

Utjecaj selekcioniranih kvasaca na dinamiku alkoholne fermentacije i aromatski sastav vina Plavac mali

Šarić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:837201>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan, 2021.

Iva Šarić

1372/PI

**UTJECAJ SELEKCIONIRANIH
KVASACA NA DINAMIKU
ALKOHOLNE FERMENTACIJE I
AROMATSKI SASTAV VINA
PLAVAC MALI**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić te uz pomoć Katarine Lukić, mag.ing.

Zahvaljujem se mentorici prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić i Katarini Lukić, mag.ing. na vodstvu, savjetima i uloženom vremenu tijekom izvođenja i pisanja ovog diplomskog rada. Najviše od svega želim zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju tijekom studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ SELEKCIONIRANIH KVASACA NA DINAMIKU ALKOHOLNE FERMENTACIJE I AROMATSKI SASTAV VINA PLAVAC MALI

Iva Šarić, 1372/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj selekcioniranih kvasaca na dinamiku alkoholne fermentacije i aromatski sastav vina Plavac mali, berba 2020. Pri proizvodnji vina provodio se postupak maceracije s alkoholnom fermentacijom te su se korišteni selekcionirani kvasci vrste *Saccharomyces cerevisiae*, trgovačkih naziva: „Red Select“ i „Fructo Select“, proizvođača Appinacle te „AWRI 796“ proizvođača Maurivin. Nakon provedene alkoholne fermentacije, djelovanjem tri kvasca različitih karakteristika, dobivena su tri vina koja su se najviše razlikovala u aromatskom sastavu, dok se usporedbom fizikalno-kemijskih parametara i dinamike alkoholne fermentacije utvrdilo kako ne postoje značajne razlike u proizvedenim vinima.

Ključne riječi: Plavac mali, alkoholna fermentacija, selekcionirani kvasci, fizikalno-kemijski parametri, aroma

Rad sadrži: 44 stranice, 18 slika, 4 tablice, 37 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić*

Pomoć pri izradi: *Katarina Lukić, mag.ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Mara Banović*
2. Prof.dr.sc. *Karin Kovačević Ganić*
3. Prof.dr.sc. *Ksenija Marković*
4. Prof.dr.sc. *Branka Levaj* (zamjena)

Datum obrane: 24. rujan 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Wine Technology and Analytics

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food Technology

THE IMPACT OF SELECTED YEASTS ON THE DYNAMICS OF ALCOHOLIC FERMENTATION AND AROMA COMPOSITION OF WINE PLAVAC MALI

Iva Šarić, 1372/PI

Abstract: The aim of the study was to investigate the impact of selected yeasts on the dynamics of alcoholic fermentation and aroma composition of wine Plavac mali, harvest 2020. The production of wine implied the maceration/fermentation process and the use of selected yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, trade names: „Red Select“ and „Fructo Select“ of producer Appinacle, and „AWRI 796“ od producer Maurivin. After the alcoholic fermentation was carried out with the addition of aforementioned three different yeasts, the produced wines differed mostly in the aroma composition, while there was no great difference in analyzed physicochemical parameters and dynamics of alcoholic fermentation for all presented wines.

Keywords: *Plavac mali, alcoholic fermentation, selected yeasts, physicochemical parameters, aroma*

Thesis contains: 44 pages, 18 figures, 4 tables, 37 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD Karin Kovačević Ganić, Full Professor*

Technical support and assistance: *Katarina Lukić, mag.ing*

Reviewers:

1. PhD. *Mara, Banović*, Full professor
2. PhD. *Karin, Kovačević Ganić*, Full professor
3. PhD. *Ksenija, Marković*, Full professor
4. PhD. *Branka, Levaj*, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 24th, 2021

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE CRNIH VINA.....	2
2.2. ALKOHOLNA FERMENTACIJA	4
2.2.1. Disanje (respiracija).....	4
2.2.2. Alkoholna fermentacija	5
2.2.3. Biokemijski put razgradnje šećera.....	5
2.2.4. Uvjeti fermentacije crnih vina	6
2.3. KVASCI	7
2.3.1. Primjena selekcioniranih kvasaca u proizvodnji vina.....	9
2.3.2. Utjecaj kvasaca na dinamiku fermentacije	10
2.3.3. Utjecaj kvasaca na aromatski sastav vina	11
2.4. SORTA PLAVAC MALI	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJAL	15
3.1.1. Grožđe sorte plavac mali	15
3.1.2. Kvasci i hrana za kvasce.....	15
3.1.2.1. Karakteristike kvasca „Red Select“.....	17
3.1.2.2. Karakteristike kvasca „Fructo Select“	17
3.1.2.3. Karakteristike kvasca „Awri 796“	17
3.1.2.4. Hrana za kvasce „Pinnacle FermiTop“	18
3.1.3. Kemikalije	17
3.1.4. Uređaji i oprema	17
3.2. METODA	18
3.2.1. Metoda proizvodnje crnog vina sorte plavac mali primijenjena u ovom eksperimentalnom radu	18
3.2.1.1. Priprema kvasaca.....	20
3.2.1.2. Praćenje tijekom alkoholne fermentacije.....	20
3.2.2. Fizikalno-kemijska analiza mošta i vina.....	20
3.2.2.1. Određivanje topljive suhe tvari aerometrom (moštomjerom)	21
3.2.2.2. Određivanje ukupne kiselosti mošta i vina	22
3.2.2.3. Određivanje slobodnog i ukupnog sumporovog dioksida	23
3.2.3. Određivanje arome vina plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS).....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. REZULTATI I RASPRAVA FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE VINA	27
4.2. REZULTATI I RASPRAVA PRAĆENJA DINAMIKE ALKOHOLNE FERMENTACIJE	30
4.3. REZULTATI I RASPRAVA AROMATSKOG SASTAVA VINA.....	33

5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	41

1. UVOD

Proizvodnja vina kakvu danas poznajemo značajno se razlikuje u odnosu na svoje početke. Za razliku od bijelih vina, kod crnih vina se maceracija odvija usporedno s alkoholnom fermentacijom. Fermentacija može započeti spontano, djelovanjem prirodno prisutne mikroflore koja se nalazi na grožđu ili opremi za vinifikaciju, no uobičajeno je ipak koristiti selekcionirane sojeve vinskih kvasaca jer se tako postiže bolja kontrola procesa fermentacije. Osim što će metabolizmom šećera proizvesti alkohol, vinski kvasci će proizvesti i spojeve arome te brojne druge spojeve i tako sudjelovati u oblikovanju senzorskih karakteristika budućeg vina (Jackson, 2008).

Davne 1866. godine, Louis Pasteur je ustanovio kako su glavni mikroorganizmi odgovorni za provedbu alkoholne fermentacije upravo kvasci. U mnoštvu mikroorganizama prisutnih tijekom odvijanja alkoholne fermentacije, kao najbrojniji su se istaknuli kvasci roda *Saccharomyces*. Općenito ovi kvasci bolje podnose visoke koncentracije šećera i porast koncentracije alkohola etanola, nego ostali prisutni mikroorganizmi. Identificirano je nekoliko vrsta kvasaca koji mogu provesti alkoholnu fermentaciju do kraja: *S. cerevisiae*, *S. bayanus* i *S. paradoxus* (Specht, 2010; Divol i Bauer, 2010).

Plavac mali je autohtona hrvatska sorta koja se uzgaja u srednjoj i južnoj Dalmaciji te otocima. Po količini uzgoja ističe se poluotok Pelješac. Na tržište rijetko dolazi pod pravim imenom sorte pa ga možemo pronaći pod nazivima koji označavaju geografski položaj: dingač, postup, plavac mili, ivan dolac i slično ili pod nazivima neodređenog karaktera kao što su: zlatan plavac, villa sponza, pelješac ili jednostavno samo plavac. Obilje tanina, vrlo visoka koncentracija alkohola (13 - 16 vol %), blago slatkast okus te vrlo bogato i puno tijelo, odlike su vina dobivenih s dobrih položaja (Vina Croatia, 2017).

Cilj ovoga rada je istražiti utjecaj upotrebe tri komercijalno dostupna kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae*, različitih karakteristika, na dinamiku alkoholne fermentacije i aromatski sastav vina. U Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu, biti će proizvedeno vino sorte plavac mali koje će se koristiti u istraživanju. Tijek alkoholne fermentacije će se pratiti mjerenjem temperature masulja i koncentracije šećera, dok će se aromatski sastav vina odrediti plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. TEHNOLOGIJA PROIZVODNJE CRNIH VINA

Crna vina se proizvode na poseban način. Tehnologiju proizvodnje karakterizira maceracija tijekom koje dolazi do ekstrakcije polifenolnih spojeva, jabučno-mliječna fermentacija i duljina starenja vina, posebice kada je riječ o visokokvalitetnim vinima (Morata i sur., 2019).

U proizvodnji crnih vina mogu se primijeniti različite tehnike i metode proizvodnje. Neki od koraka proizvodnje se uobičajeno primjenjuju, dok uvijek postoji mogućnost modificiranja postupaka u svrhu postizanja određenog cilja. Kada grožđe pristigne u vinariju, započinje proces pretvorbe grožđa u vino - vinifikacija. Prerada započinje postupkom muljanja - ruljanja. Ruljanjem se uklanjaju peteljke. One su bogate polifenolima, posebice taninima koji pridonose gorčini mošta te se radi sprječavanja prekomjerne ekstrakcije tanina i posljedično prekomjerne gorčine vina, peteljke uklanjaju. Tijekom muljanja, grožđe se blago pritišće, a ova dva postupka mogu biti izvedena istovremeno u uređaju koji se naziva muljača – ruljača. Grožđe ulazi u rotirajući cilindar uređaja, bobice prolaze kroz otvore na cilindru, a peteljke zaostaju u unutrašnjosti. Peteljke se izbacuju iz uređaja i mogu se kasnije koristiti kao gnojivo. Bobice grožđa padaju na rotirajuće valjke koji ih potiskuju pod određenim tlakom kako bi iz njih iscijedili sok. Ovim postupkom se dobiva masulj – sok grožđa s pokožicom i sjemenkama (Grainger i Tattersall, 2005).

Nakon muljanja - ruljanja, slijede maceracija i fermentacija. Maceracija je postupak tijekom kojega, uslijed stajanja masulja, dolazi do ekstrakcije pigmenta, tanina i spojeva arome iz pokožice i sjemenki u mošt. Ovaj korak je ključan u proizvodnji crnih vina kako bi se ekstrahirali antocijani iz pokožice, koji daju boju crnom vinu i tanini koji osim što su antioksidansi, doprinose gorčini i trpkoci budućeg vina. Koncentracija ekstrahiranih tanina (proantocijanidina) imat će snažan utjecaj na potencijal starenja vina u bačvama. Maceracija i fermentacija ovise o faktorima poput dizajna i materijala fermentora, temperature i tehnike potapanja klobuka, koncentraciji sumporova dioksida, pH, dodatku enzima i slično. Predviđa se da će se u budućnosti ovaj postupak moći provoditi kontinuirano, primjenom novih tehnologija poput visokog hidrostatskog tlaka, pulsirajućeg električnog polja, ultrazvuka i slično (Morata i sur., 2019). O alkoholnoj fermentaciji bit će više rečeno u sljedećem poglavlju.

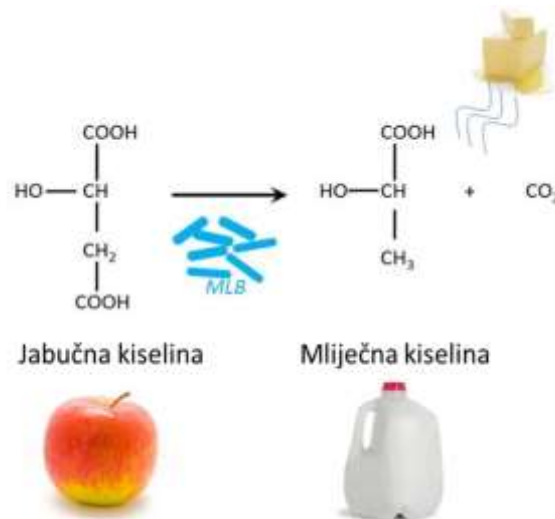
Nakon završene maceracije i fermentacije, potrebno je izvršiti prešanje masulja (slika 1). Postoji veliki broj različitih preša, a neke od njih su konstruirane tako da postepeno postižu

željeni tlak - pneumatske preše. Može se provesti u više koraka, ali treba imati na umu da se svakim sljedećim prešanjem ekstrahira još više polifenola, čime vino postaje sve gorče i trpkije.



Slika 1. Masulj za vrijeme fermentacije (Kokot agro, 2017)

Jabučno - mliječna fermentacija (slika 2) se provodi kako bi se gruba jabučna kiselina konvertirala u mliječnu kiselinu koja je puno mekšeg okusa. Ovu vrstu fermentacije provode bakterije mliječne kiseline rodova *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*, a vinu daju okus po maslacu i/ili prepečencu te doprinose kompleksnosti vina.



Slika 2. Slikovni prikaz jabučno - mliječne fermentacije (Haibach, 2020)

Poželjno je kupažirati vina kako bi se u konačnici dobilo vino ujednačene kvalitete. Mlada vina zatim dozrijevaju kroz određeno vrijeme. Tijekom tog vremena tanini postaju mekši, a ukupna kiselost se smanjuje. Izbor posuđa za dozrijevanje vina, kao i trajanje dozrijevanja, faktori su koji mogu varirati ovisno o stilu vina koji se želi postići, ali i raspoloživim novčanim

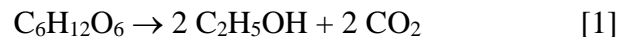
sredstvima. Obično se bira između posuđa načinjenog od nehrđajućeg čelika i drvenih bačvi. Najkvalitetnija vina dozrijevaju u drvenim bačvama 9 do 22 mjeseca (Grainger i Tattersall, 2005).

Period dozrijevanja mora biti dug onoliko koliko je vremena potrebno da se vino stabilizira, također je ovaj period važan i za pripremu kvalitetnih vina koja će određeni vremenski period stariti i u bocama. Ovo razdoblje prate brojne promjene u vinu, poput razvoja boje, arome i okusa vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

2.2. ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Alkoholna fermentacija ili alkoholno vrenje je proces u kojemu iz šećera, djelovanjem kvasaca i enzima, u brojnim reakcijama koje se međusobno smjenjuju, nastaju etanol i ugljikov dioksid. Također nastaje i energija koju kvasci dijelom koriste za rast i razvoj, a dijelom se oslobađa u obliku topline. Osim navedenih najzastupljenijih produkata, nastaju i razni sekundarni produkti poput estera, viših alkohola, masnih kiselina i mnogi drugi. Ovim procesom, uz pomoć kvasaca, iz mošta (ili masulja) se dobiva mlado vino, stoga je ovo jedna od glavnih faza proizvodnje vina.

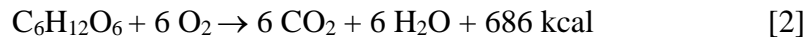
1815. Gay–Lussac je prvi postavio formulu razgradnje šećera:



1895. Eduard Buchner je potvrdio nalaze Leibig-a i Pasteur-a otkrivši prisutnost tvari (koje je nazvao zimazama) u kvašćevim stanicama koje su odgovorne za pokretanje fermentacije. Izraz zimaza označava kompleks enzima koji sudjeluju u složenom mehanizmu alkoholne fermentacije. Za provođenje alkoholne fermentacije, značajni su kvasci iz skupine kvasaca *Saccharomyces sensu stricto* (*S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. bayanus* i *S. pastorianus*) s naglaskom na 2 najznačajnija fermentabilna kvasca iz te skupine: *S. cerevisiae* i *S. bayanus*. Kvasci mogu metabolizirati šećer u aerobnim i anaerobnim uvjetima pa govorimo o fazi disanja (respiracije) i fazi alkoholne fermentacije.

2.2.1. Disanje (respiracija)

U trenutku kontakta kvasca sa moštom/masuljem vladaju aerobni uvjeti u kojima kvasac troši šećere, glukozu i fruktozu, za svoj rast i razvoj, što rezultira porastom kvašćeve biomase. Dakle u ovoj fazi se najviše energije troši na razmnožavanje kvasaca, pri čemu se troši sav šećer, a nastaju ugljikov dioksid, voda i velika količina energije. Formula koja prikazuje opisanu fazu disanja glasi:



2.2.2. Alkoholna fermentacija

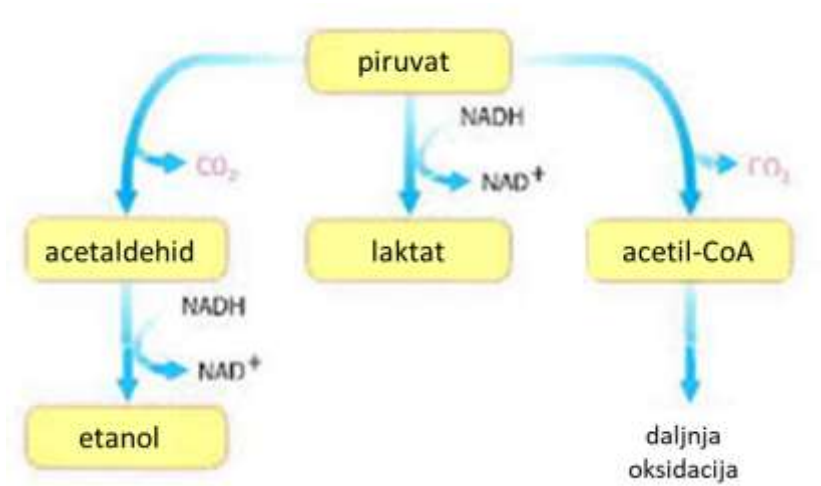
Alkoholna fermentacija je biokemijski proces koji se odvija bez prisustva kisika, odnosno u anaerobnim uvjetima. Djelovanjem kvasaca, šećer se u ovoj fazi prevodi do etanola i ugljikovog dioksida. Za razliku od respiracije, ovdje šećer nije u potpunosti iskorišten i oslobađa se puno manje energije. Formulom se može pojednostavljeno prikazati opisani kemizam procesa:



U ovoj fazi se ne oslobađa dovoljna količina energije za razmnožavanje kvasaca pa se fermentacija odvija u dva pravca: nastajanje glavnih produkata (etanola i CO_2) i nastajanje sporednih produkata (glicerol, viši alkoholi, esteri, organske kiseline, acetaldehid, acetoin i mnogi drugi).

2.2.3. Biokemijski put razgradnje šećera

Šećeri heksoze (glukoza) difuzijom prolaze kroz staničnu membranu kvaščeve stanice do citoplazme. Biokemijski put razgradnje šećera započinje glikolizom, nizom reakcija koje kataliziraju brojni enzimi, na kraju kojih se iz glukoze dobivaju 2 molekule piruvata. Glikoliza se odvija u citosolu. U prvoj fazi glikolize iz glukoze kroz 3 reakcije (fosforilacija, izomeracija i ponovna fosforilacija) nastaje fruktoza-1,6- difosfat i za tu pretvorbu se troše 2 molekule ATP-a. U drugoj fazi fruktoza-1,6-difosfat se cijepa na dihidroksiacetonfosfat i gliceraldehid-3-fosfat. Iz dihidroksiacetonfosfata nastaje još jedna molekula gliceraldehid-3-fosfata. U trećoj fazi, gliceraldehid-3-fosfat se koncertira u 1,3-difosfoglicerat, a on konačno u 3-fosfoglicerat i ATP. Završno, u četvrtoj fazi glikolize, iz 3-fosfoglicerata, preko 2-fosfoglicerata i fosfoenolpiruvata, djelovanjem enzima piruvat kinaze, nastaje piruvat i ATP. Proces glikolize, odvija se na isti način u aerobnim i anaerobnim uvjetima, ali nakon glikolize razgradnja piruvata, prikazana na slici 3, može se odvijati u nekoliko smjerova ovisno o uvjetima prisutnim u mediju (Banović, 2020).



Slika 3. Mogućnosti razgradnje piruvata nakon glikolize (Vuk, 2017)

Alkoholna fermentacija započinje nakon glikolize, dekarboksilacijom pirogroždane kiseline u acetaldehid, a zatim redukcijom acetaldehida nastaje etanol. Istovremeno dolazi do oksidacije NADH₂ u NADH⁺. NADH⁺ kao akceptor vodika sudjeluje u pretvorbi gliceraldehid-3-fosfata u 1,3 difosfoglicerat te tako omogućuje nastavak glikolize. U nedostatku ovog koenzima doći će do prekida narednih reakcija glikolize. Nastali etanol ne sudjeluje u daljnjem metabolizmu kvasaca, već se kao takav akumulira u mediju (Banović, 2020).

Koncentracija reducirajućih šećera u moštu/masulju, tijekom alkoholne fermentacije pada sa otprilike 150 do 250 g L⁻¹ na manje od 5 g L⁻¹ čime se dobivaju suha vina. Većina kvasaca fermentira glukozu što objašnjava činjenicu da vina sadrže više fruktoze nego glukoze. Saharoza se u vinu nalazi isključivo hidrolizirana na glukozu i fruktozu, njena prisutnost u obliku disaharida obično je rezultat dodavanja šećera u vino (Moreno i Peinado, 2012).

2.2.4. Uvjeti fermentacije crnih vina

U većini slučajeva fermentacija se provodi do suha ili polusuha. Ovisno o sastavu masulja, konačna koncentracija alkohola u vinu obično se kreće između 11 i 14,5 vol %. Sam proces fermentacije je dinamičan, posebice u početku i rezultira stvaranjem energije u obliku topline. Primjerice, temperatura fermentacije može porasti sa oko 20 °C na oko 30 do 32 °C. Kvasci prestaju djelovati pri temperaturama višim od 35 °C, stoga je potrebno kontrolirati temperaturu tijekom trajanja fermentacije, posebice u toplijim sredinama, kako bi se spriječilo da kvasci prestanu fermentirati prije nego što potroše sav šećer. Sadržaj šećera od 100 g L⁻¹ teoretski može povisiti temperaturu masulja za 13 °C. Upravljanje temperaturom fermentacije može biti dosta zahtjevno. Ukoliko se fermentacija provodi pri nešto nižoj temperaturi, kvasci bolje rastu

i u konačnici se dobiva vino s većom koncentracijom alkohola. S druge strane, pri višim temperaturama, fermentacija brže završava, ali se bolje ekstrahiraju pigmenti. U svrhu kontrole temperature, fermentori su opremljeni uređajima koji omogućuju postizanje željene temperature (Grainger i Tattersall, 2005).

2.3. KVASCI

Kvasci su prirodno prisutni mikroorganizmi koji se nalaze na pokožici grožđa i imaju vodeću ulogu u procesu alkoholne fermentacije. Dvije su osnovne skupine kvasaca koje se nalaze na pokožici grožđa: divlji i vinski. Divljim kvascima, uglavnom roda *Klockera* i *Hanseniaspora*, je potreban kisik za njihovo djelovanje. Pretvaraju šećer u alkohol, ali samo do 4 vol %, kada umiru. Tada ulogu preuzimaju vinski kvasci, roda *Saccharomyces*, koji fermentiraju sve dok ili više nema zaostalog šećera ili je postignuta koncentracija alkohola od 15 vol %, kada oni prirodno umiru (Grainger i Tattersall, 2005).

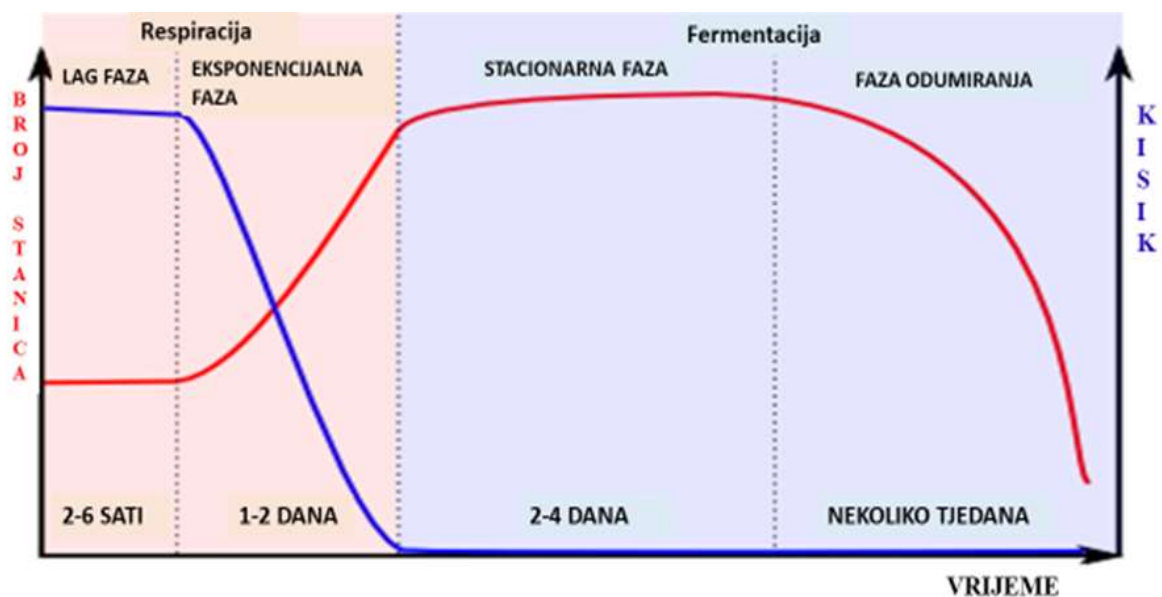
Rod *Saccharomyces* obuhvaća veliki broj različitih vrsta kvasaca koji imaju važnu ulogu u proizvodnji vina. Većina ih fermentira glukozu, a postoje i neke vrste koje podjednako fermentiraju glukozu i fruktozu. Kada je riječ o alkoholnoj fermentaciji vina, glavnu ulogu iz ovoga roda preuzima kvasac *Saccharomyces cerevisiae*.



Slika 4. Izgled stanica kvasca *S.cerevisiae* pod mikroskopom (Tischelmayer, 2021)

S. cerevisiae, slabo je zastupljen na površini grožđa, a u mošt dopijeva uglavnom kontaktom s vinskim posuđem i opremom. Izuzetno je važan u fermentaciji vina jer ju provodi do kraja. Ovalnog je oblika, kao što je vidljivo na slici 4, brzo se razmnožava pupanjem, podnosi koncentracije alkohola i do 18 vol % i relativno se brzo taloži nakon završene fermentacije (Banović, 2020).

Kvasci tijekom svoga rasta obično prolaze kroz 4 razvojne faze - lag, log, stacionarna i faza odumiranja (slika 5). Nakon inokulacije, stanicama je potrebno neko vrijeme da se prilagode na novonastale uvjete – lag faza. Nakon prilagodbe, većina stanica se počinje umnažati stalnom brzinom, sve dok su uvjeti za to povoljni. Krivlja rasta može se opisati eksponencijalnom jednadžbom te se ova faza stoga naziva eksponencijalna ili logaritamska faza rasta. Tijekom ove faze, broj živih stanica raste i postiže svoj maksimum. Kada ponestane nutrijenata, nastupaju nepovoljni uvjeti za kvasce jer dolazi do akumulacije toksičnih metabolita. Nakon perioda ubrzanog rasta, brzina diobe stanica postaje jednaka brzini kojom stanice odumiru - stacionarna faza. Koncentracija nutrijenata nastavlja opadati dok se koncentracija toksičnih metabolita povisuje i sve veći broj stanica odumire, što se naziva fazom odumiranja. Kratka lag faza ili izostanak iste, može biti rezultat prethodne pripreme stanica za proces fermentacije. Stanice aktivnih suhih kvasca koje se obično koriste u inokulaciji mošta ili masulja, prethodno su umnožene (eksponencijalna faza) i tako pripremljene za inokulaciju. Ove stanice imaju mitohondrije u kojima se odvija proces respiracije, ali i brojne enzime koji sudjeluju u fermentaciji, stoga je potrebno kratko vrijeme da stanice nakon završene respiracije počnu vršiti alkoholnu fermentaciju (Jackson, 2008).



Slika 5. Razvojni ciklus kvasaca (Bogdanović, 2020)

2.3.1. Primjena selekcioniranih kvasaca u proizvodnji vina

U svrhu proizvodnje vina, kvasci roda *Saccharomyces* prvi puta su selekcionirani prije otprilike 80 godina. Osnovni kriterij selekcije je bio - sposobnost provedbe fermentacije do kraja. Ustrajnošću vinarskih instituta, starter kulture su prihvaćene od strane vinara i to najprije kao tekuće starter kulture. Sredinom 1960-ih, razvijene su starter kulture u obliku osušenih stanica kvasaca. Ovakav oblik starter kultura postigao je veliku popularnost među vinarima i zadržao ju sve do danas. Istraživanja provedena 1980-ih godina u području vinarstva temeljila su se na izolaciji kvasaca sa njihovih prirodnih staništa. Neki od kriterija za selekciju kvasaca bili su: sposobnost kompeticije, enološko porijeklo, sposobnost tvorbe hlapivih spojeva sorte arome, tehnike uzgoja i mogućnosti primjene tehnika genetičkog inženjerstva (Specht, 2010).

Nekada se fermentacija provodila primjenom prirodno prisutne mikroflore, a danas većina vinara koristi selekcionirane sojeve kvasaca. Pažljivo se odabire soj kvasaca jer različiti sojevi doprinose različitim karakteristikama budućeg vina. Korištenjem selekcioniranih kvasaca postiže se bolja kontrola procesa fermentacije. Osim toga, brojni drugi aspekti proizvodnje vina mogu biti poboljšani upotrebom sojeva s poboljšanim ili novim karakteristikama. Primjerice, pojedini sojevi mogu izlučivati specifične hidrolitičke enzime ili sudjelovati u stvaranju spojeva koji čine fermentacijsku aromu vina (npr. viši alkoholi i esteri). Također, neki sojevi mogu pojačano izlučivati pektolitičke enzime koji razgrađuju pokožicu bobica grožđa i doprinose naknadnom oslobađanju prekursora arome. U novije vrijeme, selekcija kvasaca je usmjerena u cilju zadovoljavanja potreba potrošača za ekološkom proizvodnjom vina i istraživanjem učinaka vina na zdravlje potrošača. Kao što je već spomenuto, u početku su svi sojevi izolirani direktno sa svojih staništa kao što su površina bobice grožđa, masulj, vino te zidovi i posude u vinariji. Međutim, 1990-ih, istraživanja su usmjerena na tradicionalne biotehnološke metode kao što su križanje i mutageneza. Ove metode molekularne biologije i biotehnologije, dovele su do pristupa koji je omogućio da se ciljanim promjenama specifičnih gena ili funkcija, poboljšaju karakteristike postojećih sojeva. S obzirom da mnogi genetski modificirani sojevi ne mogu provesti fermentaciju do kraja, moraju biti inokulirani zajedno s kvascem *Saccharomyces cerevisiae*. Selekcijom kvasaca uspjela se povećati otpornost nekih kvasaca na stresne uvjete, čime se doprinijelo sveopćem napretku procesa fermentacije. Navedeno se postiglo povećanjem otpornosti prema etanolu, poboljšanom iskorištenju šećera (posebice fruktoze), boljoj asimilaciji dušika, većoj otpornosti prema kvascima koji proizvode tzv. killer toksine i slično. Po završetku alkoholne fermentacije, jako je važno da se kvasci dobro talože na dno posude (Divol i Bauer, 2010).

Kada je riječ o upotrebi komercijalnih sojeva *S.cerevisiae*, postoje određena neslaganja među znanstvenicima. Održavanje biološkog postojanja autohtonih kvasaca koji nisu iz roda *Saccharomyces* je ključno u održavanju jedinstvenosti vina koja potječu od grožđa različitih sorti, bez obzira na brojne prednosti upotrebe komercijalnih starter kultura. Dolazi se do kompromisa tako da se i dalje selekcioniraju novi sojevi kvasaca, sa svim dobrim karakteristikama starter kultura, ali kako bi se zadržala autohtonost, kvasce se izolira iz vinograda koji su najbliže vinariji. Na ovaj način postignuta je kontrola nad nepoželjnim kvascima iz mikroflore i u isto vrijeme, kontrola fermentacije. U svrhu očuvanja raznolikosti među vinima, može se poraditi i na kontroliranoj upotrebi kvasaca koji nisu iz roda *Saccharomyces* (Ciani i Comitini, 2019).

2.3.2. Utjecaj kvasaca na dinamiku fermentacije

Ključna uloga kvasaca u procesu fermentacije očituje se u njihovoj sposobnosti pretvorbe šećera u etanol i ugljikov dioksid. Većina vinara bi se složila kako bez kvasaca ne bi bilo niti vina. Različiti kvasci mogu različito utjecati na dinamiku alkoholne fermentacije, ovisno o njihovim potrebama i sposobnostima. Neki kvasci, zahvaljujući svojim natjecateljskim sposobnostima i otpornosti, mogu nadvladati ostale prisutne mikroorganizme, što je često i prekretnica u odabiru određenog soja kvasca. Pravilnim odabirom i prikladnom upotrebom kvasaca, može se postići raznolikost spojeva arome i okusa kakvu vinar priželjkuje. Postoje značajne razlike između sojeva *Saccharomyces* kada je riječ o tvorbi estera, sumpornih spojeva, spojeva sortne arome, polisaharida, utjecaja manoproteina na hlapivost određenih spojeva i stabilnost pigmenta i polifenola. Stupajući u interakcije s prekursorima arome ili stvarajući vlastite metabolite, tijekom fermentacije, kvasci značajno utječu na aromu budućeg vina. Još jednom je važno napomenuti kako je potrebno odabrati one selekcionirane kvasce koji će se najbolje prilagoditi uvjetima u moštu ili masulju i na taj način iskazati očekivane (deklarirane) karakteristike. Na primjer, kvasci koji dobro podnose niže temperature i fermentiraju u jako izbistrenim moštovima, a koriste se za dobivanje bijelih aromatičnih vina s nižom koncentracijom alkohola, neće fermentirati jednako dobro u uvjetima više temperature, u masulju crnog vina i slično (Specht, 2010).

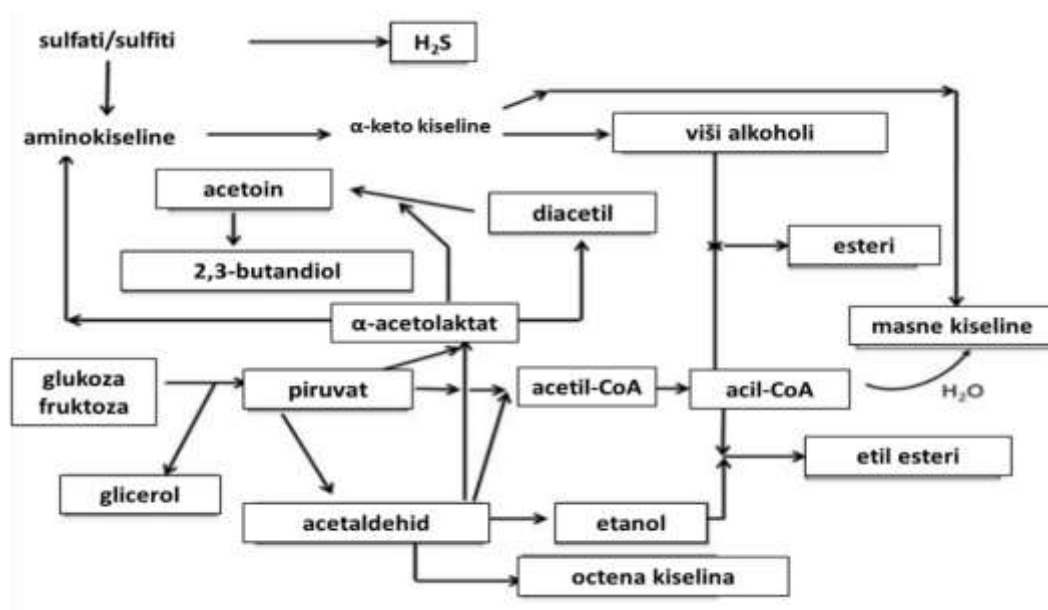
Većina kvasaca koji nisu iz roda *Saccharomyces*, imaju ograničenu sposobnost fermentacije, slabu otpornost na ugljikov dioksid, a neki od njih mogu stvarati visoke koncentracije octene kiseline, etil acetata, acetaldehida i acetoina, koji nepoželjno utječu na senzorske karakteristike vina. Međutim, nekoliko studija je pokazalo kako ovi kvasci ipak mogu imati pozitivan učinak na sastav i kompleksnost arome vina (Ciani i Comitini, 2019).

2.3.3. Utjecaj kvasaca na aromatski sastav vina

Kemijski sastav vina rezultat je djelovanja mikroflora, različitih vrsta fermentacije, sorte grožđa te uvjeta skladištenja i dozrijevanja. Mikroflora odgovorna za odvijanje fermentacije, doprinosi razvoju arome vina putem nekoliko mehanizama:

1. Biotransformacijom spojeva iz mošta u spojeve koji čine aromu ili okus vina
2. Proizvodnjom enzima koji prevode neutralne spojeve iz grožđa u spojeve koji doprinose aromi vina
3. Sami stvaraju primarne (etanol, glicerol, octena kiselina i acetaldehid) i sekundarne (esteri, viši alkoholi, masne kiseline) spojeve fermentacijske arome vina

Tijekom fermentacije, enzim glukozidaza može hidrolizirati glikozidne veze vezanih spojeva i tako osloboditi spojeve koji doprinose aromi. Mnogi spojevi iz grožđa, u masulju postoje u obliku konjugata sa cisteinom, nehlapivi su i ne doprinose mirisu. Upravo kvasci, tijekom fermentacije, oslobađaju te spojeve iz njihovih prekursora. Promatrajući aromatski sastav vina, najveći broj spojeva arome vina (slika 6), nastaje upravo tijekom alkoholne fermentacije, što ne znači da imaju i najveći utjecaj na samu aromu vina (ovisno o senzorskom pragu osjetljivosti). Količinski gledano, produkti glikolize (poput etanola, glicerola i octene kiseline) zastupljeni su u najvećoj mjeri. Kao posljedica klimatskih promjena, dobiva se grožđe s većom koncentracijom šećera što rezultira vinima s većom koncentracijom alkohola. Veća koncentracija šećera, zahtjeva veću otpornost kvasaca na osmotski stres, povećanu koncentraciju etanola, glicerola i octene kiseline (Styger i sur., 2011).



Slika 6. Spojevi fermentacijske arome (Styger i sur., 2011)

Brojne studije su pokazale kako u masulju većinom nema dovoljno nutrijenata potrebnih kvascima za provođenje alkoholne fermentacije, posebice asimilativnog dušika, što je čest uzrok usporavanja ili prekida fermentacije. Stoga je dodatak hrane bogate nutrijentima postao uobičajeni dio prakse kada je riječ od provođenju alkoholne fermentacije. Osim utjecaja na dinamiku alkoholne fermentacije, dodatak nutrijenata utječe i na stvaranje arome tijekom fermentacije. Dva osnovna izvora asimilativnog dušika za kvasce su primarne aminokiseline i amonijak. Ovisno o sposobnosti korištenja dušika, različiti kvasci će različito utjecati na aromatski sastav vina. Najvažniji spojevi arome koji nastaju iz aminokiselina su viši alkoholi, esteri i hlapive masne kiseline. Spojevi koji sadrže sumpor mogu imati pozitivan i negativan utjecaj na aromu. Spojevi poput 3-merkaptiheksanola doprinose voćnim aromama vina, dok sumporovodik daje miris po pokvarenim jajima. Tijekom fermentacije, kvasci sudjeluju u sintezi masnih kiselina iz acetyl-CoA i stvaraju hlapive masne kiseline različitih duljina lanaca. Osim *S.cerevisiae* i drugi kvasci, poput kvasaca iz rodova *Candida*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulasporea*, *Brettanomyces*, *Saccharomyces*, *Pichia* i *Williopsis* sudjeluju u stvaranju fermentacijske arome vina (Styger i sur., 2011).

Viši alkoholi u optimalnim koncentracijama, ispod 300 mg L⁻¹ daju voćne arome vinu, dok u koncentracijama iznad 400 mg L⁻¹, koje uglavnom nastaju uslijed mikrobiološkog kvarenja, daju jake i oštre mirise (Swiegers i Pretorius, 2005). Najznačajniji viši alkoholi su 1-propanol, 1-butanol, *i*-amil alkohol i 2-fenil etanol (Swiegers i sur., 2005). Doprinosu herbalnoj aromi i aromi zelene trave (Waterhouse i sur., 2016).

Tijekom alkoholne fermentacije nastaju dvije skupine estera: etil esteri ravnolančanih masnih kiselina i acetatni esteri viših alkohola. Od etil estera u vinima pronalazimo: etil propionat, etil butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat i etil dekanat (Lambrechts i Pretorius, 2000), dok su najznačajniji acetatni esteri prisutni u vinu: etil acetat i *i*-amil acetat (Wang i sur., 2002).

Masne kiseline nastaju u vinu kao rezultat djelovanja kvasaca i bakterija. Kvasci tijekom alkoholne fermentacije stvaraju male količine kapronske, kaprilne i kaprinske kiseline, koje su karakterističnog mliječnog mirisa (Makhotkina, 2011).

Kako bi se tijekom fermentacije sintetiziralo što više spojeva arome, poduzimaju se postupci poput hladne maceracije, dodaje se određena količina enzima i odabire odgovarajuća vrsta kvasaca, ovisno o tome kakav aromatski sastav vina se želi dobiti. Kako bi se povećala sigurnost da će se dobiti vino željenog aromatskog sastava, može se odabrati odgovarajuća metoda za praćenje aromatskog sastava vina i time osigurati precizno praćenje procesa. U tu svrhu, često

se koristi metoda koja kombinira plinsku kromatografiju sa masenom spektrometrijom (engl. *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, GC/MS) s pripremom uzorka mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME) (Zhang i sur., 2011).

2.4. SORTA PLAVAC MALI

Plavac mali, prikazan na slici 7, je autohtona dalmatinska sorta koja se uzgaja na uskom obalnom području i otocima. Područje uzgoja ove sorte nije veliko, ali se odlikuje specifičnim ekološkim faktorima poput klime, tla i slično. Zahvaljujući brojnim istraživanjima, danas detaljno poznajemo agrobiološke i tehnološke karakteristike ove sorte te na temelju toga možemo reći da je plavac mali visokokvalitetna sorta od koje se proizvode vrhunska vina (Maleš,1998). Istraživanja pokazuju kako je plavac mali potomak sorti dobričić i zinfandel (tribidrag). Ispitivanjem genoma sorti dobričić i zinfandel dokazano je da i ove sorte potječu iz Hrvatske (Maletić i sur., 2004).

Pretpostavlja se da je gospodarski značajan postao potiskivanjem sorte tribidrag, prvenstveno zbog veće tolerantnosti na pepelnicu. Prvi puta se spominje 1821. godine u djelu Riterra von Heintla kao „plavaz mali czerni“. Ova sorta najviše se uzgaja u podregiji srednje i južne Dalmacije, ali i na otoku Krku te podregijama sjeverne Dalmacije i Dalmatinske Zagore. Na području Republike Hrvatske 171 584 ha vinograda zasađeno je plavcem malim, što ga svrstava na treće mjesto prema zastupljenosti u sortimentu u Republici Hrvatskoj (Andabaka i sur., 2016).



Slika 7. Grozd plavca malog (Pejić, 2007)

Plavac mali je crna sorta grožđa koja duže dozrijeva. Blage arome prezrelog grožđa i kože te visoke koncentracije antocijana, odlike su ove sorte. Sjemenke i pokožica bogate su flavan-3-olima, katehinom, epikatehinom i dimerima. Proantocijanidi iz bobice grožđa snažno utječu na gorčinu i trpkocu vina od ove sorte. Često se osjećaj u ustima ovog vina opisuje kao pregrub i jako trpak (Mucalo i sur., 2020).

Jako je dobro prilagođen vrelj mediteranskoj klimi i škrtom tlu, štoviše, punija, snažnija i zdravija vina, odlične kvalitete i dugog životnog vijeka se dobivaju s južnih krševitih padina izloženih suncu, za razliku od plavaca „iz polja“, kako kažu u Dalmaciji, koji daju vina lošije kvalitete. Vina s dobrih položaja obično obiluju taninima, vrlo visokom koncentracijom alkohola (13 - 16 vol %), blago slatkastim okusom te vrlo bogatim i punim tijelom. Miris plavca malog je lako prepoznatljiv, odlikuju ga blage arome trešnje, borovnice i suhih šljiva te mošusne note. Kompleksnija aroma se postiže dozrijevanjem vina u barrique bačvama, a osim arome, mijenja se i okus jer tanini postaju mekši (Vina Croatia, 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Grožđe sorte plavac mali

U svrhu izrade diplomskoga rada, odnosno proizvodnju crnog vina, korišteno je 50 kg grožđa sorte plavac mali, berba 2020.

3.1.2. Kvasci i hrana za kvasce

U cilju provođenja alkoholne fermentacije korišteni su komercijalno dostupni kvasci vrste *Saccharomyces cerevisiae*, različitih karakteristika. Svaki proizvođač, uz proizvode prilaže i upute za njihovo korištenje. Za potrebe ovog diplomskog rada korišteni su kvasci trgovačkog naziva „Red Select“ i „Fructo Select“ te hrana za kvasce „Pinnacle FermiTop“ proizvođača Appinacle te kvasci „AWRI 796“ proizvođača Maurivin (prikazani redom na slici 8). Korišteni kvasci dolaze u obliku dehidriranih stanica i namijenjeni su za proizvodnju crnih vina.



Slika 8. Kvasci i hrana za kvasce korišteni u izradi diplomskog rada (vlastiti izvor)

3.1.2.1. Karakteristike kvasca „Red Select“

Prema uputama proizvođača, ovi kvasci, porijeklom iz Francuske, poboljšavaju boju crnih vina i potiču ekstrakciju polifenola iz soka grožđa, čime zapravo poboljšavaju osjet vina u ustima. „Red Select“ kvasce karakterizira kratka lag faza, sa umjerenom brzinom fermentacije pri 16 - 28 °C. Zahtijevaju dodatak nutrijenata (posebice aminokiselina) u obliku hrane za kvasce kako bi iskazali svoje najbolje karakteristike. Nutrijente se preporuča dodati nakon prve trećine alkoholne fermentacije. Podnose 15 - 16 vol % alkohola te stvaraju malu ili osrednju količinu pjene. Povećavaju hlapivu kiselost do 0,4 g L⁻¹ i do završetka fermentacije mogu proizvesti 30 - 40 mg L⁻¹ ukupnog sumpora.

3.1.2.2. Karakteristike kvasca „Fructo Select“

Ovi kvasci, porijeklom iz Italije, koriste se u proizvodnji crnih vina s visokom koncentracijom alkohola (16 - 18 vol %), koja se zbog toga mogu čuvati kroz dulji vremenski period. U ovakvim vinima nastoji se, što je više moguće, smanjiti hlapiva kiselost. U svom životnom ciklusu, ovi kvasci prolaze kroz kratku lag fazu, a najbrže fermentiraju pri 16 - 32 °C. Kao i kod prethodno opisanih kvasaca, preporuča se u obliku hrane za kvasce dodati nutrijente kako bi kvasci sa sigurnošću mogli fermentaciju provesti do kraja. Stvaraju malu količinu pjene, povećavaju hlapivu kiselost do 0,3 g L⁻¹, a do kraja fermentacije mogu povećati koncentraciju ukupnog sumpora za 20-30 mg L⁻¹. „Fructo Select“, kao i „Red Select“, može proizvesti tzv. „killer-toksine“ koji mogu tijekom fermentacije usmjeriti u neželjenom pravcu.

3.1.2.3. Karakteristike kvasca „Awri 796“

Ukoliko se želi proizvesti vino neutralnih karakteristika, to jest vino zadržanih prirodnih karakteristika, proizvođač preporuča koristiti ovu vrstu selekcioniranih vinskih kvasaca. S obzirom da stvaraju male količine tvari koje doprinose aromi i okusu vina, idealni su za proizvodnju vina izraženih sortnih karakteristika. Crnim vinima daju aromu kupina, šljiva i groždica. Nakon kratke lag faze, najbrže fermentiraju pri 20 - 30 °C. Ukoliko se fermentacija odvija pri nižoj temperaturi (15 - 18 °C), mogu stvoriti visoke koncentracije alkohola uz preporuku da se temperatura do kraja fermentacije povisi iznad 15 °C. Dobro podnose alkohol (14,5 - 15,5 vol %), mogu podići hlapivu kiselost do 0,3 g L⁻¹, stvaraju malu količinu pjene i odlično se talože nakon fermentacije.

3.1.2.4. Hrana za kvasce „Pinnacle FermiTop“

Hranu za kvasce čine nutrijenti izolirani iz autoliziranih stanica kvasaca. U hrani se mogu pronaći nutrijenti poput aminokiselina, vitamina, minerala, nezasićenih masnih kiselina i sterola, koji pomažu provođenje fermentacije do kraja i postizanje željenih senzorskih karakteristika određenog vina. Hrana dolazi u obliku sitnih granula koje se mogu odmah dozirati u mošt bez prethodne rehidracije. Preporuča se hranu dodati nakon prve trećine alkoholne fermentacije, a preporučena doza je 25 - 40 g hL⁻¹.

3.1.3. Kemikalije

- 0,1 M NaOH (Kefo d.o.o., Sisak, Hrvatska)
- Sumporna kiselina 1/3 (941) (Laboratoires Dujardin-Salleron, Noizay, Francuska)
- Natrijev hidroksid 2N (908) (Laboratoires Dujardin-Salleron, Noizay, Francuska)
- Sumporna kiselina 1/10 (932) (Laboratoires Dujardin-Salleron, Noizay, Francuska)
- Jodid/jodat N/64 (921) (Laboratoires Dujardin-Salleron, Noizay, Francuska)
- Kalijev metabisulfit (Vrelko d.o.o., Kaštel Stari, Hrvatska)
- L(+)-vinska kiselina, p.a. (Fisher Scientific, New Hampshire, SAD)
- Natrijev klorid, čistoće > 99,5 % (Carlo Erba, Vale de Reuil, Francuska)
- n-amil alkohol, čistoće > 99 % (interni standard) (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

3.1.4. Uređaji i oprema

- pH-metar, inoLab 7110 basic (WTW, Weilheim, Njemačka)
- Moštomjer po Baboou (T-20 °C) (MAR-TRADE d.o.o., Novi Marof, Hrvatska)
- Uređaj za određivanje slobodnog i ukupnog sumporovog dioksida, Sulfilyser (Laboratoires Dujardin-Salleron, Noizay, Francuska)
- Analitička vaga ($\pm 0,0001$ g) (Metler Toledo, Columbus, SAD)
- Plinski kromatograf, Agilent Technologies 6890 Network GC System (Agilent, Santa Clara, SAD)
- Maseni spektrometar, Agilent Technologies 5973 *Inert* Mass Selective Detector (Agilent, Santa Clara, SAD)
- Termoblok s magnetskom mješalicom, Reacti-Therm, Heating/Stirring module, No. 18971 (Pierce, Rockford, IL, SAD)
- Mikropipete od 100 i 1000 μ L (Eppendorf, Hauppauge, SAD)

- Plastične posude za grožđe od 120 L
- Stakleni demižoni od 5 L
- Menzura od 100 mL
- Termometar
- Laboratorijske čaše od 50 mL, 100 mL i 250 mL
- Bacto boce od 100 mL
- Graduirana pipeta od 10 mL
- Magnet za miješanje
- SPME vlakno, 100 μm PDMS, 23 Ga (Supelco, Bellefonte, SAD)
- HSS bočice od 20 mL (Restek, Bellefonte, SAD)
- Silikonski čepovi za HSS bočice (Düren, Njemačka)
- Kolona za kromatografiju BP20 (50 m x 220 μm x 0,25 μm) (SGE Analytical Science, Victoria, Australija)

3.2. METODA

3.2.1. Metoda proizvodnje crnog vina sorte plavac mali primijenjena u ovom eksperimentalnom radu

Prerada 50 kg grožđa sorte plavac mali započinja 10. studenog 2020. Kako bismo organizirali preradu, bilo je potrebno izračunati iskorištenje grožđa odnosno masulja :

- ISKORIŠTENJE GROŽĐA (60 %) = 50 kg grožđa x 0,60 = 30 L masulja
- ISKORIŠTENJE MASULJA (60 %) = 30 L masulja x 0,60 = 18 L vina

Prvi dan prerade, provedeno je muljanje-ruljanje kako bi se uklonila peteljka, oštećene bobice grožđa, lišće, grančice i slično. Masulj je raspodijeljen u velike plastične posude od 120 L u kojima se provodila maceracija s alkoholnom fermentacijom. Isti dan su izmjereni fizikalno-kemijski parametri dobivenog masulja i dodan sumpor kako bi se spriječila oksidacija masulja. Također je dodana i vinska kiselina radi korekcije vrijednosti ukupne kiselosti na 5 g L⁻¹. Sumpora je dodano u količini da se postigne vrijednost od 50 mg L⁻¹ ukupnog sumporovog dioksida u masulju. Kako bismo započeli alkoholnu fermentaciju masulja, prvi dan prerade je bilo potrebno dodati i odabrane vinske kvasce. Količina od 30 L masulja podijeljena je u 3 posude s obzirom da će se pratiti tijekom alkoholne fermentacije upotrebom 3 kvasca roda *Saccharomyces* različitih karakteristika. Posude su označene oznakama: CRNO 1, CRNO 2 i CRNO 3 te su te oznake korištene do kraja eksperimentalnog rada (tablica 1).

3.2.1.1. Priprema kvasaca

Odabrana je preporučena doza kvasca od 30 g hL⁻¹. Kvasci su najprije rehidratirani u 10 puta većoj količini vode, temperature 35 - 40 °C. Nakon 15 minuta, dodano je mošta u količini 20 puta većoj od količine kvasaca, odnosno 60 mL pazeći pri tome da razlika u temperaturi mošta u odnosu na temperaturu kvasaca i vode ne bude veća od 10 °C. Nakon još 15 minuta, pripremljeni kvasci su dodani u odgovarajuće posude s masuljem.

Tablica 1. Prikaz korištenih oznaka vina i trgovačkih naziva kvasaca upotrijebljenih u pojedinačnom ekperimentalnom vinu

OZNAKA VINA	TRGOVAČKI NAZIV KVASCA <i>S. cerevisiae</i>
CRNO 1	Red Select
CRNO 2	Fructo Select
CRNO 3	Awri 796

3.2.1.2. Praćenje tijekom alkoholne fermentacije

Nakon što je prošlo 24 sata otkako su kvasci dodani u masulj, započelo se s praćenjem tijekom alkoholne fermentacije mjerenjem temperature masulja i koncentracije šećera. S obzirom da je grožđe dan prije predviđene prerade bilo odmrznuto i da je masulj bio niske temperature, fermentacija je započela nešto kasnije od 24 sata od dodatka kvasaca te su prvi parametri izmjereni 12. studenog 2020. Mjerenje je provedeno korištenjem moštomjera po Baboo-u (slika 9) koji je baždaren na 20 °C. Dobivene koncentracije šećera su pomoću Salleronove tablice preračunate u koncentraciju šećera u g L⁻¹ i potencijalnu koncentraciju alkohola u volumnim postocima. Uz pretpostavku da će fermentacija trajati najviše 7 dana i da se hrana za kvasce treba dodati nakon jedne trećine fermentacije, 14. studenog je dodana hrana za kvasce u količini od 30 g hL⁻¹. Tijek alkoholne fermentacije praćen je od 11. do 17. studenog 2020., nakon čega je uslijedio postupak prešanja.



Slika 9. Moštomjer po Baboo-u (vlastiti izvor)

Nakon što je alkoholna fermentacija završena, masulj je isprešan na mehaničkoj preši, a mlado vino prebačeno u staklene demižone od 5 L, označene ponovno odgovarajućim oznakama. Istoga dana, provedena je i fizikalno-kemijska analiza vina, te napravljena korekcija slobodnog sumporovog dioksida na 25 mg L^{-1} kako bi vino bilo zaštićeno od oksidacijskog i mikrobiološkog kvarenja. Potom je određena količina pojedinog vina posebno izdvojena u bacto boce od 100 mL za potrebe analize aromatskog sastava.

3.2.2. Fizikalno-kemijska analiza mošta i vina

3.2.2.1. Određivanje topljive suhe tvari aerometrom (moštomjerom)

Princip metode

Ova fizikalna metoda temelji se na činjenici da 90 - 94 % suhe tvari mošta čine ugljikohidrati i na principu Arhimedova zakona prema kojemu je sila uzgona funkcija gustoće tekućine.

Skale koje se koriste u vinarstvu daju količinu šećera u stupnjevima koji obično dobivaju naziv prema tvorcu skale. Na primjer, Klosterneuburger skala po Babo-u-^oBa (^oKI); Oechsle-ovi stupnjevi - ^oOe. Babo-ov moštomjer izražava sadržaj šećera u masenim postocima tj. stavlja u odnos masu otopljene tvari (šećera) sa masom otopine (mošta) x 100.

^oBa= koliko grama šećera ima u 100 g mošta

Ukoliko se šećer u moštu mjeri na ovaj način, važno je napomenuti da gustoća mošta ovisi o njegovoj temperaturi. Svaki moštomjer je baždaren pri određenoj temperaturi i ukoliko izmjerena temperatura odstupa od temperature na kojoj je moštomjer baždaren, potrebno je izvršiti korekciju očitane vrijednosti. Za preračunavanje stupnjeva u masenu koncentraciju šećera u g L^{-1} mogu se koristiti Salleronove ili Oechslove tablice. Na osnovu očitane količine šećera, pomoću Salleronovih tablica može se procijeniti potencijalnu koncentraciju alkohola u budućem vinu, izraženu u vol % (Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2020).

Postupak određivanja

Uliti mošt u menzuru od 100 mL do vrha. U menzuru s uzorkom uroniti moštomjer te očitati vrijednosti šećera i temperature.

3.2.2.2. Određivanje ukupne kiselosti mošta i vina

Princip metode

Ova metoda temelji se na potenciometrijskoj titraciji uzorka s otopinom natrijevog hidroksida. Ovom otopinom će se neutralizirati sve organske i anorganske kiseline i njihove soli te druge kisele tvari. Iz utroška otopine natrijeva hidroksida izračunava se ukupna kiselost, koja se izražava kao g L^{-1} vinske kiseline (Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2020).

Postupak određivanja

Otpipetirati 10 mL uzorka u laboratorijsku čašu. U čašu s uzorkom uroniti pH-metar i uz lagano miješanje uzorak titrirati s 0,1 M NaOH do $\text{pH}=7,00$.

Izračunavanje ukupne kiselosti

$$\text{Ukupna kiselost (g L}^{-1}\text{)} = 0,75 \times a \times f$$

0,75 – faktor za preračunavanje kiselosti u vinsku kiselinu

a – volumen (mL) 0,1 M NaOH utrošenog za neutralizaciju

f – faktor 0,1 M NaOH ($f=1,000$)

3.2.2.3. Određivanje slobodnog i ukupnog sumporovog dioksida

Princip metode:

Mjerenje je provedeno pomoću uređaja za mjerenje sumporovog dioksida - LDS Sulfilyser (slika 10), titracijom otopinom jodid/jodata, pri čemu se jod reducira, a sumporov dioksid oksidira, uz potenciometrijsko određivanje krajnje točke titracije pomoću LED indikatora (Prehrambeno-biotehnološki fakultet, 2020).



Slika 10. Uređaj za određivanje slobodnog i ukupnog sumporovog dioksida u vinu (vlastiti izvor)

Postupak određivanja slobodnog sumporovog dioksida

U staklenu čašu od 50 mL otpipetirati 25 mL uzorka vina i 5 mL komercijalne otopine sulfatne kiseline koncentracije 1/3. Zatim u čašu staviti magnet za miješanje te čašu postaviti na uređaj. Potom u čašu s uzorkom spustiti elektrodu te uključiti miješanje. Titraciju provesti komercijalnom otopinom jodid/jodata N/64, kojeg je potrebno dodavati u intervalima od 1 sekunde pritiskom na titracijsku tipku uređaja, sve do pojave crvenog LED signala koji se zadržava kroz 5 sekundi, što označava kraj titracije.

Izračun:

Utrošak otopine jodid/jodata pomnožiti s faktorom 20, te dobivenu vrijednost slobodnog SO₂ izraziti u mg L⁻¹.

Postupak određivanja ukupnog sumporovog dioksida

U staklenu čašu od 50 mL otpipetirati 10 mL uzorka vina i 2 mL 2N komercijalne otopine lužine. Nakon što je prošlo 5 minuta u čašu dodati 20 mL komercijalne otopine sulfatne kiseline koncentracije 1/10 i magnet za miješanje te čašu postaviti na uređaj. Potom u čašu spustiti elektrodu te uključiti miješanje. Titraciju provesti komercijalnom otopinom jodid/jodata N/64, kojeg je potrebno dodavati u intervalima od 1 sekunde pritiskom na titracijsku tipku uređaja, sve do pojave crvenog LED signala koji se zadržava kroz 5 sekundi, što označava kraj titracije.

Izračun:

Utrošak otopine jodid/jodata pomnožiti s faktorom 50, pri čemu dobivenu vrijednost slobodnog SO₂ izraziti u mg L⁻¹.

3.2.3. Određivanje arome vina plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS)

Princip metode

Strujom inertnog plina (plina nosioca) se u kromatografsku kolonu uvodi određena količina ispitivane smjese. U koloni se sastojci smjese razdjeljuju između adsorbensa (nepokretna faza) i plina nosioca (pokretna faza). Po izlasku iz kolone, na detektoru se bilježi prisutnost odijeljenih sastojaka smjese u plinu nosiocu. Detektor je uređaj koji u obliku kromatograma registrira količinu eluiranog sastojka kao funkciju vremena.

Postupak provedbe i uvjeti GC/MS analize

Najprije je potrebno pripremiti uzorak mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPME), što se provodi u termobloku s magnetskom miješalicom prikazanom na slici 11.



Slika 11. Termoblok s magnetskom mješalicom (vlastiti izvor)

U tikvicu od 50 mL otpipetirati dio uzorka, zatim mikropipetom dodati interni standard - n-amil alkohol, u koncentraciji od 20 mg L^{-1} te tikvicu nadopuniti uzorkom do oznake. Potom u HSS bočicu odvagati 2g NaCl te dodati 10 ml uzorka iz tikvice s internim standardom. Zatim provesti mikroekstrakciju na čvrstoj fazi pri 40°C , kroz 30 minuta i konstantno miješanje. Nakon 30 minuta, vlakno prenijeti u injektor plinskog kromatografa gdje se vrši desorpcija kroz 5 minuta.

Uvjeti rada plinskog kromatografa bili su sljedeći:

- temperatura injektora: 250°C
- temperatura detektora: 280°C
- temperaturni program: 40°C , 5 minuta $\rightarrow 200^\circ\text{C}$, $3^\circ\text{C}/\text{min}$ $\rightarrow 240^\circ\text{C}$, $30^\circ\text{C}/\text{min}$
- plin nosioc: He
- protok plina nosioca: $1,2 \text{ mL min}^{-1}$
- „splitless mode“ injektiranja (Tomašević i sur., 2017).

Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome

Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome provedena je kompjuterskom obradom podataka dobivenih pomoću plinskog kromatografa s masenim spektrometrom (prikazanog na slici 12), odnosno dobivenog kromatograma, u programu Enhanced Chemstation (Agilent

Technologies), dok je analiza rezultata provedena u programu Microsoft Excel (Office 2010). Spojevi arome identificirani su usporedbom retencijskih vremena (vrijeme između injektiranja i izlaska određenog spoja iz kolone) sa onima dobivenim analizom standarada. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednja vrijednost dvije paralele te je izračunata standardna devijacija za svaki detektirani spoj u vinu, a rezultati su izraženi u mg L^{-1} .



Slika 12. Plinski kromatograf s masenim spektrometrom (vlastiti izvor)

4. REZULTATI I RASPRAVA

Veliki je broj faktora koji utječu na kvalitetu grožđa, a posljedično i na kvalitetu vina. Proces vinifikacije je dug, njime se iz grožđa dobiva mlado vino, koje nakon toga dozrijeva i stari kroz određeni vremenski period ovisno o vrsti vina. Tijekom cijelog vijeka trajanja vina, ono je izloženo brojnim promjenama i zahtjeva veliku pažnju i tijekom čuvanja.

U ovome radu, istražen je utjecaj jednog od najvažnijih koraka procesa proizvodnje vina na njegovu kvalitetu - alkoholne fermentacije, kojom se mošt/masulj pretvara u vino. Alkoholna fermentacija je proces vođen djelovanjem mikroorganizama, prvenstveno kvasaca. Oni pretvaraju šećere (glukozu i fruktozu) u etanol, ugljikov dioksid i energiju (toplinu). Kako bi se dobilo vino željenih karakteristika, ključno je odabrati određenu vrstu kvasca.

Upravo je ovim radom istraženo kako i na koji način 3 kvasca vrste *Saccharomyces cerevisiae*, različitih karakteristika, utječu na :

- fizikalno - kemijske parametre mošta (tablica 2) i vina (tablica 3)
- dinamiku alkoholne fermentacije (slike 13, 14 i 15)
- aromatski sastav vina (tablica 4 te slike 16, 17 i 18).

S obzirom da glavnina spojeva arome vina nastaje upravo tijekom alkoholne fermentacije, provedena je identifikacija i kvantifikacija glavnih predstavnika fermentacijske arome vina - estera, viših alkohola i hlapivih masnih kiselina.

4.1. REZULTATI I RASPRAVA FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE VINA

Tablica 2. Rezultati fizikalno-kemijske analize mošta

OZNAKA	KONCENTRACIJA ŠEĆERA [g L ⁻¹]	UKUPNA KISELOST [g L ⁻¹]	pH	UKUPNI SO ₂ [mg L ⁻¹]	SLOBODNI SO ₂ [mg L ⁻¹]
CRNO 1	223,5	3,6	3,9	64	19
CRNO 2	222,3	3,9	4,0	70	20
CRNO 3	223,5	3,7	3,8	59	18

Prije dodatka kvasaca, izmjereni su fizikalno - kemijski parametri mošta, prikazani u tablici 2. Iz tablice 2 je vidljivo kako su sva tri mošta podjednakih karakteristika, što je i očekivano jer se radi o istom masulju, razdijeljenom u tri posude. Ovi podaci su izmjereni kako bi se nakon završene alkoholne fermentacije utvrdilo postoje li razlike između vina, u mjerenim parametrima, s obzirom na upotrebu 3 kvasca različitih karakteristika.

Tablica 3. Rezultati fizikalno-kemijske analize vina nakon završene alkoholne fermentacije

OZNAKA	KONCENTRACIJA ŠEĆERA [g L ⁻¹]	UKUPNA KISELOST [g L ⁻¹]	pH	UKUPNI SO ₂ [mg L ⁻¹]	SLOBODNI SO ₂ [mg L ⁻¹]
CRNO 1	< 2	6,9	3,6	60	8
CRNO 2	< 2	6,8	3,6	62	10
CRNO 3	< 2	8,6	3,4	56	9

Nakon završene alkoholne fermentacije, iz tablice 3, možemo uočiti veliki pad koncentracija šećera u odnosu na koncentracije šećera u moštovima, što je očekivano s obzirom da je poznato kako kvasci koriste šećere da bi proveli fermentaciju. Također vidimo kako sva 3 kvasca fermentiraju do suha po tome što je koncentracija šećera u vinima manja od 2 g L⁻¹.

Šećeri se uobičajeno nazivaju ugljikohidratima, a u vinu su najzastupljenije glukoza i fruktoza. Tijekom alkoholne fermentacije iz glukoze i fruktoze nastaju etanol i drugi nusprodukti, stoga zaključujemo kako imaju ulogu prekursora. Kako bi nastao barem 1 vol % etanola, potrebno je da kvasci fermentiraju barem 16,5 – 18,0 g L⁻¹ šećera. Suha vina uglavnom sadrže fruktozu jer će većina kvasaca radije fermentirati glukozu. Osim što su prekursori etanola, ugljikohidrati su i prekursori organskih kiselina. Tako glukoza tijekom glikolize djeluje kao prekursor limunske, jabučne i jantarne kiseline, dok je u pentoza-fosfatnom putu prekursor vinske i šikiminske kiseline. Također su i prekursori polifenola te aromatskih aminokiselina poput tirozina, fenilalanina i triptofana (Ribéreau-Gayon i sur.,2006).

Kada je riječ o proizvodnji suhih vina, jedan od osnovnih ciljeva proizvodnje je provesti fermentaciju do kraja. Drugim riječima, cilj je proizvesti vino sa vrlo niskom koncentracijom šećera (manje od 5 g L⁻¹ šećera), iz masulja koji sadrži 180 - 250 g L⁻¹ šećera. Pojedini faktori poput previsoke koncentracije šećera, preniska ili previsoka temperatura, inhibitorne tvari poput botriticina, nedostatak asimilativnog dušika, kisika ili vitamina, mogu dovesti do usporavanja ili prekida fermentacije (Divol i Bauer, 2010).

Najzastupljenije organske kiseline u moštu i vinu su vinska, jabučna, limunska, jantarna i mliječna kiselina. Ovisno o koncentraciji u kojoj su prisutne, mogu direktno utjecati na pH vrijednost vina, koja određuje mikrobiološku stabilnost vina, tijekom jabučno-mliječne fermentacije te koncentracije slobodnog i ukupnog sumporovog dioksida. Realna kiselost (pH) predstavlja koncentraciju slobodnih vodikovih iona u moštu ili vinu, a ovisi o koncentraciji ukupnih kiselina i njihovom stupnju disocijacije, no pH vrijednost ipak nije direktno proporcionalna koncentraciji ukupnih kiselina. Vinska kiselina, kao najzastupljenija kiselina u vinu, stabilna je prema djelovanju mikroorganizama, no njezina koncentracija se može promijeniti uslijed taloženja njezinih soli ili postupcima zakiseljavanja/otkiseljavanja vina. Ukupna kiselost crnih vina obično je niža nego kod bijelih vina (Comuzzo i Battistutta, 2019). Za većinu bijelih vina, pH se kreće između 3,1-3,4, dok se za većinu crnih vina kreće između 3,3-3,6. (Jackson, 2008).

Koristeći i najsuremenije tehnike, teško je predvidjeti ukupnu kiselost vina na temelju kiselosti masulja iz kojeg će vino biti proizvedeno. Neki mikroorganizmi, posebice bakterije, mogu koristiti organske kiseline iz masulja, dok ih drugi mogu stvarati tijekom fermentacije i tako povisiti ukupnu kiselost vina (npr. mliječna i jantarna kiselina) (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Navedeno stoga, uz zakiseljavanje koje smo proveli kako bismo povisili ukupnu kiselost na 5 g L⁻¹, može biti uzrok dodatnog porasta ukupne kiselosti u eksperimentalnom vinu.

Prema Pravilniku o proizvodnji vina (2005), ukupna kiselost vina u prometu mora biti najmanje 4 g/L, izraženo kao vinska kiselina, a najviše do 14 g/L. Prema sadržaju neprevrelog šećera, vino u prometu može biti : suho vino do 4 g L⁻¹, polusuho vino 4 – 12 g L⁻¹, poluslatko vino 12 – 50 g L⁻¹, slatko vino više od 50 g L⁻¹.

Prema navedenim podacima, zaključujemo da su vina proizvedena u skladu s Pravilnikom o proizvodnji vina (2005) po pitanju koncentracije ukupnih kiselina te da se radi o suhom vinu. S obzirom da se radi o crnim vinima, povišena ukupna kiselost vina može se smanjiti provedbom jabučno-mliječne fermentacije tzv. biološko otkiseljavanje ili otkiseljavanjem kalcijevim karbonatom.

Koncentracije slobodnog i ukupnog SO₂ su se snizile s obzirom da masulj nije bio sumporen za vrijeme fermentacije kako sumpor ne bi inhibirao kvasce i tako doveo do prekida alkoholne fermentacije.

U vinu u koje nije dodavan sumpor, nakon alkoholne fermentacije, mogu se pronaći niske koncentracije ukupnog SO₂ (obično 10 - 20 mg L⁻¹) kao rezultat tvorbe SO₂ tijekom biosinteze aminokiselina. Koncentracije slobodnog SO₂ su nakon fermentacije često ispod granice detekcije jer se većina SO₂ veže na acetaldehid i druge spojeve koji nastaju tijekom fermentacije, čime nastaje vezani SO₂. Uobičajeno će dodatak od 10 mg L⁻¹ SO₂ rezultirati porastom vrijednosti ukupnog SO₂ od 5 mg L⁻¹ kao rezultat vezanja SO₂ na acetaldehid. Sumpor se uglavnom dodaje prije ili nakon fermentacije, najčešće u obliku kalijeva metabisulfita ili plinovitog SO₂. Koncentracija ukupnog SO₂ se u većini vina kreće između 60 i 80 mg L⁻¹ (Waterhouse i sur., 2016).

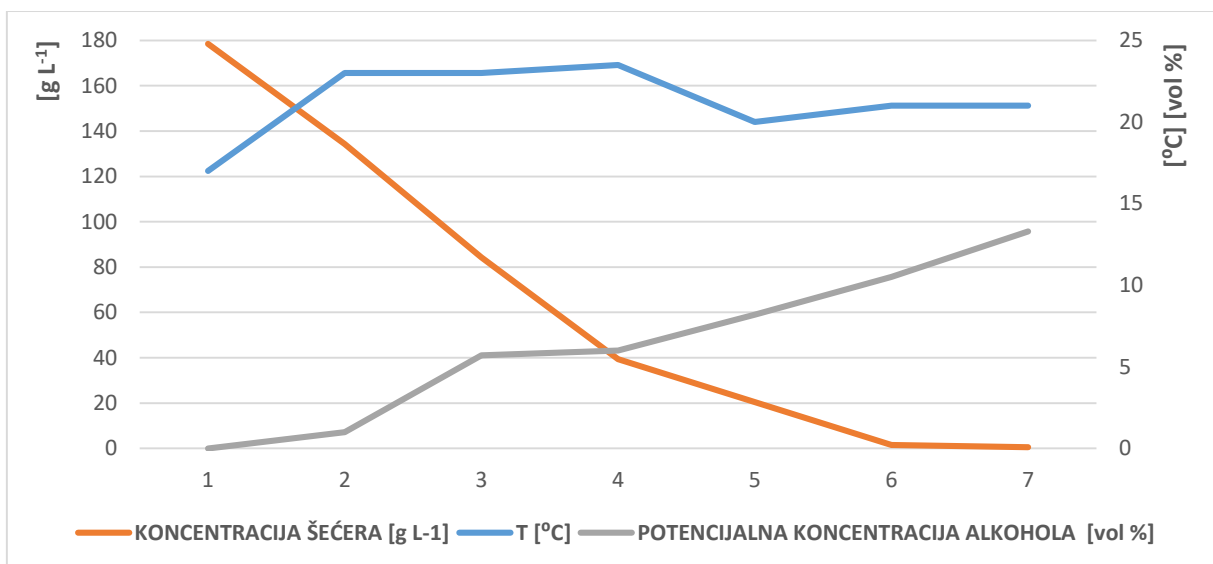
Koliko će se sumpora izgubiti ovisi o uvjetima čuvanja vina. Vina čuvana u hladnijim podrumima u velikim spremnicima s minimalno otpražnjenim prostorom, mogu izgubiti do 5 mg L⁻¹ slobodnog SO₂ u mjesecu. S druge strane vina čuvana u toplijim podrumima i često otvaranim spremnicima, mogu izgubiti i više od 20 mg L⁻¹ u mjesecu. Potrebno je vršiti mjerenje koncentracije slobodnog SO₂ barem jednom u mjesecu jer upravo slobodni SO₂ štiti vino od kvarenja (Kojić, 2019).

Prema rezultatima prikazanim u gore navedenim tablicama 2 i 3, dolazi se do zaključka kako upotreba kvasaca vrste *S.cerevisiae*, različitih karakteristika ne uzrokuje značajne razlike u

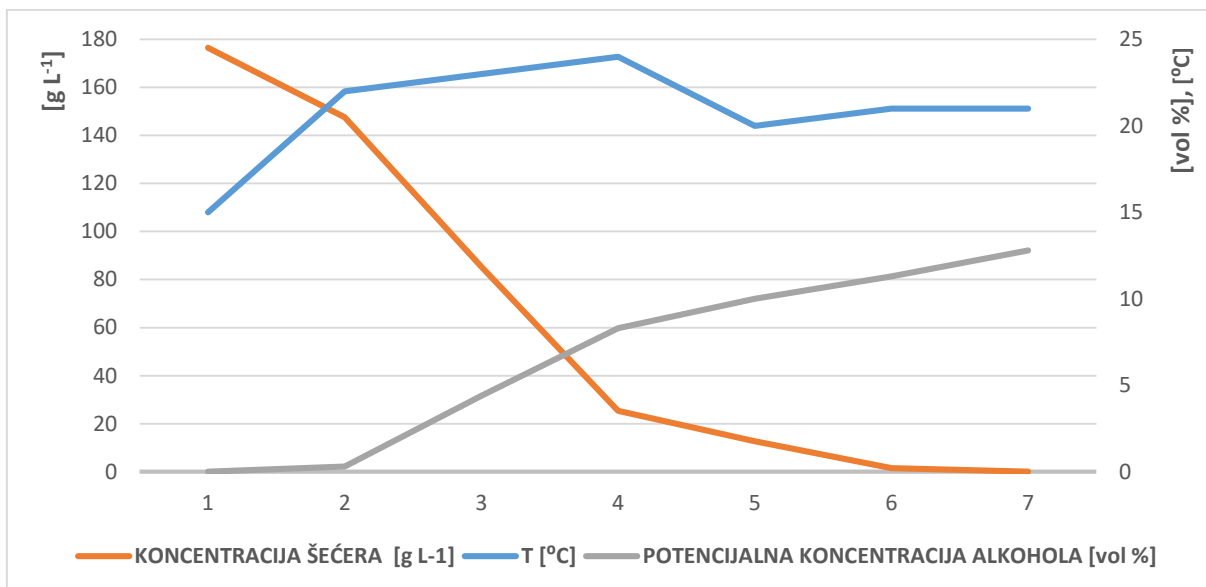
praćenim fizikalno - kemijskim parametrima vina, osim što u vinu CRNO 3 vidimo kako je ukupna kiselost porasla nešto više nego u ostala dva vina, te je ujedno pH vrijednost bila niža.

4.2. REZULTATI I RASPRAVA PRAĆENJA DINAMIKE ALKOHOLNE FERMENTACIJE

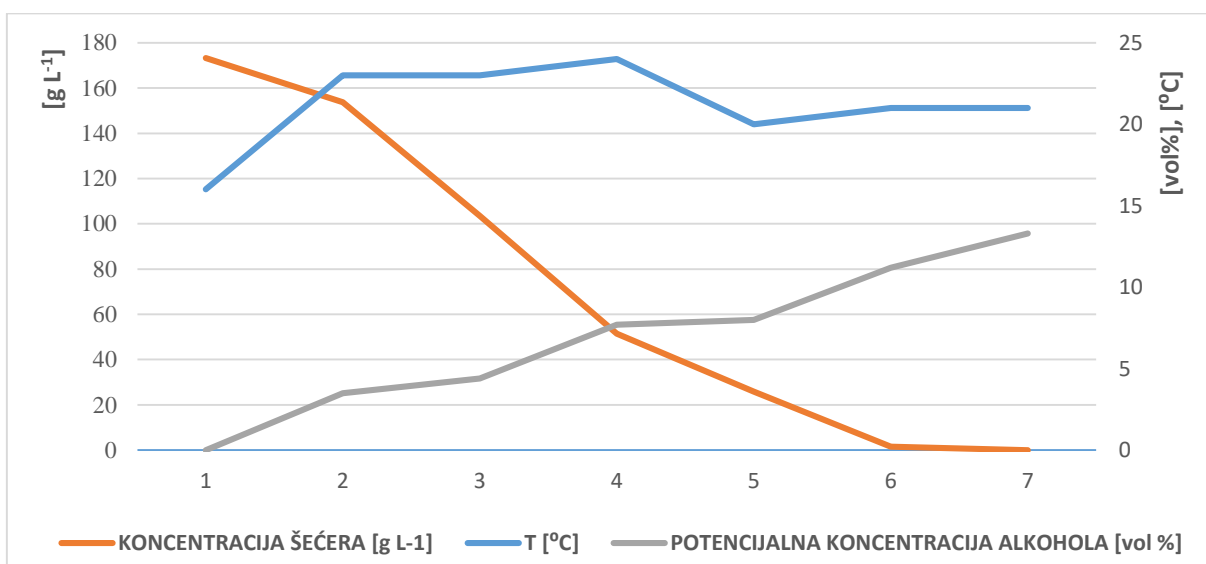
Osnovni pokazatelji dinamike alkoholne fermentacije su potrošnja šećera i temperatura. Uz ova dva pokazatelja prati se i sinteza alkohola etanola, koji je uz CO₂ glavni produkt alkoholne fermentacije. Tijekom 7 dana, koliko je trajala alkoholna fermentacija, jedanput dnevno su mjereni spomenuti pokazatelji. Na temelju dobivenih podataka, izrađeni su grafički prikazi dinamike alkoholne fermentacije (slike 13, 14 i 15) tako da se na os apscisa stavi vrijeme u danima, a na osi ordinata koncentracija šećera u g L⁻¹, koncentracija etanola u vol % i temperatura u °C.



Slika 13. Grafički prikaz dinamike alkoholne fermentacije vina CRNO 1



Slika 14. Grafički prikaz dinamike alkoholne fermentacije vina CRNO 2



Slika 15. Grafički prikaz dinamike alkoholne fermentacije vina CRNO 3

Promatrajući promjene koncentracija šećera u vinima, vidljivo je kako do četvrtog dana fermentacije, najmanje šećera zaostaje u vinu CRNO 2 (oko 25 g L⁻¹), nešto više u vinu CRNO 1 (oko 40 g L⁻¹) te najviše u vinu CRNO 3 (oko 50 g L⁻¹). Zaključujemo kako kvasac upotrijebljen za fermentaciju vina CRNO 2 (Fructo Select) fermentira najbrže u prvih 4 dana fermentacije, dok kvasac upotrijebljen u vinu CRNO 3 (Awri 796) duplo sporije od njega. Shodno tomu, očekivano je da fermentacija završi najprije u vinu CRNO 2, no već šestog dana fermentacije vidimo kako u sva tri vina koncentracija šećera dostiže vrijednosti ispod 4 g L⁻¹,

što ipak dovodi do zaključka kako sva tri upotrijebljena kvasca fermentiraju jednako dugo, samo drukčijom dinamikom.

Dok koncentracija šećera opada, koncentracija alkohola etanola raste, što se uobičajeno događa tijekom alkoholne fermentacije. U sva tri vina je nastalo oko 13 vol % alkohola. Prema tome, može se zaključiti kako nema razlike u kvascima u pogledu količine stvorenog etanola, ali ipak svaki od kvasaca slijedi svoju dinamiku produkcije alkohola. Ovdje se radi o potencijalnoj koncentraciji alkohola koja se izračunava iz koncentracije šećera pomoću Salleronove tablice.

Prirodna volumna alkoholna jakost kvalitetnih vina, osim pjenušavih, biser i likerskih vina ne može biti manja od 10 vol % u zoni C3 (sjeverna, srednja i južna Dalmacija), stoga proizvedeno vino zadovoljava prema koncentraciji minimalne prirodne volumne alkoholne jakosti (Pravilnik, 2005).

U početku alkoholne fermentacije dolazi do zamućenja, stvaraju se mjehurići i pjena te započinje vrenje pa temperatura može porasti za 10 - 20 °C, što je i vidljivo u prva dva dana fermentacije. Temperatura se kasnije u svim vinima kretala između 20 - 25 °C (slike 13 - 15).

Fizikalno-kemijski parametri (koncentracija alkohola, ukupna kiselost, pH) proizvedenog vina, približni su rezultatima fizikalno-kemijske analize vina sorte plavac mali, uzgojenog na otocima Korčuli i Visu, dobivenih u sklopu istraživanja Jagatić Korenika i sur. (2021).

4.3.REZULTATI I RASPRAVA AROMATSKOG SASTAVA VINA

Kako glavna spojeva arome vina nastaje upravo tijekom alkoholne fermentacije, provedena je identifikacija i kvantifikacija glavnih spojeva fermentacijske arome - estera, viših alkohola i hlapivih masnih kiselina kako bi se utvrdilo postoje li razlike između kvasaca u pogledu stvaranja ovih spojeva. Unutar pojedine skupine, ističu se predstavnici koji najznačajnije doprinose aromi zbog najveće zastupljenosti u vinu (npr. etil acetat od estera).

Tablica 4. Rezultati analize arome vina dobiveni na plinskom kromatografu s masenim spektrometrom (GC/MS)

NAZIV SPOJA	NAZIV UZORKA		
	CRNO 1	CRNO 2	CRNO 3
ESTERI (mg L⁻¹)			
Etil acetat	42,75 ± 0,07	50,52 ± 0,10	82,95 ± 0,78
Etil butirat	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,00	0,16 ± 0,00
<i>i</i> -amil acetat	1,18 ± 0,02	0,45 ± 0,04	1,19 ± 0,08
Etil heksanoat	0,55 ± 0,01	0,43 ± 0,05	0,51 ± 0,08
Etil oktanoat	0,73 ± 0,02	0,61 ± 0,10	0,58 ± 0,16
Etil dekanat	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,02
Dietil sukcinat	3,48 ± 0,05	1,88 ± 0,21	3,75 ± 0,30
2-feniletal acetat	0,08 ± 0,00	0,15 ± 0,01	0,48 ± 0,02
VIŠI ALKOHOLI (mg L⁻¹)			
<i>i</i> -butanol	72,82 ± 0,03	39,92 ± 0,71	59,06 ± 0,95
<i>i</i> -amil alkohol	312,91 ± 0,45	214,74 ± 0,67	304,26 ± 0,45
1-heksanol	1,06 ± 0,02	1,01 ± 0,01	0,96 ± 0,03
2-fenil etanol	88,76 ± 0,84	111,63 ± 0,70	99,18 ± 0,64
HLAPIVE MASNE KISELINE (mg L⁻¹)			
Kapronska kiselina	0,76 ± 0,02	0,67 ± 0,01	0,82 ± 0,01
Kaprilna kiselina	1,48 ± 0,03	1,28 ± 0,01	1,45 ± 0,02
Kaprijska kiselina	0,35 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,02

*Rezultati prikazani u tablici predstavljaju srednje vrijednosti mjerenja dvije paralele, uz pripadajuću standardnu devijaciju.

Kod pojedinačnih koncentracija estera, vidljivo je kako je u sva tri vina daleko najzastupljeniji etil-acetat, dok su koncentracije ostalih estera značajno niže i podjednake u sva tri vina. Isto tako vidimo kako vino CRNO 3, u odnosu na ostala dva vina, sadrži najveću koncentraciju etil-acetata ($82,95 \text{ mg L}^{-1}$), što ukazuje na činjenicu da ipak postoji razlika između upotrijebljenih kvasaca u pogledu stvaranja spojeva arome.

Odnosi koncentracija pojedinačnih estera su u skladu s istraživanjem Zhang i sur. (2011), odnosno etil-acetat je također najzastupljeniji ester u vinu. Koncentracija *i*-amil acetata nije u skladu s navedenim istraživanjem, ali je u skladu s istraživanjem Vianna i Ebeler (2001) u kojem se utvrđuje kako njegova koncentracija nije viša od 3.2 mg L^{-1} tijekom fermentacije. Razlog tomu može biti ne uzimanje u obzir dijela estera apsorbiranih etanolom. Kako bi se dobili što točniji rezultati, Zhang i sur. (2011) koristili su sedam različitih koncentracija etanola te su vrijednosti *i*-amil acetata dobiveni tim istraživanjem nešto više ($17,9 - 45,1 \text{ mg L}^{-1}$). Važno je istaknuti kako Zhang i sur. (2011) koriste vino sorte syrah, stoga je za očekivati određene razlike u rezultatima s obzirom da se radi o vinima dobivenim od različitih crnih sorti grožđa. Osim što u istraživanju također koriste crno vino, analizu spojeva arome vina provode primjenom SPME-GC/MS metode koja je isto tako korištena u ovome radu.

Etilni esteri kao grupa imaju najveći utjecaj na aromu vina, posebice etil acetat koji je u većini vina količinski najzastupljeniji ester jer brzo nastaje iz etanola i octene kiseline. Pri koncentracijama nižim od 100 mg L^{-1} daje voćnu aromu vinu, no pri višim koncentracijama je nositelj nepoželjne arome laka za nokte i acetona. Povećanjem duljine ugljikovodičnog lanca se pojačava sapunasta aroma (Sumbly i sur., 2010). Prema dobivenim koncentracijama ovoga estera u uzorcima vina, zaključujemo kako pozitivno doprinosi aromi vina.

Od viših alkohola je u svim vinima najzastupljeniji *i*-amil alkohol, a najviše ga ima u vinu CRNO 1 ($312,91 \text{ mg L}^{-1}$). Koncentracije ostalih viših alkohola variraju što je i očekivano s obzirom da su upotrijebljena 3 kvasca različitih karakteristika.

Također, u vinu korištenom u istraživanju Zhang i sur. (2011) su najzastupljeniji isti viši alkoholi kao i u vinu korištenom u ovome radu. Važno je istaknuti kako je *i*-amil alkohol također najzastupljeniji, ali u gotovo upola nižim koncentracijama u odnosu na vino korišteno u ovome radu, dok su koncentracije 2-fenil etanola podjednake u oba vina.

Smanjenje koncentracije alkohola tijekom fermentacije može biti rezultat tvorbe estera, jer alkoholi, zajedno s koezimom acetyl-CoA imaju ulogu supstrata u sintezi estera (Zhang i sur., 2011).

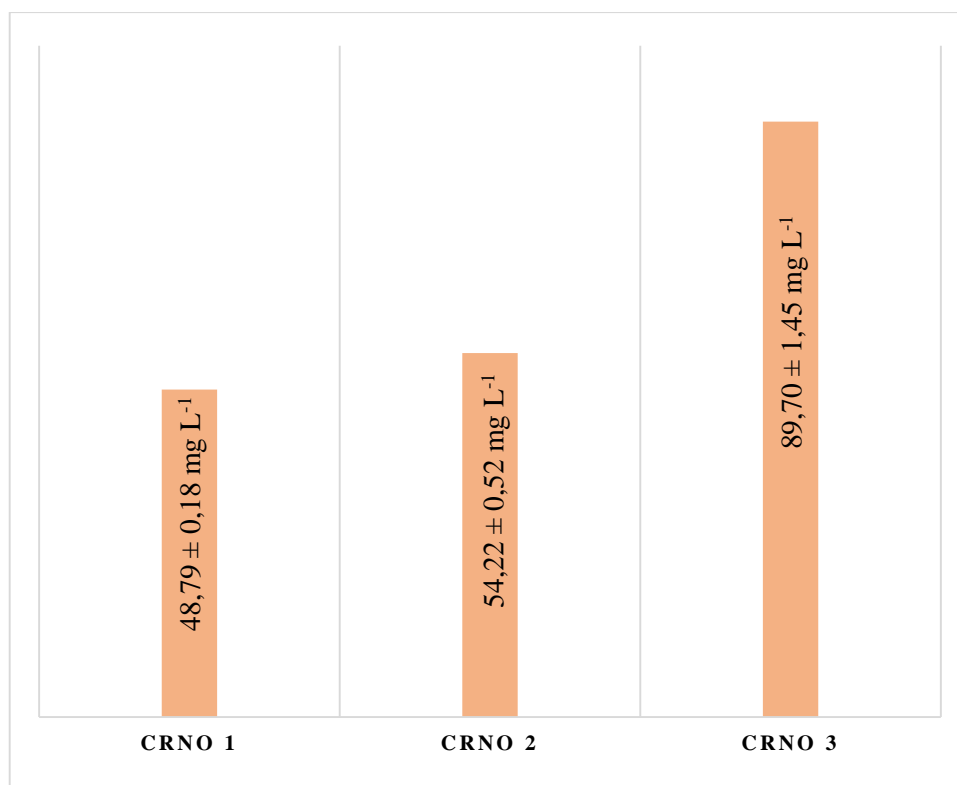
Senzorski prag osjetljivosti *i*-amil alkohola iznosi 30 mg L⁻¹ (Swiegers i sur., 2005). U koncentracijama nižim od 300 mg L⁻¹, viši alkoholi doprinose kompleksnosti arome vina, dok pri koncentracijama višim od 400 mg L⁻¹ nadvladavaju sam miris vina te imaju negativan utjecaj (Jackson, 2008; Panighel i Flamini, 2014).

Koncentracije *i*-amil alkohola su vinima CRNO 1 i CRNO 3 su nešto više od 300 mg L⁻¹, ali ipak niže od 400 mg L⁻¹, stoga se može zaključiti kako ipak neće imati negativan utjecaj na aromu vina. S obzirom da je koncentracija ovoga spoja puno viša od njegovog senzorskog praga, može se zaključiti kako značajno doprinosi aromi vina.

Od hlapivih masnih kiselina, najzastupljenija je kaprilna kiselina i to u vinu CRNO 1 (1,48 mg L⁻¹). Koncentracije pojedinačnih hlapivih masnih kiselina u vinima ne variraju značajno kao koncentracije pojedinačnih estera i viših alkohola, gdje se ipak uočavaju veće razlike u koncentracijama pojedinih spojeva u vinima.

Poznato je kako koncentracije kapronske, kaprilne i kaprinske kiseline u vinu variraju ovisno o soju kvasca, uvjetima fermentacije i sastavu mošta (Panighel i Flamini, 2014). Koncentracije kaprionske i kaprinske kiseline se prema istraživanju Zhang i sur. (2011) kreću između 0,27-0,54 mg L⁻¹, što je podjednako vrijednostima dobivenim ovim istraživanjem, dok je koncentracija kaprilne kiseline također najviša. Navedene hlapive masne kiseline, kao i viši alkoholi, sudjeluju u tvorbi estera pa je zbog toga moguće smanjenje i njihove koncentracije tijekom fermentacije.

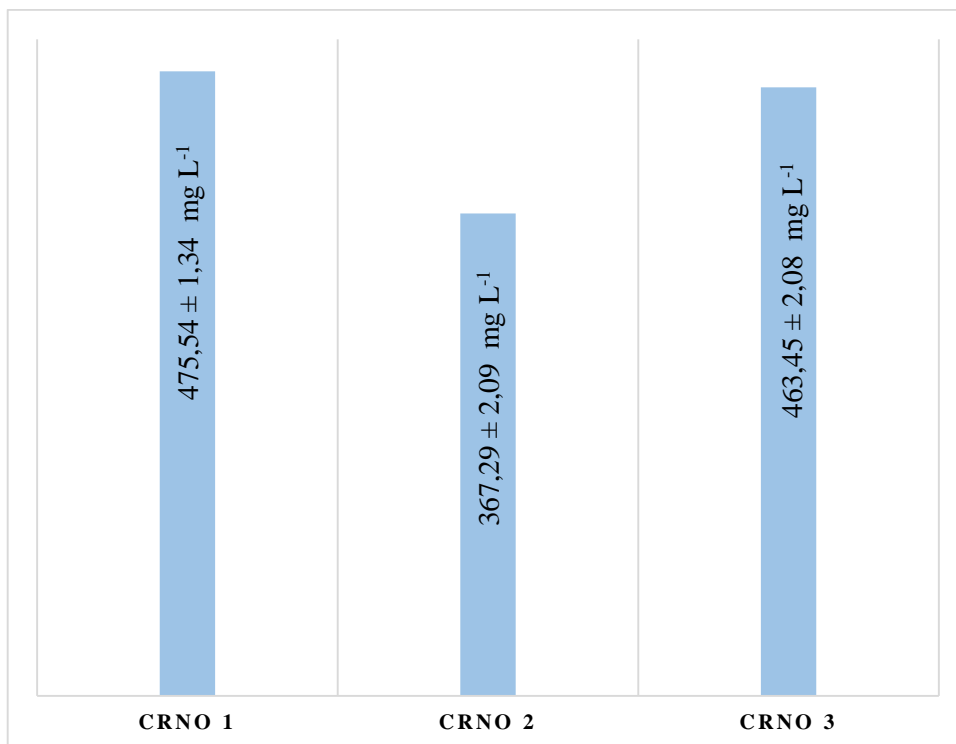
Kako bi se jasnije uočile razlike u aromatskom sastavu proizvedenih vina, zbrojene su koncentracije pojedinačnih estera, viših alkohola i hlapivih masnih kiselina (tablica 4), te grafički prikazane na slikama 16 – 18 kao ukupne koncentracije glavnih predstavnika fermentacijske arome vina.



Slika 16. Grafički prikaz koncentracija ukupnih estera u pojedinim vinima

Iz slike 16 je vidljivo kako najviše estera ima u vinu CRNO 3, nešto manje u CRNO 2 i najmanje u vinu CRNO 1. Za pretpostaviti je kako će vino CRNO 3 biti bogatog voćnog mirisa zahvaljujući najvećoj koncentraciji estera.

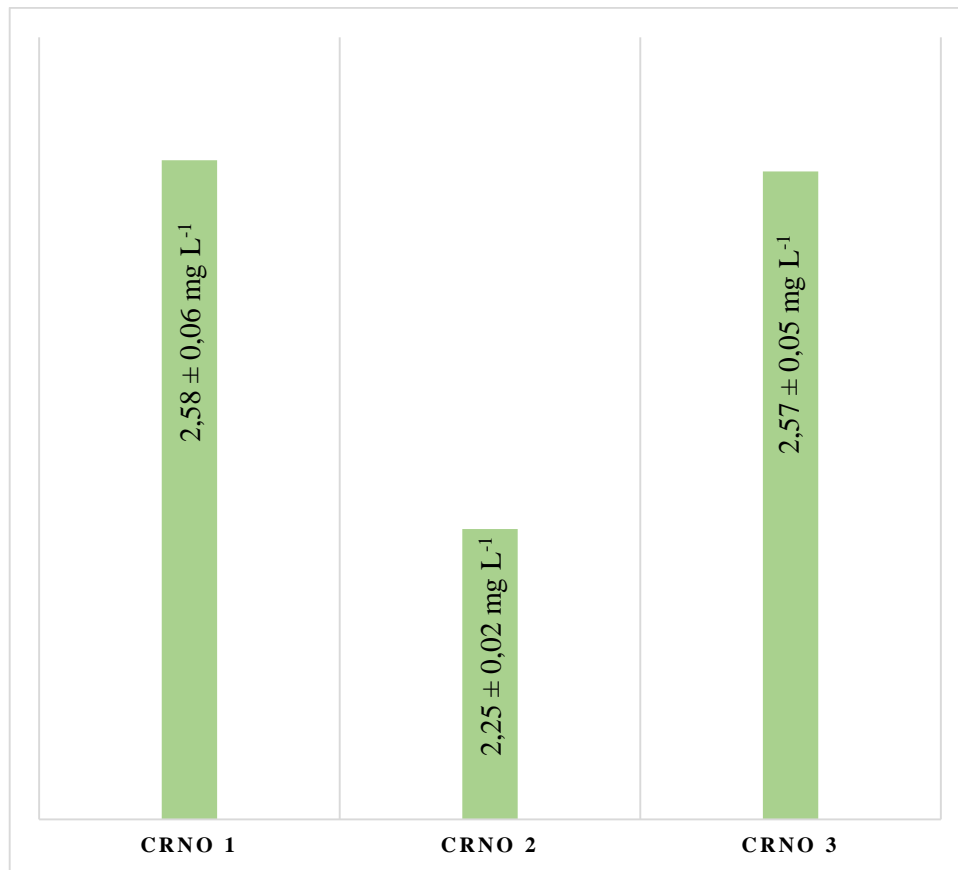
U vinu se većina estera nalazi samo u tragovima, a pojedinačno su prisutni u koncentracijama nižim od senzorskog praga osjetljivosti, dok količina ukupnih estera ne prelazi koncentracije više od 100 mg L⁻¹. Činjenica da su pojedinačno prisutni u koncentracijama oko njihovog senzorskog praga osjetljivosti ukazuje na to da i male promjene njihove koncentracije značajno utječu na aromu vina (Jackson, 2008; Sumbly i sur., 2010).



Slika 17. Grafički prikaz koncentracija ukupnih viših alkohola u pojedinim vinima

Na temelju rezultata prikazanih na slici 17 vidimo kako je koncentracija viših alkohola najviša u vinu CRNO 1, nešto niža u CRNO 3 i najniža u vinu CRNO 2.

Viši alkoholi neizravno doprinose razvoju bouqueta vina namijenjenih duljem starenju, tako što reagiraju s organskim kiselinama, tvoreći estere. Tijekom fermentacije, tvorba estera se odvija brzo, pod utjecajem enzima kvasaca, dok se tijekom starenja odvija sporije i bez djelovanja enzima (Jackson, 2008).



Slika 18. Grafički prikaz koncentracija ukupnih hlapivih masnih kiselina u pojedinim vinima

Iz slike 18 je vidljivo kako je koncentracija ukupnih hlapivih masnih kiselina podjednaka u vinima CRNO 1 i CRNO 3, a nešto niža u CRNO 2.

Masne kiseline, kao i viši alkoholi, doprinose složenosti bouqueta vina, ali mogu imati i negativan utjecaj na aromu vina (Jackson, 2008). U slučaju mikrobiološkog kvarenja obično su prisutne u koncentracijama iznad senzorskog praga osjetljivosti (Makhotkina, 2011).

5. ZAKLJUČCI

- Prema rezultatima prikazanim u tablicama 2 i 3, dolazi se do zaključka kako upotreba kvasaca različitih karakteristika ne uzrokuje značajne razlike u praćenim fizikalno-kemijskim parametrima vina (ukupna kiselost, pH, ukupni i slobodni SO₂); izuzetak je vino CRNO 3 u kojem je ukupna kiselost porasla nešto više nego u ostala dva vina, te je ujedno pH vrijednost bila niža.
- Proizvedena vina su u skladu s podacima iz Pravilnika o proizvodnji vina (2005) u pogledu ukupne kiselosti te ih svrstavamo u suha vina prema koncentraciji neprevrelog šećera.
- Iz slika 13, 14 i 15 je vidljivo kako tijekom alkoholne fermentacije koncentracija šećera opada, a koncentracija etanola i temperatura rastu. Također, uočava se kako sva tri kvasca fermentiraju jednako dugo, ali različitom dinamikom te proizvode podjednake količine alkohola etanola.
- Dobivena vina se najviše razlikuju prema koncentracijama pojedinačnih spojeva arome, posebice estera i viših alkohola, što ukazuje na to kako je upotreba kvasaca različitih karakteristika jedan od faktora koji može utjecati na aromatski sastav vina.

6. LITERATURA

Andabaka, Ž., Stupić, D., Karoglan, M., Marković, Z., Preiner, D., Maletić, E., Karlogan Kontić, J. (2016) Povijesni tijek uzgoja najvažnijih autohtonih dalmatinskih sorata vinove loze (*Vitis vinifera L.*). *Glasnik zaštite bilja* **39**, 14 - 20, <<https://hrcak.srce.hr/162147>>. Pristupljeno 14. srpnja 2021.

Banović, M. (2020) Kemija i tehnologija vina, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Bogdanović, D. (2020) Vinski kvasac, 5 neverovatnih faza razvoja. *Enolog*, <<https://www.enolog.rs/mikrobiologija-vina/vinski-kvasac-ciklus-razvica/>>. Pristupljeno 11. srpnja 2021.

Ciani, M., Comitini, F. (2019) Use of non-*saccharomyces* yeasts in red winemaking. U: *Red wine technology* (Morata, A., ured.), Academic press, Cambridge, Massachusetts, str. 51 - 64, <<https://www.elsevier.com/books/red-wine-technology/morata/978-0-12-814399-5>>.

Pristupljeno 14. srpnja 2021.

Comuzzo, P., Battistutta, F. (2019) Acidification and pH control in red wines. U: *Red wine technology* (Morata, A., ured.), Academic press, Cambridge, Massachusetts, str. 17 - 32, <<https://www.elsevier.com/books/red-wine-technology/morata/978-0-12-814399-5>>.

Pristupljeno 14. srpnja 2021.

Divol, B., Bauer, F.F. (2010) Metabolic engineering of wine yeast and advances in yeast selection methods for improved wine quality. U: *Managing wine quality, Volume 2: Oenology and wine quality* (Reynolds, A. G., ured.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 34 - 52, <<https://www.elsevier.com/books/managing-wine-quality/reynolds/978-0-08-102065-4>>.

Pristupljeno 14. srpnja 2021.

Grainger, K., Tattersall, H. (2005) *Wine production: wine to bottle*. Blackwell Publishing, Hoboken, New Jersey, <<https://www.wiley.com/en-us/Wine+Production%3A+Vine+to+Bottle-p-9781405173544>>. Pristupljeno 14. srpnja 2021.

Haibach, R. (2020, 9. prosinca) What is malolactic fermentation? *Smart Winemaking*, <https://www.smartwinemaking.com/post/malolactic_fermentation>. Pristupljeno 11. srpnja 2021.

Jackson, R.S. (2008) Wine Science: principles and applications, 3. izd [online], Academic press, Cambridge, Massachusetts, <<https://www.elsevier.com/books/wine-science/jackson/978-0-12-373646-8>>. Pristupljeno 14. srpnja 2021.

Jagatić Korenika, A.M., Tomaz, I., Preiner, D., Plichta, V., Jeromel, A. (2021) Impact of Commercial Yeasts on Phenolic Profile of Plavac Mali Wines from Croatia. *Fermentation* **7**, 1 - 12 . doi: 10.3390/fermentation7020092.

Kojić, N. (2019) Djelovanje sumporovog dioksida u vinu. *Glasnik zaštite bilja* **42**, 86 - 92. doi: 10.31727/gzb.42.6.11

Kokot agro (2017) Protokoli fermentacije, <<https://www.kokot-agro.hr/2017/08/17/protokoli-fermentacije/>>. Pristupljeno 11. srpnja 2021.

Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma -a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 97 – 129. doi: doi.org/10.21548/21-1-3560

Makhotkina O. (2011) Stability of New Zealand Sauvignon Blanc Aroma Compounds: Oxidation versus Hydrolysis. The University of Auckland, Auckland, <<https://www.semanticscholar.org/paper/Stability-of-New-Zealand-Sauvignon-blanc-aroma-Makhotkina/9679c5cfa3414d728864fe84b552dede5b24e818>>. Pristupljeno 14. srpnja 2021.

Maleš, P. (1998) Biološka i tehnološka svojstva vinske sorte plavac mali. *Agronomski glasnik*. **60**, 3-16, <<https://hrcak.srce.hr/142602>>. Pristupljeno 14. srpnja 2021.

Maletić, E., Pejić, I., Karoglan Kontić, J., Zegarac Piljac, J., Dangl, G.S., Vokurka, A., Lacombe, T., Mirošević, N., Meredith, C.P. (2004) Zinfandel, Dobričić and Plavac mali: The Genetic Relationship among Three Cultivars of the Dalmatian Coast of Croatia. *Am. J. Enol. Vitic.* **55**, 174 - 180, <<https://www.bib.irb.hr/163885>>. Pristupljeno 14. srpnja 2021.

Morata, A., Gonzalez, C., Tesfaye, W., Loira, I., Suarez-Lepe, J.A. (2019) Maceration and fermentation: new technologies to increase extraction. U: Red wine technology (Morata, A., ured.), Academic press, Cambridge, Massachusetts, str. 35-48, <<https://www.elsevier.com/books/red-wine-technology/morata/978-0-12-814399-5>>. Pristupljeno 14. srpnja 2021.

Moreno, J., Peinado, R. (2012) Enological chemistry (preveli Murray, A., Patten, I.), Academic press, Cambridge, Massachusetts, <https://gtu.ge/Agro-Lib/%5BJuan_Moreno.pdf>. Pristupljeno 14. srpnja 2021.

Mucalo, A., Maletić, E., Zdunić, G. (2020) Extended Harvest Date Alter Flavonoid Composition and Chromatic Characteristics of Plavac Mali (*Vitis vinifera L.*) Grape Berries. *Foods* **9**, 1 – 25. doi: 10.3390/foods9091155

Panighel A., Flamini R. (2014) Applications of Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME-GC/MS) in the Study of Grape and Wine Volatile Compounds. *Molecules* **19**, 21291–21309. doi: 10.3390/molecules191221291

Pejić, I. (2007) Plavac mali – najstariji trs nalazi se u Dolu (posaden 1860.g.) Tartajun-Dol na Hvaru, <www.tartajun.hr/plavac-mali-najstariji-trs-nalazi-se-u-dolu-posaden-1860-g/> . Pristupljeno 11. srpnja 2021.

Pravilnik o proizvodnji vina (2005) *Narodne novine* **17**, Zagreb.

Prehrambeno-biotehnoški fakultet (2020) *Kemija i tehnologija vina (skripta za vježbe)*. Sveučilište u Zagrebu.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006) Handbook of Enology Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments, 2. izd., John Wiley & Sons, Chichester, <<https://www.wiley.com/en-us/Handbook+of+Enology%2C+Volume+2%3A+The+Chemistry+of+Wine+%26nbsp%3BStabilization+and+Treatments%2C+2nd+Edition-p-9780470010389>>. Pristupljeno 14. srpnja 2021.

Specht, G. (2010) Yeast fermentation management for improved wine quality. U: Managing wine quality Volume 2: Oenology and wine quality [online] (Reynolds, A.G., ured.), Woodhead Publishing Limited, Cambridge, str. 3 - 29, <<https://www.elsevier.com/books/managing-wine-quality/reynolds/978-0-08-102065-4>> . Pristupljeno 14. srpnja 2021.

Styger, G., Prior, B., Bauer, F.F. (2011) Wine flavor and aroma. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 1145 - 1159. doi: 10.1007/s10295-011-1018-4

Sumby, K. M., Grbin P. R., Jiranek V. (2010) Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food. Chem.* **121**, 1 – 16. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.12.004.

Swiegers, J. H., Bratowsky, E. J., Henschke, P. A., Pretorius, I. S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **11**, 139 - 173. doi: 10.1111/j.1755-0238.2005.tb00285.x

- Swiegers, J. H., Pretorius, I. S. (2005) Yeast Modulation of Wine Flavour. *Adv. Appl. Microbiol.* **57**, 131 - 175. doi: 10.1016/S0065-2164(05)57005-9
- Tischelmayer, N. (2021) Saccharomyces. Wein.plus, <<https://glossary.wein.plus/saccharomyces>> . Pristupljeno 11. srpnja 2021.
- Tomašević, M., Gracin, L., Ćurko, N., Ganić, K. K. (2017) Impact of pre-fermentative maceration and yeast strain along with glutathione and SO₂ additions on the aroma of *Vitis vinifera* L. Pošip wine and its evaluation during bottle aging. *Food. Sci. Tech.-Brazil.* **81**, 67-76. doi: 10.1016/j.lwt.2017.03.035
- Vianna, E., Ebeler, S. E. (2001). Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid phase microextraction coupled with gas chromatography – mass spectrometry. *J. Agr. Food. Chem.* **49**, 589–595. doi: 10.1021/jf000907g
- Vina Croatia (2017) Plavac mali, <<https://vinacroatia.hr/hrvatska-vina/sorte/plavac-mali/>>. Pristupljeno 11. srpnja 2021.
- Vuk, D. (2017) Metabolizam ugljikohidrata-glikoliza, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
- Wang, X. D., Bohlscheid, J. C., Edwards, C. G. (2002) Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 349 - 359. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01827.x
- Waterhouse, A.L., Sacks, G.L., Jeffery, D.W. (2016) Understanding wine chemistry, John Wiley & Sons, Chichester , < <https://www.wiley.com/en-us/Understanding+Wine+Chemistry-p-9781118627808>>. Pristupljeno 14. srpnja 2021.
- Zhang, M., Pan, Q., Yan, G., Duan, C. (2011) Using headspace solid phase micro-extraction for analysis of aromatic compounds during alcoholic fermentation of red wine. *Food. Chem.* **125**, 743 - 749. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.09.008

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ime i prezime studenta