

Utjecaj različitih vrsta bakterija mliječne kiseline na sastav i kakvoću vina 'Chardonnay'

Pranjić, Petra

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:159189>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**UTJECAJ RAZLIČITIH VRSTA BAKTERIJA MLIJEČNE
KISELINE NA SASTAV I KAKVOĆU VINA
‘CHARDONNAY’**

DIPLOMSKI RAD

Petra Pranjić

Zagreb, lipanj, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Hortikultura – Vinogradarstvo i vinarstvo

**UTJECAJ RAZLIČITIH VRSTA BAKTERIJA MLIJEČNE
KISELINE NA SASTAV I KAKVOĆU VINA
‘CHARDONNAY’**

DIPLOMSKI RAD

Petra Pranjić

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Ana-Marija Jagatić Korenika

Zagreb, lipanj, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Petra Pranjić**, JMBAG 0178113255, rođena 03.04.1998. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**UTJECAJ RAZLIČITIH VRSTA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE
NA SASTAV I KAKVOĆU VINA 'CHARDONNAY'**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Petre Pranjić**, JMBAG 0178113255, naslova

UTJECAJ RAZLIČITIH VRSTA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

NA SASTAV I KAKVOĆU VINA 'CHARDONNAY'

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Izv. prof. dr. sc. Ana-Marija Jagatić Korenika, mentor _____
2. Prof. dr. sc. Ana Jeromel član _____
3. Izv. prof. dr. sc. Zvezdana Marković član _____

Zahvala

Ovime zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ana-Mariji Jagatić Korenika na svojoj pomoći, potpori, strpljenju, savjetima te susretljivosti tijekom pisanja diplomskog rada.

Također se zahvaljujem prof. dr. sc. Ani Jeromel i prof. dr. sc. Bernardu Kozina koji su mi pomagali tijekom prerade grožđa i proizvodnje vina na Jazbini.

Posebno hvala mojoj obitelji i dečku Mateju na strpljenju, podršci i razumijevanju tijekom cijelog studiranja.

Za kraj, veliko hvala svim profesorima i djelatnicima sa Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo koji su svojim znanjem i prijateljskim pristupom omogućili lakše i zanimljivije studiranje.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Cilj istraživanja.....	1
2. Pregled literature	2
2.1. Sorta 'Chardonnay'	2
2.1.1. Obilježja sorte 'Chardonnay'	3
2.2. Organske kiseline	4
2.3. Malolaktična fermentacija.....	5
2.3.1. Bakterije mliječne kiseline	6
2.3.2. Malolaktična fermentacija u proizvodnji bijelih vina	7
2.3.3. Čimbenici koji utječu na MLF	8
2.3.4. Prednosti i mane provođenja MLF	8
3. Materijali i metode.....	10
3.1. Berba i prerada grožđa.....	10
3.2. Postavljanje pokusa.....	13
3.3. Fizikalno-kemijska analiza	20
3.4. Senzorna analiza.....	20
4. Rezultati i rasprava	21
4.1. Kretanje šećera	21
4.2. Koncentracije organskih kiselina	23
4.3. Fizikalno-kemijska analiza	25
4.3.1. Specifična težina.....	25
4.3.2. Alkoholna jakost.....	26
4.3.3. Ekstrakt vina	26
4.3.4. Rezidualni šećer.....	27
4.3.5. Ukupna i hlapljiva kiselost.....	27

4.3.6. pH vrijednost.....	28
4.3.7. Ukupni, slobodni i vezani sumporov dioksid (SO ₂).....	28
4.3.8. Pepeo	29
4.4. Senzorno ocjenjivanje	30
5. Zaključak.....	33
6. Popis literature.....	34
Životopis	36

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Petre Pranjić**, naslova

UTJECAJ RAZLIČITIH VRSTA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE NA SASTAV I KAKVOĆU VINA 'CHARDONNAY'

Chardonnay je sorta bijelog grožđa koja je u posljednjih 25 godina jedna od najpopularnijih sorata u svijetu. Izuzetno je prilagodljiva i rasprostranjena u različitim klimatskim zonama uzgoja vinove loze. To je sorta koja se smatra "ulaznicom" na tržište vina za nove proizvođače, posebno u zemljama Novog svijeta. Kvaliteta svakog vina uvjetovana je raznim biokemijskim reakcijama u koje se ubraja i malolaktična fermentacija. To je proces biološkog otkiseljavanja odnosno transformacije jabučne kiseline u mliječnu kiselinu uz oslobađanje CO₂, a provode ga određene vrste bakterija mliječne kiseline.

U ovom radu, nakon inokulacije različitih vrsta bakterija mliječne kiseline praćene su koncentracije organskih kiselina te su provedene fizikalno-kemijske, instrumentalne i senzorne analize kojima je utvrđen utjecaj malolaktične fermentacije na sastav i kakvoću vina 'Chardonnay'.

Ključne riječi: 'Chardonnay', *Lactobacillus plantarum*, malolaktična fermentacija, *Oenococcus oeni*

Summary

Of the master's thesis – student **Petra Pranjić**, entitled

THE INFLUENCE OF DIFFERENT SPECIES OF LACTIC ACID BACTERIA ON THE COMPOSITION AND QUALITY OF CHARDONNAY WINE

Chardonnay is a white grape variety that has been one of the most popular varieties in the world for the last 25 years. It adapts extremely well, and it is widespread in different climate zones. It is a variety that is considered “a ticket” to the wine market for new winemakers, especially in the countries of the New World. The quality of each wine is determined by various biochemical reactions, including malolactic fermentation. Malolactic fermentation is a process of biological deacidification breakdown of malic into lactic acid with the release of CO₂ and is carried by certain lactic acid bacteria species. In this paper, after the inoculation of different types of lactic acid bacteria, the concentrations of organic acids were monitored, and a physicochemical, instrumental, and sensory analysis were performed to determine the composition and quality of 'Chardonnay' wines.

Keywords: 'Chardonnay', *Lactobacillus plantarum*, malolactic fermentation, *Oenococcus oeni*

1. Uvod

Chardonnay je sorta koja svoje podrijetlo vuče iz Francuske, odnosno Burgundije. Do kraja 20. st. ampelografi su ga povezivali sa sortom 'Pinot bijeli', dok nije utvrđeno da je 'Chardonnay' potpuno samostalna sorta. Danas je rasprostranjen diljem svijeta i smatra se jednom od najpopularnijih sorata. Neki ga čak smatraju i sinonimom za bijela vina (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008). Upravo zbog svoje prilagodljivosti raširen je u svim klimatskim zonama, tako da se i kod nas također prostire u cijeloj zemlji. Upotrebljava se za proizvodnju različitih vinskih stilova i to je samo jedan od razloga njegove popularnosti.

Alkoholna fermentacija koju provode kvasci je složen biokemijski proces kojim nastaje vino. Jedan od biokemijskih procesa je i malolaktična fermentacija (MLF) tijekom koje bakterije mliječne kiseline (BMK) razgrađuju jabučnu kiselinu do mliječne. O provođenju malolaktične fermentacije potrebna je odluka već na početku vinifikacije kako bi se moglo odrediti pravo vrijeme inokulacije te prava metoda. Također, ovisi i o sastavu te željenom stilu vina (Vrbanac, 2012).

Malolaktična fermentacija je oduvijek bila prihvaćena u proizvodnji crnih vina, dok su u proizvodnji bijelih vina mišljenja i dalje podijeljena. Kod zrelih vina kod kojih se želi utjecati na kompleksnost i mekoću, svakako se preporučuje. Tijekom malolaktične fermentacije dolazi do mikrobiološke stabilnosti te nastaje veća aromatska kompleksnost nakon čega vino postaje mekše, zaobljenije i blaže (Boulton i sur., 1996).

Oenococcus oeni je enološki najvažnija bakterija mliječne kiseline, a uz nju koriste se i selekcije bakterije *Lactobacillus plantarum* koja je učinkovita i pri visokoj pH vrijednosti vina.

1.1. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada bio je pratiti kretanje i koncentracije organskih kiselina tijekom malolaktične fermentacije te utvrditi osnovna fizikalno-kemijska te senzorna svojstva vina 'Chardonnay', obzirom na primijenjene MLF tretmane.

2. Pregled literature

2.1. Sorta 'Chardonnay'

Chardonnay je bijela sorta grožđa čije se podrijetlo povezuje s Francuskom, odnosno regijom Burgundijom, gdje čak postoji i selo imena Chardonnay. Dugo vremena povezivan je s 'Pinot' grupom sorata i čak smatran njihovim mutantom (Priewe, 2019). Podrijetlo sorte je teško utvrditi i u većini slučajeva je još uvijek nepoznato, međutim primjenom molekularno-genetičkih metoda moguće je utvrditi roditeljstvo i dokazati autohtonost (Maletić, 2020). Sve do 1990-ih ampelografi vjeruju da je njegova genetika ista kao i kod sorte 'Pinot bijeli', dok detaljnija istraživanja nisu pokazala da su to dvije različite sorte, odnosno da je 'Chardonnay' potpuno samostalna sorta (Priewe, 2019). Razlikuju se i po morfološkim i fenološkim značajkama. Novija genetička istraživanja, putem SSR markera, utvrđuju kako je 'Chardonnay' spontani križanac sorata 'Pinot crni' i 'Gouais Blanc' ('Belina starohrvatska'). Jedan od sinonima za 'Chardonnay' je upravo i 'Pinot Chardonnay' kao i 'Chardonnay blanc', 'Chardonet', 'Aubain', 'Arnaison blanc' i još puno drugih.

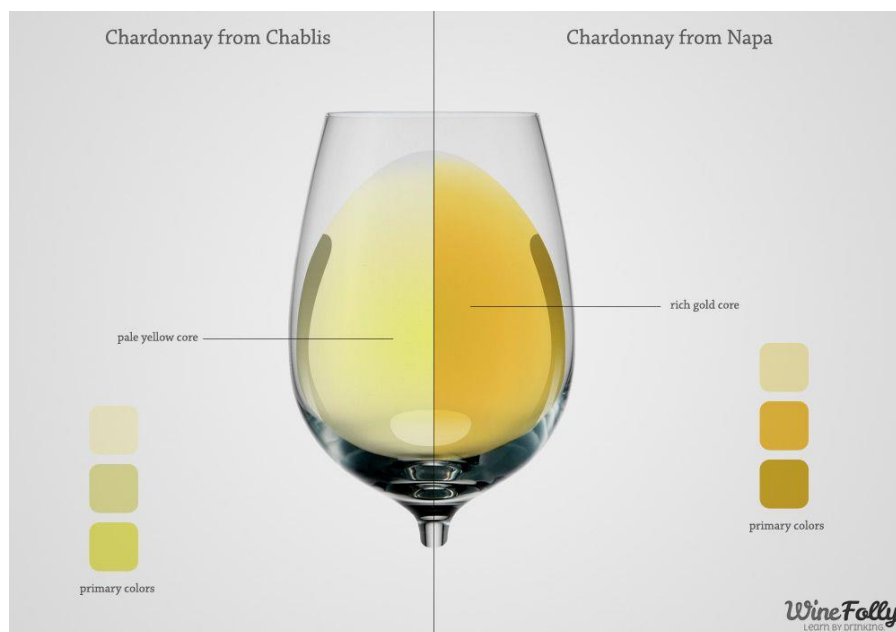
Krajem 80-ih i 90-ih prošlog st., širi se po cijelom svijetu, u sva vinogradarska područja te je danas jedna od najpopularnijih sorata (Hažić, 2007). Od svih bijelih sorti, on doživljava najbržu stopu rasta u posljednjih 25 godina te se diljem svijeta proizvode njegova vina od izvrsnih pa sve do sasvim običnih. Po zastupljenosti bijelih sorti druga je po redu u svijetu, dok je ukupno sedma. Smatra se 'ulaznicom' na tržište vina za nove proizvođače, posebno u zemljama Novog svijeta.

Izuzetno je prilagodljiv pa je tako rasprostranjen u svim klimatskim zonama, pogotovo u područjima umjerene klime (Maletić, 2020). U Hrvatskoj se prostire od Plešivice, Slavonije pa sve do toplijih krajeva kao što su Istra i Dalmacija. 2017. g. bio je na sedmom mjestu po zastupljenosti u Hrvatskoj. Jedan od razloga njegove popularnosti je što se koristi za razne vinske stilove. Naravno, ovisno o njegovom klonu, području i načinu uzgoja ovisi i kategorija kakvoće vina.

Najpoznatija vina su upravo ona iz Burgundije npr. Montrachet, Corton-Charlemagne i Chablis *grand cru*. Uz 'Pinot crni' i 'Pinot Meunier', 'Chardonnay' je jedna od tri sorte koje se koriste u proizvodnji šampanjaca. Pjenušci s etiketom *blanc de blancs* proizvode se od ove sorte. Osim u Europi, intenzivno je posađen i raširen u Kaliforniji, koja je poznata po „Wente klonu” selekcioniranom 1912. godine i smatra se kraljem kalifornijskih 'Chardonnay-a' (<https://daily.seventyfive.com/how-the-wente-clone-came-to-define-california-chardonnay/>). Napa, Sonoma County i Monterey samo su neka od područja gdje se „Wente klon” udomaćio. Osim ovog, 'Chardonnay' ima puno drugih klonova. U Čileu su vina sorte 'Chardonnay' koncentriranija i s hladnijih tala. Dolaze iz područja kao što su Casablanca, San Antonio i dolina Leyda. U Australiji su također najbolji 'Chardonnay-i' iz hladnijih područja poput Adelaide Hills, Victoria i Tasmanija (Jeromel, 2021).

Već spomenuto, prisutan je u različitim stilovima vina, ovisno o onome što vinar želi postići. Može se koristiti za proizvodnju svježih pjenušavih vina pa sve do kremastih, bogatih i dozrelih vina u drvu. Razlikuju se vina 'Chardonnay' odležana u hrastovim bačvama (*oaked*) i standardna, svježija vina (*unoaked*).

Vina 'Chardonnay' odležana u hrastovim bačvama povezujemo s područjima Kalifornije i Francuske, odnosno Burgundije (Jeromel, 2021). Vina su punijeg tijela u odnosu na ostala bijela vina, kremasta i bogata, s aromama drva (vanilije, maslaca i začina). Vina iz toplih klimata imaju tropske arome poput ananasa, a ona vina iz hladnih klimata imaju arome zelene jabuke i citrusa (<https://thegrapegrind.com/oaked-chardonnay-the-buttery-one/>). Čile i Novi Zeland su neka od područja gdje se proizvodi svježiji 'Chardonnay'. Ta vina su svježija, ne odležavaju u hrastovini i ovisno o zrelosti, arome koje prevladavaju su citrusi, breskva, ananas i zelena jabuka.



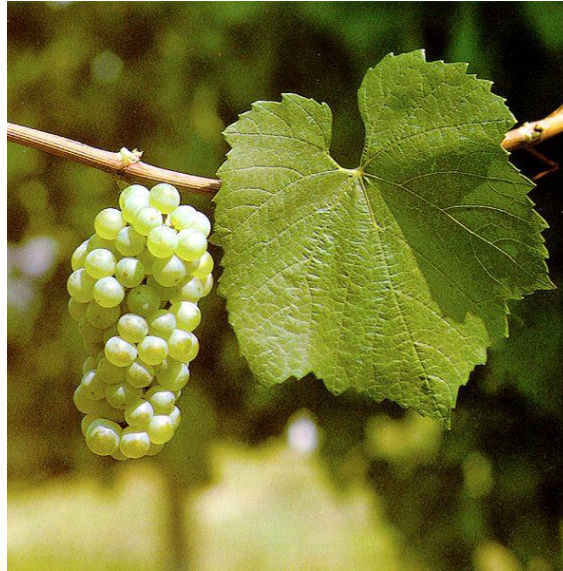
Slika 1: Stilovi vina 'Chardonnay'
Izvor: Wine Folly

2.1.1. Obilježja sorte 'Chardonnay'

Chardonnay ima dvospolan cvijet. Vršci mladica su bjelkasti i pahuljasti. Odrasli listovi su mu srednje veličine i okrugli, a sinus peteljke je otvoren i u obliku slova U. Može biti trodijelan, peterodijelan ili cijeli. Lice lista je golo, dok naličje može biti prekriveno s rijetkim paučinastim dlačicama. Plojka mu je neravna, hrapava ili mjehurasta.

Grozd je malen do srednje veličine, valjkast i zbijen. Zrele bobice su žućkastobijele boje, okruglaste ili malo duguljaste, a veličinom su male do srednje velike. Meso mu je sočno, a kožica tanka i prozirna (Mirošević i Turković, 2003). Nije prikladan kao zobatica.

Dozrijeva u II. razdoblju, kao i sorte grupe 'Pinot'. Oplodnja mu je redovita, a otpornost na niske temperature dobra. Pogoduju mu topla i propusna tla južnih ekspozicija. Moguća osjetljivost na Botrytis. Iako mu je sadržaj ukupnih kiselina jednak 'Pinot bijelom', obično nakuplja 2-3 % više sladora od njega (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008).



Slika 2: 'Chardonnay bijeli'
Izvor: www.krizevci.net

2.2. Organske kiseline

Nakon šećera, najzastupljeniji spojevi vina su organske kiseline. One su te koje utječu na okus vina, njegovu stabilnost, boju i pH vrijednost. Vinska, jabučna, limunska i jantarna kiselina su predstavnici, a u manjoj mjeri nalaze se mliječna, glukonska, glukoronska kiselina i ostale (Jeromel, 2019). Različite organske kiseline imaju različita organoleptička svojstva. Kiseline koje se nalaze u vinu dolaze iz dva izvora: tijekom primarne vinifikacije, iz grožđa će prijeći u mošt, te metaboličkom aktivnošću kvasaca i bakterija u procesima razgradnje kiselina iz grožđa i biosinteze tijekom fermentativnih procesa (Volschenk i sur., 2006).

Kiselost vina dijeli se na hlapljivu i nehlapljivu kiselost, a njihov zbroj daje ukupnu kiselost vina (Jackson, 2008).

Sve do faze šare koncentracija kiselina raste na račun nepotpune oksidacije šećera. Od trenutka šare kao izvor energije bobica koristi jabučnu kiselinu, a kiselost pada. U usporedbi s jabučnom kiselinom, koncentracija vinske kiseline tijekom dozrijevanja se ne smanjuje (Jackson, 2008). Jabučna kiselina se prirodno pojavljuje u L-obliku, dok D-jabučna kiselina nije prirodno prisutna u soku grožđa i ne metabolizira se od strane BMK (Hažić, 2007).

L-vinska kiselina koja je prvi puta izolirana u čistom stanju 1769. godine iz vinskog kamena nalazi se u svim zelenim dijelovima vinove loze. Stvara se u mladim organima kao što su bobica i lišće, dok se u već formiranom lišću ne stvara. Relativno je jaka organska kiselina i

locirana je u središnjem dijelu bobice. Iznad 37-40 °C u bobici počinje i njezina razgradnja, a u punoj zrelosti ona je najvećim dijelom u vezanom obliku, kao soli tartarati (Jeromel, 2019). Njena koncentracija će se nakon alkoholne fermentacije smanjiti jer se ona veže s ionima kalija i kalcija tvoreći kristale kalijevog bitartarata i kalcijevog tartarata koji se talože tijekom fermentacije (Conde i sur., 2007). Moreno i Peinado (2012) navode da vinska kiselina ima metalni karakter koji pojačava osjećaj trpkocće.

Zelena bobica u svojoj fazi rasta sadrži veće količine L-jabučne kiseline u usporedbi s punom zrelosti, odnosno nakon šare kada se njena koncentracija smanjuje. Jabučna kiselina je proizvod nepotpune oksidacije šećera u lišću gdje se kao jaki metaboliti razgrađuju na vodu i CO₂. U vinu je razgrađuju mliječno kisele bakterije u mliječnu kiselinu i CO₂ te kvasci u etanol i CO₂. Moreno i Peinado (2012) navode kako jabučna kiselina donosi zeleni i svjež okus koji podsjeća na zelenu jabuku. Isti autori navode da mliječna kiselina ima oštar, prepoznatljiv okus koji podsjeća na jogurt.

Mliječna kiselina se u niskim koncentracijama stvara metabolizmom kvasca tijekom alkoholne fermentacije, a većinom tijekom malolaktične fermentacije radom bakterija mliječne kiseline. Metabolizam organskih kiselina tijekom malolaktične fermentacije ima velik utjecaj na senzorna svojstva vina. Nakon provedene MLF dolazi do zamjene oštrog i zelenog okusa jabučne kiseline s blažim okusom mliječne. Ona vina kod kojih je protekla razgradnja jabučne kiseline postaju pitkija, bogatija i mekša (Plavša, 2020).

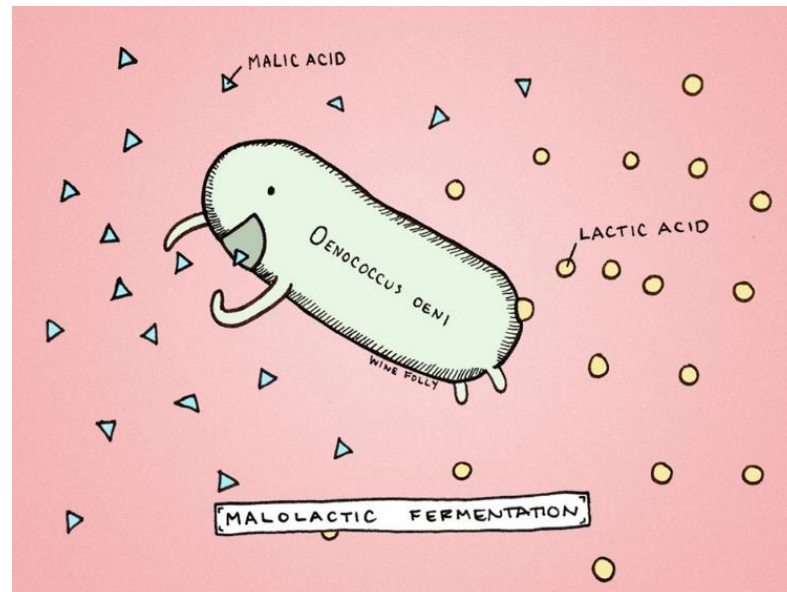
2.3. Malolaktična fermentacija

Ovisno o stilu vina i onome što vinar želi ovisi i hoće li se provoditi malolaktična fermentacija. Također, odluku o tome treba donijeti već na početku vinifikacije kako bi se mogla primijeniti odgovarajuća metoda i vrijeme inokulacije. Sama kvaliteta vina je posljedica brojnih biokemijskih procesa i reakcija među koje se može uvrstiti i malolaktična fermentacija. To je biološki proces u vinima izazvan od strane bakterija. U prošlosti je MLF mnogo češće protjecala spontano što rezultira negativnim posljedicama za vino (Hažić, 2007).

Malolaktična fermentacija (MLF) je biološki proces u kojem se događa razgradnja jabučne kiseline u mliječnu uz oslobađanje CO₂, a provode ga određene bakterije mliječne kiseline. Njihovi glavni produkti su mliječna kiselina i CO₂. Naravno, nastaju i sekundarni produkti koji utječu na senzorna svojstva, poput diacetila, acetaldehida, octene kiseline i sl. (blog.hannaservice.eu).

Kako bi ona bila brža i kontrolirana, krenulo se s ispitivanjima starter kultura i korištenjem selekcioniranih sojeva koji pridonose poboljšanju mirisa i okusa vina. Utjecaj malolaktične fermentacije ovisit će o sorti i soju mliječnih bakterija koje su i odgovorne za sami proces MLF. Razna istraživanja pomažu boljem razumijevanju hranidbenih potreba

malolaktičnih starter kultura i vezi kvasac-bakterije. Poznato je da periodično dolazi do manjka hranjiva koji podržavaju rast i razvoj BMK, ako kvasci s velikim nutritivnim zahtjevima provode alkoholnu fermentaciju. U takvoj situaciji medij (mošt, vino) treba obogatiti potrebnim tvarima. Ključna je pravilna ishrana kvasaca i bakterija mliječne kiseline (Hažić, 2007).



Slika 3: Malolaktična fermentacija
Izvor: sl.wilson-drinks-report.com

2.3.1. Bakterije mliječne kiseline

1886. godine Louis Pasteur potvrđuje postojanje bakterija mliječne kiseline i dokazuje kako su za fermentaciju bitni rast i razvoj mikroorganizama (Plavša, 2020). Kako se te bakterije prirodno nalaze na grožđu, mogu se naći i u podrumu, pa ako se ne spriječi, doći će do malolaktične fermentacije (Priewe, 2019). U trenutku porasta temperatura, u podrumu postaje toplije pa se fermentacije u vinu mogu ponovno aktivirati.

Razlikuju se dvije porodice bakterija mliječne kiseline: *Lactobacillaceae* s rodnom *Lactobacillus* i *Streptococcaceae* s rodovima *Oenococcus* i *Pediococcus*. Sve te bakterije su gram-pozitivne i nepokretne. Bakterije koje su izolirane iz mošta su *Oenococcus*, *Pediococcus* i *Lactobacillus* (Plavša, 2020). Zbog brojnih komercijalnih malolaktičnih bakterija danas je omogućeno bolje i brže provođenje procesa i razumijevanje istog. Iako je *Oenococcus oeni* enološki najvažnija bakterija mliječne kiseline i pokazuje se kao najadaptivnija, uz nju postoje i selekcije bakterija drugih rodova (Krieger-Weber i sur., 2020). Npr. *Lactobacillus plantarum* je bakterija mliječne kiseline koja se pokazuje kao najbolja za inokulaciju vina s visokom pH vrijednosti (Lerena i sur., 2016).

Bakterije mliječne kiseline provode jabučnu kiselinu u mliječnu na tri načina: putem oksaloctene i piruvične kiseline, piruvične kiseline ili direktnim prelaskom jabučne u mliječnu uz oslobađanje CO₂.

U kontroliranoj malolaktičnoj fermentaciji razgradnja jabučne kiseline od strane bakterija nije zaslužna za povećanu hlapljivu kiselost. Tom rastu često je razlog prisutnost epifitnih bakterija koje mogu biti unesene u vino uslijed loših higijenskih uvjeta te visokog pH koji im olakšava rast i razmnožavanje. One se razvijaju tako što koriste šećer kao izvor energije, a produkt je octena kiselina (Hažić, 2007).

Tablica 1: Podjela bakterija mliječne kiseline

Porodica i oblik stanice	Rod	Vrsta
<i>Lactobacillaceae</i> (štapićasti oblici)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus hilgardii</i>
<i>Streptococcaceae</i> (okrugli oblici)	<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus damnosus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i>
	<i>Oenococcus</i>	<i>Oenococcus oeni</i>

2.3.2. Malolaktična fermentacija u proizvodnji bijelih vina

Većina crnih vina prolaze tzv. drugu fermentaciju, nakon alkoholne fermentacije. To je upravo malolaktična fermentacija koja je dobila naziv po latinskoj riječi „*malum*” što znači jabuka. Nepoželjna je kod bijelih suhih vina koji imaju izražen voćni karakter, kod rosé vina i onih koji imaju niže koncentracije organskih kiselina jer MLF može negativno utjecati na senzorna svojstva. Bijela vina iz hladnijih klimata sadržavaju više jabučne kiseline, dok ona iz toplijih manje (Priewe, 2019). S godinama se promijenio ukus potrošača i traže se voćna bijela vina umjerenih i ugodnih kiselina pa je reduciranje ukupne kiselosti vina važan dio i vinifikacije bijelih vina.

Vina s visokom ukupnom kiselošću sadržavat će i više koncentracije jabučne kiseline koja im može dati grubi, kiseli okus. Nakon završetka malolaktične fermentacije, vino ne sadrži jabučnu kiselinu i okus im je mekši, bogatiji i zaobljeniji (Vrbanac, 2012).

2.3.3. Čimbenici koji utječu na MLF

Ako se želi provesti djelomična malolaktična fermentacija ili se želi spriječiti, provode se neki od postupaka poput bistrenja, dodavanja SO₂ i snižavanja temperature. Koristi se i lizozim koji je ekstrahiran iz bjelanjka jajeta koji se prvenstveno koristio u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Jeromel, 2019). On razgrađuje staničnu stijenku gram-pozitivnih bakterija (*Oenococcus*, *Pediococcus* i *Lactobacillus*).

SO₂, pH vrijednost, alkohol i temperatura samo su neki od čimbenika koji utječu na uspješnu malolaktičnu fermentaciju (Plavša, 2020). Ovi čimbenici djeluju sinergijski, ali isto tako moguće je da poželjna razina jedne komponente, ugrozi razinu druge komponente. Slobodan SO₂ bi trebao biti što niži kako ne bi kočio rast i razvoj malolaktičnih bakterija. Uz ove čimbenike, utjecaj još imaju i soj kvasca i mliječnih bakterija, hranjiva, koncentracija tanina i fenolnih kiselina, masne kiseline (C6-C12), rezidue fungicida i početna koncentracija jabučne kiseline. Neki kvasci imaju bolju kompatibilnost s određenim bakterijama i njihovim sojevima. U nekim uvjetima, određeni kvasci mogu proizvesti više koncentracije SO₂ koje mogu imati negativan utjecaj na MLF bakterije (Hažić, 2007). Odabir dobrog soja bakterija s pozitivnim svojstvima u kombinaciji s enološkim metodama vinifikacije vinaru daje kontrolu nad razvijanjem aromatskog profila. Sama kontrola provođenja MLF je presudna za uspješan proizvod.

2.3.4. Prednosti i mane provođenja MLF

Vrijeme inokulacije bakterijama mliječne kiseline može biti istovremeno s alkoholnom fermentacijom (koinokulacija) ili nakon alkoholne fermentacije (inokulacija). Koinokulacija je postupak u kojem se bakterije mliječne kiseline dodaju otprilike 24-48 sati nakon dodatka kvasca (Maslek, 2017). Njene prednosti su brži završetak, zadržavanje voćnih aroma i brže postizanje mikrobiološke stabilnosti te bakterije ne pate od manjka hranjiva i visokih koncentracija alkohola. Iako je u ovom tipu inokulacije moguć porast octene kiseline, brojna istraživanja svjedoče kako koinokulacija ne mora voditi ka tome. Kod inokulacije temperatura vina bi trebala biti iznad 20 °C, izražajnije su mliječne i maslačne arome te je potreban dodatak hranjiva (Jeromel, 2019).

Malolaktična fermentacija se prvenstveno provodi zbog smanjenja kiselosti, promjena mirisa i okusa, odnosno kompleksnosti arome i kod vina namijenjenih za dulje starenje. Ona vina koja prođu MLF imaju naglašenije tijelo, duži, izraženiji i bogatiji okus. Aroma vina postaje kompleksnija i složenija. Razgradnju jabučne kiseline prati povišenje pH, smanjenje ukupne kiselosti te sinteza novih kemijskih spojeva pa je tako vino bolje strukture i mekšeg okusa. Sporijom degradacijom jabučne kiseline stvaranje diacetila se povećava. To je diketon specifičnog mirisa na maslačno (Vrbanac, 2012). Neki vinari preferiraju provođenje MLF prije

ili istovremeno s alkoholnom fermentacijom, a u tom slučaju *Lactobacillus plantarum* ima prednost jer sprječava rast octene kiseline. Takva vina imaju manje izražene maslačne arome, a više voćnije.

Malolaktična fermentacija može proteći i spontano. Može početi odmah ili nakon nekoliko mjeseci po već završenoj alkoholnoj fermentaciji. U proljeće kada je u podrumu toplo, fermentirano vino opet može postati aktivno. U procesu spontane malolaktične fermentacije bakterije koje su zaslužne za taj proces dolaze iz vinograda, odnosno grožđa ili podrumske opreme (Priewe, 2019). Koliko će bakterije mliječne kiseline napredovati i razvijati se ovisi o izdržljivosti na povećanje koncentracije alkohola i otpornost na nizak pH (Lerena i sur., 2016). Kod spontane fermentacije se povećava rizik od kvarenja čime dolazi do razvoja neugodnih mirisa poput mirisa kiselog zelja, repe i pregorjelog maslaca.

3. Materijali i metode

3.1. Berba i prerada grožđa

Ručna berba sorte 'Chardonnay' provedena je 13.9.2021. godine na pokušalištu Jazbina u Vinogorju Zagreb. Pazilo se da grožđe do primarne prerade ostane cijelo, da ne bude oštećeno u berbi jer se tako sprječava mogućnost razvoja mane ili bolesti. Šećer je mjeran refraktometrom, a vrijednost je bila 95 °Oe.

Ukupna kiselost iznosila je 7,7 g/L, a pH vrijednost bila je 3,25.



Slika 4: Grozd sorte 'Chardonnay' na pokušalištu Jazbina
Izvor: Petra Pranjić

Nakon berbe i prije primarne prerade grožđe je hladeno u komori na 8°C oko 24 sata. Dodan je pektolitički enzim Lallzyme Cuvée blanc, Lallemand (2g/100kg). To je specifična pektinaza koncentrirane glukozidazne aktivnosti. Svojom aktivnošću omogućuje bolje istjecanje mošta i bistrenje nakon prešanja te olakšava taloženje, također zbog koncentrirane beta-glukozidazne aktivnosti povećava aromatsku kompleksnost bijelih vina (<http://www.pavin.hr>).



Slika 5: Lallzyme Cuvée Blanc
Izvor: www.brewing.hu

Grožđe je prešano pneumatskom prešom (do 2 bara), ne pod prevelikim pritiskom kako se ne bi povećala gruboća i potencijal oksidacije. Nakon primarne prerade dodana je 5 %-tna sumporasta kiselina (SUMPOvin). U mošt prije taloženja dodano je 50 mL/hL SUMPOvina. Prvenstveno se koristi kao antioksidativno i antimikrobiološko sredstvo čime omogućava bolju kvalitetu bez utjecaja na organoleptička svojstva (boja, okus i miris). Nakon što je mošt sulfitiran, uslijedilo je hladno taloženje 24 sata na 10 °C.



Slika 6: Preša na pokušalištu Jazbina
Izvor: Petra Pranjić



Slika 7: SUMPOvin
Izvor: Petra Pranjić



Slika 8: Masulj tijekom prešanja
Izvor: Petra Pranjić



Slika 9: Mošt od grožđa 'Chardonnay'
Izvor: Petra Pranjić

3.2. Postavljanje pokusa

U bistri mošt dodano je enološko sredstvo Optimum White, Lallemmand (30g/hL). To je specifičan inaktivan kvasac koji ima jaka antioksidativna svojstva. Otapa se u četiri puta većoj količini vode ili mošta, dobro promiješa i odmah dodati u mošt nakon bistrenja, na početku fermentacije. Namijenjen je primjeni kod bijelih vina i sudjeluje u očuvanju boje i aromatike te smanjuje mogućnost posmeđivanja vina. Istovremeno može biti i hrana za kvasce, iako sam ne može zamijeniti uobičajenu hranu za kvasce (www.pavin.hr).



Slika 10: Optimum White, Lallemand
Izvor: Petra Pranjić

Količina stvorenog taloga u moštu ovisi o sorti, zrelosti, zdravstvenom stanju grožđa i primarnoj preradi. 24 h nakon taloženja i odvajanja čistog mošta dodani su kvasci. Bistrri mošt podijeljen je u 4 staklene posude od 10 litara u 2 ponavljanja. Ostavljeno je otprilike 10 % praznog prostora jer tijekom fermentacije dolazi do stvaranja pjene i širenja tekućine uslijed oslobađanja topline.

Sve posude inokulirane su istim *Saccharomyces cerevisiae* kvascem Lalvin ICV D47 (Lallemand) koji je izoliran s grožđa na području Cotes du Rhone. Selekcioniran je među 450 izoliranih sojeva između 1986. i 1990. godine. Ima brzi početak fermentacije i proizvodi malo pjene, što omogućuje maksimalno korištenje kapaciteta. U vinima koja su inokulirana ovim kvascem malolaktična fermentacija jako dobro protječe. Na 100 litara mošta dodaje se 25 g suhog kvasca. Njega je potrebno pomiješati u 5 puta većoj količini čiste vode na 37 °C, ostaviti oko 15 minuta i zatim ga dodati u mošt. Uz njega dodan je i Goferm Protect Evolution, Lallemand (30 g/hL), odnosno starter za rehidraciju kvasca.



Slika 11: Posude za fermentaciju
Izvor: Petra Pranjic

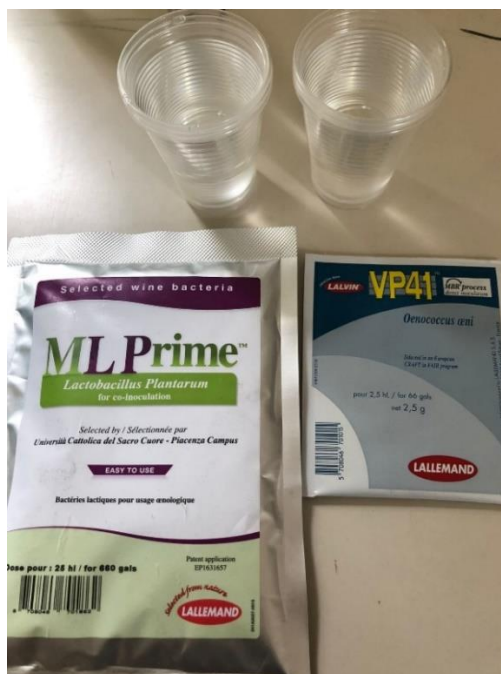


Slika 12: Kvasac Lalvin ICV D47 (Lallemand) i starter Goferm Protect evolution™
Izvor: Petra Pranjic



Slika 13: Rehidracija kvasca Lalvin ICV D47
Izvor: Petra Pranjić

24 sata nakon dodavanja kvasaca, uslijedile su inokulacije različitih bakterija mliječne kiseline, odnosno tretmani: (1) kontrola, bez MLF, (2) *Lactobacillus plantarum* (ML Prime, Lallemmand) 1 g/L , (3) *Lactobacillus plantarum* (ML prime, Lallemmand) 2 g/L i (4) *Oenococcus oeni* (Lalvin VP41, Lallemmand) 1 g/L. Temperatura prostora fermentacije bila je 18-20 °C.



Slika 14: Bakterije *Lactobacillus plantarum* i *Oenococcus oeni* u istraživanju
Izvor: Petra Pranjić



Slika 15: Bakterije mliječne kiseline prije inokulacije
Izvor: Petra Pranjić

Tijekom fermentacija praćene su koncentracije šećera i organskih kiselina. Nakon 1/3 alkoholne fermentacije 22.9.2021., pri otprilike 63 °C dodano je hranjivo Stimula 'Chardonnay', Lallemmand (4 g/10L). Od 1.10.2021. šećeri se prate kemijskom metodom u laboratoriju. Za određivanje šećera koristila se metoda po Rebelein-u.



Slika 16: Uzimanje uzoraka za analize
Izvor: Petra Pranjić



Slika 17: Određivanje koncentracija šećera u vinu
Izvor: Petra Pranjić

Po završetku alkoholne fermentacije, dodan je SO_2 (SUMPOvin) 10 mL/10L te sredstvo Redules, Lallemmand (1g/hL) koji se dodaje 24 sata prije pretoka. Redules™ je specifični inaktivni kvasac za otklanjanje nepoželjnih sumpornih spojeva u vinu, doprinosi kvaliteti vina i otklanja neugodne mirise. Slijedio je pretok vina i dodavanje sredstva Pure Lees Longevity™, Lallemmand (40 g/hL) te Noblesse™, Lallemmand (20 g/hL). Pure Lees Longevity™ je novi specifičan inaktivni kvasac koji sudjeluje u očuvanju vina od oksidacije jer nakon alkoholne fermentacije vino je jako osjetljivo na kisik. Noblesse™ je inaktivni kvasac koji pomaže u modifikaciji i stabilizaciji vina te rezultira s intenzivnijom strukturom i punijim okusom (www.pavin.hr).



Slika 18: Talog tijekom pretakanja vina
Izvor: Petra Pranjić



Slika 19: Pure Lees Longevity™, Lallemand
Izvor: Petra Pranjic



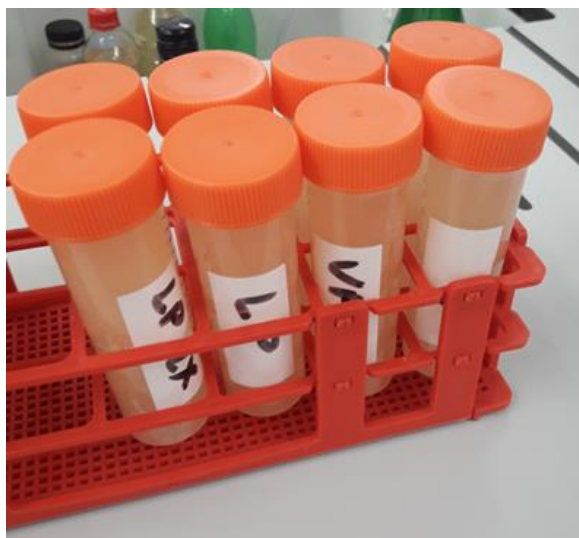
Slika 20: Noblesse™, Lallemand
Izvor: Petra Pranjic

3.3. Fizikalno-kemijska analiza

Dva mjeseca nakon alkoholne fermentacije napravljena je fizikalno-kemijska analiza svih vina na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, u laboratoriju Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo.

Ispitali su se parametri specifične težine (20/20°C), alkohola (% vol.), ukupni ekstrakt (g/L), reducirajući šećeri (g/L), ekstrakt bez šećera (g/L), ukupna kiselost kao vinska (g/L), hlapljiva kiselost kao octena (g/L), pH, slobodni, vezani i ukupni SO₂ (mg/L) i pepeo (g/L).

Tijek malolaktične fermentacije praćen je određivanjem koncentracija organskih kiselina koje su analizirane tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC). Uzorak vina se filtrira primjenom membranskog filtra veličine pora 0,22 μm te je potom izravno injektiran. Analiza je provedena uz izokratno eluiranje pri protoku od 0,6 mL/min, temperaturi kolone 65°C i detekciju pri 210 nm. Korištena kolona bila je kationski izmjenjivač Aminex HP-87H 300 x 7,8 mm i.d. (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) dok je kao pokretna faza korištena 0,0065%-tna vodena otopina fosforne kiseline.



Slika 21: Uzorci za fizikalno-kemijsku analizu
Izvor: Petra Pranjić

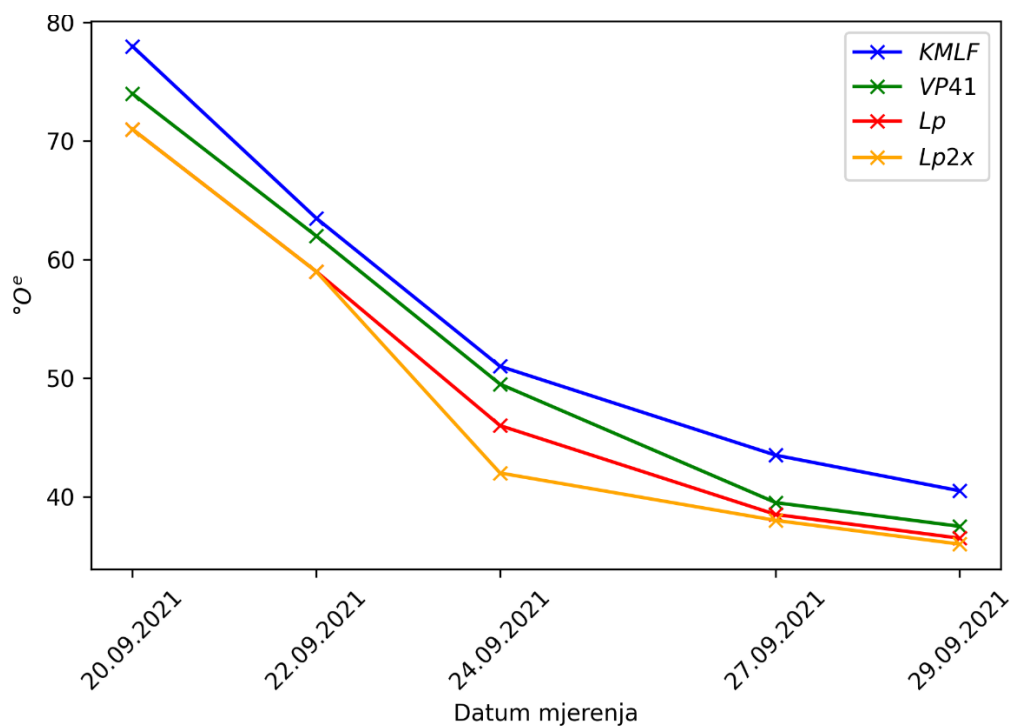
3.4. Senzorna analiza

Senzorna svojstva vina analiziralo je 5 certificiranih ocjenjivača metodom redosljeda uz Compusense. Ocjenjivači su rangirali četiri uzorka, a ispitala se punoća okusa, kakvoća mirisa i intenzitet kiselosti.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Kretanje šećera

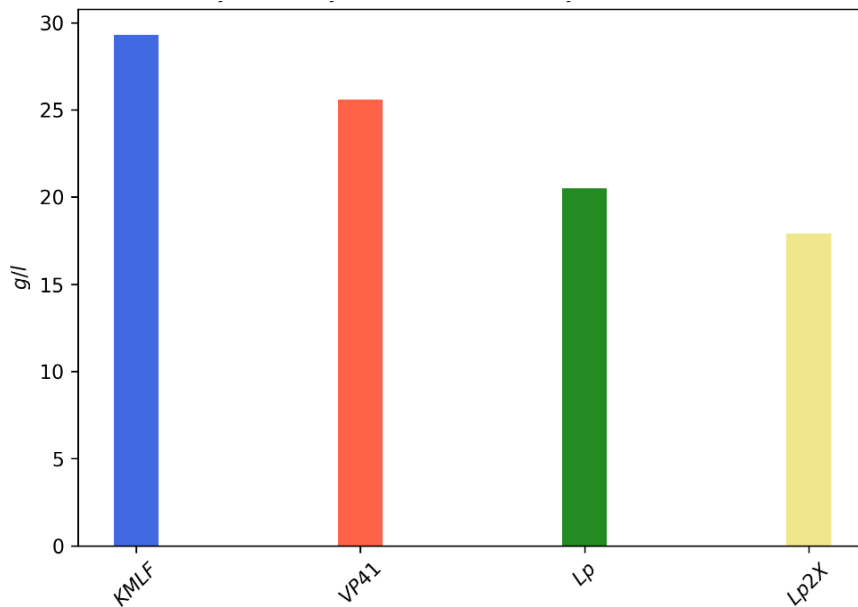
Tijek alkoholne fermentacije u periodu od 20.9.2021. do 29.9.2021. praćen je refraktometrijskim mjerenjem (O_e°) svaki drugi dan na pokušalištu Jazbina.



Graf 1: Dinamika alkoholne fermentacije

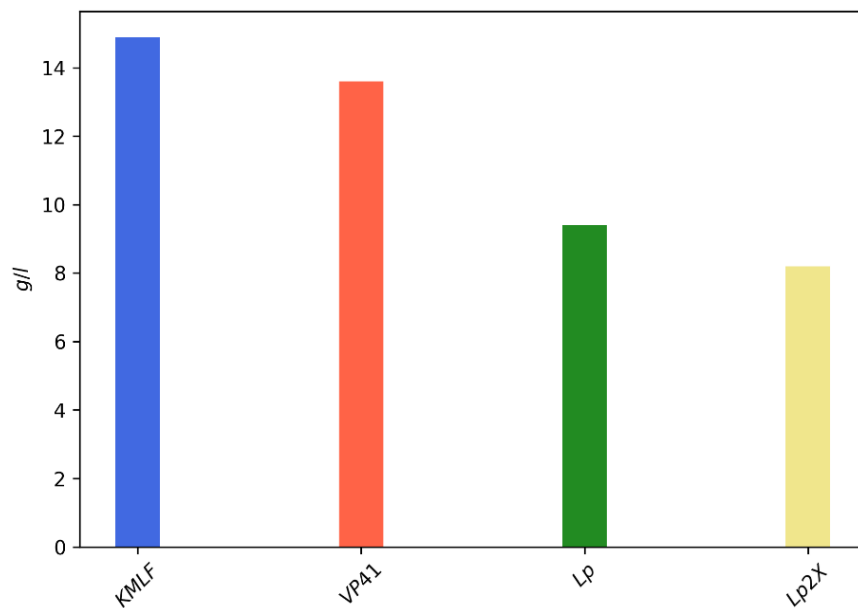
(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Na grafovima su prikazane vrijednosti šećera mjerene refraktometrom za kontrolni tretman (KMLF) koji je označen plavom bojom, tretman s *Oenococcus oeni* Lalvin VP41 označen zelenom bojom, te *Lactobacillus plantarum* – Lp (crvena boja) i *Lactobacillus plantarum* u duploj dozi (Lp2x) naznačen narančastom bojom. Šećeri su mjereni digitalnim i analognim refraktometrom te prikazuju kretanje i pad vrijednosti do otprilike 40 O_e° .

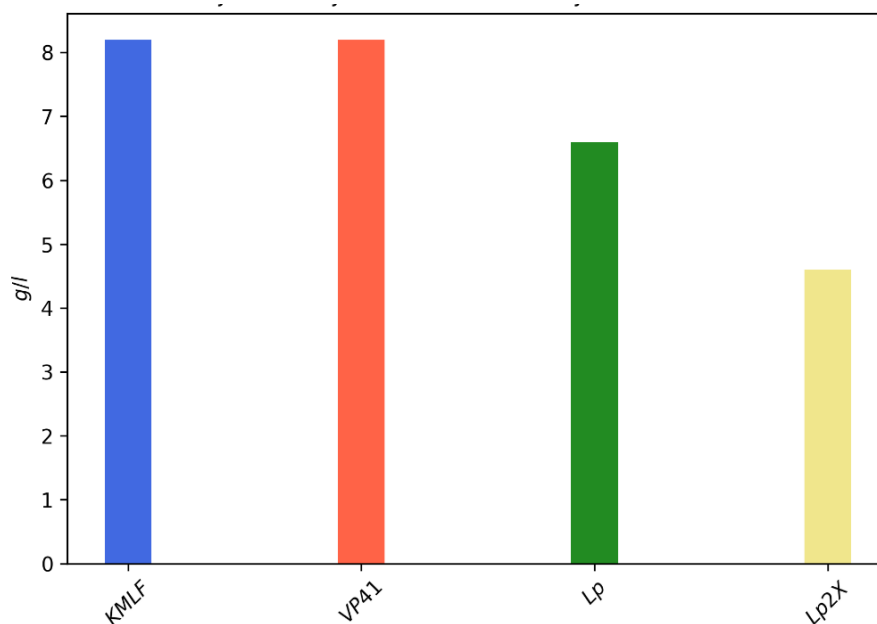


Graf 2: Koncentracija šećera (g/L) po tretmanima, 01.10.2021.
 (KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Na grafovima (2., 3. i 4.) prikazan je pad šećera u periodu od 1.10. do 11.10.2021. čije su vrijednosti mjerene u laboratoriju kemijskom metodom po Rebeleinu (g/L).



Graf 3: Koncentracije šećera (g/L) po tretmanima, 06.10.2021.
 (KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)



Graf 4: Koncentracija šećera (g/L) po tretmanima, 11.10.2021.
(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Graf 4. prikazuje kako su kontrolni tretman (KMLF) i tretman s bakterijom *Oenococcus oeni* Lalvin VP41 imali iste vrijednosti šećera dok je tretman s dvostrukom dozom *Lactobacillus plantarum* (Lp2x) rezultirao s najnižom vrijednosti šećera, odnosno najbržom razgradnjom šećera u istom razdoblju.

4.2. Koncentracije organskih kiselina

Glavne organske kiseline grožđa i vina su vinska, jabučna, limunska te jantarna. Njihova koncentracija mijenja se tijekom dozrijevanja grožđa i fermentacije te ovisi o puno čimbenika jer pojedini kultivari npr. sadrže više vinske kiseline u odnosu na jabučnu. Kako se u malolaktičnoj fermentaciji jabučna kiselina prevodi u mliječnu, potrebno je pratiti i njihove koncentracije. Koncentracije organskih kiseline pratile su se pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

14.9.2021. uzeti su uzorci mošta kako bi se odredile početne koncentracije organskih kiselina čije se vrijednosti mogu vidjeti u tablici 2.

Tablica 2: Koncentracije organskih kiselina (g/L) u moštu Chardonnay 2021

CH 2021 mošt	Limunska	Vinska	Jabučna	Jantarna	Mliječna
g/L	0,29	6,05	2,36	0	0

Koncentracije organskih kiselina (g/L) provjeravale su se u četiri navrata, odnosno svakih par dana do kraja malolaktične fermentacije.

Tablica 3: Prosječne koncentracije organskih kiselina (g/L) u vinima 'Chardonnay', 20.9.2021.

	Limunska	Vinska	Jabučna	Jantarna	Mliječna
VP41	0,61	5,90	2,44	0,18	0
Lp	0,61	5,74	1,44	0,21	0,73
Lp2x	0,60	5,75	0,98	0,22	1,49

(VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Prvi uzorci tijekom fermentacije uzeti su 20.9.2021. (tablica 3). U svim tablicama kontrolni tretman označen je oznakom KMLF, tretman bakterijom *Oenococcus oeni* Lalvin oznakom VP41, a tretmani bakterijom *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus plantarum* u duploj dozi s oznakama Lp i Lp2x.

Protjecanje malolaktične fermentacije očituje se kroz smanjenje koncentracije jabučne kiseline te rast mliječne. U tablici 3. može se vidjeti kako su kod svih tretmana BMK već započele razgradnju jabučne kiseline (5 dana od inokulacije), osim kod tretmana bakterijama *Oenococcus oeni* Lalvin (VP41) u kojem je koncentracija mliječne kiseline bila 0 g/L. Uočen je i rast limunske kiseline, kao i očekivani pad vinske kiseline koja se tijekom fermentacije gubi kroz taloženje tartarata.

Tablica 4: Prosječne koncentracije organskih kiselina (g/L) u vinima 'Chardonnay', 24.9.2021.

	Limunska	Vinska	Jabučna	Jantarna	Mliječna
KMLF	0,77	5,26	1,99	0,57	0
VP41	0,82	4,91	1,05	0,57	1,03
Lp	0,73	4,77	0,23	0,63	1,69
Lp2x	0,73	4,78	0	0,63	2,12

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

24.9.2021. uzorci su uzeti i poslani na analizu uz pomoć HPLC-a, kako bi se pratio daljnji tijek malolaktične fermentacije. Kod svih tretmana s bakterijama mliječne kiseline može se vidjeti pad jabučne kiseline i porast mliječne, dok se kod tretmana *Lactobacillus plantarum* bakterijom u dvostrukoj dozi može vidjeti najbrži završetak malolaktične fermentacije (12 dana), kada je koncentracija jabučne kiseline iznosila 0 g/L.

Tablica 5: Prosječne koncentracije organskih kiselina (g/L) u vinima 'Chardonnay', 27.9.2021.

	Limunska	Vinska	Jabučna	Jantarna	Mliječna
KMLF	0,79	4,73	1,74	0,69	0
VP41	0,68	4,49	0	0,67	1,71
Lp	0,71	4,52	0	0,7	2,04
Lp2x	0,71	4,52	0	0,74	2,34

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Tablica 5. prikazuje kako su 27.9.2021. uzeti uzorci za provjeru koncentracije organskih kiselina treći put. Koncentracije jabučne kiseline pale su na 0 g/L kod svih tretmana s bakterijama mliječne kiseline (15 dana), dok se kod kontrolnog tretmana vidi pad iste kiseline, ali bez sinteze mliječne kiseline što može biti posljedica taloženja malata.

Tablica 6: Prosječne koncentracije organskih kiselina (g/L) u vinima 'Chardonnay', 29.9.2021.

	Limunska	Vinska	Jabučna	Jantarna	Mliječna
KMLF	0,67	4,76	1,55	0,77	0
VP41	0,64	4,25	0	0,75	1,78
Lp	0,67	4,06	0	0,74	2,04
Lp2x	0,64	4,12	0	0,80	2,37

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Tablica 6. prikazuje koncentracije organskih kiselina posljednjeg mjerenja 29.9.2021. Malolaktična fermentacija je trajala nešto manje od dva tjedna. Najviše koncentracije mliječne kiseline zabilježene su kod tretmana s bakterijama *Lactobacillus plantarum* u dvostrukoj dozi (Lp2x) koji je i najbrže završio razgradnju jabučne kiseline, dok je tretman s bakterijom *Oenococcus oeni* Lalvin VP41, stvorio najnižu koncentraciju mliječne kiseline (1,78 g/L).

4.3. Fizikalno-kemijska analiza

Fizikalno kemijska analiza provedena je 8.12.2021. u laboratoriju Zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo, na Agronomskom fakultetu u Zagrebu.

4.3.1. Specifična težina

Prema Pravilniku o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, relativna gustoća pri 20 °C/20 °C (ili specifična težina pri 20 °C) je omjer gustoće nekog određenog volumena vina ili mošta pri 20 °C prema gustoći istog volumena vode pri istoj temperaturi.

Tablica 7: Specifična težina vina 'Chardonnay' 2021.

	KMLF	VP41	Lp	Lp2x
Specifična težina (20/20°C)	0,9900	0,9900	0,9892	0,9896

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Gledajući prethodnu tablicu možemo vidjeti kako kontrolni tretman i tretman s *Oenococcus oeni* Lalvin (VP41) imaju identičnu vrijednost, dok se kod bakterija *Lactobacillus plantarum* (Lp) i *Lactobacillus plantarum* u duploj dozi (Lp2x) mogu uočiti niže vrijednosti. Uzimajući u obzir sve tretmane, razlike u vrijednostima u zanemarive.

4.3.2. Alkoholna jakost

Alkoholna jakost izražena volumenom predstavlja broj litara etanola sadržanog u 100 litara vina.

Tablica 8: Prosječna alkoholna jakost vina 'Chardonnay' 2021.

	KMLF	VP41	Lp	Lp2x
Alkoholna jakost (g/L)	124,00	122,55	122,55	121,10
Alkohol (% vol.)	15,75	15,55	15,55	15,35

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Tablica 8. prikazuje alkoholnu jakost u g/L i % vol. Razlike u alkoholnoj jakosti vidljive su kod kontrolnog tretmana, koji ima najviše alkohola u odnosu na vrijednosti tretmana s bakterijama mliječne kiseline. Najviša alkoholna jakost zabilježena je kod kontrolnog tretmana (KMLF), a najniža kod tretmana s bakterijama *Lactobacillus plantarum* u dvostrukoj dozi (Lp2x).

4.3.3. Ekstrakt vina

Ekstrakt vina predstavlja sastojke koji su otopljeni u vinu ili prisutni u obliku koloida, to su oni sastojci koji ne mogu ishlapati. Svi ekstrakti se iskazuju u g/L (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03). Općenito, bijela vina sadrže između 16 i 19 g/L suhog ekstrakta, odnosno ekstrakta bez šećera.

Tablica 9: Prosječna koncentracija (g/L) ekstrakta vina 'Chardonnay' 2021.

	KMLF	VP41	Lp	Lp2x
Ekstrakt ukupni (g/L)	25,6	25,1	23,0	23,4
Ekstrakt bez šećera (g/L)	21,2	20,0	20,15	19,9

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Iz tablice 9. vidljive su male razlike između tretmana. Najveći ukupni ekstrakt zabilježen je u kontrolnom tretmanu, dok je tretman bakterijama *Lactobacillus plantarum* (Lp) imao najnižu vrijednost. Gledajući vrijednosti ekstrakta bez šećera uočavamo da je kontrolni tretman također imao najvišu vrijednost u odnosu na druge tretmane, ali je *Lactobacillus plantarum* u dvostrukoj dozi dao najnižu vrijednost ekstrakta bez šećera.

Iz prethodne tablice može se zaključiti kako svi tretmani sadrže više vrijednosti od onih koje općenito sadrže bijela vina.

4.3.4. Rezidualni šećer

Reducirajući šećeri su oni koji imaju funkcionalnu skupinu takvu da u alkalnoj sredini može reagirati s ionima bakra, to su aldehidne i keto skupine. Od tih šećera najzastupljeniji su glukoza i fruktoza. Prisutne su i pentoze, ali one nisu fermentabilne što znači da ih kvasac u procesu alkoholne fermentacije ne metabolizira i kao takvi čine rezidualne šećere vina. Prema Pravilniku o vinu, mirna vina se dijele prema količini neprovrelog šećera na suha (do 4 g/L), polusuha (između 4 g/L i 12 g/L), poluslatka (između 12 g/L i 50 g/L) i slatka (više od 50 g/L).

Tablica 10: Prosječna koncentracija rezidualnih šećera (g/L) u vinima 'Chardonnay' 2021.

	KMLF	VP41	Lp	Lp2x
Rezidualni šećer (g/L)	4,9	6,1	3,9	4,5

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Dobiveni rezultati prikazani su tablicom 10. i pokazuju da su sva vina, osim tretmana s bakterijom *Lactobacillus plantarum* (Lp), klasificirana kao polusuha vina. Vino inokulirano Lp bakterijama, uvršteno je u kategoriju suhih vina s obzirom na to da vrijednost šećera iznosila 3,9 g/L. Najveći ostatak šećera zabilježen je u tretmanu VP41, odnosno fermentacija se zaustavila najranije u odnosu na ostale tretmane.

4.3.5. Ukupna i hlapljiva kiselost

Ukupna kiselost izražava se kao vinska kiselina u g/L. Općenito u vinima, ukupna kiselost vina se kreće od 4 g/L pa sve do 14 g/L. Ukupna kiselost predstavlja sumu njegovih titrabilnih kiselina kada se titrira do pH 7 sa standardnom alkalnom otopinom. Hlapljiva kiselost označava homologne octene kiseline koje su prisutne u vinu bilo u slobodnom obliku ili u obliku soli, koji su nastali radom kvasaca ili bakterija tijekom ili nakon fermentacije (Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03). Ona se izražava kao octena kiselina u g/L, a maksimalna dopuštena koncentracija u bijelim i rosé vinima je 1,1 g/L. Njena povećana koncentracija može biti posljedica bolesti vina (octikavost).

Tablica 11: Prosječna koncentracija ukupne i hlapljive kiselosti u vinima 'Chardonnay' 2021.

	KMLF	VP41	Lp	Lp2x
Ukupna kiselost (kao vinska, g/L)	8,2	7,3	7,0	7,7
Hlapljiva kiselost (kao octena, g/L)	0,59	0,68	0,60	0,69

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Tablica 11. pokazuje kako su sve vrijednosti unutar zakonski dopuštenih koncentracija. Kod kontrolnog tretmana (KMLF) može se uočiti porast ukupne kiseline, dok kod svih tretmana inokuliranih mliječnim bakterijama primjećujemo njen pad, što je jedan od očekivanih ishoda provođenja MLF.

Također primjećujemo da je hlapljiva kiselost viša kod MLF tretmana u odnosu na kontrolni tretman, a najvišu hlapljivu kiselost uočavamo kod tretmana *Oenococcus oeni* Lalvin (VP41) koja iznosi 0,68 g/L i kod bakterije *Lactobacillus plantarum* u duploj dozi (Lp2x) koja iznosi 0,69 g/L.

4.3.6. pH vrijednost

pH vrijednost mjeri se pomoću pH-metra, odnosno elektrode uronjene u ispitivanu tekućinu. Optimalna pH vrijednost bijelih vina je između 3,0 i 3,3.

pH ili realna kiselost predstavlja negativan logaritam koncentracije vodikovih (H⁺) iona u nekoj otopini: $pH = -\log [H^+]$

Tablica 12: Prosječne pH vrijednost vina 'Chardonnay' 2021.

	KMLF	VP41	Lp	Lp2x
pH	3,36	3,48	3,44	3,43

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Tablica 12. prikazuje pH vrijednosti vina svih tretmana iz kojih se može zaključiti kako kontrolni uzorak (KMLF) ima najnižu pH vrijednost, što je ujedno i posljedica najviše ukupne kiseline. Vidljiv je rast pH vrijednosti u MLF tretmanima kao rezultat razgradnje jabučne kiseline.

4.3.7. Ukupni, slobodni i vezani sumporov dioksid (SO₂)

Sumporov dioksid (SO₂) u vinu se nalazi u slobodnom i vezanom obliku, a njegova upotreba u vinarstvu je praktički nezamjenjiva. Prema Pravilniku o kategorijama proizvoda od grožđa i vina, enološkim postupcima i ograničenjima, bijela i rosé vina ne smiju imati više od 200 mg/L ukupnog SO₂, osim kada imaju više od 5 g/L neprovrelog šećera, tada je njihova dopuštena koncentracija 250 mg/L.

Tablica 13: Prosječne koncentracije ukupnog, slobodnog i vezanog SO₂ u vinima 'Chardonnay'

	KMLF	VP41	Lp	Lp2x
SO ₂ slobodni (mg/L)	26,5	20,5	18,0	24,0
SO ₂ vezani (mg/L)	54,5	45,0	49,0	58,0
SO ₂ ukupni (mg/L)	81,0	65,5	67,0	82,0

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

U Tablici 13. može se vidjeti kako su koncentracije ukupnog SO₂ unutar dopuštenih koncentracija. Najviša koncentracija slobodnog SO₂ zabilježena je kontrolnom tretmanu, a najniža vrijednost u tretmanu *Lactobacillus plantarum* (18,0 mg/L). Promatrajući vezani i ukupni SO₂ najvišu vrijednost imao je tretman *Lactobacillus plantarum* u duploj dozi (Lp2x), a najnižu tretman *Oenococcus oeni* Lalvin (VP41).

4.3.8. Pepeo

Koncentracija pepela označuje ukupno sve produkte koji su ostali nakon žarenja taloga (550 °C) preostalog od isparavanja vina i označava mineralne tvari (K, Ca, Mg, Na, Fe, Al, Cu, anioni sulfata itd.). Nakon dobivene mase pepela, ona se množi s 50 kako bi se dobio rezultat u g/L. Prema Zakonu o vinu bijela vina moraju sadržavati najmanje 1,2 g/L pepela.

Tablica 14: Prosječne koncentracije (g/L) pepela u vinima 'Chardonnay' 2021.

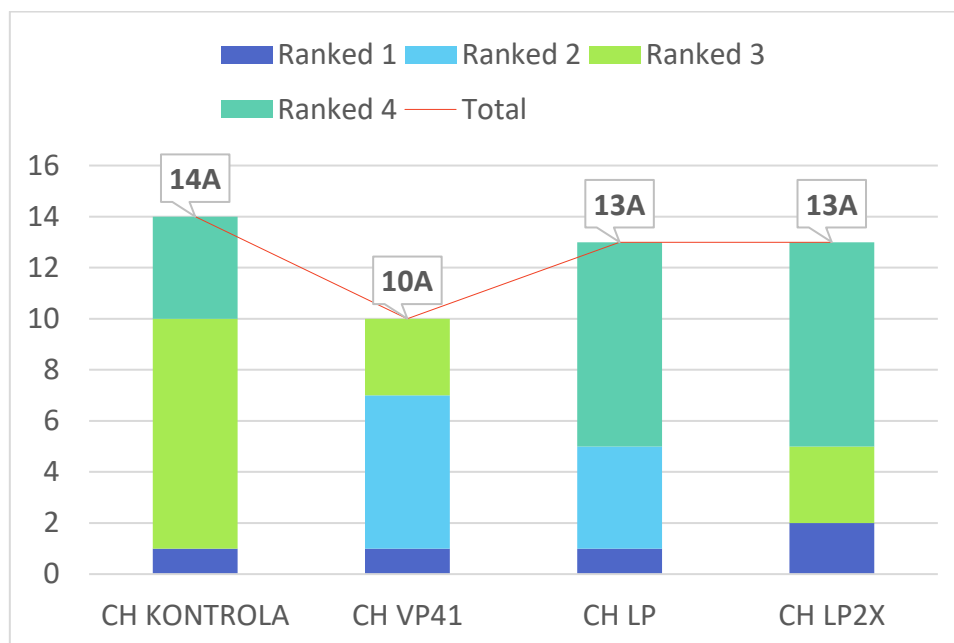
	KMLF	VP41	Lp	Lp2x
Pepeo (g/L)	1,57	1,66	1,2	1,57

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Dobiveni rezultati vidljivi su u Tablici 14. te se može zaključiti da vina svih tretmana, zadovoljavaju uvjete važećih propisa. Tretman *Oenococcus oeni* Lalvin VP41 imao je najvišu, dok je tretman *Lactobacillus plantarum* (Lp) imao značajno najnižu koncentraciju pepela koja je ujedno i zakonski najniža koncentracija za bijela vina.

4.4. Senzorno ocjenjivanje

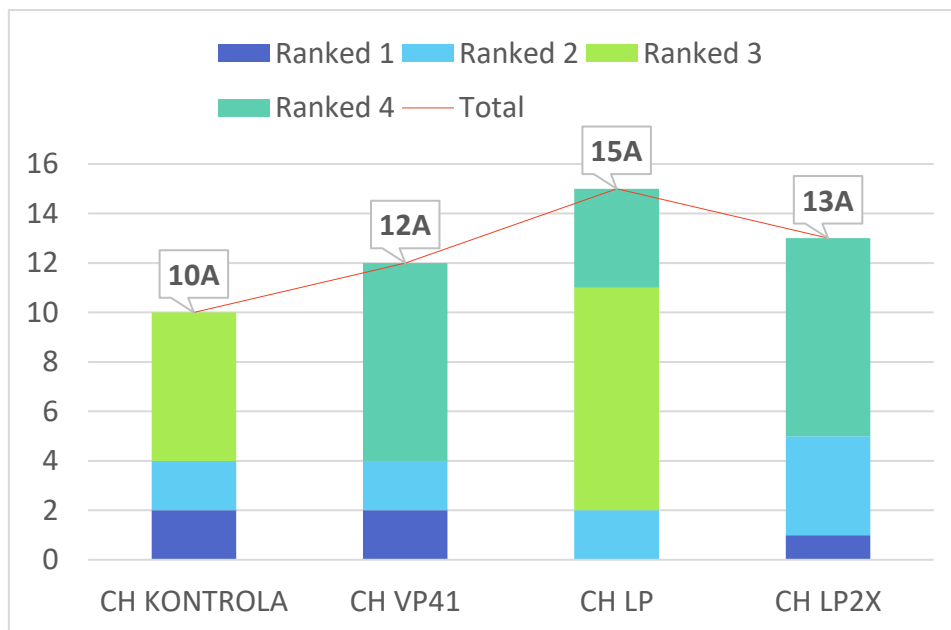
Šest mjeseci nakon početka istraživanja, odnosno tri mjeseca nakon analiza vina su i senzorno ocijenjena. Uz softver Compusense, metodom redosljeda, svojstva vina (kakvoću mirisa, intenzitet kiselosti i kakvoću okusa) ocjenjivalo je pet certificiranih ocjenjivača.



Graf 5: Kakvoća mirisa vina 'Chardonnay' 2021.

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

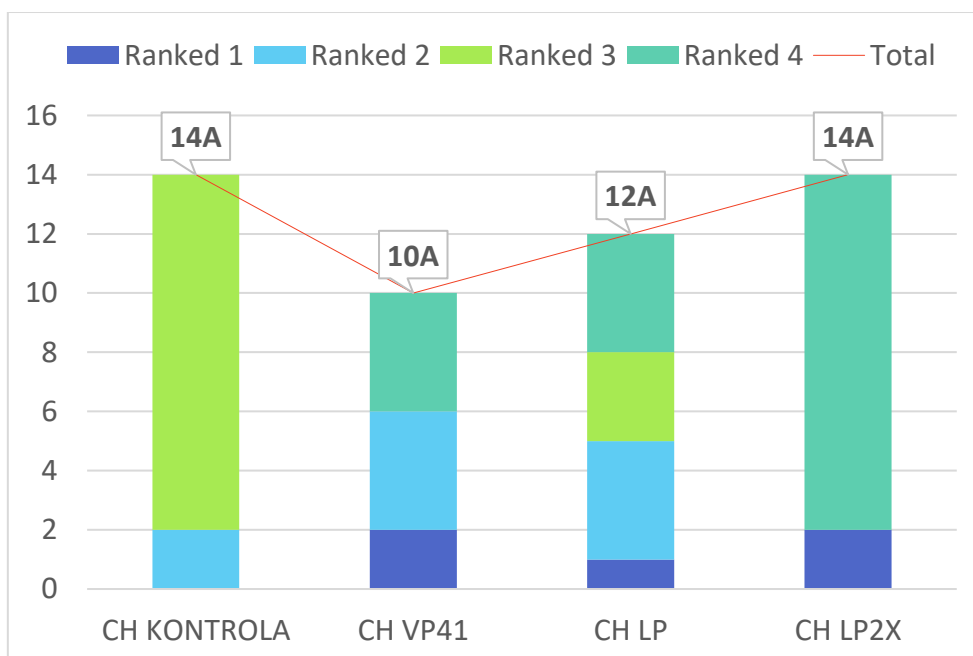
Graf 5. prikazuje rezultate za kakvoću mirisa vina u istraživanju. Uzorke vina trebalo je poredati prema kakvoći mirisa od najboljeg (1) do najlošijeg (4) što znači da je uzorak s najmanjim zbrojem bodova najbolje ocijenjen. Prvi uzorak ili kontrolni tretman ocijenjen je kao vino najniže kakvoće mirisa, dok je tretman s bakterijom *Oenococcus oeni* - CH VP41 ocijenjen kao najbolji.



Graf 6: Intenzitet kiselosti u vinima 'Chardonnay' 2021.

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

U grafu 6. prikazane su ocjene intenziteta kiselosti. Graf prikazuje kako je CH kontrolni tretman ocijenjen najnižom ocjenom, u ovom slučaju broj 1 u ocjenjivanju predstavlja najkiseliji uzorak što je bilo i očekivano s obzirom na ukupnu kiselost, pH vrijednost i to da nije prošao malolaktičnu fermentaciju koja smanjuje kiselost, dok je najmanji intenzitet kiselosti zabilježen kod tretmana CH LP s bakterijom *Lactobacillus plantarum*.



Graf 7: Punoća okusa vina 'Chardonnay' 2021.

(KMLF- kontrola; VP41- *Oenococcus oeni* Lalvin VP41; Lp- *Lactobacillus plantarum*; Lp2x-dvostruka doza *Lactobacillus plantarum*)

Graf 7. pokazuje rezultate ocjenjivanja punoće okusa. U ovom slučaju tretman s bakterijom *Oenococcus oeni* – VP41 je najbolje ocijenjen i dodijeljen mu je najmanji zbroj ocjena. Upravo je malolaktična fermentacija pridonijela punoći i mekšem okusu vina. Kontrolni tretman i tretman s bakterijom *Lactobacillus plantarum* u duploj dozi (CH LP2X) ocijenjeni su kao najlošiji kad je punoća okusa u pitanju.

5. Zaključak

Istraživanje predočeno u ovom diplomskom radu, provedeno je u berbi 2021. na pokušalištu Jazbina u Vinogorju Zagreb, na grožđu sorte 'Chardonnay'. Nakon primarne prerade mošt je sulfitiran i hladno taložen te podijeljen u četiri tretmana u dva ponavljanja. Svi tretmani inokulirani su istim kvascem Lalvin ICV D47 (Lallemmand), a nakon 24 sata s različitim bakterijama mliječne kiseline, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum* u dvostrukoj dozi i *Oenococcus oeni* – VP41. Provedena je koinokulacija, odnosno malolaktična fermentacija je provedena istovremeno s alkoholnom fermentacijom. Cilj rada bio je istražiti učinak i opravdanost primjene različitih MLF tretmana praćenjem koncentracija organskih kiselina i analizom osnovnih fizikalno-kemijskih parametara te senzornih svojstva vina 'Chardonnay'.

Tretman s *Oenococcus oeni* Lalvin VP41, najkasnije je započeo razgradnju jabučne kiseline, a najkraća i najbrža malolaktična fermentacija provedena je u tretmanu *Lactobacillus plantarum* u duploj dozi, koji je ujedno dao najviše mliječne kiseline i najnižu koncentraciju alkohola u odnosu na druge tretmane. Razgradnju jabučne kiseline pratio je rast pH vrijednosti i smanjenje ukupne kiselosti kod tretmana s bakterijom *Lactobacillus plantarum* (Lp) i *Oenococcus oeni* VP4.

Na temelju provedenog istraživanja i senzornog ocjenjivanja može se zaključiti kako su vina 'Chardonnay' inokulirana bakterijama mliječne kiseline punijeg, mekšeg i zaobljenijeg okusa, u odnosu na kontrolni tretman. Tretman s *Oenococcus oeni* Lalvin-VP41 dao je najbolje rezultate u vidu kakvoće mirisa i punoće okusa. Najniži intenzitet kiselosti uočava se kod tretmana s *Lactobacillus plantarum*, a najviši kod kontrolnog tretmana.

Tretman s *Lactobacillus plantarum* u dvostrukoj dozi nije pokazao bolje rezultate senzornog ocjenjivanja u odnosu na druge, što se s obzirom na višu cijenu, nije pokazalo isplativim. Za još bolje praktične i primjenjive rezultate potrebno je ponoviti istraživanje s raznim vrstama, sojevima i dozama bakterija kako bi uočili njihove prednosti i nedostatke.

6. Popis literature

1. Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. (1996). Principles and Practices of Winemaking. Springer Science+Business Media Dordrech.
2. Conde, C., Silva, P.F., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse A., Delrot, S., Gerós, H. (2007). Biochemical changes throughout Grape Berry development and fruit and wine quality. Food 1(1): 1-22. Global Science Books.
3. Hažić, V. (2007). Utjecaj malolaktične fermentacije i vremena inokulacije na kakvoću vina Chardonnay. Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.
4. Jackson, R.S. (2008). Wine Science: Principles and Applications, Thrid Edition. Academic Press Elsevier: Burlington, MA, USA.
5. Jeromel, A. (2019). Alkoholna fermentacija. Interna prezentacija, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
6. Jeromel, A. (2019). Analiza kemijskog sastava vina. Interna prezentacija, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
7. Jeromel, A. (2021). Chardonnay. Interna prezentacija, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
8. Krieger-Weber, S., Heras, J.M., Suarez, C. (2020). *Lactobacillus plantarum*, a New Biological Tool to Control Malolactic Fermentation: A Review and an Outlook. Beverages, 6(2): 23.
9. Lerena, M.C., Rojo, M.C., Sari, S., Mercado, L.A., Krieger-Weber, S., Combina, M. (2016). Malolactic Fermentation Induced by *Lactobacillus plantarum* in Malbec Wines from Argentina. Afr. J. Enol. Vitic., 37(2): 115-123.
10. Maletić, E. (2020). Ampelografska obilježja-shema za opis sorata vinove loze. Prezentacija, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb
11. Maletić, E. (2020). Sorte vinove loze - svjetske sorte. Interna prezentacija, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
12. Maslek N., Maslek M. (2017). Praktični savjeti za vinare. Pa-vin d.o.o. Jastrebarsko.
13. Mirošević, N., Turković, Z. (2003). Ampelografski atlas. Zagreb: Golden marketing. Tehnička knjiga.
14. Mirošević, N., Karoglan Kontić, J. (2008). Vinogradarstvo. Zagreb. Nakladni zavod Globus.

15. Moreno, J., Peinado, R. (2012). *Enological Chemistry*, 1st Edition. Elsevier Inc. London, United Kingdom.
16. Plavša, T. (2020). Utjecaj bakterija mliječne kiseline na aromatske spojeve i senzorska svojstva vina Teran. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.
17. Pravilnik o fizikalno-kemijskim metodama analize mošta, vina, drugih proizvoda od grožđa i vina te voćnih vina, Zakona o vinu »Narodne novine«, br. 96/03.
18. Pravilnik o kategorijama proizvoda od grožđa i vina, enološkim postupcima i ograničenjima, Zakon o uređenju tržišta poljoprivrednih proizvoda »Narodne novine« br. 149/09.
19. Pravilnik o vinu, Zakon o vinu ("Narodne novine", br. 34/95).
20. Priewe, J. (2019). *Wine from grape to glass*, 4th Edition. Abbeville Press: New York, USA.
21. Volschenk, H., van Vuuren, H.J.J., Viljoen-Bloom, M. (2006). Malic Acid in Wine: Origin, Function and Metabolism during Vinification. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 27(2): 123-136.
22. Vrbanac, Ž. (2012). Utjecaj malolaktične fermentacije i soja kvasca na kakvoću vina Chardonnay. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zagreb.

Internetske stranice:

1. <https://blog.hannaservice.eu/hr/malolakticka-fermentacija-u-vinu/>
2. <https://daily.sevenfifty.com/how-the-wente-clone-came-to-define-california-chardonnay/>
3. <https://thegrapegrind.com/oaked-chardonnay-the-buttery-one/>
4. <http://www.pavin.hr/proizvod/lalzyme-cuvee-blanc/>
5. <http://www.pavin.hr/proizvod/noblesse/>
6. <http://www.pavin.hr/proizvod/optimum-white/>

Životopis

Petra Pranjić rođena je 03. 04. 1998. godine u Zagrebu. Pohađala je IX. gimnaziju u periodu od 2013. - 2017. godine, nakon čega upisuje Agronomski fakultet u Zagrebu. Svoje fakultetsko obrazovanje započinje na smjeru Hortikultura (2017. – 2020.) te ga nastavlja diplomskim studijem na smjeru Hortikultura-Vinogradarstvo i vinarstvo. Kroz razna inozemna putovanja usavršava engleski jezik koji je tijekom srednje škole pohađala u školi stranih jezika te se njime aktivno koristi i tečna je u govoru i pismu. Posjeduje certifikat B2 razine u španjolskom te A1 u francuskom jeziku. Vlada vještinama Microsoft Office programskog paketa. Tijekom studiranja sudjeluje u raznim konferencijama i radionicama usko vezanih za struku, te je radila na raznim vinskim sajmovima. 2022. godine u sklopu Croatia Scholarship Fund- Mike Grgich dobiva Internship u Kaliforniji u kojoj provodi četiri mjeseca.