

Mogućnosti promjene sadržaja etanola i ukupne kiselosti vina korištenjem *Saccharomyces cerevisiae* kvasaca

Sažetak

Utjecaj globalnog zagrijavanja nije zaobišao niti vinarsku industriju. To se najbolje očituje kroz porast alkoholne jakosti vina te smanjenje ukupne kiselosti što u konačnici dovodi do značajne promjene u senzornim svojstvima vina. Jedna od mogućnosti smanjenja alkoholne jakosti obuhvaća primjenu različitih selekcioniranih kvasaca (*Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces*). U provedenom istraživanju ispitane su mogućnosti primjene komercijalnih *Saccharomyces* kvasaca (IONYSWF™, Enoferm RP15 i Uvaferm BDX) sa ciljem smanjenja alkoholne jakosti te povećanja ukupne kiselosti vina sorte Cabernet franc. Po provedenim fizikalno-kemijskim analizama utvrđeno je da je primjena kvasca IONYSWF™ dala vina manje alkoholne jakosti uz naglašeniju ukupnu kiselost. Nadalje, nisu utvrđene značajne razlike u kinetici alkoholne fermentacije među tretmanima, ali su utvrđene razlike u senzornim svojstvima. Prema rezultatima deskriptivne analize vino sorte Cabernet franc (*Vitis vinifera* L.) proizvedeno primjenom kvasca IONYSWF™ izdvojilo se nešto jačim tijelom te naglašenijim intenzitetom i trajnošću mirisa u kojem su dominirale začinske note i mirisi crvenog voća. Vino navedenog tretmana bilo je ujedno i najbolje brojčano ocjenjeno.

Gljučne riječi: alkohol, Cabernet franc, komercijalni vinski kvasac, ukupna kiselina

Uvod

Porast alkoholne jakosti vina vidljiv u posljednjih nekoliko godina pripisuje se klimatskim promjenama kao i zahtjevima potrošača za strukturiranim i fenolno zrelim crnim vinima (Cano-nico i sur. 2019) što za posljedicu može imati prenaplašenu alkoholnu jakost. Schmidtke i sur. (2012) i Puškaš i sur. (2020) navode različite pristupe koji mogu utjecati na smanjenje alkoholne jakosti vina i to kroz četiri osnovne faze proizvodnje vina: proizvodnju grožđa, predfermentativnu, fermentativnu i postfermentativnu fazu. Među ovim strategijama velik broj autora (Puškaš i sur. 2020, Goold i sur. 2017, Pascual i sur. 2017, Ciani i sur. 2016,) ističe važnost odabira kvasca koji ima manju konverziju šećer/etanol što se može postići bilo primjenom čistih *Saccharomyces* ili ne—*Saccharomyces* sojeva odnosno njihovim kombinacijama. Tijekom alkoholne fermentacije od 1 g L⁻¹ šećera stvori se približno 0,47g L⁻¹ etanola što odgovara količini od 16,8 g L⁻¹ šećera potrebnog za proizvodnju 1 vol% alkohola. Uzimajući u obzir činjenicu da su glavni metaboliti razgradnje šećera (glukoza i fruktoza) radom kvasca etanol i CO₂ (oko 92%) te glicerol (oko 3%), novija istraživanja daju naglasak na preusmjeravanju metabolizam *Saccharomyces* kvasaca ka većoj sintezi glicerola i organskih kiselina, a na štetu proizvodnje etanola (Noble i sur. 2020). U tu svrhu primjenjuje se adaptivna laboratorijska evolucija (Tilloy i sur. 2015) ili evolucijska prilagodba, ne-GMO strategija, koja omogućuje prirodni odabir kvasaca sa specifičnim svojstvima, izvan fenotipova već poznatih sojeva te se temelji na jednostavnom poticanju stanica da svoj metabolizam prilagode stresnim uvjetima, a zatim se izdvajaju oni koji udovoljavaju traženim kriterijima (Noble i sur. 2020).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi mogućnost smanjenja alkoholne jakosti uz povećanje

¹ dr. sc. Tomislav Plavša, dr. sc. Igor Palčić, Institut za poljoprivredu i turizam Poreč, K. Huguesa 8, 52440 Poreč, Hrvatska
² doc. dr. sc. Željko Andabaka, prof. dr. sc. Ana Jerome, Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska
Autor za korespondenciju: tomislav@iptpo.hr

ukupne kiselosti vina sorte Cabernet franc (*Vitis vinifera* L.) korištenjem komercijalnih *Saccharomyces cerevisiae* kvasaca (IONYSWF™, Enoferm RP15 i Uvaferm BDX). Nadalje, praćena je kinetika alkoholne fermentacije te utjecaj korištenih kvasaca na senzorni profil dobivenih vina.

Materijali i metode

Kvasci

U istraživanju su korištena tri komercijalno dostupna *Saccharomyces cerevisiae* kvasca (www.lallemmandwine.com): IONYSWF™, Enoferm RP15 i Uvaferm BDX (Lallemmand Inc., Canada).

IONYSWF™ je vinski kvasac koji je odabran unutar vrste *Saccharomyces cerevisiae* zbog svoje sposobnosti da značajno i prirodno poveća kiselost mošta tijekom fermentacije uz smanjenje alkoholne jakosti od 0,3 do 0,8 vol%. Vina dobivena od grožđa visoke zrelosti fermentirana ovim kvascem uravnoteženog su okusa uz naglašenu svježinu. Kvasac RP15 odlikuje umjerena brzina fermentacije, a daje bogata, uravnotežena i puna vina te pridonosi razvoju aroma svojstvenih kultivaru i to poput crvenog voća i mineralnih nota. Kvasac BDX je pogodan za vrhunska crvena vina te poboljšava sortne arome crnih vina, bez pojave netipičnih mirisnih i okusnih svojstava.

Vinifikacija

Grožđe sorte Cabernet Franc ubrano je tehnološkoj zrelosti, a za njeno određivanje korišteno su parametri šećera i titracijske kiselosti (Rajha i sur. 2017). Nakon provedenog i runjenja uz dodatak 1,5 g hL⁻¹ K-metabisulfida masulj je ujednačen te ravnomjerno raspodijeljen u tankove od nehrđajućeg čelika, po tretmanima u tri ponavljanja. Enzim Lallzyme EX-V™ (Lallemmand Inc, Canada), u dozi od 2 g hL⁻¹, radi stvaranja stabilnije veze antocijan-tanin te utjecaja na oslobađanje tvari arome i inaktivni kvasac OPTI-RED (Lallemmand Inc, Canada), u dozi od 40 g hL⁻¹ zbog oslobađanja polisaharid dodani su u masulj prije fermentacije. Rehidracija kvasca (30 g hL⁻¹) uz dodatak 40 g hL⁻¹ hrane za kvasce Go-Ferm Protect™ (Lallemmand Inc, Canada) obavljena je po uputama proizvođača. Alkoholna fermentacija je vođena pri temperaturi od 23°C ± 0,5°C. Dohrana kvasca izvršena je dva puta tijekom alkoholne fermentacije hranom Fermaid O™ (20g hL⁻¹ trećeg dana i 20g hL⁻¹ na ½ alkoholne fermentacije). Potapanje klobuka provedeno je ručno tri puta dnevno uz postupak pretakanja (delestage) jedanput dnevno za vrijeme trajanja fermentacije. Po završetku alkoholne fermentacije vino je u svim tretmanima ostavljeno u kontaktu s kožicom sedam dana (produžena maceracija). Prešanje je obavljeno na hidro preši pri maksimalnom tlaku od 0,6 bara. Nakon obavljenih pretoka i stabilizacije vino je punjeno u boce začepljeno plutenim čepom (Nomacorc) te ostavljeno u ležećem položaju 6 mjeseci do senzorne analize.

Fizikalno-kemijske analize mošta i vina

Šećer u moštu određivan je pomoću Oechleove moštne vage, a potom je iz Salleronovih tablica očitana je količina šećera u g L⁻¹. Reducirajući šećer u vinu određivan je titracijskom metodom po Rebelein-u prema Zoecklin i sur. (1995). Ukupna kiselost (kao vinska) mošta i vina određene su metodom neutralizacije uzorka s 0,1 M NaOH uz indikator bromtimol plavi prema metodi O.I.V. (2007). Hlapiva kiselost (kao octena) u vinu određena je metodom neutralizacije uzorka prethodno destiliranog u struji vodene pare, uz 0,1 M NaOH i indikator fenolftalein prema O.I.V. (2007).

Alkohol u vinu određen je metodom destilacije na osnovi specifične težine destilata pri 20°C prema vodi iste temperature. Iz dobivenih vrijednosti pomoću tablica po Reichardu očitani su odgovarajući vol. % alkohola. Ukupni ekstrakt u vinu određen je denzimetrijski iz ostatka destilacije, a odgovarajuća količina u gL⁻¹ očitana je iz tablica po Reichardu prema metodi O.I.V.

(2007). Ekstrakt bez šećera u vinu određen je računski, oduzimanjem količine reducirajućeg šećera od vrijednosti ukupnog ekstrakta. Pepeo u vinu određen je sagorijevanjem suhe tvari u mufolnoj peći pri 525°C, metodom propisanom od O.I.V.-a (2007). Slobodni i ukupni SO₂ u vinu određen je jodometrijskom metodom po Ripper-u (Vahl i Converse, 1980), pH vrijednost vina određena je mjerenjem na METTLER pH-metru.

Senzorna analiza vina

Ocjenjivanje je provedeno od strane 7 certificiranih senzornih analitičara. Ocjenjivanja vina proveden su metodama 100 bodova (NN br. 96/03) i metodom rangiranja. Za deskriptivnu analiza mirisnih i okusnih svojstava korištena je ljestvica od 10 bodova (0–1 najslabije; 2–3 slabo; 4-5 srednje; 6-7 jako; 8–9 najjače) za pojedino senzorno svojstvo.

Statistička obrada podataka

Jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) provedena je pomoću statističkog programa Statistica 13.4. (TIBCO Software Inc., 2018). Tukey-ev test primijenjen je za utvrđivanje značajne razlike ($p \leq 0,05$) među pojedinim uzorcima za svaki senzorni deskriptor, a smatraju se značajno različitim kod $p \leq 0,05$.

Rezultati i rasprava

Osnovna fizikalno-kemijska svojstva mošta i vina

U tablici 1. prikazane su fizikalno-kemijske vrijednosti mošta Cabernet franc prije dodatka enoloških preparata.

Tablica 1. Fizikalno - kemijska analiza mošta

Table 1. Physico - chemical analysis of must

parametri/ parameters	vrijednost/ value
Šećer (g L ⁻¹) / Sugar	235,00
Potencijalni alkohol [†] (vol%)/ Potential alcohol	13,90
Ukupna kiselost ^{††} (g L ⁻¹)/ Total acidity	7,20
pH	3,45

[†]šećer x 16,83/ sugar x 16,83; ^{††}kao vinska kiselina/ as tartaric acid

Kao što je vidljivo iz rezultata fizikalno-kemijske analize vina (tablica 2.) nisu utvrđene razlike u sadržaju neprevrelog šećera između korištenih komercijalnih kvasaca pri čemu sva vina možemo svrstati u kategoriju suhih vina. S druge strane, sadržaj alkohola bio je značajno manji, a ukupna kiselost značajno veća u vinima proizvedenim primjenom kvasca IONYSWF™. Prosječno, kvasac IONYSWF™ je dao vina s 0,6% majim postotkom alkohola i 0,4 – 0,8 gL⁻¹ većom ukupnom kiselošću, što je u skladu s istraživanjima Pascual i sur. (2017) i Noble i sur. (2020). Shodno povećanju ukupne kiselosti vina fermentirana ovim kvascem imala su i značajno manju pH vrijednost. Hlapiva kiselost u vinima fermentiranim s kvascem IONYSWF™ značajno je bila viša u odnosu na druga dva kvasca (RP15 i BDX), ali u granicama ispod senzorne osjetljivosti što za neka vina (Merlot i Garnacha Tinta) fermentiranim pri 16 ± 1 °C navode i Pascual i sur. (2017). S druge strane, isti autori ne navode značajne razlike u hlapivoj kiselosti kod vina fermentiranih pri 27 ± 1 °C.

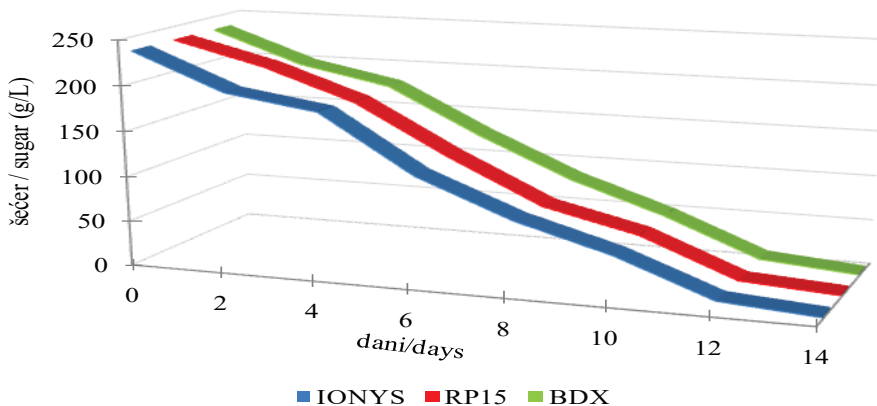
Tablica 2. Fizikalno-kemijska analiza vina sorte Cabernet franc
Table 2. Physico-chemical analysis of Cabernet franc wines

parametri/ parameters	Kvasac/ yeast		
	IONYS	RP15	BDX
Alkohol (vol%)/ Alcohol	13,30 ± 0,08 ^b	13,80 ± 0,06 ^a	13,80 ± 0,03 ^a
Ukupna kiselost [†] (g L ⁻¹)/ Total acidity	7,20 ± 0,10 ^a	6,60 ± 0,09 ^b	6,80 ± 0,03 ^b
Hlapiva kiselost ^{††} (g L ⁻¹) / Volatile acidity	0,25 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,01 ^b	0,23 ± 0,01 ^b
Neprevreli šećer (g L ⁻¹) / Residual sugar	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,10	1,00 ± 0,06
Suhi ekstrakt ^{†††} (g L ⁻¹) / Dry extract	32,10 ± 1,10 ^a	28,20 ± 0,20 ^b	29,40 ± 0,06 ^b
pH	3,38 ± 0,03 ^b	3,52 ± 0,02 ^a	3,48 ± 0,01 ^a

[†]kao vinska kiselina/ as tartaric acid; ^{††}kao octena kiselina/as acetic acid; ^{†††}ukupni ekstrakt - neprevreli šećer/ total dry extract - residual sugar; Prikazane srednje vrijednosti s različitim slovima u istom retku značajno se međusobno razlikuju po Tukey-evom testu ($p \leq 0,05$), n.s. nije značajno/ Means with different letters in the same row are different according Tukey test ($p \leq 0,05$), n.s. not significant

Kinetika alkoholne fermentacije

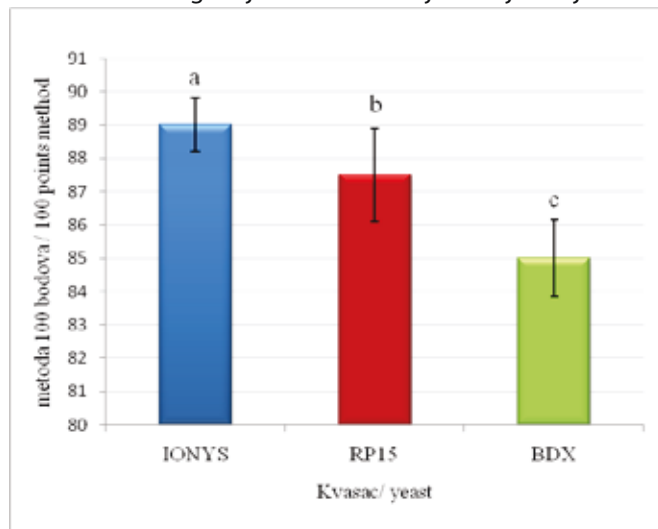
Nakon dodatka komercijalnih vinskih kvasaca svaka dva dana praćena je kinetika alkoholne fermentacije (grafikon 1). Za dužinu trajanja LAG faze te dužinu trajanja i kinetiku alkoholne fermentacije nisu utvrđene značajne razlike među tretmanima. U svim tretmanima alkoholna fermentacija započela je 24 sata od dodatka kvasca, a završila 14-tog dana. U svim tretmanima zabilježena je slična dinamika odvijanja alkoholne fermentacije bez usporavanja ili zastoja.



Grafikon 1. Kinetika alkoholne fermentacije
Graph 1. Kinetic of alcoholic fermentation

Senzorna analiza

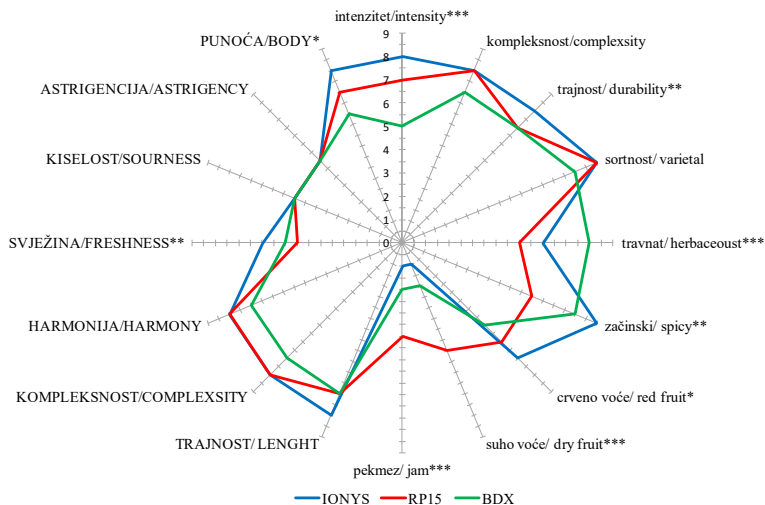
Vina iz pokusa su ocjenjena metodama 100 bodova (grafikon 2). i rangiranjem. Ocjenjivanjem metodom 100 bodova sva vina dobila su ocjene $\geq 85,00$ i to kako slijedi: IONYSWF™>RP15>BDX. Uspoređujući vina metodom rangiranja za mirisna svojstva vina proizvedena kvascem IONYSWF™ najbolje su rangirana, potom slijede vina s kvascem RP15 te ona s kvascem BDX. Rangiranje za okusna svojstva slijedilo je isti obrazac kao i za mirisna.



Grafikon 2. Rezultati ocjenjivanja vina; a) metoda 100 bodova

Graph 2. Wine evaluation results; a) 100 points method

Rezultati deskriptivne analize vina (grafikon 3) ukazali su na razlike kako u mirisnim tako i u okusnim svojstvima. Značajne razlike među kvascima nisu utvrđene jedino u kategorijama sortnost i kompleksnost. S druge strane vina proizvedena primjenom kvasca IONYSWF™ pokazala su značajnu razliku u intenzitetu i trajnosti mirisa. Isto tako ova vina imala su značajno viši intenzitet začinskih mirisa te mirisa koji podsjeća na crveno voće. S druge strane, vina kod kojih je u proizvodnji korišten kvasac RP15 imala su značajno intenzivnije mirisne komponente koje se vežu uz suho voće i pekmez, dok se kvasac BDX izdvojio po travnatim mirisnim notama. Vina za čiju proizvodnju je korišten kvasac IONYSWF™ odlikovala su se kako značajno većom punoćom okusa što je posljedica i značajno višeg suhog ekstrakta (tablica 2) tako i svježinom samog okusa. Do sličnih rezultata došli su i Noble i sur. (2020) koji su u vinu Syrah proizvedeno kvascem IONYSWF™ utvrdili povećanje svježine, intenziteta i punoće okusa te naglašeniju aromu u odnosu na kontrolni kvasac.



Grafikon 3. Prikaz senzornih svojstava vina sorte Cabernet franc, zvjezdice označavaju značajnost pri * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, mala slova označavaju mirisna, a velika slova okusna svojstva vina

Graph 3. Display of sensory properties of Cabernet franc wines, stars indicate significance at * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, lowercase letters denote the aroma and uppercase letters the flavour properties of wine

Zaključak

Temeljem dobivenih rezultata možemo zaključiti kako je korištenjem komercijalnog kvasca IONYSWF™ (*Saccharomyces cerevisiae*) u vinima sorte Cabernet franc došlo do značajnog smanjenja alkoholne jakosti uz naglašeniju ukupnu kiselosti u odnosu na tretmane s kvascima RP15 i BDX. Korišteni komercijalni soj kvasca nije imao utjecaja na kinetiku alkoholne fermentacije. Senzorno, vina proizvedena kvascem IONYSWF™ bolje su ocjenjena, a odlikovala su se većom punoćom i svježinom okusa uz naglašeniji intenzitet i trajnost mirisa u kojem su prevladavale začinske note i mirisi crvenog voća.

Literatura

- Canonico L., Solomon M., Comitini F., Ciani M., Varela C. (2019) Volatile profile of reduced alcohol wines fermented with selected non-*Saccharomyces* yeasts under different aeration conditions. *Food Microbiology* 84, 103247. DOI: 10.1016/j.fm.2019.103247
- Ciani M., Morales P., Comitini F., Tronchoni J., Canonico L., Curiel J. A., Oro L., Rodrigues A. J., Gonzalez R. (2016) Non-conventional yeast species for lowering ethanol content of wines. *Frontiers in Microbiology* May 4;7:642. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00642
- Goold H. D., Kroukamp H., Williams T. C., Paulsen I. T., Varela C., Pretorius I. S. (2017) Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microbial Biotechnology* 10(2), 264-278. DOI: 10.1111/1751-7915.12488
- Noble J., Ortiz-Julien A., Silvano A., Heras J.M., Théodore D. (2020) Using the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* for acidity management in wine. URL://www.lallemandwine.com/wp-content/uploads/2020/03/IONYS-ENG.pdf (12.02.2020.)
- O.I.V. (2007) Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Vol. 1., Paris
- Pascual O., Pons-Mercadé P., Gombau J., Ortiz-Julien A., Heras J. M., Fort F., Canals J. M., Zamora F. (2017) Study of the effectiveness of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* selected for the production of wines with higher acidity and lower alcoholic strength. *BIO Web of Conferences* 9, 02002, 40th World Congress of Vine and Wine. DOI: 10.1051/bioconf/20170902002
- Puškaš V. S., Miljić U. D., Djuran J. J., Vučurović V. M. (2020) The aptitude of commercial yeast strains for lowering the ethanol content of wine. *Food Science & Nutrition* 8, 1489-1498. DOI: 10.1002/fsn3.1433

- Rajha H. N., El Darra N., El Kantar S., Hobaika Z., Louka N., Maroun R.G. (2017) A comparative study of the phenolic and technological maturities of red grapes grown in Lebanon. *Antioxidants* 6(1),8, 1-11. DOI: 10.3390/antiox6010008
- Schmidtke L. M., Blackman J. W., Agboola S. O. (2012) Production Technologies for Reduced Alcoholic Wines. *Journal of Food Science* 77(1), R25-41. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02448.x
- Tilloy V., Cadière A., Ehsani M., Dequin S. (2015) Reducing alcohol levels in wines through rational and evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 213, 49-58. DOI: 10.1016/j.ijfood-micro.2015.06.027
- Vahl J. M., Converse J. E. (1980) Ripper procedure for determining sulfur dioxide in wine: collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 62(2), 194-199. DOI: org/10.1093/jaoac/63.2.194
- Zoecklin B. W., Fugelsang C. K., Gump B. H., Nury S. F. (1995) Wine analysis and production. Chapman & Hall, New York, USA
- www.lallemmandwine.com. URL://www.lallemmandwine.com/en/australia/products/catalogue (12.02.2020.)

Prispjelo/Received: 15.12.2020.

Prihvaćeno/Accepted: 15.2.2021.

Original scientific paper

Management of ethanol content and total acidity in wines by use of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts

Abstract

The impact of global warming has not bypassed the wine industry either. This is best manifested through an increase in alcoholic strength, which is accompanied by a decrease in total acidity and significantly affects the sensory properties of wine. One possibility of lowering alcohol strength involves use non-*Saccharomyces* and/or *Saccharomyces* yeast. The aim of this study was to examine the effect of commercial *Saccharomyces* yeasts (IONYSWF™, Enoferm RP15 and Uvaferm BDX) on the reduction of alcoholic strength and increase of the total acidity of Cabernet franc (*Vitis vinifera* L.) wine. According to the chemical analyzes, it was determined that the wine produced using IONYSWF™ yeast had a lower alcoholic strength with a higher total acidity. Furthermore, no significant differences in alcoholic fermentation kinetics were found between treatments. The wines were sensory different. Descriptive analysis showed that the wine fermented with IONYSWF™ yeast had stronger body without loss of freshness and a more pronounced intensity and length of the aroma, which was dominated by spicy notes and aromas of red fruit. This wine was also the best rated.

Key words: alcohol, Cabernet franc, commercial wine yeast, total acidity