Optimizacija procesa proizvodnje i karakterizacija voćnog vina od kruške

Husnjak, Bruno

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:109:063256

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Bruno Husnjak

OPTIMIZACIJA PROCESA PROIZVODNJE I KARAKTERIZACIJA VOĆNOG VINA OD KRUŠKE

DIPLOMSKI RAD

Osijek, 2019.

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 VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 30. svibnja 2019. godine
Mentor: *prof. dr. sc Darko Velić*
Komentor: *doc. dr. sc. Valentina Bušić*

Optimizacija procesa proizvodnje i karakterizacija voćnog vina od kruške

Bruno Husnjak, 0149212916

Sažetak:
Cilj rada bio je istražiti utjecaj različitih vinskih kvasaca, sa i bez dodatka pektolitičkog enzima, na kinetiku fermentacije, fizikalno-kemijska svojstva, boju te udio ukupnih polifenola u soku/vinu od kruške iz ekološkog uzgoja. Istraživanje je provedeno u malom i poluindustijskom mjerilu. Tijekom alkoholne fermentacije (AF) u malom mjerilu praćena je kinetika fermentacije za dva komercijalno dostupna enološka kvasca (Uvaferm BDX i Cross Evolution), sa i bez dodatka komercijalnog pektolitičkog enzima (Lallzym OE). U sustavu za fermentaciju vina u poluindustrijskom mjerilu provedena je kontrolirana fermentacija (KF) soka od kruške te je provedena i kontrolirana jabučno-mliječna fermentacija (JMF). Za jabučno-mliječnu fermentaciju vina od kruške primijenila se (komercijalno dostupna) čista kultura bakterije mliječne kiseline (BMK) *Oenococcus oeni* uz uspostavljenje temperaturnog optimuma. Rezultati istraživanja pokazali su kako odabrani kvasci Uvaferm BDX i Cross Evolution uspješno provode fermentaciju soka od kruške. Primjenom kvasca Uvaferm BDX-a postignuta je veća specifična brzina fermentacije. U uzorcima s dodatkom pektolitičkog enzima Lallzym OE zabilježena je veća specifična brzina fermentacije te veći udio ukupnih polifenola u odnosu na ostale uzorke voćnog vina od kruške. Potaknutom jabučno-mliječnom fermentacijom smanjila se koncentracija jabučne kiseline što je rezultiralo poboljšanim senzornim svojstvima tako proizvedenog voćnog vina od kruške.

Ključne riječi: Voćno vino od kruške, kontrolirana fermentacija, jabučno-mliječna fermentacija, ukupni polifenoli

Rad sadrži: 47 stranica
17 slika
5 tablice
28 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.	doc. dr. sc. Valentina Bušić	član-komentor
4.	izv. prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač	zamjena člana

Datum obrane: 22. listopada 2019. godine

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. 7 held on May 30, 2019.
Mentor: *Darko Velić*, PhD, *full prof.*
Co-mentor: *Valentina Bušić, PhD*

Optimisation of Fermentation Processand Characterisation of Pear Fruit Wine

Bruno Husnjak, 0149212916

Summary:
This study aimed to investigate the influence of different wine yeasts, with and without the addition of pectolytic enzyme, on the fermentation kinetics, physicochemical properties, colour and the total polyphenols content in organic pear juice/wine. The study was conducted on a small and semi-industrial scale. During alcoholic fermentation (AF), the fermentation kinetics for two commercially available oenological yeasts (Uvaferm BDX and Cross Evolution) was monitored on a small scale, with and without the addition of an industrial pectolytic enzyme (Lallzym OE). The controlled fermentation (CF), as well as induced malolactic fermentation (MLF), of pear juice was carried out in the semi-industrial scale fermentation system. The pure culture of lactic acid bacteria (LAB) *Oenococcus oeni* was used for pear wine fermentation with the establishment of temperature optimum for selected LAB type. The results of the study showed that selected yeasts Uvaferm BDX and Cross Evolution could successfully ferment pear juice. The higher specific fermentation rate was achieved by using the yeast Uvaferm BDX. In samples with the addition of the pectolytic enzyme Lallzym OE, a higher specific fermentation rate, as well as a higher total polyphenols content, were observed compared to other pear wine samples. The stimulated malolactic fermentation led to the decrease of malic acid concentration which resulted in improved sensory properties of pear wine.

Key words: Fruit wine, pear wine, controlled fermentation, malolactic fermentation, total polyphenols

Thesis contains: 47 pages
17 figures
5 tables
28 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. Natalija Velić, PhD, associate prof. — chair person
2. Darko Velić, PhD, full prof. — supervisor
3. Valentina Bušić, PhD — member
4. Dajana Gašo-Sokač, PhD, associate prof. — stand-in

Defense date: October 22, 2019.

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

Zahvaljujem se svom mentoru prof. dr. sc. Darku Veliću na strpljenju, pomoći i savjetima tijekom izrade diplomskog rada te komentorici doc. dr. sc. Valentini Bušić koja je svojim savjetima i znanjem pomogli tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Hvala svim mojim prijateljima i kolegama s fakulteta koji su studiranje učinili zabavnijim i jednostavnijim.

Na kraju najveće hvala mojoj obitelji koja je uvijek bila najveća podrška tijekom studiranja.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. Kruška 4

2.1.1. Voćno vino i perry 5

2.2. Starter kulture 6

2.3. Proizvodnja voćnog vina od kruške 7

2.3.1. Priprema kruške za preradu 8

2.3.2. Usitnjavanje i prešanje krušaka 8

2.3.3. Priprema mošta 8

2.3.4. Alkoholna fermentacija 9

2.3.5. Jabučno-mliječna fermentacija 9

2.3.6. Pretok vina s taloga i bistrenje 11

2.3.7. Odležavanje voćnih vina 11

2.4. Upotreba pektolitičkih enzima u proizvodnji voćnih vina 11

2.5. Kemijski sastav voćnog vina 11

2.5.1. Alkoholi 12

2.5.2. Šećeri 12

2.5.3. Organske kiseline 12

2.5.4. Hlapljivi (aromatski) spojevi 13

2.5.5. Polifenolni spojevi 13

2.7. Šaržni fermentor 16

3. EKSPERIMENTALNI DIO 17

3.1. ZADATAK 18

3.2. MATERIJALI 18

3.3. OPREMA 18

3.3.1. Sustav za fermentaciju 19

3.4. METODE 22

3.4.1. Proces proizvodnje vina od kruške u malom i poluindustrijskom mjerilu 22

3.4.2. Praćenje fermentacijske aktivnosti kvasca - određivanje mase CO_2 oslobođenog tijekom mikrofermentacija 25

3.4.3. Određivanje refraktometrijske vrijednosti 27

3.4.4. Određivanje pojedinih kemijskih spojeva u sastavu vina pomoću Reflectoquant® sustava 28
3.4.5. Određivanje jabučne i mliječne kiseline 29
3.4.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti 29
3.4.7. Folin-Ciocalteau metoda za određivanje ukupnih polifenolih spojeva u vinu 30
4. REZULTATI I RASPRAVA 33
4.1. Utjecaj dodatka kvasaca Uvaferm BDX i Cross Evolution na kinetiku fermentacije 34
4.2. Udio ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost vina od kruške 37
4.3. Utjecaj jabučno-mliječne fermentacije na promjenu boje te udio jabučne kiseline u voćnom vinu od kruške 38
4.4. Fizikalno-kemijski pokazatelji kakvoće voćnog vina od kruške 41
5. ZAKLJUČCI 42
6. LITERATURA 44

1. UVOD

Proizvodnja vina od grožđa je jedan od prvih poznatih fermentacijskih procesa za dobivanje alkoholnih pića, a danas je takva tehnologija dobro poznata i standardizirana. Osim grožđa, različite vrste voća, u velikom broju istraživanja, pokazale su se kao dobre sirovine za dobivanje kvalitetnih voćnih vina (Tsegay, 2018.). Voćno vino je prehrambeni proizvod dobiven fermentacijom soka ili masulja od svježeg i za to pogodnog koštičavog, jezgričavog, jagodičastog, bobičastog ili ostalog voća i ima minimalni sadržaj prirodnog alkohola 1,2 % vol. (NN 73/06).

Voćna vina predstavljaju odličan izvor fenolnih i mineralnih tvari. Također, u voćnim vinima mogu biti prisutni i vitamini A, C, D i K, ali u malim količinama (Kosseva i sur, 2017.). Trendovi u prehrambenoj industriji i nutricionističke preporuke idu u smjeru razvoja novih funkcionalnih proizvoda na bazi voća, koji su korisni za ljudsko zdravlje tako što doprinose smanjenju degenerativnih procesa uzrokovanih oksidacijskim stresom (Amiždić Klarić i sur., 2016.).

Proizvodnja voćnog vina ovisi o geološkom položaju s obzirom na to koje je voće dostupno za proizvodnju vina. Na području Hrvatske se najčešće upotrebljavaju kupine, maline, borovnice, trešnje i jabuke za proizvodnju voćnog vina, a najzastupljenije je vino od kupine (Amiždić Klarić i sur., 2016.). Sam proces proizvodnje voćnog vina jako je sličan procesu proizvodnje vina od grožđa uz moguće dodatne operacije s obzirom na zahtjeve voća te regulaciju količine ukupnih šećera i ukupnu kiselost (Velić i sur., 2018a). Proizvodnja voćnog vina sastoji se od nekoliko osnovnih operacija: muljanja ploda, maceracije (predfermentacije), fermentacije te zrenja i odležavanja. 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. Tijekom proizvodnje voćnih vina često se koriste selekcionirani vinski kvasci i enzimski pripravci. Enzimi se dodaju jer pozitivno utječu na iskorištenje sirovine, ekstrakciju tvari boje i arome iz ploda te na stabilnost i okus voćnih vina. Najčešće korišteni enološki enzimi u su pektinaze (Bautista i sur., 2005.).

Cilj rada bio je istražiti utjecaj različitih vinskih kvasaca, sa i bez dodatka pektolitičkog enzima, na kinetiku fermentacije, fizikalno-kemijska svojstva, boju te udio ukupnih polifenola u soku/vinu od kruške iz ekološkog uzgoja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kruška

Kruška (*Pyrus Communis*) je tipični predstavnik voća umjerenog temperaturnog područja, a uglavnom se uzgaja diljem sjeverne zemljine hemisfere. Plod kruške je dobro prihvaćen od strane potrošača zbog dobrog okusa i niske kalorijske vrijednosti. Kruške pripadaju porodici (*Rosaceae*) zajedno sa jabukama; rod *Pyrus* sastoji se od oko 22 vrste koje obitavaju u Aziji, Europi i Sjevernoj Americi. Dvije vrste su najčešće uzgajane u komercijalne svrhe europski kultivar *Pyrus communis* i azijski kultivar *Pyrus Pyrifolia* te u globalnoj preradi i proizvodnji prevladava europski kultivar (Clifford i Tokuşoğlu, 2011.).



Slika 1. Kruške vrste *Abbé Fetel*

Abbé Fetel je kultivar europske vrste kruške *Pyrus Communis* kojeg je križanjem nekoliko različitih lokalnih kultivara u istočnoj Francuskoj dobio svećenik Fetel (Carrière, 1886.). Plod kruške *Abbé Fetel* je srednje velik do velik, specifičnog izduženog kruškolikog i asimetričnog oblika, povijenog u stranu i od svih krušaka su najduži. Kožica ploda je srednje tanka i čvrsta, svjetlo zelene boje u vrijeme berbe, a površina ploda je sjajna i glatka na površini gdje nema rđe, a gdje je ima je tek primjetno hrapava. Osnovna je boja na vrhu vrata i udubini čaške

uvijek prekrivena slivenom rđom, a na ostalim dijelovima može se naći u obliku mrežastih šara nježne rđe ili prskanih rđastih točkica. Meso ploda kruške Abbé Fetel je žućkasto bijele boje, srednje fine teksture sa malo sitnih sklerenhimskih zrnaca u mesu i nešto malo krupnijim u uskom pojasu oko sjemenjače. Meso je sočno, polu topivo, slatkasto i pomalo neskladnog okusa zbog manjka kiselina sa srednje izraženom aromom i blagim mirisom. Okus ove sorte jako varira i ovisi o stanišnim uvjetima i pravovremenoj berbi (Rendić, 2014.).

Svježi plodovi kruške u sebi prosječno sadrže oko 20 % suhe tvari, 9-15 % ukupnih šećera, 0,30-0,60 % organskih kiselina, 0,80-1,50 % celuloze, znatne količine tanina, pektina, mineralnih tvari, vitamina i drugih biološki vrijednih tvari (Kulina i sur., 2017.). Fruktoza, glukoza i saharoza su najzastupljeniji šećeri u plodu kruške te njihov udio u svježem soku kruške iznosi oko 7 % fruktoze, 2-2,5 % glukoze i 1 % saharoze. U kruškinom soku prisutan je i sorbitol koji može prijeći u vino od kruške budući da ga kvasci ne metaboliziraju tijekom fermentacije (Kosseva i sur., 2017.). Glavni polifenolni spojevi u kruški su fenolna kiselina (hidroksicimetna kiselina), arbutin (4-hidroksifenil-*β*-D-glukopiranozin), katehin i flavonoli (Clifford i Tokuşoğlu, 2011.).

2.1.1. Voćno vino i perry

Voćna vina su prehrambeni proizvodi koji se dobivaju fermentacijom mošta dobivenog prešanjem različitih vrsta voća kao što su jabuke, kruške, višnje, trešnje, aronija itd. Postupak proizvodnje ovakvih vrsta vina vrlo je sličan proizvodnji vina od grožđa, ali postoje određene prilagodbe procesa s obzirom na zahtjeve samoga voća. Samljevene kruške ili jabuke se moraju prvo prešati kako bi se dobio mošt koji zatim ide na fermentaciju (Jeremić i sur, 2008.). Vino od kruške je voćno vino dobiveno alkoholnom fermentacijom soka ili masulja dobivenog od svježih i za to pogodnih kruška. Kako bi se dobilo voćno vino zadovoljavajuće kvalitete koriste se sorte koje sadrže više tanina kao što je *Bartlett* kruška (Kosseva i sur., 2017.). Vino od kruške ima manju kiselost i niži sadržaj polifenola u odnosu na ostala voćna vina. Manja kiselost kvari okus, ali je niži sadržaj polifenola poželjan jer je gorčina manja. Ako je pak količina polifenola preniska, gubi se specifičnost okusa po voću. Stoga je potrebno postići odgovarajuću ravnotežu između ovih spojeva pa se vino od kruške često miješa s jabučnima ili vinima spravljenim od tangerine (Jeremić i sur., 2008.). Usporedno s drugim voćnim vinima ustanovljeno je manje antioksidativno djelovanje voćnog vina od kruške nego voćnih vina od bobičastog voća zbog nižeg udjela polifenolnih spojeva (Velić i sur., 2018a.). Perry je piće slično

cideru ali se umjesto jabuka kao sirovina koriste tkz. snježne kruške. Tradicionalni proces proizvodnje perrya sličan je procesu proizvodnje cidera u kojem se odabirano voće tj. kruške drobe i prešanjem se ekstrahira sok koji fermentira uz pomoć divljih kvasaca prisutnih na kožici voća. Ukoliko se želi postići veći volumni udio alkohola sok se može dodatno dosladiti, a za doslađivanje se koristi šećer. Proizvodnja perrya je zastupljena u Sjedinjenim Američkim Državama, Švedskoj, Japanu, Australiji i Novom Zelandu (Kosseva i sur., 2017.). Razlika između vina od kruške i perrya je što perry nakon proizvodnje sadrži CO_2 te se tijekom proizvodnje perrya ne dodaju selekcionirani kvasci.

Prema pravilniku o voćnim vinima (NN 73/06, 24/11, 28/11, 55/11) voćno vino koje se stavlja u promet mora udovoljavati ovim temeljnim zahtjevima:

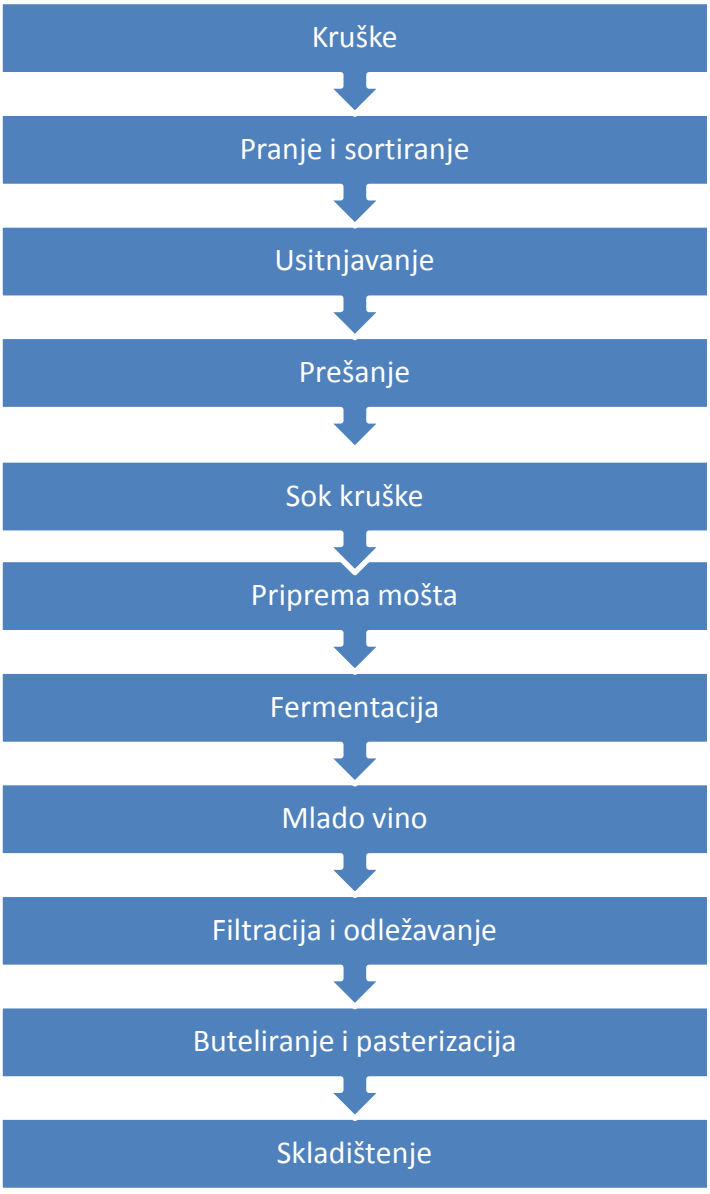
- da ima odgovarajuća organoleptička svojstva, da je bistro i čisto bez stranog mirisa i okusa;
- sadržaj stvarnog alkohola od 1,2 % vol. do 13 % vol., a kod desertnog voćnog vina i aromatiziranog voćnog vina više od 13 % vol.;
- ukupne kiseline najmanje 3,5 g/L izražene kao jabučna kiselina;
- hlapive kiseline najviše do 1,5 g/L izražene kao octena kiselina;
- ekstrakta bez šećera najmanje 15 g/L;
- ukupnog sumpor dioksida do 200 mg/L;
- slobodnog sumpor dioksida najviše 30 mg/L;
- pepela najmanje 1 g/L.

2.2. Starter kulture

Jedno od najznačajnijih otkrića u procesu proizvodnje vina je kontrolirana fermentacija upotrebom selekcioniranih kultura kvasaca koje se još zovu starter-kulture. Čiste starter kulture dostupne su u dva oblika kao tekući kvasac ili kao aktivni suhi kvasac. Prevladava proizvodnja suho aktivnog kvasca, a u obliku tekućeg kvasaca pripremaju se samo kvasci koji nisu pogodni za sušenje (Mesihović, 2011.). Čiste kulture kvasaca koje se koriste za proizvodnju vina su klonovi sojeva *Saccharomyces cerevisiae i Saccharomyces bayanus* (Fugelsang i Edwards, 2007.), a značajka ovih kvasaca je da dobro podnose uvjete tijekom fermentacije i proizvode dovoljnu količinu alkohola. Aktivni suhi kvasac je na tržištu dostupan

u obliku granula, gdje se prikladni soj proizvodi u aerobnim uvjetima i zatim suši. Vinski kvasci pripremljen na ovakav način ne moraju se ponovno umnožavati nego se dodaju direktno u masulj ili mošt. Pri standardnim uvjetima gdje mošt nije mikrobiološki kontaminiran i temperatura fermentacije nije preniska dodaje se oko 3 g/L aktivnog suhog kvasca u mošt (Mesihović, 2011.). Tijekom alkoholne fermentacije u samom mediju se postepeno povećava koncentracija etanola, temperatura, pH vrijednost i tlak tako da se danas gleda i otpornost kvasca prema ovakvim nepovoljnim uvjetima, a ne samo količina nastalog alkohola (etanola).

2.3. Proizvodnja voćnog vina od kruške



Slika 2. Proces proizvodnje voćnog vina od kruške

2.3.1. Priprema kruške za preradu

Prije postupaka usitnjavanja izdvajaju se trule kruške, a ostale kruške se peru vodom. Poželjno je odstraniti oštećene i natučene dijelove ploda. Pranje plodova važan je postupak jer se njime uklanja dio mikroflore koja je prirodno prisutna na plodu i može uzrokovati probleme tijekom procesa fermentacije te negativno utjecati na kvalitetu i kakvoću kruškinog vina (Jeremić i sur., 2008.).

2.3.2. Usitnjavanje i prešanje krušaka

Usitnjavanje ploda kruške direktno utječe na količinu tj. randman mošta. Usitnjavanje plodova može se provesti na više načina, starije metode uključuju gnječenje uz pomoć klipa, a danas se rabe specijalizirani mlinovi za voće i mehanički strojevi za drobljenje tvrdog voća poput krušaka i jabuka (Jackson, 2017.). Tijekom procesa usitnjavanja ploda provodi se sulfitiranje radi sprječavanja procesa posmeđivanja voćne pulpe. Kako bi se iz pulpe dobio sok koriste se različite vrste preša. Tradicionalnim prešama se postiže niže iskorištenje u odnosu na suvremene preše ali se dobiva sok bolje kvalitete. Tijekom prešanja važno je što više smanjiti kontakt pulpe s kisikom kako ne bi došlo do posmeđivanja soka uzrokovano enzimom polifenoloksidazom (Jeremić i sur., 2008.). Moguće je dodavanje pektolitičkih enzima pektinaza, celulaza i hemicelulaza kako bi se postigla bolja razgradnja staničnih stjenka i na taj način povećala ekstrakcija soka (Velić i sur., 2018b.).

2.3.3. Priprema mošta

Prije same fermentacije sok od kruške se tretira na nekoliko načina s ciljem proizvodnje vina od kruške željenih svojstava. Poboljšanje kakvoće mošta obuhvaća korekciju udjela pojedinačnih organskih kiselina, šećera i hranjiva za same kvasce tijekom fermentacije na taj način se osiguravaju optimalni uvjeti za proces fermentacije što osigurava kvalitetu konačnog proizvoda (Jeremić i sur., 2008.). Tipični sastav soka od kruške poslije prešanja sadrži 14 °Bx i 0,25 % ukupne kiselosti dok optimalni sastav mošta treba imati oko 21 °Bx i 0,5 % limunske kiseline s 100 ppm SO_2 (Kosseva i sur., 2017.). Kako bi se postigao optimalan udio šećera za fermentaciju moguće je dodavanje saharoze tj. konzumnog šećera u sok. Tijekom faze doslađivanja moguće je još dodavanje različitih hranjiva za kvasce, različitih enzimskih pripravaka koji će svojim utjecajem povoljno utjecati na proces fermentacije.

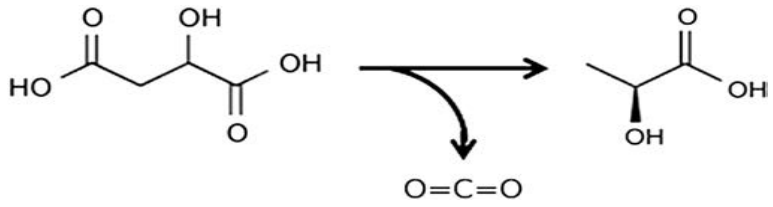
2.3.4. Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija (AF) je biološki proces u kojem se kvasci nalaze u kontaktu s tekućinom u kojoj je otopljen šećer te razmnožavanjem i metabolizmom kvasca kao krajnji produkti nastaju alkoholi i CO_2. Sam proces je moguće podijeliti na dvije faze: aerobnu i anaerobnu fazu. Tijekom aerobne faze stanicama kvasca je dostupan kisik te dolazi do razmnožavanja kvasca nakon što je nastao dovoljan broj kvaščevih stanica sprječava se dovod kisika i započinje anaerobna faza u kojoj svojim metabolizmom kvasac razgrađuje šećere pri čemu dolazi do intenzivnog pjenjenja i oslobađanja CO_2 (E. Coton i M. Coton, 2016.). Daljnja brzina fermentacije ovisi o odabiru soja kvasca, temperaturi, prisustvu kisika, pH vrijednosti, razini dušika i ostalih nutrijenata koji su potrebni stanicama kvasca za rast (E. Coton i M. Coton, 2016.). Sam proces AF traje dok se ne metabolizira cjelokupan šećer ili je količina nastalog alkohola u otopini dovoljno velika da inhibira aktivnost kvasca (Saranraj, 2017.). Kako bi se dobio kvalitetan proizvod navedene parametre potrebno je nazirati i držati pod kontrolom. Kvasci su prirodno prisutni na kožici voća te određeni sojevi mogu spontano provoditi fermentaciju. Vina nastala na ovaj način imaju kompleksniji okus i aromu, ali znatno variraju u svojoj kakvoći. Primjenom selekcioniranih vinskih kvasaca dobivaju se vina standardne kakvoće te je upotreba selekcioniranih vinskih kvasaca preduvjet za dobivanje kvalitetnih vina. Glavni produkti AF su etanol te pojedini viši alkoholi (izoamilni, butan-1-ol, propan-1-ol, izobutanol) i esteri (etil-butanoat, 2-feniletil-acetat, etil-heksanoat) (Jeremić i sur., 2008.). Tijekom procesa fermentacije dolazi do formiranja sekundarnog aromatskog profila tj. fermentacijske arome vina kojoj pridonose viši alkoholi i hlapljivi esteri koji daju cvjetne fermentacijske arome vina. AF se provodi u različitim tipovima tankova načinjenim od različitih materijala koji su otporni na koroziju, a najčešće od nehrđajućeg čelika ili drveta.

2.3.5. Jabučno-mliječna fermentacija

Tijekom fermentacije, osim pretvorbe šećera u etilni alkohol odvija se i pretvorba jabučne kiseline u mliječnu kiselinu uz nastanak CO_2. Ovaj proces se zove jabučno-mliječna fermentacija (JMF), a započinje pred kraj ili nakon AF. Obavljaju ga specifične bakterije koje se zovu malolaktične bakterije ili bakterije mliječne kiseline (BMK), među kojima su najznačajnija vrsta *Oenococcus oeni* ali mogu se koristiti i *Lactobacillus brevis, L. Plantarum* (Sun i sur., 2017.). JMF je poželjna u proizvodnji vina iz hladnijih vinogradarskih regija u kojima grožđe

ima visoku razinu jabučne kiseline ili kako bi se formirao određeni organoleptički profil vina kao što je slučaj s Chardonnay i Burgundiskim bijelim vinima i bordoškim crvenim vinom. U nekim vinima JMF uzrokuje kvarenje koje dovodi do bakterijskog kvarenja vina povišenjem pH vrijednosti iznad 3,5 (Leon i Dicks, 2004.). Također, kod voćnih vina se provedbom JMF potiče razvijanje voćne arome. Jackson, 2017. navodi da provedbom JMF kod jabučnog cidera se pojačava okus na jabuku i smanjuje se okus kiselosti, oporosti i okusa po kvascu. Isti autor navodi da je do poboljšanja okusa došlo i kod vina od manga provedbom JMF. Mliječna kiselina ima mekši okus od jabučne kiseline i može potaknuti stvaranje pića koje ima poželjniji aromatski profil uz istovremeno smanjenje kiselosti koja daje neugodan okus vinu ali tijekom procesa može doći do smanjenja obojenja kod nekih vrsta voćnih vina od bobičastog voća što je nepoželjno (Velić i sur., 2018b.; Sun, 2017.). BMK su tolerantne na prisustvo SO_2 i niski pH ali su im potrebni vitamini B skupine, organski dušik i aminokiseline od kojih je većina dostupna autolizom kvasca, a ukoliko nastane nedostatka ijednog od ovih nutrijenata dolazi do inhibicije rast (Velić i sur., 2018.).



Slika 3. Razgradnja jabučne u mliječnu kiselinu uz nastanak CO_2

JMF može biti spontano potaknuta od bakterije *O. oeni* prirodno prisutnih u moštu ali je tada teško kontrolirati kakvoću dobivenog vina ili dodatkom starter kultura BMK koje daju vina bolje i ujednačenije kakvoće (Jeremić, 2008.). JMF utječe na tri različita aspekta kvalitete vina: kiselost, mikrobnu stabilnost i aromatski profil vina. Enološki parametri koji utječu na provedbu JMF su udio alkohola, temperatura, pH vrijednost vina i koncentracija SO_2 te kombinacijom i kontrolom ovih parametara je moguće utjecati na sami tijek JMF (Velić i sur., 2018b.; Fotez,2017.). Osim ovih faktora sama JMF ovisi o odabiru starter kulture i razvoju starter kulture unutar samog medija (Dicks, 2004.). Optimalna temperatura za provedbu JMF je od 20 do 25°C, a u praksi se preporučuje temperatura od 22°C jer je tada pretvorba jabučne u mliječnu kiselinu najveća (Jeremić i sur., 2008.).

2.3.6. Pretok vina s taloga i bistrenje

Po završetku fermentacije te nakon odležavanja vina tijekom nekoliko dana slijedi prvi pretok mladog vina i odstranjivanja taloga koji sadrži autolizirane stanice kvasca, aminokiseline i enzime (ukoliko su dodani). Postupak bistrenja može se provesti na nekoliko načina od prirodnog putem sedimentacije te primjenom centrifugiranja ili dodatkom nekoga sredstva za bistrenje (želatina, bentonit) (Kosseva, 2017.).

2.3.7. Odležavanje voćnih vina

Mlado vino po završetku AF nije pogodno za piće jer je neharmonično, grubo i s naglašenim mirisom po kvascu. Potrebno je određeno vrijeme odležavanja vina kako bi ono postiglo konačnu kakvoću. Odležavanje se odvija u dvije faze, prva faza se odnosi na promjene nakon AF do punjenja tijekom ove faze odvija se ranije opisana JMF te druga faza koja započinje punjenjem u boce i uklanjanjem kisika. Tijekom druge faze voćno vino dobiva svoj specifični blaži i voćni okus (Velić i sur. 2018.).

2.4. Upotreba pektolitičkih enzima u proizvodnji voćnih vina

Kruška kao sirovina sadrži veliku količinu pektina koji tijekom usitnjavanja završava u voćnoj pulpi te smanjuje iskorištenje tijekom prešanja. Dodatkom pektolitičkih enzimskih pripravaka dolazi do razgradnje pektina i narušavanja strukture stanične stjenke što omogućava lakšu ekstrakciju i prešanje. Također ovi pripravci pogoduju ekstrakciji tvari koje utječu na boju i aromu, a nalaze se u kožici ili pulpi (Batistuta i sur., 2005.). Komercijalni enzimski pripravci uglavnom su višekomponentni te sadrže pektinaze (uglavnom poligalakturaze, pektinesteraze i pektin liaze) kao i male količine celulaza i hemicelulaza koje sudjeluju u razgradnji staničnih stijenki (Velić i sur., 2018).

2.5. Kemijski sastav voćnog vina

U kemijskom sastavu voćnog vina kruške dominiraju voda i etanol, no prisutne su i druge tvari koje potječu od same sirovine kao što su organske i hlapljive kiseline ili su nusproizvodi procesa fermentacije aldehidi, ketoni, viši alkoholi itd.

2.5.1. Alkoholi

Etanol je glavni predstavnik alkohola u voćnim vinima te njegova količina je u ovisnosti o količini šećera, temperaturi fermentacije i soju kvasca; određeni sojevi kvasca mogu tolerirati čak alkoholnu jakost do 14 % volumnog udjela. Sama uloga etanola u vinu je višestruka; etanol djeluje kao otapalo za ekstrakciju voćnih sastojaka, služi kao reaktant u stvaranju važnih hlapljivih spojeva (etilnih estera) te djeluje na stabilnost i održivost vina tijekom starenja. Osim etanola u voćnim vinima prisutni su i neki od predstavnika viših alkohola kao što su *n*-propanol, izobutilni alkohol (2-metilpropan-1-ol), 2-metil butanol i izoamilni alkohol. Oni su sekundarni proizvodi nastali metabolizom kvasca. Tijekom AF osim etanola nastaju još poželjni glicerol i nepoželjni metanol u manjim količinama. Glicerol je bezbojan, nehlapljivi spoj bez aromatičnih svojstava ali značajno pridonosi osjećaju slatkoće, punoće i zaokruženosti okusa što ga čini poželjnim. Također, glicerol može biti razgrađen tijekom JMF što u konačnici može utjecati na senzorska svojstva samoga vina. Metanol je toksičan za ljude pa bi njegova razina u voćnim vinima trebala biti ispod 250 mg/L (Velić i sur., 2018a.).

2.5.2. Šećeri

Fruktoza, glukoza i u nekim plodovima saharoza su glavni šećeri prisutni u voću te se tijekom AF prevode u već navedene glavne metabolite: etanol, glicerol i CO_2. Većina voća sadrži manje šećera nego grožđe, zbog čega je neprikladno za proizvodnju vina ako se ne provede doslađivanje konzumnim šećerom. Šećeri koji ostanu nefermentirani nazivaju se rezidentni (reducirajući) šećeri te njihova količina može biti vrlo različita. Zabilježen je veliki raspon od 13,5 do 177,6 g/L koncentracije reducirajućih šećera tijekom ispitivanja kupinovog vina u radu Amidžić Klarić i suradnika iz 2017. godine. Autori u navedenom radu smatraju da je uzrok, tako velikog raspona koncentracija reducirajućih šećera, leži u čestom dodavanju saharoze tj. konzumnog šećera tijekom različitih faza procesa proizvodnje kupinovog vina.

2.5.3. Organske kiseline

Na organoleptička svojstva mošta i voćnih vina snažno utječu organske kiseline. U većini voćnih vina najzastupljenija je jabučna kiselina, a slijedi ju limunska kiselina. Od hlapljivih kiselina najzastupljenija je octena kiselina koja se koristi kao parametar kvalitete vina. Ona je

sekundarni metabolit dobiven iz piruvata tijekom AF. Povišena koncentracija octene kiseline može upućivati na infekciju i aktivnost bakterija octene kiseline (Velić i sur., 2018a).

2.5.4. Hlapljivi (aromatski) spojevi

Poznavanje kompozicije hlapljivih tvari vina je bitno jer one određuju samu kvalitetu arome voćnog vina. Aroma voćnih vina uglavnom je određena hlapljivim tvarima koje su prisutne u samom voću ali mogu nastati i tijekom AF, JMF i tijekom punjenja i odležavanja. Esteri, acetati, viši alkoholi, organske kiseline su tvari koje najviše doprinose okus i aromi voća. Osim ovih spojeva postoje još mnogi mali spojevi poput aldehida, ketona, laktona, terpena i fenola koji mogu biti hlapljivi ili nehlapljivi, a utječu na aromu voćnih vina (Velić i sur., 2018a).

2.5.5. Polifenolni spojevi

Polifenoli predstavljaju veliku grupu spojeva koji su sekundarni produkti biljnog metabolizma te su esencijalni za rast i razvoj biljke. Njihova funkcija je vrlo različita od formiranja spojeva koji služe u borbi protiv patogena preko pigmentacije do antioksidativne zaštite biljke. Mnogi spojevi ove skupine pokazuju antibakterijsko, antifungalno, antivirusno, antikancerogeno i imunoprotektivno djelovanje što pridonosi njihovoj terapeutskoj vrijednosti. Dokazan je učinak ovih spojeva u liječenju kardiovaskularnih tegoba, asme, alergija, dijabetesa i hipertenzije zbog antioksidativne aktivnosti polifenolnih spojeva (Kosseva i sur., 2017.). Polifenolni spojevi kao što su antocijanini, flavonoli, katehini, tanini i flavonoidi značajno utječu na kvalitetu vina djelujući na boju i oporost vina. Voćna vina trešnje, maline, borovnice i crnog ribizla pokazala su se kao sličan ili bolji izvor polifenolnih spojeva od vina proizvedenih od crnog grožđa, dok su se voćna vina jabuke, šljive i breskve pokazala kao slabiji izvor ovih spojeva (Velić i sur., 2018a.).

2. 6. Fizikalno-kemijski pokazatelji kakvoće voćnih 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_2 i ukupni SO_2 (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.

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 i Boyd, 1973.). 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 i sur., 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 i sur., 1998.).

Ukupni aciditet je vrijednost izražena količinom lužine (NaOH) upotrjebljene 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_2. SO_2 se nalazi u vinu u slobodnom i vezanom obliku. Veže se sa šećerima, aldehidima 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. Kiselija 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).

2.7. Šaržni fermentor

Šaržni fermentator predstavlja bioreaktor izveden najčešće u obliku zatvorenog duplostjenog cilindričnog spremnika, po potrebi opremljenog miješalicom, s otvorima kroz koje se reakcijska smjesa dovodi ili odvodi. Unutar plašta moguća je ugradnja zmijače ili polucijevi za izmjenu topline. Fermentori koji se upotrebljavaju u vinarstvu su uglavnom cilindričnog oblika s konusnim dnom zbog jednostavnosti održavanja, skupljanja taloga u dnu fermentora te laganog odjeljivanja vina s taloga. U današnje vrijeme za izradu fermentora kao konstrukcijski materijal uglavnom se upotrebljava nehrđajući čelik (AISI 304 i AISI 316). Prednosti primjene nehrđajućeg čelika za izradu fermentora su izrada u gotovo bilo kojoj veličini i obliku, brzi prijenos topline, lako čišćenje, inertnost i nepropusnost za vino. Moguća je još upotreba drvenih fermentora od hrastovine kod proizvodnje posebnih vina (Jackson, 2017.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj predloženog rada je istražiti utjecaj različitih vinskih kvasaca, sa i bez dodatka pektolitičkog enzima, na kinetiku fermentacije, fizikalno-kemijska svojstva, boju te udio ukupnih polifenola u soku/vinu od kruške iz ekološkog uzgoja.

3.2. MATERIJALI

Sirovine:

- sok od kruške iz ekološkog uzgoja vrste *Abbé Fetel* (Hrvatska),
- selekcionirani vinski kvasci Uvaferm BDX (dalje u radu K1) i Cross Evolutiion (dalje u radu K2),
- Pektolitički enzim Lallzym OE (dalje u radu E),
- Starter kultura bakterija *O. oeni* LALVIN VP 41 MBR za provođenje JMF.

Kemikalije:

- kalijev metabisulfit ($K_2S_2O_5$),
- saharoza (šećer bijeli, rafinirani),
- Folin-Ciocalteauov reagens (Kemika, Hrvatska),
- galna kiselina ($C_7H_6O_5$),
- etanol (C_2H_5OH),
- natrijev karbonat (Na_2CO_3),
- otopina DPPH (c = 0,3 mM u metanolu).

3.3. OPREMA

Tijekom pripreme uzoraka soka za AF korišteni su:

- ručno mješalo i plastična posuda,
- Erlenmayerove tikvice volumena 2 L,
- analitička vaga (AW 220M, Shimadzu) je korištena za vaganje enoloških preparata,
- laboratorijska vaga (572, Kern) je korištena za vaganje pripremljenih uzoraka u Erlenmayerovim tikvicama,
- pH metar (Lab 850, Schott) za određivanje početne kiselosti soka kruške,
- Refraktometar HI 96813 za određivanje °Bx u soku i vinu,
- babometar.

Za provedbu serije fermentacijskih istraživanja korišteni su:

- sustav za fermentaciju,
- termometar,
- vrenjače,
- laboratorijska vaga 572, Kern.

Tijekom analiza mladog vina korišteni su:

- refraktometar HI 96813 za određivanje °Bx u vinu,
- RQflex plus 10 za određivanje jabučne i mliječne kiseline u uzorcima vina,
- spektrofotometar Specord 200, Analytic Jena,
- kromametar CR-400 Konica Minolta.

3.3.1. Sustav za fermentaciju

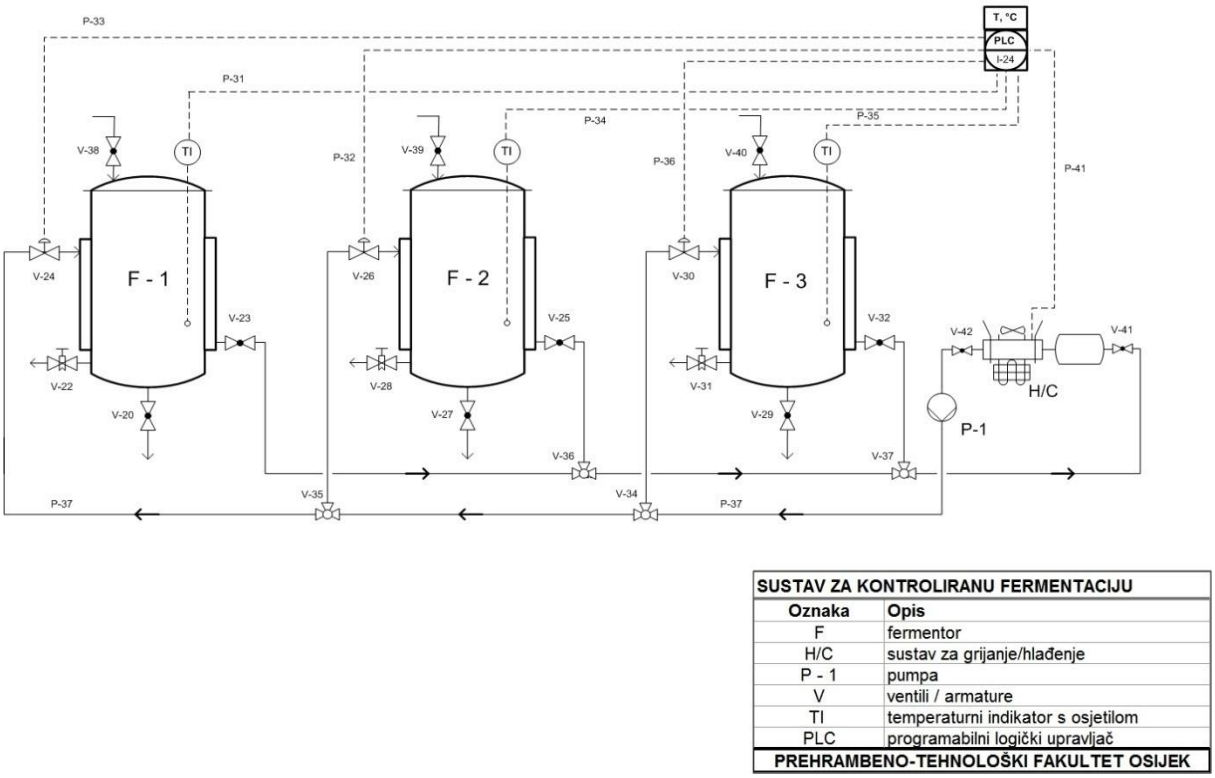
Sustav za kontroliranu fermentaciju (Slika 4.) sastoji se od:

- postolja i nogica na koje su postavljeni duplikatori,
- tri posude s duplom stjenkom (fermentori; duplikatori) volumena 15 L,
- plivajućih pokrova,
- ventila (ispusni, totalni ispusni),
- cjevovoda,
- fitinga,
- rashladnog sustava (kontrolni ormarić, digitalni termostat, pumpa, elektroventili, cjevovodi),
- temperaturnih indikatora s osjetilom (Pt-100, digitalno očitavanje temperature),
- automatike za upravljanje sustavom grijanja/hlađenja sustava fermentora.



Slika 4. Sustav za kontroliranu fermentaciju

Cilindrični, vertikalni samostojeći fermentori s koničnim dnom posjeduju duple stjenke u koje se može dovoditi rashladni/ogrijevni medij pomoću kojega se vrši zagrijavanje/hlađenje sadržaja fermentora uz pomoć automatiziranog rashladnog sustava. Kao rashladno sredstvo unutar sustava rashlađivanja koristi se smjesa propilenglikola i vode (u omjeru 1:1). Fermentori su izgrađeni od nehrđajućeg čelika (AISI 304; 18Cr, 10 Ni; W. Nr 1.4301., Č. 4580). Temperatura unutar fermentora se mjeri pomoću temperaturnih indikatora s osjetilom koji su postavljeni unutar sva tri fermentora kako je prikazano u shematskom prikazu sustava na slici 5. Regulacija temperature može se provoditi neovisno u svakome fermentoru putem upravljačkog panela (Fotez, 2017.).



Slika 5. Shematski prikaz sustava za fermentaciju

3.4. METODE

3.4.1. Proces proizvodnje vina od kruške u malom i poluindustrijskom mjerilu

Za proizvodnju vina od kruške upotrijebljen je sok od kruške iz ekološkog uzgoja vrste *Abbé Fetel*. Sok je čuvan i transportiran u obliku *bag-in-box* pakiranju (dalje u radu BIB). Nakon senzorske provjere sva 4 BIB pakiranja odabrana su dva BIB od kojih je priređen jedan uzorak u ravnomjernom omjeru po 7 L iz svakog BIB. U svježem soku određen je udio šećera pomoću babometra i refraktometra (~12 °Bx). Pošto određena količina šećera nije dovoljna za proizvodnju vina provedeno je doslađivanje do 20 °Bx (1,5 kg konzumnog šećera na 14 L soka). Provedeno je sumporenje ukupne količine soka s 35 mg/L $K_2S_2O_5$.



Slika 6. Pripremljeni uzorci u Erlenmayerovim tikvicama s vrenjačama

Za potrebe provedbe serije mikrofermentacijskih istraživanja, sok od kruške pripremljen na prethodno opisan način, razdijeljen je u osam Erlenmeyerovih tikvica volumena 2 L. U svaku Erlenmeyerovu tikvicu dodano je 1,75 L soka kruške. Za pokretanje fermentacije korištena su dva komercijalna vinska kvasca Uvaferm BDX (K1) i Cross Evolution (K2) sa ili bez dodatka pektolitičkog enzima Lallzym OE (E). U četiri od osam Erlenmeyerovih tikvica dodao je 0,026 g

komercijalnog pektolitičkog enzima Lallzym OE te je u dvije Erlenmeyerovih tikvice dodan kvasac K1 u količini od 0,53 g, a u druge dvije kvasac K2 u istoj količini. Nakon toga u dvije (od preostale četiri Erlenmayerove tikvice) dodan je samo kvasac K1 i kvasac K2 u druge dvije EM tikvice u količini od 0,53 g. Uzorci su označeni oznakama K1I, K1II, K2I, K2II, K1EI, K1EII, K2EI i K2EII. Također, pripremljena je tikvica s 1,75 L destilirane vode koja se koristila kao kontrola isparavanja tijekom AF. Na sve tikvice su postavljene vrenjače kako bi se spriječio ulazak zraka te pravilno provela fermentacija. Tako pripremljeni početni uzorci prikazani su na slici 6.



Slika 7. Uzorci na početku procesa alkoholne fermentacije

Mikrofermentacije su provedene na prosječnoj temperaturi od 21 °C u zamračenom prostoru kako je prikazano na slici 7. Tikvica s vodom u koju je bio uronjen termometar korištena je za praćenje temperature fermentacije. Nakon 31 dan fermentacije napravljen je pretok mladog vina i odjeljivanje taloga dekantiranjem. Talog zaostao nakon dekantiranja prikazan je na slici 8. Mlado vino od kruške pretočeno je u tamne boce u kojima nastavlja daljnje dozrijevanje i odležavanje na podrumskoj temperaturi.



Slika 8. **Talog zaostao nakon pretoka mladog vina**

Za kontroliranu fermentaciju u poluindustrijskom mjerilu (SKF-15) pripremljeno je 22 L soka koji je doslađen s 2,357 kg konzumnog šećera uz sumporenje sa 770 mg $K_2S_2O_5$. Sok je nakon homogenizacije ravnomjerno razdijeljen u dva fermentora sustava za kontroliranu fermentaciju (po 11 L u svaki). U prvi fermentor je dodan kvasac K1, a u drugi kvasac K2 u količini 3,3 g. Provedena je AF uz kontrolu temperature na 18 °C unutar fermentora a nakon završetka AF provedena i JMF potaknuta dodatkom malolaktičnih bakterija (LALVIN VP 41 MBR). Tijekom procesa JMF temperatura u fermentorima je održavana na 22 °C. Nakon završetka JMF mlado vino je pretočeno ("skinuto") s taloga pomoću ventila za ispust kako je prikazano na slici 9. te je pretočeno u boce na daljnje odležavanje i dozrijevanje.



Slika 9. Odjeljivanje mladog vina od taloga (sustav za kontroliranu fermentaciju, SKF 15)

3.4.2. Praćenje fermentacijske aktivnosti kvasca - određivanje mase CO_2 oslobođenog tijekom mikrofermentacija

Za mjere mase tijekom provedbe mikrofermentacija korištena je analitička vaga, a vaganje je provedeno pri sobnoj temperaturi. Praćenjem promjene mase Erlenmayerovih tikvica tijekom intervala od 24 sata za vrijeme procesa AF izračunata je količina CO_2 proizvedena metabolizmom kvasca sa i bez dodatka pektolitičkih enzima.



Slika 10. Mjerenje mase uzoraka tijekom provedbe mikrofermentacije

Masa oslobođenog CO_2 tijekom mikrofermentacija izračunata je kao razlika promjene mase tikvice u kojoj se provodila fermentacija i promjena mase tikvice slijepe probe (tikvica s vodom).

$$m = m_1 - m_2$$

gdje je:

m - masa oslobođenog CO_2 u fermentacijskoj tikvici [g],
m_1 - gubitak mase tikvice (razlika mase tikvice između dva mjerenja) [g],
m_2 - razlika mase tikvice slijepe probe između dva mjerenja [g].

Brzina nastajanja CO_2 određena je na način da je masa oslobođenog CO_2 u određenom vremenskom intervalu podijeljena s trajanjem tog intervala i volumenom uzorka (podloge):

$$\frac{d\mathrm{CO}_2}{dt} = \frac{\Delta m}{V \times \Delta t}$$

gdje je:

$\frac{\mathrm{dCO}_2}{\mathrm{dt}}$ - brzina nastajanja CO_2 [g/L 24h],

Δm - masa CO_2 oslobođenog u vremenskom intervalu Δt [g],

Δt - vremenski interval između dva mjerenja [24h],

V - volumen uzorka (podloge) [L].

3.4.3. Određivanje refraktometrijske vrijednosti

Refraktometrija je određivanje indeksa loma svijetlosti (refrakcije) neke tvari, u ovom slučaju voćnog vina od kruške. Za mjerenje se koristi mjerni instrument (refraktometar) koji mjeri kut pod kojim se zraka svjetlosti lomi prelaskom iz otopine u staklenu prizmu poznatog indeksa loma. Indeks loma otopine proporcionalan je njihovoj koncentraciji pa refraktometrija služi kao brza analitička metoda za određivanje koncentracije šećera u vinima i sokovima, alkohola u alkoholnim pićima i za određivanje koncentracije masti u mlijeku. Refraktometar rezultat obrađenih uzoraka daje u obliku stupnjeva Brix-a [°Bx]. Za analizu je korišten refraktometar tvrtke Hanna Instruments (HI 96813 Wine Refractometer).



Slika 11. Refraktometar HI 96813

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

Reflectoquant® sustav radi na principu re-emisijske fotometrije, gdje se mjeri difuzno reflektirana svijetlost pomoću test-trakice ili nakon transmisije kroz kivetu. Dobiveni rezultat predstavlja razliku intenziteta između emitirane i reflektirane svjetlosti što omogućava kvantitativno određivanje specifičnih analita.

Postupak mjerenja sastoji se od tri osnovna koraka:

- uranjanje test trakice u otopinu uzorka,
- postavljanje test trakice u čitač mjernog uređaja i pokretanja mjerenja,
- očitavanje kvantitativnih rezultata koji su prikazani na zaslonu mjernog uređaja.

Prije samog postupka mjerenja potrebno je programirati mjerni uređaj. Programiranje se provodi tako da se unose informacije o parametrima koji će se mjeriti. Na taj način se provodi korekcija valne duljine za odabrani parametar kao i specifična kalibracijska krivulja koja služi kao interna kalibracija mjernog instrumenta (Fotez, 2017.).

3.4.5. Određivanje jabučne i mliječne kiseline



Slika 12. RQflex plus 10

Određivanje udjela jabučne i mliječne kiseline provedeno je primjenom uređaja RQflex koji je prikazan na slici 12. Pomoću njega mogu se odrediti i ostale kiseline, poput askorbinske i vinske, očitati pH vrijednost, odrediti nitrati, kalcij i drugi parametri. Svaki mjerni parametar ima svoj barkod. Mjerenje se provodi tako da se test traka uroni u uzorak i ostavi 5 minuta nakon toga test traka se stavlja u uređaj RQflex plus 10 koji na zaslonu pokazuje rezultat mjerenja. Ovaj sustav radi u mjernom području od 0,1 do 5 g/L.

3.4.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Pripremljena je 0,3 mmol/L otopina 2,2-difenil-1-pikrilhidrazila (DPPH) u metanolu. 0,5 mL ovako pripremljene otopine DPPH dodaje se u kivetu s 100 µL uzorka vina od kruške te se izmiješa. Reakcijska otopina se ostavi na tamnom mjestu na 30 °C tijekom 30 minuta. Naposljetku se očita apsorbancija pri 518 nm.

Postotak inhibicije DPPH izračuna se prema izrazu:

$$\%\ \text{inhibicije} = \frac{\text{Apsorbancija kontrolnog uzorka} - \text{Apsorbancija uzorka vina od kruške}}{\text{Apsorbancija kontrolnog uzorka}}$$

3.4.7. Folin-Ciocalteau metoda za određivanje ukupnih polifenolih spojeva u vinu

Koncentraciju ukupnih polifenonih spojeva u voćnim vinima moguće je odrediti primjenom Folin-Ciocalteau metode. To je kolormetrijska metoda koja se temelji na oksidacijskim i redukcijskim reakcijama. Sama reakcija se može prikazati na sljedeći način:

Fenoli + alkalna otopina + Folin-Ciocalteauov reagens + toplina = plava boja

Folin-Ciocalteauov reagens je smjesa fosfowolframove ($H_3PW_{12}O_{40}$) i fosfomolbidenske kiseline ($H_3PMo_{12}O_{40}$) koje u alkalnom mediju oksidiraju fenolne spojeve pri čemu nastaje plavo obojeni produkt čija se apsorbancija mjeri pri valnoj duljini od 765 nm.

Otopina galne kiseline pripremljena je u čaši od 100 mL, na način da je 0,5 g suhe galne kiseline otopljeno u 10 mL 95 % etanola i nakon toga nadopunjeno destiliranom vodom do oznake. Otopina natrijeva karbonata pripremljena je otapanjem 200 g dehidriranog natrijeva karbonata u 800 mL vode tijekom zagrijavanja do ključanja. Nakon hlađenja otopine dodano je nekoliko kristala natrijeva karbonata. Nakon 24 sata otopina je profiltrirana te je dodana voda do volumena od 1L. Otopine su pripremljene prema Waterhouse metodi (2019.), a Folin-Ciocalteauov reagens je komercijalno dostupan.

Za pripremu uzorka otpipetirano je 20 µL uzorka vina/soka, dodano je 1580 µL destilirane vode i 100 µL Folin-Ciocalteauov reagensa te nakon stajanja od 5 minuta dodano je 300 µL Na_2CO_3, tako da je ukupni volumen 2000 µL. Na ovakav način su pripremljeni svi uzorci soka i vina od kruške. Slijepa proba se priprema na isti način, ali se umjesto uzorka dodaje destilirana voda.

Uzorci za analizu su nakon pripreme homogenizirani i ostavljeni dva sata kako bi se razvila plava boja čija je apsorbancija mjerena na spektrofotometru pri valnoj duljini 765 nm.

Postupak izrade kalibracijske krivulje za određivanje ukupnih polifenola

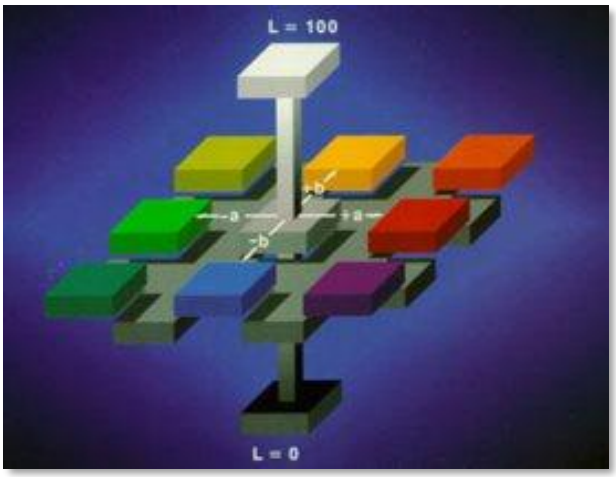
Odabir galne kiseline kao standarda baziran je na njenoj dostupnosti i stabilonsti čiste tvari, osim toga jeftinija je od ostalih opcija. Standardna krivulja je napravljena otopinom galne kiseline. U odmjerne tikvice od 50 mL odpipetirano je po 1 mL, 2 mL , 3mL, 5mL, 10 mL, 15 mL otopine galne kiseline i nadopunjeno do oznake s 10 %-tnom vodenom otopinom etanola.

Apsorbancija u pripremljenim uzorcima je određena po postupku za određivanje ukupnih polifenola.

Na osnovi dobivenih podataka, metodom linearne regresije, određena je standardna krivulja i regresijska jednadžba (jednadžba pravca) koje daju ovisnost koncentracije galne kiseline o apsorbanciji. Uvrštavanjem apsorbancija obojenih kompleksa vina/soka od kruške određena je koncentracija ukupnih polifenola izražena u ekvivalentima galne kiseline po mL uzorka.

3.4.8. Određivanje boje

Kromametar je uređaj kojim se određuje boja neke površine pomoću difuznog osvjetljenja. Pulsirajuća ksenonska lampa koja je smještena unutar postolja omogućuje ujednačeno difuzno osvjetljenje kroz prostor za uzorak. Svijetlost koja se odbija okomito od površine uzorka skuplja se u šest silikonskih fotoćelije (tri fotoćelije mjere osvjetljenje iz izvora, a prostale odbijenu svjetlost). Nakon udara u silikonske fotoćelije, svjetlosna energija se pretvara u električni signal i šalje u mikroprocesor gdje se pretvara u koordinate za odabrani prostor boja. Izlaz podataka je u obliku L *, a * i b *.



Slika 13. Prikaz L*a*b* sustava boja

U Lab sustavu (**Slika 13**) vrijednosti mjere se parametri L*, a* i b*. L* parametar predstavlja koliko je neki predmet svijetao ili taman te ima vrijednost u rasponu od 0 do 100. 0 se dobiva kada je predmet mjerenja crne boje, a 100 kada je bijele boje. Vrijednosti parametra a*

određuju je li neki predmet crvene ili zelene boje. Vrijednost parametra b* određuje je li neki predmet žute ili plave boje.

Na temelju izmjerenih vrijednosti L*, a* i b* parametara izračunate su vrijednosti ukupne promjene boje (ΔE) i promjene boje (ΔC^*_{ab}) uzoraka, prema formulama:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

$$\Delta C^*_{ab} = \sqrt{[(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]}$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

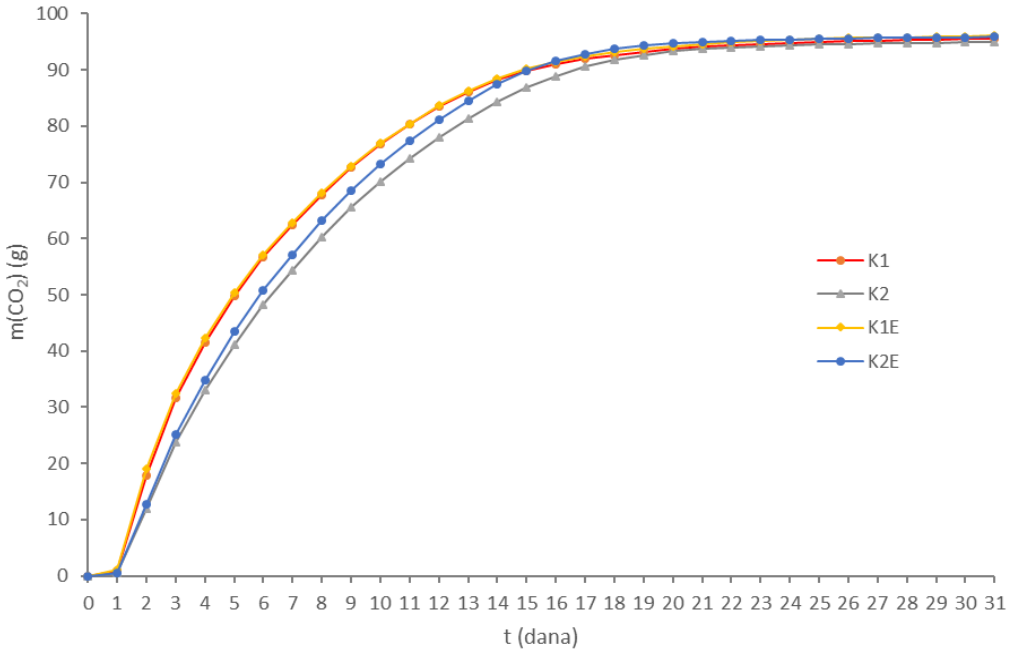
4.1. Utjecaj dodatka kvasaca Uvaferm BDX i Cross Evolution na kinetiku fermentacije

Nastajanje CO_2 tijekom fermentacije u stehiometrijskom je odnosu s potrošnjom šećera i proizvodnjom etanola. Stoga se tijek fermentacije, odnosno fermentacijska aktivnost kvasca može posredno pratiti jednostavnim određivanjem mase oslobođenog CO_2 (Petravić-Tominac i sur., 2013). U diplomskom radu, serijom mikrofermentacijskih eksperimenata praćena je fermentacijska aktivnost dva komercijalna vinska kvasca Uvaferm BDX (K1) i Cross Evolution (K2) tijekom procesa proizvodnje vina od kruške sa i bez dodatka komercijalnog pektolitičkog enzima Lallzym OE (E). Provedena je fermentacija u trajanju od 31 dan, kako bi se utvrdila fermentacijska aktivnost kvasaca. Tijekom AF srednja vrijednost temperature bila je 21°C. Rezultati prikazuju srednju vrijednost između dvije paralele uzorka na kojima je provedena AF, a prikazani su grafički na slikama 14. i 15.

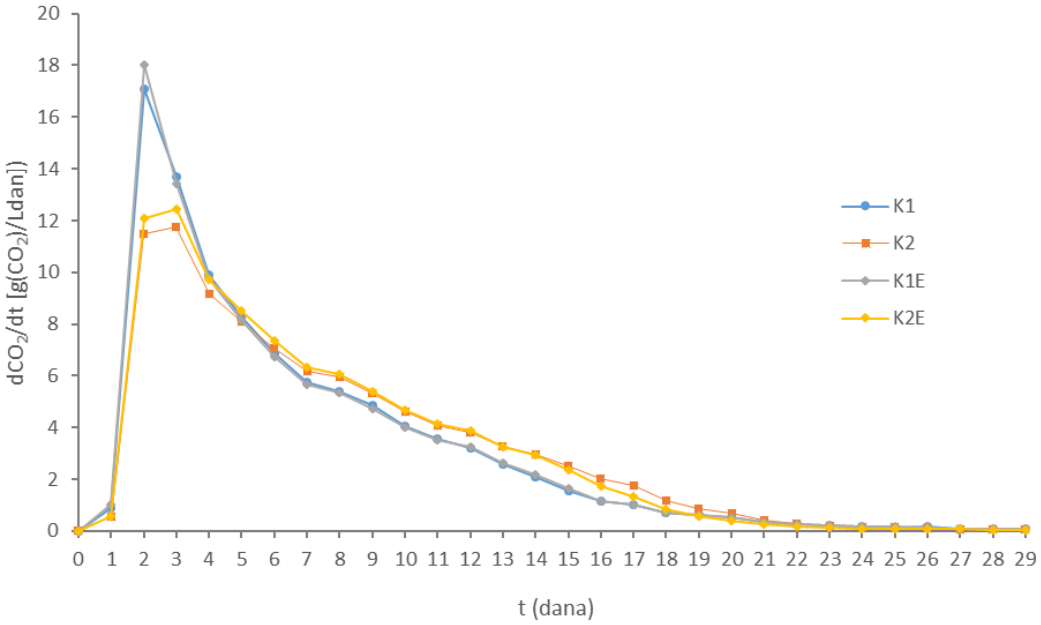
Slika 14 prikazuje fermentacijsku aktivnost komercijalnih kvasaca K1 i K2 tijekom AF voćnog vina od kruške te je vidljivo kako je fermentacija započela između prvog i drugog dana u svim uzorcima. Nadalje, vidljivo je da je profil krivulje gotovo isti za sve uzorke, te dodatkom enzima kod oba kvasca se primjećuje blago povećanje nagiba krivulje što upućuje na brže nastajanje CO_2. Sličan trend i oblik krivulje je dobiven u radu Petravić-Tominac i sur. iz 2013. kod proizvodnje vina od kupine. Nakon 31 dana AF masa nastalog CO_2 je podjednaka u svim uzorcima. Kvasac K1E serije pokazao je najveću katalitičku moć s 96,08 g nastalog CO_2, a slijedi ga uzorci iz K2E serije s 95,88 g CO_2 što ukazuje da je dodatkom pektolitičkog enzima povećana dostupnost šećera kvascu tijekom AF. U uzorcima u koje nije dodan enzim veću katalitičku moć pokazao je kvasac K1 serije s produkcijom CO_2 u iznosu od 95,53 g, a K2 serija u iznosu od 94,96 g. Vidljivo je da dodatakom pektolitičkih enzima došlo do povećanja ukupne produkcije CO_2 no takvo povećanje nije bilo značajno.

Iz slike 15 koja prikazuje produkciju CO_2 u voćnom vinu od kruške unutar intervala od jednog dana vidljivo je da najveća brzina fermentacije postignuta drugi dan fermentacije te je produkcija CO_2 bila najviša kod K1E serije i iznosila je 18,031 g (CO_2)/L dan, a slijede K1, K2E i K2 serije u iznosima od 17,071, 12,097, 11,477 g (CO_2)/L dan.

Faza burnog vrenja trajala je oko tjedan dana, nakon čega slijedi tiho vrenje i usporavanje specifične brzine fermentacije. Kvasac K1 je pokazivao veću promjenu specifične brzine fermentacijske tijekom prvih šest dana, a nakon toga kvasac K2 pokazuje veću promjenu specifične brzine fermentacije u intervalu od jednog dana. Tijekom mikrofermentacije voćnog vina od kupine u radu Petravić-Tominac i sur. iz 2013. godine masa nastalog CO_2 iznosi 90,52 g i 90,10 g za dva različita komercijalna kvasca što je manje u odnosu na dobiveni rezultat za voćno vino od kruške.



Slika 14. Fermentacijska aktivnost vinskih kvasaca Uvaferm BDX (K1) i Cross Evolution (K2), sa enzimom (K1E i K2E) i bez dodatka pektolitičkog enzima (Lallzym OE) tijekom proizvodnje voćnog vina od kruške



Slika 15. Promjene specifične brzine fermentacije soka od kruške primjenom kvasaca Uvaferm BDX (K1) i Cross Evolution (K2), s enzimom Lallzym OE (K1E i K2E) i bez dodatka pektolitičkog enzima

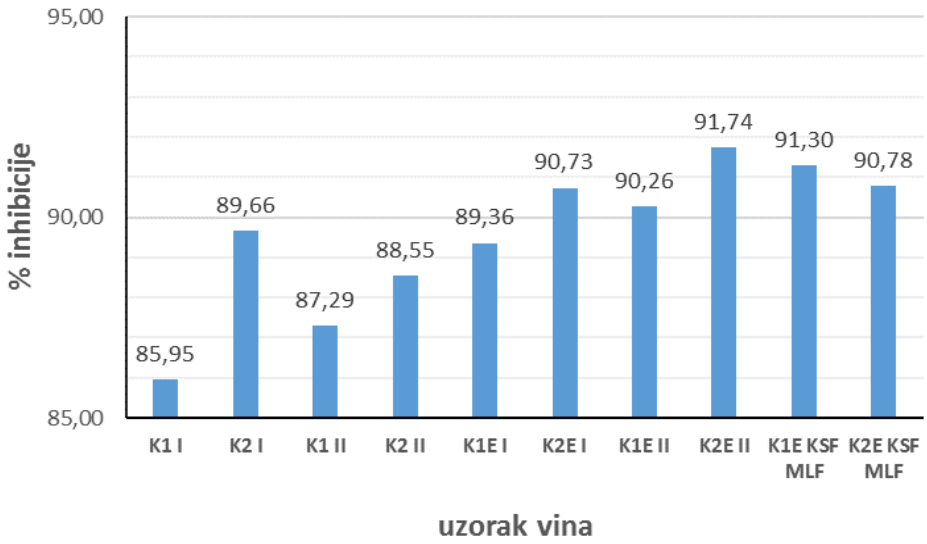
4.2. Udio ukupnih polifenola i antioksidativna aktivnost vina od kruške

Nakon analize ukupnih polifenola Folin-Ciocalteauov metodom (**Tablica 1**) vidljivo je da dolazi do povećanja udjela polifenolnih spojeva u vinu od kruške u odnosu na sok od kruške. Isto tako, može se uočiti da je prisutna veća koncentracija polifenola u mladom vinu od kruške primjenom kvasca K1 nego kvasca K2. Primjenom pektolitičkih enzima također dolazi do blagog porasta koncentracije polifenola u oba uzorku i s kvascem K1 i s kvascem K2. Kod proizvodnje voćnog vina od naranče prema Kelbeku (2009) došlo je do smanjenja koncentracije ukupnih polifenola s 317 mg/L u soku na 162 mg/L u voćnom vinu naranče. Dok Velić i sur navode 733-2698 mg/L za vino od kupine, 558-743 mg/L za vino od trešnje i 160-470 mg/L vino od jabuke, Trbojević (2016) u svom radu za vino od kupine dobiva iznos od 1480 mg/L. Iz ovih podataka je vidljivo kako voćna vina bobičastog voća sadrže veću koncentraciju polifenolnih spojeva od voćnog vina od kruške, a voćno vino od jabuke nešto manju koncentraciju ovih spojeva. S tehnološkog stajališta proizvodnje vina od kruške polifenolni spojevi utječu na razvoj boje, trpkosti, gorčine te neki od njih posjeduju i antioksidativno djelovanje.

Tablica 1. Koncentracija ukupnih polifenola u uzorcima preračunata na mg/L galne kiseline

Apsorbancija	Koncentracija galne kiseline, mg/L	Uzorak
0,443	514	Sok od kruške
0,506	567	Doslađeni sok od kruške
0,488	551	K1
0,445	516	K2
0,502	563	K1E
0,453	523	K2E
0,501	563	K1 KSF
0,472	538	K2 KSF

Prema prikazanim rezultatima (**Slika 16**) za antioksidacijsku aktivnost voćnog vina od kruške vidljivo je da uzorci K2 imaju višu antioksidacijsku aktivnost u odnosu na uzorke K1 serije. Kod uzoraka KE serije prisutan je isti trend te je dodatno povišena antioksidacijska vrijednost vjerojatno utjecajem pektolitičkih enzima na samu ekstrakciju spojeva koji imaju antioksidativno djelovanje.

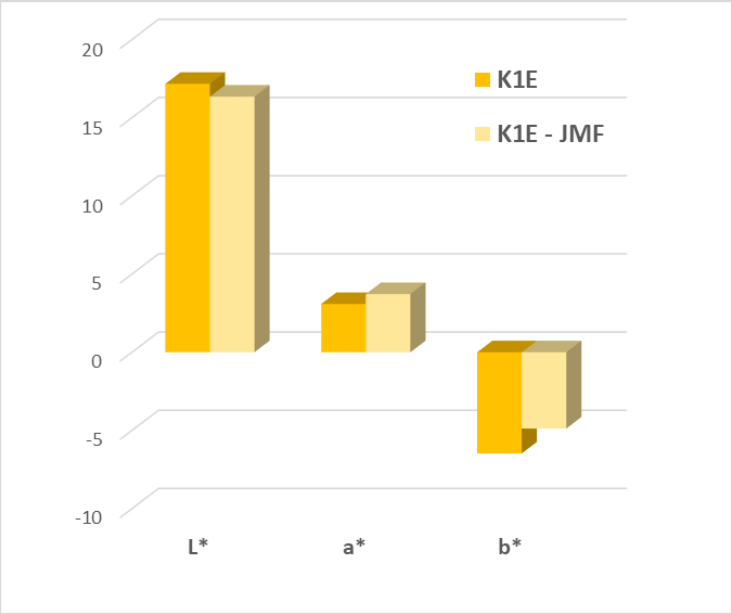


Slika 16. Antioksidacijska aktivnost uzoraka vina od kruške

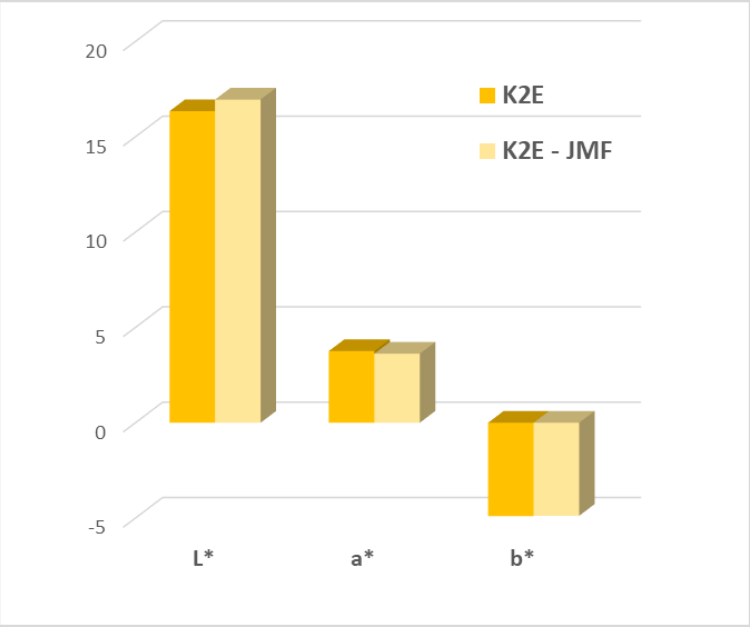
4.3. Utjecaj jabučno-mliječne fermentacije na promjenu boje te udio jabučne kiseline u voćnom vinu od kruške

Tablica 2. Ukupna promjena boje (ΔE) i promjena boje (ΔC^*_{ab}) uzorka vina od kruške nakon serije fermentacijskih eksperimenata

Uzorak	K1	K2	K1E	K2E	K1E - JMF	K2E - JMF
ΔE	6,78	8,51	6,71	7,12	7,09	6,52
ΔC^*_{ab}	4,21	3,48	3,95	3,40	3,36	3,27



Slika 16. Vrijednost parametara boje (L*, a* i b*) uzoraka vina od kruške nakon provedene alkoholne fermentacije kvascem Uvaferm BDX uz dodatak pektolitičkog enzima te nakon provedene inducirane jabučno-mliječne fermentacije (JMF)



Slika 17. Vrijednost parametara boje (L*, a* i b*) uzoraka vina od kruške nakon provedene alkoholne fermentacije kvascem Cross Evolution uz dodatak pektolitičkog enzima te nakon provedene inducirane jabučno-mliječne fermentacije (JMF)

Tablica 3. Ukupna promjena boje (ΔE) i promjena boje (ΔC^*_{ab}) za uzorke vina od kruške prije i poslije provedene jabučno – mliječne fermentacije

Uzorak	K1E --> K1E - JMF	K2E --> K2E - JMF
ΔE	1,90	0,63
ΔC^*_{ab}	1,71	0,14

Rezultati mjerenja jabučne i mliječne kiseline prikazani su u tablici 4. Tijekom AF i JMF primjećuje se trend smanjenja količine jabučne kiseline u uzorcima te povećanja količine mliječne kiseline koja pozitivno utječe na organoleptička svojsta voćnog vina, dok kod uzorka K2E-KSF nakon završetka AF dolazi i do blagog porasta količine jabučne kiseline. To može upućivati da je primjenom kvasca K2 proizvedena mala količina jabučne kiseline kao nusprodukt metabolizma kvasca. Nakon provedene AF u uzorku mladog vina K1E-KSF izmjerena je pH vrijednost 3,55, a u uzorku K1E-KSF 3,56. Leon i Dicks u svom radu iz 2004. godine navode kako je pH u rasponu od 3,3-3,5 idealan za provedbu JMF bakterijama roda *O.oeni*. Sličan početni udio jabučne i mliječne kiseline nakon fermentacije dobiven je u radu Zuo i sur. iz 2018. godine gdje je nakon AF udio mliječne kiseline 0,6 g/L, a jabučne kiseline 4,24 g/L.

Dodatkom LALVIN VP 41 MBR komercijalnog preparata za pokretanje JMF u oba uzorka je došlo do smanjenja udjela jabučne kiseline. Kod K2E-KSF došlo je do smanjenja za 3,57 g/L, a kod uzorka K1E-KSF za 3,25 g/L u roku od tjedan dana. Sljedeće mjerenje je napravljeno za mjesec dana, te je utvrđeno je daljnje smanjenje udjela jabučne kiseline u oba uzorka za K1E-KSF 3,75 g/L, a kod K2E-KSF 3,77 g/L. Sun i sur. 2017. navode da provedbom JMF na voćnom vinu trešnje pri početnom pH od 3,55 smanjenje udjela jabučne kiseline s 2,66 g/L na 0,44 g/L, što je u korelaciji s dobivenim podacima za voćno vino od kruške. Provedbom JMF značajno se povećao udio mliječne kiseline u krajnjem produktu s udjelom 3,24 g/L kod uzorka K1E-KSF i 2,98 g/L kod uzorka K2E-KSF. Iako je u uzorku K2E-KSF došlo do veće ukupne razgradnje jabučne kiseline, veća količina mliječne kiseline ustanovljena je u uzorku K1E-KSF. Razgradnjom jabučne u mliječnu kiselinu nakon provedbe JMF izmjereno je povećanje pH vrijednosti u oba uzorka. Nakon provedene JMF izmjereni pH iznosi 3,95 u uzorku K1E-KSF te 3,96 u uzorku K2E-KSF. Povećanje pH vrijednosti na kraju procesa je bilo očekivano jer je mliječna kiselina slabija od jabučne kiseline. Iz slika 16 i 17 vidljivo je da kod oba uzorka dolazi

do smanjenja intenziteta boje provedbom JMF. Iz tablice 3 vidljivo je da uzoraka K1E-KSF ima veću ukupnu promjenu boje u odnosu na uzorak K2E-KSF.

Tablica 4. Udio jabučne i mliječne kiseline u uzorcima soka i vina od kruške

Datum mjerenja	4. 3.'19.	9. 4. '19.		16. 4. '19.		10. 5. '19.	
Uzorak	**Sok od kruške**	**K_1E - KSF**	**K_2E - KSF**	**K_1E - KSF**	**K_2E - KSF**	**K_1E - KSF**	**K_2E - KSF**
Jabučna kiselina (g/L)	4,4	4,35	4,45	1,205	0,88	0,715	0,68
Mliječna kiselina (g/L)	0,51	0,85	0,97	2,65	2,75	3,24	2,98

4.4. Fizikalno-kemijski pokazatelji kakvoće voćnog vina od kruške

Nakon provedene fizikalno-kemijske analize voćnog vina kruške dobiveni rezultati dani su u tablici 5. Voćno vino od kruške proizvedeno tijekom izrade ovog rada zadovoljava fizikalno-kemijske parametre kakvoće propisane pravilnikom o voćnim vinima (NN 73/06, 24/11, 28/11, 55/11).

Tablica 5. Rezultati analize fizikalno-kemijskih pokazatelja kakvoće vina od kruške nakon provedenih mikrofermentacija

OZNAKA UZORKA	K1	K2	K1E	K2E
Ukupni suhi ekstrakt (g/L)	78,4	78,4	77,6	77,5
Alkoholna jakost (vol %)	11,59	11,53	11,58	11,55
Sadržaj slobodnog SO_2 (mg/L)	6,4	20,48	7,04	8,96
Sadržaj ukupnog SO_2 (mg/L)	32,00	99,20	41,6	53,12
Sadržaj hlapljivih kiselina (g/L)	0,53	0,65	0,57	0,58
Sadržaj ukupnih kiselina (g/L)	5,74	6,15	5,89	6,41
pH	3,69	3,68	3,67	3,67
Sadržaj neprevrelog šećera (g/L)	51,77	51,20	53,18	53,10
Sadržaj ukupnog šećera (g/L)	52,44	51,43	54,67	53,26

5. ZAKLJUČCI

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

Proizvedeno voćno vino od kruške zadovoljava parametre kakvoće propisane pravilnikom o voćnim vinima (NN 73/06, 24/11, 28/11, 55/11).

U mikrofermentacijskim istraživanjima, veću količinu proizvodnje CO_2 imao je kvasac Uvaferm BDX nego kvasac Cross Evolution. Kvasac Uvaferm BDX je imao je veću specifičnu brzinu fermentacije na samom početku fermentacije dok nakon burne fermentacije kvasac Cross Evolution imao veću specifičnu brzinu fermentacije.

Dodatkom komercijalnog pektolitičkog enzima Lallzym OE kod oba kvasca je blago povećana produkcija CO_2 i specifična brzina fermentacije te se može zaključiti kako dodatak pektolitičkih enzima ubrzava tijek fermentacije i povećava dostupnost šećera za kvasce.

Provedenom jabučno-mliječnom fermentacijom komercijalnim preparatom čiste kulture bakterije mliječne kiseline (Lalvin VP 41 MBR), u poluindustrijskom mjerilu, u oba uzorka je došlo do smanjenja udjela jabučne kiseline i povećanja udjela mliječne kiseline. Također, provedbom jabučno-mliječne fermentacije kod oba uzorka dolazi do smanjenja intenziteta obojenja i promjene ukupne boje.

Fermentacija soka od kruške primjenom kvasca Uvaferm BDX rezultira voćnim vinom s većim udjelom ukupnih polifenolnih spojeva nego što je to slučaj kod provedbe fermentacije s kvascem Cross Evolution. Također, dodatkom pektolitičkog enzima Lallzym OE povećava se udio ukupnih polifenola kod oba ispitana uzorka.

Uzorci s kvascem Cross Evolution pokazali su veće antioksidativno djelovanje nego uzorci s kvascem Uvaferm BDX što može značiti da metabolizmom tog kvasca nastaju veća količina polifenolnih spojeva s antioksidativnim djelovanjem. Isto tako, primjenom pektoličkog enzima Lallzym OE dolazi do povećanja antioksidacijske aktivnosti u uzorcima zbog veće ekstrakcije ovih sastojaka iz samoga voća.

Dodatak komercijalnog pektolitičkog pripravka utjecao je pozitivno na brzinu fermentacije, količinu ukupnih polifenola i antioksidacijsku aktivnost uzoraka.

6. LITERATURA

Amidžić Klarić D, Klarić I, Mornar A, Velić D, Velić N: Blackberry wines mineral and heavy metal content determination after dry ashing: multivariate data analysis as a tool for fruit wine quality control, International Journal of Food Sciences and Nutrition, Volume 67:5, 2016.

Bautista-Ortin A, Martinez-Cutillas A, Ros-Garcia M, Lopez-Roca J M, Gomez-Plaza E: Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. International Journal of Food Science and Technology, 40: 867-878, 2005.

Carrière EA: Fruits nouveaux ou peu connus, La Revue Horticole: 236–7, 1886.

Clifford A i Tokuşoğlu Ö: Fruit and Cereal Bioactives: Sources, Chemistry, and Applications, Hall III, 2011.

Coton E, Coton M, Guichard H: Cider (Cyder; Hard Cider): The Product and Its Manufacture, 2016.

Dıaz C, El'ıas Conde J, Claverie C, D'ıaz 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.

Fugelsang KC, Edwards CG: Wine microbiology: Practical appliccations and procedures, 2. izd., Springer Science and Business Media, LLC, New York, 2007.

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.

Jeremić T, Šindrak Z, Skendrović Babojelić M, Fruk G, Mihaljević Žulj M, Jagatić Korenika AM: Proizvodnja jabučnog vina na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima, Agronomski fakultet Zagreb, 2008.

Kelebek H, Selli S, Canbas A, Cabaroglu T:HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan, Microchemical Journal 91: 187–192, 2009.

Kosseva MR, Joshi VK, Panesar PS: Science and technology of Fruit Wine Production, Elsevier, 2017.

Kulina M, Paunović G, Radović M, Mitrović A: Fizičko-hemijska svojstva ploda nekih sorti kruške (*Pyrus Communis L.*) na području Sarajevske regije, XXII Savetovanje o biotehnologiji, Zbornik radova 1, 2017.

Kulišić T: Vježbe iz kolegija prerada grožđa. Kemijsko-tehnološki fakultet Sveučilišta u Splitu, 2004.

Leon M, Dicks T: Control of Malolactic Fermentation in Wine. A Review, South African Journal for Enology and Viticulture, 2004.

Mesihović A: Proizvodnja kupinovog vina mikrofiltracijom s komercijalnim kvascem Fermol Rouge, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, 2011.

Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva RH: Pravilnik o voćnim vinima, Narodne novine 73/06, 96/03, 28/11, 55/11, 2004.

Morrison R.T, Boyd R.N: Organska kemija, 1973.

Petravič-Tominac V, Mesihović A, Mujadžić S, Lisičar J, Oros D, Zechner-Krpan V, Velić D, Velić N, Srečec S, Petrović Z: Production of Blackberry Wine by Microfermentation using Commercial Yeasts Fermol Rouge® and Fermol Mediterranée®, 2013.

Rendić, I: Utjecaj sorte i različitih sredstava za obradu na održivost minimalno procesiranih krušaka, Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2014.

Saranraj P, Sivasakthivelan P, Naveen M: Fermentation of fruit wine and its quality analysis: A review, Australian Journal of Science and Technology, ISSN: 2208-6404, 2017.

Sović V: Utjecaj membranske filtracije na kemijski sastav i kvalitetu vina sorte graševina. Diplomski rad, Prehrambeno–tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2013.

Sun, S Y, Chen Z X, Jin C W: Influence of lactic acid bacteria starter and pH after alcoholic fermentation, and interaction between those factors, on the induction of malolactic fermentation, and on chemical and sensory properties of cherry wines, LWT - Food Science and Technology, doi: 10.1016/j.lwt, 2017.

Velić D, Amidžić Klarić D, Velić N, Klarić I, Petrović Tominac V, Mornar A: Chemical Constituents of Fruit Wines as Descriptors of their Nutritional, Sensorial and Health-Related Properties; Descriptive food Science, London: IntechOpen, 2018a.

Velić D, Velić N, Amidžić-Klarić D, Klarić I, Petravić Tominac V, Kosmerl T, Vidrih R: The production of fruit wines – a review, Croatian Journal of Food Science and Technology, DOI: 10.17508/CJFST.2018.10.2.19 , 2018b.

Vrdoljak I: Utjecaj membranske filtracije na aromu i kemijski sastav vina sorte Graševina. Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2009.

Weifang Zuo, Lin Xu, Haifeng Xu, Chao Wang, Mosen Lu, Xuesen Chen: Effect of fermentation time on nutritional components of red-fleshed apple cider, Food and Bioproducts Processing S0960-3085(18) 30267-0, 2018.

Waterhouse A: Folin-Ciocalteu Micro Method for Total Phenol in Wine, Department of Viticulture & Enology, University of California, Davis, 2019.