđe će prvo biti "izmuljano", tako će se izdvojiti "samotok". Pod pritiskom u presi dolazi do odvajanja čvrstih dijelova (pokožice, mesa, sjemenki). „Preševina“ je obično inferiorna u pogledu kvaliteta u odnosu na „samotok“ i mnogo oporija [11].

U fazi drobljenja (muljanja, gnječanja) ili presanja, vinar može dodati više dodataka širi (za bijelo vino) ili kljuku (za crno vino) da koriguje sastav prije početka fermentacije. Ovi dodaci mogu uključivati kiseline ('zakiseljavanje-povećanje količine kiselina' u vrućim klimatskim područjima-sa manjkom kiselina u grožđu), šećer ('chaptalisation' u hladnim klimatskim regijama-sa manjkom šećera u grožđu), sumpor dioksid (kao antimikrobni i antioksidacijski agens) i askorbinsku kiselinu (kao antioksidant u proizvodnji bijelih vina).

Alkoholna i malolaktična (jabučno-mliječna) fermentacija. Alkoholna fermentacija se vrši ambijentalnim kvascem ("spontana fermentacija") ili dodatim kvascem ("inokulisana" fermentacija). Tokom ovog procesa, glavni groždani šećeri, glukoza i fruktoza se pretvaraju u etil alkohol (etanol) i ugljen dioksid (CO₂) anaerobnim metabolizmom (glikolizom) ćelija kvasca. Jedan molekul glukoze stvara dva molekula etanola i dva molekula ugljen dioksida, tj. $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$.

Alkoholna fermentacija koju pokreće kvasac je slična za bijelo i crveno vino, osim što se fermentacija crvenog vina odvija na nešto višoj temperaturi (18–30° C). Temperatura koja se

održava u fermentacionoj masi je glavni faktor koji određuje trajanje fermentacije - čak i više od početne koncentracije šećera, tipa kvasca, aeracije šire i količine mikro-hranjivih materija [10].

Tipično, fermentacija crvenog vina je završena u roku od nedelju dana, dok kod proizvodnje bijelih vina, koja često fermentišu na mnogo nižim temperaturama (12-18° C), fermentacija može da traje i nekoliko nedelja dok se vrenje ne završi do suvoće (to jest, kada su svi šećeri potrošeni u izgradnji alkohola). U zavisnosti od stila vina koje vinar nastoji postići, alkoholna fermentacija se obično obavlja u hrastovim buradima, velikim hrastovim kacama, otvorenim betonskim posudama i tankovima od nerđajućeg čelika [8].

Bez obzira na tip posude za fermentaciju, velika količina pokožice, zeleni dijelova i sjemenke u kljuku, u interakciji sa izlučivanjem ugljen dioksida tokom fermentacije, formira čvrstu masu (poznatu kao "kapa") koja pluta na površine posude za fermentaciju. Da bi se održao kontakt između čvrstih dijelova grožđa i soka, „kapa“ se redovno potapa u tečnost.

„Upravljanje kapom“ se može obaviti ručno („guranjem-na dolje“), mehanički (koristeći rotacione rezervoare) ili metodom prepumpavanja (pumpanje tečnosti sa dna posude preko „poklopca“).

Malolaktičke bakterije vode sekundarnu fermentaciju poznatu kao malolaktična fermentacija. Tokom ovog post-alkoholnog procesa fermentacije, jabučna kiselina se pretvara u mliječnu kiselinu (koja ima manju kiselost) i ugljen dioksid: $\text{COOH-CHOH-CH}_2\text{-COOH} \rightarrow \text{COOH-CHOH-CH}_3 + \text{CO}_2$. Malolaktička fermentacija je jednako prihvatljiva za sva crvena vina osim za najlakša crvena vina. Nasuprot tome, malolaktička fermentacija je neuobičajena u proizvodnji bijelog vina, osim za proizvodnju određenih stilova šardonea i pjenušavih vina. Pored svoje uloge u deacidifikaciji vina, malolaktička fermentacija može doprinijeti i mirisu, okusu i složenosti vina, kao i mikrobiološkoj stabilnosti vina (smanjenje rizika stvaranja gasa u flaširanim vinima).

Bistrenje i stabilizacija vina. Po završetku faze fermentacije, bistrenje počinje uklanjanjem suspendovanog i nerastvorljivog materijala (koji se naziva "lees-talog") kod mladih vina [10]. Talog uključuje višak tartarata, pektina i materija, kao što su proteini i mali broj mikrobnih ćelija (uključujući mrtve ćelije kvasca). Bistrenje i stabilizacija vina može se postići jednostavnim držanjem vina u podrumu sve dok se veće čestice ne slegnu (proces poznat kao "taloženje" ili "débouillage"). Nakon početnog „taloženja“, fini „talozi“ koji ostaju u posudi nedovršenog vina mogu se lagano miješati (proces poznat pod nazivom „batonnage“) prije konačnog „débouillage“, nakon čega slijedi odvajanje ili „pretakanje“ bistrog vina, gornjih slojeva od kompaktnog sloja čvrstih dijelova na dnu posude [8]. Ovaj proces se može ubrzati fizičkim metodama, kao što je hladna filtracija, centrifugiranje i flotacija, ili mnogo jeftinijim hemijskim procesom poznatim kao "finiranje-filtriranje". Hlađenje i hladna filtracija će smanjiti koncentraciju tartarata u mladim vinima prezasićenim u tartaratima do nivoa ispod koncentracije koji bi kasnije mogli formirati kristale u boci [11].

Svrha dodavanja preparata-sredstva za bistrenje (bistrenje enzimskih preparatima ili bentonitom-vulkanska glina) je da vino da omekša ili smanji oporost i / ili gorčinu; da se uklane proteini sposobni za stvaranje zamućenja; ili smanji boja adsorpcijom i taloženjem polimernih fenola i tanina. Sredstvo za bistrenje reaguje sa komponentama vina ili hemijski ili fizički, tako da se formira novi kompleks koji se može odvojiti od vina. Stepem koliko će se vino izbistriti i stabilizovati zavisice od cilja stila vinara: „svakodnevna“ vina se obično temeljnije pročišćavaju i stabilizuju, a s obzirom da postoji tržište za „nefiltrirana“ vina - neki potrošači to smatraju boljim kvalitetom jer prihvataju da se talog može polako formirati u bocama i vjeruju da manje stabilni sastojci pozitivno doprinose procesu starenja [11].

Sazrijevanje vina i starenje. Vremenski period tokom kojeg se vinom rukuje u podrumu ili vinariji obično se naziva „sazrijevanje“ vina (ponekad u kontaktu sa drvetom - hrastova burad - poseban stil vina, a ponekad u tankovima od nerđajućeg čelika za pjenušava bijela vina), dok je period u kojem se vino čuva u boci poznato kao 'starenje' vina [8,11].

Prije kupažiranja i flaširanja, većina vina se obično skladišti (čuva) nekoliko mjeseci u tankovima ili drvenoj buradi. Za vrijeme sazrijevanja u hrastovom buretu (koje se češće koristi za crvena nego za bijela vina), vino se podvrgava nizu složenih transformacija, uključujući kontrolisanu oksidaciju koja može rezultirati glatkijim i zaobljenijim vinima zbog polimerizacije tanina.

Hrastovina i njome indukovane transformacije mogu značajno promijeniti aromu, sastav i kvalitet krajnjeg proizvoda prenoseći niz okusa uključujući vanilu, aromu hrasta i nagorelu zadimljenost [7]. Nasuprot tome, „starenje“ vina u bocama uključuje samo suptilnu evoluciju vina.

Suprotno uvriježenom mišljenju, starost vina nije nužno vrlina - samo relativno mali podskup tipova vina ima koristi od produženog starenja u bocama [11]. Većina današnjih vina namijenjena je za konzumiranje u nekoliko godina poslije punjenja u flaše, bilo da su zatvorena plutanim čepom, metalnim čepom ili drugačije.

Uzgoj grožđa, proizvodnja vina, pakovanje i označavanje krajnjeg proizvoda samo su pola priče - još uvijek postoji mogućnost za mnogo grešaka između čaše i usana. Ako se marketing, maloprodaja ili prodaja vina ne uradi dobro, to je potencijalno slično tome da budete na pozornici bez publike koja bi aplaudirala za nastup.

Osim toga, iskusni vinari i trgovci vinima takođe znaju da se, čak i uz savršeno dobro promišljene strategije za promociju i prodaju vina, stvari još uvijek mogu okrenuti naglavačke zbog neočekivanih i naglih promjena na tržištu.

Na primjer, 17. novembra 1991., kada je američki televizijski voditelj, **Morley Safer**, iz popularnog informativnog programa **Sixty Minutes**, podigao čašu crvenog vina, pogledao u kameru i izjavio “odgovor na nisku stopu srčanih bolesti u Francuskoj [uprkos njihovoj neuobičajeno visokoj potrošnji sira i visokoj masnoći hrane, mesu visokog kolesterola] može se nalaziti u ovoj privlačnoj čaši “rođen je takozvani **Francuski paradoks**. Unutar jedne godine, potrošnja crvenog vina porasla je za više od 40% samo u SAD-u.

Drugi primjer je film iz 2004. godine pod naslovom **Sideways**. Kada je glavnog glumca, Miles (kojeg glumi Paul Giamatti) upitala atraktivna konobarica, Maya (koju je glumila Virginia Madsen) "Zašto ste tako zaljubljeni u Pinot?", njegov odgovor 60-ih je bio, Pinot Noir je sorta vinove loze koja se specifično gaji u svim predjelima svijeta ”i koliko su samo ljubitelji ovog vina zavisni o strpljivom radu odabrane grupe uzgajivača da u potpunosti izraze okuse grožđa, koji su“ najzanimljiviji i najsajjniji i uzbudljiviji i suptilniji i drevni na ovoj planeti ” Američki potrošači vina zaljubili su se u ovu sortu grožđa.

Prije ovog filma, Pinot Noir se smatrao sortom koja se teško uzgaja i vino koje je teško prodati. Sideways Effect je imao trenutni uticaj na prodaju vina Pinot Noir. To je dovelo do masovnog i brzog podizanja zasada sa sortom Pinot Noir, i odgovarajućim padom prodaje i vrijednosti sorte Merlot.

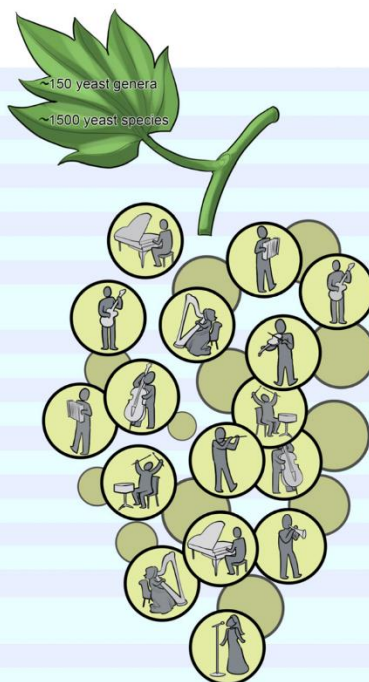
Nepredvidivi uticaj ovih dvaju primjera, francuskog paradoksa i efekta Sideways, pruža dragocene lekcije kako vinogradarima tako i trgovcima - uvijek očekujte neočekivano na tržištu i budite spremni da se suočite sa muzikom promjene preferencija potrošača.

3. Igranje mikrobioloških muzičkih stolica u bačvi za fermentaciju

Regrutovanje optimalnog broja talentovanih muzičara koji sviraju različite instrumente u orkestru je složen zadatak, koji zahtijeva mnogo vještine. Fermentacija je jednako složen ekološki i biohemijski proces koji uključuje dosljedan razvoj mikrobioloških vrsta, pod uticajem preovladavajućih uslova u vinogradima i vinarijama [13,14,15].

Grožđe i mošt (šira) prirodno su mješavina gljivica, kvasaca, bakterija, mikovirusa i bakteriofaga (slika 8). Groždani mošt je relativno potpun po sadržaju hranjivih materija; međutim, može podržati porast samo ograničenog broja mikrobnih vrsta. Vrsta i brojčana prisutnost autohtonih mikroba zavisi o faktorima kao što su: način berbe grožđa (ručno branje ili mašinsko), temperatura grožđa, transport od vinograda do vinarije (udaljenost / vrijeme, početna temperatura grožđa, temperatura vazduha, dodavanje sumpora), stanja grožđa (vrijeme, temperatura, dodavanje sumpora) i prethodne pripreme (higijena podruma, provjetranje, obrada enzimima, dodavanje sumora, metoda bistrenja, temperatura, inokulacija starter kulturama kvasca) [9].

SEKSUALNA FAZA	ASEKSUALNA FAZA	SINONIMI
<i>Citeromyces matritensis</i>	<i>Candida globosa</i>	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida famata</i>	<i>Pichia hansenii</i>
<i>Dekkera bruxellensis</i>	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	-
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	<i>Kloeckera apis</i>	-
<i>Hanseniaspora occidentalis</i>	<i>Kloeckera javanica</i>	-
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	<i>Kloeckera corticis</i>	-
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	-
<i>Hanseniaspora vineae</i>	<i>Kloeckera africana</i>	-
<i>Lachancea kluyveri</i>		<i>Saccharomyces kluyveri</i>
<i>Lachancea thermotolerans</i>		<i>Klyuveromyces thermotolerans</i> , <i>Candida dattlia</i>
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Candida pulcherrima</i>	<i>Torulopsis pucherrima</i>
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichai guilliermondii</i>
<i>Millierozyma farinosa</i>		<i>Pichia farinosa</i>
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Candida lambica</i>	-
<i>Pichia kluyveri</i>		<i>Hansenula kluyveri</i>
<i>Pichia membranifaciens</i>	<i>Candida valida</i>	-
<i>Pichia occidentalis</i>	<i>Candida sorbosa</i>	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
<i>Pichia terricola</i>		<i>Issatchenkia terricola</i>
<i>Saccharomyces ludwigii</i>		-
<i>Starmerella bombicola</i>	<i>Candida bombicola</i>	<i>Torulopsis bombicola</i>
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	<i>Candida colliculosa</i>	<i>Saccharomyces rosei</i>
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Pichia anomala</i> , <i>Hansenula anomala</i>
<i>Zygoascus meyeriae</i>	<i>Candida hellenica</i>	-
<i>Zygosaccharomyces baillii</i>		<i>Zygosaccharomyces baillii</i>
	<i>Candida zemplinina</i>	<i>Candida stellata</i>
	<i>Candida stellata</i>	<i>Torulopsis stellata</i>



Slika 8. Telemorfna (seksualna faza), anamorfna (aseksualna faza) i sinonimi nekih od ne-Saccharomyces kvasaca pronađenih na grožđu i vinu tokom fermentacije [13].

U zavisnosti od obilja i robusnosti mikrobnih vrsta u groždanom moštu, ovi organizmi mogu ili ne moraju preživjeti i / ili igrati aktivnu ulogu u fermentaciji pod određenim enološkim uslovima koje primjenjuje vinar. Slično dirigentu koji bira različite instrumentaliste potrebne za izvođenje različitih uloga u orkestru, vinar bira uslove fermentacije i prakse koji određuju koji će kvasci i bakterije biti dozvoljeni da pomognu oblikovanju vina za ciljani stil.

U suštini, cilj vinara je da se reguliše [pored prirodnog selektivnog stresa koji postoji u grožđanom moštu (osmotski pritisak koji vrši koncentracija visokog sadržaja šećera)] uslove fermentacije (nizak pH) i praktične radnje (dodavanje sumpordioksida) kako bi eliminisao bakterije kvarenja (bakterije sirćetne kiseline i određene vrste bakterija mliječne kiseline) i kvasaca (naprimjer *Brettanomyces*).

Selektivna fermentacija mora se dalje pojačavati kada se utvrde anaerobni uslovi u posudi ili tanku; određena hraniva se troše i povećana koncentracija etanola počinje da eliminiše mikrobiološke vrste osjetljive na alkohol. Ovakvi uslovi uvijek favorizuju vrste kvasaca sa najefikasnijim fermentacionim metabolizmom koji su u stanju da izdrže nizak pH, visoko-sulfitne i visoko-etanolne sredine. Sa svojim Crabtree-pozitivnim metabolizmom ugljenika, *Saccharomyces cerevisiae* je kvasac koji je najbolje opremljen da iskoristi ove restriktivne vinarske uslove - sposoban je da generiše energiju u fermentativnim uslovima i ograniči rast konkurentnih mikroorganizama tako što proizvodi inhibirajuće metabolite kao što su etanol i ugljen dioksid.

Nadmoćnost *S. cerevisiae* (autohtonih ili inokulisanih) tokom vrenja je stoga očekivana i poželjna [13]. Nažalost, nepoželjni kvasac, *Brettanomyces bruxellensis*, takođe može preživjeti teške uslove koji preovladavaju tokom fermentacije, kao i tokom sazrijevanja vina, posebno u hrastovim buradima duže vrijeme [16]. Ako je prisutan, ovaj kvasac kvarenja pretvara hidrokisicinamične kiseline u neugodno mirisne etilfenole, proizvodeći mirise u vinu, kao što su "metalni", "medicinski" i miris "seoskog dvorišta".

Najpraktičniji način da vinari dobiju prednost i da eliminišu nepoželjni *Brettanomyces* je da: primijene poznate higijenske prakse u podrumu; inokulišu mošt brzorazmnožavajućim sojevima *S. cerevisiae*; i održavaju optimalnu koncentraciju slobodnog sumpora u vinu koja bi, sa jedne strane, eliminisala *Brettanomyces* dok bi sa druge strane omogućila *S. cerevisiae* da brzo završi alkoholno vrenje [16].

A ako je poželjna malolaktična fermentacija, to bi takođe omogućilo *Oenococcus oeni* da pretvori jabučnu kiselinu u mliječnu kiselinu. Inokulacija šire sa robusnim *S. cerevisiae* sojem i primjena optimalne kombinacije niskog pH i visoke koncentracije slobodnog sumporadioksida (SO₂) ne bi samo ograničila *Brettanomyces* već bi i eliminisala nepoželjne bakterije sirćetne i mliječne kiseline. Ovakve prakse proizvodnje vina osigurale bi brze, pouzdane i bezbrižne fermentacije, kao i dosljedne, predvidive i poželjne okuse vina i kvalitet krajnjeg proizvoda (bez isparljivih kiselina ili prisutnosti drugih neočekivanih metabolita).

Jedina slaba strana široko korištene prakse inokulacije šire sa snažnim fermentacijskim sojem *S. cerevisiae* je da poželjni ne-*Saccharomyces* kvasci koji potječu iz grožđa imaju ograničenu mogućnost pozitivnog doprinosa složenosti vina [9]. Neki vinari preferiraju spontanu fermentaciju (koja se sastoji od mješovite i sekvencijske dominacije ne-*Saccharomyces* i *Saccharomyces* kvasaca).

Oni su spremni preuzeti rizik kontaminacije svog grožđanog mošta kvarenjima kvasaca jer smatraju da su autohtoni ne-*Saccharomyces* kvasci bitni za autentičnost njihovih vina time što daju željene i jasne superiorne regionalne karakteristike [13]. U tom kontekstu, izraz "ne-*Saccharomyces* kvasci" pojavio se kao labav kolokvijalni izraz koji se danas široko koristi u industriji vina za sve vrste kvasaca nađenih u grožđu osim *S. cerevisiae*, uz uslov da to uključuje samo kvasce sa pozitivnom ulogom u proizvodnji vina.

Tokom početnih faza fermentacije, ne-Saccharomyces kvasci su prisutni i aktivni u svim fermentirajućim medijima, bilo inokulisani ili ne (*slika 9*). Ovi ne-Saccharomyces kvasci se mogu svrstati u tri grupe: (I) kvasci koji su uglavnom aerobni, kao što su vrste *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia* i *Rhodoturulula*; (II) apikularni kvasci sa niskom fermentativnom aktivnošću, kao što su *Hanseniaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*), *Hanseniaspora guilliermondii* (*Kloeckera apis*) i *Hanseniaspora occidentalis* (*Kloeckera javanica*); i (III) kvasci sa fermentativnim metabolizmom, na primjer *Kluyveromyces marxianus* (*Candida kefir*), *Metschnikowia pulcherrima* (*Candida pulcherrima*), *Torulaspota delbrueckii* (*Candida colliculosa*) i *Zygosaccharomyces bailii* [13].



Slika 9. Sekvencijalno učešće različitih vrsta kvasca tokom fermentacije. Selektivni pritisci koji preovladavaju u širi grožđa (osmotski pritisak izazvan šećerima), uslovi fermentacije (temperatura i pH) i postupci proizvodnje vina (dodavanje sumpora) inhibiraju i / ili uklanjaju ne-Saccharomyces vrste kvasca tokom fermentacije. Selektivna priroda groždane šire postaje sve izraženija kada se ostvare anaerobni uslovi, nutrijenti se osiromaše, a porast nivoa alkohola počne da ograničava preživljavanje kvasaca osjetljivih na etanol.

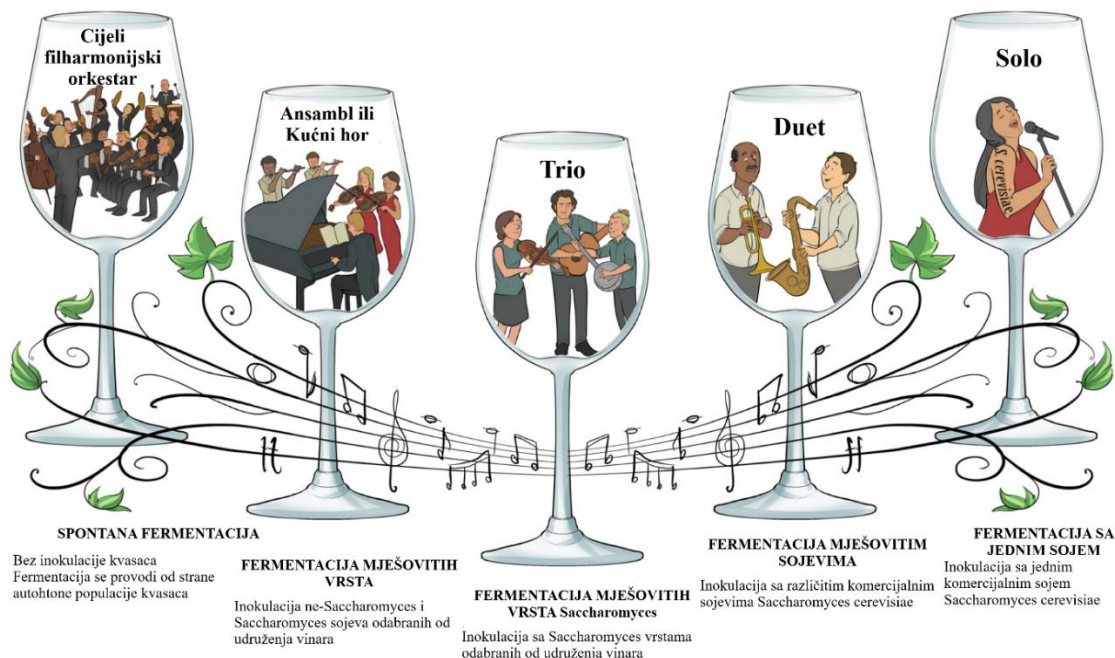
Tokom fermentacije, neki od ovih kvasaca su metabolički aktivni dok se ne postigne koncentracija etanola od 3% do 4%, dok drugi ostaju duže, dok *S. cerevisiae* konačno ne postigne apsolutnu dominaciju kako bi uspješno završio alkoholno vrenje.

Pored njihovog uticaja na rast bakterija i kvasaca *Saccharomyces*, neke od aktivnih aroma ne-Saccharomyces kvasaca mogu imati značajan uticaj na apsolutnu i relativnu koncentraciju aromatskih jedinjenja i kvalitet krajnjeg proizvoda [13].

4. Audicija Saccharomyces i Ne-Saccharomyces kvasaca za različite uloge u vinu

Voditelji orkestara uvijek nastoje pronaći nadarene izvođače i nove načine izvođenja autentičnih i zabavnih predstava. Slično tome, mnogi vinari koji se bave trendovima su uvijek u potrazi za novim sojevima u riznici ambijentalnih kvasaca u svojim vinogradima. Srećom, ovi pioniri više nisu suočeni samo sa izborom između spontane fermentacije i fermentacije uz inokulaciju sojem *S. cerevisiae* za brzo vrenje. Tokom protekle decenije, pojavila se treća opcija sa inokuliranim miješanim vrstama i sojevima kvasaca čime vinari mogu zadržati mikrobe kvarenja i još uvijek iskoristiti pozitivne doprinose kvasaca aktivnih ne-Saccharomyces i ne-cerevisiae kvasaca [17,18].

Uz dostupnost više od 250 različitih komercijalnih vinskih sojeva *S. cerevisiae*, neke kompanije za proizvodnju kvasca sada nude ne-cerevisiae i ne-Saccharomyces kvasce za inokulaciju vinskog kvasca. Pozitivni rezultati su prijavljeni sa *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia kluyveri*, *Lachancea thermotolerans* i *Candida / Metschnikowia pulcherrima* [13]. Kao što je opisano prije [13], vinari sada mogu voditi svoje prepoznatljive „vinske simfonije“ tako što će odabrati i inokulisati svoje kvasce različitim kombinacijama ovih od nedavno dostupnih ne-cerevisiae i ne-Saccharomyces kvasaca. Na taj način dobro informisani vinari takođe shvataju da ništa u posudi za fermentaciju nije gotovo sve dok debela gospođa - *S. cerevisiae* — ne otpjeva svoje i ne pretvori šećer iz grožđa do „suvoće“ i uspješno završi alkoholno vrenje. Prihvatajući muziku orkestriranu u vinariji, potrošači imaju širok spektar žanrova koje mogu odabrati. Neka publika možda više voli prijatne zvuke velikog filharmonijskog orkestra koji se sastoji od velikog broja raznovrsnih instrumentalista, kao što je slučaj sa vinom stvorenim spontanom fermentacijom. Druge publike bi mogle tražiti nešto drugo što je stvorio manji ansambl kvasaca inokuliranih u višestruke ili višestruke sojeve kvasaca, dok će drugi nastaviti kupovati svoje karte kako bi ih zabavljali poznati tekstovi pouzdane superzvijezde, *S. cerevisiae* (slika 10).



Slika 10. Širok raspon pristupa izboru kvasca za fermentaciju u proizvodnji vina.

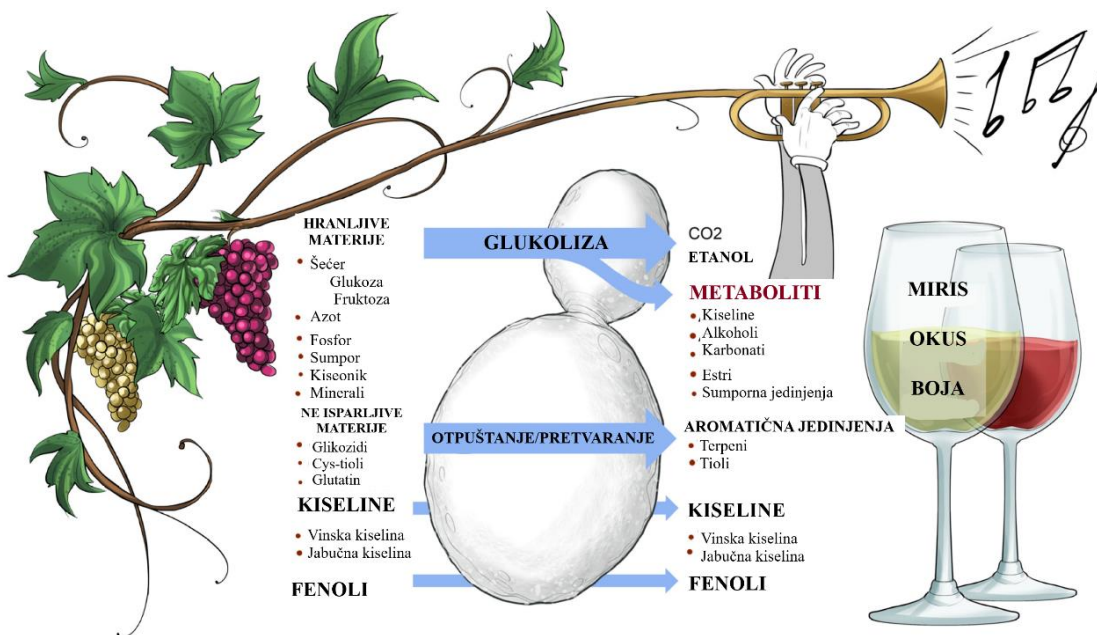
U spontanom fermentacijama, vinari u potpunosti zavise od prisustva kvasca koji potiče iz vinograda i vinarije koji fermentišu groždani šećer do "suvoće". Sa 'inokuliranim' kvascima, vinari mogu birati vođenje fermentacije sa mješovitim vrstama kvasca (koje vrste mogu uključivati od *Saccharomyces* vrsta ili ne-*Saccharomyces* vrsta, ili oboje), mješoviti sojevi (različiti sojevi *S. cerevisiae*), ili sa jednim sojem (odabrani soj *S. cerevisiae*) za proizvodnju specifičnog stila vina.

5. Fino podešavanje *Saccharomyces cerevisiae* sojeva za različite vinske performanse

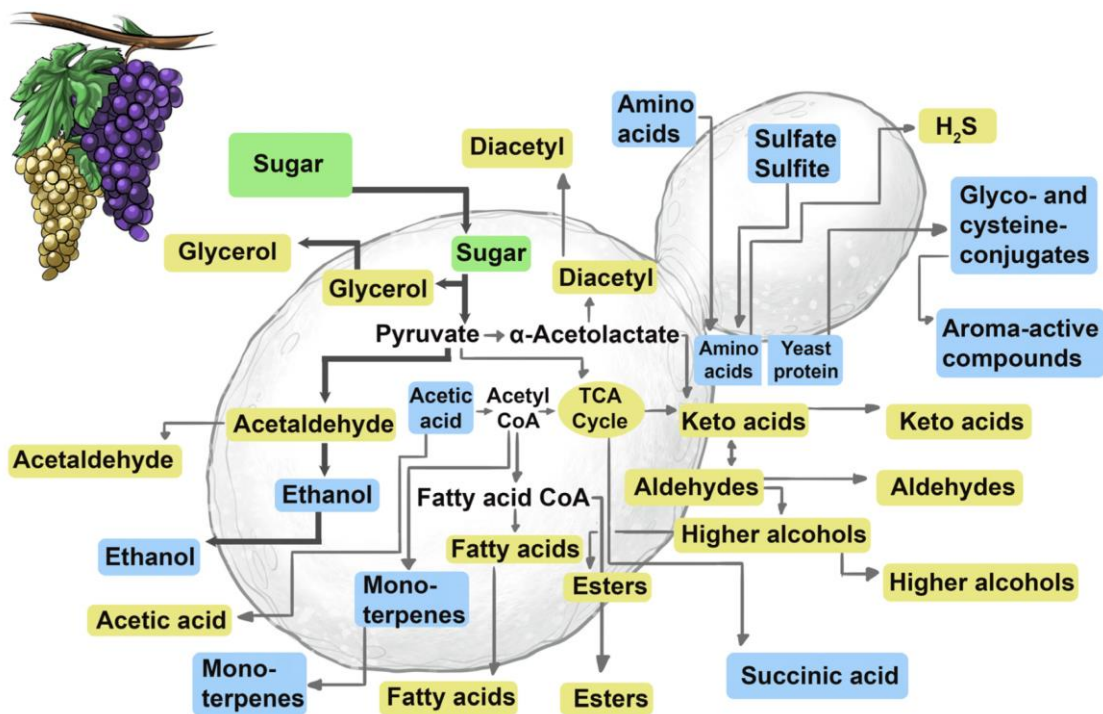
U orkestru, svaki muzičar mora znati svoju ulogu u izvođenju određene muzičke kompozicije i oni su odgovorni za fino podešavanje svojih instrumenata prije nego što dirigent krene do pulta da započne performans.

Sa inokulisanim kvascima vinari znaju da je primarna uloga *S. cerevisiae* da katalizuje brzo, potpuno i efikasno pretvaranje groždanih šećera (uglavnom glukoze i fruktoze) u etanol, ugljen dioksid i druge poželjne metabolite koji stvaraju aromu vina (kisljine, alkoholi, karbonili, esteri, terpeni, tioli) bez razvoja neugodnih mirisa kao što je sumporvodoni (slika 11 i slika 12). Najupečatljiviji nastup dolazi samo od precizno podešenog instrumenta, pa je tako i sa inokulisanim kvascem. Pristupi razvoju soja obično počinju izolacijom i odabirom varijanti prema njihovoj robusnosti, performansama fermentacije i senzornim atributima (slika 13). Kada su identifikovani najbolji sojevi, istraživači kvasca koriste hibridizaciju, mutagenezu, genetski inženjering ili tehnike genetskog inženjeringa za genetičko poboljšanje enoloških svojstava odabranih sojeva (slika 14).

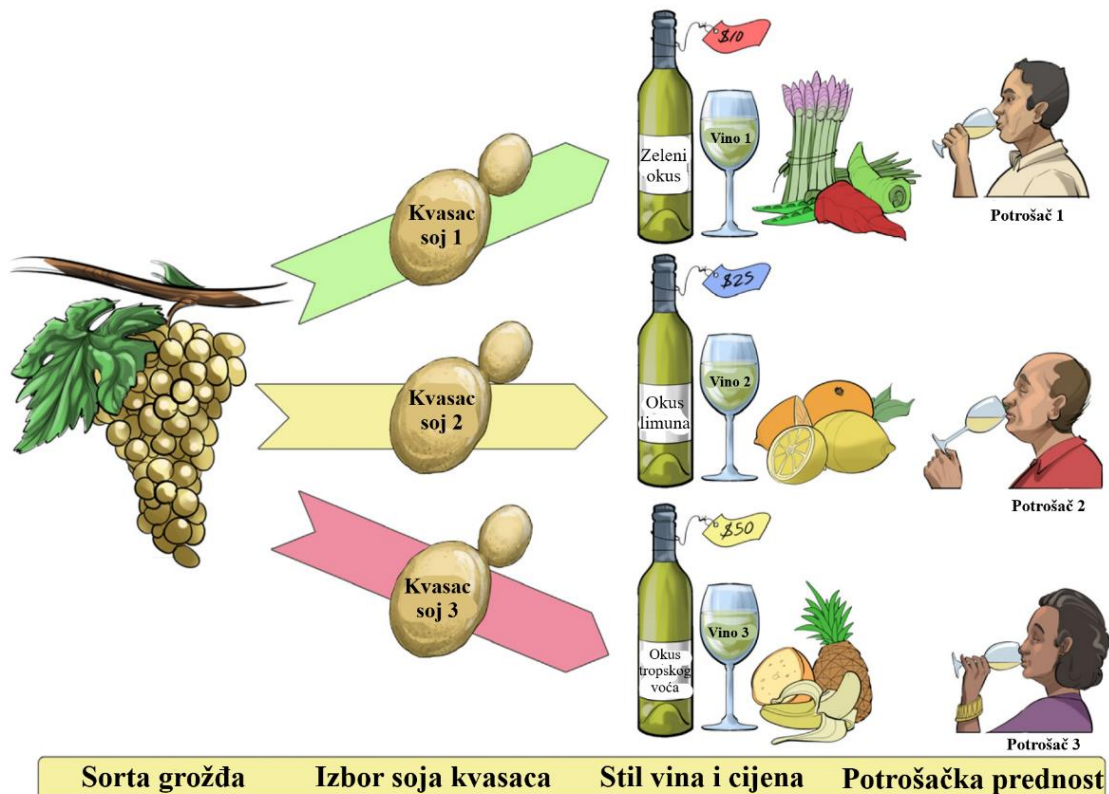
Poboljšani mutanti i hibridi se rutinski koriste u komercijalnom vinarstvu, dok su genetski modifikovani (GM) sojevi generisani genetskim i genomskim inženjeringom u ovoj fazi uglavnom rezervisani za istraživačke svrhe [6,9,19,20,21,22,23,24]. Nauka istražuju ne-GM strategije, uključujući hibridizaciju, mutagenezu i adaptivnu laboratorijsku evoluciju, da zaobiđu sadašnja anti-GM ograničenja od potrošača koji se suočavaju sa prehrambenim proizvodima koji se proizvode putem bioinženjerskih strategija [25].



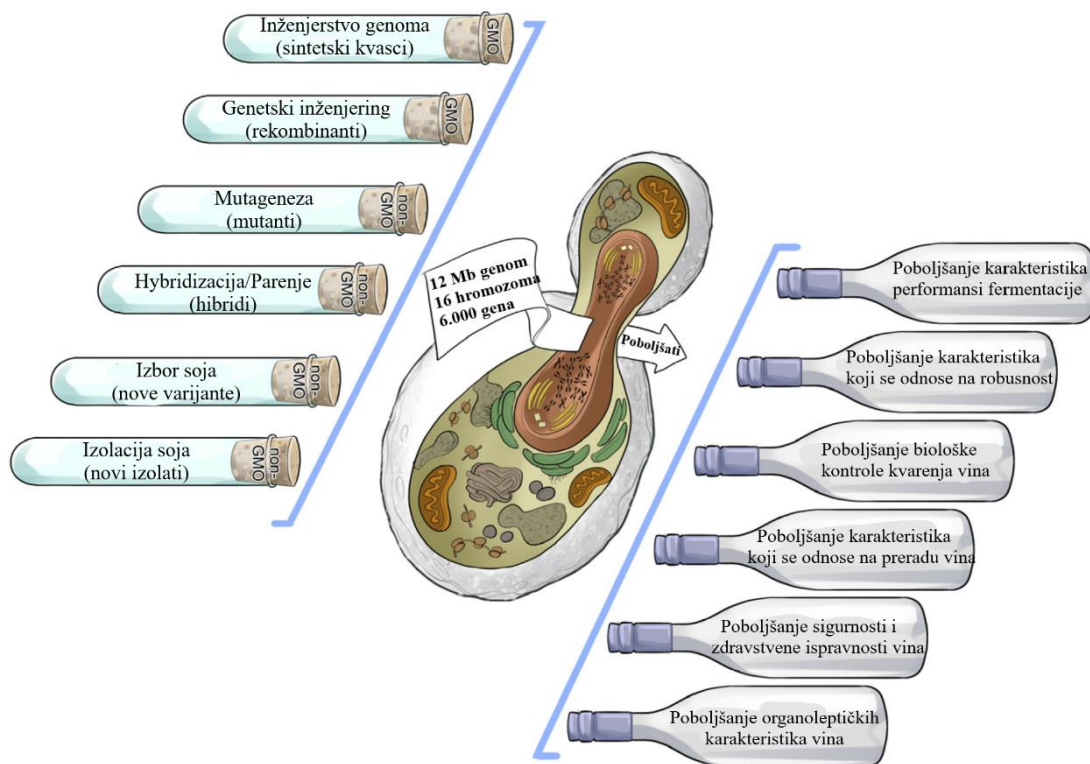
Slika 11. Pretvaranje soka od grožđa u vino djelovanjem kvasca, *Saccharomyces cerevisiae* [22]). Vinski kvasac pretvara hranjive sastojke grožđa u etanol, ugljen dioksid i sekundarne metabolite kroz svoj glikolitički metabolizam. Neke supstance dobijene od grožđa, kao što su kisljine i polifenoli, ostaju u velikoj mjeri netaknute od strane ćelija kvasca, dok su druga jedinjenja u potpunosti generisana kao dio metabolizma ćelija kvasca. Brojna jedinjenja koja su sintetizovana ili modifikovana kvascem daju arome koje mogu smanjiti ili poboljšati kvalitet vina.



Slika 12. Sva složenost fermentativne mase. Ekstrakcija i sinteza aktivnih sastojaka okusa iz šećera, aminokiselina i sumpora metabolizmom vinskog kvasca [7]. Različiti sojevi vinskog kvasca imaju različite sposobnosti da formiraju i moduliraju hemijska jedinjenja koja utiču na senzorska svojstva vina.



Slika 13. Različiti sojevi *Saccharomyces cerevisiae* proizvode sekundarne metabolite aktivne arome i vinu daju različite okuse. Nisu svi sojevi kvasca jednaki. Sok od istog grožđa će dati sasvim različita vina, zavisno o izboru soja *S. cerevisiae*. Budući da postoje velike razlike u preferencijama potrošača, koje oblikuju takve varijable kao što su etnička pripadnost, spol i starost, važno je da vinari znaju koji kvasac da izaberu ako žele da prilagode svoja vina za određena tržišta. Tek tada počinjemo da razumijemo genetiku koja podpomaže zašto različiti vinski kvasci oblikuju vino.



Slika 14. Različite tehnike razvoja soja koje se koriste za optimiranje određenih vinarskih svojstava odabranih vinskih kvasaca. Te tehnike uključuju genetsku modifikaciju (GM) i ne-GM tehnike. Primjenjuju se za proučavanje i poboljšanje atributa kvasca koji se odnose na performanse fermentacije, robusnost, kontrolu kvarenja, efikasnost prerade, korisnost proizvoda i senzorni kvalitet. GM tehnika i dalje zagađuje umove mnogih istraživača zašto je GM medicina široko prihvaćena, dok GM prehrambeni proizvodi (uključujući i vino) nisu, unatoč brojnim istraživanjima koja pokazuju da takvi proizvodi nisu više nesigurni za jelo ili piće nego bilo koji drugi prehrambeni proizvod. Ova znanstvena i kulturna močvara postaje još intrigantnija kada se uzme u obzir, na primjer, da više od 1000 transposona (segmenata hromozoma) 'skače i odskoče' po cijelom genomu vinove loze - genetski modifikujući genom *Vitis vinifera* u svakom vinogradu u komercijalnom svijetu proizvodnje vina bez ikakve intervencije vinogradara.

5.1. Usklađivanje disharmoničnosti okusa u vinu

Nedovoljno pripremljeni muzičari, neispravni instrumenti i neskladne note mogu pokvariti čitavu izvedbu orkestra i izazvati dugoročnu reputacijsku štetu kod publike. Isto tako, neuravnotežena vina ili vina koja sadrže neželjene arome mogu oštetiti brend i odvratiti potrošače od ponovne kupovine.

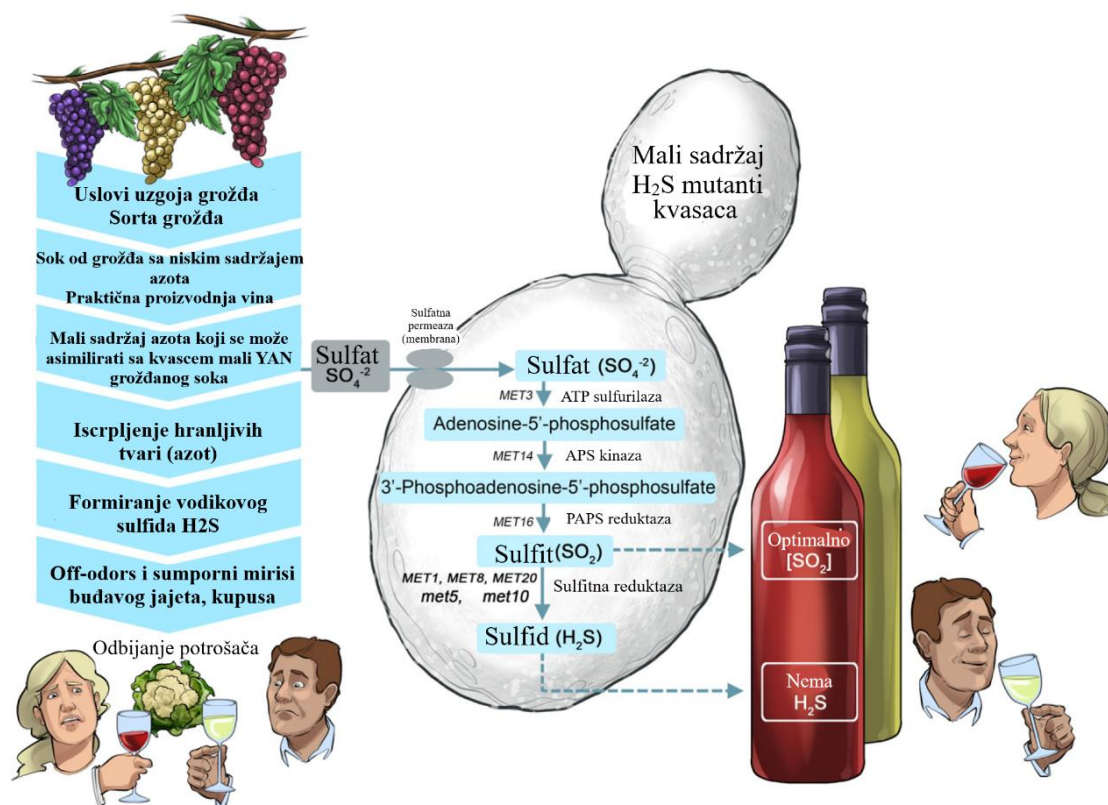
Baš kao što nisu svi violinisti Yehudi Menuhin, nisu ni svi sojevi *S. cerevisiae* superzvijezde. Većina komercijalno dostupnih sojeva vrste *S. cerevisiae* mogu realizovati brzu, potpunu i efikasnu konverziju šećera u etanol i ugljeni dioksid, ali nisu svi ovi sojevi proizveli optimalne koncentracije poželjnih sekundarnih metabolita, a u nekim slučajevima čak i proizvode - arome pod određenim uslovima fermentacije. Genetska varijacija među vinskim sojevima *S. cerevisiae* je ipak dobro dokumentovana [26,27,28,29,30,31,32].

Uzgoj novih sojeva bio je prilično efikasan u pružanju boljih mogućnosti proizvođačima vina za poboljšanje performansi fermentacije i profila spojeva aroma vina [33,34,35]. Postoji nekoliko primjera komercijalnih hibridnih sojeva (NT116, VIN13, VL3, itd.) koji potiču i iz ukrštanja [36]. Slično tome, međuvrsna hybridizacija između komercijalnih sojeva *S. cerevisiae* i srodnih vrsta kompleksa *Saccharomyces sensu stricto* (*S. arboricolus*, *S. cariocanus*, *S. eubayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. uvarum* i

Naumovozyma castellii) takođe se koristi za uvođenje raznolikosti aroma i okusa vina kao sredstva za poboljšanje stila i povećanje diferenciranosti proizvoda [32,33,34,35].

Postoje i primjeri gdje je mutagenaza efektivno primjenjena za poboljšanje postojećih komercijalnih vinskih sojeva, tako da više ne mogu da formiraju neprijatne arome (slika 15). Razvoj mutanata sa niskom H_2S i nisko isparljivom kiselinom (VA), mutanat soja Maurivin PDM je takav slučaj [37,38,39]. Varijacije PDM sa niskim H_2S generisane su mutiranjem gena MET10 i MET5, koji kodiraju katalitički α - i β -niži enzim sulfid-reduktaze. Ove mutacije su značajno smanjile ili eliminisale sposobnost da proizvedu neželjene "reduktivne" karakteristike (koje su karakterisale arome slične kupusu) tokom fermentacije groždanih šira sa niskim sadržajem azota [37,38].

Daljnje poboljšanje ovih sojeva postignuto je generisanjem mutanata koji su proizveli znatno manje sirćetne kiseline (glavna komponenta isparljivih kiselina i kolokvijalno se spominju kao VA od strane vinara) [39,40]. Kada je prisutna u koncentracijama iznad senzornog praga, sirćetna kiselina daje nepoželjni sirćetni karakter. Ovi sojevi niskog VA imali su ili mutacije u YAP1 (uključeni u oksidativni stres) ili AAF1 (uključeni u odgovor na fermentacijski stres)



Slika 15. Izgradnjom vinskog soja *Saccharomyces cerevisiae* proizvode se male ili nulte količine sumporvodonika koji može pokvariti aromu i kvalitet vina. Mali-(H₂S) mutanti su sada komercijalno dostupni vinarima.

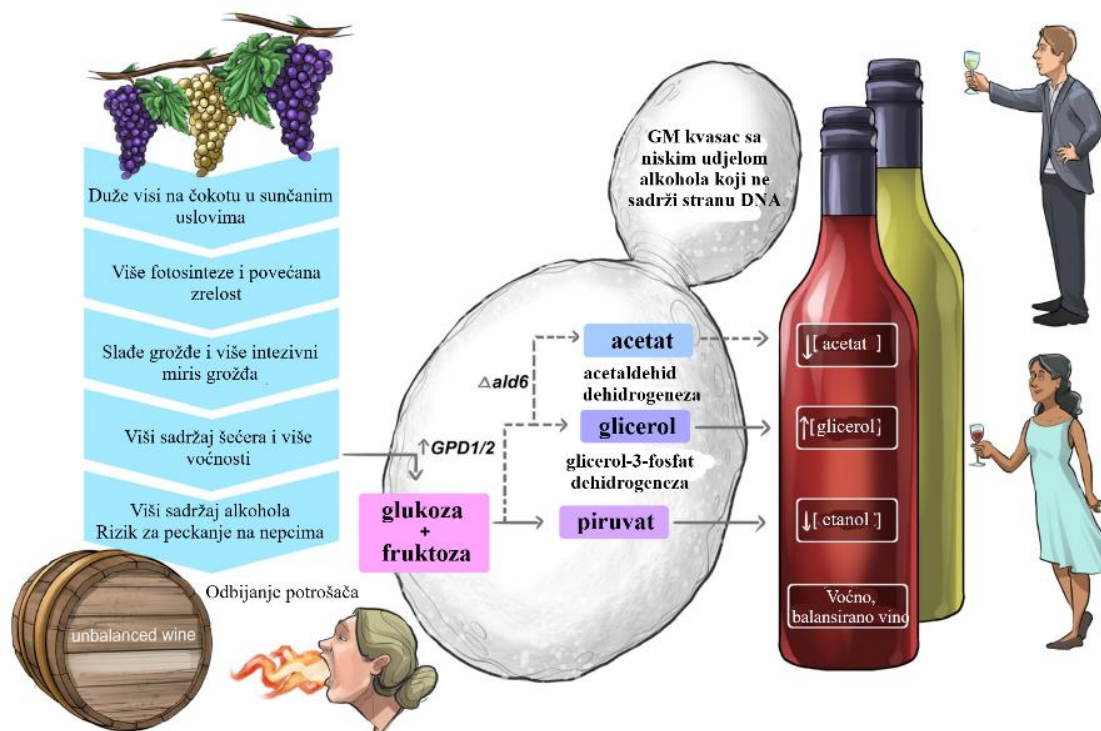
5.2. Postizanje pravog akorda između jačine alkohola i voćnosti u vinu

Kao dirigent koji nastoji da uskladi sve zvuke svih instrumenata koji sviraju u orkestru, cilj vinara je da proizvede dobro izbalansirana vina u kojima se jačina alkohola, kiselost, slast, voćnost i struktura tanina nadopunjuju, tako da nijedna komponenta ne dominira na nepcima.

Nije mali podvig postići pravi hemijski balans u vinu. Na primjer, mnogi potrošači preferiraju bogate i voćnije stilove vina od zrelog, obranog grožđa. Takva vina su oslobođena od neželjenih nezrelih, biljnih aroma, ali sadrže i mnogo više alkohola od vina proizvedenih od grožđa ranije berbe. U zavisnosti od određenog stila, previsoka koncentracija etanola može se shvatiti kao "vrućina" na nepcu, čineći tako da se previše alkoholna vina pojave nebalansirana [41,42,43]. U pokušaju da se generišu ne-GM sojevi niskog etanola za proizvodnju voćnog karaktera vina sa smanjenom alkoholnom potrošnjom, korišten je pristup adaptivne laboratorijske evolucije [44,45,46]. Ova strategija je bila prilično uspješna u tome što su rezultirajući mutanti proizveli značajno veće koncentracije glicerola na račun biosinteze etanola.

Tokom protekle dvije decenije, istraživano je nekoliko strategija genetskog inženjeringa kako bi se proizveli vinski sojevi koji mogu djelomično preusmjeriti protok ugljenika iz etanola (slika 16). Rezultati koji su najviše obećavali postignuti su prekomjernom ekspresijom jednog od dva paraloge gena, GPD1 i GPD2, koji kodiraju izoenzim glicerol-3-fosfat dehidrogenazu [47,48,49,50,51,52,53]. Na primer, višestruke kopije GPD1 genetskih konstrukcija uspješno su integrisane u genom dva vinska soja i ovi bioinženjerski sojevi su mogli da smanje sadržaj etanola sa 15,6% (v/v) na 13,2% (v/v) i sa 15,6% (v/v) do 12% (v/v) u vinima Chardonnay i Cabernet Sauvignon, [53]. Nažalost, oba soja su proizvela neprihvatljive koncentracije acetaldehida i acetoina, što je rezultiralo negativnim mirisima jabuke.

Za preusmjeravanje metaboličkog protoka od acetaldehida, acetoina i sirćetne kiseline prema senzorno neutralnom metabolitu 2,3-butandiolu, gen BDH1 - koji kodira butandiol dehidrogenazu - je prekomjerno izražen u ovim visokim glicerol / niskoetanolnim GM sojevima. To je rezultiralo značajnim smanjenjem formiranja acetaldehida, sirćetne kiseline i acetoina; međutim, neočekivano, prekomjerna ekspresija BDH1 također je ometala formiranje glicerola i etanola, najvjerojatnije podstaknuta promjenama redoks ravnoteže metabolizma kvasca [53].



Slika 16. Igradnja sojeva vinskog kvasca *Saccharomyces cerevisiae* niskog alkohola [22,23].

Želja da se smanji količina etanola u vinima od dobro sazrelog grožđa ostaje visoko na listi prioriteta vinara; međutim, razvoj „idealnog“ vinskog kvasca sa niskim sadržajem alkohola koji može postići optimalnu ravnotežu između jačine alkohola i voćnosti može se najbolje opisati kao „rad u toku“.

5.3. Izvođenje jabučno-mliječne i jabučno-etanolne fermentacije

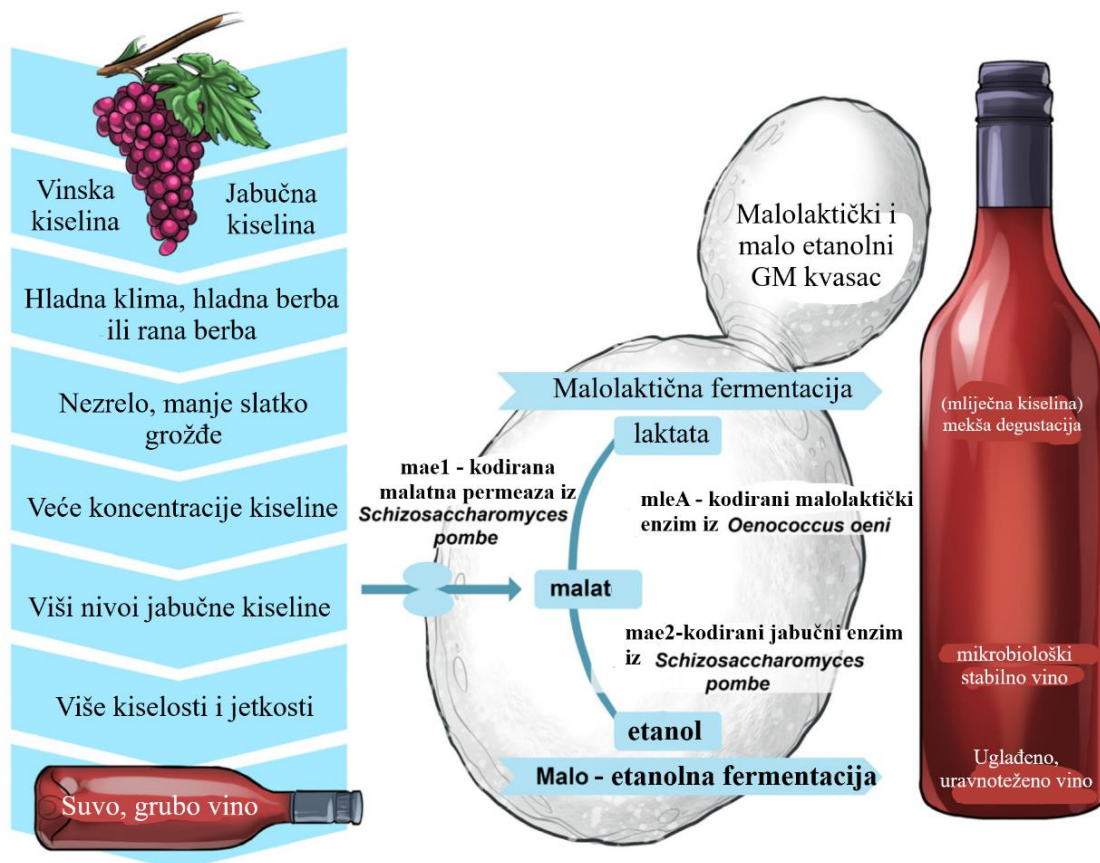
Nema sumnje mnogo više napora bi zahtijevalo da se pripremi veliki filharmonijski orkestar nego, recimo, gudački kvartet - što je manje učesnika, potrebno je manje truda. Ova intuitivna pretpostavka može se proširiti i na vinarstvo - što je manje mikroba uključeno, to je proces manje složen. To je bio cilj kada su istraživači razvili sojeve kvasca koji su bili sposobni provesti i alkoholnu i malolaktičku fermentaciju [54,55].

Normalno, malolaktičku fermentaciju izvode probirljive bakterije mliječne kiseline, kao što je *Oenococcus oeni*, nakon alkoholne fermentacije koju provodi kvasac *S. cerevisiae*. Prilikom malolaktične fermentacije, jabučna kiselina iz grožđa se deacidira (dekarboksilizira) u mliječnu kiselinu. Često se dešava da je malolaktička fermentacija 'troma' ili da se 'zaglavi' zbog inhibitornih stanja u rasponu od niskog pH, visokog sadržaja alkohola i slabe dostupnosti hranjivih materija. Takođe postoji potencijal da neke bakterije proizvode biogene amine koji mogu da ugroze zdravstveno stanje potrošača fermentisanih proizvoda. Vinski soj kvasca može pretvoriti šećer grožđa u etanol, ugljen dioksid i metabolite aktivne arome, kao i da oštru jabučnu kiselinu pretvori u mekšu mliječnu kiselinu, jednostavno poboljšavajući i pouzdanost procesa proizvodnje vina.

Široko rasprostranjen vinski soj *S. cerevisiae*, opremljen sa *Schizosaccharomyces pombe* malate transporter genom (*mae1*) i *O. oeni* malolaktičkim genom za enzim (*mleA*), osmišljen je, temeljito testiran, odobren od strane američkih i kanadskih regulatornih organa i komercijalizovan pod nazivom ML01 [54,55]. Ova dva gena su stavljena pod kontrolu jakih konstitutivnih regulatornih sekvenci promotora i terminatora *S. cerevisiae* PGK1 i integrisane u genom soja domaćina.

ML01 može vršiti malolaktičku fermentaciju paralelno sa alkoholnom fermentacijom (*slika 17*). Praćenjem fermentacije, vidjelo se da je 5 g/l jabučne kiseline dekarboksilirano do mliječne kiseline u roku od pet dana, bez negativnih uticaja na senzorna svojstva vina. Daljnje analize fenotipa, genotipa, transkriptoma i proteoma otkrile su da je ML01 bio "u suštini ekvivalentan" njegovom roditeljskom industrijskom vinskom kvascu.

Druga varijanta je takođe postala dostupna sa integracijom gena *S. pombe* malata transportera gena (*mae1*) i gena za jabučni enzim (*mae2*) u genom projektovanog soja. Sa ovim sojem malat se dekarboksilizira u piruvat, koji se zatim pretvara u etanol. 2005. godine malolaktički soj ML01 postao je prvi komercijalizovani GM vinski kvasac koji je pušten na tržište. Međutim, preovladavajuća anti-GM osjećanja potrošača sprečila su široku upotrebu ovog soja u komercijalnoj proizvodnji vina.



Slika 17. Izgradnja malolaktičkih i maloetanolnih sojeva *Saccharomyces cerevisiae* eliminišu potrebu za malolaktičkim bakterijama koje pokreću pretvaranje jabučne kiseline u mliječnu kiselinu. Genetski modifikovani malolaktički vinski kvasac, ML01, komercijaliziran je i stavljen na raspolaganje za komercijalnu proizvodnju vina u nekoliko zemalja.

5.4. Zaštita od nezdravih nota etil karbamata u proizvodnji vina

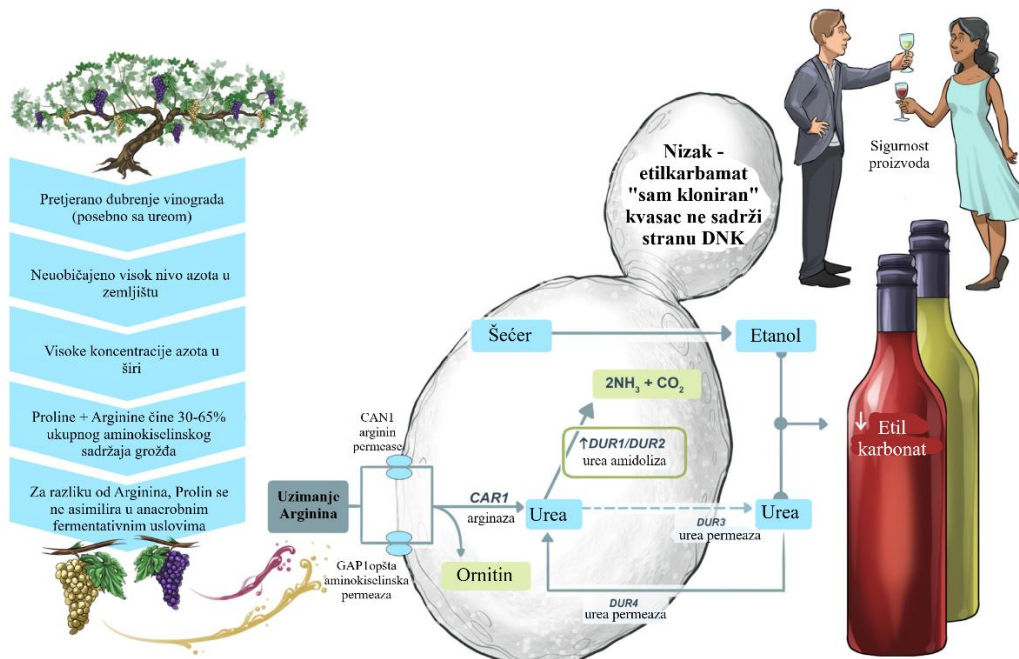
Drugi GM kvasac vina, ECMo01, dobio je odobrenje od američkih i kanadskih regulatornih tijela 2006. godine [56]. ECMo01 je konstruisan da smanji rizik proizvodnje etil karbamata tokom fermentacije. Ovo potencijalno kancerogeno jedinjenje je proizvod uree koja reaguje sa etanolom. Srećom, etil karbamat se obično proizvodi na tako niskom nivou (ako se uopšte i pojavljuje) da u proizvodnji vina to obično nije problem. Ipak, prisutan je u nekim jakim (fortified) vinima iz određenih vinogradarskih regija. ECMo01 ima dodatnu kopiju gena *S. cerevisiae* DUR1,2 pod kontrolom regulatornih sekvenci kvasca PGK1 (slika 18). Ovaj gen vezan je za urea amidoliazu, koja pretvara ureu u amonijak i ugljen dioksid, čime se uklanja supstrat za proizvodnju etil karbamata. Amonijak nastao ovom reakcijom konzumira se kao poželjni izvor azota pomoću ćelija kvasca.

ECMo01 je prijavljen da smanji etil karbamat u vinu Chardonnay za skoro 90%, a analize fenotipa i transkriptoma ECMo01 takođe su otkrile da je ECMo01 kvasac "u suštini ekvivalentan" svom roditeljskom soju [56]. Međutim, iako je ECMo01 cis (ili 'self') klonirani kvasac (ne nosi stranu DNK i stoga nije transgenski), trpio je istu sudbinu kao ML01 na tržištu u smislu opiranja da se koristi kao vinski kvasci za komercijalna proizvodnja vina koji se smatra genetski modifikovanim organizmima (GMO).

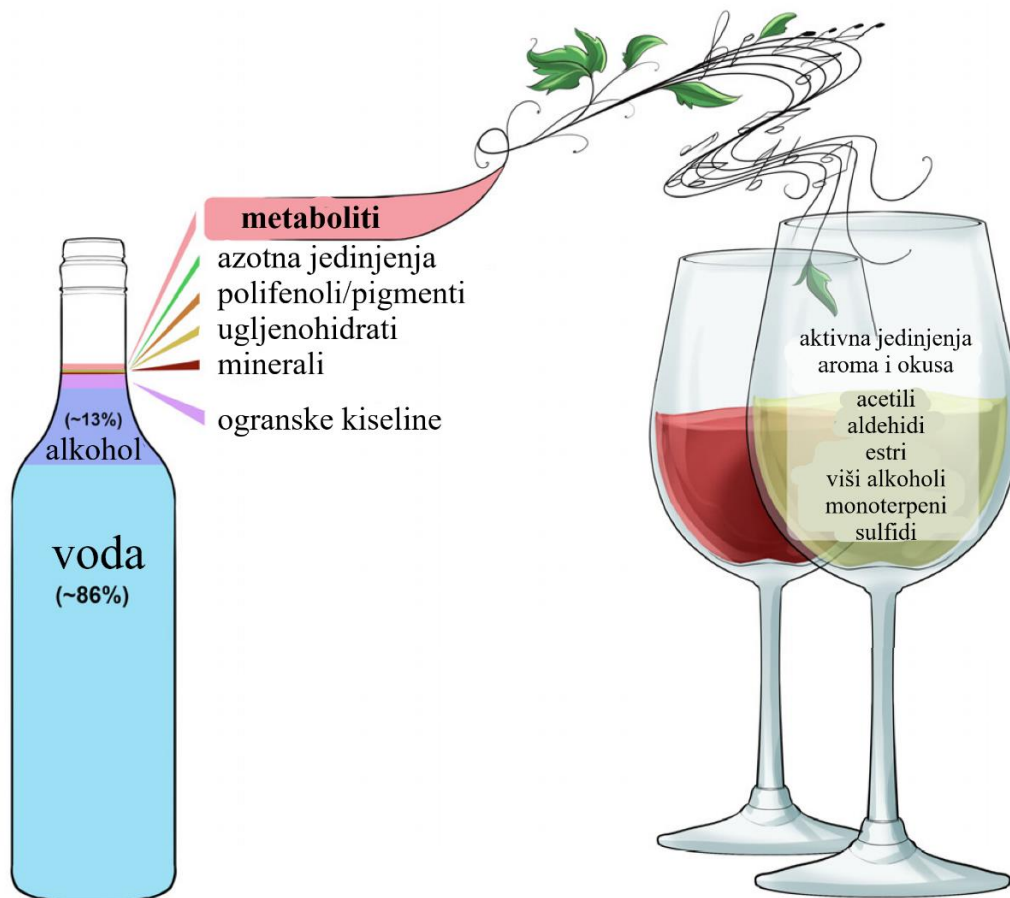
5.5. Režiranje simfonije aroma i okusa probanjem vina

Kombinacija i harmonija složenih nota simfonijskog orkestra određuju kvalitet njihovog nastupa. Ovo se može reći i za kompleksnu mješavinu hemijskih spojeva koji definišu izgled,

aromu, okus i osjećaj usta na vino (slika 19). Senzorno aktivni hemijski spojevi potiču od grožđa, mikroba i hrastovog bureta (kada se koristi).



Slika 18. Gradnja vinskog soja *Saccharomyces cerevisiae* koji smanjuje nivo nastajanja etil karbamata tokom fermentacije šire [22,23]. Genetski modifikovani soj vinskog kvasca, *Eco01*, komercijalizovan je i dostupan za komercijalnu proizvodnju vina u nekoliko zemalja.



Slika 19. Hemijski sastav vina. Vino se sastoji od ca. 86% vode, ca. 13% alkohola (uglavnom etanol) i ca. 1% sekundarnih metabolita. Kasnije sadrže jedinjenja koja oblikuju aromu i okus vina.

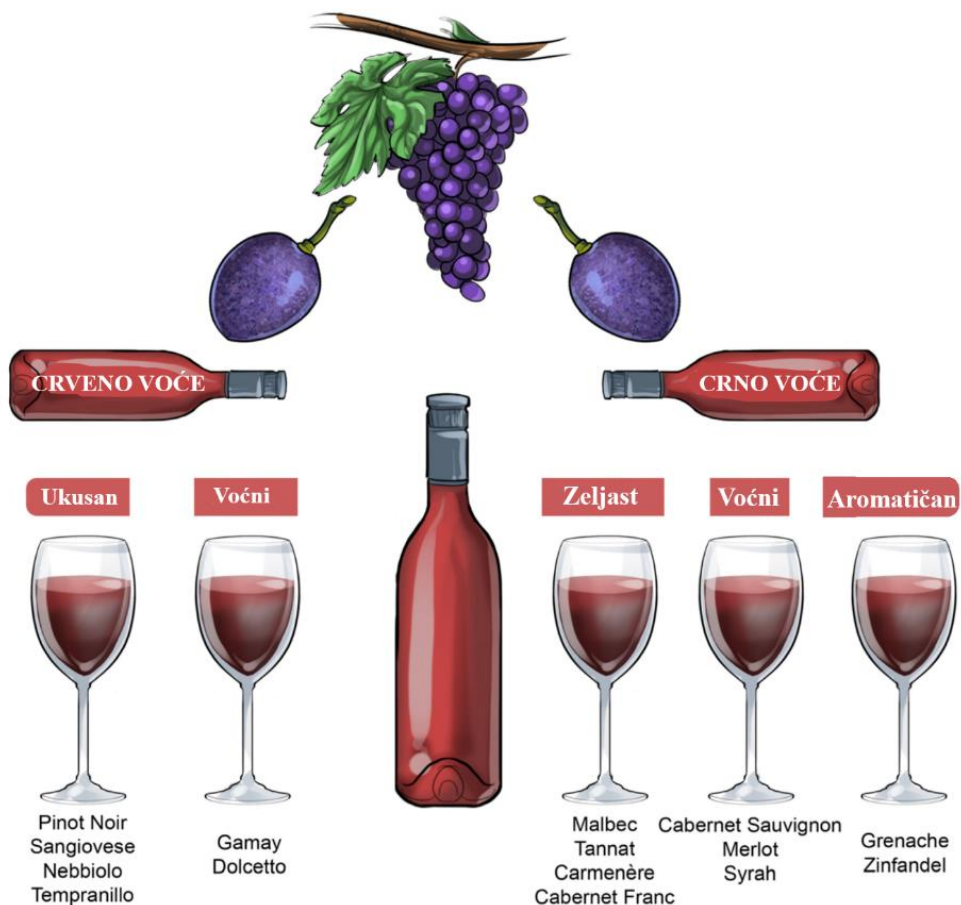
Jedinjenja grožđa daju vinima njihovu osnovnu strukturu i njihove sorte razlike (*slika 20A i 20B*). Primjeri spojeva koji potiču iz tog okusa su: aliphatics, benzene-derivatives, esters (cis-rose oxide, ethyl acetate, ethyl butyrate, ethyl formate, ethyl hexanoate, ethyl propionate, furaneol, isoamyl acetate, isobutyl acetate, methyl cinnamate), lactones (sotolon), norisprenoids (e.g., β -damascenone, β -ionone, 1,1,6-trimetyl-1,2-dihydronaphtalene), phenols, pyrazines (e.g., 3-isobutyl-2-metoxypyrazine), sesquiterpenes (e.g., rotundone), monoterpenes (e.g., linalool, geraniol, hotrienol, nerol, citronellol, cis-rose oxide and α -terpineol) and thiols (e.g., 4-mercapto-4-metyl-pentan-2-one, 3-mercaptohexan-ol, 3-mercaptohexyl acetate, etc.) [7].

Svako od ovih jedinjenja daje, pojedinačno ili u kombinaciji sa drugima, specifična svojstva vinima [8]. Na primer, karakter 'cabernet sauvignona' od zelene paprike potiče od 3-isobutyl-2-metoxipirazina, dok karakteristike slične jagodi Pinot Noir dobija iz kombinacija nekoliko estera, uključujući etil acetat, etil butirac, etil format, etil hexanoat, furaneol i metil cinnamat [8].

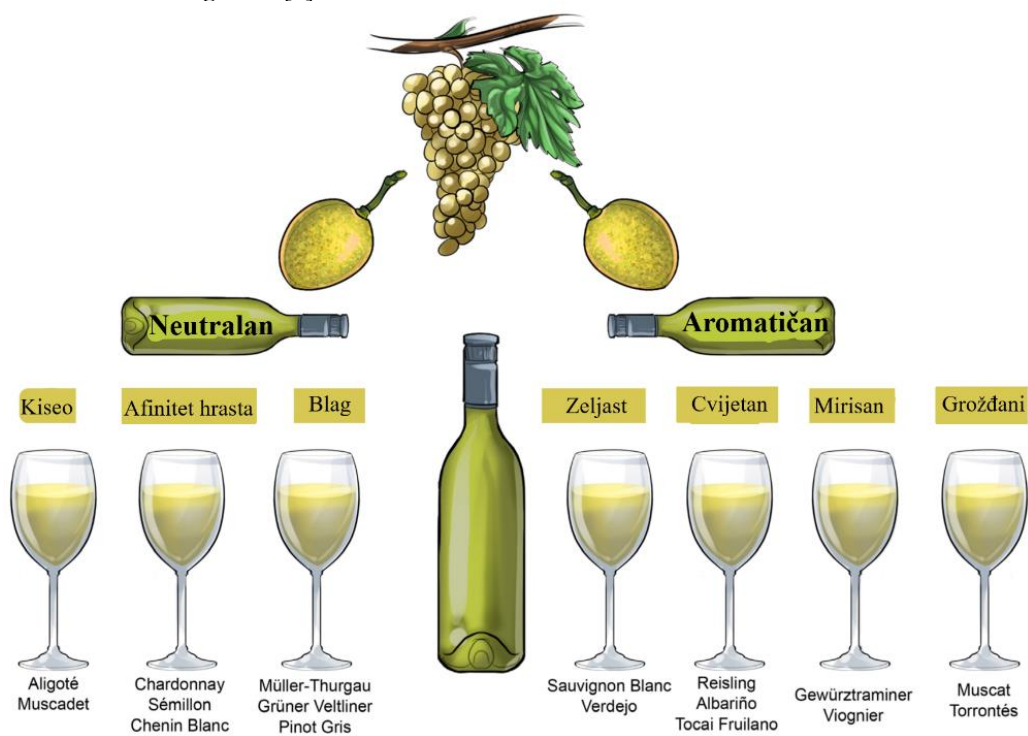
Međutim, neki estri mogu djelovati u paru ili pojedinačno kao spojevi koji definišu aromu. Na primjer, smokvi sličan karakter sorte Semillon je rezultat dva estera, etil propanat i isobutil acetat [8]. Primjer estera koji djeluje pojedinačno je cis-ružin oksid koji određuje poznati liči sličan okus Gewürztraminera. Kada se grožđe Gamay podvrgne karbonskoj maceraciji, izoamil acetat daje izražene arome slične banani u dobijenom vinu [8].

Terpeni su još jedna klasa jedinjenja koja određuju karakteristične okuse i arome grožđa; na primjer, rotkondone sesquiterpene je odgovoran za začinjene i paprene note u vinu sorte Shiraz [57,58], a monoterpen geraniol definiše „okus grožđa“ sorte Muscat.

Lakton, sotolon, je odgovoran za medne karakteristike u botritiziranim vinima i 1,6 trimetil-1,2-dihidronaftalen pokreće kerozinske znakove kod sorte Riesling. Tioli igraju glavnu ulogu u mirisu sorte Sauvignon Blanc: 4-merkapto-4-metilpentan-2-one (4MMP) daje okuse travnatih i drvenih kutija dok su 3-merkaptohexan-ol (3MH) i 3-merkaptohexil acetat (3MHA) odgovorni za ukuse tropskog voća slične onima koji tipiziraju miris ogrozda i marakuje [59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69].



Slika 20A. Glavne klase aroma dobijenih od grožđa koje određuju prepoznatljive i svojstvene karakteristike crnih vinskih sorti grožđa [8].



Slika 20B. Glavne klase aroma dobijenih od grožđa koje određuju prepoznatljive i svojstvene karakteristike bijelih vinskih sorti grožđa [8].

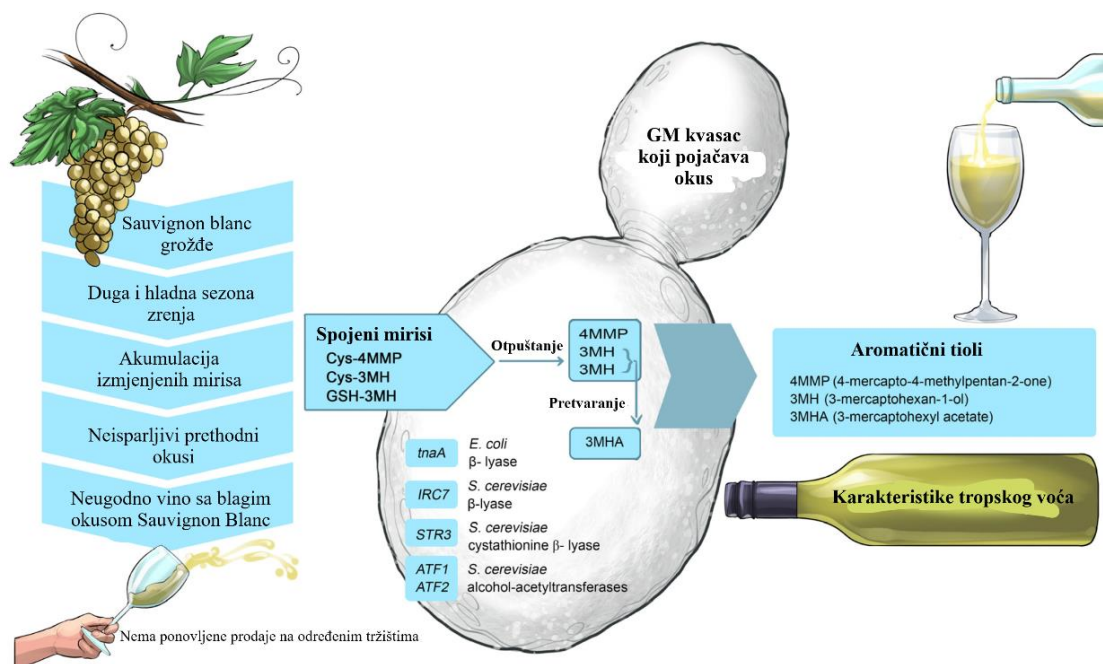
Interakcija kvasaca sa jedinjenjima dobijenim od grožđa i nova sinteza sopstvenih sekundarnih metabolita (estri, fuzel alkoholi, karbonili, isparljive masne kiseline, jedinjenja sumpora, itd.) daju vinu njegov 'vinski' karakter [65,70 71,72]. Za vrijeme alkoholne fermentacije, nekoliko spojeva derivata grožđa se biotransformišu i oslobađaju iz prekursora derivata grožđa.

Na primjer, neisparljivi cisteinizirani tioli grožđa (Cys-4MMP i Cys-3MH) mogu se osloboditi iz cisteina (4MMP i 3MH) i pretvoriti u moćniji isparljiviji spoj, 3MHA [58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68]. Sojevi vinskog kvasca mogu biti planirani tako da povećaju njihov kapacitet i sposobnost modulisanja tih preteča tiol-a dobijenih iz grožđa [65] (slika 21).

Tokom malolaktičke fermentacije, malolaktičke bakterije deacidiraju vino pretvaranjem jabučne kiseline u mliječnu kiselinu i proizvode dodatne metabolite, kao što je diacetil koji daje vinu okus butera [7]. Osim toga, kada vino dođe u kontakt sa hrastovim buretom tokom fermentacije i / ili sazrijevanja, niz složenih hemijskih transformacija može rezultirati značajnim promjenama u aromi i profilu okusa krajnjeg proizvoda [73].

Hrastova burad sa nagorelim dugama se često koriste u proizvodnji vina, a srodna moćna aromatična jedinjenja drveta (vanilin i vanilin-derivati, isparljivi fenoli i laktoni) mogu snažno uticati na aromu i stil vina. Kada se fermentacija kvasca provodi u hrastovim bačvama, neki od ovih hrastovih spojeva migriraju iz drveta u fermentišući groždani sok, koji se zatim može pretvoriti u visoko aromatsko jedinjenje [73].

Na primer, vanilin može biti redukovano kvascem na vanilinski alkohol, koji ima mnogo niži senzorni prag od vanilina. Slično tome, furfural alkohol i furfural merkaptan (2-furanmetantiol) mogu se formirati iz furfurala dobijenog od hrasta. Akumulacija hrastovih spojeva u vinu tokom čuvanja vina u hrastovim buradima povećava intenzitet senzornih deskriptora kao što su kokos, začini i vanilija.



Slika 21. Akumulacija izmijenjenih mirisa. Gradnja vinskog soja *Saccharomyces cerevisiae* koji pojačava tipične arome tiolskog voća kod sorte Sauvignon Blanc i drugim tipovima vina [22,23].

Vinari koriste veliki broj varijacija vinogradarskih i enoloških postupaka kako bi dobili optimalnu apsolutnu i relativnu koncentraciju hemijskih jedinjenja dobijenih iz grožđa, bureta hrasta i mikrobiološki derivata kako bi oblikovali aromu i okus svojih vina prema preferencijama njihovih ciljanih vina za potrošačka tržišta - skladna simfonija u čaši vina.

6. Orkestriranje buduće muzike u istraživačkoj laboratoriji

Niko ne zna odakle je došla muzika, ali znamo da su najraniji humani "muzičari" koristili sve što je bilo moguće da bi stvorili muzičke instrumente pomoću kojih bi mogli da kreiraju ritmove za pričanje svojih priča. Njihova tradicionalna poezija sa ritmom je konačno evoluirala u pjesme jer su izmislili i poboljšali svoje muzičke instrumente. Izum ovih prvih muzičkih instrumenata došao je slučajno, slično ranim izumima u proizvodnji vina. Kako su civilizacije postajale sve sofisticiranije, pronalasci su postajali sve namjerniji sve dok inovacije nisu postale kontinuirane.

Evolucija najranijih oblika, recimo, cimbala, klavikorda, klavira i orgulja na današnje elektronske klavijature, digitalne klavire i sintisajzere, ne razlikuje se od progresije razvoja soja kvasca - od pasivne upotrebe ambijentalnih kvasaca u spontanim fermentacijama do primjena hibrida, mutanata i bioinženjerskih sojeva sa specijalizovanim svojstvima za potrebe vinarstva. Primamljivo je nagađati da li su izum prvog sintisajzera elektronske muzike, muzičari i muzički entuzijasti mogli doživjeti kao veliku prijetnju budućnosti, primjer, klasična muzika koju svira filharmonijski orkestar, da li vinarski trgovci i potrošači vina mogu zamisliti da kvasac sa 'sintetičkom DNK nadzire budućnost proizvodnje vina?

Tokom godina, oni u muzičkoj industriji su shvatili da kompozitori, dirigenti i muzičari imaju koristi od dostupnosti sintisajzera u pisanju svoje muzike, pripreme za svoje nastupe i praktikovanja svoje omiljene umjetnosti. Oni znaju da tehnologija, uopšteno gledano, i digitalni sintisajzeri muzike, konkretnije, nisu prijetnja, već velika pomoć u njihovim naporima da poboljšaju svoju umjetničku formu. Tokom proteklih decenija, vinarska industrija je imala ogromne koristi od širokog spektra tehnoloških izuma; međutim, dok bi izgledi za "sintetički prilagođene" sojeve kvasca mogli biti muzika za uši nekih avangardnih naučnika, takve vijesti bi mogle izazvati drhtavicu niz kičmu mnogih proizvođača vina i ljubitelja vina.

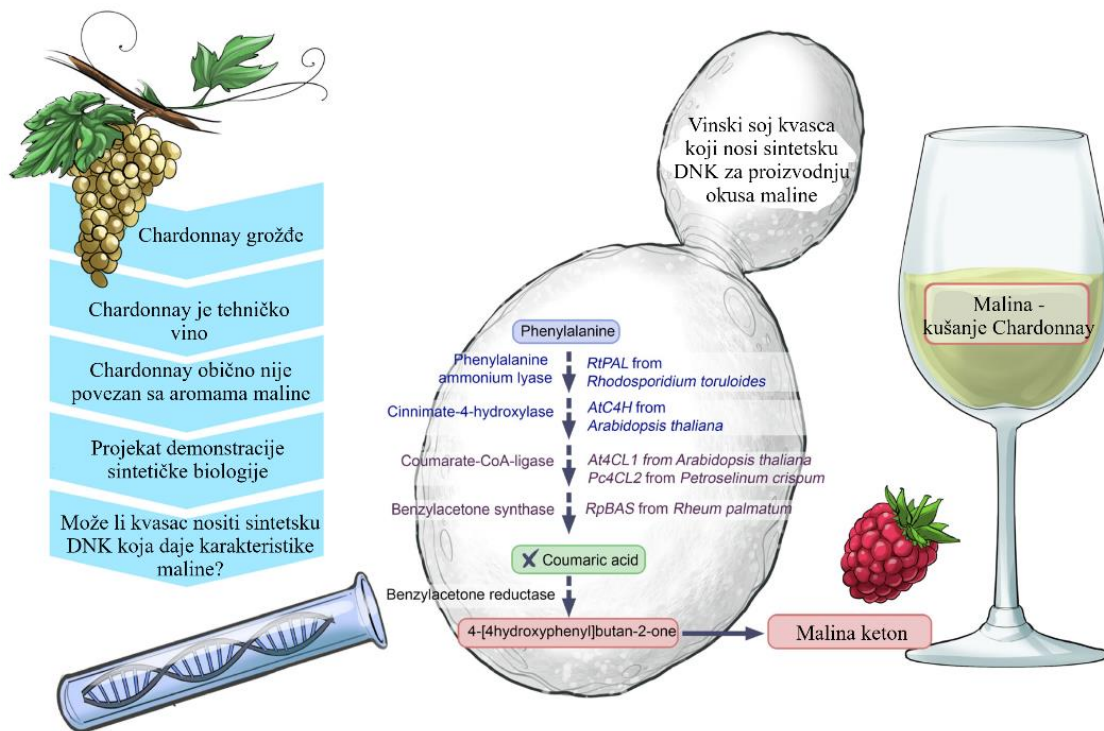
Upravo iz tog razloga prve note buduće muzike koje potiču iz najsavremenijih laboratorija za sintetičku biologiju o "sintetičkim" kvascima su kristalno jasne i obrađuju se osjetljivo. Oni koji istražuju na polju sintetičke genomike u nastajanju moraju neprestano raditi kako bi uključili sve zainteresirane strane, uključujući kolege naučnike, praktičare u industriji, kreatore politike, regulatore, komentatore i potrošače [24]. Važno je za istraživače da objasne da bi razvoj 'sintetičkih' modela kvasca u laboratoriji pomogao istraživačima kvasca da dodatno prošire svoje razumijevanje bioloških osnova, ograničenja i potencijala postojećih vinskih kvasaca - baš kao što je fizičar Richard Feynman mislio kada je rekao: "Ono što ne mogu da napravim, ne razumijem".

Ova 'filozofija' je inspirisala konzorcijum od desetak laboratorija iz pet zemalja - SAD, Velike Britanije, Australije, Kine i Singapura - da započnu zajednički projekat čiji je cilj sinteza cijelog genoma laboratorijskog soja *S. cerevisiae* (S288c) do početka 2018. godine. Ciljevi ovog velikog međunarodnog projekta - Projekat genoma sintetskog kvasca (koji se naziva projektom kvasca 2.0 ili Sc2.0) - uključuje odgovor na širok spektar "dubokih pitanja o fundamentalnim svojstvima hromosoma, organizaciji genoma, sadržaju gena, funkciji

spajanje RNK, stepen u kojem male RNK igraju ulogu u biologiji kvasca, razlika između prokariota i eukariota, te pitanja koja se odnose na strukturu i evoluciju genoma”, uz prepoznavanje da bi, eventualni “sintetički kvasac” koji je dizajniran i rafiniran mogao na kraju igrati važnu praktičnu ulogu” (www.syntheticyeast.org). Rana saznanja iz projekta kvasca 2.0 već počinju da stvaraju nove granice za razvoj vinskog kvasca [24]. Tehnologija koja se koristi u projektu kvasca 2.0 na laboratorijskom soju kvasca doista se prelila u istraživanje vinskih kvasaca sa razvojem sintetičkog modela kvasca vina od maline - prvog vinskog kvasca koji sadrži "sintetički krug DNA".

Ovaj soj kvasca *S. cerevisiae* razvijen je kao instrument za otkrivanje puteva metaboličkog okusa koji su relevantni za vinarstvo [74]. Primarni cilj ovog projekta nije bio primjena „sintetičkog“ kvasca maline u komercijalnoj proizvodnji vina; naprotiv, cilj je bio da se koristi 'sintetički' kvasac kao model za istraživanje kako bi se otkrili biohemijski putevi koji vode do formiranja ketona maline, 4- [4-hydroxyphenyl] butane-2-one. "DNK krug" koji se sastoji od četiri hemijski sintetizovana, kodon-optimizovana gena izražen je u vinskom soju *S. cerevisiae*, AWRI1631.

Sintetičke kopije su izvedene iz sljedećih gena: RtPAL iz uljastog kvasca, *Rhodospiridium toruloides*; AtC4H iz dobro proučene biljke modela, *Arabidopsis thaliana*; Pc4CL2 iz peršuna, *Petroselinum crispum*; i RpBAS od rabarbare, *Rheum palmatum*. Vinski kvasac koji sadrži sintetičku verziju ovih gena korišten je za proizvodnju eksperimentalnog chardonnaya, koji je mirisao i imao okus maline (slika 22). Ovaj „sintetički“ vinski kvasac nudi perspektivu razvoja ne-GM vinskih kvasaca starter sojeva sa sposobnošću da intenzivira note maline u crnom i bijelom vinu. Ako to bude uspješno, to bi moglo pomoći vinarima u njihovom nastojanju da dosljedno proizvode vino sa unaprijed definisanim tržišnim specifikacijama i stilovima.



Slika 22. Gradnja sintetičkog vinskog soja *Saccharomyces cerevisiae* sposobnog za proizvodnju arome maline kod sorte Chardonnay [24]. Ovo je prvi vinski kvasac koji sadrži "sintetički krug DNA" za stvaranje ketona maline.

Perspektiva 'sintetički prilagođenih' sojeva kvasca 2.0 mnogo je stvarnija nego što većina sudionika u vinarskoj industriji shvata - projekt kvasca 2.0 je već 75% završen i na putu za opremanje prve ćelije kvasca sa 16 hemijski sintetizovanih hromosoma (12 Mb sa 6000 gena). Ovaj kvasac će postati prva eukariotska ćelija koja će preći horizont in silico dizajna kompleksnih ćelija kroz novu sintezu, rekonstrukciju i uređivanje genoma kvasca. Kao i kod većine ometajućih inovacija, „techno“ zvuk buduće muzike „kvasac 2.0“ sigurno će uznemiriti i uzrokovati neskladne note unutar globalne vinarske industrije.

Nema sumnje da će buduća muzika naučnih istraživanja i prodor otkrića u vodećim laboratorijama kvasca i dalje igrati ulogu; međutim, pitanje je da li će postojati prihvatljiva i uvažavajuća publika koja će aplaudirati i pozivati na još jedan nastup.

References

1. Chambers, P.J.; Pretorius, I.S. Fermenting knowledge: The history of winemaking, science and yeast research. *EMBO Rep.* **2010**, *11*, 914–920. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Spence, C.; Wang, Q.J. Wine and music (I): On the crossmodal matching of wine and music. *Flavour* **2015**, *4*, 34. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
3. Spence, C.; Wang, Q.J. Wine and music (II): Can you taste the music? Modulating the experience of wine through music and sound. *Flavour* **2015**, *4*, 33. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
4. Spence, C.; Wang, Q.J. Wine and music (III): So what if music influences the taste of the wine? *Flavour* **2015**, *4*, 36. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
5. Swiegers, J.H.; Chambers, P.J.; Pretorius, I.S. Olfaction and taste: Human perception, physiology and genetics. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 109–113. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
6. Pretorius, I.S.; Høj, P.B. Grape and wine biotechnology: Challenges, opportunities and potential benefits. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 83–108. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
7. Swiegers, J.H.; Bartowsky, E.J.; Henschke, P.A.; Pretorius, I.S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2005**, *11*, 139–173. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
8. Lewin, B. *Wine Myths and Reality*; Vendange Press: Dover, UK, 2010. [[Google Scholar](#)]
9. Pretorius, I.S. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **2000**, *16*, 675–729. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
10. Boulton, R.B.; Singleton, V.L.; Bisson, L.F.; Kunkee, R.E. *Principles and Practices of Winemaking*; Springer: New York, NY, USA, 1996. [[Google Scholar](#)]
11. Robinson, J. *The Oxford Wine Companion*; Oxford University Press: Oxford, UK, 1999. [[Google Scholar](#)]
12. Jackson, R.S. *Wine Science—Principles and Applications*, 4th ed.; Academic Press: London, UK, 2014. [[Google Scholar](#)]
13. Jolly, N.P.; Varela, C.; Pretorius, I.S. Not your ordinary yeast: Non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 215–237. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Pretorius, I.S.; van der Westhuizen, T.J.; Augustyn, O.P.H. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1999**, *20*, 61–74. [[Google Scholar](#)]
15. Díaz, C.; Molina, A.M.; Nöhring, J.; Fischer, R. Characterization and dynamic behavior of wild yeast during spontaneous wine fermentation in steel tanks and amphorae. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 540465. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Curtin, C.D.; Pretorius, I.S. Genomic insights into the evolution of industrial yeast. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 997–1005. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
17. Englezos, V.; Torchio, F.; Cravero, F.; Marengo, F.; Giacosa, S.; Gerbi, V.; Rantsiou, K.; Rolle, L.; Cocolin, L. Aroma profile and composition of Barbera wines obtained by mixed fermentations of *Starmerella bacillaris* (synonym *Candida zemplinina*) and *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT Food Sci. Technol.* **2016**, *73*, 567–575. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
18. Rossouw, D.; Bauer, F.F. Exploring the phenotypic space of non-*Saccharomyces* wine yeast biodiversity. *Food Microbiol.* **2016**, *55*, 32–46. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. Pretorius, I.S.; Bauer, F.F. Meeting the consumer challenge through genetically customised wine yeast strains. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 426–432. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
20. Pretorius, I.S.; du Toit, M.D.; van Rensburg, P. Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st Century. *Food Technol. Biotechnol.* **2003**, *41*, 3–10. [[Google Scholar](#)]
21. Verstrepen, K.J.; Chambers, P.J.; Pretorius, I.S. The development of superior yeast strains for the food and beverage industries: Challenges, opportunities and potential benefits. In *The Yeast Handbook—Yeasts in Food and Beverages*; Querol, A., Fleet, G.H., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2006; pp. 399–444. [[Google Scholar](#)]
22. Pretorius, I.S.; Curtin, C.D.; Chambers, P.J. The winemaker's bug: From ancient wisdom to opening new vistas with frontier yeast science. *Bioeng. Bugs* **2012**, *3*, 147–156. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Pretorius, I.S.; Curtin, C.D.; Chambers, P.J. Designing wine yeast for the future. In *Advances in Fermented Foods and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits*; Holzapfel, W., Ed.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2015; pp. 195–226. [[Google Scholar](#)]
24. Pretorius, I.S. Synthetic genome engineering forging new frontiers for wine yeast. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, *37*, 112–136. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Chambers, P.J.; Bellon, J.R.; Schmidt, S.A.; Varela, C.; Pretorius, I.S. Non-genetic engineering approaches to isolating and generating novel yeasts for industrial applications. In *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*; Kunze, G., Satyanarayana, T., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; pp. 433–457. [[Google Scholar](#)]
26. Borneman, A.R.; Forgan, A.H.; Pretorius, I.S.; Chambers, P.J. Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *FEMS Yeast Res.* **2008**, *8*, 1185–1195. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Borneman, A.R.; Desany, B.A.; Riches, D.; Affourtit, P.; Forgan, A.H.; Pretorius, I.S.; Egholm, M.; Chambers, P.J. Whole genome comparison reveals novel genetic elements that characterize the genome of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1001287. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Borneman, A.R.; Desany, B.A.; Riches, D.; Affourtit, P.; Forgan, A.H.; Pretorius, I.S.; Egholm, M.; Chambers, P.J. The genome sequence of the wine yeast VIN7 reveals an allotriploid hybrid genome with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Res.* **2012**, *12*, 88–96. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Dunn, B.; Richter, C.; Kvitek, D.J.; Pugh, T.; Sherlock, G. Analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* pan-genome reveals a pool of copy number variants distributed in diverse yeast strains from differing industrial environments. *Genome Res.* **2012**, *22*, 908–924. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Borneman, A.R.; Pretorius, I.S.; Chambers, P.J. Comparative genomics: A revolutionary tool for wine yeast strain development. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, *24*, 192–199. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Borneman, A.R.; Schmidt, S.A.; Pretorius, I.S. At the cutting-edge of grape and wine biotechnology. *Trends Genet.* **2013**, *29*, 263–271. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Borneman, A.R.; Pretorius, I.S. Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genetics* **2015**, *199*, 281–291. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Bellon, J.R.; Eglinton, J.M.; Siebert, T.E.; Pollnitz, A.P.; Rose, L.; de Barros Lopes, M.; Chambers, P.J. Newly generated interspecific wine yeast hybrids introduce flavour and aroma diversity to wines. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *91*, 603–612. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Bellon, J.R.; Schmidt, F.; Capone, D.L.; Dunn, B.L.; Chambers, P.J. Introducing a new breed of wine yeast: Interspecific hybridisation between a commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast and *Saccharomyces mikatae*. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62053. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bellon, J.R.; Yang, F.; Day, M.P.; Inglis, D.L.; Chambers, P.J. Designing and creating *Saccharomyces* interspecific hybrids for improved, industry relevant, phenotypes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 8597–8609. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Van der Westhuizen, T.J.; Pretorius, I.S. The value of electrophoretic fingerprinting and karyotyping in wine yeast breeding programmes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1992**, *61*, 249–257. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Cordente, A.G.; Heinrich, A.J.; Pretorius, I.S.; Swiegers, J.H. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res.* **2009**, *9*, 446–459. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Cordente, A.G.; Curtin, C.D.; Varela, C.; Pretorius, I.S. Flavour-active wine yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *96*, 601–618. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Cordente, A.G.; Cordero-Bueso, G.; Pretorius, I.S.; Curtin, C.D. Novel wine yeast with mutations in *YAP1* that produce less acetate during fermentation. *FEMS Yeast Res.* **2013**, *13*, 62–73. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Luo, Z.; Walkey, C.J.; Madilao, L.L.; Measday, V.; van Vuuren, H.J.J. Functional improvement of *S. cerevisiae* to reduce volatile acidity in wine. *FEMS Yeast Res.* **2013**, *13*, 485–494. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Kutyna, D.R.; Varela, C.; Henschke, P.A.; Chambers, P.J.; Stanley, G.A. Microbiological approaches to lowering ethanol concentration in wine. *Trends Food Sci. Technol.* **2010**, *21*, 293–302. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
42. Varela, C.; Dry, P.R.; Kutyna, D.R.; Francis, I.L.; Henschke, P.A.; Curtin, C.D.; Chambers, P.J. Strategies for reducing alcohol concentration in wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2015**, *21*, 670–679. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
43. Goold, H.D.; Kroukamp, H.; Williams, T.C.; Paulsen, I.T.; Varela, C.; Pretorius, I.S. Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microb. Biotechnol.* **2016**, in press. [[Google Scholar](#)]
44. Kutyna, D.R.; Varela, C.; Stanley, G.A.; Borneman, A.R.; Henschke, P.A.; Chambers, P.J. Adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to generate strains with enhanced glycerol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 1175–1184. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tilloy, V.; Ortiz-Julien, A.; Dequin, S. Reduction of ethanol yield and improvement of glycerol formation by adaptive evolution of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* under hyperosmotic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 2623–2632. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Tilloy, V.; Cadiere, A.; Ehsani, M.; Dequin, S. Reducing alcohol levels in wines through rational and evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *213*, 49–58. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Nevoigt, E.; Stahl, U. Reduced pyruvate decarboxylase and increased glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD⁺] levels enhance glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1996**, *12*, 1331–1337. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
48. Michnick, S.; Roustan, J.L.; Remize, F.; Barre, P.; Dequin, S. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast* **1997**, *13*, 783–793. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
49. Remize, F.; Roustan, J.; Sablayrolles, J.; Barre, P.; Dequin, S. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces 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.* **1999**, *65*, 143–149. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
50. De Barros Lopes, M.; Rehman, A.; Gockowiak, H.; Heinrich, A.J.; Langridge, P.; Henschke, P.A. Fermentation properties of a wine yeast over-expressing the *Saccharomyces cerevisiae* glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene (*GPD2*). *Aust. J. Grape Wine Res.* **2000**, *6*, 208–215. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
51. Eglinton, J.M.; Heinrich, A.J.; Pollnitz, A.P.; Langridge, P.; Henschke, P.A.; de Barros Lopes, M.A. Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the *ALD6* aldehyde dehydrogenase gene. *Yeast* **2002**, *19*, 295–301. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Cambon, B.; Monteil, V.; Remize, F.; Camarasa, C.; Dequin, S. Effects of *GPD1* overexpression in *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine yeast strains lacking *ALD6* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 4688–4694. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Varela, C.; Kutyna, D.R.; Solomon, M.R.; Black, C.A.; Borneman, A.R.; Henschke, P.A.; Pretorius, I.S.; Chambers, P.J. Evaluation of gene modification strategies to develop low-alcohol wine yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *17*, 6068–6077. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Volschenk, H.; Viljoen-Bloom, M.; Van Staden, J.; Husnik, J.; van Vuuren, H.J.J. Genetic engineering of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for L-malic acid degradation via an efficient malo-ethanolic pathway. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2004**, *25*, 63–73. [[Google Scholar](#)]
55. Husnik, J.I.; Volschenk, H.; Bauer, J.; Colavizza, D.; Luo, Z.; van Vuuren, H.J.J. Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metab. Eng.* **2006**, *8*, 315–323. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Coulon, J.; Husnik, J.I.; Inglis, D.L.; van der Merwe, G.K.; Lonvaud, A.; Erasmus, D.J.; van Vuuren, H.J.J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 113–124. [[Google Scholar](#)]
57. Wood, C.; Siebert, T.E.; Parker, M.; Capone, D.L.; Elsey, G.M.; Pollnitz, A.P.; Eggers, M.; Meier, M.; Vössing, T.; Widder, S.; et al. From wine to pepper: Rotundone, an obscure sesquiterpene, is a potent spicy aroma compound. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3738–3744. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Takase, H.; Sasaki, K.; Shinmori, H.; Shinohara, A.; Mochizuki, C.; Kobayashi, H.; Ikoma, G.; Saito, H.; Matsuo, H.; Suzuki, S.; et al. Cytochrome P450 CYP71BE5 in grapevine (*Vitis vinifera*) catalyzes the formation of the spicy aroma compound (–)-rotundone. *J. Exp. Bot.* **2016**, *67*, 787–798. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Darriet, P.; Tominaga, T.; Lavigne, V.; Boidron, J.; Dubourdieu, D. Identification of a powerful aromatic compound of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon wines: 4-Mercapto-4-methylpentan-2-one. *Flavour Fragr. J.* **1995**, *10*, 385–392. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
60. Tominaga, T.; Masneuf, I.; Dubourdieu, D. A S-cysteine conjugate, precursor of aroma of white Sauvignon. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **1995**, *29*, 227–232. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
61. Tominaga, T.; Furrer, A.; Henry, R.; Dubourdieu, D. Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon Blanc wines. *Flavour Fragr. J.* **1998**, *13*, 159–162. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
62. Tominaga, T.; Baltenweck-Guyot, R.; Peyrot de Gachons, C.; Dubourdieu, D. Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 178–181. [[Google Scholar](#)]
63. Murat, M.L.; Masneuf, I.; Darriet, P.; Lavigne, V.; Tominaga, T.; Dubourdieu, D. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on the liberation of volatile thiols in Sauvignon Blanc wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 136–139. [[Google Scholar](#)]
64. Swiegers, J.H.; Pretorius, I.S. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, *74*, 954–960. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Swiegers, J.H.; Capone, D.L.; Pardon, K.H.; Elsey, G.M.; Sefton, M.A.; Francis, I.L.; Pretorius, I.S. Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast* **2007**, *24*, 561–574. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Swiegers, J.H.; Saerens, S.M.G.; Pretorius, I.S. Novel yeast strains as tools to adjust the flavour of fermented beverages to market specifications. In *Biotechnology in Flavour Production*; Frenkel, D.H., Belanger, F., Eds.; Blackwell: Oxford, UK, 2008; pp. 1–55. [[Google Scholar](#)]
67. Swiegers, J.H.; Kievit, R.L.; Siebert, T.; Lattey, K.A.; Bramley, B.R.; Francis, I.L.; King, E.S.; Pretorius, I.S. The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food Microbiol.* **2009**, *26*, 204–211. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Holt, S.; Cordente, A.G.; Williams, S.J.; Capone, D.L.; Jitjaroen, W.; Menz, I.R.; Curtin, C.D.; Anderson, P.A. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* to release 3-mercaptohexan-1-ol during fermentation through overexpression of an *S. cerevisiae* gene, *STR3*, for improvement of wine aroma. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 3626–3632. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Roncoroni, M.; Santiago, M.; Hooks, D.O.; Moroney, S.; Harsch, M.J.; Lee, S.A.; Richards, K.D.; Nicolau, L.; Gardner, R.C. The yeast *IRC7* gene encodes a β -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiol.* **2011**, *28*, 926–935. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Carrau, F.M.; Medina, K.; Boido, E.; Farina, L.; Gaggero, C.; Dellacassa, E.; Versini, G.; Henschke, P.A. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *243*, 107–115. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Lilly, M.; Styger, G.; Bauer, F.F.; Lambrechts, M.G.; Pretorius, I.S. The effect of increased yeast branched-chain amino acid transaminase activity and the production of higher alcohols on the flavor

- profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Res.* **2006**, *6*, 726–743. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Lilly, M.; Bauer, F.F.; Lambrechts, M.G.; Swiegers, J.H.; Cozzolino, D.; Pretorius, I.S. The effect of increased alcohol acetyl transferase and esterase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Yeast* **2006**, *23*, 641–659. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 73. Ugliano, M.; Henschke, P.A. Yeasts and wine flavour. In *Wine Chemistry and Biochemistry*; Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2009; pp. 313–391. [[Google Scholar](#)]
 74. Lee, D.; Lloyd, N.; Pretorius, I.S.; Borneman, A.R. Heterologous production of raspberry ketone in the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* via pathway engineering and synthetic enzyme fusion. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*, 49–55. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]