

# Projektiranje sustava za kontroliranu fermentaciju vina

---

Fotez, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:360993>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-08**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ana Fotez

**Projektiranje sustava za kontroliranu fermentaciju vina**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad 2017.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Nastavni predmet:** Projektiranje uređaja u prehrambenoj industriji

**Tema rada** je prihvaćena na III. izvanrednoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2016./2017. održanoj 3. srpnja 2017.

**Mentor:** *prof. dr. sc. Darko Velić*

**Komentor:** *izv. prof. dr. sc. Anita Pichler*

### Projektiranje sustava za kontroliranu fermentaciju vina

*Ana Fotez, 362-DI*

#### Sažetak:

U radu je provedeno projektiranje sustava za kontroliranu fermentaciju vina u poluindustrijskom mjerilu. Osnovni elementi projektiranja navedenog sustava obuhvatili su dimenzioniranje fermentacijskih posuda, projektiranje sustava za termostatiranje fermentora (grijanje/hlađenje) te upravljačkog sustava. Na projektiranom sustavu provela se kontrolirana alkoholna fermentacija (KAF) te kontrolirana (potaknuta) jabučno-mliječna fermentacija (JMF) vina sorte Graševina. Za jabučno-mliječnu fermentaciju vina sorte Graševina primijenila se čista kultura bakterije mliječne kiseline (BMK) *Oenococcus oeni* uz uspostavljenje temperaturnog optimuma za odabranu vrstu BMK. U uzorcima tijekom i nakon provedene kontrolirane alkoholne fermentacije, kao i potaknute jabučno-mliječne fermentacije odredio se osnovni fizikalno-kemijski sastav vina te se isti usporedio s kontrolnim uzorkom (bez potaknute jabučno-mliječne fermentacije). Istraživanje je pokazalo da kontrolirani postupak fermentacije u oba slučaja (KAF i JMF) rezultira kvalitetnim vinima, u pogledu relevantnih fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava koja definiraju kvalitetu vina. Potaknutom jabučno-mliječnom fermentacijom smanjila se koncentracija jabučne kiseline što je rezultiralo poboljšanim senzornim svojstvima tako proizvedenog vina.

**Ključne riječi:** vino, pilot postrojenje, kontrolirana fermentacija, jabučno-mliječna fermentacija, *Oenococcus oeni*

**Rad sadrži:** 64 stranica  
14 slika  
4 tablica  
32 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- |                                      |               |
|--------------------------------------|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. Natalija Velić | Predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. Darko Velić         | član-mentor   |
| 3. izv. prof. dr. sc. Anita Pichler  | član-komentor |
| 4. izv. prof. dr. sc. Stela Jokić    | zamjena člana |

**Datum obrane:** 12. listopada 2017.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Process Engineering  
Subdepartment of Process Desing and Construction Materials  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food Engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Food Process Equipment Desing

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 2016./2017. held on 3. July 2017.

**Mentor:** *Darko Velić, PhD, full prof.*

**Co-mentor:** *Anita Pichler, PhD, associate prof.*

### Designing of the system for controlled wine fermentation

*Ana Fotez, 362-DI*

#### Summary:

The aim of this study was to design a system for controlled fermentation of wine on a semi-industrial scale. The basic design elements of the above system included the dimensioning of fermentation vessels, the design of the fermenter thermostat system (heating/cooling) as well as the control system design. The controlled alcohol fermentation (KAF) and the controlled (stimulated) malolactic fermentation (JMF) of Graševina variety were performed using the designed system. The pure culture of lactic acid bacteria (BMK) *Oenococcus oeni* was applied for grape juice fermentation with the establishment of a temperature optimum for selected BMK type. The basic physico-chemical composition of wine was determined and compared to the control sample (without malolactic fermentation) in samples withdrawn during and after controlled alcoholic fermentation, as well as induced malolactic fermentation. The research has shown that the controlled fermentation process in both cases (KAF and JMF) results in wines of exceptional quality in terms of the relevant physico-chemical and sensory properties that define the quality of the wine. By stimulated malolactic fermentation, the concentration of malic acid decreased which resulted in more acceptable sensory properties of wine.

**Key words:** wine, pilot plant, controlled fermentation, malolactic fermentation, *Oenococcus oeni*

**Thesis contains:** 64 pages  
14 figures  
4 tables  
32 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |                                                |              |
|------------------------------------------------|--------------|
| 1. <i>Natalija Velić, PhD, associate prof.</i> | chair person |
| 2. <i>Darko Velić, PhD, full prof.</i>         | supervisor   |
| 3. <i>Anita Pichler, PhD, associate prof.</i>  | member       |
| 4. <i>Stela Jokić, PhD, associate prof.</i>    | stand-in     |

**Defense date:** October 12, 2017.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## Zahvala

Zahvaljujem se svom mentor prof. dr. sc. Darku Veliću te komentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Pichler koji su svojim savjetima, znanjem i zajedničkim snagama omogućili izradu ovog diplomskog rada.

Posebno se zahvaljujem roditeljima koji su uvijek bili tu i bez kojih bi bilo nemoguće postići sve željene ciljeve.

Na kraju se želim zahvaliti cimericama i kolegama koji su mi upotpunili studentski život te omogućili jednostavnije i sretnije studiranje.

Veliko hvala svima!

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. Kemijski sastav vina .....	4
2.1.1. Ugljikohidrati .....	4
2.1.2. Kiseline .....	5
2.1.3. Alkoholi .....	6
2.1.4. Tvari mirisa .....	7
2.1.5. Polifenoli .....	7
2.1.6. Aldehidi .....	7
2.2. Postupak proizvodnje vina .....	7
2.2.1. Fermentacija .....	9
2.2.2. Sumporenje .....	9
2.2.3. Odležavanje na talogu i pretakanje .....	9
2.2.4. Starenje vina .....	10
2.3. Jabučno-mliječna fermentacija .....	10
2.4. Fizikalno-kemijski pokazatelji kakvoće vina .....	17
2.5. Šaržni fermentor .....	20
2.5.1. Prednosti šaržnih procesa .....	20
2.5.2. Konstrukcijski dijelovi šaržnog fermentora .....	20
2.5.3. Izbor materijala .....	20
2.5.4. Debljina stjenke fermentora .....	21
2.5.5. Volumen fermentora .....	22
2.5.6. Masa fermentora .....	22
2.5.7. Prijenos topline .....	23
2.5.8. Prijenos topline medijem u plaštu .....	23
2.5.9. Rashladni sustav fermentora .....	24
2.5.10. Uvećanje mjerila: prijenos u poluindustrijsko i industrijsko mjerilo ( <i>scale up</i> ) .....	27
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	31

3.1.	Zadatak.....	32
3.2.	Materijali.....	32
3.3.	Oprema.....	33
3.4.	Metode.....	36
3.4.1.	Određivanje ukupnog ekstrakta i alkohola .....	36
3.4.2.	Određivanje reducirajućih šećera .....	37
3.4.3.	Određivanje slobodnog SO <sub>2</sub> .....	37
3.4.4.	Određivanje ukupnog SO <sub>2</sub> .....	37
3.4.5.	Određivanje ukupnih kiselina.....	38
3.4.6.	Određivanje hlapivih kiselina .....	38
3.4.7.	Određivanje pepela.....	38
3.4.8.	Određivanje refrakcijske vrijednosti .....	39
3.4.9.	Određivanje pojedinih kemijskih spojeva u sastavu vina pomoću Reflectoquant® sustava.....	40
3.4.10.	Određivanje pH vrijednosti .....	41
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	42
4.1.	Proračun rashladnog sustava uređaja za kontroliranu fermentaciju.....	43
4.1.1.	Dimenzije spremnika s duplikatorom.....	43
4.1.2.	Brzina strujanja rashladnog fluida.....	44
4.1.3.	Površina izmjene topline .....	46
4.1.4.	Vrijeme potrebno za hlađenje i temperatura rashladnog fluida .....	48
4.1.5.	Proračun uvećanja mjerila sustava za kontroliranu fermentaciju ( <i>scale-up</i> ).....	50
4.2.	Rezultati fizikalno-kemijskih analiza.....	53
5.	ZAKLJUČCI.....	59
6.	LITERATURA.....	61

## Popis oznaka, kratica i simbola

KAF	kontrolirana alkoholna fermentacija
JMF	jabučno-mliječna fermentacija
BMK	bakterije mliječne kiseline
MLE	malolaktični enzimi
AISI	<i>American Iron and Steel Institute</i>
$s$	debljina stjenke fermentora [m]
$p$	tlak u fermentoru [Pa]
$d$	promjer fermentora [m]
$V$	ukupni volumen horizontalnog cilindričnog fermentora [m <sup>3</sup> ]
$V_1$	volumen elipsoidne glave fermentora [m <sup>3</sup> ]
$V_2$	volumen cilindrične ljuske fermentora [m <sup>3</sup> ]
$\beta$	kut elipsoidne glave (0,5)
$a$	faktor za određivanje volumena koničnog dna fermentora (0,606)
$\lambda$	relativna duljina cilindrične ljuske [m]
$m_s$	ukupna masa fermentora [kg]
$m_1$	masa elipsoidne glave fermentora [kg]
$m_2$	masa cilindrične ljuske fermentora [kg]
$t_1$	debljina elipsoidne glave fermentora [m]
$cm$	za elipsoidnu glavu fermentora $\approx 1,38017$
$\rho_s$	gustoća mase stjenke [kg/m <sup>3</sup> ]
$t_2$	debljina cilindrične ljuske fermentora [m]
$T_1$	ulazna temperatura mase [°C]
$t_2$	izlazna temperatura rashladnog fluida [°C]
$T_2$	izlazna temperatura mase [°C]
$t_1$	ulazna temperatura rashladnog fluida [°C]
$\Delta T_{ul}$	razlika temperatura ulazni fluida [°C]
$\Delta T_{iz}$	razlika temperatura izlazni fluida [°C]
$\Delta T_m$	srednja logaritamska razlika temperature [°C]



$m'$	maseni protok rashladnog fluida [kg/s]
$cp_{(vina)}$	specifična toplina vina [kJ/kg K]
$cp_{(voda)}$	specifična toplina vode [kJ/kg K]
$\Delta T_{fluid}$	temperaturna razlika rashladnog fluida [°C]
$A$	površina izmjene topline [m <sup>2</sup> ]
$Q$	količina izmjene topline [W]
$k$	koeficijent prolaza topline [W/m <sup>2</sup> K]
$SUF$	“scale-up” faktor
$WV_2$	radni volumen većeg spremnika [m <sup>3</sup> ]
$WV_1$	radni volumen pilotnog spremnika [m <sup>3</sup> ]
$A_2$	površina prijenosa topline većeg spremnika [m <sup>2</sup> ]
$A_1$	površina prijenosa topline manjeg spremnika [m <sup>2</sup> ]
$WV$	radni volumen [m <sup>3</sup> ]
$F$	radni volumen bez volumena koničnog dna spremnika
$D$	unutarnji promjer fermentora [m]
$d$	konstanta (5,875)
$R$	omjer širine i visine fermentora
$L$	visina fermentora [m]
$D$	širina fermentora [m]
$f$	konstanta
$g$	konstanta
$t$	faktor za određivanje koničnog dna (0,931)
$X$	eksponencijalni koeficijent
$X_2$	eksponencijalni koeficijent
$a_1$	varijabla
$b$	varijabla
$k$	konstanta (za polucijevnu spiralnu cijevnu zmiju = 1)
$SUF_V$	volumni „scale-up“ faktor
OIV	<i>Organisation Internationale de la Vigne et du Vin</i>
$E_z$	faktor kvalitete zavarenih spojeva (0,8-1)
$S$	dopušteno naprezanje konstrukcijskih materijala [Pa]

$S_{kor}$	korozijski dodatak [m]
$a$	faktor za određivanje kapaciteta koničnog dna fermentora (0,606)
$M$	masa hlađenog fluida [kg]
$H_u$	visina spremnika s cijevi poklopca [mm]
$H_0$	visina spremnika bez poklopa spremnika [mm]
$V_s$	volumen spremnika [L]
$O_{izm}$	oplošje spremnika [m <sup>2</sup> ]
$Q'$	volumni protok rashladne vode [m <sup>3</sup> /s]
$\gamma$	relativna gustoća ekstrakta
$Q$	masa praznog piknometra
$Q_1$	masa piknometra s ekstraktom
$Q_2$	masa piknometra s destiliranom vodom
$K$	faktor korekcije (0,99823)
$a$	mg šećera izračunati iz tablice po Schoorl-Luff-u
$m_1$	masa prazne porculanske zdjelice
$m_2$	masa porculanske zdjelice s pepelom
$c_m$	za elipsoidnu glavu fermentora $\approx 1,38017$

## **1. UVOD**

Vino je poljoprivredni prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg ili za preradu u vino pogodnog grožđa (Zakon o vinu, NN 96/03). Put do kvalitetnog proizvoda započinje od kvalitetne sirovine, nastavlja se tijekom proizvodnje i završava krajnjim proizvodom. Tijekom procesa proizvodnje potrebno je omogućiti što jednostavnije i točnije praćenje parametara te time osigurati visoku kvalitetu krajnjeg proizvoda.

Alkoholna fermentacija je jedna od najvažnijih faza u proizvodnji vina. Alkoholnu fermentaciju provode kvasci enzimskim reakcijama transformirajući šećere u alkohol, CO<sub>2</sub> i toplinu. Različiti čimbenici imaju utjecaj na samu fermentaciju, neki u većoj a neki u manjoj mjeri. Najveći utjecaj ima temperatura, a uz nju fermentacija ovisi i o prisustvu kisika, sastavu mošta, sadržaju šećera, kiselina, fenolnih tvari, alkohola, vitamina i minerala.

Napredak znanosti i tehnike doveo je do velikih promjena u tehnologiji fermentiranih proizvoda pa tako i u proizvodnji vina. Spontano vrenje koje se odvija na višim temperaturama nepovoljno utječe na kvalitetu. Isto tako, temperature ne smiju biti ni preniske, jer u tom slučaju može doći do zastoja fermentacije. Zahvaljujući novim dostignućima u enologiji i enokemiji moguće je kontrolirano upravljati fermentacijom, kako u pogledu intenziteta vrenja tako i u pogledu temperature mošta i/ili vina.

Kontrolirana fermentacija naziva se još i usporenom fermentacijom, zbog toga što se njenom primjenom onemogućavaju velike oscilacije temperature i intenziteta fermentacije, koje se javljaju prilikom nekontrolirane (spontane) fermentacije. Pri kontroliranim uvjetima fermentacija traje nešto duže, ali je ujednačenija. Kontrolirana fermentacija naročito je značajna u proizvodnji kvalitetnih vina i voćnih vina, kod kojih se želi zadržati aroma i svježina.

Pod kontroliranim uvjetima podrazumijeva se i proizvodnja uz dodatak selekcioniranih kvasca za fermentaciju. Za vinarstvo značajan je rod *Saccharomyces*. Osim glavne funkcije kvasaca, razgradnje šećera na alkohol i CO<sub>2</sub>, oni utječu i na nastajanje spojeva arome. Vrenje mošta može biti spontano s vinskim kvascima s grožđa ili dodatkom selekcionirane kulture vinskih kvasaca uz inaktivaciju divljih kvasaca sumporenjem.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Kemijski sastav vina

Prema kakvoći vina se dijele na stolna, kvalitetna i vrhunska vina. Kakvoća vina direktno je uvjetovana sastavom grožđa. Kod dobivanja kvalitetnog vina od najvećeg značaja je udio šećera, organskih kiselina, spojeva arome i mirisa te tanina u grožđu (Kulišić, 2004). Broj organskih i anorganskih kemijskih spojeva u vinu, čiji je sastav poznat, veći je od 600.

### 2.1.1. Ugljikohidrati

Prema sadržaju šećera vina se dijele na suha, polusuha, poluslatka i slatka vina što nam prikazuje **Tablica 1**. Optimalni udio šećera bijelih vina je 20,5 – 22 °Brix-a, dok su kod crnih vina te vrijednosti nešto više. Da bi se dobilo vino s udjelom alkohola od 12 %, mošt mora imati između 22 i 24 °Brix-a (°Brix = mjera topljivih krutih tvari, približno jednaka udjelu šećera) (Kulišić, 2004). Šećeri u grožđu nastaju fotosintezom, a najvažniji s najvećim udjelom su D-glukoza i D-fruktoza. Na samom početku dozrijevanja više je glukoze, a dozrijevanjem se povećava udio fruktoze te u dozrelom grožđu omjer glukoza/fruktoza iznosi 1. Šećeri pomoću kvasaca fermentacijom prelaze u alkohol i CO<sub>2</sub>. Udio šećera u grožđu i moštu ovisi o sorti, tlu i klimi (Pozderović, 2013).

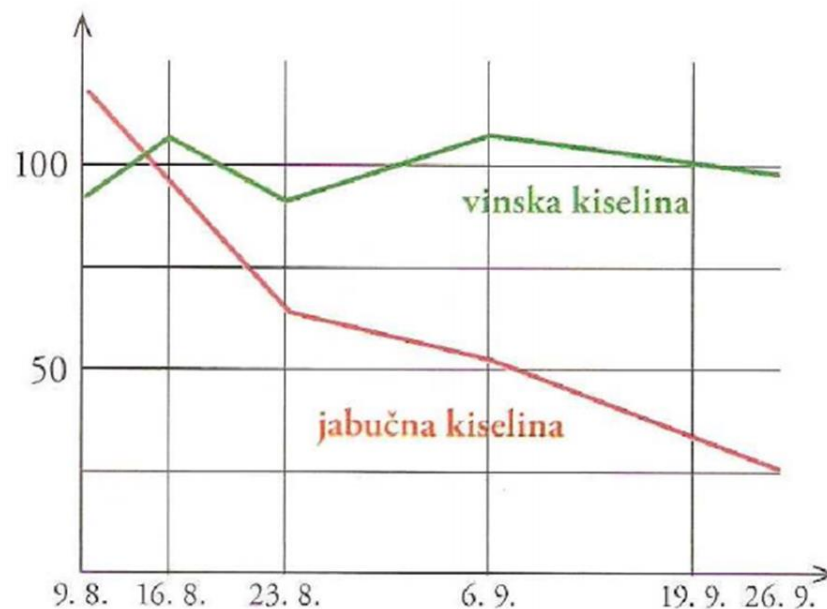
**Tablica 1** Podjela vina prema sadržaju šećera

Vrsta vina	Udio šećera (g/L)
suha	< 4
polusuha	4 – 12
poluslatka	12 – 50
slatka	> 50

Pektinske tvari su ugljikohidrati čija je osnovna jedinica od koje su građeni  $\alpha$ -galakturonska kiselina koja je u lanac povezana  $\alpha$ -1,4 glukoziidnom vezom. Pektini povećavaju viskoznosti te su važni za želiranje.

### 2.1.2. Kiseline

Kiseline su vrlo važne sastavne komponente vina te ako je vino vrlo slabo kiselo, okus mu je bezukusan i neodređen. Isto tako nije poželjno da udio kiselina bude visok. Glavni predstavnici kiselina koje se nalaze u vinu su vinska i jabučna kiselina. Udio vinske i jabučne kiseline ovisi o sorti grožđa i o vinogradarskom položaju (Kulišić, 2004). Visoka koncentracija jabučne kiseline se nalazi na početku zrenja, a zrenjem se smanjuje u procesu respiracije što ovisi o temperaturi. Tu promjenu nam prikazuje **Slika 1** (Pozderović, 2013). Obje kiseline su nehlapive što znači da ne hlape zagrijavanjem vina. Vino sadrži i hlapive kiseline koje se izražavaju kao octena kiselina. Veliki udio hlapivih kiselina u vinu nije poželjan. Ako je udio ukupnih kiselina oko 1 % znači da ima previše kiselina, a udio od 0,4 % može rezultirati mikrobiološkim infekcijama. Bijela vina su bogatija kiselinama od crnih. Uz vinsku, jabučnu i octenu kiselinu, u vinu se još nalaze i propionska, piruvična, fumarinska, mliječna, galakturonska i druge kiseline. Grožđe koje dozrijeva u toplijim klimatskim uvjetima (veća količina šećera) imat će manje kiselina nego ono koje dozrijeva u hladnijim klimatskim uvjetima. Kako bi se snizila moguća pretjerana kiselost, provodi se malolaktična fermentacija (Kulišić, 2004).



**Slika 1** Promjene koncentracije vinske i jabučne kiseline tijekom dozrijevanja grožđa

Organske kiseline uglavnom potječu iz grožđa, a nastaju kao proizvodi nepotpune oksidacije šećera u procesu disanja bobice, odakle preko mošta prelaze u vino. Tek manji dio nastaje u samom vinu transformacijom nekih sastojaka mošta u tijeku alkoholne fermentacije ili kasnije za vrijeme čuvanja vina. Ukupan sadržaj nehlapivih organskih kiselina u vinu iznosi 3,5 – 10 g/L, od toga:

- vinska: 2 – 6 g/L,
- jabučna: 0,01 – 6 g/L,
- limunska: 0,1 – 0,5 g/L,
- jantarna: 0,5 – 1,3 g/L,
- mliječna: 0,8 – 3,3 g/L,
- ostale: 70 – 100 mg/L (oksalna, pirogroždana, glukonska, glukuronska)

Hlapive organske kiseline predstavljaju masne kiseline koje pod određenim uvjetima ispare. Nastaju kao sekundarni proizvodi alkoholne fermentacije, ali mogu nastati i u procesu kvarenja vina (octikavost, vinski cvijet). Ukupni sadržaj tih kiselina se izražava kao octena kiselina (glavni predstavnik ovih kiselina). Normalna koncentracija octene kiseline u vinu iznosi 0,3 – 0,6 g/L.

### 2.1.3. Alkoholi

Najzastupljeniji alkoholi u vinu su jednovalentni alkoholi. Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) prelazi u vino iz grožđa hidrolizom pektinskih spojeva pomoću enzima pektinesteraze. Crna vina imaju veći sadržaj metilnog alkohola (115 – 338 mg/L), nego bijela (41 – 72 mg/L). Veći sadržaj metanola je rezultat dužeg kontakta tekuće faze s krutom za vrijeme maceracije masulja. Etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) je glavni proizvod alkoholne fermentacije. Prema Pravilniku o proizvodnji vina (NN 96/1996) najniži sadržaj stvarnog alkohola u vinu koje se stavlja u promet varira između 8,5 i 11,5 vol. %. Ukupni alkohol u vinu podrazumijeva zbroj stvarnog i potencijalnog alkohola. Postupcima pojačavanja može se povećati ukupna volumna alkoholna jakost. Osim jednovalentnih alkohola u vinu se još nalaze i viši alkoholi koji nastaju aktivnošću kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* za vrijeme alkoholne fermentacije. Uz hlapive estere važan su čimbenik fermentacijske arome vina. Glavni predstavnici viših alkohola su 1-propanol, izobutanol, amilni alkohol, izoamilni alkohol i 2-



feniletanol. Viši alkoholi u koncentraciji do 300 mg/L doprinose razvoju željene arome vina, a koncentracije veće od 400 mg/L negativno utječu na aromu vina.

#### **2.1.4. Tvari mirisa**

Najvažniji hlapivi spojevi primarne arome grožđa su monoterpeni (geraniol, linalol, nerol i dr.). Oni pridonose voćnim i cvjetnim mirisima aromatičnih sorti (Pozderović, 2013). Većina terpena u grožđu se nalazi u vezanoj, glikozidnoj formi, koja je nehlapiva i zato bez utjecaja na miris. Tijekom dozrijevanja vina, zbog relativno slabih nestabilnih veza može doći do cijepanja glikozidnih veza i oslobađanja terpena koji će intenzivirati aromu vina. Kako bi se potpomoglo oslobađanje vezanih terpena i poboljšanje arome, osobito bijelih vina, danas je uobičajeno koristiti enzime, uz kratku maceraciju (nekoliko sati) prije alkoholnog vrenja.

#### **2.1.5. Polifenoli**

Tanini su polifenolni spojevi složene strukture, a nalaze se u kožici, peteljci i sjemenkama. Daju trpkost i gorčinu vina te značajno utječu na fizikalno-kemijska i senzorna svojstva vina. Taninske tvari sudjeluju u reakcijama enzimskog i neenzimskog posmeđivanja u vinu. Polifenolni spojevi pozitivno utječu na zdravlje ljudi, imaju antioksidativno djelovanje te usporavaju ili blokiraju djelovanje slobodnih radikala (Pozderović, 2013).

#### **2.1.6. Aldehidi**

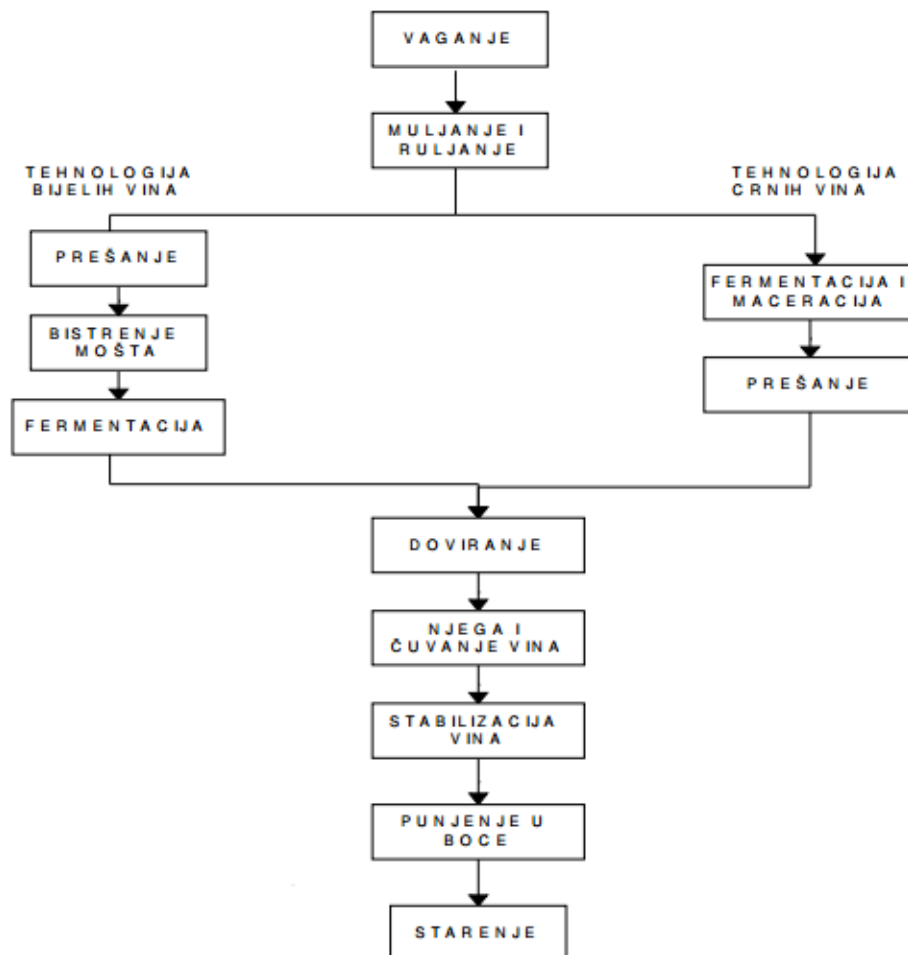
Acetaldehid nastaje tijekom alkoholne fermentacije, a jedan dio se stvara za vrijeme čuvanja vina. U bijelim vinima koncentracija može biti i do 300 mg/L, dok ga u crnim vinima ima znatno manje (20 – 60 mg/L). U većim količinama acetaldehid vinu daje specifičan okus i miris na oksidirano i ishlapljeno.

## **2.2. Postupak proizvodnje vina**

Postupak proizvodnje bijelog vina (**Slika 2**) uključuje:

- runjenje i muljanje (odvajanje peteljki i gnječenje bobica),
- određivanje šećera i kiselina u moštu,

- dodavanje sumpornog dioksida (SO<sub>2</sub>) potrebnog za inhibiciju rasta nepoželjnih mikroorganizama,
- dodatak starter kultura kvasaca (postizanje potpune fermentacije),
- prešanje,
- fermentacija (15 - 18 °C),
- pretakanje,
- provjera udjela SO<sub>2</sub>,
- starenje i pročišćavanje,
- punjenje u boce.



Slika 2 Shema postupka proizvodnje vina

### 2.2.1. Fermentacija

Alkoholna fermentacija je proces stvaranja alkohola iz šećera, pomoću kvasaca. Kvasci se već nalaze na bobicama grožđa, ali mogu biti i naknadno dodani. Osim alkohola nastaje i CO<sub>2</sub> te ostali produkti koji utječu na kvalitetu vina. Pravilan proces fermentacije je ključan faktor za dobivanje vina optimalne kakvoće. Postoje tri faze fermentacije:

- prvih 12 – 24 h tijekom kojeg stanice kvasaca rastu i započinju fermentaciju,
- jaka aktivnost kvasaca tijekom naredna 2 – 3 dana za vrijeme kojih kvasci fermentiraju do 2/3 šećera u alkohol uz nastanak CO<sub>2</sub>,
- opadanje broja stanica kvasaca i slabljenje njihovog fermentacijskog djelovanja (3 – 4 dana).

Brzina fermentacije najviše ovisi o temperaturi pri kojoj se fermentacija odvija kao i o broju kvasaca i količini hrane koja im je potrebna za optimalan rast. Fermentacija vina najčešće traje jedan do dva tjedna (Kulišić, 2004). Osim alkoholne fermentacija bitna je još i malolaktična fermentacija odnosno jabučno-mliječna fermentacija. Prilikom malolaktične fermentacije dolazi do konverzije opore jabučne kiseline u ugodniju mliječnu kiselinu te se smanjuje kiselosti i povećava kompleksnost arome vina (Kovačević Ganić, 2008).

### 2.2.2. Sumporenje

Svrha sumporenja je inaktivacija oksidativnih enzima (posmeđivanje), zaštita od oksidacije, inaktivacija prirodne mikroflore (kvasci, bakterije i plijesni) te taloženje čestica mutnoće. Najčešća sredstva za sumporenje su kalijev metabisulfit (vinobran), sumporne vrpce i sumporasta kiselina (5 – 6 % otopina). Dodatak veće količine sumpora negativno utječe na miris i okus vina te na zdravlje ljudi (Kovačević Ganić, 2008).

### 2.2.3. Odležavanje na talogu i pretakanje

Nakon završene fermentacije slijedi pretok vina. Pretokom odstranjujemo talog iz mladog vina, ali odstranjujemo i kvašćeve stanice koje su bogate aminokiselinama te na taj način u određenoj mjeri osiromašujemo vino. Da bi smanjili te negativne efekte, mlado vino se ostavlja na talogu, a tu metodu nazivamo „*sur lie*“ tehnologija. Izvorna se tehnologija provodi u drvenim bačvama kako ne bi došlo do problema sa H<sub>2</sub>S, ali se može provoditi i u posudama od nehrđajućeg čelika,

međutim tada se susrećemo sa određenim problemima. Najveći problem je pojava sumporovodika ( $H_2S$ ) koji daje neugodan miris po pokvarenim jajima.  $H_2S$  se pojavljuje zato što je nehrđajući čelik inertan materijal i ne propušta kisik koji je potreban kvascima. Kako bi se uklonio nastali sumporovodik te uklonio talog kvasaca provodi se pretok vina (tri puta). Za mlada vina idealna temperatura podruma u kojem se ono skladišti je od 12 do 16 °C. Nakon prvog pretakanja slijedi dozrijevanje i starenje vina (biokemijske i fizikalne promjene). Bitno je da u posudi tijekom tih procesa nema praznog prostora, odnosno da se kontakt sa zrakom svede na najmanju moguću mjeru.

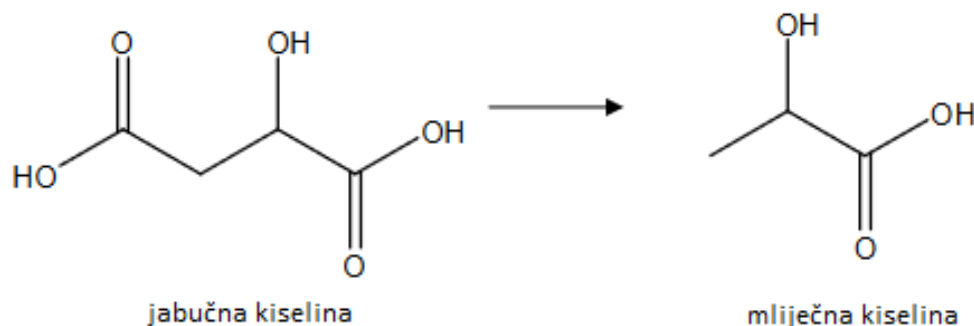
#### **2.2.4. Starenje vina**

Neposredno po završetku alkoholne fermentacije vino nije pogodno za piće; ono je neharmonično, grubo i s naglašenim mirisom po kvascu. Potrebno je određeno vrijeme, tzv. period stabilizacije (sazrijevanja) vina u kojem vino postiže konačnu kvalitetu. U formiranju okusa značajnu ulogu ima malolaktična fermentacija te se s gledišta okusa smatra da prelazak jabučne kiseline u mliječnu predstavlja prvi korak na putu starenja vina. U ovom vremenskom periodu čuvanja vina u bocama, dolazi do formiranja određenih mirisnih svojstva (*bouquet*).

### **2.3. Jabučno-mliječna fermentacija**

Proizvodnja vina uključuje dva fermentacijska procesa, alkoholnu fermentaciju koju provode kvasci i jabučno-mliječnu fermentaciju (JMF) koju provode bakterije mliječne kiseline (BMK) (Bauer i Dicks, 2004). JMF, zvana još i malolaktična fermentacija (MLF), je proces biološkog otkiseljavanja vina u kojem se dikarboksilna L-jabučna kiselina pretvara u monokarboksilnu L-mliječnu kiselinu (**Slika 3**) i ugljik(IV) oksid (Plavša, 2010). Visoke koncentracije jabučne kiseline daju neugodan kiseli okus vinima. JMF igra važnu ulogu u određivanju konačne kvalitete većine crnih vina, ali i nekih bijelih vina i klasičnih pjenušavih vina. JMF osim što povećava pH (smanjenje kiselosti), proizvodi i aromatske spojeve koji mijenjaju organoleptički profil vina. Prema kraju alkoholne fermentacije spontana JMF uglavnom je potaknuta od bakterije *Oenococcus oeni*, vrste nekada poznate kao *Leuconostoc oenos*. JMF se pretežno potiče u hladnim vinogradarskim krajevima gdje grožđe ima visoke razine jabučne kiseline. Ako je ovaj tip

fermentacije nekontroliran, osobito kod vina s visokim pH (tipično za vina u toplijim vinogradarskim regijama), može doći do neugodnog okusa vina ili čak kvarenja. Osim nepoželjnih organoleptičkih promjena, crvena boja vina (odnosi se na crna vina) može biti smanjena za čak 30 % te može doći do nastajanja biogenih amina. Spontana JMF je nepredvidljiva, jer se može pojaviti u bilo kojem trenutku, tijekom ili nekoliko mjeseci nakon završetka alkoholne fermentacije (Bauer i Dicks, 2004).



**Slika 3** Pretvorba jabučne kiseline u mliječnu kiselinu

JMF utječe na tri različita aspekta kvalitete vina: kiselost, mikrobnu stabilnost i osjetilnu složenost vina. Ovaj doprinos JMF može poboljšati kvalitetu vina, ali može i negativno utjecati u nekontroliranim uvjetima. Uspjeh provedbe JMF-a pod utjecajem je nekoliko enoloških parametara, kao što su pH, temperatura, sadržaj alkohola i koncentracije SO<sub>2</sub>. Niski pH (3,0) i visoka koncentracija alkohola (do 126,24 g/L) su dva faktora koji kada se kombiniraju s drugim enološkim parametrima, utječu na preživljavanje BMK-a i utječu na JMF. Vina iz hladnih klimatskih područja (sjeverna Europa, Novi Zeland, Kanada, sjeveroistočni SAD) obično karakterizira nizak pH i niži sadržaj alkohola. Dok vina iz toplijih klimatskih regija (južna Europa, južna Afrika, Australija) karakteriziraju visoke razine alkohola zbog visokih koncentracija šećera i visoke razine pH. Od svih vrsta BMK povezanih s vinom, bakterija *Oenococcus oeni* je najviše tolerantna na nepovoljne uvjete te je najpoželjnija bakterijska vrsta za obavljanje JMF-a. Metabolička aktivnost, kao i kinetika JMF-a, utjecat će na senzorni profil vina vezanog uz vinifikacijske tehnike te fizikalni i kemijski sastav vina. Vinifikacijska tehnika također može utjecati na završni profil vina (Knoll i sur., 2011).

Kao i dugi mikroorganizmi, BMK rastu i razvijaju se u povoljnim uvjetima koje osigurava hranjivo, temperatura, alkohol, pH, SO<sub>2</sub> te fenolni spojevi. Najpoznatije bakterije koje provode JMF potječu iz rodova *Oenococcus*, *Pediococcus* i *Lactobacillus* (gram pozitivne bakterije). Najznačajnije vrste BMK dane su u **Tablici 2**. Porodica *Lactobacillaceae* zastupljena je rodom *Lactobacillus*, a porodica *Streptococcaceae* rodovima *Oenococcus* i *Pediococcus*. BMK su kemotrofni organizmi, odnosno do energije za svoj metabolizam dolaze oksidacijom kemijskih spojeva. Metabolizam BMK predstavlja biokemijske reakcije razgradnje i sinteze izmjenom tvari preko stanične stjenke bakterije tijekom njenog umnažanja kojima bakterija osigurava energiju. Oksidiraju se šećeri (heksoza i pentoza) i organske kiseline (jabučna i limunska kiselina). Homofermentativne bakterije produciraju više od 85% mliječne kiseline iz glukoze dok heterofermentativne bakterije produciraju ugljični dioksid, etanol, octenu i mliječnu kiselinu (Plavša, 2010).

**Tablica 2** Najraširenije vrste BMK u moštu i vinu (Ribéreau-Gayon i sur., 2006.)

Oblik stanice		Vrsta
štapčasti oblici (laktobacili)	Fakultativni homofermentativni	<i>Lactobacillus casei</i>
		<i>Lactobacillus plantarum</i>
	Obligatni heterofermentativni	<i>Lactobacillus brevis</i>
		<i>Lactobacillus hilgardii</i>
okrugli oblici (koki)	Homofermentativni	<i>Pediococcus damnosus</i>
		<i>Pediococcus pentosaceus</i>
	Heterofermentativni	<i>Leuconostoc oenus (Oenococcus oeni)</i>
		<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides</i>

Većinu energije potrebne za rast i razvoj, BMK dobivaju razgradnjom brojnih organskih spojeva kao što su šećeri, aminokiseline i organske kiseline. Hranjiva, vitamine i elemente u tragovima

BMK uzimaju iz svoje okoline. Ugljik u osnovi potječe iz šećera i nekih organskih kiselina. Kapacitet razgradnje šećera ovisi o vrsti bakterije i okolišnim čimbenicima. Potrebno je manje od 1 g/L glukoze za stvaranje dovoljno biomase BMK za početak JMF. Aminokiseline opskrbljuju BMK dušikom. Minerali poput  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $K^+$  i  $Na^+$  su prijeko potrebni u metabolizmu bakterija (Plavša, 2010). Stanice dobivaju energiju iz monoanionskog L-malata kroz generiranje proton gradijenta preko stanične membrane. Samo su sojevi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Pediococcus* rezistentni na nisku pH (<3,5), visoku razinu  $SO_2$  (50 ppm) i etanol od cca. 10%. *Pediococcus damnosus*, *Leuconostoc mesenteroides* i *Oenococcus oeni* dominiraju tijekom alkoholne fermentacije. Dekarboksilacija L-malata u L-laktat je katalizirana s malolaktičkim enzimom (MLE) uz zahtjev  $NAD^+$  i  $Mn^{2+}$ . MLE, jedini enzim koji je uključen u JMF, pročišćen je iz nekoliko BMK (Bauer i Dicks, 2004).

### L-malat

Sok od grožđa sadrži 1 – 8 g/L malata (sol jabučne kiseline). Koncentracija malata smanjuje se tijekom sazrijevanja grožđa. U hladnim vinogradarskim krajevima konačna koncentracije u grožđu je oko 2 – 5 g/L, dok je sadržaj malata mnogo niži u toplijim krajevima (tipično <2 g/L). BMK metaboliziraju L-malate različitim enzimskim putevima, pretvarajući ga u L-laktat i  $CO_2$ . Neke BMK imaju aktivne enzime koji dekarboksiliraju L-malat izravno na L-laktat bez međuprodukata. *Lactobacillus casei* i *Enterococcus faecalis* posjeduju enzim koji pretvara L-malat u piruvat. Nekoliko studija je pokazalo da L-malat stimulira rast i proizvodnju biomase *O. oeni* (Bauer i Dicks, 2004).

### L-laktat

Laktat (soli mliječne kiseline) (0,1 – 7 g/L u vinu) se može aerobno metabolizirati pomoću BMK i rezultirat će kvarenjem vina. L-laktat pri 0,5 g/L smanjuje rast *O. oeni*, a u koncentracijama većim od 3 g/L potpuno inhibira njegov rast (Bauer i Dicks, 2004).

BMK prvobitno razgrađuju dvije organske kiseline iz vina, i to jabučnu i limunsku kiselinu. Razgradnja navedenih kiselina je bitna za otkiseljavanje vina, što bitno utječe na senzorska svojstva vina. Limunska kiselina spada u glavne komponente vina, a nalazi se u koncentracijama od 0,1 – 0,7 g/L. BMK (*L. plantarum*, *L. casei*, *O. oeni* i *L. mesenteroides*) su sposobne razgraditi i limunsku kiselinu do diacetila, acetoina i 2,3 butandiola. Vrste roda *Pediococcus* i vrsta *L. brevis*

nemaju tu sposobnost jer ne posjeduju enzim citrat liazu. Razgradnja limunske kiseline slijedi nakon razgradnje jabučne kiseline. Diacetil je jedna od najvažnijih mirisno-okusnih komponenti nastala tijekom JMF. Diacetil vinu daje karakterističnu aromu maslaca ili lješnjaka (Plavša, 2010).

*Oenococcus oeni* je bakterijska vrsta najprikladnija za jabučno-mliječnu fermentaciju jer može tolerirati nepovoljne fizikalno-kemijske uvjete prisutne u vinu. Kriteriji za odabir malolaktičkih starter kultura temelje se na klasičnom testu preživljavanja u vinu te količini razgradnje L-jabučne kiseline. Nedostatak aktivnost dekarboksilaze uključena je u kriterije odabira jer proizvodi ovog enzima (biogeni amini) mogu uzrokovati alergijske poremećaje ako se unesu velike količine ili ako je prirodni proces detoksifikacije inhibiran. Dokazano je da kad je bakterijska stanica pod „stresom“, može aktivirati nekoliko metaboličkih procesa proizvodnje ATP-a. Histamin, tiramin i putrescin su najznačajniji biogenih amina prisutnih u vinu u kojem se odvijala JMF (Rosi, Nannelli, Giovani, 2009). Bakterije mliječne kiseline su Gram-pozitivni nepokretni i nesporulirajući mikroorganizmi te fakultativni anaerobi kojima je optimalna temperatura za rast i razvoj 20 do 30 °C.

Temperatura ima snažan utjecaj na rast i razvoj te dužinu LAG faze. Temperaturni optimum za vrstu *Oenococcus oeni* je oko 20 – 25 °C. Kako se sadržaj alkohola povećava, temperaturni optimum se smanjuje. Rast i razvoj BMK slabi s padom temperature te na oko 14 – 15 °C prestaje (Plavša, 2010). Preživljavanje *O. oeni* te njegova sposobnost za izvođenje JMF je poboljšana predinkubiranjem na 42 °C (Bauer i Dicks, 2004).

Vrijednost pH vina igra važnu ulogu u određivanju koje će vrste BMK preživjeti i biti sposobne za razvoj. *O. oeni* djeluje i ako je pH ispod 3,5 te je prvenstveno odgovoran za JMF. *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus inopinatus* te nekoliko *Lactobacillus spp.* je izolirano iz vina s pH između 3,5 i 4,0. Inokulacija starter kulturama smanjuje potencijal kvarenja drugim bakterijama mliječne kiseline i/ili bakteriofagima, osigurava brzi početak JMF-a i osigurava bolju kontrolu nad proizvodnjom aromatskih spojeva, a time i okusa vina. Brojne starter kulture su razvijene, od kojih je većina prodana liofilizirana ili u smrznutom obliku. Priprema starter kultura podrazumijeva rast pod kontroliranim uvjetima. Poželjan je pH ispod 4,5 i temperatura inkubacije viša od 10 °C. Izravna inokulacija od rehidriranih starter kultura u vino dovodi do smanjenja najmanje tri log-ciklusa u stanicama.



Optimalno vrijeme inokulacije ovisi o vrsti vina (sorta grožđa), SO<sub>2</sub>, sadržaju alkohola, pH i temperaturi. Rast *O. oeni* se pojačava ako se uzgaja u mediju s dodatkom 40 – 80 % vina ili kvasaca. Hranjive tvari proizvedene tijekom autolize kvasca mogu stimulirati rast malolaktičkih bakterija. Neki vinari preferiraju inokulaciju bakterija tijekom alkoholne fermentacije. Inokulacija na kraju alkoholne fermentacije može rezultirati odgođenom JMF zbog visoke koncentracije etanola. Preživljavanje *O. oeni* poboljšalo se kada su stanice podvrgnute kiselom šoku prije inokulacije zbog sinteze specifičnih stresnih proteina (Bauer i Dicks, 2004).

Etanol ima jak utjecaj na rast i razvoj te na metaboličku aktivnost BMK. Visoke koncentracije etanola snižavaju optimalnu temperaturu za rast i razvoj, a tolerantnost na etanol se smanjuje podizanjem temperature (Plavša, 2010). Koncentracije etanola pronađene u vinu (8 – 12 % vol.) ne inhibiraju malolaktičku aktivnost jer se stopa rasta bakterije *O. oeni* povećava linearno s povećanjem koncentracije etanola. 14 % vol. alkohola je gornja tolerantna granica za većinu sojeva. Rast je potpuno inhibiran na 25 °C i >14 % vol. etanola. Sojevi *Lactobacillus* i *Pediococcus* su općenito tolerantniji na visoke koncentracije etanola od *O. oeni* (Bauer i Dicks, 2004).

U mediju s niskom pH vrijednošću kao što je vino, sumpor je dominantan u obliku slobodnog SO<sub>2</sub>. Razina slobodnog SO<sub>2</sub> od 5 mg/L rezultira završetkom JMF nakon 40-tak dana (Plavša, 2010). Uobičajena je praksa dodavanje SO<sub>2</sub> (50 do 100 mg/L) u mošt na početku postupka vinifikacije kako bi se ograničio rast autohtonog kvasca kao što su *Kloeckera* i *Hansenia spp.* te rast bakterija octene kiseline. Većina stanica *O. oeni* umire unutar 3 sata u prisutnosti 15 mg/L slobodnog sulfita (Bauer i Dicks, 2004).

Razne studije istražile su evoluciju JMF-a u vinu, s obzirom na visoke koncentracije etanola, niski pH ili SO<sub>2</sub>. Sadržaj etanola i pH su ključni čimbenici koji ograničavaju rast bakterija i njihovu aktivnost. pH u području od 2,9 do 3,5 ima veliki utjecaj na bakterijsku održivost i JMF, dok koncentracija alkohola u rasponu od 98,6 do 114,4 g/L ima manje utjecaja. Već i djelomična JMF može doprinijeti aromi vina povećanjem voćnih estera poput etilestera octene, propionske i maslačne kiseline. Koncentracija nekih nestabilnih komponenata arome (npr. etilester octene kiseline, 3-metilbutilester octene kiseline, dietilester jantarne kiseline ili etilester mliječne kiseline), pod utjecajem je različitih koncentracija pH i etanola. Razine estera kratkog lanca, poput etilestera mliječne i octene kiseline te dietilester sukcininske kiseline, su veće nakon

potpune JMF. Ester mliječne kiseline, povezan s voćnošću, važan je spoj arome nastao tijekom JMF. Dietilester sukcininske kiseline, povezan s voćnim i cvjetnom notom, značajno pridonosi aromi vina. Neke studije bilježe porast tog estera tijekom starenja, a druge bilježe povećanje koncentracije nakon JMF na vinu s pH 3,2 do 3,7, ovisno o korištenom bakterijskom soju. Ukupne količine estera pronađene poslije JMF doprinose finalnoj aromi vina. Općenito, jabučno-mliječna fermentacija proizvodi veće koncentracije estera i ukupnih alkohola, nego sama alkoholna fermentacija. Niži pH rezultirao je značajnijim povećanjem ukupnih voćnih estera. Sadržaj acetaldehida se smanjio u vinima s inokuliranim bakterijama. Dolazi do degradacije ovog spoja i drugih aldehida tijekom JMF što može uzrokovati smanjenje biljne arome (Knoll i sur., 2011).

Najzastupljeniji šećeri u vinu nakon završetka alkoholne fermentacije su glukoza i fruktoza, što može varirati od 10 g/L do manje od 0,5 g/L, ovisno o vrsti vina. Fruktoza se uvijek nalazi u većim koncentracijama od glukoze. Iako je glukoza poželjnija za *O. oeni*, fruktoza je najučinkovitiji metabolizirani šećer, što dovodi do maksimalne razine biomase tijekom metabolizma glukoze. Fruktoza se metabolizira heterofermentacijskim putem te se reducira na manitol pomoću manitol dehidrogenaze. Koncentracija ostalih šećera je oko 1,3 g/L. Sposobnost tih šećera je da podržavaju rast specifičnog soja *O. oeni*. JMF se smanjuje za 50 % u prisutnosti 2 mM glukoze. Pri 5 mM ili više, dolazi do 70 % inhibicije JMF-a. Dodatak fruktoze potpuno sprječava inhibiciju JMF-a izazvanu glukozom (Bauer i Dicks, 2004).

Fenolni spojevi mogu povoljno i nepovoljno utjecati na razvoj mliječno-kiselih bakterija, ovisno o koncentraciji i tipu fenolnih sastojaka. Crna vina za razliku od bijelih sadrže veće količine fenolnih spojeva. *O. oeni* može metabolizirati galnu kiselinu i antocijane iz kojih koristi glukozni dio kao izvor energije. Flavanoidi stimuliraju JMF (Plavša, 2010).

### **Učinci jabučno-mliječne fermentacije**

Razgradnjom 1 g jabučne kiseline nastaje 0,67 g mliječne kiseline čime se smanjuje kiselost. Smanjenje ukupne kiselosti ovisi o koncentraciji jabučne kiseline, pri čemu dolazi do povećanja pH vrijednosti za 0,1 – 0,3. Osim promjena u kiselinskom sastavu vina, BMK je sposobna stvarati nove i modificirati postojeće komponente koje sudjeluju u formiranju senzornih svojstava vina.

Vina kod kojih je JMF provedena do kraja (jabučna kiselina < 0,2 g/L) mikrobiološki su stabilnija od onih kod kojih taj proces nije proveden (Plavša, 2010).

Provedba JMF ne daje uvijek pozitivne rezultate. Ponekad je odgovorna i za neželjene promjene u senzornim svojstvima i smanjenju obojenosti vina kao i za nastajanje biogenih amina. *Lactobacillus* i *Pediococcus* dominantni su u provođenju JMF kod vina s visokom pH vrijednošću (> 3,5) te je moguća tvorba spojeva koji negativno utječu na kakvoću vina. Tijekom JMF boja vina se može smanjiti i od 30 % (Plavša, 2010).

#### 2.4. Fizikalno-kemijski pokazatelji kakvoće vina

Prema Pravilniku o vinu (NN/96/) kakvoća vina se utvrđuje na osnovu sljedećih fizikalno-kemijskih pokazatelja: gustoća, alkoholna jakost, ukupni suhi ekstrakt, reducirajući šećeri, saharoza, pepeo, ukupna kiselost, hlapiva kiselost, pH, slobodni SO<sub>2</sub> i ukupni SO<sub>2</sub> (Sović, 2013.).

**Relativna gustoća**, kao jedan od pokazatelja kakvoće vina, ovisi o nekoliko čimbenika: sadržaju alkohola, sadržaju šećera te sadržaju glicerola (Diaz i sur., 2003.). Gustoća vina pri 20 °C definirana je kao masa vina po jedinici volumena i pri temperaturi od 20 °C, a izražena je u g/mL. Nadalje, relativna gustoća pri 20 °C ili specifična težina pri 20 °C je omjer gustoće određenog volumena vina prema gustoći istog volumena vode pri 20 °C.

**Ukupni suhi ekstrakt.** Ukupni suhi ekstrakt predstavlja skupi svih tvari u vinu koje u određenim fizičkim uvjetima ne isparavaju (vodena kupelj, eksikator). U ekstrakt spadaju ugljikohidrati, mineralne tvari, glicerol, butilen, glikol, nehlapive kiseline (vinska, jabučna, mliječna), tanini i tvari boje (Vrdoljak, 2009.).

Kvaliteta vina ovisi o sadržaju ekstrakta. Vina sa niskim sadržajima ekstrakta su neharmonična i prazna, a vina sa previše ekstrakta su teška i gusta. Vina sa većim sadržajima alkohola najčešće imaju i veće sadržaje ekstrakta. Ekstrakt služi kao jedan od faktora za otkrivanje patvorenja vina. Optimalan sadržaj ekstrakta bez šećera prikazuje nam **Tablica 3.**

**Tablica 3** Prema Pravilniku o proizvodnji vina (NN 2/05) propisane su minimalne količine ekstrakta bez šećera za pojedine kvalitetne kategorije vina

Boja vina	Kakvoća vina		
	Stolno	Kvalitetno	Vrhunsko
Bijelo	15 g/L	17 g/L	18 g/L
Ružičasto	16 g/L	18 g/L	19 g/L
Crno	17 g/L	19 g/L	20 g/L

**Reducirajući šećeri (prirodni šećeri).** Reducirajući šećeri su definirani kao svi šećeri koji u svojoj strukturi imaju slobodne keto ili aldehidne funkcionalne skupine (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, NN 106/04, 2004). Reducirajući šećeri su svi monosaharidi, bilo aldoze ili ketoze. Većina disaharida su isto reducirajući, ali saharoza čini iznimku. To su šećeri koji reduciraju Felingovu otopinu ili Tollensov reagens (Morrison, Boyd, 1979). Reducirajući šećeri kao što su glukoza i fruktoza su široko prisutni u hrani, a najviše u voću. Kupina sadrži od 4,9 g šećera na 100 g suhe tvari (Huerta et al., 1998.).

**Alkoholna jakost.** Etanol je glavni produkt alkoholne fermentacije, dok se metanol i ostali alkoholi pojavljuju u manjim koncentracijama. Etanol je važan za aromu i stabilnost vina (Klarić i sur, 2016). Alkoholna jakost je izražena volumenom, % vol, a definirana je kao broj litara etanola u 100 L vina kada se volumen mjeri pri temperaturi od 20 °C. Homolozi etanola i homolozi estera etanola, zajedno s etanolom, su uključeni u alkoholnu jakost jer su prisutni u destilatu (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, NN 106/04, 2004.).

**Sadržaj ukupnih kiselina.** Kiseline su važna sastavnica voća, mošta i vina. Sadržaj organskih i anorganskih kiselina u voću ovisi o vrsti voća, sorti, klimi i geomorfološkim karakteristikama. Kiselost se mijenja tijekom rasta i sazrijevanja te utječe na kiselost mošta. Zbog toga kiselost mošta može utjecati na vino, jer neke kiseline iz mošta prelaze u vino i sudjeluju u različitim

fizikalno-kemijskim i biokemijskim procesima, kao što je nastanak arome. Ukupna kiselost je važna jer utječe na okus i kvalitetu vina (Huerta et al., 1998.).

Ukupni aciditet je vrijednost izražena količinom lužine (NaOH) upotrijebljene za neutralizaciju svih kiselina u vinu. Količina ukupnih kiselina u vinu najčešće se kreće od 4 do 7 g/L izraženih kao vinska kiselina.

**Sadržaj hlapivih kiselina.** Hlapive organske kiseline su grupa kiselina koje se nalaze u vinu, a koje pod određenim uvjetima isparavaju. Nastaju kao sekundarni produkti alkoholne fermentacije, a mogu nastati i u procesu kvarenja vina. Hlapivu kiselost vina najvećim dijelom čini octena kiselina te u manjem postotku maslačna, mravlja, propionska i druge.

**Pepeo.** Anorganski ostatak nakon izgaranja vina. Što je vino kvalitetnije u njemu se nalazi veća koncentracija pepela i minerala (Amidžić Klarić i sur., 2016.).

**Sadržaj ukupnog i slobodnog SO<sub>2</sub>.** SO<sub>2</sub> se nalazi u vinu u slobodnom i vezanom obliku. Veže se sa šećerima, aldehydima i polifenolnim tvarima (Sović, 2013.).

**pH.** Realni aciditet (pH) je negativni logaritam koncentracije vodikovih iona. Vinska kiselina najjače disocira, jabučna slabije, dok ostale kiseline disociraju još slabije. Koncentracija vodikovih iona tj. pH vrijednost najviše ovisi o količini vinske kiseline u moštu i vinu. pH vrijednost nije izravno proporcionalna količini ukupnih kiselina u moštu i vinu. Vrijednost pH mošta i vina uglavnom se kreće između 3,0 i 3,8. Kiseli vina imaju pH vrijednost ispod 3,5 dok se kod nedovoljno kiselih vina ova vrijednost kreće i do 4,0. Niži pH inhibira rast nepoželjnih mikroorganizama u vinu (Kulišić, 2004).

$\text{pH} = -\log [\text{H}^+]$ , pri čemu je  $[\text{H}^+]$  koncentracija vodikova iona.

## 2.5. Šaržni fermentor

Šaržni fermentor konstrukcijski je izveden najčešće u obliku zatvorenog spremnika, po potrebi opremljenog miješalicom, s otvorima kroz koje se reakcijska smjesa uvodi, odnosno odvodi, plaštem (zmijačom ili polucijevima) za izmjenu topline, zagrijavanje ili hlađenje. Karakteristike šaržnog fermentora su da tijekom procesa fermentacije nema izmjene tvari s okolinom, što znači da sve što nastane fermentacijom ostaje u spremniku (Gomzi, 1998.).

### 2.5.1. Prednosti šaržnih procesa

- Industrijski pogon koji upotrebljava spremnike od čelika volumena od 1 do 50 m<sup>3</sup>, relativno jednostavno se može prilagoditi novoj namjeni. Takva se oprema može upotrebljavati za različite operacije separacije, miješanja, grijanja i hlađenja i sl.,
- upotrebom standardne opreme proces pripreme i proces proizvodnje se može umanjiti u odnosu na opremu koja se koristi u kontinuiranoj proizvodnji,
- spremnici se mogu koristiti za nekoliko određenih operacija tijekom procesa,
- tehnologija se lako prenosi iz laboratorijskih u industrijska mjerila (Kovačević, 2008.).

### 2.5.2. Konstrukcijski dijelovi šaržnog fermentora

Šaržni fermentori, konstrukcijski gledano, uglavnom su cilindrične posude sa zaobljenim dnom te po potrebi pripadajućim uređajima/opremom za prijenos topline i miješanje. Cilindrični oblik fermentora uglavnom je uvjetovan konstrukcijskim razlozima koji se očituju u mogućnosti postizanja višeg tlaka, učinkovitijim miješanjem te olakšanom čišćenju samog fermentora. Fermentori su opremljeni s odgovarajućim cjevovodima i ventilima za unos i izvođenje reakcijske smjese, kontrolnim i mjernim osjetilima, sigurnosnim brtvama, inspekcijskim oknima i drugim (Gomzi, 1998.).

### 2.5.3. Izbor materijala

Fermentori i spremnici za proizvodnju i čuvanje vina obično su izrađeni od nehrđajućeg čelika (AISI 304 i AISI 316).

#### 2.5.4. Debljina stjenke fermentora

Fermentori trebaju biti izvedeni tako da ne dođe do deformacija ili oštećenja pod uvjetima različitih opterećenja. Opterećenja kojima se izlažu fermentori mogu se podijeliti na dvije skupine:

a) Osnovna opterećenja:

- projektni tlak uključujući statički tlak kapljevine u fermentoru,
- maksimalna masa fermentora i sadržaja u radnim uvjetima,
- opterećenja vjetra,
- opterećenja uslijed potresa.

b) Dodatna opterećenja:

- lokalna naprezanja uzrokovana nosačima, unutarnjim dijelovima i cijevovodima spojenim na fermentoru,
- momenti savijanja uzrokovani ekscentričnošću centra djelovanja radnog tlaka u odnosu na fermentor,
- naprezanja uslijed razlike temperatura i razlike koeficijenta rastezanja materijala,
- opterećenja uzrokovana promjenama temperature i tlaka (Beer, 1994.).

Debljinu stjenke cilindričnog fermentora možemo izračunati pomoću formule (1):

$$s = \frac{p \cdot (d/2)}{E_z \cdot S - 0,6 \cdot p} + s_{kor} \quad (1)$$

gdje je:

- $s$  – debljina stjenke fermentora [m],
- $p$  – tlak u fermentoru [Pa],
- $d$  – promjer fermentora [m],
- $E_z$  – faktor kvalitete zavarenih spojeva (0,8 – 1),
- $S$  – dopušteno naprezanje konstrukcijskog materijala [Pa],
- $s_{kor}$  – korozijski dodatak [m] (Šef i Olujić, 1988.).

### 2.5.5. Volumen fermentora

Horizontalni cilindrični fermentor ima volumen prema formuli (2):

$$V_0 = 2 \cdot V_1 + V_2 \quad (2)$$

gdje je:  $V_0$  – ukupni volumen horizontalnog cilindričnog fermentora [ $m^3$ ],  
 $V_1$  – volumen elipsoidne glave fermentora [ $m^3$ ],  
 $V_2$  – volumen cilindrične ljuske fermentora [ $m^3$ ].

Volumen elipsoidne glave fermentora se računa prema formuli (3):

$$V_0 = 2 \cdot V_1 + V_2 \quad (3)$$

gdje je:  $V_1$  – volumen elipsoidne glave fermentora [ $m^3$ ],  
 $\beta$  – kut elipsoidne glave (0,5),  
 $a$  – faktor za određivanje volumena koničnog dna fermentora (0,606).

Volumen cilindrične ljuske fermentora se računa prema formuli (4):

$$V_2 = \pi \cdot a^3 \cdot \lambda \quad (4)$$

gdje je:  $V_2$  – volumen cilindrične ljuske fermentora [ $m^3$ ],  
 $a$  – faktor za određivanje volumena koničnog dna fermentora (0,606),  
 $\lambda$  – relativna duljina cilindrične ljuske fermentora [m] (Magnucki i sur., 2004.).

### 2.5.6. Masa fermentora

Masa horizontalnog cilindričnog fermentora se računa prema formuli (5):

$$m_s = 2 \cdot m_1 + m_2 \quad (5)$$

gdje je:  $m_s$  – ukupna masa fermentora [kg],  
 $m_1$  – masa elipsoidne glave fermentora [kg],  
 $m_2$  – masa cilindrične ljuske fermentora [kg].

Masa elipsoidne glave fermentora se računa prema formuli (6):



$$m_1 = \pi \cdot \rho_s \cdot a^2 \cdot t_1 \cdot c_m \quad (6)$$

gdje je:  $m_1$  – masa elipsoidne glave fermentora [kg],  
 $\rho_s$  – gustoća mase stjenke [kg/m<sup>3</sup>],  
 $a$  – faktor za određivanje kapaciteta koničnog dna fermentora (0,606)  
 $t_1$  – debljina elipsoidne glave fermentora [m],  
 $c_m$  – za elipsoidnu glavu fermentora  $\approx 1,38017$ .

Masa cilindrične ljuske fermentora se računa prema formuli (7):

$$m_2 = 2\pi \cdot \rho_s \cdot a^2 \cdot t_2 \cdot \lambda \quad (7)$$

gdje je:  $m_2$  – masa cilindrične ljuske fermentora [kg],  
 $\rho_s$  – gustoća mase stjenke [kg/m<sup>3</sup>],  
 $a$  – faktor za određivanje kapaciteta koničnog dna fermentora (0,606),  
 $t_2$  – debljina cilindrične ljuske fermentora [m],  
 $\lambda$  – relativna duljina cilindrične ljuske fermentora [m], (Magnucki i sur., 2004.).

### 2.5.7. Prijenos topline

Prijenos topline obično se ostvaruje kroz stjenku fermentora (izmjena u plaštu), kroz stjenku izmjenjivača smještenog unutar fermentora (cijevna zmija) ili cirkulacijom reakcijske smjese kroz vanjski izmjenjivač topline. Najčešće se toplina prenosi kroz plašt različitih izvedbi.

Stupanj prijenosa topline ovisi uglavnom o fizikalnim svojstvima tekućine (npr. gustoća, viskozitet, specifična toplina) geometriji reaktora, stupnju miješanja, vrsti i veličini miješala te njegovim položajem (Kayode Coker, 2001.).

### 2.5.8. Prijenos topline medijem u plaštu

Kao sredstvo za prijenos topline koriste se različiti mediji. Obično se, gdje je to moguće, za hlađenje ili grijanje koristi voda. Rashladna se voda obrađuje prije primjene u izmjenjivačima da se spriječi korozija, taloženje i rast mikroorganizama na površinama za prijenos topline.

Primjenjuju se razni inhibitori korozije i stabilizatori tvrdoće s polifosfatima koji sprječavaju precipitaciju soli. Dodaju se i razni dispergenti, kao što su lingosulfonati da se spriječi aglomeracija čestica i lijepljenje na stjenkama (Šef i Olujić, 1988.).

Strujanje tekućine kroz plašt može se odvijati na dva načina: laminarno i turbulentno. Kod malih brzina strujanje je laminarno, a kod većih je turbulentno. Način strujanja tekućine ovisi o brzini strujanja tekućine, gustoći i viskozitetu tekućine te promjeru plašta, a određuje se pomoću Reynoldsovog broja (Lelas, 2006.).

Veći koeficijent prijenosa u plaštu postižu se turbulentnim protokom medija, a to se omogućuje ugradnjom pregrada te postranih ulaza. Izvedbom plašta u obliku polucijevi i "dimple" plašta također se postiže veći koeficijent prijenosa u usporedbi s uobičajenim plaštom s jednim ulazom i bez pregrada (Gomzi, 1998.).

Postoji alternativa koja predstavlja strujanje medija pomoću mlaznica raspoređene pri dnu plašta što uzrokuje gibanje tekućine u plaštu. Najčešće se toplina prenosi kroz plašt različitih izvedbi gdje medij cirkulira u prstenastom prostoru između plašta i stjenke posude.

Razmak između plašta i stjenke posude ovisi o veličini posude, međutim kreće se od 50 mm za male posude do 300 mm za veće posude. Razmak od zavojnice i područja koje obuhvaća se odabire da osigura potrebnu površinu za prijenos topline. Standardne cijevi, vanjskog promjera od 60 mm do 120 mm, često se koriste u tu svrhu (Kayode Coker, 2001.).

Tijekom prijenosa topline može doći do stvaranja otpora prijenosa topline uslijed onečišćenja površine prijenosa rashladnim ili ogrjevnim medijem zbog stvaranja kamenca (Beer, 1994.).

#### **2.5.9. Rashladni sustav fermentora**

Vrijeme grijanja ili hlađenja fermentora prvenstveno ovisi o radnom volumenu fermentora, načinu prijenosa topline te materijalu od kojeg je izrađen. Izračunavanje vremena potrebnog za grijanje ili hlađenja fermentora provodi se uz sljedeće pretpostavke:

- ukupni koeficijent prijenosa topline je konstantan tijekom cijelog vremena grijanja ili hlađenja,

- maseni protoci fluida su konstantni,
- toplinski kapacitet kapljevine su konstantni tijekom cijelog vremena grijanja ili hlađenja,
- jednaka temperatura ulaznog fluida za grijanje i hlađenje,
- miješanjem se osigurava ujednačenost temperature cijelog sadržaja,
- gubici topline su zanemarivi.

Fluid koji hladi fermentor je neizoterman, što znači da ulazna temperatura fluida nije stalna i mijenja se tijekom vremena.

Za proračun se koristi srednja logaritamske razlika temperature ( $\Delta T_m$ ) koja se računa prema formuli (8):

$$\Delta T_m = \frac{\Delta T_{ul} - \Delta T_{iz}}{\ln\left(\frac{\Delta T_{ul}}{\Delta T_{iz}}\right)} \quad (8)$$

gdje je:  $\Delta T_m$  – srednja logaritamska razlika temperature [°C],  
 $\Delta T_{ul}$  – razlika ulaznih temperatura [°C],  
 $\Delta T_{iz}$  – razlika izlaznih temperatura [°C].

Razlika izlaznih fluida se računa prema formuli (9):

$$\Delta T_{iz} = T_2 - t_1 \quad (9)$$

gdje je:  $T_2$  – izlazna temperatura mase [°C],  
 $t_1$  – ulazna temperature rashladnog fluida [°C].

Temperaturna razlika uzlaznih fluida računa se prema formuli (10):

$$\Delta T_{ul} = T_1 - t_2 \quad (10)$$

gdje je:  $T_1$  – ulazna temperatura mase [°C],  
 $t_2$  – izlazna temperature rashladnog fluida [°C].

Za proračun površine izmjene topline potrebno je odrediti vrijednost odnosno količinu izmijenjene topline, koja se izračunava prema formuli (11):

$$Q = m' \cdot c_p \cdot \Delta T_{fluid} \quad (11)$$

gdje je:  $Q$  – količina izmijenjene topline [W],  
 $m'$  – maseni protok rashladnog fluida [kg/s],  
 $c_p$  – specifična toplina rashladnog fluida [kJ/kg K],  
 $\Delta T_{fluid}$  – temperaturna razlika rashladnog fluida [°C].

Nadalje, dobivenim vrijednostima može se izračunati i površina izmjene topline prema formuli (12):

$$A = \frac{Q}{k \cdot \Delta T_m} \quad (12)$$

gdje je:  $A$  – površina izmjene topline [m<sup>2</sup>],  
 $Q$  – količina izmijenjene topline [W],  
 $k$  – koeficijent prolaza topline [W/m<sup>2</sup> K],  
 $\Delta T_m$  – srednja logaritamska razlika temperature [°C].

Izračun vremena potrebnog za hlađenje započinjemo s navedenim izrazom (13):

$$X = e^{\frac{k \cdot A}{m \cdot c_p}} \quad (13)$$

gdje je:  $X$  – eksponencijalni koeficijent,  
 $k$  – koeficijent prolaza topline [W/m<sup>2</sup> K],  
 $A$  – površina izmjene topline [m<sup>2</sup>],  
 $m$  – maseni protok rashladnog fluida [kg/s],  
 $c_p$  – specifična toplina rashladnog fluida [kJ/kg K].

Izlaznu temperaturu rashladnog fluida računamo prema formuli (14):

$$t_2 = T + \frac{t_1 - T}{X} \quad (14)$$

gdje je:  $t_2$  – izlazna temperatura rashladnog fluida [°C],  
 $T$  – temperatura mase [°C],  
 $t_1$  – ulazna temperatura rashladnog fluida [°C].

### 2.5.10. Uvećanje mjerila: prijenos u poluindustrijsko i industrijsko mjerilo (*scale up*)

Pilot ili poluindustrijska postrojenja su umanjene kopije postojećih ili zamišljenih industrijski postrojenja, a omogućavaju odvijanje određenih fizičkih, fizičko-kemijskih, kemijskih i bioloških procesa pod uvjetima koji vladaju industrijskim postrojenjima.

Za uvećanje procesa koristi se “*scale-up*” faktor koji se može izračunati preko radnog volumena i površine prijenosa topline, prema izrazu (15):

$$SUF = \frac{W_{V2}}{W_{V1}} = \frac{A_2}{A_1} \quad (15)$$

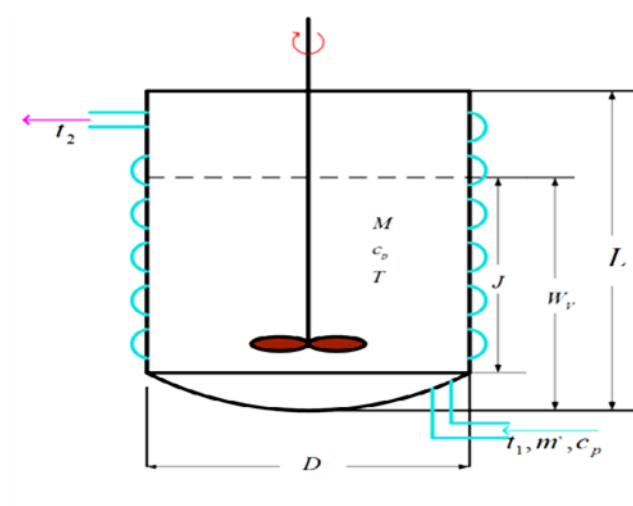
gdje je:  $SUF$  – “*scale-up*” faktor,  
 $W_{V2}$  – radni volumen većeg spremnika [m<sup>3</sup>],  
 $W_{V1}$  – radni volumen pilotnog spremnika [m<sup>3</sup>],  
 $A_2$  – površina prijenosa topline većeg spremnika [m<sup>2</sup>],  
 $A_1$  – površina prijenosa topline manjeg spremnika [m<sup>2</sup>].

Ako se računa preko radnog volumena, tada se koristi sljedeći izraz (16):

$$W_V = F \cdot [a \cdot D^3 + d \cdot R \cdot D^3] \quad (16)$$

gdje je:  $W_V$  – radni volumen [m<sup>3</sup>],  
 $F$  – radni volumen bez volumena koničnog dna spremnika,  
 $a$  – faktor za određivanje kapaciteta koničnog dna spremnika (0,606)  
 $D$  – unutarnji promjer spremnika [m],  
 $d$  – konstanta (5,875),  
 $R$  – omjer promjera i visine spremnika.

Na **Slici 4** prikazan je fermentor s karakterističnim geometrijskim i procesnim parametrima.



**Slika 4** Fermentor s karakterističnom geometrijom i osnovnim projektantskim parametrima

Unutarnji promjer fermentora računa se prema formuli (17):

$$D = \left[ \frac{\left( \frac{W_V}{F} \right)^{1/3}}{(a + d \cdot R)} \right] \quad (17)$$

Konstanta  $d$  se dobije prema formuli (18):

$$d = 7,48 \cdot \left( \frac{\pi}{4} \right) = 5,875 \quad (18)$$

Omjer širine i visine se računa prema formuli (19):

$$R = \frac{L}{D} \quad (19)$$

gdje je:  $L$  – visina fermentora [m],  
 $D$  – promjer fermentora [m].

Ako se računa preko površine prijenosa topline, tada se koristi sljedeći izraz (20):

$$A = f \cdot D^2 + g \cdot R \cdot D^2 \quad (20)$$

gdje je:  $A$  – površina izmjene topline [ $\text{m}^2$ ],  
 $f, g$  – konstante.

Konstanta  $f$  se računa prema formuli (21):

$$f = F + \frac{4 \cdot a \cdot (F - 1)}{7,48} \quad (21)$$

gdje je:  $F$  – faktor za određivanje koničnog dna (0,931).

Konstanta  $g$  se računa prema formuli (22):

$$g = \pi \cdot F \quad (22)$$

Kod uvećanog procesa umjesto eksponencijalnog koeficijenta  $X$  koristi se  $X_2$  koju računamo prema formuli (23):

$$X_2 = e^{a_1 \cdot b} \quad (23)$$

gdje je:  $X_2$  – eksponencijalni koeficijent,  
 $a_1, b$  – varijable.

Varijablu  $a_1$  računamo prema izrazu (24):

$$a_1 = \frac{k \cdot A}{m' \cdot c_{p(\text{vode})}} \quad (24)$$

gdje je:  $k$  – koeficijent prolaza topline [ $\text{W}/\text{m}^2 \text{K}$ ],  
 $A$  – površina izmjene topline [ $\text{m}^2$ ],  
 $m'$  – maseni protok rashladnog fluida [ $\text{kg}/\text{s}$ ],  
 $c_p$  – specifični toplinski kapacitet rashladnog fluida [ $\text{kJ}/\text{kg K}$ ].

Varijablu  $b$  računamo prema izrazu (25):

$$b = \frac{SUF_V \frac{2}{3}}{k} \quad (25)$$

gdje je:  $k$  – konstanta (za polucijevi = 1).

Za izračun vremena potrebnog za hlađenje manjeg spremnika, vrijednosti dobivene u prethodnim koracima uvrste se u izraz (26):

$$t = \left( \frac{M \cdot c_{p(vina)}}{m' \cdot c_{p(vode)}} \right) \cdot \left( \frac{X}{X-1} \right) \cdot \ln \left( \frac{T_{1(vina)} - t_{1(voda)}}{T_{2(vina)} - t_{1(voda)}} \right) \quad (26)$$

gdje je:  $M$  – masa hlađenog fluida [kg].

Za izračun vremena potrebnog za hlađenje višestruko većeg fermentora, vrijednosti dobivene u prethodnim koracima uvrste se u izraz (27):

$$t = \left( \frac{SUF_V \cdot M \cdot c_{p(vina)}}{m' \cdot c_{p(vode)}} \right) \cdot \left( \frac{e^{a_1 \cdot b}}{e^{a_1 \cdot b} - 1} \right) \cdot \ln \left( \frac{T_{1(vina)} - t_{1(voda)}}{T_{2(vina)} - t_{1(voda)}} \right) \quad (27)$$

gdje je:  $SUF_V$  – volumni „scale-up“ faktor.



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Zadatak

Zadatak rada bio je provesti projektiranje sustava za kontroliranu fermentaciju vina u poluindustrijskom mjerilu. Osnovni elementi projektiranja navedenog sustava bili su dimenzioniranje fermentacijskih posuda, projektiranje sustava za termostatiranje fermentora (grijanje/hlađenje) te upravljačkog sustava. Nadalje, zadatak je bio na prethodno projektiranom sustavu provesti kontroliranu alkoholnu fermentaciju (KAF) i kontroliranu (potaknuta) jabučno-mliječnu fermentaciju (JMF) vina sorte Graševina, uz praćenje osnovnih fizikalno-kemijskih parametara vina.

### 3.2. Materijali

Za analizu je korišteno vino dobiveno iz grožđa sorte Graševina. Grožđe je uzgojeno na vinogradarskom području Slavonije (zona C1), Erdutsko vinogorje, 2016. godine. U vinariji Erdutski vinogradi d.o.o provedena je primarna prerada grožđa (muljanje, sumporenje, enzimska obrada, cijedenje, dodatak bistrila i flotacija) čime su se dobio mošt za daljnju proizvodnju. Uzorci vina proizvedeni su u projektiranom sustavu za kontroliranu fermentaciju u poluindustrijskom mjerilu na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek. Kontrolni uzorak proizveden je kontroliranom alkoholnom fermentacijom (KAF) uz dodatak selekcioniranog vinskog kvasca Uvaferm® CEG (Danstar Ferment AG, Švicarska). Nakon provedene alkoholne fermentacije provedena je i potaknuta jabučno-mliječna fermentacija (JMF). Za provedbu jabučno-mliječne fermentacije vina sorte Graševina primijenjena je čista kultura bakterije mliječne kiseline (BMK) *Oenococcus oeni* (Lallemand S.A.S, Francuska) uz uspostavljenje temperaturnog optimuma (22 °C) za odabranu vrstu BMK.

#### Kemikalije

Za provedene fizikalno-kemijske analize vina korišteni su:

1. Reagens I (vodena otopina kalijferocijanida)
  - Reagens II (vodena otopina cinkovog acetata)

- Luffova otopina
- otopina šećera
- otopina KI
- 25% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- otopina KCNS
- Na-tiosulfat
- otopina škroba
- otopina joda
- otopina NaOH
- fenoftalein

### 3.3. Oprema

#### Sustav za kontroliranu fermentaciju vina

Sustav za kontroliranu fermentaciju (**Slika 5**) sastoji se od:

- tri duplostijene posude (fermentori; duplikatori) volumena 15 L,
- plivajućih pokrova,
- nivokaznog stakla,
- ventila (ispustni, totalni ispustni) - ventili s garola priključkom,
- cjevovoda,
- fitinga,
- rashladnog sustava (kontrolni ormarić, digitalni termostat, elektroventili, pumpa, cjevovodi),
- temperaturnog senzora/osjetila (Pt-100, digitalno očitavanje temperature) te,
- elektro opreme i automatike za upravljanje sustavom grijanja/hlađenja fermentora.

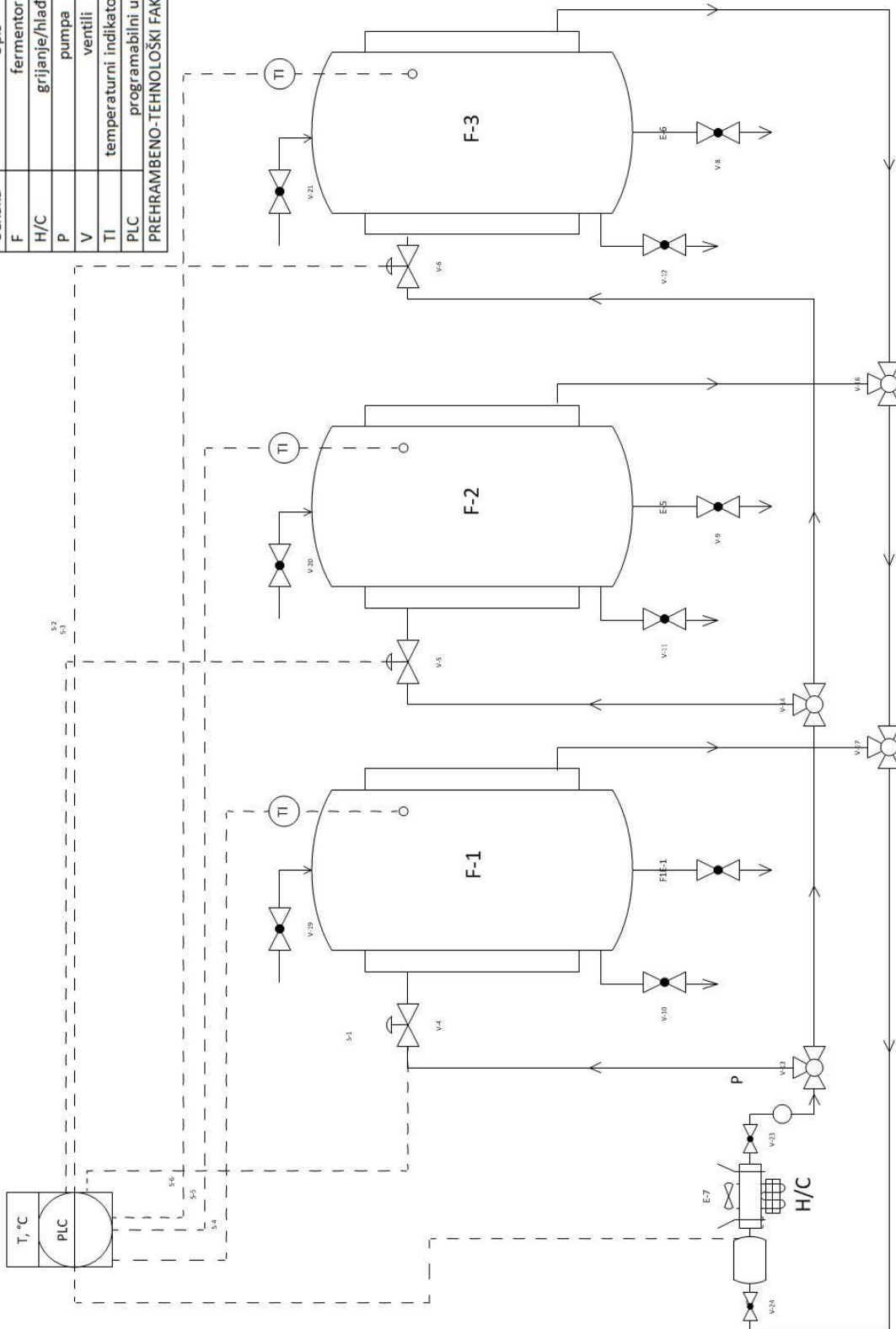


**Slika 5** Sustav za fermentaciju

Cilindrični, vertikalni samostojeći fermentori s koničnim dnom imaju duple stijenke u koje se može dovoditi rashladni ili ogrijevni medij. Fermentori su izrađeni od nehrđajućeg čelika (AISI 304; 18Cr, 10 Ni; W.Nr. 1.4301, Č. 4580). Automatiziran rashladni sustav omogućuje hlađenje/grijanje sadržaja fermentora. Kao rashladno sredstvo koristi se smjesa propilenglikola i vode (1:1). Temperatura se mjeri pomoću temperaturnih osjetila koja su postavljena u fermentorima. Regulacija temperature može se provoditi neovisno po pojedinom fermentoru putem upravljačkog panela.

SUSTAV ZA KONTROLIRANU FERMENTACIJU

Oznaka	Opis
F	fermentor
H/C	grijanje/hlađenje
P	pumpa
V	ventili
TI	temperaturni indikator s osjetilom
PLC	programabilni upravljač
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK	



### 3.4. Metode

#### Fizikalno-kemijske analize vina

##### 3.4.1. Određivanje ukupnog ekstrakta i alkohola

Suhi ostatak ili ekstrakt je cjelokupna količina onih tvari koje zagrijavanjem na 100 °C (destilacija) ne prijeđu u destilat. Uzorak vina (50 mL) se destilira te se upotrebom piknometra izračuna relativna gustoća ekstrakta prema jednadžbi:

$$\gamma(\text{ekstrakta}) = (Q_1 - Q) / (Q_2 - Q) * K$$

gdje je:

$\gamma$  – relativna gustoća ekstrakta

$Q$  – masa praznog piknometra

$Q_1$  – masa piknometra s ekstraktom

$Q_2$  – masa piknometra s destiliranom vodom

$K$  – faktor korekcije ( $K=0,99823$ ).

Iz izračunate gustoće ekstrakta iz tablice za preračunavanje očita se količina ekstrakta izražena u g/L.

Ekstrakt bez šećera izračunat je matematički:

$$\text{Ekstrakt bez šećera ( (g)/L )} = \text{ekstrakt ( (g )/L )} - \text{količina šećera ( (g)/L )}$$

Alkohol se najčešće određuje pomoću piknometra. Prije samog korištenja piknometra potrebno je izvršiti njegovo baždarenje. Sastavi se aparatura za destilaciju vina i u tikvicu se stavi vino. Količina alkohola mjeri se preko destilata koji je dobiven destilacijom, korištenjem iste jednadžbe te se udio alkohola (vol %) očita iz Tablice za preračunavanje grama alkohola u litri na volumne postotke.

Izračun:

$$\gamma(\text{ekstrakta}) = (Q_1 - Q) / (Q_2 - Q)$$

### 3.4.2. Određivanje reducirajućih šećera

U odmjernu tikvicu volumena 200 mL odvaži se 25 g uzorka te se redom dodaje 5 mL reagensa I (vodena otopina kalijferocijanida) i 5 mL reagensa II (vodena otopina cinkovog acetata), pomiješa i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Cijeli sadržaj se profiltrira preko suhog, naboranog papira u suhu tikvicu. Dobiveni filtrat označen je kao F1. U tikvicu od 300 mL redom se odmjeri 25 mL Luffove otopine i doda otopina šećera. Osim toga, potrebno je napraviti i slijepu probu. Slijepa proba radi se od 25 mL Luffove otopine i 25 mL destilirane vode. Prije zagrijavanja u tikvice se dodaju staklene kuglice, a potom se zagrijava sadržaj do vrenja te vrije 2 minute i još 10 minuta na temperaturi manjoj od temperature vrenja. Zagrijavanje se vrši uz povratno hladilo i preko azbestne mrežice. Po isteku 10 minuta naglo se hladi sadržaj tikvice pod mlazom hladne vode, a potom se dodaje 3 mL otopine KI. Brzo se promiješa te se pažljivo doda 20 mL 25 %  $H_2SO_4$  i 10 mL otopine KCNS. Sadržaj tikvice se miješa do prestanka šuma. Titracija se vrši otopinom Na-tiosulfata uz prethodni dodatak škroba kao indikatora. Gubitkom plave boje završava titracija.

Račun:

$$\% \text{ reducirajućih šećera} = (a \cdot 100) / (\text{mg uzorka})$$

a – mg šećera izračunati iz tablice po Schoorl-Luff-u.

### 3.4.3. Određivanje slobodnog $SO_2$

Volumen uzorka od 50 mL stavi se u Erlenmeyer-ovu tikvicu s brušenim grlom, potom se redom dodaju 10 mL  $H_2SO_4$  (1:4) i 3 mL otopine škroba ( $w = 0,01$ ) kao indikator. Titracija se vrši otopinom joda ( $c(I_2) = 0,02$ ) do pojave plave boje.

### 3.4.4. Određivanje ukupnog $SO_2$

U Erlenmeyer-ovu tikvicu stavi se 50 mL vina, a zatim se doda 25 mL otopine NaOH ( $c = 1 \text{ mol/L}$ ) i ostavi stajati 15 minuta. Potom se doda 15 mL otopine  $H_2SO_4$  (1:4) i 3 mL škroba ( $w = 0,01$ ). Vino se prethodno tretira s NaOH čime je stvorena alkalna sredina u kojoj se oslobađa  $SO_2$

(vezan na šećere, aldehide i polifenolne tvari). U oba slučaja titracija se provodi jodom do pojave konstantne plave boje. Račun je za oba slučaja jednak, tj. utrošak otopine joda u mL množi se faktorom 12,8 i dobije količina ukupnog SO<sub>2</sub> u mg/L vina.

$$\text{SO}_2 \text{ (mg/L)} = V \text{ (0,02 N I}_2\text{)}(\text{mL}) * 12,8$$

#### 3.4.5. Određivanje ukupnih kiselina

Određivanje ukupnih kiselina temelji se na neutralizaciji svih kiselina s NaOH. U čašu od 100 mL stavi se 25 mL uzorka te se zagrijava do vrenja kako bi se uklonio CO<sub>2</sub>, a potom se ohladi. Zatim se dodaje fenolftalein kao indikator. Titracija se provodi sa 0,25 N NaOH. Promjena boje ukazuje na završetak neutralizacije. Količina ukupnih kiselina se dobije umnoškom utroška 0,25 N NaOH i faktora 0,75 ili se očitava u tablici. Dobivena vrijednost količine ukupnih kiselina izražava se kao u g vinske kiseline po litri.

Račun:

$$\text{vinska kiselina(g/L)} = V \text{ (0,25 NaOH)}(\text{mL}) * 0,75$$

#### 3.4.6. Određivanje hlapivih kiselina

Uzorak vina destilira se na u posebnoj aparaturi. Nakon destilacije dodaje se indikator fenolftalein i provodi se titracija sa NaOH. Titracija se provodi do pojave konstantne ružičaste boje. Utrošak NaOH pri titraciji ukazuje na količinu octene kiseline.

Račun:

$$\text{g/L NaOH} = \text{g/L CH}_3\text{COOH}$$

#### 3.4.7. Određivanje pepela

Ostatak zaostao nakon potpunog spaljivanja uzorka vina predstavlja pepeo u vinu. U porculanskoj zdjelici na vodenoj kupelji (120 °C) uzorak vina se isparava (25 mL), zatim se suši u



sušioniku na 120 °C jedan sat te potom spaljuje u mufolnoj peći pri temperaturi od 200 do 500 °C do potpunog spaljivanja.

Račun:

$$m (\text{pepela; g}/(25 \text{ mL vina})) = m_1 - m_2$$

$$m (\text{pepela; g/L}) = m (\text{pepela; g}/(25 \text{ mL vina})) * 40$$

gdje je:  $m_1$  – masa prazne porculanske zdjelice

$m_2$  – masa porculanske zdjelice s pepelom

### 3.4.8. Određivanje refrakcijske vrijednosti

Refraktometrija je određivanje indeksa loma svjetlosti (refrakcije) neke tvari, u ovom slučaju vina. Mjerni instrument (refraktometar) mjeri kut pod kojim se zraka svjetlosti lomi prelaskom iz otopine u staklenu prizmu poznatog indeksa loma. Indeks loma otopina proporcionalan je njihovoj koncentraciji pa refraktometrija služi kao analitička metoda za određivanje koncentracije šećera u vinu i alkohola u alkoholnim pićima. Refraktometar nam daje podatke o stupnjevima Brix-a. Za analizu je korišten refraktometar tvrtke Hanna Instruments (HI 96813 Wine Refractometer) (Slika 6).



Slika 6 Refraktometar HI 96813

### 3.4.9. Određivanje pojedinih kemijskih spojeva u sastavu vina pomoću Reflectoquant® sustava

Reflectoquant® sustav radi na principu reflektometrije (re-emisijske fotometrije), prema kojem se mjeri difuzno reflektirana svjetlost na test-traci ili nakon transmisije kroz kivetu. Kao i u fotometriji, razlika intenziteta između emitirane i reflektirane svjetlosti omogućava kvantitativno određivanje specifičnih analita.

Postupak mjerenja sastoji se od tri osnovna koraka:

- uranjanje test trake u otopinu uzorka,
- postavljanje test trake u čitač instrumenta i pokretanje mjerenja,
- očitavanje kvantitativnih rezultata na displeju instrumenta.

Prije samog postupka mjerenja potrebno je kodirati instrument. Kodiranje instrumenta je postupak kojim se unose informacije o tome koji parametar će se mjeriti. Time se provodi korekcija valne duljine za odabrani parametar kao i specifična kalibracijska krivulja koja služi kao interna kalibracija instrumenta. Nakon kalibracije samog instrumenta, a prije samog mjerenja, potrebno je pričvrstiti odgovarajući adapter za test-trake na sam uređaj.

U eksperimentalnom radu korištena je A mjerna metoda. U ovoj metodi mjerenja reakcijsko vrijeme test-trake je čimbenik o kojem treba voditi računa i primjenjuje se s adapterom za trake.

Postupak je sljedeći:

Nakon uključivanja uređaja odaberemo željenu metodu iz registra metoda ili ako metoda nije prethodno memorirana u registru tada se metoda kodira odgovarajućom kod-trakom. Pritiskom na tipku START na zaslonu uređaja prikaže se specifično reakcijsko vrijeme u sekundama. Test traka za odgovarajući analit uranja se u uzorak te se simultano pritisne tipka START kako bi se pokrenulo vrijeme mjerenja. Po isteku dvije sekunde, testna traka se vadi iz ispitivanog uzorka, uklanja se suvišak uzorka sa trake te se pričekava prolazak reakcijskog vremena koje se odbrojava na zaslonu instrumenta. Pet sekundi prije isteka reakcijskog vremena zvučni signal upozorava na postavljanje testne trake u mjerni prostor adaptera. Rezultat mjerenja, u jedinicama koje su sukladne odabranom testu (mg/L), prikazuje se na zaslonu i automatski pohranjuje.



**Slika 7** RQflex plus 10 (MERCK)

Pomoću navedenog uređaja RQflex plus 10 (**Slika 7**), određivan je udio jabučne i mliječne kiseline u vinu. Pomoću RQflex-a mogu se odrediti i ostale kiseline, poput askorbinske i vinske, očitati pH vrijednost, odrediti nitrati, kalcij i drugi parametri. Svaki mjereni parametar ima svoj barkod.

#### **3.4.10. Određivanje pH vrijednosti**

Za određivanje pH vrijednosti u uzorcima vina korišten je pH metar HI 2020 (edge® Multiparameter pH Meter, HI 2020, Hanna Instruments, UK) (**Slika 8**). Odstupanje pH mjerča i elektroda iznosi +/- 0,05. Kako bi mjerenje bilo što točnije potrebno je izabrati ispravne pufere.



**Slika 8** pH metar HI 2020

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

## 4.1. Proračun rashladnog sustava uređaja za kontroliranu fermentaciju

### 4.1.1. Dimenzije spremnika s duplikatorom

Podaci:

Unutrašnji promjer spremnika ( $d$ )	200 mm
Debljina stijenke ( $s$ )	2,5 mm
Visina spremnika s cijevi poklopca ( $H_u$ )	480 mm
Visina spremnika bez cijevi poklopca ( $H_o$ )	400 mm
Vanjski promjer spremnika s duplikatorom	300 mm
Ukupna visina spremnika s dupl. i ispustom	600 mm

Volumen spremnika računa se prema formuli (28):

$$V_s = \frac{\pi d^2}{4} \times H_u \quad (28)$$

gdje je:  $V_s$  – volumen spremnika [L],

$d$  – unutrašnji promjer spremnika [mm],

$H_u$  – visina spremnika s cijevi poklopca [mm],

$$V_s = (\pi \times 200^2 / 4) \times 480 = \mathbf{15 \text{ L}}$$

Oplošje spremnika za izmjenu topline računa se prema formuli (29):

$$O_{izm} = (d + 2 \times s) \times \pi \times H_o \quad (29)$$

gdje je:  $O_{izm}$  – oplošje spremnika [m<sup>2</sup>],

$d$  – unutrašnji promjer spremnika [mm],

$H_o$  – visina spremnika bez cijevi poklopca [mm].

$$O_{izm} = (200 + 2 \times 2,5) \times \pi \times 400 = \mathbf{0,257 \text{ m}^2}$$

**4.1.2. Brzina strujanja rashladnog fluida**

Podaci:

Nazivni promjer cjevovoda ( $d$ )	0,0128 m
Volumni protok rashladne vode ( $Q'$ )	0,000231 m <sup>3</sup> /s

Brzina strujanja rashladnog fluida računa se prema formuli (30):

$$v = \frac{4 \times Q'}{\pi d^2} \quad (30)$$

gdje je:  $v$  – brzina strujanja rashladnog fluida [m/s], $Q'$  – volumni protok rashladne vode [m<sup>3</sup>/s], $d$  – nazivni promjer cjevovoda [m].

$$v = 4 \times 0,000231 / \pi \times 0,0128 = \mathbf{1,80 \text{ m/s}}$$

PROJEKTIRANJE SUSTAVA ZA KONTROLIRANU FERMENTACIJU				
<b>DIMENZIJE SPREMNIKA S DUPLIKATOROM</b>				
Unutrašnji promjer spremnika	d	200 mm		
Debljina stijenke	s	2,5 mm		
Visina spremnika s cijevi poklopca	H <sub>u</sub>	480 mm		
Visina spremnika bez cijevi poklopca	H <sub>0</sub>	400 mm		
Vanjski promjer spremnika s duplikatorom		300 mm		
Ukupna visina spremnika s dupl. i ispustom		600 mm		
<b>Volumen spremnika</b>		$V_s = (d^2 \pi / 4) \times H$		
		$V_s = 0,015$ m <sup>3</sup>	15	L
<b>Oplošje spremnika za izmjenu topline</b> (površina izmjenjivača topline, duplikator)		$O_{izm.} = d_v * \pi * H_0$		
		$O_{izm.} = 0,257$ m <sup>2</sup>		
Konstruktivski materijal		AISI 304		
Promjer poklopca s vrenjačom		200 mm		
<b>BRZINA STRUJANJA RASHLADNOG FLUIDA</b>				
Nazivni promjer cjevovoda (d)		0,0128 m	12,8	mm
Volumni protok rashladne vode (Q')		0,000231 m <sup>3</sup> /s	0,8316	m <sup>3</sup> /h
Brzina strujanja rashladnog fluida (v)		$v = 4 * Q' / d^2 * \pi$		
		$v = 1,80$		m/s

**Slika 9** Primjer proračuna osnovnih parametra sustava za kontroliranu fermentaciju u programu *Microsoft Excel*®

### 4.1.3. Površina izmjene topline

Podaci:

Ulazna temperatura vina ( $T_1$ )	25 °C
Izlazna temperatura vina ( $T_2$ )	15 °C
Ulazna temperatura rash. fluida ( $t_1$ )	2 °C
Izlazna temperatura rash. fluida ( $t_2$ )	11 °C

Temperaturna razlika izlaznih fluida se računa prema formuli (31):

$$\Delta T_{iz} = T_2 - t_1 \quad (31)$$

gdje je:  $T_2$  – izlazna temperatura mase [°C],

$t_1$  – ulazna temperature rashladnog fluida [°C].

$$\Delta T_{iz} = 15 - 2 = 13 \text{ °C}$$

Temperaturna razlika uzlaznih fluida računa se prema formuli (32):

$$\Delta T_{ul} = T_1 - t_2 \quad (32)$$

gdje je:  $T_1$  – ulazna temperatura mase [°C],

$t_2$  – izlazna temperature rashladnog fluida [°C].

$$\Delta T_{ul} = 25 - 11 = 14 \text{ °C}$$

Za proračun se koristi srednja logaritamske razlika temperature ( $\Delta T_m$ ) koja se računa prema formuli (33):

$$\Delta T_m = \frac{\Delta T_{ul} - \Delta T_{iz}}{\ln \left( \frac{\Delta T_{ul}}{\Delta T_{iz}} \right)} \quad (33)$$

gdje je:  $\Delta T_m$  – srednja logaritamska razlika temperature [°C],

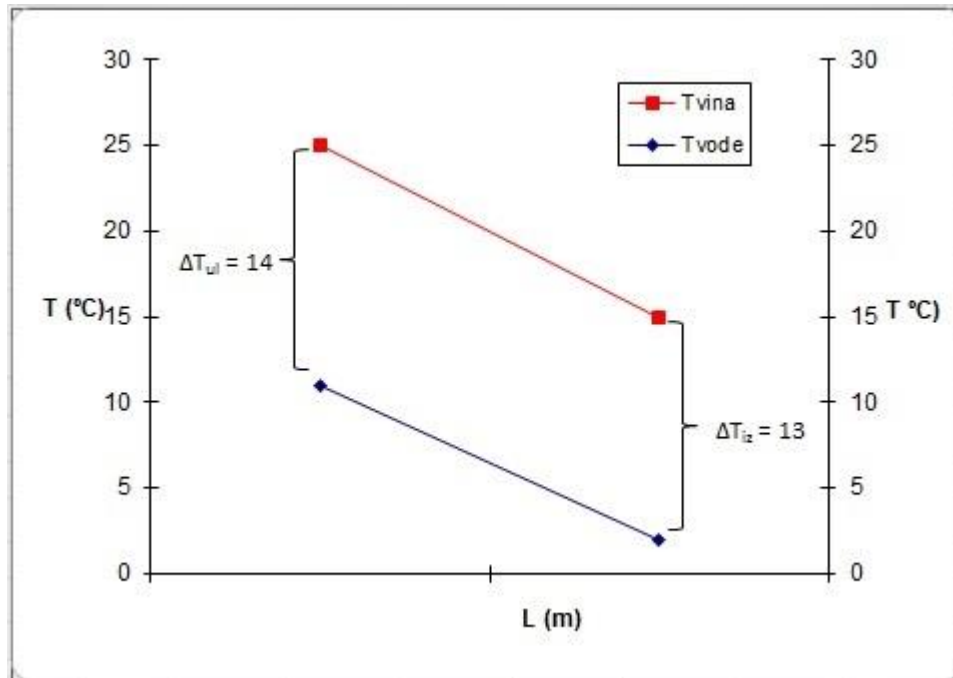


$\Delta T_{ul}$  – razlika ulaznih temperatura [°C],

$\Delta T_{iz}$  – razlika izlaznih temperatura [°C].

$$\Delta T_m = (14 - 13) / \ln (14/13) = 13,49 \text{ °C}$$

Na Slici 10 prikazan je dijagram temperaturnih profila tijekom hlađenja vina u fermentorima



Slika 10 Dijagram temperaturnih profila tijekom hlađenja vina u fermentorima

Za proračun površine izmjene topline potrebno je odrediti količinu izmijenjene topline, koja se izračunava prema formuli (34):

$$Q = m' \cdot c_p \cdot \Delta T_{fluid} \quad (34)$$

gdje je:  $Q$  – količina izmijenjene topline [W],

$m'$  – maseni protok rashladnog fluida [kg/s],

$c_p$  – specifična toplotina rashladnog fluida [kJ/kg K],

$\Delta T_{fluid}$  – temperaturna razlika rashladnog fluida [°C].

Podaci:

Maseni protok rashladne vode ( $m'$ )	0,231 kg/s = 831,6 kg/h
Specifična toplina vode ( $c_p$ )	4186 J/kgK
Razlika temperature rashladne vode ( $\Delta T_{vode}$ )	$\Delta T_{vode} = t_2 - t_1 = 11 - 2 = 9 \text{ }^\circ\text{C}$

$$Q = 0,231 \times 4186 \times 9 = \mathbf{8702,69 \text{ W}}$$

Površina izmjene topline računa se prema formuli (35):

$$A = \frac{Q}{k \cdot \Delta T_m} \quad (35)$$

gdje je:  $A$  – površina izmjene topline [ $\text{m}^2$ ], $Q$  – količina izmijenjene topline [W], $k$  – koeficijent prolaza topline [ $\text{W}/\text{m}^2 \text{ K}$ ], $\Delta T_m$  – srednja logaritamska razlika temperature [ $^\circ\text{C}$ ].

Koeficijent prolaza topline ( $k$ )	2530 $\text{W}/\text{m}^2 \text{ K}$
-------------------------------------	--------------------------------------

$$A = 8702,69 / (2530 \times 13,49) = \mathbf{0,255 \text{ m}^2}$$

#### 4.1.4. Vrijeme potrebno za hlađenje i temperatura rashladnog fluida

PARAMETRI JEDINICE VRIJEDNOSTI

PARAMETRI	JEDINICE	VRIJEDNOSTI
<b>A</b>	( $\text{m}^2$ )	0,255
<b><math>c_p</math> (vina)</b>	kJ/kgK	3,7680
<b><math>c_p</math> (vode)</b>	kJ/kgK	4,1868
<b>M (vina)</b>	kg	15
<b><math>t_1</math> (voda)</b>	$^\circ\text{C}$	2

<b>T<sub>1</sub> (vino)</b>	°C	25
<b>T<sub>2</sub> (vino)</b>	°C	15
<b>k</b>	W/m <sup>2</sup> K	2530
<b>m'</b>	kg/h	831,6

Izračun vremena potrebnog za hlađenje započinjemo s navedenim izrazom (36):

$$X = e^{\frac{k \cdot A}{m \cdot c_p}} \quad (36)$$

gdje je:  $X$  – eksponencijalni koeficijent,  
 $k$  – koeficijent prolaza topline [W/m<sup>2</sup> K],  
 $A$  – površina izmjene topline [m<sup>2</sup>],  
 $m$  – maseni protok rashladnog fluida [kg/h],  
 $c_p$  – specifična toplina rashladnog fluida [kJ/kg K].

$$X = e^{(2530 \times 0,255)/(831,6 \times 4,1868)} = \mathbf{1,20}$$

Izlaznu temperaturu rashladnog fluida računamo prema formuli (37):

$$t_2 = T + \frac{t_1 - T}{X} \quad (37)$$

gdje je:  $t_2$  – izlazna temperatura rashladnog fluida [°C],  
 $T$  – temperatura mase [°C],  
 $t_1$  – ulazna temperatura rashladnog fluida [°C].

Početak ciklusa hlađenja

$$t_2 = 25 + \frac{2-25}{1,20} = \mathbf{5,83 \text{ °C}}$$

Kraj ciklusa hlađenja

$$t_2 = 15 + \frac{2-15}{1,20} = \mathbf{4,17\text{ }^\circ\text{C}}$$

#### 4.1.5. Proračun uvećanja mjerila sustava za kontroliranu fermentaciju (*scale-up*)

Varijablu  $a_1$  računamo prema izrazu (38):

$$a_1 = \frac{k \cdot A}{m' \cdot c_{p(\text{vode})}} \quad (38)$$

$$a_1 = \frac{2530 \times 0,255}{831,6 \times 4,1868} = \mathbf{0,185}$$

Varijablu  $b$  računamo prema izrazu (39):

$$b = \frac{SUF_V^{\frac{2}{3}}}{k} \quad (39)$$

$$b = \frac{2^{2/3}}{1} = \mathbf{1,587}$$

Kod uvećanog procesa umjesto eksponencijalnog koeficijenta  $X$  koristi se  $X_2$  koju računamo prema formuli (40):

$$X_2 = e^{a_1 \cdot b} \quad (40)$$

$$X_2 = e^{0,185 \times 1,587} = \mathbf{1,34}$$

Za izračun vremena potrebnog za hlađenje manjeg spremnika, vrijednosti dobivene u prethodnim koracima uvrste se u izraz (41):

$$t = \left( \frac{M \cdot c_{p(vina)}}{m' \cdot c_{p(vode)}} \right) \cdot \left( \frac{X}{X-1} \right) \cdot \ln \left( \frac{T_1(vina) - t_1(voda)}{T_2(vina) - t_1(voda)} \right) \quad (41)$$

$$t = \left( \frac{15 \times 3,7680}{831,6 \times 4,1868} \right) \times \left( \frac{1,20}{1,20-1} \right) \times \ln \left( \frac{25-2}{15-2} \right) = \mathbf{0,055 \text{ h} = 3,33 \text{ min.}}$$

Za izračun vremena potrebnog za hlađenje višestruko većeg fermentora, vrijednosti dobivene u prethodnim koracima uvrste se u izraz (42):

$$t = \left( \frac{SUF_V \cdot M \cdot c_{p(vina)}}{m' \cdot c_{p(vode)}} \right) \cdot \left( \frac{e^{a_1 \cdot b}}{e^{a_1 \cdot b} - 1} \right) \cdot \ln \left( \frac{T_1(vina) - t_1(voda)}{T_2(vina) - t_1(voda)} \right) \quad (42)$$

$$t = \left( \frac{2 \times 15 \times 3,7680}{831,6 \times 4,1868} \right) \times \left( \frac{e^{0,185 \times 1,587}}{e^{0,185 \times 1,587} - 1} \right) \times \ln \left( \frac{25-2}{15-2} \right) = \mathbf{0,073 \text{ h} = 4,37 \text{ min.}}$$

	PARAMETRI	JEDINICE	VRIJEDNOSTI				
	A	(m <sup>2</sup> )	0,255				
	c <sub>p</sub> (vina)	kJ/kgK	3,7680				
	cp (vode)	kJ/kgK	4,1868				
	M (vina)	kg	15				
	t <sub>1</sub> (voda)	°C	2				
	T <sub>1</sub> (vino)	°C	25				
	T <sub>2</sub> (vino)	°C	15				
	k	W/m <sup>2</sup> K	2530				
	m'	kg/h	831,6				
	t <sub>2</sub> = T + (t <sub>1</sub> - T) / X gdje je T = T <sub>1</sub> za t = 0 (START); T = T <sub>2</sub> za t = kraj (TARGET);						
<b>Na početku ciklusa hlađenja:</b>							
		0,19					
	X =	1,20					
	t <sub>2</sub> =	5,89	°C				
	odvođenje						
START	Q <sub>S</sub> = m' * cp * (t <sub>2</sub> - t <sub>1</sub> )		Q <sub>S</sub> = 13540,79	kJ/h	3,76	kW	
<b>Na kraju ciklusa hlađenja:</b>							
	t <sub>2</sub> =	4,20	°C				
END	Q <sub>E</sub> = m' * cp * (t <sub>2</sub> - t <sub>1</sub> )		Q <sub>E</sub> = 7653,49	kJ/h	2,13	kW	
<b>SCALE-UP za dvostruko veći volumen spremnika!</b>							
Volumni scale-up fakt.	SUF <sub>v</sub> = Mv <sub>2</sub> /Mv <sub>1</sub> = 2		SUF <sub>v</sub> =	2			
	k = 1						
	Mc <sub>2</sub> = k * Mc <sub>1</sub> = 1 * Mc <sub>1</sub>						
	a <sub>1</sub> = k <sub>1</sub> * A <sub>1</sub> / Mc <sub>1</sub> * c <sub>p</sub>		a <sub>1</sub> =	0,185			
	b = (SUF <sub>v</sub> ) <sup>2/3</sup> / k		b =	1,587			
	X <sub>2</sub> = exp (a <sub>1</sub> b)		X <sub>2</sub> =	1,34			
<b>Na početku ciklusa (veći spremnik scale-up)</b>							
	t <sub>2</sub> =	7,86	°C				
	Q <sub>S</sub> = m' * cp * (t <sub>2</sub> - t <sub>1</sub> )		Q <sub>S</sub> = 20400,76	kJ/h	5,67	kW	
<b>Na kraju ciklusa hlađenja (veći spremnik Scale-up)</b>							
	t <sub>2</sub> =	5,31	°C				
	Q <sub>E</sub> = m' * cp * (t <sub>2</sub> - t <sub>1</sub> )		Q <sub>E</sub> = 11530,86	kJ/h	3,20	kW	
<b>Vrijeme potrebno za hlađenje:</b>							
			t =	0,07	h	4,36	min. veći spremnik
	$\theta = \left( \frac{\text{SUF}_v \cdot M_1 \cdot c}{kW_{c1} C_c} \right) \left( \frac{e^{a_1 b}}{e^{a_1 b} - 1} \right) \ln \left( \frac{T_1 - t_1}{T_2 - t_1} \right)$		t =	0,05	h	3,29	min. manji spremnik
			t duže za			32,75 %	kod većeg spremnika

Slika 11 Primjer proračuna rashladnog sustava i prijenos rezultata u poluindustrijsko mjerilo (program Microsoft Excel®)

Iz proračuna rashladnog sustava vidljivo je da je ukupno vrijeme potrebno za hlađenje fermentora dvostruko većeg radnog volumena (30 L) iznosi 4,37 minute, što je samo za 31,32 % duže u odnosu na vrijeme potrebno za hlađenje fermentora manjeg volumena (15 L). Dakle, što je spremnik (fermentor) veći, ukupno vrijeme potrebno za hlađenje/zagrijavanje medija je sve kraće. Samim time proces je sve ekonomičniji u odnosu na energetske ciljeve. U tom smislu, potrebno je odabrati optimalni omjer investicijskih i pogonskih troškova.

Kako bi izračunali potrebno vrijeme hlađenja spremnika (fermentora), potrebno je provesti niz prethodnih proračuna. Potrebna nam je informacija o volumenu spremnika (15 L), brzina strujanja rashladnog fluida, koja u ovom slučaju iznosi 1,80 m/s, površina izmjene topline (0,255 m<sup>2</sup>), količina izmijenjene topline (8,703 kW) te temperatura medija na početku i na kraju hlađenja.

Za preračunavanje iz pilot postrojenja u industrijsko mjerilo, koriste se *scale-up* proračuni. Proračun vrijedi za sustav kod kojeg su isti ili slični procesni uvjeti hlađenja fermentora.

## 4.2. Rezultati fizikalno-kemijskih analiza

Po završenom projektiranju, uređaj za kontroliranu fermentaciju je izrađen te je u njemu proveden eksperiment s ciljem dobivanja uzoraka vina sorte Graševina. Analize su provedene u dva uzorka vina sorte Graševina, kontrolni uzorak (KAF), odnosno uzorak kod kojeg je provedena alkoholna fermentacija te uzorak kod kojeg je nakon završene alkoholne fermentacije još potaknuta jabučno-mliječna fermentacija (JMF). Rezultate analize vina sorte Graševina prikazani su u **Tablica 4**.

**Tablica 4** Rezultati analize vina

	Graševina (KAF)	Graševina (JMF)
<b>Ukupni ekstrakt (g/L)</b>	22,10	20,70
<b>Prirodni reducirajući šećeri (g/L)</b>	3,20	3,20
<b>Ukupni alkohol (vol %)</b>	12,19	11,66
<b>Slobodni SO<sub>2</sub> (mg/L)</b>	36,48	51,80
<b>Ukupni SO<sub>2</sub> (mg/L)</b>	97,28	133,12
<b>Ukupne kiseline (g/L)</b>	7,13	6,79
<b>Hlapive kiseline (g/L)</b>	0,84	0,72
<b>pH</b>	2,99	3,00
<b>Pepeo (g/L)</b>	1,74	2,23

Prema Pravilniku o vinu (NN/96), optimalan udio ekstrakta kreće se od 15 - 18 g/L. Analizom je utvrđen udio ukupnog ekstrakta od kojeg se oduzme udio šećera te se dobije ekstrakt bez šećera. KAF uzorak sadrži 18,9 g/L ekstrakta bez šećera te time spada u vrhunska vina (s oznakom kontroliranog podrijetla), a JMF uzorak sadrži 17,5 g/L ekstrakta bez šećera pa pripada skupini kvalitetnih vina što pokazuje da u ovom slučaju klasifikacije vina prema kvaliteti, jabučno-mliječna fermentacija smanjuje kvalitetu vina.

Vino sa manje od 4 g/L šećera spada u suho vino. Ispitivani uzorci sadrže 3,2 g/L šećera te spadaju u suha vina.

Vrhunska vina prema Pravilniku o vinu, sadrže više od 10,5 vol. % alkohola te dobiveni rezultati ukazuju da analizirano vino spada u vrhunska vina. Nešto niži udio alkohola ima uzorak u kojem je bila provedena jabučno-mliječna fermentacija. Bauer i Dicks (2004) navode kao gornju granicu udjela alkohola za provođenje jabučno-mliječne fermentacije udjel od 14% vol/vol.

Analizirani slobodni SO<sub>2</sub> ne zadovoljava kriterije Pravilnika o vinu. Prema pravilniku maksimalni udio slobodnog SO<sub>2</sub> je do 30 mg/L. Kontrolni uzorak sadrži 36,48 mg/L slobodnog SO<sub>2</sub>, a vino u kojem je provedena jabučno-mliječna fermentacija sadrži još veću koncentraciju slobodnog SO<sub>2</sub> (51,80 mg/L). Nešto veću koncentraciju ukupnog SO<sub>2</sub> ima JMF uzorak (133,12 mg/L), ali još uvijek u granicama pravilnika. Prema Pravilniku o vinu maksimalna koncentracija ukupnog SO<sub>2</sub> je do 350 mg/L. Što je viša koncentracija SO<sub>2</sub> to se proces JMF više usporava te je čak moguće da se



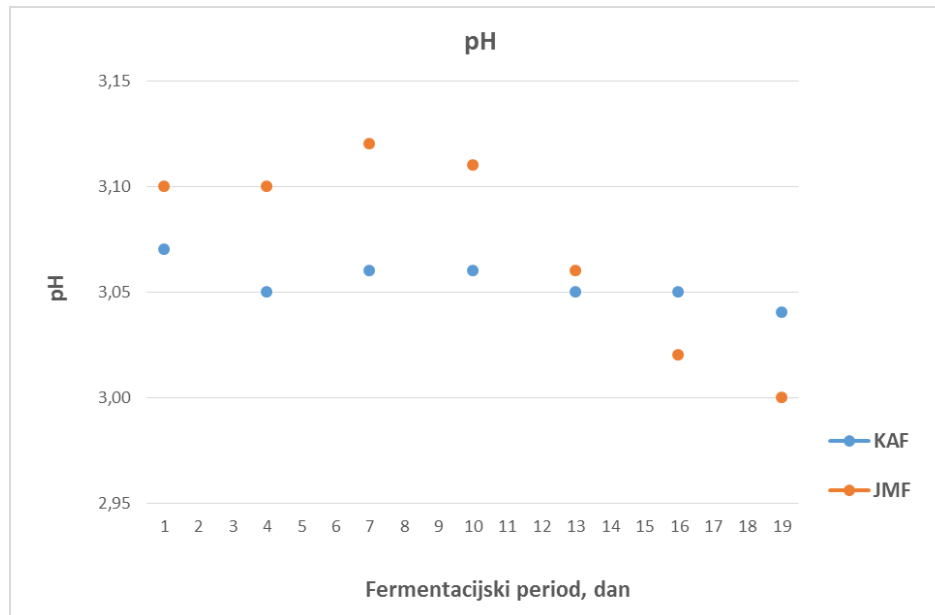
proces u potpunosti spriječi. Vezani SO<sub>2</sub> u koncentraciji višoj od 100 mg/L inhibira jabučno-mliječnu fermentaciju. Bauer i Dicks (2004) navode da prisustvo od 20 mg/L slobodnog SO<sub>2</sub> može inhibirati bakteriju *Oenococcus oeni* i do 50%.

Opće poznato je da vina s visokom ukupnom kiselosti uglavnom sadrže i veće koncentracije jabučne kiseline, koja im daje grubi, previše kiseli i neharmoničan okus. Koncentracija ukupnih kiselina, izraženih kao vinska kiselina, kreće se unutar granica. Prema pravilniku koncentracija ukupnih kiselina kreće se od 4,5 do 14 g/L. Kontrolni uzorak sadrži višu koncentraciju ukupnih kiselina (7,13 g/L) od MLF uzorka (6,79 g/L).

Hlapive kiseline se izražavaju kao octena kiselina te je maksimalna dozvoljena koncentracija navedene kiseline do 1,2 g/L. Vina s većom koncentracijom hlapivih kiselina smatraju se vinima s manom. KAF uzorak sadrži 0,84 g/L, a MLF uzorak 0,72 g/L.

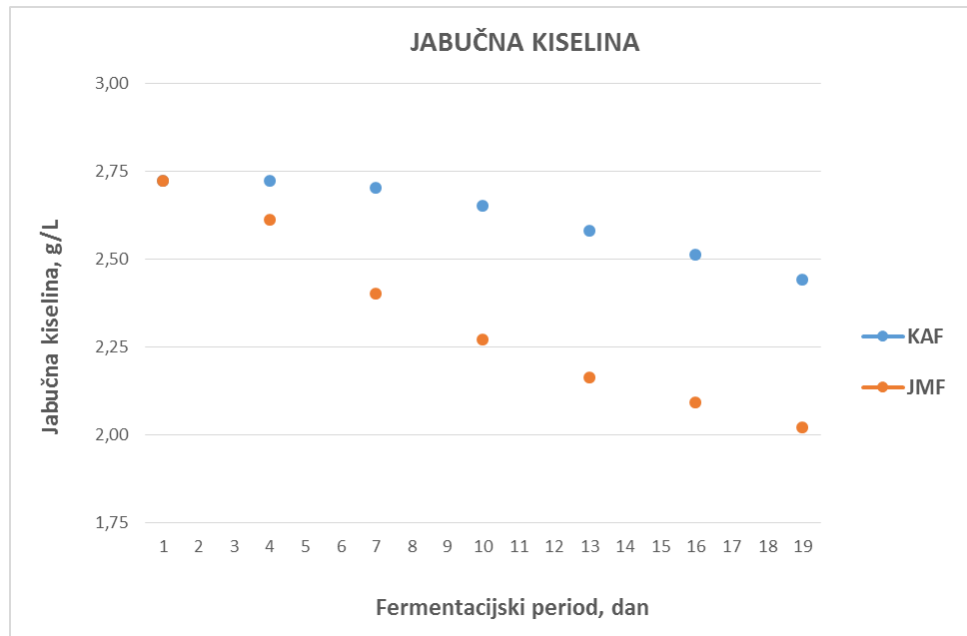
pH u vinima se kreće u rasponu od 3,0 do 3,8. Bauer i Dicks (2004) navode da se pH za najbolju provedbu jabučno-mliječne fermentacije kreće od 3,5 do 4,0. Što je viši pH, vino je podložnije kontaminaciji te razvoju štetnih sojeva. U analiziranim uzorcima pH se kreće oko 3,0 ± 0,2 što ukazuje na to da je vino na donjoj granici kiselosti. Niži pH pogoduje rastu bakterija *Oenococcus oeni*, ali prenizak pH (<3,0) usporava njegov rast te ga može i inhibirati. Promjenu vrijednosti pH ovisno o danima fermentacije, kod kontrolnog uzorka i uzorka vina kod kojeg je provedena jabučno-mliječna fermentacija prikazuje **Slika 12**. Na slici je vidljivo kako se pH u jednom periodu neznatno povisi (sedmi dan fermentacije), ali do završetka fermentacije pH se uglavnom snižava. Kod JMF su oscilacije pH nešto izraženije nego kod KAF. Costello (2015) navodi da se nakon provedene jabučno-mliječne fermentacije pH povisi za 0,1 do 0,3 jedinice.

Analiza udjela pepela pokazuje kako se oba proizvedena vina mogu svrstati u vrhunska vina. Uzorak koji je podvrgnut jabučno-mliječnoj fermentaciji sadrži 2,23 g/L, a KAF uzorak 1,74 pepela. Prema Pravilniku o vinima, vina s udjelom pepela većim od 1,6 g/L, spadaju u vrhunska vina.



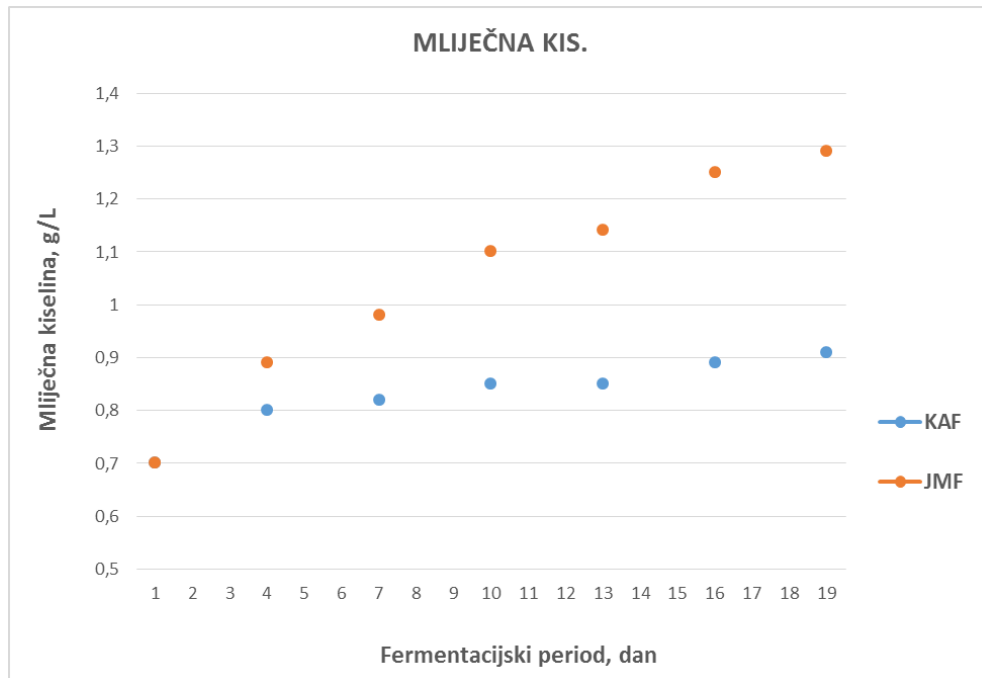
**Slika 12** pH vrijednost u odabranom fermentacijskom periodu kod kontrolirane alkoholne fermentacije (KAF) te kontrolirane jabučno-mliječne fermentacije (JMF) vina sorte Graševina

Kako bi se odredile pozitivne promjene jabučno-mliječne fermentacije, potrebno je odrediti koncentraciju jabučne i mliječne kiseline. Mjerenja su provedena tijekom tri tjedna. **Slika 13** prikazuje promjenu udjela jabučne kiseline tijekom jabučno-mliječne fermentacije. U kontrolnom uzorku, odnosno uzorku kod kojeg je provedena samo alkoholna fermentacija, udio jabučne kiseline se smanjio za 0,3 g/L. U uzorku kod kojeg je provedena dodatna jabučno-mliječna fermentacija, udio jabučne kiseline se smanji za 0,75 g/L. Koncentracija jabučne kiseline nakon alkoholne fermentacije iznosi 2,4 g/L, a nakon jabučno-mliječne fermentacije 2,00 g/L.



**Slika 13** Koncentracije jabučne kiseline u odabranom fermentacijskom periodu kod kontrolirane alkoholne fermentacije (KAF) te kontrolirane jabučno-mliječne fermentacije (JMF) vina sorte Graševina

**Slika 14** prikazuje promjenu udjela mliječne kiseline tijekom JMF. Udio mliječne kiseline se povećava tijekom jabučno-mliječne fermentacije. Slika jasno prikazuje da se potaknutom JMF udio mliječne kiseline povećava znatno više nego kod alkoholne fermentacije. Provedbom JMF udio mliječne kiseline se povećao za 0,6 g/L, a nakon provedbe samo alkoholne fermentacije taj udio se povećao samo za 0,1 g/L. Koncentracija mliječne kiseline nakon alkoholne fermentacije iznosi 0,9 g/L, a nakon jabučno-mliječne fermentacije 1,3 g/L.



**Slika 14** Koncentracije mliječne kiseline u odabranom fermentacijskom periodu kod kontrolirane alkoholne fermentacije (KAF) te kontrolirane jabučno-mliječne fermentacije (JMF) vina sorte Graševina

## **5. ZAKLJUČCI**

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Pri projektiranju rashladnog sustava potrebno je optimirati kapacitet fermentora u odnosu na obim i dinamiku procesa proizvodnje vina. Proračun rashladnog sustava omogućuje definiranje osnovnih tehno-ekonomskih parametara u fazi prethodnog projektiranja, kao i odabir optimalnog kapaciteta proizvodnje u uvjetima kontrolirane fermentacije vina.
2. Iz proračuna rashladnog sustava vidljivo je da ukupno vrijeme potrebno za hlađenje fermentora dvostruko većeg radnog volumena (30 L) iznosi 4,37 min, što je samo za 31,32 % duže u odnosu na vrijeme potrebno za hlađenje fermentora manjeg volumena (15 L), pri istim procesnim uvjetima hlađenja.
3. Uspješna simulacija procesa i proračun rashladnog sustava provedeni su korištenjem programa *Microsoft Excel*<sup>®</sup>, pri čemu se dobije pregled relevantnih procesnih parametara tijekom fermentacije vina, kao i parametra važnih za dimenzioniranje spremnika različitih radnih volumena (prijenos u poluindustrijsko i industrijsko mjerilo).
4. Uzorci vina sorte Graševina proizvedeni postupkom kontrolirane alkoholne fermentacije (KAF) ne razlikuju se značajno u ispitanim (osnovnim) fizikalno-kemijskim pokazateljima od uzoraka kod kojih je provedena naknadna jabučno-mliječna fermentacija (JMF).
5. Istraživanje je pokazalo kako kontrolirani postupak fermentacije u oba slučaja (KAF i JMF) rezultira vinima iznimne kvalitete, u pogledu relevantnih fizikalno-kemijskih i senzorskih svojstava koja definiraju kvalitetu vina.
6. Razlike su uočene u koncentracijama jabučne i mliječne kiseline tijekom promatranog fermentacijskog perioda, pri čemu se postiglo snižavanje koncentracije jabučne kiseline u slučaju potaknute jabučno-mliječne fermentacije vina. Ovim zahvatom, kroz razgradnju jabučne kiseline, utjecalo na poboljšanje senzornih svojstava i pitkosti vina sorte Graševina.

## **6. LITERATURA**

1. Ahmad T: Reservoir Engineering Handbook, second edition, Gulf Professional Publishing, 2001.
2. Amidžić Klarić D, Klarić I, Velić D, Velić N, Marček T: Evaluation of Quercetin Content, Colour and Selected Physico – Chemical Quality Parameters of Croatian Blackberry Wines. Polish Journal of Food and Nutrition Science 67: 75-83, 2017.
3. Amidžić-Klarić D, Klarić I, Mornar A: Polyphenol content and antioxidant activity of commercial blackberry wines from Croatia: application of multivariate analysis for geographic origin differentiation. Journal of Food Nutrition and Research 50: 199–209, 2011.
4. Arozarena I, Ortiz J, Hermosin-Gutierrez I, Urretavizcaya I, Salvatierra S, Cordova I, Remedios Marin-Arroyo M, Jose Noriega M, Navarro M: Color, Ellagitannins, Anthocyanins, and Antioxidant Activity of Andean Blackberry (*Rubus glaucus* benth.) Wines. Journal of agricultural and food chemistry 60: 7463-7473, 2012.
5. Bauer R, Dicks L.M.T: Control of Malolactic Fermentation in Wine. Department of Microbiology, Stellenbosch University, Private Bag X1, 7602 Matieland (Stellenbosch), South Africa, 2004.
6. Beer E: Priručnik za dimenzioniranje uređaja kemijske procesne industrije. DKI/Kemija u industriji, Zagreb, 1994.
7. Bosilj T: Praćenje procesnih parametara i optimiranje proizvodnje bijelog vina sorte graševina. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2008.
8. Bošnjaković, M: Istraživanje utjecaja kontrolirane fermentacije na kvalitetu ekoloških kupinovitih vina. Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2012.
9. Costello P: Malolactic fermentation importance of wine lactic acid bacteria in winemaking, 2015.
10. Diaz C, El'ias Conde J, Claverie C, D'iaz E, Pérez Trujillo J P: Conventional enological parameters of bottled wines from the Canary Islands (Spain). Journal of Food Composition and Analysis 16: 49–56, 2003.
11. Gomzi Z: Kemijski reaktori. Hinus, Zagreb, 1998.



12. Huerta M D, Salinas M R, Masoud T, Alonso G L: Wine differentiation according to color using conventional parameters and volatile components. *Journal of Food Composition and Analysis* 11: 363–374, 1998.
13. Katalinić V: Prerada grožđa, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split, 2010.
14. Kayode Coker A: Modeling of Chemical Kinetics and Reactor Design. Gulf Publishing Company, Houston, 2001.
15. Knoll C, Fritsch S, Schnell S, Grossmann M, Rauhut D, Toitd M: Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *Food Science and Technology*, 2011.
16. Kovačević Ganić, K: Osnove prehrabnih tehnologija, Tehnologija vina, 2008
17. Kulišić T: Vježbe iz kolegija prerada grožđa. Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 2004.
18. Lelas V: Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, 2006.
19. Magnucki K. , Lewinski J., Stasiewicz P: Optimal sizes of a ground-based horizontal cylindrical tank under strength and stability constraints. *International Journal of Pressure Vessels and Piping*, 81, 913–917, 2004.
20. Mihovilović M: Utjecaj procesnih parametara na zadržavanje tvari boje i arome vina od jabuke. Diplomski rad, Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2016.
21. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva RH: Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina. *Narodne novine* 96/03, 2004.
22. Morrison R.T, Boyd R.N: *Organska kemija*, 1973.
23. Petravić Tominac V, Mesihović A, Mujadžić S, Lisičar J, Oros D, Velić D, Velić N, Srećec S, Zechner Krpan V, Petrović Z: Production of Blackberry Wine by Microfermentation using Commercial Yeasts Fermol Rouge and Fermol Mediterranee. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 78: 49 – 55, 2013.

24. Plavša T: Jabučno-mliječna fermentacija u vinu. Glasnik zaštite bilja 6/2010.
25. Pozderović A, Pichler A: Propisi za vježbe iz predmeta osnove prehrambene tehnologije. Osnove tehnologije vina, Osijek, 2009.
26. Ribéreau Gayon R, Dubourdieu D, Donéche B, Lonvaud A: Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications, 2006.
27. Rosi I, Nannelli F, Giovani G: Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* during malolactic fermentation of wines obtained using different strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Food Science and Technology, 2008.
28. Sović V: Utjecaj membranske filtracije na kemijski sastav i kvalitetu vina sorte graševina. Diplomski rad, Prehrambeno–tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2013.
29. Šef F, Olujić Ž: Projektiranje procesnih postrojenja, SKTH/Kemija u industriji, Zagreb, 1988.
30. Velić D: Projektiranje uređaja u prehrambenoj industriji-nastavni materijali, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2016.
31. Vogel, H. C. ; Todaro, C. L.: Fermentation and Biochemical Engineering Handbook-Principles, Proces Design, and Equipment (2nd Edition), William Andrew Publishing/Noyes, 1997.
32. Vrdoljak I: Utjecaj membranske filtracije na aromu i kemijski sastav vina sorte Graševina. Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2009.