

Optimizacija proizvodnje i karakterizacija voćnog octa od sibirske borovnice

Sapanjoš, Goran

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:109:483403>

Rights / Prava: [Attribution-ShareAlike 4.0 International / Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-22**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Goran Sapanjoš

**OPTIMIZACIJA PROIZVODNJE I KARAKTERIZACIJA VOĆNOG OCTA OD
SIBIRSKJE BOROVNICE**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj 2024

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za tehnološko projektiranje i farmaceutsko inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij: Procesno inženjerstvo
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija
Nastavni predmet: Optimizacija i projektiranje industrijskih procesa
Tema rada prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 2. svibnja 2023.
Mentor: prof. dr. sc. *Darko Velić*
Komentor: prof. dr. sc. *Natalija Velić*
Pomoć pri izradi: *Tanja Mađarević Pavetić*, mag. ing., univ. spec. techn. aliment.

Optimizacija proizvodnje i karakterizacija voćnog octa od sibirske borovnice

Goran Sapanjoš, 0113138476

Sažetak:

Cilj rada bio je istražiti utjecaj vrste miješanja (trešnje) na proces proizvodnje voćnog octa sibirske borovnice (*Lonicera caerulea* L.) iz ekološkog uzgoja u laboratorijskom mjerilu te provesti proces uvećanja mjerila u poluindustrijskom sustavu za proizvodnju octa (acetatoru). Tijekom oba proizvodna procesa (ukupnog trajanja 20 dana) praćeno je nastajanje octene kiseline korištenjem dvije metode: standardne titracijske metode te spektrofotometrijske enzimске metode. Veći prinosi octene kiseline postignuti su primjenom orbitalnog miješanja u odnosu na linearno (recipročno) miješanje. Koncentracija octene kiseline u uzorcima dobivenim u laboratorijskom mjerilu, nakon 20 dana octene fermentacije, kretala se u rasponu od 45,34 g/L do 61,33 g/L. Dobivena biomasa octenih bakterija (tzv. matična kultura) iz eksperimenta provedenog u laboratorijskom mjerilu iskorištena je kao inokulum za proces proveden u poluindustrijskom mjerilu, odnosno acetatoru volumena 30 L. Izmjerena koncentracija octene kiseline od 59,4 g/L u voćnom octu od sibirske borovnice dobivenog u poluindustrijskom mjerilu nakon 20 dana, bila je u skladu s minimalnom zahtijevanom koncentracijom propisanom Pravilnikom o vinskom i voćnom octu (NN 121/05).

Ključne riječi: voćni ocat, fermentacija, acetator, sibirska borovnica

Rad sadrži: 43 stranica
19 slika
1 tablicu
19 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

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

- | | |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Hrvoje Pavlović</i> | Predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. <i>Darko Velić</i> | član-mentor |
| 3. prof. dr. sc. <i>Natalija Velić</i> | član-komentor |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Frane Čačić Kenjerić</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 4. srpnja 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process Engineering
Subdepartment of Process Design and Pharmaceutical Engineering
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program: Process Engineering
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Biotechnology
Course title: Optimisation and design of industrial processes
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 7 held on May 2, 2023.
Mentor: *Darko Velić*, PhD, Full professor
Co-mentor: *Natalija Velić*, PhD, Full professor
Technical assistance: *Tanja Mađarević Pavetić*, mag. ing., univ. spec. techn. aliment.

The Optimisation of the Production Process and Characterization of Siberian Blueberry Vinegar Goran Sapanjoš, 0113138476

Summary:

The aim of the study was to investigate the influence of the mixing method (shaking) on the production process of fruit vinegar from organically grown Siberian blueberry (*Lonicera caerulea* L.) on a laboratory scale and to scale up the process to a semi-industrial vinegar production system (Acetator). During both production processes (total duration of 20 days), acetic acid formation was monitored using two methods: the standard titration method and the spectrophotometric enzymatic method. Higher yields of acetic acid were obtained with orbital shaking than with linear (reciprocal) shaking. The concentration of acetic acid in the laboratory-scale samples obtained after 20 days of acetic acid fermentation ranged from 45.34 g/L to 61.33 g/L. The biomass of acetic acid bacteria obtained on a laboratory scale (the so-called vinegar mother) was used as inoculum for the process carried out on a semi-industrial scale, i.e. in a 30-litre acetator. The measured acetic acid concentration of 59.4 g/L in the fruit vinegar from Siberian blueberries produced on a semi-industrial scale after 20 days corresponded to the minimum concentration prescribed in the Ordinance on Wine and Fruit Vinegar (OG 121/05).

Key words: *fruit vinegar, fermentation, acetator, Siberian Blueberry*

Thesis contains: 43 pages
19 figures
1 table
19 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|-------------|
| 1. <i>Hrvoje Pavlović</i> , PhD, full prof. | chairperson |
| 2. <i>Darko Velić</i> , PhD, full prof. | supervisor |
| 3. <i>Natalija Velić</i> , PhD, full prof. | member |
| 4. <i>Frane Čačić Kenjerić</i> , PhD, associate prof | stand-in |

Defense date: 4th July, 2024

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Mina, Hvala ti!

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. SIBIRSKA BOROVNICA	4
2.2. OCAT	6
2.2.1. Vrste octa.....	7
2.3. PROIZVODNJA OCTA	9
2.3.1. Alkoholna fermentacija	9
2.3.2. Oksidacija etanola pomoću bakterija octene kiseline	10
2.3.3. Bakterije octene kiseline.....	11
2.4. TEHNOLOŠKI POSTUPCI PROIZVODNJE OCTA	12
2.4.1. Orleanska metoda	12
2.4.2. Schützenbach-ova metoda	13
2.4.3. Frings-ov generator	14
2.4.4. Submerzna metoda	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO	17
3.1. ZADATAK RADA	18
3.2. MATERIJALI	18
3.3. OPREMA	19
3.3.1. Laboratorijske miješalice/tresilice	19
3.3.2. Acetator	20
3.3.3. MegaQuant™ Wave spektrofotometar	23
3.4. METODE	23
3.4.1. Proces proizvodnje octa od sibirske borovnice u laboratorijskom i poluindustrijskom mjerilu	23
3.4.2. Određivanje pH vrijednosti.....	25
3.4.3. Određivanje koncentracije octene kiseline titracijskom metodom.....	25
3.4.4. Određivanje koncentracije octene kiseline spektrofotometrijskom enzimskom metodom	26
3.4.5. Određivanje refraktometrijske vrijednosti	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI VOĆNOG VINA OD SIBIRSKE BOROVNICE	31
4.2. UTJECAJ VRSTE MIJEŠANJA NA KINETIKU NASTAJANJA I KONCENTRACIJU OCTENE KISELINE U LABORATORIJSKOM MJERILU 32	
4.3. KINETIKA NASTAJANJA OCTENE KISELINE U POLUINDUSTRIJSKOJ PROIZVODNJI VOĆNOG OCTA OD SIBIRSKE BOROVNICE I USPOREDBA TITRIMETRIJSKE I SPEKTROFOMETRIJSKE ENZIMSKE METODE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE OCTENE KISELINE	36
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	41

Popis oznaka, kratica i simbola

vol %	volumni udio
rpm	okretaja u minuti
°Bx	stupnjevi Brix
OM	orbitalna miješalica
LM	linearna miješalica
TOM	termostatirana orbitalna miješalica

1. UVOD

Proizvodnja octa jedan je od najstarijih biotehnoloških postupaka, koji se tijekom vremena značajno razvijao i unaprijedio. U današnje vrijeme, ocat se proizvodi primjenom sofisticiranih tehnoloških postupaka koji omogućuju kontroliranu i optimiziranu proizvodnju visoko kvalitetnog octa. Submerzni način proizvodnje octa, odnosno submerzna fermentacija, predstavlja jednu od novijih metoda koja omogućuje bržu i učinkovitiju proizvodnju octa, radi upotrebe specijaliziranih bioreaktora u kojima se octena fermentacija provodi u tekućoj fazi, uz osiguravanje optimalnih uvjeta za rast i razvoj bakterija octene kiseline (*Acetobacter*).

S obzirom na rastući trend konzumacije ekoloških proizvoda, važno je istražiti mogućnosti i optimirati metode proizvodnje ekološkog voćnog octa velike nutritivne vrijednosti. Ekološka proizvodnja voćnog octa od sibirске borovnice (*Lonicera caerulea* L.), koja je poznata po svojim mnogim nutritivnim svojstvima i potencijalnim zdravstvenim dobrobitima, mogla bi postati sve značajnija. Ovo voće sadrži velik udio antioksidansa, vitamina i minerala, što u konačnici povećava vrijednost voćnog octa proizvedenog od njega. Obzirom na otpornost sibirске borovnice na hladnoću, vrlo je pogodna biljna kultura za uzgoj u kontinentalnoj klimi.

Cilj ovog rada bio je istražiti i optimirati proces proizvodnje voćnog octa od sibirске borovnice iz ekološkog uzgoja primjenom serije laboratorijskih te poluindustrijskih eksperimenata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Sibirska borovnica

Sibirska borovnica (*Lonicera caerulea* L.), poznata i kao haskap, vrsta je bobičastog voća koja je relativno nova u Republici Hrvatskoj. Prirodno raste u šumama Europe, Sjeverne Amerike i Sjeveroistočne Azije, uglavnom u planinskim i niskim vlažnim područjima (Bors i sur., 2012). Duga tradicija uzgoja ove voćne vrste proteže se na područje Rusije (Kamčatka i Sibir), Kine i Japana (otok Hokkaido). U novije vrijeme uzgoj se proširio na Ameriku i Kanadu, a posljednjih godina u značajnijim količinama se uzgaja i u Europi, točnije u Poljskoj i Slovačkoj. Haskap, čije ime potječe s otoka Hokkaido u Japanu, u hrvatskoj se još naziva kozja krv, modra kozokrvina, kamčatska borovnica, majska jagoda (Thompson, 2006; Celli i sur., 2014).

Sibirska borovnica je listopadni grm koji se ističe po svojoj otpornosti na niske temperature. Tijekom zime podnosi temperature od -45 do -47 °C bez većih oštećenja biljke. Rano cvate, a otvoreni cvjetovi mogu izdržati i temperature do -10 °C. Zbog ove karakteristike, pogodna je za uzgoj u područjima s oštrijom kontinentalnom klimom, a najbolje uspijeva na sunčanim položajima s dobro dreniranim, vlažnim tlom bogatim organskim tvarima. Optimalna pH vrijednost tla za uzgoj haskapa iznosi od 5,5 do 7. Haskap može narasti do 3 metra u visinu i 1,5 metara u širinu te kao dugovječna biljka može doživjeti 25 do 30 godina. Plod sibirske borovnice bobica je valjkastog oblika, tamno plave/ljubičaste boje (**Slika 1**) (Lovrenčić i Šimunović, 2014).



Slika 1 Plod Sibirske borovnice (Lovrenčić i Šimunović, 2014)

Listovi se nalaze jedni nasuprot drugih, jednostavni su, jajolikog oblika, dugački između 3 i 8 centimetara, široki između 1 i 3 centimetra i nalaze se na do 5 milimetara dugoj peteljci. Cvjetovi su dvospolni, svijetložute ili žutobijele boje veličine između 10 i 15 milimetara (**Slika 2**).



Slika 2 Cvijet Sibirske borovnice (Lovrenčić i Šimunović, 2014)

Sibirska borovnica kiselkastog je okusa. Dozrijeva sredinom svibnja, ranije od ostalog voća što ga čini iznimno privlačnim voćem u našem podneblju. Kako je plod izuzetno bogat vitaminima C, A i E, antioksidansima, polifenolima i fenolima, haskap je postao predmet brojnih istraživanja kako bi se otkrile dodatne mogućnosti primjene ovog nutritivno bogatog voća. Plodovi se obično se konzumiraju sirovi ili se odmah skladište, jer imaju kratak vijek trajanja, a može se prerađivati u pekmeze, džemove, sokove, likere i vina te se dodaje u različite namirnice u svježem ili praškastom obliku, kao što su jogurti i sladoledi (Lovrenčić i Šimunović, 2014).

Prije nego se sibirska borovnica zasadi potrebno je dobro pripremiti tlo. Prema rezultatima analize tla, preporučuje se izvršiti meliorativnu gnojidbu stajskim gnojivom i mineralnim gnojivima s većim udjelom fosfora i kalija. Optimalno vrijeme sadnje je u kasnu jesen ili rano proljeće s dvogodišnjim ili trogodišnjim sadnicama. Sibirska borovnica uzgaja se kao grm ili kao živica. Biljke je potrebno saditi na odgovarajuću dubinu od 20 centimetara i promjera 30 centimetara.

Najpopularnije sorte sibirске borovnice u Americi i Kanadi razvio je prof. Bors a sa Sveučilišta u Saskatchewanu: Aurora, Borealis, Indigo Gem, Honey Bee i Berry Smart Blue (Bors i sur., 2012). U Republici Hrvatskoj najčešće se uzgajaju sljedeće europske sorte sibirске borovnice: Duet, Altaj, Amur, Smitczka, Tomiczka, Nimfa i Morena, a rjeđe Fialka, Zojka i Wojtek (Lovrenčić i Šimunović, 2014).

2.2. Ocat

Naziv ocat (engl. vinegar) potječe od starofrancuskog izraza „vin aigre“ što u prijevodu na hrvatski jezik znači kiselo vino. Prvi zapisi proizvodnje octa datiraju iz doba Sumerana, a koristili su ga i Babilonci, Perzijanci, Egipćani, Rimljani i Grci. Medicinska upotreba octa spominje se u starom i novom zavjetu. Vjerojatno je da je do otkrića octa došlo slučajno, nakon otkrića alkoholnih napitaka uslijed kvarenja odnosno fermentiranja istog. Postupak proizvodnje octa odvijao se u drvenim bačvama, a unazad 200 godina u Europi se poboljšava i unaprjeđuje proizvodnja octa čineći sam postupak bržim i učinkovitijim (Hailu, 2012; Horvat, 2010; Luzón-Quintana i sur., 2021; Singh, 2020).

Ocat je proizvod koji nastaje mikrobnom oksidacijom etanola u octenu kiselinu djelovanjem bakterija octene kiseline. Ocat je kisela tekućina dobivena iz bilo kojeg izvora ugljikohidrata, šećernog ili škrobnog sadržaja, putem dvostrukog procesa fermentacije. U početku se odvija alkoholna fermentacija ugljikohidrata koju provode kvasci pri anaerobnim uvjetima, obično roda *Saccharomyces*, nakon čega slijedi proces octene fermentacije alkohola koju provode bakterije pri aerobnim uvjetima, uglavnom roda *Acetobacter*. Sastoji se, uglavnom, od vode, sadrži 4 – 8 % octene kiseline (varira o vrsti upotrijebljene sirovine), etanol i otopljene čvrste tvari poput bjelančevina, minerala, ugljikohidrata i drugih organskih tvari. Ovisno o uporabi octa, koncentracija octene kiseline može biti i do 18 % kao što je to kod procesa konzerviranja (kiseljenja) hrane (Hailu, 2012; Luzón-Quintana i sur., 2021; Singh, 2020; Velić, 2010). Osim za konzerviranje hrane, ocat se koristi i kao začim u pripremi jela (za obogaćivanje okusa jela), za proizvodnju prirodnih lijekova, ali i za čišćenje i dezinfekciju. Sirovine od kojih se proizvodi ocat, između ostaloga uključuju: vino, pivo, slad, razrijeđeni etanol i sirovine koje u sebi sadrže šećer (Horvat, 2010).

2.2.1. Vrste octa

Octevi se mogu podijeliti prema tri osnovna kriterija: vrsti upotrijebljene sirovine, koncentraciji octene kiseline te prisutnosti aromatičnih tvari dodanih radi poboljšanja okusa i mirisa (Horvat, 2010). Iako se u svijetu najčešće konzumira vinski ocat koji se dobiva iz grožđa, postoji veliki broj različitih vrsta octeva koji se dobivaju iz različitih sirovih materijala. Neki od najpoznatijih vrsta su sake ocat, sladni ocat, jabučni ocat i voćni ocat koji se dobiva iz različitih vrsta voća (Luzón-Quintana i sur., 2021), odnosno voćnih vina (npr. jabučni, breskvin, mareličin, kokosov, kupinov, ocat od rajčice), alkoholni (bijeli) ocat, vinski ocat (dobiven iz vina od grožđa), žitni ocat, pivski ocat te mnogi drugi.

Prema Pravilniku o vinskom i voćnom octu (NN 121/05), vinski ocat je proizvod dobiven biološkim postupkom fermentacije iz vina. Poznat je po svojim koristima ublažavanja simptoma proširenih vena, glavobolje, prehlade i mučnine te pomaže u povratku apetita, kontroli imunološkog sustava i eliminaciji štetnih toksina iz organizma (Ho i sur., 2017).

Balzamski ocat je ocat koji se dobiva biološkim postupkom alkoholne i octene fermentacije ugušćenog vinskog mošta i vina ili ugušćenog voćnog soka uz obavezno odležavanje u drvenim posudama u trajanju najmanje jedne godine.

Voćni ocat je proizvod dobiven iz voćnog vina putem biološkog procesa octene fermentacije zadržavajući inherentne okuse izvorne sirovine kao što su malina, jabuka, dunja, mango, crni ribiz. Dodatna aroma se ne dodaje, jer obično ostaje zadržana u krajnjem proizvodu. Voćni octevi, posebice oni napravljeni isključivo od određenih vrsta voća, cijene se na europskom tržištu zbog svojih specifičnih aroma. U Aziji su popularni jedinstveni voćni octevi poput kaki octa, žižula octa ili octa od vučjih bobica, dok je u Indiji najpopularniji *Jamun Sirka* ocat koji je cijenjen zbog svojih ljekovitih svojstava. Poznato je da je voće bogato bioaktivnim spojevima, poput vitamina i minerala, organskih kiselina, aminokiselina i fenola, ali ne sadrži svo voće istu količinu ovih spojeva jer ono uz vrstu voća, također, ovisi i o stupnju zrelosti, uvjetima uzgoja, zbrinjavanju nakon branja i skladištenju (Hailu, 2012). Odabir sirovine i odgovarajuće bakterije za proizvodnju octa igraju važnu ulogu u karakteristikama konačnog proizvoda. Kako bi se poboljšala kakvoća voćnog octa, u proizvodnji voćnog octa mogu se koristiti sljedeći dodaci (Pravilnik o vinskom i voćnom octu, NN 121/05):

- biljke i dijelovi biljaka, uključujući aromatično i ljekovito bilje, svježe voće i povrće,

osušeno voće i povrće, usitnjeno voće i povrće ili cjelovito voće i povrće;

- šećer;
- kuhinjska sol;
- med;
- prirodni ili koncentrirani voćni sok,
- L – askorbinska kiselina.

Jedan od najkorištenijih voćnih octeva je jabučni ocat koji se primjenjuje u prehrani i medicini više od deset tisuća godina. Djelotvoran je u slučajevima osteoporoze, visokog kolesterola i niskog krvnog tlaka te pomaže u probavi i regulaciji tjelesne težine. Jabučni ocat, također, snižava glikemijski indeks namirnica, poboljšava osjetljivost na inzulin i pomaže u kontroliranju dijabetesa tipa 2 (Ho i sur., 2017). Važno je naglasiti da voćni ocat koji se stavlja u promet na teritoriju Republike Hrvatske mora zadovoljavati određenim temeljnim zahtjevima (Pravilnik o vinskom i voćnom octu, NN 121/05):

- tekućina mora biti bistra, svojstvene boje i mirisa po sirovini koja se koristi;
- mora sadržavati najmanje 50 g/L ukupnih kiselina, računato kao octena kiselina;
- udio alkohola ne smije biti veći od 0,5 % vol.;
- smije sadržavati najviše 170 mg/L SO₂, od toga slobodnog SO₂ najviše 30 mg/L.

Aromatizirani ocat je ocat koji se dobiva aromatiziranjem vinskog ili voćnog octa različitim dodacima kao što su ekstrakti prirodnih začina, aromatičnog bilja i povrća (Pravilnik o vinskom i voćnom octu, NN 121/05). Bitno je da aromatizirani ocat ima naglašenu karakterističnu aromu koja odražava dodane sastojke po kojima se i deklarira. Aromatizirati se mogu sve vrste octa, a najčešće se aromatizira alkoholni ocat u svrhu poboljšanja organoleptičkih svojstava. Za aromatiziranje octa najčešće se koriste različite aromatične biljke ili njihovi dijelovi, kao što su: vanilija, menta, cimet, klinčić, papar, origano, muškatni oraščić, kamilica, češnjak, majčina dušica, limun, borovnica, đumbir i drugi.

Također, osim navedenih, postoje neke vrste octa koje se proizvode specijalnim postupcima kao „Aceto balsamico“ balzamski ocat te sherry ocat koji se proizvodi iz sherry vina „solera“ postupkom. Aceto balsamico proizvodi se od koncentriranog mošta bijelog grožđa sorte Trebiano u talijanskoj Modeni. Najskuplja je i najcjenjenija vrsta octa, a koristi se za davanje jačeg pečata i arome hrani (Ho i sur., 2017).

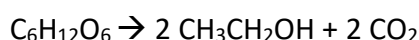
U svijetu prevladava korištenje vinskog octa, pogotovo u vinorodnim regijama, a u kontinentalnoj Hrvatskoj se sve više povećava popularnost njegove konzumacije. U Hrvatskoj se pretežito koristi alkoholni ocat koji se dobiva iz procesiranog alkohola te jabučni ocat kao produkt fermentacije jabučnice odnosno jabučnog vina (cidera).

2.3. Proizvodnja octa

Kako je već navedeno, ocat je proizvod dobiven dvostupanjskim procesom fermentacije, pri čemu prvo dolazi do transformacije fermentabilnih šećera u etanol katalizirane kvascima (alkoholna fermentacija), a zatim do oksidacije etanola do octene kiseline katalizirane bakterijama (octena fermentacija).

2.3.1. Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija je anaerobna transformacija šećera, uglavnom glukoze i fruktoze, u etanol i ugljikov dioksid. Ovaj biološki proces kataliziraju kvasci poput *Saccharomyces cerevisiae*, ali i neke bakterije poput *Zymomonas mobilis* te se može prikazati sljedećom ukupnom reakcijom:

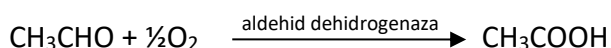
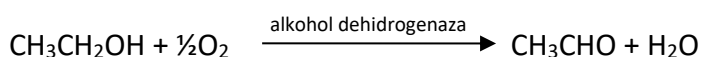


Međutim, osim alkohola i ugljikovog dioksida, tijekom alkoholne fermentacije djelovanjem kvasaca nastaje i nekoliko sporednih produkata koji također doprinose konačnom okusu i aromi. Neki od tih spojeva uključuju: više alkohole, glicerol, jantarnu kiselinu, estere i aromatske spojeve (Zamora, 2009). Cjelokupan proces alkoholne fermentacije podijeljen je u dvije faze: aerobnu i anaerobnu. Aerobna faza ključna je za razmnožavanje kvasaca kako bi se postigao dovoljan broj stanica za transformaciju fermentabilnih šećera u alkohol. Kada se umnoži dovoljan broj stanica kvasca, prekida se dotok kisika te započinje anaerobna faza u kojoj kvasac metabolizira fermentabilne šećere, što rezultira nastankom etanola i oslobađanjem CO₂. Osim navedenog, trajanje fermentacije može biti pod utjecajem drugih parametara kao što su koncentracija mikroorganizama, temperatura fermentacije, sastav supstrata, tolerancija kvasaca na alkohol, pH vrijednost i koncentracija šećera (Luzón-Quintana i sur., 2021). Alkoholna fermentacija traje sve dok se ne potroši sav dostupni šećer ili dok količina alkohola u otopini ne postane dovoljno visoka da inhibira aktivnost kvasca.

2.3.2. Oksidacija etanola pomoću bakterija octene kiseline

Nakon provedene alkoholne fermentacije, oksidacija alkohola u octenu kiselinu je sljedeći ključni korak u proizvodnji octa. Budući je alkoholna fermentacija anaerobni proces, nakon završetka reakcije, dobiveni proizvod ne sadrži dovoljnu koncentraciju kisika i, potrebno ju je osigurati aeracijom ili intenzivnim miješanjem za provedbu octene fermentacije. Octena fermentacija je striktno aeroban proces (Rezo, 2023). Proizvodnja octa obuhvaća procese koji se smatraju „prirodno zaštićenima“, što implicira da nije neophodno osigurati sterilnost opreme i podloge. Prilikom proizvodnje octa iz alkoholnih komina, upotreba mješovitih kultura bakterija octene kiseline uobičajena je praksa u industrijskoj i zanatskoj proizvodnji octa. Takve mješovite kulture bakterija octene kiseline prisutne su u pogonima iz dva ključna razloga: zbog aeracije podloge nesterilnim zrakom te zbog korištenja nesterilnih prirodnih podloga poput jabuka, vina, medovine, što neizbježno dovodi do unosa različitih vrsta i sojeva bakterija. Čak i u pogonima koji su počeli s čistom laboratorijskom kulturom bakterija, brzo se formira mješovita kultura zbog korištenja nesterilnog zraka i podloga. Takav nesterilan pristup je moguć, prije svega, zbog izuzetno niske pH vrijednosti podloge ($\text{pH} < 3$) tijekom uzgoja, što gotovo u potpunosti sprječava razvoj većine drugih mikroorganizama, osim onih koji preferiraju kiselo okruženje (Horvat, 2010).

Proces proizvodnje octa temelji se na oksidaciji etanola u octenu kiselinu pod djelovanjem kulture octenih bakterija, koje oksidiraju etanol dvostupanjskom reakcijom uz acetaldehid (etanal) kao intermedijer. U reakciji proizvodnje octene kiseline sudjeluju dva enzima vezana za membranu bakterija: alkohol dehidrogenaza (E.C.1.1.99.8) i aldehid dehidrogenaza (E.C.1.2.99.3). Dvostupanjska reakcija oksidacije etanola do octene kiseline može se prikazati sljedećim reakcijama:

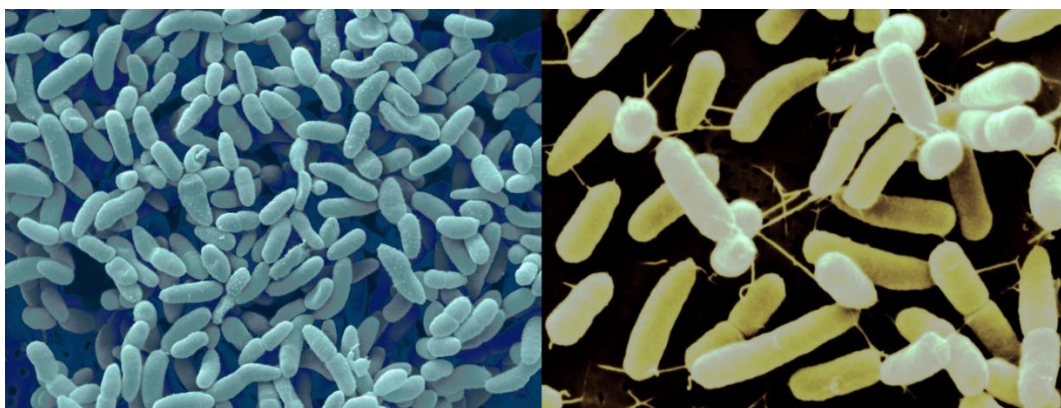


Acetifikacija počinje transformacijom alkohola u acetaldehid uz oslobađanje vodikovih iona i elektrona, što katalizira enzim alkohol dehidrogenaza. Nakon toga, acetaldehid se hidratizira, pri čemu vodikovi ioni reagiraju s kisikom, stvarajući vodu. Dalje, acetaldehid se transformira

u octenu kiselinu uz oslobađanje vodikovih iona i elektrona, što katalizira enzim acetaldehid dehidrogenaza. Uslijed tog procesa dolazi do prijenosa vodikovih iona i elektrona na molekularni kisik, stvarajući vodu putem citokromskog sustava (Singh, 2020).

2.3.3. Bakterije octene kiseline

Bakterije octene kiseline, poznate i kao *Acetobacteraceae*, čine skupinu mikroorganizama koja uključuje nekoliko rodova i vrsta. Trenutno su klasificirane u 19 rodova, uključujući *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Bombella*, *Ameyamaea*, *Asaia*, *Commensalibacter*, *Endobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, *Granulibacter*, *Komagataeibacter* i druge. Glavne vrste odgovorne za proizvodnju octa pripadaju rodovima *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* i *Komagataeibacter* (Slika 3) zbog njihove dobre sposobnosti oksidacije etanola u octenu kiselinu i velike otpornosti na octenu kiselinu koja se oslobađa u fermentacijskom mediju (Gomes i sur., 2018).



Slika 3 *Acetobacteraceae* i *Gluconacetobacter* (Lovrenčić i Šimunović, 2014)

Bakterije octene kiseline su strogo aerobni mikroorganizmi, gram-negativni ili gram-varijabilni, pozitivni na katalazu i negativni na oksidazu. Imaju oblik elipsoidnih do štapićastih stanica te se mogu pojaviti pojedinačno, u parovima ili lancima. Radi se o mezofilnim mikroorganizmima, te im je optimalna temperatura rasta između 25 i 30 °C. Optimalna pH vrijednost za njihov rast kreće se u rasponu od 5,0 – 6,5, ali mogu rasti i pri nižim pH vrijednostima (Gomes i sur., 2018).

U prirodnim procesima, *Acetobacteraceae* se spontano razvijaju tijekom dugo vremena. Međutim, u komercijalnoj proizvodnji octa dodaje se tako zvana „majka octa“ kao izvor radnog

mikroorganizma. „Majka octa“ je ljepljivi biofilm (sluz) koji se formira na površini alkoholnog medija tijekom njegove transformacije u ocat. Taj biofilm se skida s površine i koristi kao starter kultura za sljedeće šarže alkohola u svrhu ubrzane proizvodnje octa (Hailu, 2012).

2.4. Tehnološki postupci proizvodnje octa

Proizvodnja octa može se provesti brzo ili sporo, zavisno o odabranom procesu. U sporijem, prirodnom procesu, alkoholna hranjiva podloga fermentira u otvorenim bačvama na sobnoj temperaturi tijekom nekoliko mjeseci, pri čemu alkohol oksidira u octenu kiselinu. Ovaj tradicionalni pristup, iako traje duže, omogućava stvaranje tzv. „majke octa“- biofilma/sluzi koji se sastoji od bakterija octene kiseline i bakterijske celuloze (Hailu, 2012).

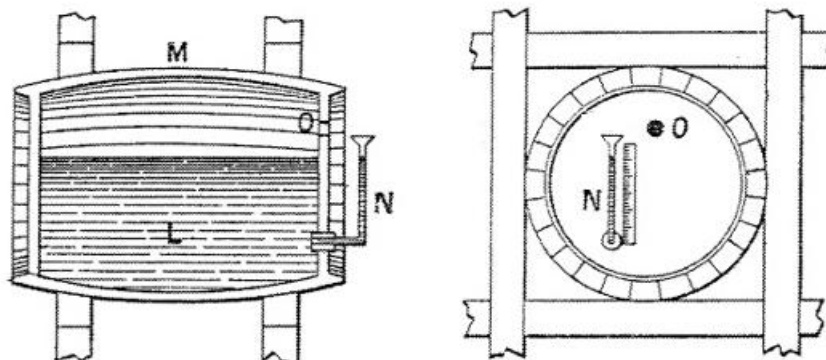
Brze metode postaju sve popularnije zbog svoje učinkovitosti i ekonomičnosti. Ove metode obično uključuju upotrebu „majke octa“ te aeracije koja osigurava dovoljno kisika za brži proces. Primjenom ovih tehnika, vrijeme fermentacije se znatno skraćuje te sam proces traje od 20 sati do nekoliko dana. U komercijalnoj proizvodnji postoji tendencija korištenja generatorne metode ili submerzne fermentacije kako bi se postigla konzistentna kvaliteta proizvoda. Ove tehnike ne samo da osiguravaju kvalitetan proizvod, već i ubrzavaju proces proizvodnje, što je ključno za zadovoljenje potražnje na tržištu (Hailu, 2012).

2.4.1. Orleanska metoda

Orleanska metoda proizvodnje octa predstavlja jedan od najstarijih i najpoznatijih pristupa, koji potječe s kraja 17. stoljeća (oko 1670. godine) iz Francuske. Ovaj spori proces karakterizira korištenje visokokvalitetnog octa kao početne kulture, uz dodavanje vina svakog tjedna. Fermentacija octa odvija se u velikim drvenim bačvama kapaciteta od 200 L koje su napunjene do otprilike $\frac{3}{4}$ punog kapaciteta (**Slika 4**). Takve bačve ciljano se izrađuju s otvorima (rupama) koje se prekrivaju finom mrežom na kraju, nekoliko centimetara iznad razine tekućine, što olakšava protok zraka (Bhat i sur., 2014).

Početno se u bačvu dodaje oko 65 do 70 L visokokvalitetnog octa, zajedno s 15 L vina. Nakon tjedan dana, dodaje se dodatnih 10 do 15 L vina, a ovaj postupak se ponavlja svakog tjedna. Nakon otprilike četiri tjedna, dio octa se može izvaditi iz bačve (10 do 15 L tjedno), dok se

dodaje vino kako bi se zamijenio ocat. Glavni izazov ove metode je kako dodati više tekućine u bačvu bez negativnog učinka na majku octa. Taj problem rješava se korištenjem staklene cijevi koja doseže dno bačve. Dodatna tekućina se ulijeva kroz cijev kako bi se osiguralo da majka octa ostane netaknuta. Ponekad se u bačvu za fermentaciju dodaje drvena strugotina, koja služi kao nosač za octene bakterije, odnosno majku octa (Hailu, 2012).

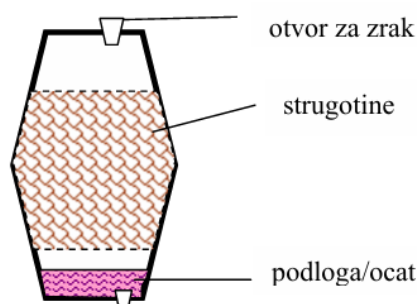


Slika 4 Opći prikaz Orleanskog acetatora: drvena bačva (M), otvor za ventilaciju (O), tekući medij (L), razina tekućine (N) (Horvat, 2010)

2.4.2. Schützenbach-ova metoda

Schützenbach-ova „brza“ metoda proizvodnje octa predstavljala je revolucionarni pristup koji je omogućio brže i učinkovitije vođenje procesa te upotrebu sirovina s nižim udjelom ekstraktivnih tvari. Srž ove metode leži u korištenju drvenih bačvi unutar kojih su na približno trećini visine od vrha i dna postavljene drvene rešetke između kojih je prostor ispunjen rahlim celuloznim materijalom (**Slika 5**). Bačva je opremljena s dva otvora za zrak, jedan na vrhu i drugi na dnu, koji se otvaraju ovisno o potrebi, prilagođavajući se položaju bačve. Poput orleanskog postupka, i u ovom slučaju, na početku procesa bačva se djelomično puni prethodno proizvedenim vinskim octom do četvrtine volumena. Dodatno, u taj vinski ocat se ulijeva još 5 – 10 % vina. Bačva se redovito okreće nekoliko puta dnevno kako bi se mješavina octa i vina filtrirala preko umetnutog rahlog materijala zbog kojeg je povećana kontaktna površina i poboljšan prijenos kisika iz plinovite u tekuću fazu. Taj postupak omogućuje bakterijama octene kiseline kolonizaciju rahlog materijala, čime se ubrzava oksidacija etanola u octenu kiselinu. Ovakav pristup omogućava polukontinuiranu proizvodnju octa, pri čemu je

trajnost rahlog materijala i drvenih rešetki ograničavajući faktor za kontinuitet procesa (Horvat, 2010; Velić, 2010).

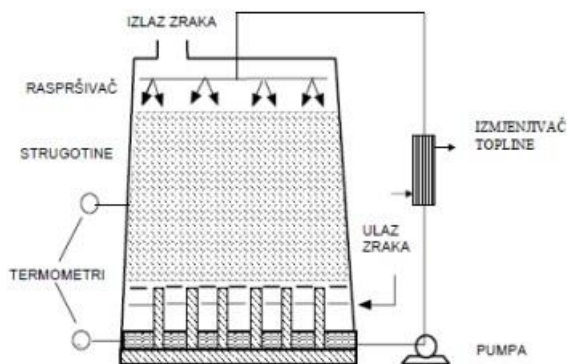


Slika 5 Shema Schützenbach-ovog bioreaktora (Horvat, 2010)

2.4.3. Frings-ov generator

Proces proizvodnje octa u generatoru sve se rjeđe koristi, jer je sporija u usporedbi s modernijim tehnikama poput submerzne tehnike uzgoja, ali i dalje privlači pažnju nekih proizvođača zbog svojih karakterističnih aroma i visoke kvalitete octa koje proizvodi (Horvat, 2010).

Generator je zapravo bioreaktor oblika krnjeg stošca, najčešće izrađen od tikovog ili hrastovog drva. Sastoji se od cilindričnog spremnika s perforiranim dnom koje podržava sloj drvenih strugotina ili sličnog materijala. Perforirane cijevi za dovod zraka smještene su neposredno ispod rešetke, dok je cijeli spremnik ispunjen strugotinama gotovo do vrha (slika 6). Proces započinje pripremom mješavine alkohola i octene kiseline, koja se nanosi na vrh generatora. Takva otopina kaplje niz strugotine, dolazi u kontakt s kisikom iz zraka te potiče mikrobnu oksidaciju etanola u octenu kiselinu. Bakterije octene kiseline rastu na drvenim strugotinama i kataliziraju proces oksidacije. Proizvod se prikuplja na dnu generatora i ponovno cirkulira preko strugotina što rezultira većom oksidacijom alkohola sve dok se ne dobije ocat željene jačine (Hailu, 2012). Protok komine i zraka regulira se na temelju stanja procesa i temperaturnog režima, kao i održavanjem optimalne temperature cirkulacijom i hlađenjem komine. Iako i dalje spora, ova metoda omogućuje proizvodnju octa izuzetne kvalitete, s naglašenim okusom i mirisom (Rezo, 2023).



Slika 6 Shematski prikaz presjeka Frings-ova generatora (Horvat, 2010)

2.4.4. Submerzna metoda

Ova tehnika za proizvodnju octa, najčešće se koristi i podrazumijeva poboljšanje parametara fermentacije poput aeracije, miješanja, grijanja i slično, a primjenjuje se na industrijskoj razini. U ovom procesu, komina se redovito aerira i miješa, dok je fermentor opremljen izmjenjivačem topline kako bi se održala optimalna temperatura tijekom fermentacije. Fringsov acetator bio je prvi bioreaktor submerznog tipa, nakon čega su razvijene druge metode poput kavitatora i fermentora s mjehurićima (Vidra i sur., 2017). Aparatura koja se koristi za provedbu ove metode uključuje nehrđajući čelični spremnik s izmjenjivačem topline, regulatorom pjene, ventilima za punjenje i pražnjenje te sustavom za opskrbu zrakom. Koeficijenti prijenosa kisika u svakom sustavu izuzetno su raznoliki. Općenito, ovi fermentori osiguravaju maksimalne koeficijente prijenosa kisika i ne uključuju miješanje (Ho i sur., 2017). Sustavi za kontinuiranu opskrbu zrakom ključni su za uspješno funkcioniranje ove metode. Očuvanje bakterijske kulture u fazi eksponencijalnog rasta je od iznimne važnosti te je nužno osigurati potrebne hranjive tvari i kisik kako bi bakterije preživjele. Korištenjem ovog sustava bakterije octene kiseline suspendirane su u tekućini (hranjivoj podlozi) i ne stvaraju „majku octa“, nema prisutnosti sluzi u fermentoru, a gotovi ocat je izuzetno bistar. Postoje dva glavna tipa ovih sustava: turbinski sustavi i sustavi s venturijevom cijevi (Hailu, 2012).

Svi parametri su strogo i automatski kontrolirani, uključujući temperaturu, pH vrijednost, koncentraciju alkohola, količinu zraka te punjenje i pražnjenje acetatora. Postupak submerzne proizvodnje octa može biti vođen kao šaržni, polukontinuirani i kontinuirani. Šaržni postupak uključuje tri koraka: punjenje acetatora hranjivom podlogom (medijem), inokulaciju

bakterijama octene kiseline te pražnjenjem acetatora nakon završenog proizvodnog procesa. Za inokulum se koristi nedovršeni ocat s 12 % octene kiseline i 1 % alkohola. Kako bi se postigla smjesa sa sadržajem od 7 - 8 % octene kiseline, 5 % alkohola i 0,15 % specijalnih hranjiva, dodaje mu se odgovarajuća količina podloge koja sadrži 12 % alkohola, 1 % octene kiseline i 0,3 % specijalnih hranjiva (Velić, 2010). Polukontinuirani postupak sličan je šaržnom, no ovdje se dio sadržaja acetatora s gotovim proizvodom ispusti, dok drugi dio ostaje u acetatoru i nadopuni se s hranjivom podlogom radi provedbe sljedećeg ciklusa. Kontinuirani proces, započinje kao šaržni, da bi se potom održavao stalni volumen fermentirane podloge u acetatoru na način da se kontinuirano dovodi svježja hranjiva podloga (stalna opskrba supstratom) i odvodi/prazni fermentirana podloga (odnosno ocat, proizvod) (Vidra i sur., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada

Cilj rada bio je istražiti i optimirati proces proizvodnje voćnog octa od sibirske borovnice iz ekološkog uzgoja. Istraživanje je provedeno primjenom serije laboratorijskih (u aeriranim Erlenmeyerovim tikvicama volumena 2 L) te poluindustrijskih (u acetatoru volumena 30 L) eksperimenata. Nakon eksperimentalne proizvodnje i analize uzoraka provedena je statistička obrada dobivenih rezultata te je optimiran proces proizvodnje voćnog octa od sibirske borovnice.

3.2. Materijali

Sirovine:

- vino od sibirske borovnice iz ekološkog uzgoja - Aurora (Hrvatska)
- kultura octenih bakterija – majka octa 100 mL/pak (Brouwland, Belgija)

Kemikalije:

- 1 M natrijev hidroksid (NaOH)
- indikator (fenolftalein)
- etanol
- destilirana voda
- enzimski test (**slika 7**) za određivanje octene kiseline (K-ACET) (Megazyme, Irska)



Slika 7 Megazyme enzimski test za određivanje koncentracije octene kiseline (Megazyme, Irska)

3.3. Oprema

Tijekom pripreme uzoraka vina za octenu fermentaciju korišteno je sljedeće:

- Erlenmeyerove tikvice volumena 2 L
- pipete

Za provođenje octene fermentacije u laboratorijskom mjerilu korišteni su:

- orbitalna tresilica (IKA KS 260)
- linearna tresilica (PHOENIX RS-LS20)
- termostatirana orbitalna tresilica (BIOSAN ES-20)
- termometar (TFA LT-101)
- aeratori (zračni kompresori i zračni difuzeri)

Za provođenje octene fermentacije u poluindustrijskom mjerilu korišteni su:

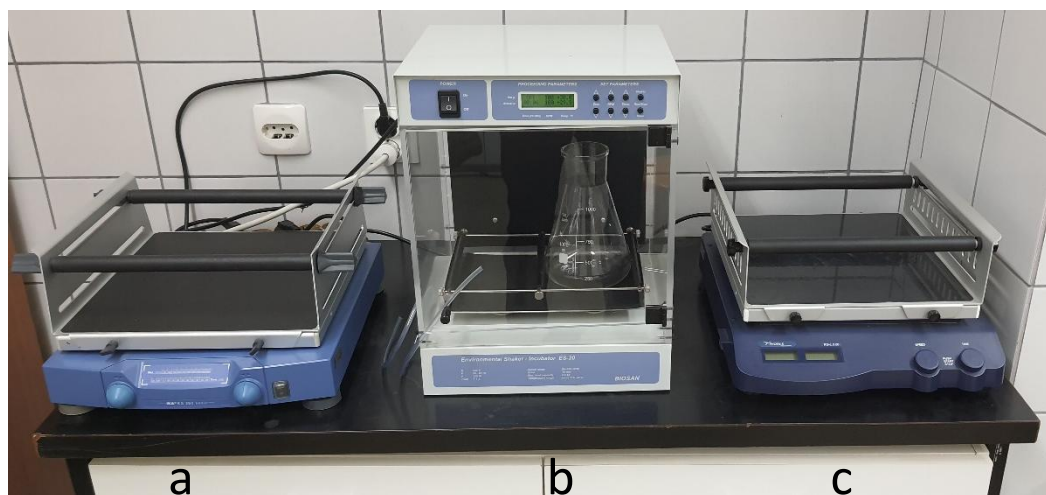
- acetator EUCLID tip A 30

Tijekom analize octa u laboratorijskom i poluindustrijskom mjerilu korišteni su:

- pH metar (Mettler Toledo) za određivanje pH vrijednosti octa
- digitalni refraktometar (HI 96813) za određivanje šećera u octu
- tresilica (Vortex V-1 plus)
- spektrofotometar MegaQuant™ Wave (Megazyme, IR)

3.3.1. Laboratorijske miješalice/tresilice

Za potrebe ovog rada, korištena su tri različita tipa mješalice/tresilice, kako bi se odredio optimalan utjecaj na povećanje koncentracije otopljenog kisika, koji je ključan čimbenik za pretvorbu vina sibirske borovnice u octenu kiselinu. Za istraživanje utjecaja orbitalnog miješanja uzoraka korištena je orbitalna tresilica - OM (IKA, KS 260 basic) (**Slika 8**). U svrhu linearnog miješanja trešnje korištena je linearna tresilica - LM (Phoenix, RS-LS20). Treći eksperiment provodio se u termostatiranoj orbitalnoj tresilici - TOM (Biosan, ES-20) pri temperaturi od 30 °C. Svi ekperimenti na tresilicama provedeni su pri jednakom broju okretaja (100 rpm).



Slika 8 Tresilice: a) IKA, KS 260; b) Biosan, ES-20; c) Phoenix, RS-LS20

3.3.2. Acetator

Acetator EUCLID tip A 30 (**slike 9 i 10**) namijenjen je za proizvodnju octa postupkom aerobne fermentacije etanola pomoću bakterija octene kiseline uz intenzivno dovođenje zraka i njegovo miješanje s tekućinom. Sastoji se od spremnika s postoljem, centrifugalne pumpe, ejektorskog uređaja za napajanje zrakom, cijevnog spiralnog hladnjaka, armature za pražnjenje spremnika i mjerenje razine tekućine, radnog i sigurnosnog temperaturnog senzora, električne instalacije i upravljačkog ormarića.

Spremnik acetatora ima volumen od 30 litara. Unutar spremnika nalaze se cijevi za dovod tekućine pomiješane s usisanim zrakom i cijevni spiralni hladnjak tekućine. Pored spremnika nalazi se centrifugalna pumpa s elektromotornim pogonom te električna instalacija i upravljački ormarić.

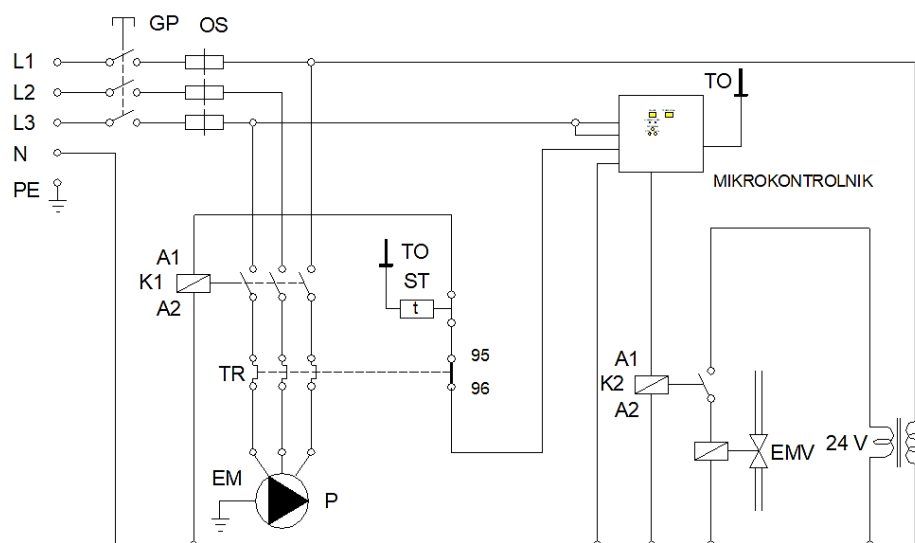
Za vrijeme rada acetatora, pomoću centrifugalne pumpe ostvaruje se optočno strujanje tekućine, pri čemu se u tekućinu dovodi zrak iz okolice. Tekućina se iz spremnika usisava kroz usisnu cijev smještenu na njegovom dnu, usisnom cijevi dolazi u pumpu, iz koje tlačnom cijevi ponovno odlazi u spremnik. Tlačna cijev grana se na tri cijevi, čime se omogućava usisavanje velike količine zraka, potrebne za proces aerobne fermentacije etanola pomoću bakterija octene kiseline. Na gornjem dijelu svake od tri cijevi za dovod tekućine nalaze se uređaji za napajanje tekućine zrakom. Uređaji rade na principu ejektora. U tlačnim cijevima ugrađene su Venturijeve cijevi, kojima se ostvaruje podtlak potreban za usisavanje zraka. U najuži dio Venturijevih cijevi ulaze sapnice kojima se dovodi zrak. Na ovaj način usisani zrak ulazi u tlačne cijevi, miješa se s tekućinom i na donjem dijelu u spremnik ulazi mješavina tekućine i zraka.

Zračni mjehurići, nakon ubacivanja u spremnik, kreću se prema površini, miješajući na taj način tekućinu s kojom i kemijski reagiraju. Zrak izlazi iz spremnika kroz otvor na poklopcu.

Miješanje zraka s tekućinom koja sadrži alkohol i octene bakterije uzrokuje ubrzavanje procesa pretvorbe alkohola u octenu kiselinu. Budući je taj proces egzoterman, (oslobađa se toplina tijekom procesa), dolazi do povećanja temperature tekućine. Osim toga, tekućina se dodatno zagrijava i uslijed trenja uzrokovanog njezinim miješanjem. Ukupnu toplinu, nastalu kemijskom reakcijom i trenjem, potrebno je odvesti u okolinu, kako ne bi došlo do prekoračenja temperature optimalne za rast i razmnožavanje bakterija. U tu svrhu u spremnik je ugrađen spiralni cijevni izmjenjivač topline, u kojem se kao rashladno sredstvo koristi voda iz vodovodne mreže.

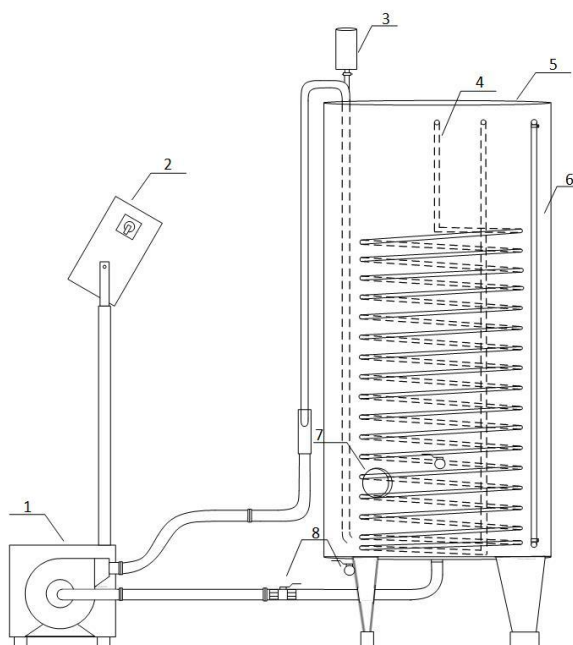
U spremniku se nalaze radni i sigurnosni temperaturni senzori. Na temelju izmjerene vrijednosti temperature pomoću radnog temperaturnog senzora, mikrokontrolnik upravlja radom elektromagnetnog ventila hladnjaka te na taj način održava zadanu temperaturu u spremniku. Kao sigurnosni element, u spremnik je ugrađen temperaturni senzor sigurnosnog termostata, koji u slučaju otkazivanja radnog termostata, odnosno prekoračenja temperature zraka iznad 35 °C zbog bilo kojeg razloga, prekida rad acetatora.

Prije uključivanja acetator je potrebno napuniti s ukupno 30 litara tekućine/hranjive podloge, supstrata te inokulirati octenim bakterijama. Prije prvog uključivanja acetatora potrebno je podesiti temperaturu i vrijeme rada. Uključivanjem acetatora pokreće se cirkulacijska pumpa te započinje mikroprocesorska regulacija temperature i vremena. Na zaslonima se može očitati trenutna temperatura tekućine te vrijeme preostalo do kraja procesa. Vrijednost temperature na zaslonu iskazana je u Celzijevim stupnjevima, a vremena u satima.

**Oznake:**

GP - Glavni prekidač	EM - Elektromotor
OS - Osigurač	P - Pumpa
K1, K2 - Sklopnici	TO - Temperaturni osjetnik
TR - Termički relej	ST - Sigurnosni termostat
EMV - Elektromagnetski ventil	

Slika 9 Električna shema acetatora



Slika 10 Shema acetatora

Legenda: 1. centrifugalna pumpa 2. upravljački ormarić 3. aerator 4. spiralni izmjenjivač topline 5. spremnik acetatora 6. nivokaz 7. termostat 8. ventili

3.3.3. MegaQuant™ Wave spektrofotometar

Za određivanje koncentracije octene kiseline enzimskim testovima, korišten je Megazyme MegaQuant Wave spektrofotometar (**Slika 11**) konstruiran za preciznu kvantitativnu analizu tekućih uzoraka.



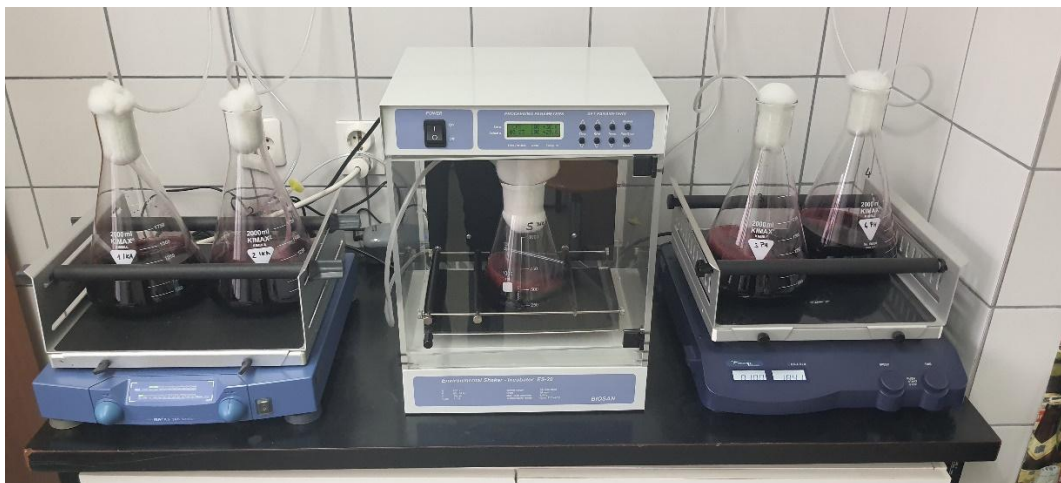
Slika 11 Spektrofotometar MegaQuant™ (Megazyme, Irska)

3.4. Metode

3.4.1. Proces proizvodnje octa od sibirske borovnice u laboratorijskom i poluindustrijskom mjerilu

Za proizvodnju octa od sibirske borovnice upotrijebljeno je voćno vino od sibirske borovnice iz ekološkog uzgoja sorte Aurora. Voćno vino je za potrebe provedbe serije mikrofermentacijskih istraživanja vino razdijeljeno u pet (5) Erlenmeyerovih tikvica volumena 2 L. U četiri (4) Erlenmeyerove tikvice dodano je 920 mL vina sibirske borovnice, a u posljednju tikvicu je dodano 460 mL vina. Za pokretanje octene fermentacije, kao inokulum je korištena komercijalna kultura octenih bakterija (Brouwland, BE). U četiri Erlenmeyerove tikvice dodano je 80 mL inokuluma čineći 1 L ukupnog volumena uzorka u pojedinim tikvicama. U tikvicu postavljenu u termostatiranoj tresilici dodano je 40 mL octene kulture čime se dobio ukupan volumen uzorka od 500 mL. Sve tikvice opremljene su aeratorima (zračnim difuzerima) kako bi se osigurao stalni dotok zraka putem zračnih kompresora/pumpi. Sve tikvice su zatvorene čepom od akvarijske vate. Tikvice u paralelama (volumena uzorka od 1 L) označene kao OM1

i OM2 koje su postavljene na orbitalnu tresilicu, dok su tikvice označene kao LM1 i LM2 postavljene na linearnu tresilicu. Tikvica volumena 500 mL, označena kao TOM, postavljena je na termostatisiranu tresilicu pri temperaturi od 30 °C, dok je proces u ostalim tikvicama vođen pri sobnoj temperaturi. Pripremljeni početni uzorci prikazani su na **Slici 12**.



Slika 12 Pripremljeni uzorci na tresilicama: lijevo (OM), sredina (TOM), desno (LM)

Tijekom provedbe eksperimenta, svaka 4 dana uzimani su uzorci radi analize odabranih parametara s ciljem praćenja biološke oksidacije etanola. Nakon 20 dana provedbe eksperimenta, dekantirano je 600 mL svakog uzorka, uz minimalno prebacivanje taloga. Ukupni volumen od 3 L pohranjen je te je kasnije korišten kao inokulum za poluindustrijsku proizvodnju octa u acetatoru.

Fermentacija voćnog vina od sibirske borovnice u poluindustrijskom mjerilu provedena je u acetatoru volumena 30 L (**Slika 10**) u koji je dodano 3 L inokuluma dobivenog aerobnom fermentacijom etanola pomoću octenih bakterija u laboratorijskom mjerilu te 27 L voćnog vina od sibirske borovnice. Fermentacija je provedena uz konstantan dovod zraka te regulaciju temperature pri 30 °C. Acetator je opremljenim spiralnim izmjenjivačem topline s automatskom regulacijom temperature fermentacije. Na samo početku procesa, uzorak je zagrijan do 30 °C kako bi se potaknula aerobna fermentacija etanola pomoću bakterija octene kiseline. Uzorkovanje i analiza uzorka u poluindustrijskom mjerilu provođena je svakih četiri dana. Nakon 20 dana ocat sibirske borovnice je pretočen u boce u kojima je nastavljeno odležavanje i dozrijevanje.

3.4.2. Određivanje pH vrijednosti

Praćenje pH vrijednosti uzoraka provedeno je korištenjem pH metra FiveEasy, Mettler Toledo (Slika 13). pH vrijednost mjerena je direktno u uzorcima, bez prethodne pripreme uzorka.



Slika 13 pH metar (Mettler Toledo)

3.4.3. Određivanje koncentracije octene kiseline titracijskom metodom

Titracijska metoda određivanja koncentracije octene kiseline u uzorku temelji se na neutralizaciji octene kiseline natrijevim hidroksidom. Metoda je pogodna jer omogućuje brzo i precizno određivanje octene kiseline u voćnom octu.

Otpipetirano je 10 mL voćnog octa u Erlenmeyerovu tikvicu te je dodano nekoliko kapi indikatora fenolftaleina. Uzorak je, uz stalno miješanje, polako titriran standardnom otopinom natrijeva hidroksida (1M NaOH) do promjene boje indikatora u crveno-ljubičastu čime je označen kraj titracije. Koncentracija octene kiseline u uzorku se izračunata je prema jednadžbi (1):

$$\text{Koncentracija octene kiseline} = V(\text{NaOH}) \times f \times 10 \text{ [g/L]} \quad (1)$$

gdje je:

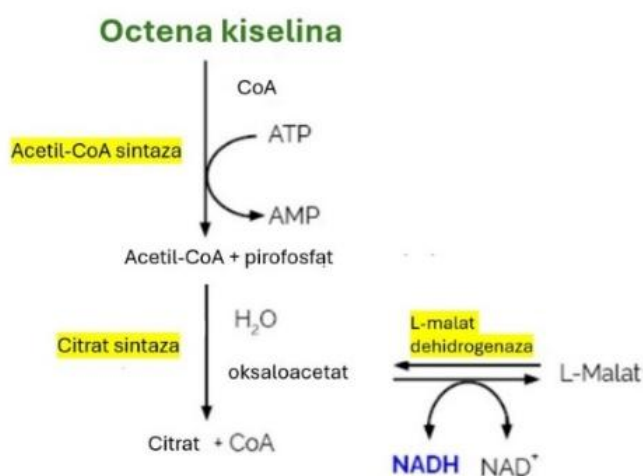
$V(\text{NaOH})$ – volumen titranta (1M NaOH)

f – faktor konverzije (0,6)

3.4.4. Određivanje koncentracije octene kiseline spektrofotometrijskom enzimskom metodom

Enzimski test za određivanje koncentracije octene kiseline pruža brzo i pouzdano mjerenje koncentracije octene kiseline/acetata u hrani, pićima i drugim materijalima. Metoda se temelji na sljedećim reakcijama (**Slika 14**): acetil-koenzim A sintaza (ACS), uz prisutnost adenozin-5'-trifosfata (ATP) i koenzima A (CoA), pretvara octenu kiselinu (acetat) u acetil-CoA (1), uz istovremeno nastajanje adenozin-5'-monofosfata (AMP) i pirofosfata. Nakon toga, citrat sintaza (CS) u prisutnosti acetil-CoA pretvara oksaloacetat u citrat (2). Oksaloacetat potreban za reakciju (2) nastaje se iz L-malata i nikotinamid-adenin dinukleotida (NAD^+) u prisutnosti L-malat dehidrogenaze (L-MDH) (3). U toj reakciji, NAD^+ se reducira u NADH.

Određivanje se provodi spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 340 nm, u staklenoj kiveti promjera 1 cm i volumena 5 mL. Svi uzorci su prije analize termostimirani na temperaturi od 25 °C.



Slika 14 Reakcije na kojima se temelji enzimska metoda određivanja octene kiseline

Mjerenje apsorbancije provedeno je na način da je u kivetu dodano 2 mL destilirane vode, 0,1 mL uzorka, 0,5 mL standarda 1 (pufer), 0,2 mL standarda 2 (NAD^+ /ATP/PVP/CoA). Dobivena smjesa izmiješana je na vortex mješaču, inkubirana 3 minute pri temperaturi od 25 °C te je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 340 nm. Nakon toga dodano je 0,02 mL standarda 3 (L-MDH/CS). Reakcijska smjesa ponovo je izmiješana na vortex-u te izmjerena apsorbancija

nakon 4 minute termostatiranja. Zatim je dodano 0,02 mL suspenzije 4 (ACS), ponovo izmiješano, termostatirano kroz 12 minuta te očitana apsorbancija. Prije svake analize uzorka, spektrofotometar se nulira pomoću slijepe probe.

Izračunavanje koncentracije octene kiseline na osnovu izmjerenih apsorbancija uzoraka provedeno je korištenjem odgovarajućeg (specijaliziranog) digitalnog alata (MegaCalc™ kalkulator, https://www.megazyme.com/documents/Data_Calculator/K-ACET_CALC.xlsx).

3.4.5. Određivanje refraktometrijske vrijednosti

Refraktometrija je mjerna tehnika određivanja indeksa loma svjetlosti (refrakcije) neke tvari. Za mjerenje se koristi mjerni instrument refraktometar (**Slika 15**), koji mjeri kut pod kojim se zraka svjetlosti lomi pri prijelazu iz otopine u staklenu prizmu poznatog indeksa loma. Indeks loma otopina proporcionalan je njihovoj koncentraciji, pa refraktometrija služi kao brza analitička metoda za određivanje koncentracije šećera u vinima i sokovima, alkohola u alkoholnim pićima, koncentracije masti u mlijeku itd. Rezultat je pri tome izražen u stupnjevima Brix-a [$^{\circ}\text{Bx}$]. Za analizu je korišten refraktometar tvrtke Hanna Instruments (HI 96813 Wine Refractometer).



Slika 15 Refraktometar HI 96813 (Izvor: Autor)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Fizikalno-kemijski parametri voćnog vina od sibirske borovnice

Kao početna sirovina za proizvodnju voćnog octa od sibirske borovnice korišteno je voćno vino sibirske borovnice iz ekološkog uzgoja. **Tablica 1** prikazuje rezultate dobivene fizikalno-kemijskom analizom voćnog vina od sibirske borovnice te početnih uzoraka voćnog vina od sibirske borovnice nakon dodatka komercijalno dostupnog inokuluma u tekućem obliku. Analizirani uzorci voćnog vina od sibirske borovnice zadovoljavaju uvjete propisane Pravilnikom o vinarstvu (NN 81/22) te se na takvim uzorcima zasnivala daljnja proizvodnja voćnog octa od sibirske borovnice.

Tablica 1 Fizikalno-kemijski parametri voćnog vina od sibirske borovnice te početnih uzoraka voćnog vina od sibirske borovnice nakon dodatka inokuluma

Parametar Uzorci	Suhi ekstrakt (g/l)	Alkoholna jakost (vol %)	Sadržaj hlapljivih kiselina (g/l)	Sadržaj ukupnih kiselina (g/l)	Sadržaj slobodnog SO ₂ (mg/l)	Sadržaj ukupnog SO ₂ (mg/l)	pH
Voćno vino od haskapa	65,6	11,21	1,02	19,35	23,04	84,48	3,48
Voćno vino od haskapa s dodanim inokulumom	57,3	10,52	5,37	29,25	25,60	80,26	3,30

Iz tablice je vidljivo kako dodatkom inokuluma dolazi do povećanja sadržaja hlapljivih i ukupnih kiselina, kao i smanjenja pH vrijednosti, što je očekivano, jer je komercijalni inokulum dostupan u obliku octa u kojem se nalaze suspendirane octene bakterije. Dodatak inokuluma u tekućem obliku osigurao je prisutnost dovoljne početne količine octenih bakterija za pokretanje bioprocesa, pri čemu blago sniženje pH podloge (voćnog vina) i dalje osigurava optimalne uvjete za njihov rast i razmnožavanje. Neznatno smanjenje alkoholne jakosti i suhog ekstrakta također je posljedica dodatka tekućeg inokuluma, odnosno razrjeđenja originalnog uzorka voćnog vina. Kako bi se tijekom procesa proizvodnje octa postigao zadovoljavajući prinos, odnosno koncentracija octene kiseline u skladu s lokalnom regulativom za voćne octove, potrebno je osigurati da alkoholna jakost početnog uzorka voćnog vina bude dovoljno velika, ali istovremeno takva da ne dovede do inhibitornog učinka na bakterije octene kiseline.

Rezultati istraživanja koje su proveli Garrido-Vidal i suradnici (2003) pokazali su kako u kontinuiranoj proizvodnji octene kiseline sadržaj etanola od 50 g/L (odnosno oko 6% vol/vol) može imati inhibitorski učinak na octene bakterije. Ovo se može izbjeći razrjeđivanjem početne sirovine, odnosno korekcijom sadržaja alkohola, ali to može narušiti mineralni sastav i udjel dušika u sirovini. Navedeno također može imati nepovoljan učinak na proizvodni proces, pa je te vrijednosti također potrebno korigirati dodatkom odgovarajućih izvora minerala/dušika. Coelho i suradnici (2017), temeljem rezultata dobivenih istraživanjima proizvodnje voćnih octeva od voćnih vina naranče, manga, višnje i banane, navode kako je i alkoholna jakost do 11% prikladna za proizvodnju voćnog octa. Inhibitorski učinak alkohola na početku proizvodnog procesa može se prevladati dodatkom veće količine inokuluma. Istraživanja su pokazala kako upotreba komercijalno dostupnih inokuluma bakterija octene kiseline (tzv. „startera“, odnosno majke octa) osigurava brže provođenje procesa te konačni proizvod boljeg sastava i senzorskih karakteristika u odnosu na procese u kojima nije korišten inokulum (Luzón-Quintana i sur., 2021).

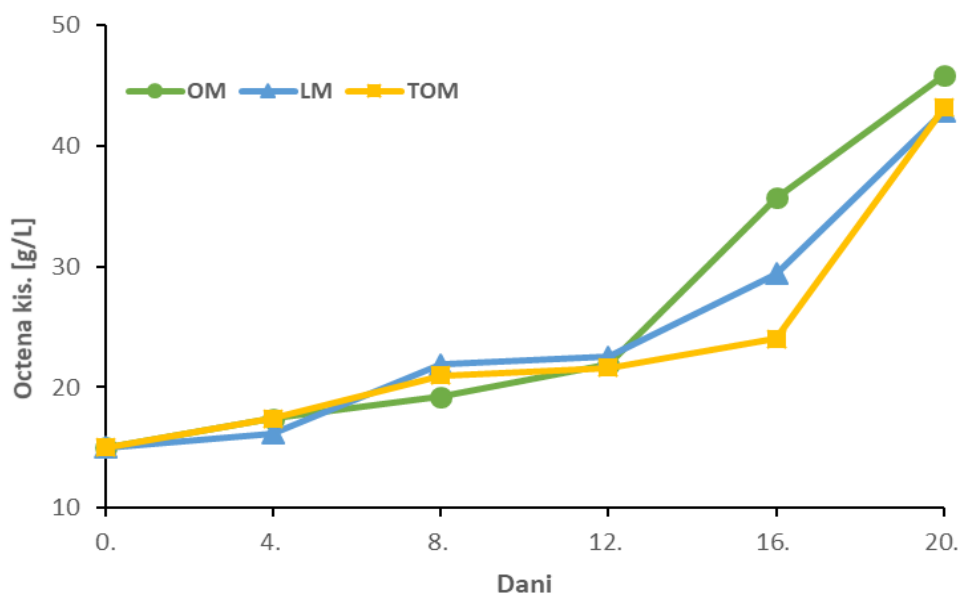
4.2. Utjecaj vrste miješanja na kinetiku nastajanja i koncentraciju octene kiseline u laboratorijskom mjerilu

Jedan od ciljeva rada bio je istražiti kako vrsta miješanja utječe na proizvodnju voćnog octa od sibirke borovnice, odnosno na kinetiku nastajanja i koncentraciju octene kiseline, kao glavnog proizvoda procesa biološke oksidacije alkohola. U tu svrhu provedeni su šaržno vođeni eksperimenti u laboratorijskom mjerilu (0,5 – 1 L voćnog vina) primjenom različitih vrsta miješalica (tresilica): orbitalne, linerane (recipročne) i termostatirane orbitalne.

Vrsta miješanja u direktnoj je vezi s učinkovitošću aeracije, koja je jedan od ključnih procesnih parametara u proizvodnji octa. U tom kontekstu, ispitan je utjecaj orbitalnog miješanja (OM) i lineranog miješanja (LM) na kinetiku nastajanja i koncentraciju octene kiseline, pri čemu su eksperimenti provedeni pri sobnoj temperaturi (25 °C). Optimalna temperatura za bakterije octene kiseline iznosi od 25 do 30 °C (Luzón-Quintana i sur., 2021). Imajući u vidu utjecaj temperature na brzinu rasta i razmnožavanje mikroorganizama, ali i na brzinu kojom nastaju proizvodi njihova metabolizma, dodatno je ispitan i utjecaj temperature veće od sobne pri orbitalnom miješanju na nastajanje octene kiseline, pri čemu je eksperiment proveden pri 30

°C korištenjem termostatirane orbitalne miješalice (TOM). Volumna jakost alkohola u svim početnim uzorcima je bila jednaka te je iznosila 10,52 vol %.

Kako bi se pratila kinetika nastajanja i koncentracija octene kiseline, uzorci su uzimani svaka 4 dana tijekom eksperimenta u ukupnom trajanju od 20 dana. Rezultati iskazani kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja prikazani su na **Slici 16**.



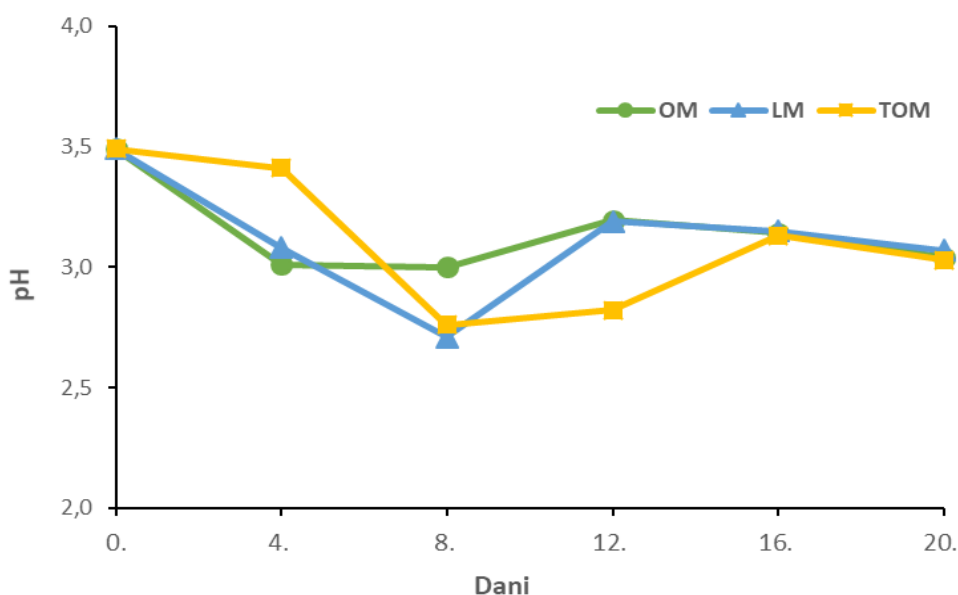
Slika 16 Kinetika nastajanja octene kiseline i koncentracija octene kiseline (određeno titracijskom metodom) tijekom proizvodnje voćnog octa od sibirske borovnice

Iz rezultata je vidljivo kontinuirano povećanje koncentracije octene kiseline od 4. do 20. dana vođenja procesa u svim uzorcima, neovisno o načinu miješanja i temperaturi. U prvim danima vođenja procesa to povećanje nije veliko u odnosu na početni uzorak, ali već od 8. dana promjena koncentracije u svim uzorcima u odnosu na početnu koncentraciju je puno izraženija što se vidi iz nagiba krivulja. Usporedbom rezultata za sva tri uzorka nakon 20. dana vođenja procesa vidljivo je kako je najveća koncentracija octene kiseline dobivena u uzorcima koji su miješani orbitalno (OM) pri sobnoj temperaturi i iznosi 45,9 g/L. U uzorcima koji su miješani linearno (LM) koncentracija octene kiseline nakon 20 dana procesa iznosila je 42,9 g/L. Ovo vjerojatno ukazuje kako se orbitalnim miješanjem postigla bolja topljivost i distribucija kisika u masi tekućine u odnosu na linearno miješanje. Nadalje, koncentracija octene kiseline nakon 20 dana procesa u orbitalno miješanim uzorcima pri temperaturi 30 °C (TOM) iznosila je 43,2

g/L. Očekivano, to je nešto veća vrijednost u odnosu na linearno miješane uzorke, ali manja u odnosu na uzorke miješane orbitalno pri nižoj temperaturi. Iako je aktivnost bakterija octene kiseline veća pri višim temperaturama (u ovom slučaju $30\text{ }^{\circ}\text{C} > 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, odnosno sobne temperature) i može se posljedično očekivati veći prinos octene kiseline, povećanje temperature ima negativan utjecaj na topljivost kisika i može dovesti do smanjenja njegove koncentracija u kompleksnim hranjivim podlogama, poput voćnih vina. Nadalje, povećanjem temperature može također doći do jačeg isparavanja hlapljivih spojeva poput alkohola te same octene kiseline, što također može biti jedan od razloga zašto je u koncentracija octene kiseline dobivena u uzorku TOM manja nego u uzorku OM.

Dobivene vrijednosti koncentracija octene kiseline nakon završenog procesa proizvodnje usporedive su s koncentracijama koje su u svom istraživanju dobili Coelho i suradnici (2017) koji su proizvodili voćni ocat iz voćnih vina od naranče, manga, višnje i banane, čija je alkoholna jakost bila usporediva s voćnim vinom od sibirske borovnice korištenom u ovom istraživanju. Koncentracija octene kiseline u navedenom istraživanju također je određivana titracijski, s 0,1 M NaOH i 1%-tnim fenolftaleinom kao indikatorom. Koncentracije octene kiseline na kraju fermentacije u svim su uzorcima bile su između 40 i 50 g/L.

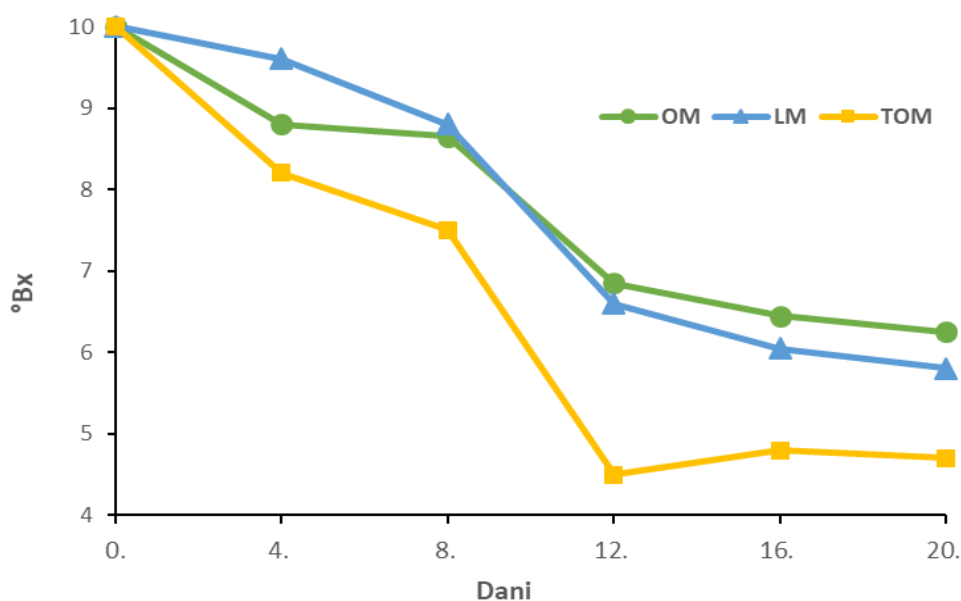
Nastajanje octene kiseline praćeno je promjenom pH uzoraka, a rezultati praćenja prikazani su na **Slici 17**.



Slika 17 Promjene pH vrijednosti uzoraka tijekom proizvodnje voćnog octa od sibirske borovnice

Iako se koncentracija octene kiseline kontinuirano povećava tijekom eksperimenta u svim uzorcima, promjene pH ne prate isti trend već variraju od 2,7 do 3,2, ali su uvijek manje od početnog pH koji je iznosio 3,5. Najveća promjena, odnosno smanjenje pH u svim uzorcima vidljivo je 8. dana fermentacije, vjerojatno zbog veće aktivnosti bakterija octene kiseline u odnosu na prve dane fermentacije. Nakon dvadeset dana fermentacije, pH vrijednost sva tri uzorka je bila približno jednaka, $\text{pH } 3,05 \pm 0,02$.

Osim nastajanja octene kiseline i promjene pH, proces proizvodnje voćnog octa može se indirektno pratiti i praćenjem potrošnje šećera. U tu svrhu u svim je uzorcima praćen udio suhe tvari u ovisnosti o vremenu, odnosno vrsti miješanja uzorka. Udio suhe tvari, odnosno šećera, određivan je refreaktometrijskom metodom (izraženo u stupnjevima Brix-a), a dobiveni rezultati prikazani su na **Slici 18**.



Slika 18 Promjene udjela suhe tvari (šećera) tijekom proizvodnje voćnog octa od sibirske borovnice

Iz rezultata je vidljivo kontinuirano smanjenje udjela suhe tvari od 4. do 20. dana vođenja procesa u svim uzorcima, neovisno o načinu miješanja i temperaturi. Nadalje, iz rezultata se je vidljivo kako veći utjecaj na smanjenje udjela suhe tvari ima temperatura vođenja procesa, nego vrsta miješanja. Tako je u uzorku dobivenom pri temperaturi fermentacije $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (TOM) vidljivo puno izraženije smanjenje udjela suhe tvari tijekom svih 20 dana trajanja procesa, odnosno veća potrošnja šećera, u odnosu na uzorke dobivene pri temperaturi fermentacije 25

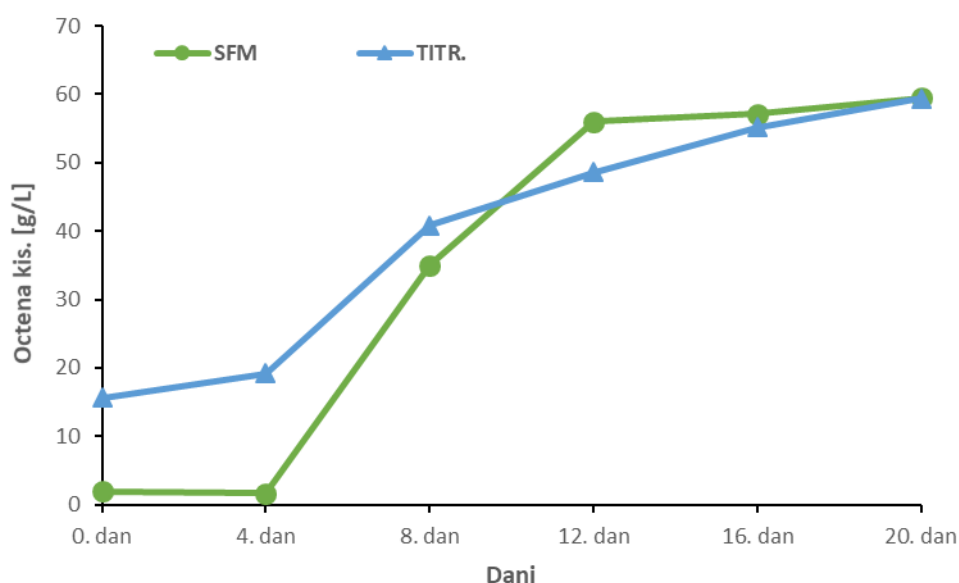
°C (OM i LM). U uzorcima OM i LM, iako miješanima na različite načine, vidljiv je vrlo sličan trend i razina smanjenja udjela suhe tvari, odnosno potrošnje šećera. Ovakvi rezultati mogli bi se objasniti činjenicom kako je metabolička aktivnost mikroorganizama, pa tako i bakterija octene kiseline, veća pri višim temperaturama, što se očituje kroz veću potrošnju šećera prisutnih u hranjivoj podlozi. Istovremeno, veća temperatura može predstavljati stres za octene bakterije te tako negativno utjecati na učinkovitost octene fermentacije, odnosno nastajanje octene kiseline (Ghosh i sur., 2012).

4.3. Kinetika nastajanja octene kiseline u poluindustrijskoj proizvodnji voćnog octa od sibirske borovnice i usporedba titrimetrijske i spektrofometrijske enzimске metode za određivanje koncentracije octene kiseline

Nakon provedenih eksperimenata u laboratorijskom mjerilu, provedeno je uvećanje mjerila procesa u poluindustrijskom mjerilu korištenjem acetatora volumena 30 L, pri čemu je kao inokulum korišteno 3 L octa dobivenog u eksperimentima provedenim u laboratorijskom mjerilu. Proces je vođen 20 dana uz konstantnu aeraciju i temperaturu procesa, koja je iznosila 30 °C. Kinetika nastajanja i koncentracija octene kiseline praćeni su tijekom eksperimenata u ukupnom trajanju od 20 dana, na način da su uzorci uzimani svaka 4 dana. Radi usporedbe i procjene prikladnosti, za određivanje koncentracije octene kiseline korištene su dvije metode: standardna titracijska metoda i spektrofotometrijska enzimska metoda. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost dva paralelna mjerenja i prikazani su na **Slici 19**.

Iz rezultata prikazanih na **Slici 19** vidljivo je kako i u poluindustrijskom mjerilu kinetika nastajanja octene kiseline slijedi isti trend kao i tijekom eksperimenata u laboratorijskom mjerilu. Vidljivo je kontinuirano povećanje koncentracije octene kiseline od početka do kraja procesa proizvodnje, pri čemu je također izraženiji porast koncentracije u odnosu na početnu koncentraciju vidljiv od 8. dana. Tijekom prvih dana fermentacije bakterije octene kiseline su vjerojatno još uvijek u fazi prilagodbe, pri čemu se dostupni supstrati i kisik u hranjivoj podlozi troše uglavnom na nastajanje biomase, a ne na sintezu proizvoda, odnosno octene kiseline. Nakon faze prilagodbe, odnosno nakon 8. dana procesa primjetan je već spomenuti izraženiji

porast koncentracije octene kiseline (40,80 g/L određeno titracijskom metodom, odnosno 35,04 g/L određeno spektrofotometrijskom enzimskom metodom) u odnosu na početnu vrijednost, što ukazuje na intenzivnu aktivnost octenih bakterija usmjerenu prema sintezi proizvoda. Na kraju procesa fermentacije, odnosno 20. dana mjerenja, koncentracije octene kiseline iznosila je 59,4 g/L određeno titracijskom metodom, odnosno 59,49 g/L određeno spektrofotometrijskom enzimskom metodom, što je ukazuje na veći prinos u poluindustrijskom mjerilu u odnosu na laboratorijsko mjerilo, odnosno na uspješno provedenu optimizaciju i uvećanje mjerila provedenog laboratorijskog eksperimenta. Dobiveni proizvod ispunjava minimalne zahtjeve Pravilnika o vinskom i voćnom octu Republike Hrvatske (NN 121/05) koji voćni ocat definira kao proizvod s minimalnom hlapljivom kiselošću od 50 g/L, izraženom kao octena kiselina.



Slika 19 Grafički prikaz usporedbe metoda mjerenja koncentracije octene kiseline

Uspoređujući dvije metode za određivanje koncentracije octene kiseline (**Slika 19**) vidljivo je kako je najveća razlika vrijednosti koncentracija bila prilikom određivanja početne vrijednosti koncentracije octene kiseline, ali i da titracijska metoda konzistentno pokazuje veće vrijednosti koncentracija octene kiseline. Spektrofotometrijska metoda pokazala je puno nižu početnu koncentraciju (1,90 g/L) u usporedbi s titracijskom metodom (15,60 g/L). Isto se može

primijetiti i u slučaju drugog uzorka uzetog 4. dana fermentacije, dok koncentracija octene kiseline još uvijek nije puno veća u odnosu na početnu koncentraciju. Za ostale uzorke, u kojima je koncentracija octene kiseline puno veća u odnosu na početnu koncentraciju, smanjuje se razlika vrijednosti koncentracija određenih pomoću ovih dviju metoda. Dobiveni rezultati mogli bi se objasniti razlikom u osjetljivosti metoda u slučaju malih koncentracija octene kiseline. 20. dana mjerenja, koncentracije octene kiseline određene korištenjem obje metode gotovo su iste (59,40 g/L određeno titracijskom metodom, odnosno 59,49 g/L određeno spektrofotometrijskom metodom), što ukazuje da su obje metode pouzdane za određivanje većih koncentracija octene kiseline.

Obje ispitane metode dale su validne rezultate i pokazale isti trend nastajanja octene kiseline tijekom eksperimenta u poluindustrijskom mjerilu, unatoč razlikama u određivanju početnih koncentracija (kada je koncentracija octene kiseline mala). Imajući u vidu činjenicu kako je spektrofotometrijska enzimska metoda specifičnija, a titracijska metoda konzistentno daje veće vrijednosti, bilo bi korisno provesti kalibraciju i standardizaciju ovih metoda s ciljem preciznije procjene ukupne kiselosti octa.

5. ZAKLJUČCI

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

- Tijekom proizvodnje voćnog octa od sibirske borovnice u laboratorijskom mjerilu vidljivo je kontinuirano povećanje koncentracije octene kiseline od 4. do 20. dana vođenja procesa neovisno o načinu miješanja i temperaturi.
- Veća koncentracija octene kiseline (45,9 g/L) dobivena je u uzorcima voćnog octa dobivenih primjenom orbitalnog miješanja (OM), pri sobnoj temperaturi, u odnosu na uzorke miješane linearno/recipročno (LM).
- U svim uzorcima vidljivo je kontinuirano smanjenje udjela suhe tvari tijekom cijelog eksperimenta. Veći utjecaj na smanjenje udjela suhe tvari, odnosno potrošnju šećera, imala je temperatura vođenja procesa, nego vrsta miješanja.
- Kinetika nastajanja octene kiseline u uzorcima dobivenima vođenjem procesa u poluindustrijskom mjerilu slijedi isti trend kao i tijekom eksperimenata u laboratorijskom mjerilu, odnosno dolazi do kontinuiranog povećanja koncentracije octene kiseline od početka do kraja procesa proizvodnje.
- Na kraju procesa proizvodnje u poluindustrijskom mjerilu (20. dan) dobivena je veća koncentracija octene kiseline (59,4 g/L) u odnosu na laboratorijsko mjerilo, što ukazuje na uspješno provedenu optimizaciju i uvećanje mjerila provedenog laboratorijskog eksperimenta.
- Usporedbom dvaju metoda za određivanje koncentracije octene kiseline vidljivo je da titracijska metoda konzistentno pokazuje veće vrijednosti, ali i da su obje metode pokazale isti trend nastajanja octene kiseline tijekom eksperimenta u poluindustrijskom mjerilu.

6. LITERATURA

-
- Bhat S, Rehana A, Tawheed A: An Overview on the Biological Production of Vinegar. *International Journal of Fermented Foods* 3:139–155, 2014.
- Bors B, Thomson J, Sawchuk E, Reimer P, Sawatzky R, Sander T: Haskap breeding and production - final report, ADF Grant 2008-0042, University of Saskatchewan, str. 1–142, 2012.
- Celli GB, Ghanem A, Brooks MSL: Haskap Berries (*Lonicera caerulea* L.)—a Critical Review of Antioxidant Capacity and Health-Related Studies for Potential Value-Added Products. *Food and Bioprocess Technology* 7:1541–1554, 2014.
- Coelho E, Genisheva Z, Oliveira JM, Teixeira JA, Domingues L: Vinegar Production from Fruit Concentrates: Effect on Volatile Composition and Antioxidant Activity. *Journal of Food Science and Technology* 54: 4112–4122, 2017.
- Hailu S, Shimelis A, Yogesh KJ: Vinegar Production Technology – An Overview. *Beverage and Food World*, 29–32, 2012.
- Garrido-Vidal D, Pizarro C, González-Sáiz JM: Study of Process Variables in Industrial Acetic Fermentation by a Continuous Pilot Fermentor and Response Surfaces. *Biotechnology Progress* 19:1468–1479, 2003.
- Ghosh S, Chakraborty R, Chatterjee G, Raychaudhuri U: Study on fermentation conditions of palm juice vinegar by response surface methodology and development of a kinetic model. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 29: 461–472, 2012.
- Gomes RJ, Borges MF, Rosa MF, Castro-Gómez RJH, Spinosa WA. Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. *Food Technology and Biotechnology* 56:139–151, 2018.
- Ho CW, Lazim AM, Fazry S, Zaki UKHH, Lim SJ: Varieties, Production, Composition and Health Benefits of Vinegars: A Review. *Food Chemistry* 221:1621–1630, 2017.
- Horvat P: *Biotehnološka proizvodnja octa*. Sveučilišni udžbenik. Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, 2010.
-

- Lovrenčić Š, Šimunović V: Haskap ili modra kozokrvna - sibirski borovnica, Zagreb, 2014.
https://www.savjetodavna.hr/wp-content/uploads/publikacije/haskap_1310.pdf.
(pristupano: 22. 4. 2024.)
- Luzón-Quintana LM, Castro R, Durán-Guerrero E. Biotechnological Processes in Fruit Vinegar Production. *Foods* 10:945. 2021.
- MP, Ministarstvo poljoprivrede: Pravilnik o vinarstvu. Narodne novine 81/22, 2022.
- Rezo A: Proizvodnja octa tradicionalnom metodom. Završni rad. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, 2023.
- Singh AK: Overview of vinegar production. *PalArch's Journal of Archaeology of Egypt/Egyptology* 17: 4027–4037, 2020.
- Thompson M: Introducing Haskap, Japanese blue honeysuckle. *Journal of the American Pomological Society* 60:164–168, 2006.
- Velić D: Proizvodnja jabučnog octa. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, radni materijali, 2010.
- Vidra A, Németh A: Bio-Produced Acetic Acid: A Review. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* 62:245–256, 2018.
- Zamora F: Biochemistry of Alcoholic Fermentation. U: *Wine Chemistry and Biochemistry*, ur. Moreno-Arribas MV, Polo MC, Springer, New York, 3–26, 2009.