

Utjecaj kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Lachancea thermotolerans* na kemijski sastav vina sorte 'Frankovka'

Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učinke primjene različitih sojeva kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Lachancea thermotolerans* na osnovni kemijski sastav, koncentracije pojedinačnih organskih kiselina, fenolnih spojeva i glicerola u vinu. U istraživanju provedenom 2018. godine, grožđe sorte 'Frankovka' korišteno je za fermentacije s komercijalnim sojevima kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Uvaferm BDX™ i Lonys WF™) i sekvencijalnu inokulaciju s *Lachancea thermotolerans* (Laktia™) u ulozu startera, te Uvaferm BDX™ kvasca, čija je uloga bila provesti fermentaciju do kraja. Rezultati potvrđuju utjecaj kvasca Uvaferm BDX™ na pojačanu ekstrakciju antocijana i tanina, te utjecaj kvasca Lonys™ na povećanu sintezu glicerola u vinu. Iako je došlo do zastoja u fermentaciji, potvrđen je učinak sekvencijalne inokulacije na povećanje ukupne kiselosti te boju i strukturu vina temeljem više koncentracije ukupnih fenola što potencijalno može opravdati njenu primjenu u ekstremno toplim godinama ili toplim klimatima.

Gljučne riječi: fenolni spojevi, 'Frankovka', ne-*Saccharomyces* kvasci, sekvencijalna fermentacija, ukupna kiselost

Uvod

Proizvođači vina oduvijek su morali odgovarati na učinke brojnih čimbenika kako bi proizveli vrhunski proizvod. U posljednje vrijeme cijeli svijet suočava se s klimatskim promjenama. Grožđe, pod utjecajem klimatskih promjena, dozrijeva u uvjetima visokih prosječnih temperatura zraka, a često i ekstremno visokih temperatura te dužih sušnih perioda. Sve više prosječne temperature, pogotovo u toplim klimatima, utječu na veće nakupljanje šećera u grožđu, što se odražava i na višu alkoholnu jakost vina. Veliki problem je i sve niža ukupna kiselost vina te nezreli tanini zbog prisilne zriobe, što često rezultira neharmoničnim vinima. Kao odgovor na najnovije probleme u vinarstvu, na tržište dolaze selekcionirani kvasci koji svojim metabolizmom utječu na ublažavanje promjena u kemijskom sastavu mošta i vina, kroz povećanje ukupne kiselosti vina i glicerola, snižavanje koncentracije alkohola te povećanu sintezu aromatskih spojeva koji doprinose aromatskom profilu vina. Različiti sojevi kvasaca imaju i različite enološke karakteristike, kao što su tolerancija na visoke temperature, pH vrijednost, koncentraciju SO₂ te brzinu fermentacije. Također, razlikuju se i po sposobnosti proizvodnje sekundarnih produkata alkoholne fermentacije, iznimno važnih za okus i aromu vina (Margalit, 1997). Najpoznatija i najčešće korištena vrsta kvasca koja se koristi u proizvodnji vina je *Saccharomyces cerevisiae* (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Iako su se nekada uglavnom povezivali s negativnim utjecajem na kakvoću vina tijekom spontanih fermentacija, ne-*Saccharomyces* vrste kvasca posljednjih godina dobivaju svoje mjesto, uz *Saccharomyces cerevisiae*, u kontroliranim fermentacijama. Literatura navodi kako selekcionirani ne-*Saccharomyces* kvasci tijekom alkoholne fermentacije svojim metabolizmom oslobađaju spojeve koji doprinose kompleksnosti aromatskog profila vina te proizvodnjom organskih kiselina povećavaju ukupnu kiselost vina. Obzirom na dokazane pozitivne učinke na kakvoću vina, ne-*Saccharomyces* kvasci koriste se kao starter kulture u sekvencijalnoj fermentaciji s kompatibilnim *Saccharomyces cerevisiae* sojevima, koji se dodaju 24-72 h kasnije. Jedna od najvećih prednosti ovakvih fermentacija je proizvodnja vina s jedinstvenim karakterom (Mateo i sur., 2016).

¹ prof. dr. sc. Ana Jeromel, doc. dr. sc. Ana-Marija Jagatić Korenika, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Svetosimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska
² Iva Babić, Student - Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Svetosimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska
Autor za korespondenciju: amjagati@agr.hr

Materijali i metode

Sorta 'Frankovka'

Frankovka je crna sorta grožđa podrijetlom iz središnje Europe. Još uvijek nije točno utvrđeno odakle potječe, a mnogo zemalja smatra je svojom autohtonom sortom. Neki od sinonima su: Blaufränkisch, Lemberger, Modra frankinja, Franconia, Moravka (www.winemag.com). 'Frankovka' je sorta kasnijeg razdoblja dozrijevanja, tipična za uzgoj u kontinentalnim klimatskim uvjetima. Rasprostranjena je u cijelom kontinentalnom dijelu Republike Hrvatske, a posebno u podregijama Moslavina, Plešivica i Slavonija. Daje različite stilove vina ovisno o vinorodnom području, ampelotehničkim i agrotehničkim zahvatima, tehnologiji vinifikacije i duljini dozrijevanja. U određenim godinama i dobro odabranim položajima za uzgoj, može dati i vina vrhunske kakvoće. Prvo vrhunsko vino od sorte 'Frankovka' bila je Iločka frankovka (Herjavec, 2019). Vino 'Frankovka' je puno, skladno, s naglašenom kiselošću te izraženom voćnom aromom, specifičnog mirisa i okusa svojstvenog sorti te intenzivne rubinske crvene boje. Voćni miris podsjeća na arome tamnih zrelih višanja, crvenog ribiza i kupine. Vina su često više ukupne kiselosti te srednje do jače alkoholne jakosti. Aroma sorte odlično se slaže s aromama hrastovine (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008). Grožđe ove sorte sadrži od 18 do 22 % šećera, a sadržaj ukupnih kiselina iznosi 7-9 gL⁻¹ (Bešlić i sur., 2010). Vrhunsku kvalitetu osim na područjima Iloka daje i na vinogradarskim položajima Feričanaca i Orahovice. Harmoničnost mirisa i okusa te bolju finoću 'Frankovka' će postići dozrijevanjem u već korištenim barrique bačvama (Herjavec, 2019).

Proizvodnja vina

Istraživanje je provedeno u berbi 2018. godine na grožđu sorte 'Frankovka' u vinogorju Zagreb. Grožđe je runjeno i muljano pomoću električne muljače-runjače. Maceracija masulja u trajanju od 8 dana, provedena je pri temperaturi od 22±2 °C. Alkoholna fermentacija provedena je s tri različita komercijalna soja kvasaca u inoks tankovima zapremine 15 L u dva ponavljanja. Sulfitiranje masulja obavljeno je 5 %-tnom sumporastom kiselinom u dozi 50 mg/100 L. Tri varijante kontrolirane fermentacije provedene su kako slijedi: kontrolno vino FrBDX – Uvaferm BDX™ (Lallemand); vino FrLakt – sekvencijalna fermentacija s Laktia™ (Lallemand) + Uvaferm BDX™ (Lallemand); FrLon – Ionys_{WF}™ (Lallemand).

Prešanje masulja u fermentaciji uslijedilo je nakon 8 dana, uz dodatak kompleksne hrane za kvasac Fermaid E™ (Lallemand). Mošt je pretočen u demižone od 5 L u dva ponavljanja, u kojima je fermentacija provedena do kraja. Nakon utvrđenog završetka fermentacije, vina su pretočena i sulfitirana te su izdvojeni uzorci za daljnje analize.

Uvaferm BDX™

Komercijalni Uvaferm BDX™ kvasac je *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae*, selekcioniran u Bordeaux-u, Francuska. Specifičan metabolizam Uvaferm BDX™ daje snažne i izražajne tipove crnih vina zbog pojačane ekstrakcije polifenolnih spojeva, posebno antocijana i tanina te intenziviranja sortnog karaktera crnih vina. Već na samom početku fermentacije s Uvaferm BDX™ uočava se brža ekstrakcija tvari boje. Rezultat fermentacije su strukturirana crna vina punog tijela te velikog potencijala za dozrijevanje i starenje (www.lallemandwine.com).

Laktia™

Laktia™, selekcija kvasca iz španjolske regije Rioja, čista je kultura kvasca *Lachancea thermotolerans*. Prirodna je alternativa za povećanje svježine i kiselosti u crnim i bijelim vinima zbog jedinstvene karakteristike proizvodnje visoke koncentracije mliječne kiseline tijekom fermentacije, čak do 7 gL⁻¹. Koristi šećer za proizvodnju mliječne kiseline te mu odgovaraju više temperature za razmnožavanje. Laktia™ primjenjuje se u sekvencijalnim inokulacijama, zajedno sa selekcioniranim *Saccharomyces cerevisiae* kvascem. Laktia™ proizvodi značajne količine mliječne kiseline i prirodni je alat kojim se mogu smanjiti posljedice globalnog zatopljenja u toplijim

klimatima, a koji se očituju kao gubitak svježine i kiselosti u vinu. Osim što značajno doprinosi svježini i kiselosti vina, također utječe i na aromatsku kompleksnost vina od početka alkoholne fermentacije (www.lallemandwine.com).

lonys^{WF}

lonys^{WF} je selekcija vinskog kvasca bolje prilagođenog uvjetima uzrokovanim globalnim zatopljenjem. *lonys^{WF}* je *Saccharomyces cerevisiae* kvasac specifičnog i jedinstvenog metabolizma koji sintetizira značajne koncentracije glicerola, do 15 gL⁻¹ i organskih kiselina. *lonys^{WF}* prvi je selekcionirani kvasac unutar vrste *Saccharomyces cerevisiae* koji ima sposobnost značajnog i prirodnog zakiseljavanja mošta tijekom fermentacije. Također, specifična je proizvodnja vina niže alkoholne jakosti, do 0,4-0,8 vol.% alkohola manje u usporedbi s drugim kvascima u istim uvjetima. Većini vinskih kvasaca potrebno je 16,8 g šećera da bi proizveli 1 vol.% alkohola, dok je kvascu *lonys^{WF}* potrebno 17,3 g šećera da bi proizveo istu količinu alkohola. *lonys^{WF}* prilagođen je za fermentaciju crnih vina i dobivanje uravnoteženih vina veće svježine (www.lallemandwine.com).

Osnovna fizikalno-kemijska analiza vina

Osnovni parametri kakvoće vina poput alkoholne jakosti (vol %), ukupne kiselosti (gL⁻¹ kao vinska), pH vrijednosti, reducirajućih šećera (gL⁻¹), ukupnog suhog ekstrakta (gL), ekstrakta bez šećera (gL⁻¹), hlapljive kiselosti (gL⁻¹), pepela (gL⁻¹) određeni su prema metodama O.I.V.-a (2012).

Određivanje organskih kiselina

Organske kiseline vina- vinska, jabučna, limunska, mliječna i jantarna kiselina određene su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (Agilent 1050, Palo Alto, SAD). Uzorak je prethodno filtriran uz pomoć PTFE membranskih filtera (0,45 μm). Kvantifikacija i identifikacija provedene su na valnoj duljini λ= 210 nm na Aminex HPX-87H (BioRad, Hercules, CA, SAD) (Puhelek, 2016).

Određivanje ukupnih antocijana

Ukupni antocijani određeni su spektrofotometrijski, metodom izbjeljivanja s natrijevim bisulfitom, a kao standard koristio se malvidin-3-O-glukozid. Alikvot uzorka od 1 mL se odpipetira i prenosi u epruvetu u koju se dodaje 1 mL 0,1 % HCl u 96 % etanolu (v/v) i 20 mL HCl u vodi (v/v). Otopina se podijeli u dvije epruvete, u svaku po 10 mL. U prvu epruvetu s otopinom dodaje se 4 mL 15 % otopine natrijevog metabisulfita (w/v), a u drugu 4 mL destilirane vode. Nakon 20 minuta mjere se apsorbancije pri λ=520 nm. Oduzimanjem apsorbancije uzorka bez dodatka natrijevog metabisulfita od apsorbancije uzorka koji je reagirao s natrijevim metabisulfitom dobiva se vrijednost koja se potom preračunava u masenu koncentraciju prema baždarnoj krivulji. Rezultat je izražen u ekvivalentima malvidin-3-O-glukozida (MAE mgL⁻¹).

Određivanje ukupnih fenola

Ukupni fenolni spojevi u vinu određeni su spektrofotometrijski prema metodi Singleton i Rossi (1965). Navedena metoda temelji se na kolornoj reakciji fenolnih spojeva sa Folin-Ciocalteu reagensom. Alikvot uzorka od 1 mL odpipetira se i prenosi u odmjernu tikvicu od 100 mL u koju se dodaje 60 mL destilirane vode i 5 mL Folin-Ciocalteu reagensa. Reakcijska smjesa miješa se točno 8 minuta i 30 sekundi, a potom se dodaje 20 mL Na₂SO₄ (γ= 200 gL⁻¹). Otopina se razrijedi do 100 mL s destiliranom vodom i ostavlja u vodenoj kupelji 2 sata na temperaturi od 20 °C. Apsorbancija je izmjerena na λ= 765 nm uz slijepu probu. Provedena su tri uzastopna mjerenja, a rezultat je srednja vrijednost izražena u ekvivalentima galne kiseline (GAE mgL⁻¹). Crno vino se razrjeđivalo u omjeru 1:5 s destiliranom vodom, a krajnji rezultat je pomnožen s faktorom razrjeđenja 5.

Određivanje pojedinačnih polifenolnih spojeva

Analiza pojedinačnih polifenolnih spojeva odrađena je na tekućinsko-kromatografskom sustavu (HPLC; Agilent 1100). Analiza je provedena na fenil-heksilnoj koloni (Phenomenex, SAD) uz detektor s nizom dioda. Analiza uzoraka traje 65 minuta. Kromatogrami se istovremeno bilježe detektorom s nizom dioda pri različitim valnim duljinama i fluorescencijskim detektorom na različitim valnim duljinama ekscitacije i emisije. Istovremeno se snimaju i UV-Vis spektri pojedinih sastavnica u rasponu valnih duljina od 200 nm do 650 nm. Identifikacija sastavnica vina provedena je usporedbom njihovih vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni te pripadnih UV-Vis spektara i fluorescencije na karakterističnim valnim duljinama ekscitacije i emisije s vremenima zadržavanja, spektrima i fluorescencijom standardnih spojeva. Masene koncentracije identificiranih spojeva određene su pomoću baždarnih krivulja načinjenih analizom vanjskog standarda (Puhelek, 2016).

Određivanje udjela glicerola u vinu

Za enzimatsko određivanje glicerola korišten je komercijalno dostupan enzimatski kit K-GCROL (Megazyme, Irska) koji sadrži reagense potrebne za 70 analiza i spektrofotometar Vari-an Cary 3 UV/VIS Spectrophotometer, SAD (www.megazyme.com).

Statistička analiza podataka

Razlike u kemijskom sastavu moštova i vina te utjecaju tretmana na kakvoću različitih varijanti vina sorte 'Frankovka', testirane su faktorskom analizom varijance (ANOVA). Značajnost razlika između razina faktora testirana je na razini značajnosti $p=5\%$, uz Bonferonijevu korekciju. Za sve analize varijance upotrebljavala se procedura iz statističkog paketa SAS (SAS Institute, Cary NC).

Rezultati i rasprava

Tablica 1. Osnovni fizikalno-kemijski sastav vina 'Frankovka' 2018.

Table 1. Basic physicochemical composition of Blaufränkisch wines, 2018.

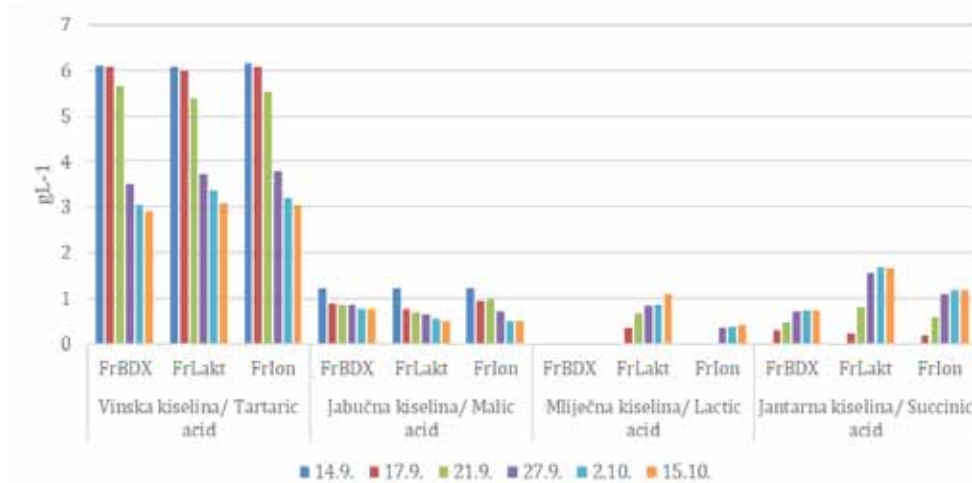
Parametar/Parameter	FrBDX	FrLakt	Frlon
Specifična težina/ Specific gravity (20/20°C)	1,00 ^a	1,00 ^a	1,00 ^a
Alkohol/ Alcohol (gL ⁻¹)	107,10 ^a	98,45 ^b	100,20 ^b
Alkohol/ Alcohol (vol%)	13,6 ^a	12,5 ^b	12,7 ^b
Ekstrakt ukupni/ Total extract (gL ⁻¹)	32,3 ^c	44,7 ^a	40,3 ^b
Šećer reducirajući/ Reducing sugar (gL ⁻¹)	5,7 ^c	13,3 ^a	9,2 ^b
Ekstrakt bez šećera/ Sugar-free extract (gL ⁻¹)	27,6 ^b	32,4 ^a	32,05 ^a
Ukupna kiselost/ Total acidity (kao vinska/as tartaric acid) (gL ⁻¹)	7,5 ^c	10,1 ^a	9,0 ^b
Hlapljiva kiselost/ Volatile acidity (kao octena kiselina/ as acetic acid) (gL ⁻¹)	0,64 ^b	0,67 ^a	0,63 ^c
Nehlapljiva kiselost/ Non-volatile acids (gL ⁻¹)	6,75 ^c	9,25 ^a	8,25 ^b
pH	3,38 ^a	3,30 ^a	3,31 ^a
Pepeo/ Ash (gL ⁻¹)	3,11 ^a	3,11 ^a	2,95 ^a

FrBDX = Uvaferm BDX™; FrLakt= Laktia™ + Uvaferm BDX™; Frlon= Ionys_{WF}™; Srednje vrijednosti označene različitim slovima (a,b,c) u istom redu, signifikantno su različite pri $p=0.05$

Tablica 1. prikazuje razlike u osnovnom fizikalno-kemijskom sastavu analiziranih vina sorte 'Frankovka'. U grožđu sorte 'Frankovka' zabilježena je relativno visoka koncentracija šećera od 106° Oe. Rezultati reducirajućeg šećera u vinima, potvrđuju spontani zastoj alkoholne fermentacije u sve tri varijante. FrBDX varijanta s koncentracijom reducirajućeg šećera od 5,7 gL⁻¹ i Frlon s 9,2 gL⁻¹ pripadaju kategoriji polusuhih vina, dok FrLakt s 13,3 gL⁻¹ pripada kategoriji poluslatkih vina (Pravilnik o kategorijama proizvoda od grožđa i vina, enološkim postupcima i ograničenjima, NN 114/2010). Uzrok zastoja fermentacije najvjerojatnije je bila visoka koncentracija šećera u moštovima i nagli pad temperature, što je značajno utjecalo na mikrobiološku aktivnost u posudama male zapremnine.

Koncentracije šećera u moštu odrazile su se na visoke koncentracije alkohola u vinima, uz statistički značajne razlike između varijanti. U vinu FrBDX, gdje je fermentacija bila najučinkovitija te su kvasci BDX iskoristili veću količinu šećera, izmjerena je najviša koncentracija alkohola (13,6 vol.%). U vinima Frlon i FrLakt utvrđena je niža alkoholna jakost, bez značajne razlike, za razliku od značajne razlike između koncentracija rezidualnih šećera.

Analiza ukupne kiselosti vina potvrdila je značajnu razliku između tri vina različitih tretmana. U varijanti FrLakt, u kojoj je protekla sekvencijalna fermentacija s *L. thermotolerans*, zabilježena je najviša ukupna kiselost od 10,1 gL⁻¹, slijedi je Frlon s 9,05 gL⁻¹ i varijanta FrBDX s 7,55 gL⁻¹. Također, u varijanti FrLakt zabilježena je najviša koncentraciju hlapljive kiselosti od 0,67 gL⁻¹. Fermentacije s različitim vrstama i sojevima kvasaca nisu značajno utjecale na pH vrijednost ni koncentraciju pepela.



FrBDX = Uvaferm BDX™; FrLakt= Laktia™ + Uvaferm BDX™; Frlon= Ionys_{WF}™

Grafikon 1. Promjene koncentracija organskih kiselina tijekom alkoholne fermentacije vina 'Frankovka' 2018.

Graph1. Organic acids concentration dynamics during alcoholic fermentation of Blaufränkisch wines, 2018.

Grafikon 1. prikazuje promjene koncentracija najvažnijih organskih kiselina vina za vrijeme alkoholne fermentacije, temeljem šest uzorkovanja u razdoblju od mjesec dana. Početne koncentracije vinske kiseline u vinima 'Frankovka' bile su oko 6 gL^{-1} . Tijekom fermentacije, koncentracije vinske kiseline smanjivale su se gotovo jednakom dinamikom u svim varijantama. Najviša koncentracija vinske kiseline kod posljednjeg uzorkovanja, zabilježena je u vinu FrLakt i iznosila je $3,05 \text{ gL}^{-1}$. Početne koncentracije jabučne kiseline iznosile su prosječno $1,2 \text{ gL}^{-1}$ kod svih analiziranih vina. U varijanti FrBDX bio je vidljiv najsporiji pad koncentracije jabučne kiseline, a prilikom zadnjeg uzorkovanja zabilježena je najviša koncentracija od $0,75 \text{ gL}^{-1}$. U vinima FrLakt i Frlon koncentracije jabučne kiseline kod posljednjeg uzorkovanja iznosile su $0,5 \text{ gL}^{-1}$, a kod FrLakt zabilježen je najveći pad koncentracije.

Najizraženije razlike, kao posljedica fermentacije različitim kvascima, pokazali su rezultati analize mliječne kiseline. Jedna od glavnih karakteristika kvasca *L. thermotolerans*, sinteza mliječne kiseline, potvrđena je i ovim istraživanjem. U varijanti FrLakt kod prvog uzorkovanja mliječna kiselina nije bila prisutna, no poslije drugog uzorkovanja koncentracija mliječne kiseline počinje postupno rasti sve do $1,09 \text{ gL}^{-1}$. Prisutnost mliječne kiseline u varijanti Frlon zabilježena je tek prilikom četvrtog uzorkovanja i rasla je do $0,41 \text{ gL}^{-1}$, što uz usporedni pad jabučne kiseline upućuje na spontanu malolaktičnu fermentaciju. Mliječna kiselina u varijanti FrBDX nije sintetizirana.

Koncentracije jantarne kiseline također su vidljiv pokazatelj razlike u radu kvasaca tijekom fermentacije. Vina FrLakt i Frlon imala su izrazito više koncentracije jantarne kiseline u odnosu na vino FrBDX.

Tablica 2. Koncentracija ukupnih fenola i antocijana (mgL^{-1}) u vinima 'Frankovka', 2018.

Table 2. Concentration of total phenols and anthocyanins (mgL^{-1}) in Blaufränkisch wines, 2018.

Uzorak/ Sample	FrBDX	FrLakt	Frlon
Ukupni fenoli/ Total phenols	2112,9 ^b	2309,3 ^a	2013,3 ^b
Ukupni antocijani / Total anthocyanins	995,0 ^a	1065,0 ^a	903,0 ^b

FrBDX = Uvaferm BDX™; FrLakt= Laktia™ + Uvaferm BDX™; Frlon= Ionys_{WF}™

Srednje vrijednosti označene različitim slovima (^{a,b,c}) u istom redu, signifikantno su različite pri $p=0,05$

Fenolni spojevi iznimno su važni za boju i strukturu crnih vina. Tablica 2. prikazuje značajnu razliku u koncentracijama ukupnih fenola. Značajno najviša koncentracija ukupnih fenola od $2309,34 \text{ mgL}^{-1}$ utvrđena je u vinu FrLakt, gdje je provedena sekvencijalna inokulacija s kvascima *L. thermotolerans* i *S. cerevisiae*. Ukupni fenoli u crnim vinima nalaze se u koncentracijama od 700 do 4059 mgL^{-1} (De Beer i sur., 2002).

Tablica 2. prikazuje i značajne razlike između analiziranih varijanti, obzirom na koncentracije ukupnih antocijana koje ovise o sorti i o starosti vina. U varijantama FrLakt i FrBDX zabilježene su značajno više koncentracije u odnosu na vino Frlon. Koncentracije antocijana mjerene u mladim vinima više su i kreću se između $100\text{-}1500 \text{ mgL}^{-1}$, a uvelike ovise i o slobodnom SO_2 (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Tablica 3. Koncentracije pojedinačnih fenolnih spojeva (mgL^{-1}) u vinima 'Frankovka', 2018.
Table 3. Concentration of individual phenolic compounds (mgL^{-1}) in Blaufränkisch wines, 2018.

Spoj/ Compound (mgL^{-1})	FrBDX	FrLakt	Frlon
Antocijani/ Anthocyanins			
Delfinidin-3-glukozid/ Delphinidin-3-glucoside	52,88 ^a	50,52 ^b	45,15 ^c
Cijanidin-3-glukozid/ Cyanidin-3-glucoside	2,41 ^a	2,11 ^b	1,70 ^c
Petunidin-3-glukozid/ Petunidin-3-glucoside	28,59 ^a	29,62 ^a	26,12 ^b
Peonidin-3-glukozid/ Peonidin-3-glucoside	18,63 ^a	17,31 ^b	14,01 ^c
Malvidin-3-glukozid/ Malvidin-3-glucoside	550,82 ^a	548,16 ^b	469,69 ^c
Σ	653,31^a	647,72^b	556,56^c
Flavonoli/Flavonols			
Miricetin-3-O-glukozid/ Myricetin-3-O-glucoside	19,66 ^b	20,77 ^a	18,97 ^b
Hiperosid/ Hyperoside	3,70 ^a	4,29 ^a	3,80 ^a
Kvercetin-3-O-glukozid/ Quercetin-3-O-glucoside	39,37 ^a	38,33 ^b	35,11 ^c
Kvercetin/ Quercetin	2,93 ^c	5,50 ^a	4,06 ^b
Kemferol/ Kaempferol	0,44 ^c	0,63 ^a	0,53 ^b
Izoramnetin/ Isorhamnetin	0,69 ^c	1,40 ^a	1,00 ^b
Σ	66,78^b	70,91^a	63,46^c
Hidroksicimetine kiseline/ Hydroxycinnamic acids			
Kaftarinska/ Caftaric	137,53 ^c	150,80 ^a	140,10 ^b
Kafeinska/ Caffeic	4,86 ^b	5,79 ^a	4,45 ^b
Kutarinska/ Cutaric	17,38 ^b	19,08 ^a	17,95 ^b
Kumarinska/ Coumaric	1,80 ^a	0,94 ^b	0,74 ^c
Fertarinska/ Fertaric	4,49 ^b	5,02 ^a	4,53 ^b
Ferulinska/ Ferulic	1,08 ^b	1,35 ^a	0,92 ^b
Σ	167,12^c	182,96^a	168,68^b
Hidroksibenzojeve kiseline/ Hydroxybenzoic acids			
Galna/ Galic	7,67 ^c	10,33 ^a	7,77 ^b
Flavanoli/ Flavanols			
Galokatehin/ Gallocatechin	1,64 ^{ab}	1,58 ^b	1,72 ^a
Procijanidin B1/ Procyanidin B1	2,43 ^a	1,79 ^b	1,31 ^c
Katehin/ Catechin	18,10 ^a	18,36 ^a	15,12 ^b
Procijanidin B2/ Procyanidin B2	6,21 ^a	5,39 ^b	4,35 ^c
Epikatehin/ Epicatechin	12,12 ^a	10,71 ^b	8,32 ^b
Σ	40,49^a	37,83^b	30,81^c
Rezveratrol glukozid/ Resveratrol glucoside	4,67 ^b	5,40 ^a	4,76 ^b

FrBDX = Uvaferm BDX™; FrLakt= Laktia™ + Uvaferm BDX™; Frlon= Ionys_{WF}™
Srednje vrijednosti označene različitim slovima (^{a,b,c}) u istom redu, signifikantno su različite pri p=0,05

U tablici 3. prikazani su rezultati analize pojedinačnih fenolnih spojeva u tri varijante vina 'Frankovka'. Očekivano, soj kvasca BDX™ utjecao je na veću ekstrakciju antocijana kod vina FrBDX, u kojem je zabilježena najviša koncentracija delphinidin-3-glukozida, cijanidin-3-glukozida, peonidin-3-glukozida i malvidin-3-glukozida. Vino FrLakt imalo je niže koncentracije pojedinačnih antocijana, no istaknulo se sa značajno najvišom koncentracijom petunidin-3-glukozida. Kod treće varijante, FrLon, utvrđene su značajno najniže koncentracije svih analiziranih pojedinačnih antocijana. Prema Ribéreau-Gayon i sur. (2006) koncentracija flavonola u crnim vinima kreću se do 100 mgL⁻¹. Rezultati analize pokazali su značajno najviše koncentracije miricetin-3-O-glukozida, kvercetin, kemferola i izoramnetina u vinu FrLakt, dok je u vinu FrBDX utvrđena značajno najviša koncentracija kvercetin-3-O-glukozida. U vinu FrLon zabilježene su najniže koncentracije ukupnih flavonola.

Koncentracije hidroksicimetnih kiselina u vinu ovise o različitim čimbenicima, kao što su rok berbe, sorta grožđa, klimatski uvjeti te uvjeti vinifikacije. Statistički značajna razlika u koncentracijama hidroksicimentnih kiselina vidljiva je iz tablice 3., pri čemu se izdvojilo vino FrLakt sa značajno najviših 182,96 mgL⁻¹. Najizraženija razlika vidljiva je kod rezultata kaftarinske kiseline, sa značajno najvišom koncentracijom od 150,80 mgL⁻¹ u vinu FrLakt. U istom vinu utvrđena je i najviša koncentracija hidroksibenzojevih kiselina, odnosno galne kiseline u koncentraciji od 10,33 mgL⁻¹.

Koncentracija flavanola uvelike ovisi o tehnologiji vinifikacije, znatno duži proces maceracije i više temperature tijekom maceracije utječu na više koncentracije monomernih flavanola i tanina koji se ekstrahiraju iz sjemenki (Herjavec, 2019). Na višu koncentraciju flavanola utjecala je fermentacija provedena s kvascem BDX™ koji je pojačao ekstrakciju tanina u vino, isto kao i antocijana. U vinu FrBDX zabilježene su značajno najviše koncentracije epikatehina, galokatehina te procijanidina B1 i B2, dok je u varijanti FrLakt zabilježena najviša koncentracija katehina. U vinu FrLon izmjerene su najniže koncentracije flavanola.

Rezultati analize pokazali su da je u vinu FrLakt bila značajno najviša koncentracija rezveratrol glukozida, najznačajnijeg predstavnika stilbena, u koncentraciji od 5,40 gL⁻¹.

Tablica 4. Koncentracija glicerola (gL⁻¹) u vinima 'Frankovka', 2018.

Table 4. Concentration of glycerol (gL⁻¹) in Blaufränkisch wines, 2018.

Spoj/ Compound (gL ⁻¹)	FrBDX	FrLakt	FrLon
Glicerol/ Glycerol	7,73 ^b	7,72 ^b	7,82 ^a

FrBDX = Uvaferm BDX™; FrLakt= Laktia™ + Uvaferm BDX™; FrLon= Ionys_{WF}™

Srednje vrijednosti označene različitim slovima (a,b,c) u istom redu, signifikantno su različite pri p=0,05

Udio glicerola u vinu ovisi o sastavu mošta, koncentraciji šećera, temperaturi alkoholne fermentacije i soju kvasca koji provodi fermentaciju. U crnim vinima, koncentracija glicerola kreće se približno oko 10 gL⁻¹ (Herjavec, 2019). Tablica 4. prikazuje rezultate u kojima su vidljive značajne razlike u koncentraciji glicerola u vinima. Očekivano, značajno najviša koncentracija od 7,82 gL⁻¹, utvrđena enzimskom analizom bila je u vinu FrLon, inokuliranim sa selekcioniranim kvascem Ionys_{WF}™, čija je glavna karakteristika povećana sinteza glicerola u vinu.

Zaključak

Na temelju istraživanja provedenog u berbi 2018., na vinu sorte 'Frankovka', u kojem je cilj bio istražiti učinke različitih sojeva kvasaca *Saccharomyces cerevisiae* i *Lachancea thermotolerans*, utvrđene su značajne razlike između vina različitih tretmana.

U svim varijantama, alkoholna fermentacija se spontano zaustavila pri različitim koncentracijama rezidualnih šećera. Sekvencijalna inokulacija provedena s *L. thermotolerans* i *S. cerevisiae* (FrLakt) pokazala je značajan učinak na ukupnu kiselost, odnosno rast koncentracija mliječne i jantarne kiseline. U vinu FRLakt, zabilježena je i značajno najviša koncentracija ukupnih fenola, kao i flavonola, galne kiseline, hidroksicimentnih kiselina i stilbena. U kontrolnom vinu FrBDX (Uvaferm BDX™) zabilježene su značajno više koncentracije pojedinačnih antocijana i flavanola. Značajno najviša koncentraciju glicerola, uz višu ukupnu kiselost, zabilježena je u vinu Frlon, proizvedenim s kvascem Ionys[™] WF.

Istraživanjem je potvrđen učinak sekvencijalne inokulacije s ne-*Saccharomyces* vrstom *L. thermotolerans* na nagašavanje svježine u vinima uslijed povećanja koncentracije mliječne kiseline te na boju i strukturu vina uslijed više koncentracije ukupnih fenola. Na temelju dobivenih rezultata moguće je zaključiti da bi se ovakav tip fermentacije mogao primjenjivati u ekstremno toplim godinama ili u toplijim klimatima, u moštu s nedostatkom ukupne kiselosti. Daljnjim istraživanjima trebalo bi obuhvatiti učinke različitih *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* sojeva kvasaca, kao i njihovih kombinacija, na tijek alkoholne fermentacije i sastav vina različitih sorata.

Literatura

- Bešlić, Z., Todić, S., Marković, N., Atanacković, Z. (2010). Effect of pruning intensity on berry skin and must composition on cv. Blaufränkisch (*V. vinifera* L.). Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Serbia 1153-1157.
- De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W.C.A., Manley, M. (2002). Phenolic compounds: A review of their possible role as In Vivo antioxidants of wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 23, 48-71
- Herjavec, S. (2019). *Vinarstvo*, Zagreb, Nakladni zavod Globus.
- Margalit, Y. (1997). *Concepts in Wine Chemistry*. The Wine Appreciation Guild, San Francisco, CA.
- Mateo, J. J., Maicas, S. (2016). Application of Non-*Saccharomyces* Yeasts to Wine-Making Process. *Fermentation*, 2, 14.
- Mirošević, N., Karoglan Kontić, J. (2008). *Vinogradarstvo*, Zagreb, Nakladni zavod Globus, 357.
- O.I.V. (2012). International code of oenological practices, 01, Paris.
- Pravilnik o kategorijama proizvoda od grožđa i vina, enološkim postupcima i ograničenjima, NN 114/2010.
- Puhelek, I. (2016). Sastav aromatskih spojeva, aminokiselina i organskih kiselina u vinima klonskih kandidata kultura kraljevina, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology* Volume 1, Second Edition. The Microbiology of Wine and Vinifications. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, West Sussex, England.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
<https://www.winemag.com/2019/01/09/the-rise-of-blaufrankisch-wine/>
<https://www.lallemandwine.com/en/eastern-countries/products/catalogue/>
<https://www.megazyme.com/glycerol-assay-kit/>
- Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., Nury, F. S. (2001). *Wine Analysis and Production*, New York, Van Nostrand Reinhold Publishing Co.

Prispjelo/Received: 10.10.2020.

Prihvaćeno/Accepted: 11.6.2021.

The impacts of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* yeast strains on changes in chemical composition of Blaufränkisch wine

Abstract

The aim of this research was to determine the effects of using different strains of yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Lachancea thermotolerans* on basic chemical composition, concentrations of individual organic acids, polyphenolic compounds and glycerol in wine. In the research conducted in 2018, Blaufränkisch grapes were used and three variants in controlled fermentation were compared. The control and the first variant were inoculated with *Saccharomyces* sp., commercial yeast strains of Uvaferm BDX™ and Ionys WF™. In another variant, sequential inoculation was performed with the non-*Saccharomyces* yeast species *Lachancea thermotolerans* (Laktia™), in the role of starter, and Uvaferm BDX™ yeast, whose role was to carry out the fermentation to the end. The results confirm the influence of the yeast Uvaferm BDX™ on the enhanced extraction of anthocyanins and tannins, and the influence of the yeast Ionys on the increased synthesis of glycerol in wine. Although there was a stuck fermentation, the effect of sequential inoculation on the increase in total acidity, color and structure of wine through increased concentration of total phenols was confirmed. Based on the obtained results, it is possible to justify the use of sequential inoculation in extremely warm years or in warmer climates where the problem of acid deficiency in grapes and must occurs.

Keywords: Blaufränkisch, non-*Saccharomyces* yeasts, phenolics, sequential fermentation, total acidity