

Učinak sekvencijalne fermentacije s kvascima *Lachancea thermotolerans* i *Torulasporea delbrueckii* na kemijski sastav vina 'Malvazija istarska'

Sažetak

Suočavajući se sa sve drastičnijim utjecajem klimatskih čimbenika na kemijski sastav grožđa, enologija traži i proučava nove metode u tehnologiji proizvodnje vina, posebice bijelih, kako bi se očuvale primarne arome te postigla ravnoteža između alkoholne jakosti i ukupne kiselosti. Kao jedno od rješenja nudi se primjena ne-*Saccharomyces* kvasaca. U ovom istraživanju analiziran je utjecaj sekvencijalne inokulacije komercijalnih sojeva *Torulosporea delbrueckii* i *Lachancea thermotolerans* sa sojem kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na vino 'Malvazija istarska'. Istraživanje je obuhvatilo inokulacije mošta s ne-*Saccharomyces* kvascima, a 48 h kasnije i sa sojem *S. cerevisiae* te kontrolnu varijantu isključivo sa *S. cerevisiae*. Ne-*Saccharomyces* kvasci utjecali su značajno na koncentraciju alkohola, mliječne kiseline te pH vrijednost. Fermentacija sa *S. cerevisiae* utjecala je na višu koncentraciju ukupnih aromatskih spojeva u vinu. Intenziteti boje i mirisa najbolje su ocijenjeni u kontrolnom uzorku, a metodom redosljeda najbolje je rangirana 'Malvazija' iz tretmana *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*.

Ključne riječi: aromatski spojevi, ne-*Saccharomyces* kvasci, 'Malvazija istarska', mliječna kiselina

Uvod

S obzirom da kvasci provode alkoholnu fermentaciju, imaju najvažniju ulogu među svim mikroorganizmima u vinu. Doprinosu senzornim svojstvima i kakvoći vina produkcijom metabolita tijekom rasta i autolize stanične stijenke. Kvasci koji su prisutni tijekom fermentacije potječu s grožđa i iz vinograda, opreme koja se koristi u podrumu i vanjskih izvora kao što su selekcionirane kulture koje se dodaju za kontroliranu fermentaciju (Jolly i sur., 2006).

Zbog sve češćih problema u vinogradarskoj-vinarskoj proizvodnji nastalih uslijed klimatskih promjena, traže se nova rješenja za korekciju visokih koncentracija šećera, nisku ukupnu kiselost i za očuvanje primarnih aroma. Kao moguće rješenje problema, neki od trenutno aktualnih enoloških protokola uključuju primjenu selekcioniranih ne-*Saccharomyces* kvasaca za provođenje alkoholne fermentacije. Krajnji učinak spomenutih kvasaca može biti niža koncentracija alkohola, viša ukupna kiselost te kompleksniji aromatski profil vina. Promjene navedenih parametara mogu rezultirati harmoničnijim senzornim profilom vina, što je posebno važno u proizvodnji svježih bijelih vina. Kakvoća vina se evaluira kombinacijom senzornih (boja, aroma, *mouthfeel*) i kemijskih analiza (pigmenti, aromatski profil, polifenolni profil) (Loira i sur., 2014). Ne-*Saccharomyces* kvasci imaju određene enološke karakteristike koje *Saccharomyces* vrsta ne posjeduju, a koje mogu imati dodatan utjecaj na analitički i senzorni profil vina (Gobbi i sur., 2013a). Poboljšavaju boju vina formiranjem piroantocijana tijekom fermentacije sintezom pirogroždane kiseline i acetaldehida koji služe kao prekursori vitisina A i B (Loira i sur., 2014). Njihov rad utječe na snižavanje pH vrijednosti i rast ukupne kiselosti što također doprinosi kakvoći boje vina. Aromatski profil se poboljšava sintezom estera i ostalih aromatskih komponenti (Fleet, 2003.) kao što je 2-feniletanol (cvjetne arome), etil laktat i izoamil acetat (voćne

1 Luka Marinov, mag. ing. agr., prof. dr. sc. Ana Jeromel, dr. sc. Ivana Tomaz, izv. prof. dr. sc. Darko Preiner, doc. dr. sc. Ana-Marija Jagatić Korenika, Sveučilištu u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za vinogradarstvo i vinarstvo, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska, *student
Autor za korespondenciju: amjagatic@agr.hr

arome). Također ne-*Saccharomyces* kvasci djeluju na poboljšanje tijela i punoće vina otpuštanjem polisaharida iz staničnih stjenki i proizvodnjom glicerola (Loira i sur., 2014.). Međutim, kad se nekonvencionalni kvasci koriste sami, dolazi do pojave problema sa završetkom fermentacije (Escribano-Viana i sur., 2018.). Korištenje odabranih miješanih starter kultura određenih ne-*Saccharomyces* vrsta u kombinaciji sa *S. cerevisiae* pokazalo se kao jedan od načina kako bi se izbjegla nepotpuna fermentacija i poboljšala različita svojstva važna za kakvoću konačnog proizvoda (Escribano-Viana i sur., 2018.).

Materijali i metode

Istraživanje je provedeno u berbi 2019. u vinogradima i vinariji Agrolaguna d.d. u Poreču. Grožđe 'Malvazije istarske' ručno je brano na položaju „Devići“ na kojem je primjenjivana uobičajena ampelotehnika i agrotehnika. Srednja vegetacijska temperatura iznosila je 18.9 °C, a srednja godišnja 14.8 °C. Ukupna količina padalina u vegetacijskom periodu bila je 739.4 mm, a tijekom cijele godine 1 498.0 mm. Trsovi su sađeni na tipičnoj istarskoj crvenici, a uzgojni oblik je Royat kordonac. Prilikom runjenja i muljanja grožđa postupno je dodavano 1.2 L/t 5%-tne H₂SO₃ te 0.8 L/t askorbinske kiseline pripremljene u otopini s vodom u omjeru 1:10. Tijekom punjenja pneumatske preše masulj je prolazio kroz izmjenjivač topline prilikom čega je hlađen na 18°C. U procesu punjenja preše dodano je 3 g/hL enzima Zimaclar Flot (Enologica Vason) za olakšano prešanje i flotaciju. Gruba prešavinska frakcija je odvojena. Nakon prešanja dodano je 1 g/hL glutationa koji ima izraženu antioksidativnu sposobnost te doprinosi očuvanju aromatskog profila bijelih vina (prema pravilniku OIV-a dozvoljeno je do 20 mg/L u mošt ili vino). Mošt iz cjednice je prepumpnan u tank zapremnine 100 000 L i flotiran uz pomoć želatine i inertnog dušika.

Proizvodnja vina

Nakon flotacije mošt je podijeljen u osam inoks tankova zapremnine 30 L. Osnovni parametri mošta bili su: šećer, 21 °Kl; pH, 3.49; ukupna kiselost, 5.4 g/L; jabučna kiselina, 1.8 g/L; YAN, 168 mg/L; ukupni SO₂, 39 mg/L. Za alkoholnu fermentaciju korištene su tri različite vrste kvasaca u tri ponavljanja, dozirani po preporuci proizvođača, u količini od 25 g/hL te rehidrirani u deset puta većoj količini tople vode s malo mošta. Za kontrolnu alkoholnu fermentaciju (Sc.) korišten je komercijalni *S. cerevisiae* soj Lalvin QA23™ (Lallemend). Čista kultura *T. delbruecki* (Td.+Sc.) komercijalnog naziva Biodiva™ (Lallemend) inokulirana je u tri ponavljanja kao i čista kultura *L. thermotolerans* (Lt.+Sc.) pod nazivom Concerto™ (Chr. Hansen). Odmah nakon inokulacije dodana je dušična hrana Fermoplus® Tropical (AEB) u dozi od 30 g/hL za početnu ishranu, rast i razvoj kvasaca. Nakon 48 h uslijedila je sekvencijalna inokulacija s rehidriranim sojem *S. cerevisiae* QA23 u količini propisanoj od strane proizvođača (25 g/hL), u posudama gdje je fermentacija počela s ne-*Saccharomyces* kvascima. Provedena je hladna fermentacija zbog očuvanja aromatskog profila na temperaturi 11.4 °C. Po završetku alkoholne fermentacije proveden je „pinking“ test vizualno i UV-VIS spektrofotometrom. Vina su otočena s taloga u staklene posude zapremnine 5 L u koje je dodano 20 g/hL PVPP-a za sprječavanje pojave ružičastih tonova te 6 g/hL kalijevog metabisulfitu za mikrobiološku stabilnost. Da bi se poboljšala autoliza kvašćevih staničnih stjenki dodano je 1 g/hL enzima β-glukanaza Mannozyim (Enologica Vason). Nakon provedenih tretmana staklene posude su stavljene u hladnu komoru (4-8 °C), na odležavanje na finom talogu. Nakon 7 dana uslijedio je pretok s taloga, a dan kasnije sulfitanje s 5 mL 5%-tne H₂SO₃.

Osnovna kemijska analiza

Za kemijsku analizu vina i mošta u fermentaciji korišten je uređaj FOSS WineScan SO2 na bazi FTIR spektrometrije. Analizirani su šećeri, ukupna kiselost, pH, etanol, jabučna kiselina, mliječna kiselina, hlapljiva kiselost, gustoća te koncentracija glukoze i fruktoze. Tijek alkoholne fermentacije praćen je kontrolom razgradnje šećera.

„Pinking“ test

Mana bijelih vina nazvana „pinking“ rezultira obojenjem i precipitacijom polifenola male molekularne mase, dajući bijelom vinu ružičaste nijanse. Vino 'Malvazije istarske' jedno je od sklonijih „pinkingu“ odnosno pojavi ružičastih tonova. Iako se problem „pinkinga“ pojavljivao i u prošlosti, suvremena upotreba reduktivne tehnologije bez pristupa kisika, uz primjenu inernih plinova i posuda potencira pojavu „pinkinga“.

Za potrebe testa iz svake posude uzet je uzorak od 10 mL koji je filtriran kroz filter papir, a filtrirano vino napunjeno je u piknometre zapremnine 50 mL. U svaki piknometar dodano je 0.25 mL H₂O₂ (0.3 %) te su stavljeni u autoklav na 60 °C na 30 minuta kako bi se ubrzale vizualne promjene. Uz vizualni pregled provedena je i analiza svih uzoraka UV-VIS spektrofotometrom. Destilirana voda s reagensom (0.3% H₂O₂) stavljena je u kivetu kao kontrola te je svaki uzorak očitavan na valnim duljinama od 440, 500 i 580 nm. Vina s „pinking“ potencijalom imaju absorbancu veću od 5 mAU pri mjerenju s valnim duljinama od 440, 500 i 580 nm. Absorbanca (mAU) je izračunata uz pomoć formule $|500 \text{ nm}| \times (3 \times |580 \text{ nm}| + 4 \times |440 \text{ nm}|) / 7 \times 1000$.

Analiza pojedinačnih aromatskih spojeva

Ekstrakcija iz vina provedena je primjenom ekstrakcije na čvrstoj fazi s LiChrolut EN kolonicama (500 mg, 3 mL, Darmstadt, Njemačka). Prije nanošenja uzorka kolonica je kondicionirana s 3 mL diklormetana, metanola i 13 %-tne vodene otopine etanola. Po završetku kondicioniranja, nanoseno je 50 mL uzorka vina. Prolaskom uzorka kroz kolonicu ostavljena je da se suši na zraku 30 min, a potom je provedeno ispiranje analita s 1 mL diklormetana. Dobiveni ekstrakt prenesen je u posudicu za uzorak i analiziran primjenom metode GC-MS. Za potrebe analize GC-MS korištena je kolona ZB-WAX 60 dimenzija 60 m x 0.25 mm i.d. x 0.50 μm (Phenomenex, SAD). Analiza je provedena na vezanom sustavu GC-MS (plinski kromatograf Agilent Technology 6890, spektrometar masa Agilent 5973N). Ostali parametri analize bili su istovjetni onima opisanim u radu Lopez i sur. (2002.).

Senzorna analiza

Senzorna analiza vina provedena je na Agronomskom fakultetu u Zagrebu, Zavodu za vinogradarstvo i vinarstvo. Pokusna vina ocijenilo je pet certificiranih ocjenjivača vina. Vina su evaluirana deskriptivnom (opisnom) metodom te metodom redoslijeda. Deskriptivnom metodom boja je opisana kroz nijansu i kakvoću, prema intenzitetu od 1 (neizraženo) do 5 (vrlo izraženo). Miris se opisan kroz različite kategorije mirisa (cvjetne, voćne, prosušeno voće, orašasto voće, biljne, začinske...) uz ocjenu intenziteta od 1 do 5, a kod okusa definirana je kakvoća, kiselost, gorčina, astringencija, tijelo, harmoničnost i „*aftertaste*“ te ukupni dojam također ocjenom intenziteta od 1 do 5. Prema metodi redoslijeda, najboljem uzorku unutar tretmana daje se ocjena 1, a najbolje ocjenjeni tretman je onaj s najmanjim zbrojem pojedinačnih ocjena.

Statistička analiza

U svim uzorcima provedena je statistička obrada podataka koja je uključila analizu varijance (ANOVA) uz pomoć programa XLSTAT v.2020.3.1. (Addinsoft, New York, NY, USA) pri čemu se srednje vrijednosti statistički razlikuju pri $p \leq 0.05$.

Rezultati i rasprava

Osnovni parametri kakvoće vina

Alkoholna fermentacija s čistom kulturom *S. cerevisiae* (Sc.) i sekvencijalna s *L. thermotolerans* (Lt.+Sc.) trajala je 17 dana, dok se u isto vrijeme sekvencijalna fermentacija s *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* zaustavila pri 5,17 g/L rezidualnog šećera (polusuho vino). Iz analiziranih parametara u Tablici 1. vidljivo je kako je vino Td.+Sc. imalo najvišu koncentraciju fruktoze koja nije metabolizirana u etanol tijekom fermentacije. Fermentacija s ne-*Saccharomyces* kvascima rezultirala je nižim koncentracijama etanola (0.2-0.9 vol.%) što se posebice ističe kod Td.+Sc. uzorka, uslijed nižeg fermentabilnog učinka prema fruktozi. Niža koncentracija alkohola (0.3-0.7 %) pripisuje se i sintezi mliječne kiseline iz šećera, kad je u pitanju metabolizam *L. thermo-tolerans* (Morata i sur. 2019.).

Tablica 1. Rezultati osnovne analize vina 'Malvazija istarska' berba 2019.

Table 1. Basic chemical parameters of Malvasia istriana wines, vintage 2019.

Parametri/ Parameters	Sc.	Td.+Sc.	Lt.+Sc.
Rezidualni šećeri/ Residual sugars (g/L)	1,75 ^b	5,17 ^a	1,97 ^b
Ukupna kiselost / Total acidity (g/L)	5,2 ^a	5,33 ^a	5,50 ^a
pH	3,36 ^a	3,34 ^a	3,32 ^b
Etanol/ Ethanol (vol.%)	13,35 ^a	12,63 ^b	13,00 ^{ab}
Jabučna kiselina/ Malic acid (g/L)	1,25 ^a	1,30 ^a	1,25 ^a
Mliječna kiselina/ Lactic acid (g/L)	0,0 ^b	0,0 ^b	0,70 ^a
Hlapljiva kiselost/ Volatile acidity (g/L)	0,40 ^a	0,37 ^{ab}	0,35 ^b
Gustoća/ Density (g/cm ³)	0,9917 ^b	0,9950 ^a	0,9918 ^b
Glukoza/ Glucose (g/L)	0,70 ^b	1,13 ^a	0,77 ^b
Fruktoza/ Fructose (g/L)	1,05 ^b	4,03 ^a	1,20 ^b

Sc.=*Saccharomyces cerevisiae*; Td.+Sc.= *Torulaspora delbrueckii*+*Saccharomyces cerevisiae*; Lt.+Sc.=*Lachancea thermotolerans*+ *Saccharomyces cerevisiae*;

Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti (n=3) Različita slova u superskriptu (a,b,c) predstavljaju signifikantnu različitost pri p<0,05

Prema rezultatima analiza utvrđeno je kako tretmani Td.+Sc i Lt.+Sc. nisu značajno utjecali na promjenu ukupne kiselosti u odnosu na kontrolni uzorak (Sc), međutim kod tretmana Lt.+Sc. zabilježena je značajno niža pH vrijednost, što je u skladu s prijašnjim istraživanjima (Benito i sur., 2018.; Dutraive i sur., 2019.). Značajno najniža koncentracija hlapljive kiselosti zabi-

Iježena je u tretmanu Lt.+Sc, što je u skladu s istraživanjima s *L. thermotolerans* koja upućuju na sintezu nižih koncentracija hlapljivih kiselina (Escribano i sur. 2018.). Koncentracije jabučne kiseline nisu se značajno razlikovale među tretmanima, a mliječna kiselina uočena je jedino kod tretmana Lt.+Sc. u prosječnoj koncentraciji od 0.7 g/L (0.6 do 0.9 g/L). Dosadašnja istraživanja potvrđuju ulogu *L. thermotolerans* u sintezi više koncentracije mliječne kiseline i dokiseljavanja mošta (Gobbi i sur., 2013.; Benito, 2018.; Escribano i sur., 2018.)

'Pinking' test

Tablica 2. prikazuje rezultate izračuna absorbance. Iz rezultata je vidljivo kako su sva vina potencijalno bila sklona „pinkingu“ s obzirom da je kad svih uzoraka absorbancija bila veća od 5 mAU (Simpson, 1977.). Vina fermentirana s ne-*Saccharomyces* kvascima, posebno Td.Sc. imala su znatno višu absorbancu u usporedbi s vinom fermentiranim isključivo sa *S. cerevisiae*.

Tablica 2. Rezultati mjerenja 'pinking' potencijala spektrofotometrom pri 440, 500 i 580 nm
Table 2. Spectrophotometer measurement results of pinking potential at 440, 500 and 580 nm

Uzorak/ Sample	440 nm	500 nm	580 nm	mAU
Sc.	0.717	0.612	0.404	332
Td.+Sc.	1.667	1.552	1.367	2323
Lt.+Sc.	1.250	1.144	0.986	1253

Sc.=*Saccharomyces cerevisiae*; Td.+Sc.= *Torulaspora delbrueckii*+*Saccharomyces cerevisiae*; Lt.+Sc.= *Lachancea thermotolerans*+ *Saccharomyces cerevisiae*;

Aromatski profil vina

Kako bi se utvrdio utjecaj ne-*Saccharomyces* kvasaca na aromatski profil 'Malvazije istarske', analizirani su aromatski spojevi iz grupa aldehida, viših alkohola, hlapljivih fenola, terpena, norizoprenoida, laktona, estera i masnih kiselina (Tablica 3). Kod aldehydskih spojeva jedina značajna razlika uočena je kod koncentracija 2-heptenala, međutim sve vrijednosti manje su od njegovog mirisnog praga detekcije (27.5 µg/L) (Odournet, n.d.). Od viših alkohola ističe se značajno viša koncentracija izoamilnog alkohola kod vina Sc. (9.5 mg/L) iako ni njegova koncentracija ne prelazi mirisni prag detekcije od 30 mg/L (Gómez-Míguez i sur., 2007.). Kod svih vina ističe se viša koncentracija 4-vinilgvajakola kojeg karakteriziraju začinski mirisi (klinčić, curry), iako među uzorcima nema signifikantne razlike, a u svim uzorcima koncentracije prelaze mirisni prag detekcije od 33 µg/L. Analizom estera utvrđena je niža koncentracija 2-feniletil acetata u vinu Td.+Sc. iako ni kod jednog uzorka nije prelazila prag detekcije. Vino Td.+Sc. također se značajno istaknulo s višom koncentracijom etil butanoata (ananas), međutim i kod ostalih uzoraka je iznad mirisnog praga detekcije od 20 µg/L (Gómez-Míguez i sur., 2007.). Koncentracija izoamil acetata (banana) kod svih uzoraka je prelazila mirisni prag detekcije (30 µg/L) (Gómez-Míguez i sur., 2007.), a kod vina fermentiranih s ne-*Saccharomyces* kvascima uočene su nešto niže koncentracije. U koncentraciji masnih kiselina nije bilo značajnih razlika osim kod butanske kiseline koja je značajno niža kod vina Td.+Sc., a u svim uzorcima prelazi mirisni prag detekcije (173 µg/L) (Gómez-Míguez i sur., 2007.). Ne-*Saccharomyces* kvasci utjecali su i na promjenu koncentracije 4-metil-pentanola iako u niti jednom uzorku nije prijedjen mirisni prag detekcije od 1 mg/L (Zea i sur., 2001.).

Tablica 3. Koncentracije aromatskih spojeva u vinima 'Malvazija istarska', berba 2019.
Table 3. Aromatic compounds concentrations in Malvasia istriana wines, vintage 2019.

Spoj/ Compounds ($\mu\text{g/L}$)	Deskriptori/Descriptors	Sc.	Td. + Sc.	Lt. + Sc.
Aldehidi/ Aldehydes				
2,4-heksadienal		1,7 ^a	1,6 ^a	1,6 ^a
2,4-heptadienal		1,0 ^a	0,9 ^a	0,9 ^a
2,4-nonadienal		0,3 ^a	0,1 ^c	0,3 ^b
2-heptenal		0,3 ^{ab}	0,2 ^b	0,6 ^a
2-oktenal		1158,4 ^a	1101,5 ^a	1111,3 ^a
Benzacetaldehid		3,8 ^a	3,5 ^a	2,2 ^a
Benzaldehid		12,8 ^a	13,4 ^a	10,1 ^a
Dekanal		1,2 ^a	1,4 ^a	1,1 ^a
Furfural	bademi, kvasac	1,9 ^a	2,5 ^a	1,6 ^a
Heksanal		3,2 ^a	3,3 ^a	3,5 ^a
Nonanal	zeleno, travnato	2,6 ^a	2,4 ^a	2,1 ^a
Σ		1187,4 ^a	1130,7 ^a	1135,3 ^a
Viši alkoholi/ Higher alcohols				
1-butanol	kemijski	134,3 ^a	90,5 ^b	89,4 ^b
1-dekanol	voćno, cvjetno, slatkasto	7,1 ^a	7,4 ^a	7,7 ^a
1-heptanol	masno	3,5 ^a	2,4 ^a	3,3 ^a
1-heksanol	travnato, masno	2158,5 ^a	1708,4 ^b	2065,4 ^a
1-oktanol		22,6 ^a	17,1 ^b	19,8 ^{ab}
1-nonanol		1,3 ^a	0,9 ^a	0,9 ^a
2-heptanol	voćno, biljno	0,8 ^a	0,7 ^a	0,8 ^a
<i>trans</i> -2-heksen-1-ol	biljno, zeleno	15,2 ^a	13,8 ^a	13,3 ^a
2-metil-1-butanol	začinski, paljeno	25303,3 ^a	21587,1 ^b	20281,4 ^b
<i>cis</i> -3-nonen-1-ol		16,0 ^a	16,8 ^a	14,2 ^a
2-penten-1-ol		1,5 ^b	4,6 ^a	5,1 ^a
<i>cis</i> -3-nonen-1-ol	travnato, zeleno	103,6 ^a	86,1 ^b	82,1 ^b
<i>trans</i> -2-heksen-1-ol	trava, grožđice	61,5 ^a	56,7 ^a	56,8 ^a
3-oktanol		0,4 ^a	0,3 ^{ab}	0,2 ^b
Izoamilni alkohol	kemijski, lak za nokte	9350,1 ^a	3135,0 ^b	2620,7 ^b
Izobutanol	kemijski, lak za nokte	2104,4 ^c	2601,3 ^a	2407,1 ^b
Feniletil alkohol	cvjetno, ruže, med	3312,0 ^a	2979,3 ^a	2546,5 ^b
Σ		42596,2 ^a	32308,6 ^b	30214,8 ^b
Hlapljivi fenoli/ Volatile phenols				
4-vinilgvajakol	začini, klinčić, curry	186,2 ^b	230,7 ^a	248,1 ^a
4-vinilfenol	fenolno, medicinalno	81,2 ^b	85,7 ^a	97,4 ^a
Eugenol	cimet, klinčić	0,8 ^a	0,9 ^a	0,7 ^b
Gvajakol	dim	0,3 ^a	0,3 ^a	0,3 ^a
Homovanilin alkohol		23,4 ^a	25,3 ^a	21,3 ^b
Vanilin	vanilija	14,2 ^a	12,8 ^b	9,6 ^c
Σ		306,1 ^b	355,6 ^a	377,4 ^a

Spoj/ Compounds ($\mu\text{g/L}$)	Deskriptori/Descriptors	Sc.	Td. + Sc.	Lt. + Sc.
Terpeni/ Terpenes				
1,8-terpin		1,1 ^a	0,7 ^b	0,5 ^b
6,7-dihidro-7-hidroksilinalol		7,5 ^a	7,4 ^a	6,3 ^a
8-hidroksilinalol		20,4 ^a	22,6 ^a	21,0 ^a
<i>alfa</i> -terpineol	cvjetno, slatko	9,6 ^a	8,6 ^a	8,5 ^a
<i>beta</i> -farnesen		2,9 ^a	3,1 ^a	3,0 ^a
<i>cis</i> -linalol oksid, fur.	cvjetno	1,1 ^a	0,5 ^b	0,5 ^b
Citronelol	cvjetno, ruže	14,8 ^a	8,2 ^b	8,0 ^b
Dihidriaktinidiol		0,8 ^a	1,0 ^a	0,9 ^a
Farnesol		22,4 ^a	15,0 ^c	18,0 ^b
Geraniol	citrusi	11,6 ^a	11,2 ^a	11,6 ^a
Geranil acetat	dim, slatko, medicinalno	3,2 ^a	3,1 ^a	3,2 ^a
Hotrienol	svježe, cvjetno, voćno	16,1 ^a	7,7 ^b	6,9 ^b
Linalol	citrusi, cvjetno, slatko	52,0 ^a	48,2 ^a	45,0 ^a
Linalol oksid piran	cvjetno	3,9 ^b	4,4 ^{ab}	4,6 ^a
Neral		3,0 ^b	9,0 ^a	3,7 ^b
Nerolična kiselina		3,1 ^a	2,7 ^b	2,9 ^{ab}
Nerol	ruže, voćno, cvjetno	3,2 ^a	2,8 ^a	2,2 ^a
Nerolidol	ruže, jabuke, zeleno, masno, drvo	0,9 ^a	0,7 ^a	0,8 ^a
Terpendiol I		0,9 ^a	0,3 ^b	1,0 ^a
Terpendiol II		38,3 ^a	37,5 ^a	33,2 ^b
Terpinen-4-ol		17,2 ^a	2,1 ^b	0,9 ^b
Tetrahidrolinalol		3,7 ^a	5,0 ^a	2,3 ^a
2,6-dimetil-3,7-oktadien-2,6-diol		10,0 ^a	8,6 ^a	8,6 ^a
2,6-dimetil-7-okten-2,6-diol		7,0 ^a	5,9 ^{ab}	4,5 ^b
Σ		254,8 ^a	216,2 ^{ab}	197,9 ^b
Norizoprenoidi/ Norisoprenoids				
<i>alfa</i> -ionon		0,2 ^a	0,2 ^a	0,2 ^a
<i>beta</i> -ionon	ljubica, cvjetni, slatki	0,1 ^a	0,1 ^a	0,0 ^b
<i>beta</i> -damaskenon	slatki, voćni, cvjetni, med	6,1 ^b	6,6 ^a	6,0 ^b
TDN	petrolej, kerozin	0,4 ^a	0,3 ^{ab}	0,2 ^b
Σ		6,8 ^{ab}	7,1 ^a	6,4 ^b
Laktoni/ Lactones				
<i>delta</i> -dekalakton		3,6 ^a	3,5 ^a	3,4 ^a
<i>gama</i> -butirolakton	kokos, karamela	346,9 ^a	408,6 ^a	404,0 ^a
<i>gama</i> -dekalakton	breskva, voćni	1,2 ^c	2,8 ^b	9,6 ^a
<i>gama</i> -heksalakton		2,5 ^{ab}	2,9 ^a	2,3 ^b
<i>gama</i> -nonalakton	kokos, breskva	13,9 ^{ab}	16,6 ^a	12,0 ^b
<i>gama</i> -oktalakton		0,8 ^a	0,9 ^a	1,0 ^a
<i>gama</i> -undekalakton	marelica, breskva	0,4 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a
Σ		369,4 ^b	435,6 ^a	432,6 ^a
Esteri/ Esters				
2-feniletil acetat	ruža, med, duhan	27,2 ^a	25,5 ^a	10,1 ^b
Dietil sukcinat	prezrelo, dozrelo	125,9 ^{ab}	151,6 ^a	103,9 ^b

Spoj/ Compounds ($\mu\text{g/L}$)	Deskriptori/Descriptors	Sc.	Td. + Sc.	Lt. + Sc.
Dimetil malat		35,2 ^a	33,8 ^a	32,3 ^a
Etil butanoat	ananas, jabuka	722,0 ^b	853,4 ^a	736,3 ^b
Etil dekanat	cvjetni	485,6 ^a	389,6 ^a	452,2 ^a
Etil furoat	ljepilo, boja	6,2 ^a	5,4 ^a	5,3 ^a
Etil heksadekanoat		1593,0 ^a	1827,9 ^a	1542,1 ^a
Etil laktat	maslac	426,3 ^a	483,4 ^a	449,4 ^a
Etil linoleat		0,1 ^a	0,5 ^a	0,5 ^a
Etil oktanoat	slatko, cvjetno, voćno, kruška	2011,5 ^a	1911,5 ^a	1934,6 ^a
Metil vanilat		14,9 ^a	13,3 ^a	12,4 ^a
Etil-2-hidroksi-3-metilbutanoat		0,8 ^a	1,3 ^a	0,9 ^a
Etil-3-hidroksibutanoat	grožđe, voćni, karamela, prženo	31,7 ^a	25,0 ^b	17,7 ^c
Etil-3-hidroksiheksanoat	guma	5,7 ^a	5,7 ^a	4,4 ^a
Etil-3-metilbutanoat	voćni, ananas	5,7 ^a	3,4 ^a	2,6 ^a
Heksil acetat		310,0 ^a	201,0 ^b	171,8 ^b
Izoamil acetat	banana	6782,1 ^a	5436,5 ^b	4512,8 ^b
Izobutil acetat	jabuka, banana	170,8 ^a	160,6 ^a	131,4 ^a
Metil heksadekanoat		2,5 ^b	3,0 ^{ab}	3,4 ^a
Metil heksanoat		6,0 ^a	7,0 ^a	5,5 ^a
Metil ester geranijske kiseline		3,2 ^a	3,8 ^a	3,2 ^a
Σ		12766,4 ^a	11543,0 ^a	10132,7 ^a
Masne kiseline/ Fatty acids				
2-metilpropionična kiselina		496,2 ^b	1093,8 ^a	553,4 ^b
Butanska kiselina	balzamično, masno	1086,3 ^a	512,8 ^b	1121,1 ^a
Dekanska kiselina	balzamično, kremasto	2765,5 ^a	2393,0 ^a	2579,0 ^a
Heptanska kiselina	Slatkasto	5,6 ^a	6,9 ^a	6,7 ^a
Heksanska kiselina	kremasto, masno	3965,5 ^a	4316,6 ^a	3994,5 ^a
Izovalerijanska kiselina	slatki, balzamično	3,7 ^a	5,2 ^a	4,7 ^a
Oktanska kiselina	balzamično, masno	5094,1 ^a	4994,7 ^a	4955,0 ^a
Propanoična kiselina	balzamično, masno	44,9 ^a	3,5 ^c	24,3 ^b
Σ		13461,8 ^a	13326,5 ^c	13238,7 ^b
Ostali alkoholi / Other alcohols				
1,4-butandiol		0,3 ^{ab}	0,4 ^a	0,1 ^b
2-etil-1-heksanol		1,2 ^a	0,8 ^b	0,4 ^c
3-etoksi-1-propanol	prezrela kruška	115,0 ^a	74,2 ^b	21,7 ^c
4-metil-1-pentanol	badem, prženo	17,0 ^a	13,0 ^b	13,5 ^b
Benzilalkohol	dimljeno, prženo	10,4 ^a	10,5 ^a	8,0 ^a
2,3-butandiol	maslac, kremasto	0,5 ^b	1,2 ^{ab}	2,3 ^a
Σ		144,4 ^a	100,0 ^{ab}	46,0 ^b

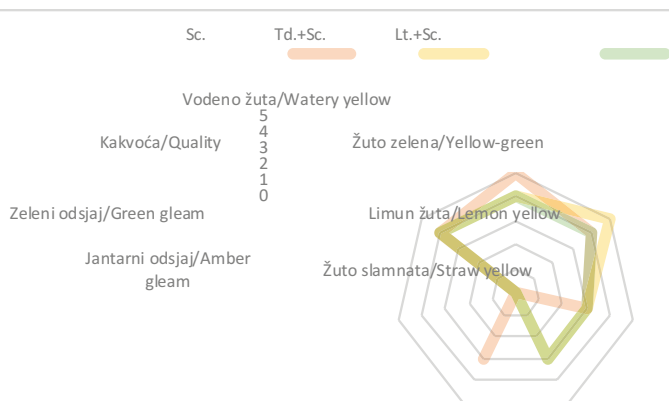
Sc.=*Saccharomyces cerevisiae*; Td.+Sc.= *Torulaspota delbrueckii*+*Saccharomyces cerevisiae*; Lt.+Sc.= *Lancea thermotolerans*+ *Saccharomyces cerevisiae*;

Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti (n=3) Različita slova u superskriptu (a,b,c) predstavljaju signifikantnu različitost pri $p < 0,05$.

Senzorna analiza

Prosjek rezultata deskriptivne metode ocjenjivanja (boja, miris, okus) prikazan je u Grafu 1., a metode redoslijeda u Tablici 5., pri čemu je 1 oznaka najboljeg vina u nizu. Boja svih uzoraka bila je slične kakvoće i nijanse. U uzorku vina Sc. vodeno-žuta nijansa je nešto intenzivnija nego kod vina Td.+Sc. i Lt.+Sc. gdje su izraženije žuto-zelene nijanse (Graf 1.).

Iz Grafa 2. uočljiv je intenzivniji cvjetni miris i miris začinskog bilja u vinu Sc., a u vinu Lt.+Sc. intenzivniji voćni mirisi. Malvazija Lt.+Sc. pokazala se harmoničnijom i boljeg tijela nego preostali uzorci (Graf 3.) Rezultati metode redoslijeda prikazani su u Tablici 5. gdje se vidi da je većina ocjenjivača odabralo 'Malvaziju' Td.+Sc. kao najbolje vino (najmanji zbroj bodova), a kao sljedeće vino odabrana je 'Malvazija' Lt.+Sc., bez obzira što su mirisi i boja kod vina Malvazija Sc. bili intenzivniji i bolje ocijenjeni prilikom evaluacije deskriptivnom metodom

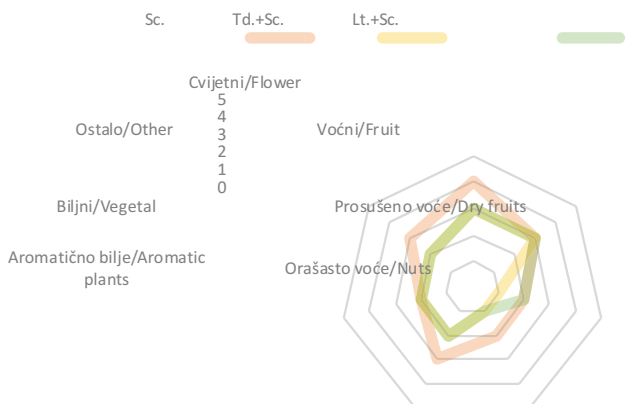


Graf 1. Ocjena boje vina 'Malvazija istarska', 2019.

Graph 1. Wine color evaluation of Malvazija istarska, 2019.

Sc.=*Saccharomyces cerevisiae*; Td.+Sc.= *Torulaspora delbrueckii*+*Saccharomyces cerevisiae*;

Lt.+Sc.= *Lachancea thermotolerans*+ *Saccharomyces cerevisiae*;

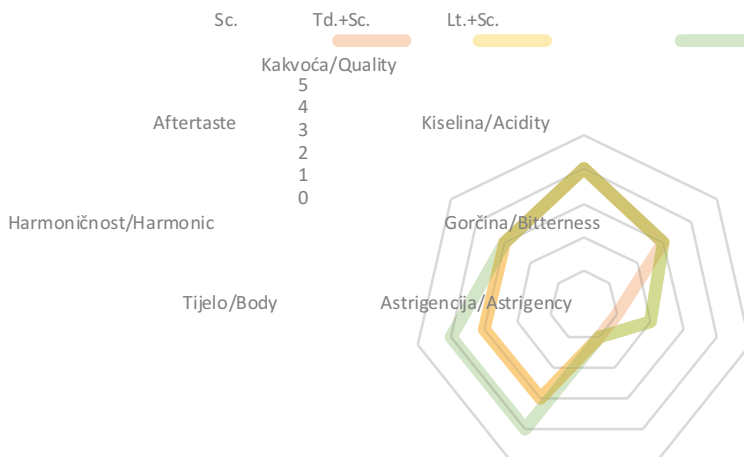


Graf 2. Ocjena mirisa vina 'Malvazija istarska', 2019.

Graph 2. Wine odor evaluation of Malvazija istarska, 2019.

Sc.=*Saccharomyces cerevisiae*; Td.+Sc.= *Torulaspora delbrueckii*+*Saccharomyces cerevisiae*;

Lt.+Sc.= *Lachancea thermotolerans*+ *Saccharomyces cerevisiae*;



Graf 3. Ocjena okusa vina 'Malvazija istarska', 2019.

Graph 3. Wine taste evaluation of Malvazija istarska, 2019.

Sc.=*Saccharomyces cerevisiae*; Td.+Sc.= *Torulaspora delbrueckii*+*Saccharomyces cerevisiae*;

Lt.+Sc.= *Lachancea thermotolerans*+ *Saccharomyces cerevisiae*;

Tablica 4. Rezultati ocjenjivanja vina 'Malvazija istarska' 2019. metodom redoslijeda.

Table 4. Results of ranking method evaluation of Malvazija istarska wines, vintage 2019.

Ocjenjivač/Panelist	Sc.	Td.+Sc.	Lt.+Sc.
I	3	1	2
II	2	1	3
III	3	1	2
IV	1	3	2
V	2	3	1
Σ	11	9*	10

Sc.=*Saccharomyces cerevisiae*; Td.+Sc.= *Torulaspora delbrueckii*+*Saccharomyces cerevisiae*;
Lt.+Sc.= *Lachancea thermotolerans*+ *Saccharomyces cerevisiae*; *=najbolje ocijenjen uzorak
vina /the best rated wine sample.

Zaključak

Na temelju provedenog istraživanja u proizvodnji vina 'Malvazija istarska' može se zaključiti kako su sekvencijalne fermentacije s ne-*Saccharomyces* kvascima očekivano utjecale na promjenu koncentracija etanola, dok značajna promjena ukupne kiselosti nije uočena. *T. delbrueckii*, zbog izrazite glukofilnosti nije fermentirao znatne količine fruktoze zbog čega jedino vino Td.+Sc. nije u kategoriji suhog vina, što ukazuje na bolje fermentativne sposobnosti ostalih sojeva i kombinacija u pokusu. Potvrđena je sinteza mliječne kiseline od strane *L. thermotolerans* što je utjecalo na smanjenje pH vrijednosti. Sva vina imala su visoki 'pinking' potencijal što ukazuje na osjetljivost sorte te potrebu za preventivnim tretmanom s PVPP-om ili hiperoksidacijom mošta. Analize aromatskog profila ukazuju na razlike između tretmana. Sekvencijalna fermentacija utjecala je na višu koncentraciju laktone i hlapljivih fenola, te nori-zoprenoida kod vina Td.+Sc. Temeljem rezultata senzorne analize, sekvencijalna fermentacija s ne-*Saccharomyces* kvascima pozitivno je utjecala na ukupni dojam, čineći vina kompleksnijim

i drugačijim od vina dobivenog fermentacijom s kvascem *S. cerevisiae*. Istraživanja je potrebno nastaviti i provesti na industrijskoj razini u većim tankovima s mogućnošću kontrole uvjeta zbog pouzdanijih rezultata.

Zahvala

Autori rada zahvaljuju Agrolaguni d.d. iz Poreča na ustupljenom grožđu sorte Malvasija istarska, materijalu za provođenje istraživanja te ustupljenim podacima osnovne analize mošta i vina odrađenim za vrijeme provedbe studentske prakse.

Literatura

- Benito, S. 2018. The impact of *Torulasporea delbrueckii* yeast in winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3081–3094.
- Dutraive, O., Benito, S., Fritsch, S., Beisert, B., Patz, C.-D., Rauhut, D. 2019. Effect of Sequential Inoculation with Non-Saccharomyces and Saccharomyces Yeasts on Riesling Wine Chemical Composition. *Fermentation.* 5(3):79.
- Escribano-Viana, R., González-Arenzana, L., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., Gutiérrez, A.R. 2018. Wine aroma evolution throughout alcoholic fermentation sequentially inoculated with non-Saccharomyces/Saccharomyces yeasts. *Food Res. Int.* 112, 17–24.
- Fleet, G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 11–22.
- Gobbi, M., Comitini, F., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I., Ciani, M. 2013. Lachancea thermotolerans and Saccharomyces cerevisiae in simultaneous and sequential co-fermentation: A strategy to enhance acidity and improve the overall quality of wine. *Food Microbiol.* 33, 271–281.
- Gómez-Miguez, M.J., Cacho, J.F., Ferreira, V., Vicario, I.M., Heredia, F.J. 2007. Volatile components of Zalema white wines. *Food Chem.* 100, 1464–1473.
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H., Pretorius, I.S. 2006. The role and use of non-Saccharomyces yeasts in wine production. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 27, 15–39.
- Loira, I., Vejarano, R., Bañuelos, M.A., Morata, A., Tesfaye, W., Uthurry, C., Villa, A., Cintora, I., Suárez-Lepe, J.A. 2014. Influence of sequential fermentation with *Torulasporea delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* on wine quality. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 915–922.
- Lopez, R., Aznar, M., Cacho, J., Ferreira, V. 2002. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A.* 966 (1-2), 167-177.
- Morata, A.; Bañuelos, M.A.; Vaquero, C.; Loira, I.; Cuerdo, R.; Palomero, F.; González, C.; Suárez-Lepe, J.A.; Wang, J.; Han, S.; et al. 2019. *Lachancea thermotolerans* as a tool to improve pH in red wines from warm regions. *Eur. Food Res. Technol.* 245, 885–894.
- Odournet, S. n.d. Odour Threshold Shop by SENSENET Odour Threshold Shop. <https://www.odourthreshold.com/> (pri-
stupljeno 09.07.2020).
- Simpson, R.F. 1977. Oxidative pinking in white wines. *Vitis.* 16, 286-294.
- Zea, L., Moyano, L., Moreno, J., Cortes, B., Medina, M. 2001. Discrimination of the aroma fraction of Sherry wines obtained by oxidative and biological ageing. *Food Chem.* 75, 79–84.

Prispjelo/Received: 30.12.2020.

Prihvaćeno/Accepted: 12.5.2021.

Original scientific paper

Influence of sequential fermentation with *Lachancea thermotolerans* and *Torulasporea delbrueckii* yeast on chemical composition of Malvasia Istriana wines

Abstract

As we face drastic climate change, new methods are being sought in the technology of wine production, especially in production of white wines, in order to preserve the primary aromas and achieve the desired balance of alcohols and acids. As a potential solution the use of non-Saccharomyces yeasts whose metabolism differs from Saccharomyces yeasts is suggested. In this study the influence of sequential inoculation of *Torulosporea delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* with *Saccharomyces cerevisiae* on Malvasia istriana wine was studied and analyzed. Malvasia Istriana is the second most widespread white grape variety in Croatia and thus one of the most economically important varieties. The study included inoculations of must with non-Saccharomyces yeasts, and 48 h later with *S. cerevisiae* QA23 strain and fermentation exclusively with *S. cerevisiae* QA23. Non-Saccharomyces yeasts contributed to lower ethanol concentration, especially *T. delbrueckii* which in co-culture with *S. cerevisiae* was not able to ferment a significant amount of fructose and *L. thermotolerans* by converting sugar to lactic acid. Although differences within the aromatic profile were observed, none of the non-Saccharomyces strains significantly affected the overall wine aroma. Although the aroma, color and color intensity were best evaluated in the sample produced with the *S. cerevisiae* strain, the best ranked wine was Malvasia *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*.

Keywords: aromatic compounds, lactic acid, non-Saccharomyces, Malvasia Istriana, yeast