

UNIVERZITET U NOVOM SADU
TEHNOLOŠKI FAKULTET

Uroš Miljić, dipl. inž.

**PROIZVODNJA I OCENA KVALITETA
VOĆNOG VINA OD SORTI DOMAĆE
ŠLJIVE (*Prunus domestica* L.)**

Doktorska disertacija

Novi Sad, 2015.

Zahvaljujem svim dragim kolegama i prijateljima koji su mi pružili pomoć i podršku tokom izrade ove doktorske disertacije. Posebnu zahvalnost dugujem svom mentoru dr Vladimiru Puškašu na znanju i iskustvu koje sam stekao radeći sa njim.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	4
2.1. Šljiva	5
2.1.1. Domaća šljiva (<i>Prunus domestica</i> L.)	6
2.1.2. Sorte domaće šljive	7
2.1.2.1. Čačanska lepotica	8
2.1.2.2. Požegača	8
2.1.2.3. Čačanska rana	9
2.2. Hemijske i nutritivne karakteristike šljive	10
2.2.1. Fenolna i isparljiva jedinjenja šljive	12
2.3. Voćna vina	14
2.4. Primarna prerada voća	16
2.4.1. Termički tretman voća	16
2.4.2. Enzimski tretman voća	17
2.4.2.1. Pektolitički enzimi	18
2.4.2.2. Upotreba komercijalnih preparata pektolitičkih enzima	19
2.4.2.3. Nastajanje metanola tokom proizvodnje vina	21
2.4.2.4. Važniji činioci koji utiču na sadržaj metanola u vinu	23
2.4.2.5. Inhibicija aktivnosti PME	23
2.5. Uticaj uslova fermentacije na sastav i kvalitet voćnih vina	25
2.5.1. Uticaj proizvodnog mikroorganizma (kvasca)	25
2.5.1.1. Kvasci u fermentaciji voćnih vina	28
2.5.2. Temperatura i aeracija	30
2.5.3. Vrednost pH	33
2.5.4. Sadržaj izvora azota u sirovini	33
2.5.5. Mešanje kljuka	34
2.6. Uticaj starenja vina na fenolni sastav i boju vina	35
2.7. Antioksidativna, antimikrobna i antikancerogena aktivnost vina i voćnih vina	36
2.7.1. Antoksidativno delovanje	36
2.7.2. Antimikrobno delovanje	38
2.7.3. Antikancerogeno delovanje	41
2.8. Optimizacija tehnoloških procesa metodom odzivne površine funkcije (RSM)	43
3. EKSPERIMENTALNI DEO	46
3.1. Sirovine	47
3.1.1. Šljive	47
3.2. Optimizacija uslova alkoholne fermentacije vina od šljive	48
3.2.1. Enzimski tretman kljuka od šljiva	48
3.2.2. Efekat učestalosti mešanja kljuka tokom fermentacije	49

3.2.3. Proizvodni mikroorganizmi i alkoholna fermentacija	49
3.2.4. Preliminarni skrining uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljive	50
3.2.5. Postupak optimizacije	51
3.3. Efekat dodatka koštica šljive u kljuk tokom fermentacije vina.....	52
3.4. Smanjenje produkcije metanola u vinu od šljive	53
3.5. Analitički postupci	56
3.6. Senzorna ocena vina.....	63
3.7. Funkcionalne karakteristike vina od šljive.....	64
3.7.1 Antiradikalska aktivnost.....	64
3.7.2. Antimikrobna aktivnost	64
3.7.3. Antiproliferativna aktivnost	65
3.8. Ispitivanje uticaja starenja na kvalitet vina od šljive	66
4. REZULTATI I DISKUSIJA	68
4.1. Ispitivanje osobina polazne sirovine.....	69
4.1.1. Mehanički sastav plodova šljive	69
4.1.2. Hemijski sastav kljuka i soka šljive	70
4.2. Optimizacija uslova alkoholne fermentacije vina od šljive	72
4.2.1. Efekat upotrebe različitih pektolitičkih enzima	72
4.2.2. Efekat učestalosti mešanja kljuka tokom fermentacije	74
4.2.3. Ispitivanje uticaja primene različitih kvasaca na karakteristike alkoholne fermentacije i aromatski profil proizvedenih vina	75
4.2.4. Ispitivanje uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljive: Preliminarni skrining.....	84
4.2.5. Postupak optimizacije	92
4.2.5.1. Čačanska lepotica.....	92
4.3. Uticaj dodatka koštica u kljuk na sastav vina od šljive	104
4.4. Hemijski sastav vina od šljive	106
4.5. Fenolna jedinjenja i hromatske karakteristike vina od šljive.....	109
4.6. Ispitivanje funkcionalnih karakteristika vina od šljive	113
4.6.1. Antiradikalska aktivnost.....	113
4.6.2. Antimikrobna aktivnost	116
4.6.3. Antiproliferativna aktivnost	121
4.7. Ispitivanje uticaja starenja na kvalitet vina od šljive	124
4.8. Smanjenje produkcije metanola u vinima od šljive	126
4.8.1. Primena tanina.....	127
4.8.2. Primena fenolnih kiselina	128
4.8.3. Primena D-galakturonske i pektinske kiseline	129
4.8.4. Primena bentonita i zeolita	130

4.8.5. Termički tretman kljuka.....	131
4.8.6. Kombinovani efekat toplote i ultrazvuka.....	133
4.8.7. Primena mikrotalasa	134
4.8.8. Poređenje primenjenih tretmana za smanjenje produkcije metanola u vinu od šljive	136
4.8.9. Inaktivacija pektin metil esteraze šljive	136
5. ZAKLJUČAK	138
6. LITERATURA	143
7. PRILOZI.....	164
7.1. Čačanska rana	165
7.2. Požegača	166

Spisak tabela

Tabela 2.1. Vrste podroda <i>Prunophora Focke</i>	5
Tabela 2.2. Vodeći proizvođači šljive u svetu (2007-2011).....	6
Tabela 2.3. Hemijski sastav svežih i sušenih šljiva	10
Tabela 2.4. Podela pektolitičkih enzima	19
Tabela 2.5. Redukcija sadržaja metanola u vinu od grožđa u zavisnosti od temperature i vremena zagrevanja kljuka	24
Tabela 2.6. Specifični inhibitori aktivnosti PME izolovani iz različitih biljnih izvora	24
Tabela 3.1. Pektolitički enzimi korišteni za tretman kljuka od šljiva.....	48
Tabela 3.2. Vrednosti nivoa ispitivanih faktora alkoholne fermentacije	51
Tabela 3.3. Vrednosti nivoa posmatranih ulaznih promenljivih.....	52
Tabela 3.4. Količina koštica dodavana u kljuk tokom mikroviniifikacija	53
Tabela 4.1 Mehanički sastav plodova sorti domaće šljive.....	69
Tabela 4.2. Hemijske karakteristike kljuka i soka tri ispitivane sorte šljive.....	71
Tabela 4.3. Uticaj pektolitičkih enzima na prinos i parametre kvaliteta vina od šljive.....	73
Tabela 4.4. Efekat učestalosti mešanja kljuka na prinos i parametre kvaliteta vina od šljive	74
Tabela 4.5. Karakteristike i sadržaj pojedinih produkata fermentacije u vinima od šljive (sorte Čačanska lepotica) proizvedenih upotrebom različitih vrsta kvasaca	75
Tabela 4.6. Aromatična jedinjenja vina od šljive (sorte Čačanska lepotica) proizvedenih upotrebom različitih vrsta kvasaca.....	78
Tabela 4.7. Aromatična jedinjenja vina od ispitivanih sorti domaće šljive proizvedenih spontanom fermentacijom.....	81
Tabela 4.8. Rezultati senzorne analize vina od šljive sorte Čačanska lepotica proizvedenih upotrebom različitih vrsta kvasaca.....	82
Tabela 4.9. Senzorna analiza vina od sorti domaće šljive proizvedenih spontanom fermentacijom	83
Tabela 4.10. Ispitivanje uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljive sorte Čačanska lepotica primenom centralnog kompozitnog eksperimentalnog plana (CCD)	86
Tabela 4.11. Polinomski oblici fitovanih odziva ispitivanih parametara.....	86
Tabela 4.12. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva i regresionih koeficijenata ...	87
Tabela 4.13. Ispitivanje uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljive sorte Čačanska lepotica primenom Box-Behnken eksperimentalnog plana	93
Tabela 4.14. Polinomski oblici fitovanih odziva ispitivanih parametara.....	94
Tabela 4.15. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva i regresionih koeficijenata	94

Tabela 4.16. Pokazatelji uticaja dodatka koštica na hemijski sastav vina od šljive	105
Tabela 4.17. Hemijski sastav vina od šljive.....	106
Tabela 4.18. Sadržaj fenolnih jedinjenja i hromatske karakteristike vina od šljive	109
Tabela 4.19. HPLC analiza fenolnih jedinjenja vina od sorti domaće šljive	111
Tabela 4.20. Sadržaj fenolnih jedinjenja i antiradikalaska aktivnost analiziranih vina od šljive.	113
Tabela 4.21. Antimikrobna aktivnost vina od šljive i kontrolnih uzoraka, izražena kao prečnik zone inhibicije.....	117
Tabela 4.22. Antiproliferativna aktivnost vina od sorti domaće šljive	121
Tabela 4.23. Efekat starenja na parametre kvaliteta vina od šljive.....	125
Tabela 7.1. Ispitivanje uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljive sorte Čačanska rana primenom Box-Behnken eksperimentalnog plana.....	165
Tabela 7.2. Polinomski oblici fitovanih odziva ispitivanih parametara.....	165
Tabela 7.3. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva i regresionih koeficijenata ...	166
Tabela 7.4. Ispitivanje uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljive sorte Požegača primenom Box-Behnken eksperimentalnog plana.....	166
Tabela 7.5. Polinomski oblici fitovanih odziva ispitivanih parametara.....	167
Tabela 7.6. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva i regresionih koeficijenata ...	167

Spisak slika

Slika 2.1. Prosečna godišnja proizvodnja šljiva u svetu (FAO, 2012)	6
Slika 2.2. Izgled ploda sorte Čačanska lepotica.....	8
Slika 2.3. Izgled ploda sorte Požegača.....	9
Slika 2.4. Izgled ploda sorte Čačanska rana	10
Slika 2.5. Postupak proizvodnje crvenih vina.....	15
Slika 2.6. Struktura ćelijskog zida biljne ćelije.....	18
Slika 2.7. Struktura glavnih lanaca (a) niskoesterifikovanih i (b) viskoesterifikovanih pektina i aktivno mesto delovanja enzima uključenih u njihovu razgradnju.....	19
Slika 2.8. Demetoksikacija pektinskih materija.....	22
Slika 2.9. Šematski prikaz formiranja aromatskih jedinjenja iz šećera i amino kiselina kao rezultat metabolizma vinskog kvasca	26
Slika 2.10. Eksperimentalni planovi bazirani na praćenju tri faktora u tri nivoa: a) kompletan faktorijski plan, b) Box-Behnken dizajn, c) Centralni kompozitni dizajn (CCD).....	44
Slika 4.1 Prosečne dimenzije korišćenih plodova šljive: a) Čačanska rana, b) Čačanska lepotica, c) Požegača	70
Slika 4.2. Senzorna analiza vina od šljive proizvedenih upotrebom različitih vrsta kvasaca izražena preko procenta ukupne prihvatljivosti, kao i prihvatljivosti pojedinih parametara	83
Slika 4.3. Senzorna analiza vina od šljive proizvedenih spontanom fermentacijom izražena preko procenta ukupne prihvatljivosti, kao i prihvatljivosti pojedinih parametara	84
Slika 4.4. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na sadržaj etanola u vinu od šljive sorte Čačanska lepotica	88
Slika 4.5. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na koncentraciju metanola u vinu od šljive sorte Čačanska lepotica.....	89
Slika 4.6. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na sadržaj glicerola u vinu od šljive sorte Čačanska lepotica	90
Slika 4.7. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na sadržaj etanola u vinu od šljive sorte Čačanska lepotica	98
Slika 4.8. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na koncentraciju metanola u vinu od šljive sorte Čačanska lepotica.....	99
Slika 4.9. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na sadržaj glicerola u vinu od šljive sorte Čačanska lepotica	100
Slika 4.10. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na prinos vina od šljive sorte Čačanska lepotica	101
Slika 4.11. „Parity plot“ postignutih i predviđenih vrednosti sadržaja etanola	102

Slika 4.12. „Parity plot“ postignutih i predviđenih vrednosti koncentracije metanola.....	102
Slika 4.13. „Parity plot“ postignutih i predviđenih vrednosti sadržaja glicerola.....	103
Slika 4.14. „Parity plot“ postignutih i predviđenih vrednosti prinosa vina	103
Slika 4.15. Hemijska struktura stabilnog DPPH [•] radikala	113
Slika 4.16. Korelacija između antiradikalske aktivnosti vina i a) ukupnih fenola, b) ukupnih antocijana i c) flavan-3-ola	115
Slika 4.17. Zone inhibicije za uzorke vina od šljive i kontrolne uzorke prema <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1-U ₁ , 2-U ₂ , 3-U ₃ , 4- Ket, 5-A ₁ , 6-A ₂ , 7-A ₃ , 8-KSO ₂ , 9-FB ₁ , 10-FB ₂ , 11-FB ₃ , 12-KpH, 13-pufer).....	118
Slika 4.18. Mehanizam citotoksičnog dejstva amigdalina na ćelije kancera	124
Slika 4.19. Prikaz uticaja dodavanja tanina u kljuk na sadržaj metanola u vinu	127
Slika 4.20. Prikaz uticaja dodavanja fenolnih kiselina na sadržaj metanola u vinu	128
Slika 4.21. Prikaz uticaja dodavanja D-galakturonske i pektinske kiseline na sadržaj metanola u vinu	129
Slika 4.22. Prikaz uticaja dodatka bentonita i zeolita na sadržaj metanola u vinu	131
Slika 4.23. Prikaz uticaja termičkog tretmana na sadržaj metanola u vinu	132
Slika 4.24. Prikaz uticaja zajedničkog dejstva toplote i ultrazvuka na sadržaj metanola u vinu	133
Slika 4.25. Prikaz uticaja tretmana kljuka mikrotalasima na sadržaj metanola u vinu.....	135
Slika 4.26. Uporedni prikaz najefikasnijih fizičko-hemijskih tretmana kljuka za smanjenje produkcije metanola u vinu.....	136
Slika 4.27. Prikaz uticaja različitih fizičko-hemijskih tretmana kljuka na sadržaj metanola formiranog aktivnošću PME šljive	137

1. UVOD

Voćno vino je poljoprivredno-prehrambeni proizvod dobijen potpunom ili delimičnom fermentacijom soka ili kljuka od svežeg, i za to pogodnog, koštičavog, jezgričavog, jagodičastog, bobičastog ili ostalog voća. Ovakva vina zbog svog laganog, voćnog i osvežavajućeg karaktera postaju sve popularnija u svetu. Sa druge strane, trend proizvodnje i konzumiranja voćnih vina u Republici Srbiji je praktično zanemarljiv, i pored velike godišnje proizvodnje različitih vrsta voća. Šljiva (*Prunus domestica* L.) je svakako najvažnija i najčešće gajena voćna vrsta u Srbiji, pri čemu je naša zemlja takođe i jedan od najvećih proizvođača ovog voća u svetu. Na osnovu podataka Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (FAO) za period od 2007-2011. godine, Srbija se nalazi na drugom mestu u svetu po proizvodnji šljiva sa prosečnim godišnjim prinosom od oko 600000 tona. Značajna količina godišnje proizvodnje šljive se izveze u svežem ili suvom stanju, dok se najveći deo preradi u neki od brojnih proizvoda (sokovi, džemovi i, pre svega, rakija šljivovica). S obzirom na težnju da se što manje izvoze primarni poljoprivredni proizvodi, a što više gotovi prehrambeni proizvodi, pruža se mogućnost da Srbija postane poznata po još jednom proizvodu od svoje najrasprostranjenije vrste voća, specifičnom voćnom vinu od šljive. U pogledu hemijskog sastava, šljivu, kao potencijalnu sirovinu za proizvodnju vina, karakteriše povoljan odnos šećera i voćnih kiselina, visok sadržaj pektinskih materija, kao i značajane količine fenolnih jedinjenja, vitamina i mineralnih materija. S obzirom na različite epohe sazrevanja (sastav sirovine) pretpostavlja se da nisu sve sorte šljive koje se gaje u Srbiji podjednako pogodne za preradu u vino.

Proizvodnja voćnih vina se tehnološki ne razlikuje značajno od proizvodnje vina od grožđa, ali s obzirom na specifičnosti šljive kao sirovine, pre svega u pogledu fizičko-hemijskih parametara kvaliteta, neophodno je jednim opsežnim istraživanjem celokupnog procesa proizvodnje omogućiti dobijanje finalnog proizvoda najvišeg, standardizovanog i prepoznatljivog kvaliteta. Pod time se podrazumeva ispitivanje postupaka primarne prerade voća i procesa fermentacije u cilju pronalaženja optimalnih uslova proizvodnje vina od šljive (temperatura, pH, tretman voćnog kljuka enzimima, postupak maceracije, izbor soja kvasca itd.). Za kvalitet gotovog vina od velike važnosti su procesi sazrevanja i stabilizacije kao i njihov uticaj na fizičko-hemijske parametre kvaliteta. Posebna pažnja prilikom ispitivanja uticaja različitih procesnih parametara i postupaka vinifikacije mora biti usmerena ka oceni senzorne prihvatljivosti i kvaliteta svakog proizvedenog vina.

Poznato je da konzumiranje određene hrane i pića može imati pozitivan uticaj na zdravlje potrošača. Takva hrana se naziva funkcionalnom, jer ima povoljan uticaj na ljudsko zdravlje, pored svojih uobičajenih nutritivnih funkcija. Vino, kao i grožđe od kojeg je proizvedeno, prirodno sadrži velike količine biološki aktivnih komponenti (pre svega fenolnih jedinjenja). Umeren dnevni unos vina je povezan sa dužim životom, kao i boljim opštim zdravstvenim stanjem ljudi. Pored grožđa, voće kao što je borovnica, kupina, brusnica, šljiva itd. smatra se jednakim, pa i boljim, izvorom različitih fenolnih jedinjenja. Kako bi se ocenila funkcionalna vrednost vina od šljive potrebno je ispitati sastav i sadržaj fenolnih jedinjenja, njegovu eventualnu antioksidativnu i antimikrobnu aktivnost. Za razliku od vina od grožđa, voćna vina

imaju jednu bitnu prednost, a to je najčešće niži sadržaj alkohola koji je najveća prepreka prihvatanju vina kao funkcionalne hrane usled kontraverznog mišljenja naučne javnosti o uticaju alkohola na zdravlje.

Uzimajući u obzir nedostatak dostupne literature vezane za postupak proizvodnje vina od šljive, kao i nedovoljno podataka o pogodnosti različitih domaćih sorti za ovaj način prerade, ova doktorska disertacija je imala za cilj sprovođenje detaljnih istraživanja celokupnog procesa vinifikacije. Kao sirovine za proizvodnju vina korištene su tri sorte domaće šljive različitih epoha sazrevanja: Čačanska rana, Čačanska lepotica i Požegača, s obzirom da predstavljaju jedne od najzastupljenijih i najkvalitetnijih sorti šljive koje se gaje u Republici Srbiji. U cilju ocene mogućnosti upotrebe pomenutih sorti kao sirovina za proizvodnju voćnog vina ispitan je njihov mehanički i fizičko-hemijski sastav. Izvršena je optimizacija uslova alkoholne fermentacije (temperature, vrednosti pH, trajanja fermentacije i doze enzimskog preparata). Pronalaženje optimalnog tehnološkog postupka za cilj je imalo i ispitivanje upotrebe različitih pektolitičkih enzima za tretman kljuka i efekta učestalosti mešanja kljuka tokom fermentacije. Takođe, ocenjen je kvalitet vina od šljive proizvedenih upotrebom autohtonih i selekcionisanih sojeva kvasaca, kako bi se odabrao proizvodni mikroorganizam najpogodnijih karakteristika.

Radi dobijanja potpune slike o ovom vinu, izvršena je njegova karakterizacija u pogledu hemijskog sastava (alkoholi, kiseline, mineralne materije, fenolna i aromatična jedinjenja itd.). S obzirom da je reč o voćnom vinu namenjenom široj potrošnji, jedan od osnovnih ciljeva je bio i da se rezultati hemijskih analiza upotpune senzornom ocenom kvaliteta i prihvatljivosti vina dobijenih primenom različitih uslova proizvodnje. Kvalitet vina od sorti domaće šljive je ocenjivan i tokom njegovog dvanaestomesečnog starenja u staklenim bocama na kontrolisanoj temperaturi.

Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je bio i „*in vitro*“ ispitivanje i karakterizacija antiradikalne, antimikrobne i antiproliferativne aktivnosti vina od ispitanih sorti šljive. Antimikrobna aktivnost vina ispitana je prema Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama izolovanim iz vode za piće i namirnica i prema dve vrste kvasaca, dok su u oceni antiradikalne aktivnosti korišteni 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) slobodni radikali. Antiproliferativna aktivnost ispitana je na tri histološki različite ćelijske linije karcinoma: Hep2, RD i L2OB.

Velika pažnja prilikom izrade ove disertacije bila je usmerena ka pronalaženju kompromisnog rešenja vezanog za enzimski tretman kljuka. Obrada kljuka pektolitičkim enzimima primenjuje se pre svega zbog povećanja randmana vina i sadržaja fenolnih jedinjenja, ali sa druge strane značajno povećava sadržaj metanola usled visokog sadržaja pektina u šljivi. Sa time u vezi, cilj je bio da se ispituju različiti fizičko-hemijski tretmani koji mogu dovesti do smanjenja produkcije metanola, kako bi se pronašao najefikasniji i, po kvalitetu vina od šljive, najneutralniji postupak.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Šljiva

Šljiva je drvo iz familije ruža (*Rosaceae*) (Mišić, 2006). Filogenetski posmatrano, šljiva pripada potfamiliji *Prunuoideae* (*Amygdalaceae*, koštičavo voće), rodu *Prunus* L., u koji spadaju i badem, breskva, kajsija, trešnja, višnja. Ova voćka pripada podrodu *Prunophora* Focke koji ubuhvata veći broj vrsta (tabela 2.1.).

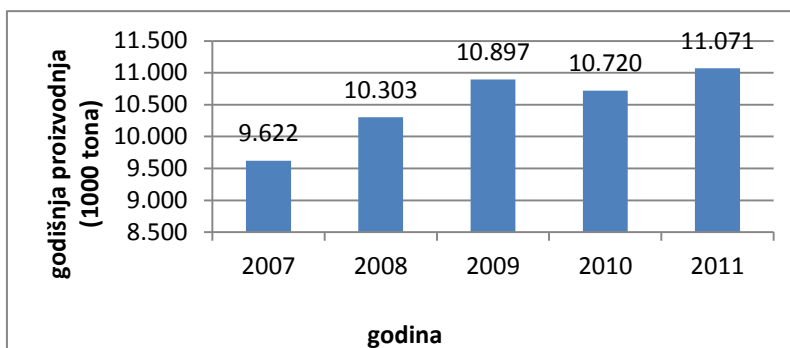
Tabela 2.1. Vrste podroda *Prunophora* Focke (Blagojević i Božić, 2012)

Vrste šljiva			
	Latinski naziv	Srpski naziv	Poreklo
1	<i>P. domestica</i> L.	Domaća šljiva	Zapadna Azija, Evropa
2	<i>P. insititia</i> L.	Trnošljiva	Zapadna Azija, Evropa
3	<i>P. spinosa</i> L.	Crni trn	Evropa, Severna afrika
4	<i>P. cerasifera</i> Ehrh.	Džanarika	Od Tjen-šana u Aziji do Jadranskog mora
5	<i>P. salicina</i> Lindl.	Kineska (japanska) šljiva	Kina
6	<i>P. simonii</i> Carr.	Šljiva-kajsija	Severna Kina
7	<i>P. ussuriensis</i> Kov. Et. Kost.	Usurijska šljiva	Daleki istok
8	<i>P. nigra</i> Ait.	Kanadska šljiva	Kanada, sever SAD
9	<i>P. americana</i> Marsh.	Američka šljiva	Istočni deo SAD
10	<i>P. hortulana</i> Bailey	Američka baštenska	Centralni deo SAD
11	<i>P. angustifolia</i> Marsh.	Uskolinska šljiva	Jugoistočni deo SAD
12	<i>P. munsoniana</i>	Munsonijska šljiva	Centralni deo SAD, Meksiko
13	<i>P. maririma</i> Marsh.	Severnoamerička primorska šljiva	Severositočni deo SAD
14	<i>P. subcordata</i> Benth	Pacifička šljiva	Kalifornija i Oregon

Najzastupljenije u svetu su sorte domaće šljive (*Prunus domestica* L.), znatno manje su prisutne sorte kineske šljive (*Prunus salicina* Lindl.) i džanarika (*R. cerasifera*), dok je proizvodnja ostalih vrsta šljiva skoro zanemarljiva (Hui i sar., 2006). Na slici 2.1. predstavljeni su podaci o prosečnoj godišnjoj proizvodnji šljive u svetu u periodu od 2007. do 2011, dok su u tabeli 2.2. istaknute zemlje koje su najvažniji proizvođači ovog voća. Najveći proizvođač šljive je danas Kina, sa preko 5 miliona tona sveže šljive godišnje. Među značajne proizvođače ove voćke se ubrajaju i Srbija, SAD, Rumunija, Iran, Čile, Rusija, Turska, Italija itd. sa prosečnom proizvodnjom od 100.000 do 600.000 tona (FAO, 2012).

Smatra se da su domaća šljiva (*Prunus domestica* L.) i trnošljiva (*Prunus insititia*), nastale spontanom hibridizacijom crnog trna (*R. spinosa*) i džanarike (*R. cerasifera*) (Blagojević i Božić, 2012). Dugotrajnom evolucijom u različitim ekosredinama šljiva je stekla visok stepen prilagođenosti i širok areal rasprostranjenja, posebno na severnoj Zemljinj polulopti (između 40 i 60° severne geografske širine). Naučna dostignuća u oblasti genetike, oplemenjivanja, fiziologije, integralne proizvodnje šljiva i njene prerade otvorila su nove puteve za stvaranje

boljih sorti i podloga, proširila su aeral gajenja, povećala proizvodnju, poboljšala kvalitet svežih šljiva i njenih prerađevina, što je omogućilo veću potrošnju u svetu.



Slika 2.1. Prosečna godišnja proizvodnja šljiva u svetu (FAO, 2012)

Tabela 2.2. Vodeći proizvođači šljive u svetu (2007-2011) (FAO, 2012)

Zemlja	2007	2008	2009	2010	2011
Bosna i Hercegovina	138707	132623	155767	157562	157504
Bugarska	23020	14298	17246	33688	32371
Češka Republika	5858	5942	8894	4470	6261
Čile	250000	234000	296000	298000	293205
Iran	164029	269139	269139	269139	288719
Italija	178293	183955	189303	207497	191989
Kina	4825830	5223001	5372899	5664826	5873656
Moldavija	14015	56157	31400	53816	34981
Nemačka	65290	31363	73102	49260	58741
Rumunija	372631	475290	533691	624884	573596
Rusija	183000	135000	138000	120000	137000
SAD	367319	493055	568442	257096	281499
Srbija	680566	606767	662631	426846	581874
Turska	240874	248185	245782	240806	268696

2.1.1. Domaća šljiva (*Prunus domestica* L.)

Domaća šljiva (*Prunus domestica* L.) gaji se u Evropi preko 2000 godina (Walkowiak-Tomczak, 2008). Pored Evrope, zastupljena je u Aziji (najviše zapadni delovi) i, u manjoj meri, u Severnoj Americi. Ova vrsta šljive obuhvata preko 2500 sorti (Mišić, 2006).

Domaća šljiva je žbun ili drvo visoko do 12 m. Živi od 30 do 50 godina. Kruna stabla je piramidalna, jajasta, loptasta ili u obliku kišobrana. Grančice gajenih biljaka su gole ili prekrivene dlačicama, bez trnova. Listovi su dosta krupni (4-9 x 2-5 cm), eliptični ili jajasti. Lice liske je tamnozeleno i golo, a naličje sivozeleno i prekriveno dlačicama. Cvetovi su najčešće beli, obično po dva u cvetnom pupoljku. Plodnik je srednje cvetan. Kod nas cveta u martu i

aprilu. Plod domaće šljive je koštunica, različite krupnoće (mase 6,5 do 65 g) i oblika (jajast, loptast, kruškast) sa bočnom brazdom. Pokožica ploda je modroplava, ljubičasta, crvena, žuta ili zelena. Meso (mezokarp) ploda sraslo je za košticu (endokarp) kod glođuša, slobodno je kod cepača, a poluslobodno kod polucepača. Meso je žuto, žutozeleno, ređe tamno, sočne konzistencije i različitog ukusa (slatko, slatko-nakiselo, kiselo, mirišljivo). U zavisnosti od sorte, plod dozreva od jula do septembra. Koren je relativno plitak, pa teško podnosi sušu (Blagojević i Božić, 2012).

Šljiva je najzastupljenija voćna vrsta u Srbiji, a ima i najveći privredni značaj (Mišić, 2006). Privredni značaj šljive određen je njenom upotrebom vrednošću, visokom zastupljenošću u voćarskoj proizvodnji, značajnim učešćem u spoljno-trgovinskoj razmeni, visokim angažovanjem radne snage u proizvodnji, preradi i prometu, kao i doprinosu ove voćne vrste održivom razvoju poljoprivrede i zaštiti životine sredine. Na osnovu podataka Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (FAO) za period od 2007-2011. godine, Srbija se nalazi na drugom mestu u svetu po proizvodnji šljiva sa prosečnim godišnjim prinosom od oko 600000 tona. Po površini koje šljivari zauzimaju, prinos bi trebao da bude veći, ali na slabiji prinos utiče zapuštenost šljivara, bolesti i štetočine, naročito štitaste vaši i virus šarke šljive (*Plum pox virus* PPV). Da bi se prinosi poboljšali nužne su sanacije šljivara, poboljšanje agrotehnike i zaštite od štetočina i biljnih bolesti (Mišić, 2006).

Šljiva je voćna vrsta umereno kontinentalne klime (Hui i sar., 2006) koja se na prostorima Srbije prilagodila različitim uslovima. Odlično uspeva i veoma dobro rađa na brdsko-planinskom području Srbije (200-700 m nadmorske visine). Veoma je adaptivna i uspeva čak i na preko 1.000 m nadmorske visine (gaji se na padinama Javora i Kopaonika, na visini preko 1.250 m). U zavisnosti od sorte, šljiva na našim prostorima sazreva od sredine juna do polovine oktobra. Koristi se sveža ili se suši, a znatan deo roda se izvozi. Od plodova ove voćke proizvodi se čitav niz proizvoda (džemovi, sokovi, slatko itd.), pri čemu se preko 90% godišnjeg roda u našoj zemlji iskoristi za proizvodnju rakije šljivovice, koja je naše nacionalno alkoholno piće (Nikićević i Paunović, 2013).

2.1.2. Sorte domaće šljive

Najnovija sortna lista kod nas je predložena i usvojena 1993. god. u Vrnjačkoj Banji, a obuhvata vodeće sorte šljive za proizvodne zasade, sorte lokalnog značaja i perspektivne sorte (Blagojević i Božić, 2012). Vodeće sorte su sorte šljive od opšteg značaja za Republiku Srbiju, sorte lokalnog značaja daju dobre rezultate u određenim mestima, pa je opravdano njihovo gajenje u takvim uslovima, dok perspektivne sorte poseduju poželjne osobine ali njihovom eventualnom širenju treba da prethode detaljna ispitivanja.

U vodeće sorte za proizvodne zasade spadaju: Čačanska lepotica, Požegača, Čačanska rodna, Valjevka, Stenli (*Stanley*).

U sorte lokalnog značaja se ubrajaju: Čačanska rana, Rut geršteter (*Ruth Gerstetter*), Čačanska najbolja, Valerija, Kalifornijska plava (*California blue*), Čačanski šećer, Ana špet (*Anna Späth*), Altanova renklode (*Reine-Claude d'Althan*), Aženka (*Agen 707*).

U perspektivne sorte spadaju: Dijana (*Diana*), Herman (*Herman*), Opal (*Opal*), Pozna plava (*Čačak Spate*), Silvija (*Silvia*), Albatros (*Albatros*) itd.

Veliki broj sorti stvoren je upravo u bivšoj Jugoslaviji, kasnije Srbiji i Crnoj Gori, i to su: Čačanska lepotica, Čačanska rana, Čačanska najbolja, Čačanska rodna, Čačanski šećer, Valjevka, Timočanka itd. Treba istaći i stare domaće sorte šljive čiji se plodovi prvenstveno koriste za proizvodnju rakije (rakijske sorte): Crvena ranka (šumadinka, darosavka), Metlaš (dragačevka), Moravka (bugarka) itd. (Mišić, 2006).

2.1.2.1. Čačanska lepotica

Stvorena je hibridizacijom u Institutu za voćarstvo u Čačku, a priznata je za novu sortu 1975. godine. Nastala je ukrštanjem sorti Vangenhajm (*Wangenheims Fruhwetsche*) i Požegača. Sazreva srednje rano, pa se berba odvija najčešće krajem jula ili početkom avgusta. Plodovi su prvenstveno namenjeni za jelo u svežem stanju, mada se mogu koristiti i za neke vidove prerade, posebno u domaćinstvu (slatko, džem, rakija). Srednje su krupni, prosečne mase oko 40 g i okruglastog oblika. Pokožica je tamno plava i prekrivena obilnim pepeljkom. Mezokarp je zelenkasto žut, čvrst, sočan, slatko nakiselog ukusa. Sadržaj suve materije je oko 16-18%, ukupnih šećera oko 9-10% a ukupnih kiselina oko 1%, a vrednost pH je oko 3,4. Rano prorodi i rađa redovno i obilno. Samooplodna je sorta. Tolerantna je prema virusu šarke šljive. Relativno dobro podnosi sušu (Mišić, 2006).



Slika 2.2. Izgled ploda sorte Čačanska lepotica

2.1.2.2. Požegača

Postoji veliki broj sinonima za ovu sortu kao što su Madžarka, plava šljiva, bistrica, bosanka, jesenka itd. Poreklo ove sorte nije u potpunosti poznato mada se smatra da potiče iz Male Azije, današnjeg Turkmenistana. Predstavlja sortu sa najkvalitetnijim plodovima ne samo kod nas već i u čitavom svetu, te se može smatrati vodećom sortom šljive. Obiluje nizom tipova (klonova) različitih biološko-privrednih osobina koji se posebno razlikuju po krupnoći ploda i rodnosti. Plodovi se u našim krajevima beru krajem avgusta ili početkom septembra, a u

hladnijim područjima i na većim nadmorskim visinama mnogo kasnije (kraj septembra, početak oktobra). Plod je sitan do srednje krupan sa težinom od 12-30 g, najčešće 15-18 g. Oblika su tipično jajastog sa modro-plavom pokožicom prekrivenom obilnim pepeljkom. Plodovi ostaju sitni ako se sprovodi blaga rezidba ili ako se stabla ne orezuju. Mezokarp se potpuno odvaja od koštice, zlatno žute je boje, čvrst, sočan, prepoznatljivo slatko-nakiselog ukusa, aromatičan. Upotrebna vrednost plodova je raznovrsna. Požegača je dosta dobro prilagođena različitim klimatskim i zemljišnim uslovima. Osetljiva je na bolesti, posebno na virus šarke šljive. Rodna je sorta, ali alternativno rađa (Mišić, 2006).

Požegača sadrži 10-14% šećera, u kojima je glukoza zastupljena sa oko 44%, fruktoza sa oko 21%, a saharoza sa oko 35%. Sadržaj kiselina je najčešće u granicama 0,44-0,9%, pri čemu je najviše zastupljena jabučna kiselina, a u manjoj meri su prisutne i limunska i vinska kiselina. Vrednost pH najčešće varira od 3,4 do 3,7. Sadržaj pektina je 0,5-0,9% (Nikićević i Paunović, 2013).



Slika 2.3. Izgled ploda sorte Požegača

2.1.2.3. Čačanska rana

Stvorena je u Institutu za voćarstvo u Čačku, a priznata za novu sortu 1975. godine. Nastala je ukrštanjem sorti Vangenhajm (*Wangenheims Fruhwetsche*) i Požegača. Sazreva rano, plodovi se beru krajem juna ili početkom jula, i neujednačene su krupnoće jer prosečna težina varira od 35 do 80 g. Plod je izduženo-jajastog oblika, ljubičasto-plave boje pokožice. Meso je žuto, čvrsto i sočno, zadovoljavajućeg ukusa. Tolerantna je prema virusu šarke šljive. Rađa dobro na toplijim položajima. Plod sadrži oko 15% rastvorljive suve materije, 9% ukupnih šećera, 1% ukupnih kiselina, a vrednost pH je oko 3,3 (Mišić, 2006).



Slika 2.4. Izgled ploda sorte Čačanska rana

2.2. Hemijske i nutritivne karakteristike šljive

Šljivu i proizvode prerade šljive (suve šljive, sok od šljiva) karakterišu značajne količine pojedinih hranljivih materija. Hemijski sastav sveže i sušene šljive prikazan je u tabeli 2.3.

Tabela 2.3. Hemijski sastav svežih i sušenih šljiva (na 100 g ploda bez koštice) (Hui i sar., 2006)

Nutrijent	Sveže šljive	Sušene šljive
Voda (g)	87,23	30,92
Energija (kcal)	46	240
Protein (g)	0,7	2,18
Ukupni lipidi (g)	0,28	0,38
Masne kiseline, zasićene (g)	0,017	0,088
Ugljeni hidrati (g)	11,42	63,88
Ukupna prehrambena vlakna (g)	1,4	7,1
Ukupni šećeri	9,92	38,13
Vitamini		
Vitamin A (IU)	345	781
Vitamin C (mg)	9,5	0,6
Tiamin (mg)	0,028	0,051
Riboflavin (mg)	0,026	0,186
Niacin (mg)	0,417	1,882
Pantotenska kiseina (mg)	0,135	0,422
Vitamin B-6 (mg)	0,029	0,205
Folna kiselina (µg)	5	4
Vitamin E (mg)	0,26	0,43
Vitamin K (µg)	6,4	59,5
Mineralne materije		
Kalcijum (mg)	6	43
Gvožđe (mg)	0,17	0,93
Magnezijum (mg)	7	41
Fosfor (mg)	16	69
Kalijum (mg)	157	732
Natrijum (mg)	1	2
Cink (mg)	0,1	0,44
Bakar (mg)	0,057	0,281

Rezultati prikazani u tabeli 2.3. predstavljaju prosečne vrednosti za jednu ispitivanu sortu šljive, proizvedenu na konkretnom području, i dati su s ciljem sticanja uvida u red veličina za najvažnije hemijske parametre kvaliteta šljive. Postoji veliki broj faktora koji utiču na sastav šljive, pri čemu, kao najvažnije, treba istaći sortu, zrelost voća, klimatske uslove, karakteristike zemljišta, agrotehničke mere, postupanje sa voćem nakon berbe itd.

U odnosu na ukupnu masu ploda domaće šljive, meso (mezokarp) i pokožica (egzokarp) čine 94,1-96,3%, dok ostatak otpada na košticu (Mišić, 2006). U sastav jestivog dela ploda šljive ulaze: voda, ugljeni hidrati, pektini, organske kiseline, lipidi, azotne materije, fenolne i aromatske supstance, vitamini, enzimi i mineralne materije.

Sveže šljive se smatraju zdravom, funkcionalnom hranom pre svega zbog niskog sadržaja masti i visokog sadržaja prehrambenih vlakana. Naučna istraživanja su pokazala pozitivan uticaj upotrebe prehrambenih vlakana u ishrani na sprečavanje pojave raka, dijabetesa, bolesti srca i gojaznosti (Anderson i sar., 2009). Konzumiranje šljiva, i pored značajnog sadržaja ukupnih šećera, ne dovodi do brzog povećanja količine glukoze u krvi, što se verovatno može objasniti visokim sadržajem prehrambenih vlakana, fruktoze i sorbitola (Walkowiak-Tomczak, 2008). Prehrambena vlakna šljive se najvećim delom sastoje od rastvorljivih frakcija (oko 80 %), koje uglavnom obuhvataju pektinske materije, hemicelulozu, celulozu, neznatne količine lignina (Hui i sar., 2006). Sadržaj pektinskih materija u jestivom delu šljive kreće se najčešće između 0,4 i 1,5%, a celuloze 1,5-2,5% (Mišić, 2006).

Sadržaj suve materije u domaćoj šljivi kreće se od 14 do 21%, pri čemu je udeo rastvorljive suve materije 13-18,5%. Šljivu karakteriše povoljan odnos šećera (8-16% (m/v)) i voćnih kiselina (5-14 g/kg). Najzastupljeniji šećeri su glukoza (3,5-5,5%), fruktoza (0,9-2,8%) i saharoza (3,5-4,5%), dok jabučna kiselina čini i do 70% od ukupnih kiselina u plodu. U manjoj meri prisutne su i hinska, limunska i vinska kiselina. U zreлом plodu šljiva vrednost pH se kreće od 3,3 do 3,6 (Mišić, 2006). Milala i sar. (2013) su analizom kljuka tri sorte domaće šljive (Promis, Čačanska najbolja i Dąbrowicka) utvrdili da je udeo glukoze u ukupnim šećerima oko 50%, fruktoze 20-40%, a sorbitola i do 10%, izraženo na suvu materiju. Šljiva je dobar izvor vitamina A (345 IU/100 g) i C (95 mg/kg), kao i kalijuma (1570 mg/kg) (Hui i sar., 2006).

Nergiz i Yildiz (1997) ispitivali su hemijski sastav jedanaest sorti domaće šljive (*Prunus domestica* L.), uzgajanih u egejskoj oblasti Turske, pri čemu su došli do sledećih srednjih vrednosti za parametre kvaliteta domaće šljive na konkretnom području: voda, 837,4g/kg; ukupne kiseline, 15,1 g/kg; ukupni šećeri, 96,5 g/kg; odnos ukupnih šećera i kiselina, 7,59; redukujući šećeri, 51,9 g/kg; saharoza, 42,4 g/kg; askorbinska kiselina (vitamin C), 157,9 mg/kg; protein, 7,5g/kg; pepeo, 5,5 g/kg; natrijum, 161,53 mg/kg; kalijum, 2228,12 mg/kg; kalcijum, 25,47 mg/kg; gvožđe, 4,70 mg/kg; pH 3,46.

Koštice šljive, ali i kajsije, breskve, višnje itd. sadrže značajne količine amigdalina, specifičnog glikozida, prvobitno izolovanog iz semena gorkog badema, koji je jedno vreme bio prihvaćen kao mogući lek protiv raka i komercijalno dostupan kao vitamin B17. U kiseloj sredini i pod dejstvom enzima beta-glukozidaze amigdalin se razgrađuje na dva molekula glukoze, benzaldehid i cijanovodoničnu kiselinu. Količina amigdalina u košticama šljive se kreće u

opsegu 5-25 mg/kg (Ghiulai i sar., 2006). S obzirom na toksičnost benzaldehida i cijanovodonične kiseline, prilikom proizvodnje alkoholnih pića od koštičavog voća, preporučuje se odvajanje koštica iz kljuka pre početka fermentacije (Nikićević i Paunović, 2013).

2.2.1. Fenolna i isparljiva jedinjenja šljive

Šljive predstavljaju sirovinu bogatu biološki aktivnim supstancama, nosiocima antioksidativnih svojstava koja su u korelaciji sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja. Najznačajnija fenolna jedinjenja šljive su derivati kafene kiseline, uglavnom neohlorogenska, hlorogenska i kriptohlorogenska kiselina, zajedno sa manjim količinama antocijana, flavanola i flavonola. Brojne studije su potvrdile po zdravlje pozitivna dejstva koja nosi konzumiranje šljiva, na primer poboljšanje lipidnog profila krvi, smanjenje sadržaja žučne kiseline, poboljšanje metabolizma glukoze i masti, sprečavanje osteoporoze itd. (Walkowiak-Tomczak, 2008). U zavisnosti od više faktora (sorta, klima, zemljište, primenjena analitička metoda itd), sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja može dosta varirati, te se, prema rezultatima jedne studije, kreće u opsegu 125-685 mg/100 g svežeg voća, izraženo kao ekvivalent galne kiseline (GAE), dok se sadržaj ukupnih flavonoida nalazio u opsegu 60-360 mg/100 g svežeg voća, izraženo kao ekvivalent katehina (Chun i sar., 2003). Kim i sar. (2003) su ispitujući šest sorti domaće šljive, među kojima i Čačansku najbolju i Stenli, došli do sličnih rezultata za sadržaj ukupnih fenola (174-385 mg GAE/100 g svežeg voća). U studiji hrvatskih autora Voća i sar. (2009) određivan je sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u tri sorte domaće šljive (Bistrica, Top i Elena), pri čemu su dobijene vrednosti u granicama 157-344 mg GAE/100 g svežeg voća. Sadržaj fenolnih kiselina u šljivi, takođe, može biti u širokom opsegu, pa tako npr. za neohlorogensku iznosi 85-1300 mg/kg, hlorogensku 13-430 mg/kg i kriptohlorogensku 9-56 mg/kg, izraženo na suhu materiju (Donovan i sar., 1998; Łoś i sar., 2000; Nakatani i sar., 2000; Tomas-Barberan i sar., 2001).

Među flavonolima šljive preovlađuju kvercetin-3-glukozid i kvercetin-3-rutinozid (Tomas-Barberan i sar., 2001), dok su glavni predstavnici flavanola uglavnom katehin i epikatehin, kao i proantocijanidini (njihovi dimeri i trimeri) (Łoś i sar., 2000; Tomas-Barberan i sar., 2001). Studija koja se bavila određivanjem sadržaja katehina u 27 vrsta voća, ističe daje najveći sadržaj ovog jedinjenja zabeležen upravo u šljivi (49 mg/100g), zatim jabuci (10-43 mg/100g), dok je u bobičastom voću iznosio 5-20 mg/100g, izraženo na masu svežeg voća (Auger i sar., 2004). Cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-rutinozid i peonidin-3-rutinozid su najzastupljeniji antocijani u šljivi (Walkowiak-Tomczak, 2008). Sadržaj ukupnih anthocijana se kreće od 18 do 125 mg/100 g sveže šljive (Donovan i sar., 1998; Łos i sar., 2000; Kim i sar., 2003). Koncentracija navedenih fenolnih jedinjenja je veća u pokožici nego u mesu (mezokarpu) šljive (i do 3-4 puta), ali se u većini studija njihov sadržaj određuju u celoj masi usitnjenog ploda bez koštice (Walkowiak-Tomczak, 2008).

Šljive karakteriše visoka aktivnost enzima polifenol-oksidade koja dovodi do brzog enzimskog tamnjenja kljuka ili soka prilikom prerade, a kao posledica oksidacije pojedinih grupa fenolnih jedinjenja (Milala i sar., 2013). Will i Dietrich (2006) su ispitali uticaj optimizovanog postupka proizvodnje soka od različitih sorti domaće šljive na stabilnost boje i biološki aktivnih

jedinjenja. Dobijene su visoke vrednosti za gustinu soka (19-21 °Brix), ekstrakt bez šećera (75-105 g/l), ukupnu kiselost (6-11 g/l, izraženo kao jabučna kiselina), sorbitol (27-52 g/l) i sadržaj mineralnih materija (pre svega kalijum, oko 2700 mg/l). Sadržaj fenolnih jedinjenja je takođe bio veoma visok, 1465-2590 mg/l, pri čemu su kao najdominantniji polifenoli u soku od šljive identifikovani neohlorogenska kiselina, hlorogenska kiselina, (+)-katehin i (-)-epikatehin. Ukupni antocijani su pronađeni u količinama od 43-168 mg/l, a kao najdominantniji predstavnici ove grupe flavonoida istaknuti su cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-rutinozid, peonidin-3-glukozid i peonidin-3-rutinozid. Naglo smanjenje koncentracije antocijana primećeno je tokom prvih šest meseci skladištenja na 20 °C, što je dovelo do drastične promene crvene boje soka.

Takođe, ovo voće ima i visoku antiradikalnu aktivnost, izraženu preko ORAC vrednost - 950/100 g (ORAC–oxygen radical absorbance capacity). Poređenja radi, ista masa crvenog grožđa daje ORAC vrednost 739, borovnice 2400, a kupine 2036 (Hui i sar., 2006). Fenolna jedinjenja šljive poseduju veoma značajnu sposobnost hvatanja slobodnih kiseonikovih radikala kao što su hidroksil i peroksil radikali (Murcia i sar., 2001). Kim i sar. (2003) su pokazali da je antiradikalna aktivnost ekstrakta šljiva, izražena kao ekvivalent vitamina C, bila znatno veća (do tri puta) u odnosu na antiradikalnu aktivnost ekstrakta jabuke. U drugoj studiji, Wang i sar. (1996) istakli su 4,4 puta veću ukupnu antiradikalnu aktivnost šljive u odnosu na jabuku, kao jedne od najčešće konzumiranih vrsta voća u ljudskoj ishrani. Voće i sar. (2009) su određivanjem antiradikalne aktivnosti etanolnih ekstrakata šljive (sorte Bistrica, Top i Elena) prema DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikalima došli do približno iste vrednosti za sve tri sorte (3,10 mmol Trolox ekvivalenta/kg sveže šljive) i pored značajnih razlika u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja među sortama. Prilikom određivanja antiradikalne aktivnosti derivata hlorogenske kiseline, kao jedne od najzastupljenijih fenolnih kiselina u šljivi, prema superoksid anjon ($O_2^{\cdot-}$) radikalu primenom elektron spin rezonantne (ESR) spektroskopije, utvrđen je da kapacitet hvatanja ovog radikala od 30 do 37%, dok je za askorbinsku kiselinu, u kontrolnom eksperimentu, ova vrednost iznosila 47% (Walkowiak-Tomczak, 2008). Istraživanja su pokazala visok stepen korelacije ($r=0,96$) između antiradikalne aktivnosti i ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja kod sorti domaće šljive (Rupasinghe i sar., 2006).

Sveži plodovi šljiva bogati su aromatičnim sastojcima, a posebno njena pokožica. Isparljiva jedinjenja i nosioci arome svežih šljiva su ispitivani od strane više autora. Jedinjenja koja najznačajnije doprinose aromi šljive sorte Viktorija su linalol, benzaldehid, metil-cinamat i dekalakton (Williams i Ismail, 1991). Smatra se da heksanol, heksanal i njihovi derivati doprinose tzv. „zelenim“ tonovima arome šljive. Lako isparljivi estri, kao što su 3-metil-butilacetat i etil-butirat takođe doprinose aromi i odgovorni su za njenu oštrinu (Nikićević i Paunović, 2013).

U pokožici požegače identifikovana su 43 aromatična sastojka, pri čemu se kao najvažniji ističu cis-linaloloksid, nonanal, etil-nonanat, etil-oktanoat, etil-dekanoat, etil-dodekanoat, etil-tetradekanoat i etil-heksadekanoat (Nikićević i Paunović, 2013). Horvat i sar. (1992) analizirali su isparljive sastojke pet komercijalnih sorti domaće šljive i tom prilikom identifikovali su trideset i šest jedinjenja. Osam najzastupljenijih jedinjenja za većinu sorti su bili heksanal,

butilacetat, (E)-2-heksenal, butil-butirat, heksil-acetat, linalol, γ -dekalakton i γ -dodekalakton. U manjim količinama bilo je prisutno i jedanaest estara, dva alkohola, četiri laktone, dva terpena, dva zasićena ugljovodonika, palmitinska kiselina, tri fenil jedinjenja i nonanal. Pino i Quijano (2012) su, ispitujući sastav i doprinos isparljivih jedinjenja sveže šljive karakterističnoj aromi ovog voća, identifikovali 148 jedinjenja, uključujući 58 estara, 23 terepenoide, 14 aldehida, 11 alkohola, 10 ketona, 9 alkana, 7 kiselina, 4 laktone, 3 fenola i još 9 jedinjenja različite strukture. Među identifikovanim estrima, izraženo na masu svežeg voća, u najvećoj meri bili su prisutni butil-acetat (3,8 mg/kg), heksil-acetat (3,4 mg/kg), propil-acetat (1,0 mg/kg), etil-butanoat (0,8 mg/kg) i heksil-heksanoat (0,72 mg/kg). Najzastupljeniji viši alkohol u svežoj šljivi bio je heksanol (1,7 mg/kg), a zabeležen je i značajan sadržaj ukupnih terpena (1,5 mg/kg) i δ -dekalaktona (1,2 mg/kg).

Najznačajnija aromatična jedinjenja kineske tj. japanske šljive (*P. salicina* Lindl) su heksenal, heksanol, heksil-acetat, fenil-acetaldehid, 4-heksen-1-ol-acetat, nonanal i linalol (Gomez i sar., 1993; Lozano i sar., 2009).

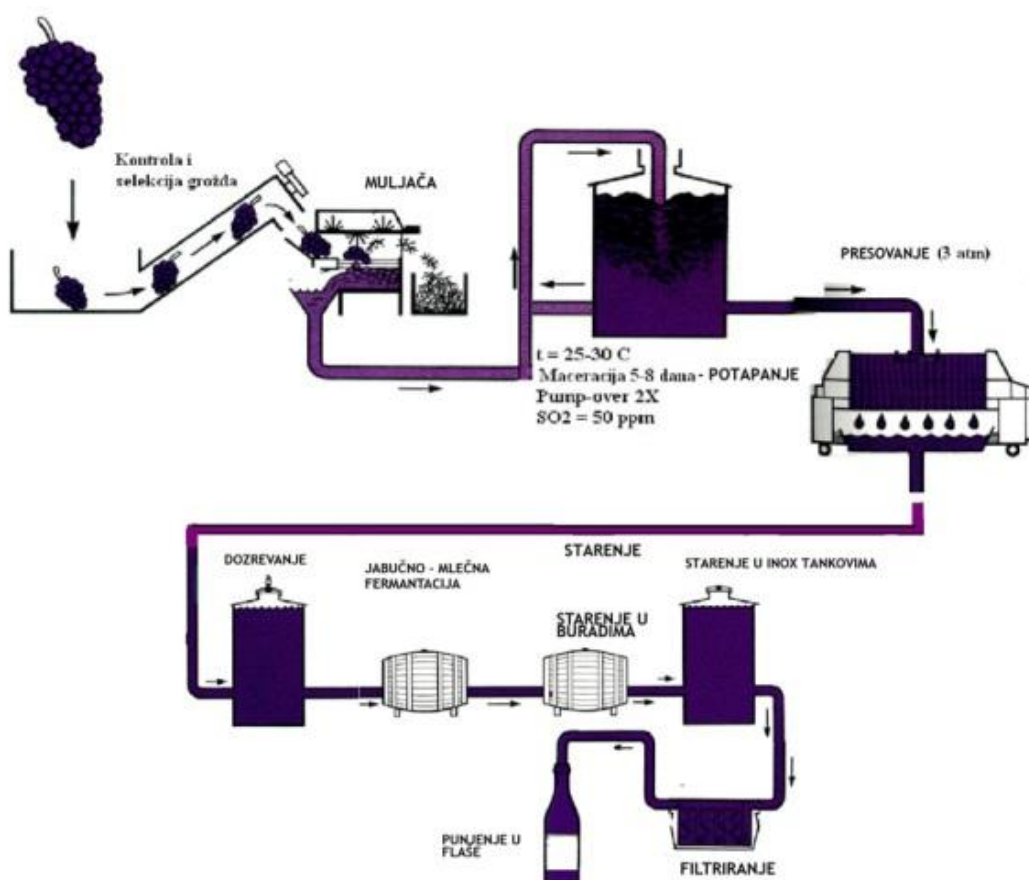
2.3. Voćna vina

Voćna vina se proizvode u većini evropskih zemalja, i njihova proizvodnja nije strogo vezana za tradicionalne vinogradarske zemlje. Najveći proizvođači voćnih vina u Evropi su danas Francuska, Rusija i Engleska, ali, u manjoj meri, i Nemačka, Austrija, Švajcarska. Vrste voća koje se najviše koriste za proizvodnju voćnih vina su jabuka, kruška, malina, kupina itd. Proizvodnja voćnih vina nije regulisana međunarodnim propisima, pa za njih svaka zemlja primenjuje svoja pravila (Nikićević i Paunović, 2013). Pod voćnim vinom se uglavnom podrazumeva piće dobijeno alkoholnom fermentacijom voćnog soka ili koncentrisanog voćnog soka, voćne kaše ili koncentrisane voćne kaše, po tehnološkom postupku koji se primenjuje u proizvodnji vina

Prerodom pojedinih vrsta voća mogu se dobiti vina značajne hranjive i biološke vrednosti, pre svega zahvaljujući značajnom sadržaju organskih kiselina, mineralnih i azotnih materija, vitamina i fenolnih jedinjenja koja potiču iz voća. Sadržaj šećera u voću je u većini slučajeva znatno niži nego u grožđu, najčešće 8-15%, te se voćna vina uglavnom karakterišu znatno manjom količinom alkohola (4-7% v/v). U nekim zemljama (npr. SAD) posebnim pravilnicima je dozvoljeno pojačavanje voćnog soka ili kljuka, tj. dodavanje šećera kako bi se dobilo vino sa većim sadržajem alkohola. Voće, kao sirovinu za proizvodnju vina, često karakteriše povećan sadržaj organskih kiselina, te, u nekim slučajevima, proizvodnja voćnih vina uključuje i postupke koji za cilj imaju smanjenje njihovog sadržaja. Pod time se može podrazumevati razređenje soka ili kljuka vodom ili dodavanje hemijskih sredstava (CaCO_3) za delimičnu neutralizaciju kiselina (Buglass, 2011).

Tehnološki postupci koji se primenjuju u proizvodnji voćnih vina slični su onima u proizvodnji vina od belog i crnog grožđa. Pojednostavljen prikaz procesa proizvodnje crvenog vina dat je na slici 2.5. Glavne razlike u postupcima proizvodnje potiču iz činjenice da voće uglavnom karakteriše viši sadržaj polisaharida (pre svega pektina), te primena samo mehaničkih

tretmana (mlevenja) voća daje manje randmane tečne faze. Takođe, ekstrakcija šećera i drugih rastvorljivih komponenti iz pulpe (mesa ploda) voća može biti otežana i neefikasna. Voćne sokove, u većini slučajeva, karakteriše niži sadržaj šećera i viši sadržaj kiselina nego u grožđanoj širi, te postupci korekcije ovih parametara mogu biti neophodni kako bi se proizvedeno voćno vino učinilo senzorno prihvatljivim (Amerine i sar., 1980). Predfermentativna faza proizvodnje voćnih vina stoga obuhvata sledeće postupke: (i) pranje voća (može biti izostavljeno), (ii) dezintegracija (mlevenje), (iii) sulfitacija voćnog kljuka, (iv) dodatak enzima (pre svih pektolitičkih), (v) maceracija i otečnjavanje, (vi) proceđivanje i ceđenje (dobijanje voćnog soka), (vii) korekcija sadržaja šećera i kiselina (po potrebi). Ovakva procedura može biti i modifikovana u tom smislu da voćni kljuk nakon dodatka enzima može ići direktno na alkoholnu fermentaciju (bez prethodnog izdvajanja voćnog soka) (Buglass, 2011).



Slika 2.5. Postupak proizvodnje crvenih vina (www.vina.rs)

Proizvodnja i karakterizacija vina od različitih vrsta voća je bila predmet brojnih naučnih istraživanja u poslednje dve decenije. Tom prilikom dobijeni su značajni naučni rezultati vezani za optimizaciju alkoholne fermentacije, hemijski sastav i senzornu prihvatljivost vina od jabuke (Joshi i sar., 1991; Polychroniadou i sar., 2001), manga (Kumar i sar., 2009; Reddy i Reddy, 2011), banane (Akubor i sr., 2003; Byarugaba-Bazirake, 2008), breskve (Chung i sar., 2003), maline (Duarte i sar., 2010), kupine (Rommel i sar., 2006) itd.

2.4. Primarna prerada voća

Primarnom preradom pojedinih vrsta voća, kao što su višnje, breskve i većina jagodičastog voća dobijaju se značajne količine tečne faze (soka). Sa druge strane, voće kao što su šljive, kajsije, dunje, banane, mango itd. zahtevaju posebne tehnološke tretmane nakon usitnjavanja kako bi se povećao randman soka i ekstarckija rastvorljivih sastojaka (Buglass, 2011). Mehanički usitnjeno voće može biti dalje podvrgnuto termičkim i/ili enzimskim tretmanima (Byarugaba-Bazirake, 2008).

Postupak proizvodnje voćnih vina koji uključuje razređenje voćnog soka (kljuka) vodom u predfermentativnoj fazi u cilju bolje ekstarckije rastvorljivih materija, smanjenja kiselosti i povećanja prinosa vina, može se izvršiti na dva načina. Prvi način podrazumeva hladnu maceraciju: dodatak potrebne količine vode (temperature oko 5 °C) i kalijum-metabisulfita, nakon 12 h dodatak pektolitičkih enzima i nastavak hladne maceracije (na oko 5 °C) narednih 48 h, a nakon toga zasejavanje kvasca i početak alkoholne fermentacije. Drugi način podrazumeva toplu maceraciju: dodatak zagrejane vode, spontano hlađenje na ambijentalnu temperaturu, dodatak kalijum-metabisulfita i nakon 24 h maceracije inokulacija selekcionisanog kvasca (Buglass, 2011). Primena pomenutih postupaka ne sme uticati na to da dobijeno vino, po sastavu i organoleptičkim osobinama, izgubi karakter sirovine – voća od kojeg potiče.

2.4.1. Termički tretman voća

Zagrevanjem kljuka grožđa, koštičavog i jagodičastog voća na 50-70 °C u periodu od nekoliko minuta do nekoliko časova (viša temperatura-kraće vreme tretmana), narušava se struktura ćelije i inicira brza ekstrakcija njenih sastojaka. Pored povećanja udela tečne faze u kljuku, postiže se bolja ekstrakcija bojenih materija i uklanjanje herbalnih (zelenih) tonova u aromi proizvedenog vina (Fischer i sar., 1999). Sa druge strane, primena termičkih tretmana voćnog kljuka (maceracija dodatakom vrele vode, a posebno direktno zagrevanje kljuka) u predfermentativnoj fazi vinifikacije dovodi do gubitka isparljivih jedinjenja, formiranja aromatskih kompleksa koji nastaju preko Majlardovih reakcija i karakterišu se kao „miris i ukus na kuvano“. Sadilova i sar. (2006) su pokazali da izlaganje voćnog soka jagode i bobica zove temperaturi od 95 °C tokom jednog časa dovodi do gubitka (degradacije) 17-19% antocijana. Pod pomenutim uslovima, cijanidin-glukozilksilozid, najvažniji anthocijanin bobica zove, razgrađuje se do aglikona cijanidina, koji se zatim razlaže do protokatehinske kiseline i floriglucin-aldehida. Antocijanin jagode, pelargonidin-3-glukozid, po sličnom mehanizmu biva razložen do 4-hidroksibenzojeve kiseline i floriglucin-aldehida.

Primena pektolitičkih enzima i pasterizacije u predfermentativnoj fazi proizvodnje vina od maline dovela je do razgradnje oko 50% ukupnih antocijana u odnosu na uzorak koji nije termički tretiran. Cijanidin-3-glukozid se pokazao najnestabilnijim antocijanom s obzirom da nije detektovan u vinu nakon završene fermentacije (Rommel i sar., 1990). Pored pomenutih

značajnih gubitaka u sadržaju antocijana, autori ističu da je proizvedeno vino od maline imalo stabilnu boju tokom dužeg vremena odležavanja.

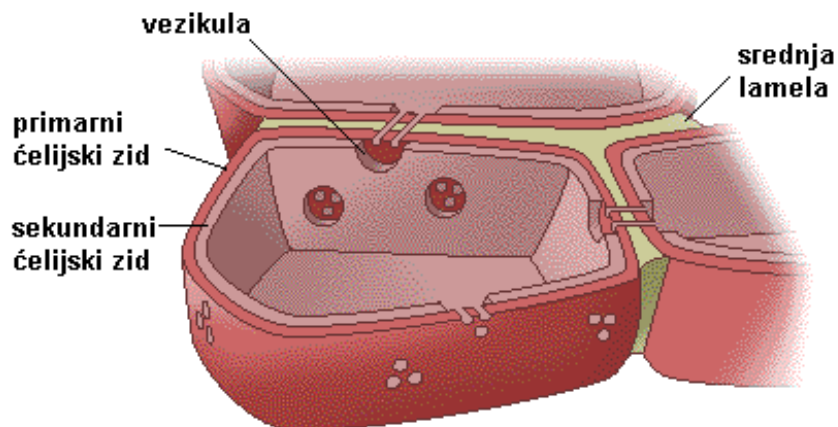
Cendres i sar. (2011) ispitivali su mogućnost primene postupka baziranog na zagrevanju voća mikrotalasima u cilju ekstrakcije njihovog soka. Postupak započinje unošenjem voća u mikrotalasni reaktor, bez dodatka vode. Frekvencija mikrotalasa u industrijskim uređajima (reaktorima) je iznosila 915 MHz, za razliku od kućnih pećnica koje koriste frekvenciju od 2450 MHz. Unutrašnje zagrevanje vode prisutne u voću do tačke ključanja dovodi do ekspanzije ćelije i njenog raspadanja. Zagrevanjem mikrotalasima se tako oslobađa voda prirodno prisutna u voću. Ovaj fizički fenomen poznat kao hidrodifuzija, omogućava ekstraktu da difunduje iz voća, i da pod uticajem gravitacije, kroz perforirani disk, napusti mikrotalasni reaktor. Efikasnost postupka ispitana je na svežem i zamrznutom voću (grožđe, šljive i kajsije). Najbolji prinosi soka su ostvareni kod tretmana zamrznutog voća, i to 480 ml/kg šljive, 620 ml/kg grožđa i 550ml/kg kajsija.

Predmet istraživanja bio je i poređenje primene klasičnog postupka (enzimski tretman i ceđenje) i postupka mikrotalasne hidrodifuzije za ekstrakciju soka od šljive sorte Čačanska najbolja (Cendres i sar., 2012). Prinos mutnog soka šljive nakon primene klasičnog postupka ekstrakcije iznosio je 670-690 g/kg, dok je postupkom hidrodifuzije dobijen prinos od 344-461 g/kg, u zavisnosti od primenjene snage uređaja (250 W, 500 W i 750 W). Sok dobijen mikrotalasnom hidrodifuzijom sadržao je više proantocijanidina, ali manje antocijana i fenolnih kiselina. Kao zaključak, pomenuti autori ističu da tretman voća mikrotalasima karakteriše jednostavnost i brzina procesa, ali i nešto niži prinos soka, u odnosu na klasičan enzimski postupak.

2.4.2. Enzimski tretman voća

Grupa enzima koja se najčešće koristi u preradi voća i proizvodnji vina su pektolitički enzimi (pektinaze). Ovi enzimi svojom aktivnošću dovode do hidrolize pektinskih materija. Pored pektinaza, mogu se koristiti i celulaze i hemicelulaze, ali je njihova primena u praksi znatno manje zastupljena (Bayindirli, 2010). Pektinske materije predstavljaju složene polisaharide čiju osnovu čini lanac molekula galakturonske kiseline povezanih $\alpha(1-4)$ glikozidnim vezama. Bočni lanci molekula pektina se mogu sastojati iz L-ramnoze, arabinoze, galaktoze i ksiloze. Karboksilne grupe galakturonske kiseline su delimično esterifikovane metil grupama i delimično ili potpuno neutralizovane natrijumovim, kailijumovim ili amonijumovim jonima. Pektinska kiselina predstavlja molekul poligalakturonske kiseline čije karboksilne grupe nisu esterifikovane metanolom ili je esterifikacija neznatna (Kashyap i sar., 2001).

Pektinske materije se najvećim delom nalaze u srednjoj lameli ćelijskog zida biljne ćelije (slika 2.6.) gde povezuju pojedine ćelije u tkivo, doprinoseći njegovom integritetu (otpornosti) i čvrstini.



Slika 2.6. Struktura ćelijskog zida biljne ćelije (www.phschool.com)

U nezrelom voću pektin je vezan za celulozna vlakna u ćelijskom zidu i kao takav je nerastvorljiv. Tokom sazrevanja struktura pektina se menja (raskidanje glavnog i bočnih lanaca) pod dejstvom enzima prirodno prisutnih u voću. Usled ovakvih promena pektini postaju rastvorljiviji, veze sa ćelijskim zidom slabe i biljno tkivo omekšava. Sadržaj pektina u svežem voću se nalazi u opsegu 0,5-4% (Kashyap i sar., 2001). Pektinske materije u voću su neravnomerno raspoređene, pa tako pokožica sadrži više pektina od mesa ploda, dok semenke i peteljke sadrže i nekoliko puta više pektina od pokožice (Jović, 1991). Nakon usitnjavanja (mlevenja) zrelog voća, rastvorljive frakcije pektina prelaze u tečnu fazu, povećavajući tako njen viskozitet, dok nerastvorljive frakcije i dalje ostaju vezane za celulozna vlakna preko bočnih lanaca hemiceluloze, olakšavajući tako zadržavanje vode. Mehaničko usitnjavanje voća bogatog pektinima oslobađa sok velikog viskoziteta, koji ostaje vezan za pulpu u formi želatinozne mase. Ekstrakcija ovakog soka ceđenjem ili primenom nekog drugog mehaničkog tretmana znatno je otežana. Dodatkom pektolitičkih enzima viskozitet soka opada, cedljivost kljuka se poboljšava, želatinozna struktura se dezintegriše i omogućava se dobijanje značajnih prinosa voćnog soka (Pifferi i sar., 1989).

2.4.2.1. Pektolitički enzimi

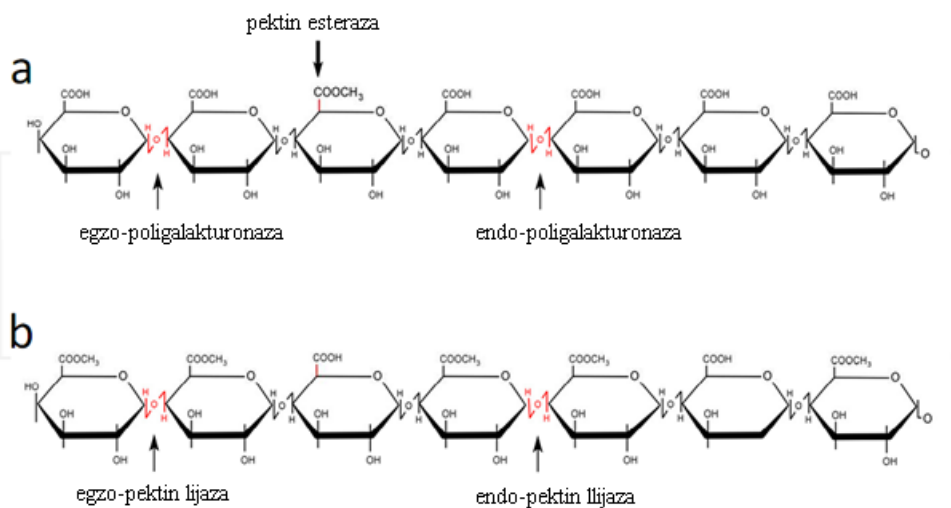
U zavisnosti od načina njihovog delovanja, pektolitički enzimi se mogu podeliti na depolimerizujuće i saponifikacione (tabela 2.4.). Endo i egzo-poligalakturonaza vrše hidrolitičku razgradnju pektinske kiseline čiji je stepen esterifikacije ispod 10%, pri čemu endo-poligalakturonaza cepa molekule pektina u njegovoj unutrašnjosti (nastaje oligomer galakturonske kiseline), dok egzo-poligalakturonaza vrši hidrolizu na kraju lanca pektina, terminalno (uz nastajanje monomera – galakturonske kiseline). Lijaze katališu transeliminativnu razgradnju molekula pektina uz nastajanje dvostruke veze na C₄ i C₅ atomima. Endo-pektin lijaza vrši degradaciju molekula visokoesterifikovanih pektina, dok endo- i egzo-pektat lijaza ispoljavaju aktivnost na pektinskoj kiselini čiji je stepen esterifikacije karboksilnih grupa ispod 10%.

Tabela 2.4. Podela pektolitičkih enzima

	Substrat	Mesto delovanja
Depolimerizujući enzimi:		
• HIDROLAZE		
Endo-poligalakturonaza	pektat	nasumice
Egzo-poligalakturonaza	pektat	terminalno
• LIJAZE		
Endo-pektat lijaza	pektat	nasumice
Egzo-pektat lijaza	pektat	terminalno
Endo-pektin lijaza	pektin	nasumice
Saponifikacioni enzimi		
• Pektin(metil) esteraza	Pektin	terminalno ¹ , nasumice ²

¹biljnog porekla, ²mikrobiološkog porekla.

Na slici 2.7. prikazan je način delovanja pojedinih grupa pektolitičkih enzima. Prisustvo različitih pektolitičkih enzima je dokazano u grožđu i voću, ali je potvrđeno i da vinski i „divlji“ (*ne-Saccharomyces*) kvasci, pa i siva plesan *Botrytis cinerea* mogu stvarati ove enzime (Kashyap i sar., 2001).



Slika 2.7. Struktura glavnih lanaca (a) niskoesterifikovanih i (b) viskoesterifikovanih pektina i aktivno mesto delovanja enzima uključenih u njihovu razgradnju.

2.4.2.2. Upotreba komercijalnih preparata pektolitičkih enzima

Aktivnost pektolitičkih enzima tokom prerade voća namenjenog proizvodnji vina ne vezuje se samo za hidrolizu pektinskih materija koja vodi otečnjavanju kljuka, povećanju randmana i olakšavanju bistrenja i filtracije, već dovodi i do značajnog povećanja efikasnosti ekstrakcije bojenih i aromatičnih materija voća (Byarugaba-Bazirake, 2008; Bayindirli, 2010).

Komercijalni preparati pektolitičkih enzima predstavljaju smešu poligalakturonaza, pektin lijaza i pektin metil esteraze (PME) (Dietrich i sar., 1991). Pektin lijaza primarno

hidrolizuje pektine višeg stepena esterifikacije srednje lamele i primarnog ćelijskog zida biljne ćelije. S obzirom da poligalakturonaze deluju na pektinsku kiselinu i niskoesterifikovane pektine, njihova aktivnost može biti uslovljena prethodnim dejstvom pektin metil esteraze (Kashyap i sar., 2001). Optimalna vrednost pH za aktivnost poligalakturonaze i pektin metil esteraze je oko 4,5 a sa porastom vrednosti pH iznad 5,0 njihova aktivnost značajno opada, da bi u neutralnoj sredini ovi enzimi bili praktično inaktivirani. Pektin lijaza pokazuje optimalnu aktivnost u znatno širem opsegu pH (5,0-6,0) (Lozano, 2006). Aktivnost poligalakturonaze je najbolja u temperaturnom opsegu 30-50 °C, dok sa povišenjem temperature ona počinje značajno da se smanjuje u kratkom periodu. Slična temperaturna zavisnost karakteriše i aktivnost pektin lijaze (Bayindirli, 2010). Optimalne temperature za aktivnost enzima pektin metil esteraze su u rasponu 45-55 °C, u zavisnosti od porekla enzima i spoljašnjih faktora sredine u kojoj enzim deluje. Aktivnost pektolitičkih enzima uključenih u proces proizvodnje vina je smanjenja, s obzirom na niže vrednosti pH voćnog kljuka (3,0-4,0) i niže temperature tokom prerade voća i fermentacije (10-30 °C) (Ducasse i sar., 2011). Pektolitički enzimi, prirodno prisutni u voću, manje su osetljivi na termičku inaktivaciju u poređenju sa njihovim izolovanim i prečišćenim oblicima (Duvetter i sar., 2009). Primena komercijalnih pektolitičkih enzima naročito je potrebna nakon termičkih tretmana kljuka grožđa i voća, s obzirom da, usled zagrevanja, dolazi do inaktivacije enzima prisutnih u voću, kao i do povećanja sadržaja slobodnih pektinskih materija u kljuku (Bayindirli, 2010).

Enzimaska razgradnja pektinskih materija tokom predfermentativne faze proizvodnje vina od banana dovela je do značajnog povećanja količine samotoka i smanjenja vremena ceđenja soka (Pilnik, 1996). Maceracija grožđa uz primenu pektolitičkih enzima dovela je do povećanja količine samotoka za oko 10% (Laurentiu Itu i sar., 2011). Dodatak komercijalnog pektolitičkog enzima tokom muljanja grožđa, u količini od 2g/hl, obezbedio je da frakcija samotoka čini 93% dobijene šire. Sa druge strane, prinos samotoka kod kontrolnog uzorka (bez dodatka enzima) iznosio je 63% (Byarugaba-Bazirake, 2008). Prinos bistrog soka od banane je kod procesa prerade koji nisu uključivali dodatak komercijalnih pektolitičkih enzima iznosio oko 38%, dok je uz primenu enzima ta vrednost bila znatno veća (60-65%) (Byarugaba-Bazirake, 2008). Sadržaj ukupnih rastvorljivih čestica i redukujućih šećera je veći u širi od grožđa tretiranog enzimima nego u odsustvu enzimskog tretmana. Istovremeno, primena enzima je uticala na povećanje prinosa šire (Espejo i Armada, 2010).

Antocijanai i tanini su jedinjenja koja su odgovorna za crvenu boju vina. Antocijani se nalaze u vakuolama ćelija pokožice grožđa, a tanini u pokožici i semenkama (u slobodnom obliku u vakuolama ili vezani za ćelijski zid). Ekstrakcija antocijana tokom maceracije zahteva razgradnju pektinima bogate srednje lamele kako bi se oslobodile čvrsto povezane ćelije. Na taj način se stvaraju uslovi za dezintegraciju ćelijskog zida koja omogućava ekstrakciju sadržaja iz vakuola (Barnavon i sar., 2000). Dodatak pektinaza tokom maceracije crnog grožđa dovodi do značajnog povećanja sadržaja ekstarhovanih antocijana, povećava intezitet i stabilnost boje tokom dužeg vremena (Sacchi i sar., 2005; Kelebek i sar., 2007; Romero-Cascales i sar., 2008). Sa druge strane, rezultati pojedinih istraživanja (Zimman i sar., 2002; Alvarez i sar., 2005)

ukazuju na neznatno povećanje sadržaja bojenih materija prilikom maceracije grožđa uz dodatak pektolitičkih enzima. Upotreba pektolitičkih enzima značajno skraćuje vreme trajanja maceracije voća (Romero-Cascales i sar., 2008) i filtracije dobijenih vina (Blunt, 2000).

Pektolitički enzimi koji svojom aktivnošću dovode do dezintegracije ćelijskog zida voća, imaju važnu ulogu u ekstrakciji prekursora aromatičnih jedinjenja. Aromatična jedinjenja voća čine monoterpeni, C₁₃ norizoprenoidna jedinjenja, estri viših masnih kiselina, derivati benzena, alifatični alkoholi itd. Ova jedinjenja u grožđu i voću mogu biti u svojoj slobodnoj formi (direktno doprinose mirisu) ili vezana za šećere ili neke druge neisparljive komponente, gde kao takva, predstavljaju bezmirisne forme. Razgradnjom ćelijskog zida pod dejstvom pektinaza tokom primarne prerade i fermentacije, ekstrahuju se veće količine aromatičnih prekursora, koji na taj način bivaju dostupni dejstvu enzima beta-glukozidaza. Beta-glukozidaze su prirodno prisutne u voću, mogu ih stvarati kvasci i bakterije tokom fermentacije, a mogu se i dodavati u vidu komercijalnih preparata. Aktivnošću ovih enzima bezmirisni aromatični prekursori prelaze u mirisne (isparljive) aglikone (Gómez-Plaza i sar., 2000; Pinelo i sar., 2006; Sieiro i sar., 2012).

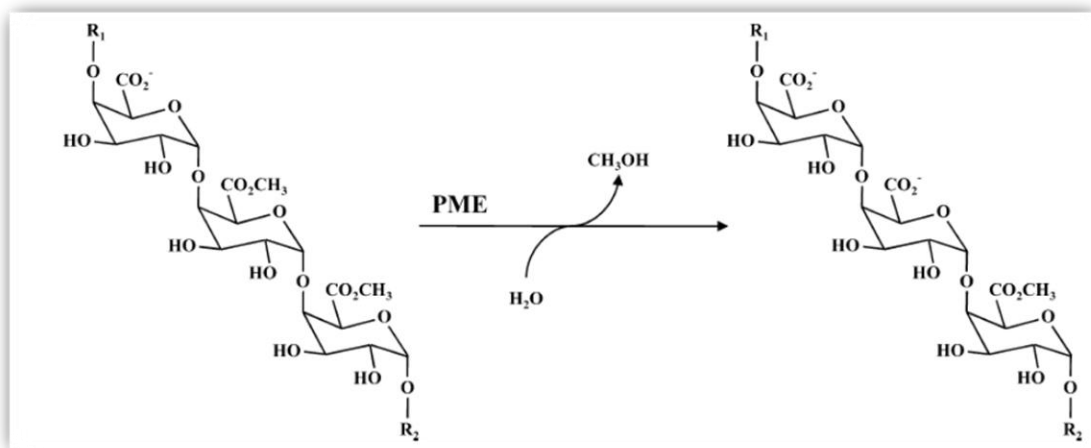
2.4.2.3. Nastajanje metanola tokom proizvodnje vina

Metanol u vinima i jakim alkoholnim pićima nastaje demetoksikacijom pektinskih materija (slika 2.8.). Pektin metil esteraza (PME) je ubikvitarni enzim (osma klasa karbohidratnih esteraza) koji je prirodno prisutan u biljkama, ali ga sintetišu i neke bakterije, plesni i kvasci. PME katalizuje specifičnu hidrolizu metil-estarskih veza na C-6 ostatku galakturonske kiseline u linearnim lancima homogalakturonana pektinskih materija. Kao posledica pomenute reakcije, dolazi do oslobađanja molekula metanola i protona (Jolie i sar., 2010). Step en esterifikacije pektinskih materija grožđa kreće se od 25 do 50%, dok je kod većine voća on znatno viši, i uglavnom se nalazi u opsegu 50-80%.

Upotreba pektolitičkih enzima tokom predfermentativne faze vinifikacije dovodi do povećanja sadržaja metanola u gotovom vinu, usled aktivnosti enzima pektin metil esteraze (Jović, 1991; Revilla i González-San José, 1998; Cabaroglu, 2005; Miljić i Puškaš, 2014).

Ovaj enzim može biti izolovan iz svih delova viših biljaka (plod, listovi, cvetovi, semenke, ali i koren). U sklopu iste biljne vrste često su pronađene različite izoforme PME, koje iako katališu istu reakciju, međusobno se razlikuju u izoelektričnoj tački, molarnoj masi, stepenu glikozilacije, termostabilnosti itd. Procentualni udeo pojedinih izoformi, može značajno varirati u zavisnosti od faze vegetativnog razvoja i biljnog organa iz kojeg je enzim izolovan (Bordenave, 1996; Benen i sar., 2003).

Izoelektrična tačka (pI) PME varira od relativno niskih vrednosti (pH 3,1), kod PME izolovane iz plesni, do pH 11,0, kod PME izolovane iz paradajza. Većina PME biljaka pokazuje neutralne ili blago alkalne pI vrednosti čime se objašnjavaju čvrste veze ovog enzima sa slabo kiselim ćelijskim zidom (Jolie i sar., 2010).



Slika 2.8. Demetoksikacija pektinskih materija (Jolie i sar., 2010)

Metanol i produkti koji nastaju njegovim metaboličkim transformacijama (formaldehid i, naročito, mravlja kiselina) su toksični za čoveka ako se unesu udisanjem ili oralnim putem, a njihovo negativno dejstvo je možda najizraženije na očni nerv i centralni nervni sistem. Čovek je naročito osetljiv na toksično dejstvo metanola usled veoma ograničene mogućnosti da metaboliše i detoksikuje mravlju kiselinu. Simptomi trovanja metanolom manifestuju se kroz pojavu glavobolje, jakih abdominalnih bolova, gušenja, slabljenje pulsa i pad telesne temperature (Hou i sar., 2008). Usvajanje metanola od strane ljudskog organizma odvija se veoma brzo, bilo putem zida creva ili sistema za disanje, te se obično nakon 30-60 minuta postiže maksimalna koncentracija u krvi. Povećan unos ovog jedinjenja može rezultirati teškim trovanjem, slepilom, pa i smrtnim ishodom. Metanol je prirodni sastojak alkoholnih pića i sokova, te iz tog razloga, svi relevantni pravilnici propisuju maksimalno dozvoljen sadržaj. Smrtonosnom dozom čistog metanola smatra se količina od 1-2 ml/kg telesne težine (ATSDR, 1993). Smrtonosna doza metanola unetog oralno, nalazi se u opsegu 300-1000 mg/kg telesne težine (WHO, 1997). Količina metanola u krvi od preko 200 mg/l smatra se mogućim uzročnikom težeg trovanja (Paine i Dayan, 2001). Smrtni ishod nastupa kada je koncentracija metanola u krvi iznad 1,5-2,0 g/l (WHO, 1997). Enzim alkohol dehidrogenaza ima mnogo veći afinitet prema etanolu nego metanolu, te tako količina etanola u krvi od oko 1000 mg/l potpuno inhibira metabolizam metanola. U takvom slučaju količina metanola u krvi se smanjuje veoma sporo (1-2% po času) usled ekskrecije kroz urin i disanje. S obzirom da se metabolizam etanola i njegova ekskrecija odvijaju takođe relativno sporo (6,5 g/h), bilo bi potrebno oko 40 h za uklanjanje 50% metanola iz krvi kroz normalne fiziološke procese u organizmu (Paine i Dayan, 2001).

Čovek može uneti male doze metanola konzumiranjem sokova od voća i povrća, fermentisanih pića, kao i unošenjem hrane koja je zaslađena aspartamom (metil ester dipeptida sastavljenog od aspartamske kiseline i fenilalanina), čijom se razgradnjom u gastrointestinalnom traktu oslobađa metanol (Medinsky and Dorman, 1995). Tehnički propisi kojima se određuje maksimalno dozvoljen sadržaj metanola u alkoholnim pićima, razlikuju se u pogledu dozvoljenih

količina, ali i u pogledu načina iskazivanja sadržaja. Gornja granica sadržaja metanola iznosi 150 mg/l za bela i roze vina, i 300 mg/l za crvena vina (prema Međunarodnoj kancelariji za vinovu lozu i vino, OIV). U literaturi se može pronaći i da maksimalna koncentracija metanola u alkoholnim pićima iznosi 10 g po litri apsolutnog alkohola (EU regulativa) (Hou i sar., 2008).

2.4.2.4. Važniji činioci koji utiču na sadržaj metanola u vinu

Sadržaj metanola u vinu zavisi od sadržaja pektinskih materija u polaznoj sirovini, ali i od uticaja brojnih drugih faktora kao što su: zdravstveno stanje voća, maceracija kljuka, koncentracija i aktivnost pektolitičkih enzima voća, dodatak komercijalnih enzima, pritisak pod kojim se obavlja ceđenje kljuka, uslovi fermentacije (temperatura, pH, intenzitet mešanja) itd. Zdravstveno stanje grožđa (voća) može u velikoj meri uticati na količinu metanola u vinu, s obzirom da npr. siva plesan (*Botrytis cinerea*) sintetiše pektin metil esterazu vrlo visoke aktivnosti. Prilikom fermentacije voćnog soka dobijaju se znatno niže vrednosti sadržaja metanola u gotovom vinu nego što je to slučaj kod fermentacije kljuka. Sa druge strane, randman i kvalitet vina su znatno slabiji ukoliko postupak proizvodnje predviđa ceđenje kljuka neposredno nakon usitnjavanja voća (loša ekstrakcija šećera, fenolnih i aromatičnih jednjenja). Maceracija kljuka dovodi do oslobađanja veće količine metanola koja je u direktnoj vezi sa trajanjem kontakta čvrste i tečne faze (Jović, 1991; Adam i Versini, 1996; Cabaroglu, 2005). Ceđenjem kljuka voća i grožđa pod većim pritiscima dobijaju se vina sa višim sadržajem metanola usled veće ekstrakcije pektina iz polazne sirovine (Jović, 1991). Miljić i Puškaš (2014) pokazali su da sadržaj metanola u vinu od šljiva raste sa povećanjem vrednosti pH kljuka i temperature fermentacije kao posledica povećavanja aktivnosti PME.

2.4.2.5. Inhibicija aktivnosti PME

Postoji više mogućnosti za smanjivanje sadržaja metanola u vinima, koji se, pre svega, odnose na primenu određenih fizičko-hemijskih tretmana tokom primarne prerade voća i alkoholne fermentacije. PME su uglavnom termolabilni enzimi koji bivaju inaktivirani na temperaturama ispod 70 °C, međutim, utvrđeno je postojanje i termostabilnih formi ovih enzima (Jolie i sar., 2010). Termički tretmani kljuka dovode do značajnog smanjenja sadržaja metanola u vinu usled denaturacije strukture enzima PME (njegove inaktivacije) pod dejstvom povišenih temperatura (tabela 2.5.).

Za nekoliko jedinjenja, proteinskih i neproteinskih, smatra se da imaju inhibitorni efekat na aktivnost PME. Pored inhibicije krajnjim proizvodom (od strane poligalakturonske kiseline) i brojnim inhibitornim agensima, kao što su: jodin, deterdženti (SDS), tanini, fenolne kiseline (galna i kumarinska kiselina), šećeri (saharoza i glukoza) i glicerol (Benen i sar, 2003), opisano je i nekoliko specifičnih inhibitora aktivnosti PME izolovanih iz različitih biljaka (Duvetter i sar., 2009).

Tabela 2.5. Redukcija sadržaja metanola u vinu od grožđa u zavisnosti od temperature i vremena zagrevanja kljuka (Adam i Versini, 1996)

Temperatura (°C)	Vreme zagrevanja (min)	Redukcija sadržaja metanola (%)
50	20	10
	40	40
	60	75
	120	95
60	10	55
	20	95
	40	100
70	10	95
	20	100
80	10	100

U tabeli 2.6. dat je pregled, do sada ispitanih, specifičnih inhibitora aktivnosti PME. Proteinski inhibitor PME pronađen je u kiviju (Balestrieri i sar., 1990), ali je na osnovu genskog koda njegovo prisustvo identifikovano i u nekim drugim biljnim vrstama (Jolie i sar., 2010). U pitanju je glikoprotein molekularne mase 16 kDa koji specifično inhibira aktivnost PME različitih biljnih vrsta u opsegu pH 3,5-7,5, dok se po pitanju inaktivacije drugih enzima koji učestvuju u degradaciji polisaharida (poligalakturonaze, amilaze) nije pokazao efikasnim. Mehanizam inhibitornog dejstva objašnjava se nastajanjem inaktivnog kompleksa između glikoproteina i PME.

Tabela 2.6. Specifični inhibitori aktivnosti PME izolovani iz različitih biljnih izvora (Jolie i sar., 2010)

Izvor	Priroda inhibitora
Kivi (<i>Actinidia deliciosa</i>)	Protein (16 kDa)
Krompir (<i>Solanum tuberosum</i>)	Bočni lanci uronske kiseline (200 kDa)
Tropska smokva (<i>Ficus aweotsang</i>)	Mali polipeptidi (4 kDa)
Banana (<i>Musa sapientum</i>)	Nedefinisan
Arabidopsis (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Protein (16 kDa)
Lišće bibera (<i>Capsicum annum</i>)	Protein (16 kDa)
Zeleni čaj (<i>Camellia sinensis</i>)	Katehin
Brokoli (<i>Brassica oleracea</i>)	Protein (16 kDa)

Količina metanola u voćnim vinima (kao i destilatima) može se smanjivati dodavanjem D-galakturonske kiseline i pektinske kiseline u kljuk. Obe kiseline imaju istu strukturu ali različitu dužinu osnovnih lanaca. Koncentracija od 0,2% pektinske kiseline u medijumu dovodi do redukcije sadržaja metanola od 60%. Ovi rezultati su postignuti u laboratorijskim uslovima, u sredini koja simulira uslove u voćnom kljuku, dok u realnim uslovima (dodatak 200 g pektinske kiseline u 100 kg kljuka) nije zabeležena statistički značajna razlika u sadržaju metanola u poređenju sa netretiranim kljukom (Adam i Versini, 1996). Smanjenje sadržaja metanola u vinu postignuto je i dodatkom tanina koji inhibiraju aktivnost PME stvaranjem kompleksa tanin-enzim (Adam i Versini, 1996). Primenom tanina u količini 1 g/kg sintetskog medijuma

postignuta je redukcija sadržaja metanola od 88%, dok je u realnim uslovima (kljuk kruške) zabeležena značajno niža efikasnost primenjenog postupka (30-70%).

Terefe i sar. (2009) ispitivali su mogućnost inaktivacije PME u soku od paradajza, primenom ultrazvuka (frekvencija 20 kHz, amplituda 65 μ m) i povišene temperature (50-75 °C). Primena ultrazvuka i temperature od 75 °C tokom 4 min dovela je do skoro potpune inaktivacije PME. Efikasnost primene ultrazvuka i temperature za inhibiciju aktivnosti PME potvrdio je svojom studijom i Siwach (2012). Predmet istraživanja bila je i primena mikrotalasa u cilju inaktivacije PME tokom proizvodnje voćnih sokova, pri čemu se pomenuti postupak pokazao veoma efikasnim. Postupak inaktivacije enzima mikrotalasa karakteriše značajno manji gubitak senzornih i hranjivih svojstava finalnog proizvoda nego što je to slučaj kod klasičnih termičkih tretmana (Tajchakavit, 1997). Veoma efikasnom u inaktivaciji PME pokazala se primena pulsnih visokih pritisaka (100-400 MPa). Pomenuta tehnika podrazumeva naizmenično izlaganje sirovine (soka ili kaše) visokim pritiscima tokom 1-3 min i brze dekompresije (oko 10 s) (Basak i Ramaswamy, 2001).

2.5. Uticaj uslova fermentacije na sastav i kvalitet voćnih vina

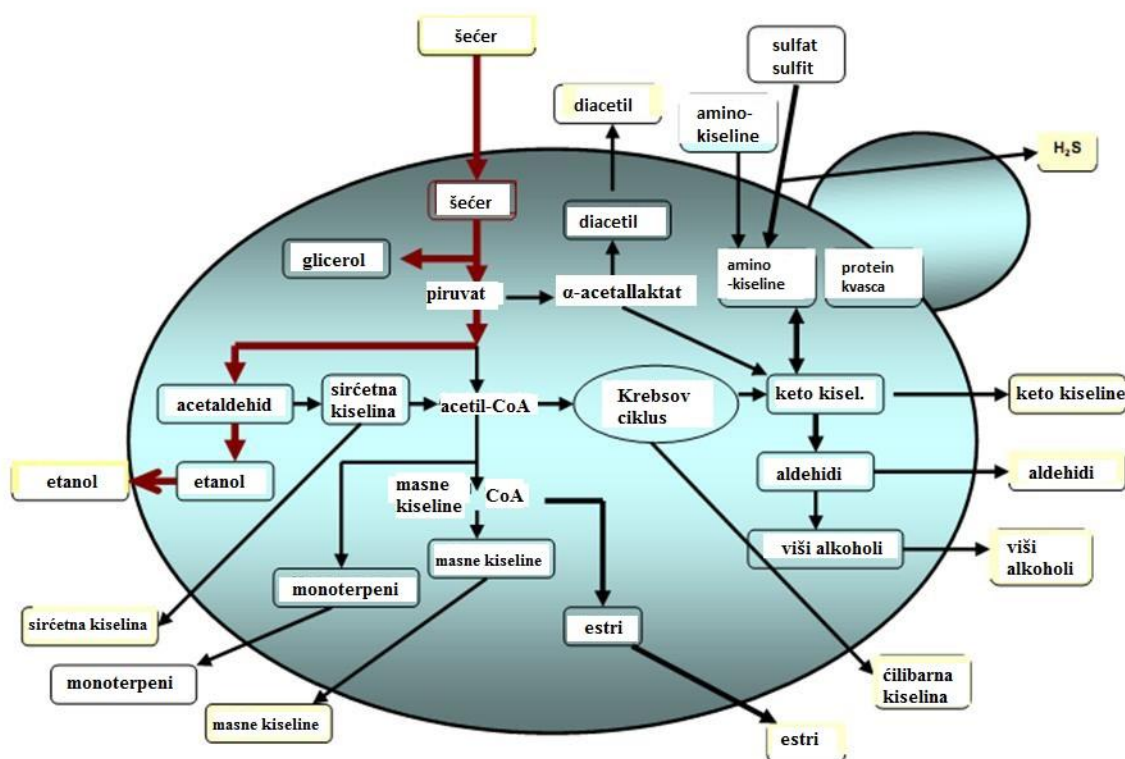
Sastav i kvalitet voćnih vina zavisi od uticaja velikog broja faktora kao što su: agroekološki uslovi (klima, zemljište, teren), sorta, stepen zrelosti, primarna prerada voća, faktori fermentacije (pH, temperatura, aeracija, dostupnost hranjivih materija, autohtona mikrobiota, upotreba starter kultura kvasaca), postupak vinifikacije (primena enoloških sredstava, način mešanja komine, postupci pretakanja, bistrenja, stabilizacije i filtracije vina), starenje i odležavanje vina.

2.5.1. Uticaj proizvodnog mikroorganizma (kvasca)

Kvasci predstavljaju mikroorganizme koji su odgovorni za proces alkoholne fermentacije, biotransformacije fermentabilnih šećera u etanol i ugljen-dioksid. Kvasci mogu da rastu i razmnožavaju se u temperaturnom opsegu od 5 do 40 °C, pri čemu se optimalnim smatraju temperature 30-37 °C, u zavisnosti od vrste i soja kvasca (za *Saccharomyces cerevisiae* to je temperatura od oko 30 °C). Na temperaturama iznad 37 °C ćelije kvasca doživljavaju metabolički stres koji onemogućava pravilnu deobu (Jay i sar., 2005). Razviće kvasaca takođe je moguće i u širokom opsegu vrednosti pH (2,5-6,5), u sredinama koje sadrže do 21% (v/v) etanola i u prisustvu do 55-60% saharoze (Barnett i sar., 2000). Kvasci su hemoorganotrofi jer koriste organska jedinjenja kao izvor energije i ne zahtevaju sunčevu svetlost za rast. Glavni izvor ugljenika predstavljaju šećeri heksoze kao što su glukoza i fruktoza, i disaharidi kao što su saharoza i maltoza (Fugelsang i Edwards, 2007). Pored etanola i ugljen-dioksida kao glavnih produkata fermentacije vina, kvasci stvaraju i veliki broj primarnih i sekundarnih nusprodukata koji utiču na senzorni profil vina (slika 2.9.). Za proizvodnju vina najznačajniji su kvasci roda *Saccharomyces*, pre svih *S. cerevisiae* i *S. bayanus*, ali se poslednjih godina sve veća pažnja

posvećuje i ne-*Saccharomyces* kvascima sledećih rodova: *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces* i *Issatchenkia*. Brojna istraživanja utvrdila su da njihova aktivnost može dati pozitivan doprinos karakteru i kvalitetu vina (Fleet, 1998; Pretorius, 2000; Fleet, 2003; Ribéreau-Gayon i sar., 2006).

U tradicionalnom vinarstvu, spontana fermentacija šire ili kljuka grožđa izvodi se sekvencijalnim razvojem i aktivnošću različitih vrsta kvasaca koji potiču sa grožđa ili opreme vinarije, i generalno pripadaju ne-*Saccharomyces* kvascima. Njihov razvoj je uglavnom ograničen na prva tri do četiri dana fermentacije, nakon kojih oni većinom odumiru. Tada izvođenje fermentacije preuzimaju *Saccharomyces* vrste koje karakteriše snažna fermentativna aktivnost i tolerancija na etanol. Spontana fermentacija obično traje duže od fermentacije uz inokulaciju selekcionisanih kvasaca, i daje rezultate koji ne odgovaraju uvek očekivanjima proizvođača. Ovakve odlike spontane fermentacije potiču, pre svega, od činjenice da brojnost i raznolikost autohtonih kvasaca prisutnih na grožđu varira zavisno od mnogobrojnih faktora, kao što su uslovi sazrevanja, padavine, tretmani zaštitnim sredstvima (Heard, 1999; Fugelsang i Edwards, 2007).



Slika 2.9. Šematski prikaz formiranja aromatskih jedinjenja iz šećera i amino kiselina kao rezultat metabolizma vinskog kvasca

Najveći broj proizvođača vina u svetu je u poslednjih trideset godina prešao na primenu kontrolisane fermentacije inicirane inokulacijom čistih kultura selekcionisanih kvasaca, kao

pouzdanijeg i jednostavnijeg postupka. Primena spontane fermentaciji je i dalje zastupljena u izvesnoj meri, usled verovanja u jedinstven doprinos različitih vrsta autohtonih kvasaca kompleksonsti proizvedenog vina, koja se ne može postići putem kontrolisane fermentacije uz inokulaciju. U cilju postizanja kompromisa između ova dva vida proizvodnje, moguće je fermentaciju početi sa autohtonim kvascima, te nakon određenog vremena izvršiti inokulaciju komercijalnom starter kulturom (Ciani i Maccareli, 1998; Pretorius, 2000; Fleet, 2003; Ciani i sar., 2010).

Starter kulture se u vinarstvu primenjuju u cilju što brže inicijacije fermentacije i smanjenja rizika od potencijalnih kvarenja vina, putem stvaranja uslova u kojima bi broj ćelija seleksionisanog kvasca bio značajno veći u poređenju sa autohtonim sojevima (Fugelsang i Edwards, 2007). Postoji veliki broj sojeva kvasca *S. cerevisiae* koji se mogu značajno razlikovati po svojim fermentacionim karakteristikama i doprinosu koji daju aromi vina, što ih čini različito pogodnim za primenu u proizvodnji određenih tipova vina. Sablayrolles (2009) ističe da je komercijalno dostupno preko 200 različitih sojeva *S. cerevisiae*. Veliki broj faktora utiče na fermentacione karakteristike vinskog kvasca. Pored uspešne inokulacije sa odgovarajućom starter kulturom, od velikog značaja je i fiziološko stanje suvog aktivnog vinskog kvasca i njegova sposobnost da se adaptira na fermentacioni medijum, eventualne nedostatke hranjivih materija i dejstvo inhibirajućih faktora (visoka doza SO₂, niska temperatura itd.) (Pretorius, 2000).

Potencijal vinskih kvasaca da naglase tipičnost geografskog porekla vina je i dalje predmet polemika u naučnim i stručnim krugovima, međutim, danas je široko prihvaćena primena pojedinih vinskih sojeva za: (i) isticanje voćnog karaktera (Torija i sar., 2003; Sablayrolles, 2009), (ii) naglašavanje određenih sortnih karakteristika (Swiegers i sar., 2005, 2006; King i sar., 2008), (iii) ograničavanje produkcije organskih kiselina ili povećanje proizvodnje glicerola (Scanes i sar., 1998), (iv) ograničavanje produkcije nepoželjnih aroma, uključujući neka sumporna jedinjenja (Rauhut i sar., 1996) i isparljive fenole (Shinohara et al., 2000). Upotrebom različitih *Saccharomyces* sojeva u fermentaciji dobijaju se vina različitog aromatskog profila koji zavisi od sastava i sadržaja velikog broja isparljivih materija (estri sirćetne kiseline, etil-estri masnih kiselina, viši alkoholi, isparljivi tioli itd.) (King i sar., 2008; Swiegers i sar., 2009). Tako, na primer, *S. bayanus* produkuje veće količine nekih viših alkohola (pre svega 2-feniletanola) i estara (2-feniletil acetat) u poređenju sa *S. cerevisiae* (Antonelli i sar., 1999).

Zapažene su znatne razlike u fenolnom sastavu vina proizvedenih upotrebom različitih sojeva kvasaca za fermentaciju kljuka. Uticaj aktivnosti kvasaca na boju i fenolna jedinjenja nije ni danas u potpunosti razjašnjen. Pojedini sojevi utiču na povećanje sadržaja fenolnih jedinjenja, monomera antocijana, intenziteta boje vina, dok je nakon fermentacije drugim sojevima utvrđen viši sadržaj flavan-3-ola i proantocijanidola. Tokom starenja vina, različiti metaboliti kvasca kao piruvinska kiselina (Fulcrand i sar., 1998) i acetaldehid (Romero i Bakker, 1999), reaguju sa različitim grupama polifenola stvarajući jedinjenja (piranoantocijani) koja dovode do stabilizacije boje vina.

Ispitivanje efekata sekvencijalne inokulacije i koinokulacije sojevima *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* kvasaca na parametre fermentacije i kvalitet proizvedenog vina je, poslednjih godina, predmet istraživanja brojnih studija (Jolly i sar., 2006; Ciani i sar., 2006; Mendoza i sar., 2007; Ciani i sar., 2010). Jedna od najviše ispitivanih upotreba mešanih kultura kvasaca (multistarter kultura) u proizvodnji vina je vezana za biološku deacidifikaciju šire i/ili vina. Moreno i sar. (1991) su predložili sekvencijalnu upotrebu *T. delbrueckii* (nekada *Saccharomyces rosei*) i *S. cerevisiae* u cilju smanjenja produkcije sirćetne kiseline tokom fermentacije i poboljšanja organoleptičkih karakteristika vina. Koinokulacija šire mešanom kulturom kvasaca *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae* (u odnosu 20:1), dovela je do smanjenja sadržaja isparljivih kiselina (za 53%) i acetaldehida (za 60%), dok je sekvencijalna upotreba ovih starter kultura dala slabije rezultate (Bely i sar., 2008). Predlagana je i upotreba kvasca *Schizosaccharomyces pombe* za smanjenje sadržaja jabučne kiseline u širi i/ili vinu, putem sekvencijalne inokulacije sa *S. cerevisiae* (Snow i Gallender, 1979; Ciani, 1995). Primena starter kultura *S. cerevisiae* i *C. stellata* dovela je do povećanja sadržaja glicerola u dobijenom vinu (Ciani i Ferraro, 1996), dok je primena starter kultura kvasaca *Hanseniaspora uvarum*, *Hanseniaspora guilliermondii* i *S. cerevisiae* uticala na povećanje produkcije sumpornih jedinjenja, viših alkohola i estara tokom fermentacije (Moreira, 2008).

Mali broj naučnih radova se bavio proizvodnjom vina od šljiva, mogućnostima za poboljšanje njegovog kvaliteta, i ispitivanjem jedinjenja odgovornih za jedinstvenost arome ovog voćnog vina. Pored toga, ne postoji dovoljno podataka o uticaju primene različitih starter kultura kvasaca i dostupnosti hranljivih materija u sirovini na fermentaciju i kvalitet vina. Kroz izbor odgovarajućeg soja vinskog kvasca moguće je pozitivno uticati na produkciju željenih aromatskih materija tokom fermentacije.

2.5.1.1. Kvasci u fermentaciji voćnih vina

Satora i Tuszyński (2003) su svojim istraživanjem utvrdili da autohtonu mikrobiotu ploda šljiva sorte Węgierka Zwykia (*Prunus domestica* L.) najvećim delom (preko 80%) čine plesni roda *Aureobasidium* sp. i kvasac *Kloeckera apiculata*. Putem usitnjavanja i muljanja voća, ovi mikroorganizmi dospevaju u kljuk (sok) šljive, gde započinju fermentaciju. Sojevi kvasaca *K. apiculata* i *Candida pulcherrima* su prisutni u najvećem broju u kljuku tokom početne faze fermentacije, dok je, u manjoj meri, zabeležen i rast pojedinih vrsta iz rodova *Rhodotorula* i *Aureobasidium*. Rast mikrobiota kvasaca je nastavljen do četvrtog dana fermentacije i uspostavljanja koncentracije ćelija od 10^7 CFU/ml. Ne-*Saccharomyces* vrste postepeno odumiru sa daljim napredovanjem fermentacije, dok se populacija *S. cerevisiae* povećava, dovodeći svojom aktivnošću do završetka fermentacije (Satora i Tuszyński, 2005). U istraživanju objavljenom 2010. godine, pomenuti autori su određivali uticaj različitih sojeva kvasaca, izolovanih sa plodova sveže šljive, iz soka šljive u spontanoj fermentaciji (*K. apiculata* i *S. cerevisiae*), kao i komercijalnih starter kultura, na fermentaciju i hemijski sastav destilata. Fermentacija je bila najbrža u slučajevima inokulacije sa sojevima *S. cerevisiae* (komercijalnim i autohtonim). Najveća koncentracija etanola u kljuku utvrđena je u uzorcima nakon spontane

fermentacije (8,4% v/v), što je značajno više nego nakon fermentacija uz inokulaciju kvasca (oko 6,4% v/v). Destilate dobijene nakon spontane fermentacije karakterisao je visok sadržaj acetoina, etil-acetata i ukupnih estara, uz nizak sadržaj metanola i viših alkohola. Ne-*Saccharomyces* kvasci su proizveli više estara i metanola, dok je povećan sadržaj viših alkohola bio posledica rasta sojeva *S. cerevisiae*. Utvrđeno je, takođe, da su autohtoni sojevi *S. cerevisiae* proizvodili relativno malo viših alkohola u poređenju sa komercijalnim kulturama.

Joshi i Bhardway (2011) su ispitali mogućnost proizvodnje penušavog vina od sorti kineske šljive (*Prunus salicina* Linn.) upotrebom sekvencijalne inokulacije i koinokulacije kvascima *S. cerevisiae* i *Shizosaccharomyces pombe*, u slobodnom i imobilizovanom obliku (na kalcijum-alginatu). *Schiz. pombe* efikasno obavlja delimičnu deacidifikaciju soka od šljive u početnoj fazi fermentacije vina (Vyas i Joshi, 1988; Joshi i sar., 1991). Efikasnost deacidifikacije pomenutim kvascem smanjivala se tokom fermentacije sa povećanjem sadržaja etanola u vinu iznad 5% v/v (Joshi i sar., 1991). Najveća brzina fermentacije i deacidifikacije je zabeležena kod uzoraka kod kojih je prvo izvršena inokulacija imobilizovanim ćelijama *Schiz. pombe*, a nakon određenog vremena, i inokulacija sa slobodnim ili imobilizovanim ćelijama *S. cerevisiae*. Značajna brzina deacidifikacije postignuta je i u slučaju koinokulacije pomenutih oblika starter kultura kvasaca na početku fermentacije. Najbolje ocenjeno vino proizvedeno je početnim inokulisanjem soka sa imobilizovanim *S. cerevisiae* i dodatkom imobilizovanih ćelija *Schiz. pombe* nakon previranja određene količine fermentabilnih šećera.

Jooyandeh (2013) je u svojoj studiji koristio kvasac *Candida colliculosa*, izolovan iz surutke belog iranskog sira, za proizvodnju bezalkoholnog, prirodno-gaziranog, pića od šljiva.

Fermentacija tradicionalnog irskog vina od jabuka (sajdera) može se podeliti u tri faze u zavisnosti od populacije kvasaca koja u određenom vremenu dominira svojom brojnošću i aktivnošću. Kvasci *Kloeckera/Hanseniaspora uvarum* dominiraju u kljuku, nakon muljanja jabuka, i na početku fermentacije, a vremenom ovi kvasci odumiru i prepuštaju dominaciju kvascu *S. cerevisiae*. U toku starenja sidera zabeležena je najveća brojnost kvasaca iz rodova *Dekkera* i *Brettanomyces*. Utvrđeno je da je kvasac *H. uvarum* jedan od najznačajnijih predstavnika autohtone mikrobiote jabuke, dok *S. cerevisiae* i *Brettanomyces* kvasci u kljuk i vino uglavnom dospevaju preko opreme u vinariji (muljače, prese itd.) (Morrissey i sar., 2004). Suarez Valles i sar. (2007) svojim istraživanjem takođe ukazuju na dominantnost *Saccharomyces* vrsta tokom spontane fermentacije vina od jabuka, s tim da je *S. bayanus* bio najbrojniji početkom i sredinom fermentacije, dok je *S. cerevisiae* preuzeo dominaciju u krajnjim fazama procesa.

S ciljem poboljšanja kvaliteta vina od žute marakuje (eng. Yellow passion fruit) testirano je šesnaest komercijalno dostupnih selekcionisanih kvasca: pet sojeva *S. bayanus* (EC1118, AWRI R2, LittoLevure, QA23 i Freddo), sedam sojeva *S. cerevisiae* (Sauvignon, VL3, X5, X16, VIN13, 4F9 i LVCB) i dva soja *Saccharomyces* spp. (Alchemy I i II). Korišćenjem različitih sojeva kvasca za pokretanje fermentacije proizvedena su vina koja karakteriše različita kinetika fermentacije i jedinstven sastav i sadržaj sekundarnih metabolita kao što su jedinjenja sklona

vezivanju SO₂, neke organske kiseline, estri sirćetne kiseline, etil-estri masnih kiselina i viši alkoholi (Srisamatthakarn i sar., 2010; Srisamatthakarn, 2011).

Reddy i Reddy (2009) ispitivali su efikasnost fermentacije i kvalitet vina od manga proizvedenih upotrebom različitih starter kultura. Soj *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* CFTRI 101, pekarski kvasac i soj kvasca izolovan iz palminog vina (PWY1) su korišćeni za inokulaciju soka od manga. Primenjeni kvasci, izuzev pekarskog kvasca, pokazali su dobre fermentativne karakteristike (brzina usvajanja i previranja šećera, produkcija etanola i aromatičnih jedinjenja itd.) pri različitim uslovima sredine (temperatura i pH). Pekarski kvasac nije bio u stanju da usvoji ili preferentiše sav šećer u podlozi, dok je fermentacija bila znatno sporija u poređenju sa ostalim uzorcima. Brzina proizvodnje etanola od strane soja CFTRI 101 iznosila je 42,87 g/l/dan, soja PWY1 36,74 g/l/dan, a pekarskog kvasca 24,83 g/l/dan. Kvasac izolovan iz palminog vina bio je manje tolerantan na etanol u odnosu na soj CFTRI 101. Soj CFTRI 101 proizveo je značajno veće količine viših alkohola i estara u odnosu na druga dva soja.

Kako bi ocenili mogućnost upotrebe soka maline za proizvodnju voćnog vina, Duarte i sar. (2010) su u svojoj studiji pratili 16 oglednih fermentacija (upotreba različitih sojeva *S. cerevisiae* i *S. bayanus*) i analizirali kvalitet dobijenih vina. Među 16 testiranih sojeva, najbolje rezultate po pitanju fermentativnih karakteristika i produkcije poželjnih isparljivih jedinjenja, dali su sojevi CAT-1 i UFLA FW 15 (*S. cerevisiae*) i soj CBS 1505 (*S. bayanus*). Vino proizvedeno sa sojem CAT-1 imalo je najveću koncentraciju isparljivih masnih kiselina (1542,6 µg/l), dok je primena soja UFLA FW 15 dala vino sa najvećom koncentracijom acetata (2211,1 µg/l) i ukupnih isparljivih materija (5835 µg/l). Najveća koncentracija isparljivih sumpornih jedinjenja (566,5 µg/l) određena je u vinu proizvedenim sa *S. bayanus* CBS 1505.

2.5.2. Temperatura i aeracija

Poznato je da uslovi fermentacije kao što su temperatura, intenzitet aeracije i pH imaju veliki uticaj na brzinu i efikasnost procesa, kao i na kvalitet proizvedenog vina. Uticaj temperature na fermentaciju i maceraciju vina bio je predmet brojnih istraživanja (Merida i sar., 1991; Zoecklein, 1991; Renolds i sar., 2001; Kumar i sar., 2009; Reddy i Reddy, 2011).

Sa povećanjem temperature fermentacije do određene granice, karakteristične za svaki soj kvasca, intenzivira se rast kvasca i povećava brzina dejstva enzima (aktivnost se približno udvostručuje sa porastom temperature sa 10 °C na 20 °C). Sa povećanjem temperature iznad 30 °C rast i aktivnost vinskog kvasca uglavnom počinje da opada (Torija i sar., 2002). Kvasci su u fazi rasta posebno osetljivi na toplotu. Kada je početna temperatura kljuka između 26 i 28 °C, dalje povećanje temperature tokom faze rasta kvasca može dovesti do zastoja i prekida fermentacije, a povećava se i rizik od proizvodnje vina sa povišenim sadržajem isparljivih kiselina (Ribéreau-Gayon i sar., 2006). Osetljivost ćelije kvasca na toksično dejstvo alkohola povećava se sa povećanjem temperature fermentacije zbog povećane propustljivosti membrane (Torija i sar., 2002).

Prinos etanola je veći a njegova produkcija sporija na nižim temperaturama fermentacije. Sadržaj sekundarnih metabolita se povećava sa povećanjem temperature alkoholne fermentacije

(Torija i sar., 2003). Na višim temperaturama fermentacije (25-30 °C) nastaje više glicerola. Produkcija glicerola je najinetznivnija u prvim danima fermentacije, i povezuje se sa metaboliranjem prvih 50 g šećera (Ribéreau-Gayon i sar., 1999; Miljić i Puškaš, 2014). Glicerol je najzastupljeniji nusprodukt fermentacije vina nakon etanola i ugljen-dioksida. Ovaj poliol ne doprinosi direktno aromi vina jer je neisparljiv, međutim, nastajanje većih količina glicerola smanjuje senzornu percepciju gorčine tanina, a doprinosi i punoći, slatkoći i ugladenosti ukusa vina (Taherzadehet i sar., 2002). Uobičajeni sadržaj glicerola u vinu i voćnim vinima je 1-15 g/l (Taherzadehet i sar., 2002). Povećanje proizvodnje glicerola može se postići izborom soja kvasca koji ima sposobnost produkcije većih količina ovog jedinjenja, ili optimizacijom uslova fermentacije (pre svega temperature).

Kako bi povećali produkciju etanola i glicerola, a minimizovali nastajanje isparljivih kiselina tokom proizvodnje vina od manga, Kumar i sar. (2009) su optimizacijom uslova fermentacije utvrdili da se, u ispitanom temperaturnom opsegu (18-30 °C), najbolji rezultati dobijaju prilikom fermentacije na nešto nižoj temperaturi (22,5 °C).

Reddy i Reddy (2011) pokazali su da temperatura ima značajan uticaj na rast kvasca i produkciju isparljivih jedinjenja tokom fermentacije vina od manga. Na višim temperaturama (35 °C) maksimalna populacija ćelija kvasca postignuta je nakon 2 dana, nasuprot 6-8 dana, koliko je bilo potrebno za postizanje maksimalne populacije ćelija kod fermentacije na 15 °C. Fermentacija je najkraće trajala na temperaturi od 30 °C, uz usvajanje celokupne količine dostupnog šećera. Na istoj temepraturi zabeležena je i najveća brzina produkcije etanola (41 g/l/dan). Duže vreme fermentacije na 35 °C, u odnosu na 30 °C, i određena količina neprevrelog šećera, potvrđuju stav da vijabilnost ćelija kvasca opada sa porastom temperature fermentacije iznad 30 °C (Jones i Ingledew, 1994; Torija i sar., 2002). Sadržaj ukupnih isparljivih jedinjenja, sadržaj glicerola i sadržaj viših alkohola se povećavao sa povećanjem temperature fermentacije. Sa druge strane, sadržaj acetaldehida i ukupnih estara u vinu se smanjivao sa povećanjem temperature fermentacije od 15 °C do 35 °C. Sadržaj etanola se smanjivao sa povećanjem temperature usled povećanja produkcije jedinjenja kao što su glicerol i sirćetna kiselina, koja nastaju putem drugih metaboličkih puteva.

Uticaj temperature je među najbitnijim faktorima faze maceracije tokom koje dolazi do ekstrakcije fenolnih jedinjenja voća ili grožđa. Ova grupa jedinjenja je odgovorna za karakterističnu boju i ukus vina. Tokom maceracije u tečnu fazu ekstrahuju se i druge komponente, kao što su aromatična jedinjenja, polisaharidi, azotna jedinjenja i mineralne materije. Porastom temperature znatno se ubrzava ekstrakcija fenolnih jedinjenja (Merida i sar, 1991). Razlog tome je degradacija ćelijskih zidova usled koje se ubrzava isticanje ćelijskog sadržaja. Sa povećanjem temperature povećava se i rastvorljivost ekstarhovanih sastojaka kljuka. Uporednim ispitivanjem uticaja vremena i temperature maceracije zaključeno je da sa povećanjem temperature kod kratkotrajne maceracije (4-8 dana), blago raste sadržaj antocijana i nijansa boje, a intenzivnije se povećava vrednost intenziteta boje, sadržaj tanina i ukupnih fenolnih jedinjenja (Ribéreau-Gayon i sar., 2006). Maceracijom na temperaturi 25 °C, dobijaju se vina lepe boje, sa izraženim voćnim tonovima, namenjena potrošnji dok su mlada, dok

maceracijom na 28-30 °C dolazi do blagog gubitka voćne arome zbog isparavanja aromatičnih komponenti sa formiranim ugljen dioksidom (Zoecklein, 1991). Maceracijom na višim temperaturama naročito se intenzivira ekstrakcija tanina, tako da se dobijaju vina namenjena dugotrajnom starenju. Kod dugotrajne maceracije (30 dana) na višim temperaturama (30-35 °C) zabeležen je izražen pad vrednosti intenziteta boje i sadržaja antocijana, ali i porast vrednosti nijanse boje vina, sadržaja tanina i ukupnih fenolnih jedinjenja (Gómez-Plaza i sar., 2001; Puškaš i sar., 2005; Ribéreau-Gayon i sar., 1999). Povećana temperatura maceracije pogoduje ekstrakciji manoproteina iz ćelija kvasca, koji doprinosi mekoći, punoći i zaokruženosti ukusa vina.

Povećanje temperature fermentacije vina od 15 °C do 30 °C dovodi do jačeg naglašavanja arome crne ribizle, ublažavanja herbalnih tonova, a utiče i na povećanje intenziteta boje vina. Fermentacija na nižim temperaturama, ispod 15 °C, dovodi do proizvodnje aromatičnijih vina koje uglavnom karakteriše i nešto manji intenzitet boje usled slabije ekstrakcije fenolnih jedinjenja (Walker, 1998). Molina i sar. (2007) ističu da je koncentracija ukupnih isparljivih produkata u vinu veća prilikom fermentacije na 15 °C nego na 28 °C. Pored razlike u biosintetičkoj aktivnosti kvasaca na različitim temperaturama (veća na višim temperaturama), pomenuti autori dobijene rezultate objašnjavaju i činjenicom da fermentacija na višim temperaturama (oko 30 °C) rezultira većim gubicima isparljivih sastojaka nego što je to slučaj kod fermentacije na nižim temperaturama. Takvi gubici usled isparavanja najviše se ogledaju na finalnoj koncentraciji komponenti niže tačke isparavanja kao što su etil-estri kratkih lanaca. Fermentacija na nižim temperaturama dovela je do povećanja koncentracije etil-estara (etil-butanoat, etil-heksanoat, etil-oktanoat i etil-dekanoat) odgovornih za sveže, voćne arome (kupine, borovnice, maline itd.). Sa druge strane, više temperature fermentacije dovele su do povećanja koncentracije komponenti koje vinu daju cvetne arome (2-feniletanol i 2-fenil-etil-acetat) i tonove tropskog voća kao što su banana i ananas (2-metil-acetat, etil-2-metil-butanoat). Povećanje temperature fermentacije dovodi i do neznatnog povećanja ukupne kiselosti (Renolds i sar., 2001).

Pokazano je da kvasci bolje podnose povišene temperature ukoliko postupak fermentacije uključuje povremenu aeraciju kljuka. Aeracija nije neophodna za produkciju etanola tokom fermentacije, ali je prisustvo kiseonika naročito značajno tokom faze umnožavanja kvasca zbog proizvodnje esencijalnih sterola (ergosterola i lanosterola) i nezasićenih masnih kiselina kao što su linolna i linoleinska kiselina. Aerisanjem kljuka u početnoj fazi fermentacije (2-4 dan), proces se znatno ubrzava. Kvasac nije u stanju da efikasno koristi kiseonik u završnoj fazi fermentacije iz razloga što etanol i drugi toksični metaboliti sprečavaju usvajanje izvora azota. Količina rastvorenog kiseonika u širi koja se smatra dovoljnom da spreči zastoj fermentacije, iznosi 10-20 mg/l (Ribéreau-Gayon i sar., 2006). Sa druge strane prisustvo kiseonika tokom fermentacije pospešuje akumulaciju uree, koja se povezuje sa proizvodnjom toksičnog etil-karbamata (Bafrcova i sar., 1999). Reddy i Reddy (2011) su pokazali da aeracija kljuka od manga u početnoj fazi fermentacije omogućava produkciju većeg sadržaja etanola, estara i viših alkohola

u poređenju sa postupkom koji je uključivao aeraciju i mešanje tokom celokupnog procesa fermentacije.

2.5.3. Vrednost pH

Optimalna vrednost pH za rast većine kvasaca je u opsegu 4,5-6,5 dok su u kiselijim i baznijim sredinama rast i fermentativna aktivnost kvasaca smanjeni ili potpuno onemogućeni. Suviše niske ili visoke vrednosti pH izazivaju hemijski stres ćelije kvasca. Aktivnost enzima aldehid dehidrogenazne se povećava na višim vrednostima pH, te stoga dolazi do značajnije produkcije sirćetne kiseline. Ova oksidaciona reakcija generiše molekul NADH, koji zahteva redukciju kako bi se odražala redoks ravnoteža ćelije (Walker, 1998). Optimalna vrednost pH za alkoholnu fermentaciju vina je između 3,0 i 4,0. Vrednosti pH kljuka 3,7-4,0 omogućavaju bržu aklimatizaciju kvasca, ali su one pogodnije i za rast nepoželjnih mikroorganizama (Jackson, 2008). Prilikom ispitivanja uticaja vrednosti pH (3,5-6,0) kljuka na produkciju etanola tokom fermentacije vina od manga, Reddy i Reddy (2011) su zabeležili značajne razlike u dobijenim vrednostima. Koncentracija etanola je bila najmanja prilikom fermentacije na pH 3,5 (5% m/v) a najveća kod fermentacije na pH 5,0 (7,8% m/v). Dalje povećanje vrednosti pH do 6,0 uticalo je na smanjenje prinosa etanola. Povećanje vrednosti pH od 2,8 do 3,7 nije dovelo do značajnijih razlika u prinosu glicerola (Rankine i Bridson, 1971).

Vrednost pH značajno utiče na antocijane i boju vina, kako tokom fermentacije, tako i tokom starenja i skladištenja. Vodeni rastvor antocijana je pri pH 1,0 zatvoreno crvene boje, a sa porastom vrednosti pH intenzitet boje opada. Pri pH 5,0 rastvor je skoro potpuno bezbojan, a daljim porastom vrednosti pH, prelazi u ljubičato. Različiti tonovi i intenzitet boje zavise od strukture antocijana i njihove međusobne ravnoteže. U jako kiseloj sredini najveći deo antocijana egzistira kao pozitivno naelektrisan flavilijum katjon (AH^+) – malvidin–glukozid, koji čini 99% crvene boje. Sa porastom vrednosti pH, ravnoteža se pomera ka bezbojnoj karbinol-pseudobazi (B), pri čemu intenzitet boje opada. Pri pH 3,0 svega 30%, a pri pH 4,0 samo 4% malvidin-3-glukozida je u formi obojenog katjona (AH^+). Pri pH 5,0 ne postoje katjonski oblici antocijana, te je zastupljena plava boja zbog prisustva hinoidne pseudobaze (Ribéreau-Gayon i sar., 1999).

2.5.4. Sadržaj izvora azota u sirovini

Kvasac *Sacchromyces cerevisiae* može da raste koristeći različite supstrate kao izvor azota. Najveći afinitet ima prema jednostavnim izvorima azota kao što su amonijumovi joni i slobodne alfa-aminokiseline (Jiranek i sar., 1995; Valero et al., 2003). Međutim, sekundarne aminokiseline, kao što su prolin i hidrosiprolin, u najvećoj meri, ne bivaju metabolizovane od strane vinskih kvasaca pri uobičajenim uslovima fermentacije. Vinski kvasci kao izvore azota mogu usvajati i peptide male molekulske mase, ali ne i peptide velike molekulske mase i proteine grožđa, usled nedostatka ekstracelularne proteolitičke aktivnosti. Frakcija azotnih jedinjenja koju kvasac može koristiti za svoj rast naziva se asimilabilni azot (Bell i Henschke, 2005). Brzina usvajanja i metabolizam azotnih jedinjenja zavise od soja kvasca, njegovog

fiziološkog stanja i fizičko-hemijskih svojstava šire ili vina. *S. cerevisiae* može direktno inkorporirati aminokiseline u proteine, ili ih koristiti kao izvor azota putem oksidativne deaminacije (izuzev lizina i histidina). Azot čini oko 10% mase kvasca, računato na suhu materiju. Celokupna količina azota koja se tokom fermentacije koristi za izgradnju ćelijske biomase (populacija od 10^8 ćelija/ml) preuzima se iz voćne sirovine. Stoga je važno da sirovina sadrži značajne količine izvora asimilabilnog azota kako bi se fermentacija odvijala brzo i bez zastoja (Dharmadhikari, 2001). Nedostatak asimilabilnog azota dovodi do smanjenja brzine fermentacije, njenog zastoja, pa i prekida, kao posledica smanjenja ćelijske aktivnosti kvasca.

Azotna jedinjenja su od velikog značaja za proces vinifikacije, ne samo zbog uticaja na rast i metaboličku aktivnost kvasaca, već i zbog uloge u formiranju viših alkohola i drugih jedinjenja koja značajno doprinose mirisu i aromi vina (Mauricio i sar., 1995; Valero i sar., 2003). Nedostatak azota takođe može da utiče na formiranje reduktivnih sumpornih jedinjenja, kao što je vodonik-sulfid (Henschke i Jiranek, 1991; Jiranek i sar., 1995). S druge strane, degradacija nekih azotnih jedinjenja dovodi do formiranja biogenih amina i etil karbamata, jedinjenja koja se smatraju štetnim za zdravlje ljudi (Ough, 1991; Zoecklein i sar., 1999; Bell i Henschke, 2005). Uticaj izvora azota, njegove količine i vremena dodavanja na parametre fermentacije i formiranje isparljivih jedinjenja je bio predmet brojnih studija (Torija i sar., 2003; Wang i sar., 2003; Beltran i sar., 2005; Rosi i sar., 2008).

Azotna jedinjenja u voćnom soku i širi obuhvataju amonijačnu komponentu i složenija jedinjenja u koja se ubrajaju aminokiseline, oligopeptidi, polipeptidi, proteini, amidni azot, bioamini, nukleinske kiseline, pirazini, vitamini i nitrati (Zoecklein i sar., 1999). Sastav i sadržaj ovih jedinjenja zavisi od sorte voća i grožđa, agroekoloških uslova, postupka primarne prerade i vinifikacije itd.

Ukupan sadržaj azotnih materija u širi kreće se u opsegu 60-2400 mg/l te stoga može biti ograničavajući faktor za rast i fermentativnu aktivnost vinskog kvasca (Ribereau-Gayon i sar., 2006). Veći broj autora smatra da je minimalni sadržaj asimilabilnog azota potreban za normalnu aktivnost kvasca 120-140 mg/l (Bisson, 1991; Henschke i Jiranek, 1993; Bell i Henschke, 2005). Sa druge strane, koncentracija asimilabilnog azota iznad 400 mg/l obezbeđuje brz rast kvasca, povećanu brzinu fermentacije, ali i značajnu produkciju aromatskih jedinjenja (Henschke & Jiranek, 1993; Zoecklein i sar., 1999; Bell i Henschke, 2005). Ribereau-Gayon i sar. (2006) su svojim istraživanjem, sprovedenim tokom deset uzastopnih berbi grožđa (1996-2006. godine) u Bordou, utvrdili nedostatak azotnih jedinjenja u 22% uzoraka šire od belog grožđa, 49% uzoraka šire crnog grožđa, 60% uzoraka šire namenjenih proizvodnji rozea i 89% uzoraka šire od botritizovanog grožđa.

2.5.5. Mešanje kljuka

Uticaj mešanja kljuka tj. kvašenja i potapanja klobuka je veoma važan radi homogenizacije kljuka, kako u pogledu ravnomernog uticaja temperature, aeracije i biomase kvasca, tako i zbog homogenizacije ekstrahovanih sastojaka. Mešanjem kljuka stvaraju se uslovi za ravnomernu i potpuniju ekstrakciju fenolnih jedinjenja i polisaharida. Ekstrakcioni procesi

veoma zavise od učestalosti i tehnike mešanja kljuka, odražavajući se tako na teksturu i aromu vina (Zoecklein, 1991).

2.6. Uticaj starenja vina na fenolni sastav i boju vina

Starenje vina treba da predstavlja proces koji karakteriše pravilan i ravnomeran razvoj različitih komponenti boje, mirisa i arome. Tako se, na primer, boja crvenih vina postepeno menja od intezivno crvene, preko tamno crvene (bordo), do braon crvene. Ukus crvenog vina se, takođe, razvija tokom odležavanja, postajući mekši, manje opor i harmoničniji. Step en ispoljavanja pomenutih promena je različit za svako vino i zavisi kako od faktora spoljašnje sredine (uticaj kiseonika, SO₂, temperature i vremena starenja), tako i od specifičnog sastava vina. Potencijal vina za starenje zavisi posebno od sadržaja i sastava fenolnih jedinjenja (odnos tanini/antocijani, tip tanina – tanini pokožice i tanini semenke). Prisustvo polisaharida poreklom iz sirovine (grožđa) i kvasca takođe značajno utiče na proces starenja vina (Ribéreau-Gayon i sar., 1999).

Boja vina, pre svega, zavisi od sadržaja i sastava antocijana. Antocijani i tanini su uključeni u brojne reakcije koje se dešavaju tokom starenja vina: degradacija i modifikacije pojedinačnih komponenti, stabilizacija boje, polimerizacija tanina i kondenzacija sa drugim komponentama (Sidari i sar., 2007).

Kontrolisana (umerena) aeracija tokom procesa starenja ima veliki značaj za razvoj i održivost boje mladog crvenog vina. Kada vinu nije omogućen kontakt sa vazduhom, intezitet boje ostaje nepromenjen, ili dolazi do njegovog smanjenja. U slučaju odgovarajućeg stepena aeracije intezitet boje crvenog vina se povećava, i pored smanjenja sadržaja antocijana koji učestvuju u formiranju stabilnih polimera putem reakcija kompigmentacije (kondenzacije) sa flavan-3-olima (monomernim jedinicama tanina) i flavanolima (Gomez-Plaza i sar., 2002). Novonastali pigmenti su intenzivnije obojeni od antocijana. Nastajanje ovih kondenzovanih formi dovodi do povećanja količine obojenih oblika molekula pigmenata u odnosu na njihove bezbojne forme, ali i do značajnog povećanja stabilnosti boje vina.

Sa druge strane, tokom starenja vina dolazi i do reakcija degradacije antocijana i tanina koje vode smanjenju inteziteta boje (gubitak crveno-ljubičastih tonova) i nastajanju žuto-narandžastih tonova. Pomenute promene u boji crvenih vina mogu biti rezultat brze i intenzivne aeracije, prisustva etanala (narandžasti kompleksi tanin-piranoantocijanin), prisustva furfurola ili hidrosimetil-furfurola iz botriziranog grožđa i barika (nastajanje žuto-narandžastih i ciglasto-crvenih komponenti) (Ribéreau-Gayon i sar., 1999).

Temperatura predstavlja najznačajni faktor sredine koji utiče na hromatske karakteristike crvenog vina tokom starenja. Starenje vina na višim temperaturama vodi izraženijem nastanku narandžastih tonova, smanjenju inteziteta i povećanju nijanse boje. Dužina odležavanja takođe utiče na boju vina jer je većina promena koje se dešavaju u tom periodu zavisna od vremena (Dallas i Laureano, 1994).

Gomez-Plaza i sar. (2000) su u svojoj studiji ispitivali promene hromatskih karakteristika tokom starenja vina na konstantnoj temperaturi (oko 15°C) i temperaturi zavisnoj od ambijentalnih uslova (dnevne i sezonske varijacije), u periodu od godinu dana. Temperatura nije imala značajnijeg uticaja na intenzitet boje i sadržaj ukupnih fenola, dok je starenje na višim temperaturama dovelo do povećanja nijanse boje, hemijske starosti i udela boje koja potiče od polimernih pigmenata. Sadržaj katehina, petunidina i procijanidina nije se značajnije menjao pod uticajem temperature, dok je sadržaj epikatehina, kaftarne i kutarne kiseline, peonidina i malvidina bio veći u vinima koja su odležavala pri promenljivim temperaturnim uslovima. Sadržaj antocijana, katehina i epikatehina se smanjivao tokom starenja vina (reakcije oksidacije, polimerizacije i kondenzacije). Intenzitet boje vina se smanjivao u prva tri meseca odležavanja, dok je u narednih devet meseci zabeležen njegov rast usled formiranja izrazito obojenih intermedijernih polimera sastavljenih od antocijana, acetaldehida i flavan-3-ola.

2.7. Antioksidativna, antimikrobna i antikancerogena aktivnost vina i voćnih vina

2.7.1. Antoksidativno delovanje

Antiradikalska aktivnost vina od grožđa, koja proizilazi iz sadržaja i sastava prisutnih fenolnih jedinjenja, detaljno i često je obrađivana u naučnoj literaturi. Sa druge strane, antioksidativni potencijal i sadržaj ukupnih fenola u voćnim vinima nisu dovoljno ispitani. Brojna istraživanja su pokazala da razlike u antioksidativnom potencijalu vina zavise više od koncentracije pojedinih fenolnih jedinjenja nego od sadržaja ukupnih fenola. Neka voćna vina poseduju veći antioksidativni potencijal od crvenih vina, pre svega zbog razlike u sadržaju i sastavu specifičnih fenolnih jedinjenja.

Slobodni radikali su atomi, joni ili molekuli, koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi. Nespareni elektroni uzrok su njihove visoke i neselektivne reaktivnosti i nestabilnosti. Slobodni radikali mogu biti pozitivno (radikal katjon) i negativno naelektrisani (radikal anjon). Reaktivni slobodni radikali mogu nastati brojnim reakcijama koje se uglavnom svode na četiri osnovna tipa: termolizu, fotolizu, oksido-redukcione procese i iradijaciju visoke energije (Piletić i sar., 1993). Nespareni elektron se može nalaziti na atomima različitih elemenata, pa se slobodni radikali dele na slobodne radikale (reaktivne slobodnoradikalske vrste) kiseonika, hlora, azota itd. U normalnim uslovima, nastajanje slobodnih radikala u ravnoteži je sa antioksidativnim sistemom odbrane organizma. Stanje u kome je ravnoteža između prooksidanata i antioksidanata pomešana u stranu prooksidanata, naziva se oksidativni stres (Puškaš, 2010). Oksidativni stres dovodi do oštećenja primarnih biomolekula: proteina, lipida, nukleinskih kiselina i ugljenih hidrata, što može biti uzrok čitavog niza poremećaja u metabolizmu i izazvati disfunkciju i smrt ćelija. Oboljenja kao što su arteroskleroza, kancer, kardiovaskularna oboljenja, astma, artitis, gastritis, dermatitis, dijabetes,

bolesti jetre, bolesti bubrega, Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest itd. posledica su oksidativnog stresa (Lee i sar., 2004).

Crvena vina ispoljavaju snažan biološki efekat koji se, pre svega, pripisuje visokim sadržajima flavonoida (Cao i Prior, 2000). Postoji visok stepen pozitivne korelacije između sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, kao i pojedinačno udela galne kiseline, (-)-epikatehina, (+)-katehina, i antioksidativnog potencijala vina (Henn i Stehle, 1998; Sanchez-Moreno i sar., 1999). Najizraženiju aktivnost u pogledu hvatanja slobodnih radikala ima galna kiselina, zatim taninska kiselina, kafena kiselina, kvercetin, rutin, ferulna kiselina, a najnižu aktivnost poseduju DL- α -tokoferol i resveratrol (Sanchez-Moreno i sar., 1999). de Gaulejac i sar. (1999) su utvrdili da frakcija antocijana pokazuje veći antioksidativni potencijal u odnosu na frakciju proantocijanidola, ali se antioksidativni efekat pojačava sinergističnim delovanjem antocijana i proantocijanidola iz vina i pokožice, u odnosu na čiste antocijane. Usku povezanost sadržaja antocijana, u ekstraktima grožđa i različitim vinima, i antioksidativnog potencijala konstatovali su u svojim istraživanjima mnogi autori (Sato i sar., 1996; Meyer i sar., 1997; Sanches-Moreno i sar., 2000). Za visok antioksidativni potencijal crvenih vina, prema Kerry i Abbey (1997), najzaslužniji su, pre svega, katehini, proantocijanidoli, monomeri antocijana i fenolne kiseline. Veće antiradikalno delovanje antioksidanti vina ispoljavaju u kombinaciji, nego svaki pojedinačno (Meyer i sar., 1997).

Heinonen i sar. (1998) su u svojoj studiji upoređivali sadržaj fenolnih jedinjenja (u ekvivalentima galne kiseline - GAE) i antioksidativni potencijal 33 voćna vina (jabuka, aronija, malina, borovnica, brusnica, jagoda), tri crvena i jednog belog vina. Antioksidativni potencijal je određivan u uzorcima vina iz kojih je vakuum uparavanjem uklonjen alkohol, merenjem stepena inhibicije oksidacije dodatog metil-linoleata. Utvrđen je nizak stepen pozitivne korelacije sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativnog potencijala kod voćnih vina ($r = 0,32-0,47$), za razliku od konvencionalnih vina ($r = 0,89-0,94$). Vina proizvedena od mešanog soka crne ribizle i borovnice (1020-1060 mg GAE/l) pokazala su nešto veći antioksidativni potencijal u poređenju sa crvenim vinima koja su sadržala znatno više fenolnih jedinjenja (1390-1600 mg GAE/l). Pomenute razlike u antioksidativnom potencijalu pripisane su različitom sastavu fenolnih jedinjenja u pojedinačnim vinima. Pinhero i Paliyath (2001) određivali su antioksidativni potencijal tri voćna vina i jednog crvenog vina, pri čemu se pokazalo da je sposobnost hvatanja superoksid anjon radikala ($O_2^{\bullet-}$) bila za 30-40% veća kod vina od borovnice, kupine i višnje, u odnosu na testirano crveno vino. Antioksidativni potencijal prema hidroksil ($\bullet OH$) radikalima je bio najveći kod vina od borovnice i višnje gde je utvrđen stepen inhibicije od 9,07% odnosno 5,98%, a nešto manji kod kupine i crvenog vina (3,57 i 2,8%).

Nasuprot rezultatima do kojih su došli Heinonen i sar. (1998), Yildirim (2006) je utvrdio značajnu pozitivnu korelaciju između antioksidativnog potencijala i sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja ispitivanih voćnih vina od jabuke, kajsije, borovnice, kupine, dunje, jagode i višnje. Razlike u dobijenim rezultatima mogu biti rezultat primene različitih metoda, s obzirom da je Yildirim (2006) za merenje antioksidativnog potencijala vina koristio DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin) radikale umesto metil-linoleata. Rezultati studije koja se bavila ispitivanjem

razlika u mehanizmu antiradikalske aktivnosti kod sokova i vina od nara, takođe ukazuju na visoku pozitivnu korelaciju između sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i antioksidativnog potencijala prema DPPH radikalima (Zhuang i sar., 2011). Visok antioksidativni potencijal i visok stepen pozitivne korelacije sa sadržajem ukupnih fenolnih jedinjenja ($r > 0,95$) utvrđen je i kod vina od tropske voćke džekfruta (*eng.* Jackfruit, *Artocarpus heterophyllus*) primenom četiri antioksidativna testa (DPPH, FRAP (*eng.* Ferric reducing antioxidant power), DMPD (N,N-dimetil-p-fenilendiamin) i NO (nitril-oksidi)). Sposobnost hvatanja DPPH slobodnih radikala je bila naizraženija i iznosila je 55-70% (Seeram i sar., 2008).

Šljiva ima visoku antiradikalnu aktivnost, ORAC vrednost 950/100 g (ORAC –oxygen radical absorbance capacity). Poređenja radi, ista masa crvenog grožđa daje ORAC vrednost 739, a borovnice 2400 (Hui i sar., 2006). Yuan (2013) je utvrdio da vino od šljiva poseduje značajan antioksidativni potencijal, pre svega prema superoksid anjon radikalima ($O_2^{\bullet-}$). Vino od šljiva je, i pored nešto nižeg sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja, imalo viši antioksidativni potencijal u odnosu na većinu voćnih vina koja su ispitana u ovoj studiji.

Rupasinghe i Clegg (2007) određivali su antioksidativni potencijal i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u deset voćnih vina (šljiva, kruška, jabuka, breskva, malina, borovnica, kupina itd.) i upoređivali dobijene vrednosti sa tradicionalnim crvenim (Kaberne sovinjon) i belim (Rajnski rizling) vinima. Ukupni antioksidativni potencijal ispitanih vina, određen pomoću modifikovanog FRAP testa, bio je u opsegu 219-2447 mg ekvivalenta askorbinske kiseline/l. Antioksidativni potencijal i sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja bio je najviši kod crvenog vina i voćnih vina od borovnice i crne ribizle, umeren kod vina od šljive, trešnje, kupine i maline, a najmanji kod belog vina i voćnih vina od jabuke, kruške i breskve. Utvrđena je snažna pozitivna korelacija između ova dva parametra ($r = 0,97$).

2.7.2. Antimikrobno delovanje

Istraživanja antimikrobnih svojstava vina u poslednje dve decenije potvrđuju aktivnost prema velikom broju mikroorganizama, ali se o nosiocima aktivnosti još uvek polemiše, te su istraživanja u ovoj oblasti i dalje aktuelna.

Sheth i sar. (1988) su u svom istraživanju ispitivali razlike u antibakterijskoj aktivnosti različitih komercijalnih napitaka kao što su gazirani sokovi, pivo, vino, mleko i voda. Pomenuti autori su inokulisali bakterije rodova *Salmonella*, *Shigella* i enterotoksigenu *E. coli* u testirana pića, i brojali preživle kolonije nakon dva dana. Najniži stepen preživljavanja među patogenim bakterijama zabeležen je prilikom inokulacije u vino, dok je najizraženiji rast ćelija bio zabeležen u mleku i vodi. Nešto niža antibakterijska aktivnost u odnosu na vino, zabeležena je kod piva i gaziranih sokova.

Weisse i sar. (1995) upoređivali su antibakterijska svojstva crvenih i belih vina sa bizmut-subsalicilatom, tradicionalnim digestivom koji se koristi protiv patogena generalno odgovornih za putničku dijareju. Suspenzije *E. coli*, *Salmonella enteritidis* i *Shigella sonnei* inokulisane su u crveno i belo vino, čist etanol i tekilu razblažene sterilnom česmenskom vodom do koncentracije etanola od 10%, rastvor bizmut-subsalicilata (35 mg/l) i sterilizovanu

česmensku vodu (kontrola). Utvrđeno je da crvena i bela vina izazivaju najveće smanjenje broja patogenih bakterija, od 10^5 - 10^6 CFU/ml do granice detekcije (<10 CFU/ml). Bizmut-subsalicilat je bio manje efikasan od crvenog i belog vina, ali i efikasniji u redukciji brojnosti *E.coli* i *S. enteritidis* od razblažene tekile. 10% etanol nije pokazao bilo koji vid inhibitornog dejstva na rast testiranih patogenih bakterija, a njegova antibakterijska aktivnost nije se značajnije razlikovala od kontrolnog uzorka (sterilizovane česmenske vode). Harding i Maidment (1996) su, takođe, istakli značajnu antibakterijsku aktivnost vina prema patogenim bakterijama (*E. coli*, *Salmonella enteritidis* i *Shigella sonnei*), ali i neznatno dejstvo 10% etanola i pufernog rastvora odgovarajuće vrednosti pH (kao u vinima) na testirane bakterijske sojeve. Dobijeni rezultati ukazuju da vino, pored alkohola i pH, poseduje dodatne komponente koje doprinose njegovoj antibakterijskoj aktivnosti. Dodatak razblaženog destilata (svedenog na 10% etanola) u širu doveo je do povećanja antibakterijske aktivnosti u odnosu na pojedinačne uzorke, što ukazuje na sinergističko dejstvo alkohola i sastojaka vina. Antibakterijska aktivnost takvog mešanog uzorka je bila i dalje manja od vrednosti zabeležene kod odgovarajućeg vina, pa se može zaključiti da proces fermentacije značajno doprinosi antibakterijskoj aktivnosti vina. Takođe, ova studija ističe neznatno veću antibakterijsku aktivnost belih, u odnosu na crvena, vina.

Kako bi odredili doprinos pojedinačnih faktora, pre svega fenolnih jedinjenja, etanola i pH, ukupnoj antimikrobnoj aktivnosti vina, Boban i sar. (2010) su za tretman *S. enteritidis* i *E. coli* koristili crveno vino, vino iz kojeg su uklonjeni fenoli, vino iz kojeg je uklonjen alkohol, rastvor etanola (12,5% v/v), puferni rastvor pH 3,1, kombinaciju rastvora etanola i pufernog rastvora i fiziološki rastvor (kontrolni uzorak). Dobijeni rezultati pokazali su da je najveću antibakterijsku aktivnost imalo netretirano crveno vino, pa zatim vino iz koga su uklonjeni fenoli, vino iz koga je uklonjen etanol, kombinacija rastvora etanola i pufernog rastvora, puferni rastvor, i na kraju rastvor etanola.

U cilju provere antimikrobne aktivnosti pojedinačnih fenolnih jedinjenja karakterističnih za vino, Rodriguez Vaquero i sar. (2007) ispitano je dejstvo četiri fenolne kiseline (galna, vanilinska, protokoatehinska i kafena) i tri flavonoida (rutin, katehin i kvercetin) protiv *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Flavobacterium* sp. i *Staphylococcus aureus*. Bakterije su pokazale različitu osetljivost prema pojedinim fenolnim jedinjenjima i njihovim koncentracijama, pri čemu je *Flavobacterium* sp. pokazao rezistentnost na sva primenjena jedinjenja, dok je *E. coli* bila najosetljivija. Ispitana je i antimikrobna aktivnost vina prema ovim bakterijama i utvrđeno je značajno inhibitorno dejstvo na rast svih testiranih sojeva, naročito kod uzoraka vina koja su vakuum uparavanjem dvostruko i četvorostruko koncentrovana. Vina koja su podvrgnuta bistrenju pokazala su nižu antimikrobnu aktivnost, što je pripisano delimičnom uklanjanju fenolnih jedinjenja tokom tretmana.

Utvrđeno je da fenolna jedinjenja vina poseduju antibakterijsko dejstvo i protiv *Campylobacter jejuni*, pri čemu je izraženija aktivnost zabeležena kod crvenih i roze, nego kod belih vina (Gaňan i sar., 2009). Testiranjem dejstva dvanaest ekstraktata raličitih vrsta bobičastog voća na rast sedam odabranih patogena, utvrđeno je da je *Bacillus cereus* bio osetljiv (pa i snažno inhibiran) na sve primenjenje ekstarkte, dok je kvasac *Candida albicans* bio

najrezistentniji, pokazujući osetljivost na samo tri ekstrakta (malina, jagoda i močvarna (severna) malina) (Nohynek i sar., 2006). Melanoidini, jedinjenja koja nastaju Majlardovim reakcijama i koja su prisutna i španskim desertnima vinima, pokazali su značajnu antibakterijsku aktivnost prema *E. coli* i *S. aureus* (Rufián-Henares i Morales, 2008).

Značajnu antimikrobnu aktivnost pokazuju i voćna vina. Bish (2011) je ispitivao baktericidni efekat četiri voćna vina (malina, kupina, trešnja i breskva) na sledeće alimentarne patogene: *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* i *Staphylococcus aureus*. Patogeni su tretirani rastvorima vina različite koncentracije tokom 24 časa. Sa povećanjem koncentracije voćnih vina (40-60% rastvori) zabeleženo je i povećanje baktericidnog dejstva. Primenom skening i transmiseone elektronske mikroskopije uočeno je da je tretman bakterija voćnim vinima doveo do smanjenja veličine ćelija, rupa u ćelijskom zidu i disrupcija ćelijske membrane.

Mehanizam antimikrobnog dejstva fenolnih jedinjenja objašnjava se pomoću nekoliko teorija. Kao moguće objašnjenje, Scalbert (1991) ističe vezivanje (prijanjanje) tanina za površinu bakterijske ćelije i njihovu interakciju sa pojedinim enzimima. Ova teorija je izvedena iz jedne od osnovnih karakteristika tanina, grupe fenolnih jedinjenja koja ima veliki afinitet ka vezivanju proteina. Tanini takođe vezuju i metalne jone, neophodne supstrate za rast ćelije. Autor ističe i da je stvaranje kompleksa i interakcije tanina sa mikrobnim enzimima posmatrano kod celulaza, pektinaza, peroksidaza, lakaza i glukoziltransferaza. Delehanty i sar. (2007) su u svojoj studiji inhibiciju bakterijskog rasta pripisali mehanizmu vezivanja lipopolisaharida ćelija gram negativnih bakterija za frakcije proantocijanidina izolovanih iz kupina, grožđa i čaja. Utvrđeno je da polifenoli i pića bogata ovim jedinjenjima proizvode značajne količine vodonik-peroksida usled reakcije sa metalnim jonima (Akagawa i sar., 2003). Na višim vrednostima pH podloge zabeleženo je intenzivnije nastajanje vodonik-peroksida. Polifenoli, takođe, mogu inhibirati aktivnost ATP sintetaze, enzima neophodnog za rast i metabolizam ćelije (Chinnam i sar., 2010).

Sugita-Konishi i sar. (2001) su upoređivali antibakterijska svojstva vina *in vitro* i *in vivo*. U prvoj fazi istraživanja ispitivana je *in vitro* antibakterijska aktivnost crvenog i belog vina, 14% rastvora etanola, rastvora 350 mg/l kalijum-metabisulfit (vinobran) i rastvora fosfatnog pufera (pH 3,3) prema *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* i *Vibrio parahaemolyticus*. Crveno i belo vino je značajno smanjilo broj kolonija bakterija tokom 30 min (od 10^5 do ispod granice detekcije). Sa druge strane, nije zabeleženo nikakvo dejstvo rastvora etanola, kalijum-metabisulfita i pufernog rastvora, te se pretpostavilo da etanol i sulfiti nisu direktno odgovorni za antibakterijsku aktivnost vina. Druga faza istraživanja imala je za cilj identifikaciju sastojaka vina odgovornih za antimikrobna svojstva. Tom prilikom utvrđeno je da vino kod kojeg je sredstvima za bistrenje uklonjena najveća količina fenolnih jedinjenja pokazuje skoro istovetna antimikrobna svojstva kao i netretirano vino. Ovakvi rezultati su doveli do zaključka da fenolna jedinjenja nisu glavni nosioci antimikrobne aktivnosti vina, što nije u saglasnosti sa rezultatima brojnih studija koja su se bavila ovom tematikom (Nohynek i sar., 2006; Rodriguez Vaquero i sar., 2007; Gañan i sar., 2009). U poslednjoj fazi istraživanja, autori su tokom perioda od nedelju dana testirali dejstvo crvenog i belog vina, koncentrisane frakcije fenolnih jedinjenja vina, 14%

rastvora etanola i vode na miševima zaraženim *S. enteritidis*. Posmatranjem slezine tretiranih miševa autori nisu uočili bitne razlike među primenjenim tretmanima, te su zaključili da unošenje vina u organizam miševa nije sprečilo ili pružilo zaštitu od infekcije salmonelom.

2.7.3. Antikancerogeno delovanje

Svako nagomilavanje ćelija preko one količine koja je potrebna za razvoj, oporavak ili funkciju tkiva naziva se tumor. Tumor može biti benigni ili maligni, gde maligni tumor (karcinom, kancer) brže raste i ima tendenciju invazije na susedna tkiva. Kancer je oboljenje kod kojeg su procesi proliferacije, razvitka i smrti ćelije poremećeni. Ovo oboljenje karakteriše nekontrolisana deoba ćelija, odnosno sposobnost tih ćelija da prodru u ostatak tkiva, bilo direktnim urastanjem (invazija) bilo migracijom ćelija do udaljenih delova tela (metastaza). Kancerogeneza je složeni proces prelaska normalne ćelije u maligno stanje, a agensi koji indukuju taj proces zovu se kancerogeni. Kancerogeni procesi mogu da započnu u gotovo svakom organu, ali tkiva kod kojih je proliferacija ćelija inače intenzivnija i koja su hronično izložena spoljašnjim uticajima (pluća, creva, itd.) su posebno podložna.

Kancer se može pojaviti kod ljudi svih uzrasta, kod životinja, pa čak i biljaka. Ovo oboljenje je odgovorno za oko 13% svih smrtnih ishoda kod ljudi. Shodno tome, ulažu se veliki naponi u cilju pronalaženja i ispitivanja novih antikancerogenih agenasa. Smatra se da jedna trećina kancera kod ljudi nastaje zbog loših navika u ishrani, te da su pravilna ishrana i promena načina života glavna strategija u borbi protiv ovih bolesti. Antikancerogene supstance koje su prisutne u ishrani generalno se mogu podeliti na blokirajuće agense, koji deluju tokom faze inicijacije kancerogeneze, i suzbijajuće agense, koji usporavaju ili vraćaju proces kancerogeneze unazad u kasnijim fazama (Johnson i sar., 1994).

Potencijalno antikancerogeno dejstvo vina, u naučnoj literaturi, uglavnom se dovodi u vezu sa prisustvom i dejstvom različitih fenolnih jedinjenja, pre svega flavonoida (kvercetin, katehin), trihidroksistilbena (resveratrol) i fenolnih kiselina (galna kiselina) (Soleas i sar., 2006). Polifenoli sprečavaju prelazak benignih u maligne tumore, što je izazvano slobodnim radikalima, štite veze u molekulu DNA od raskidanja izazvanih γ zracima koji utiču na pojavu mutacija i kancerogenezu (Dufresne i Farnworth, 2000).

Soleas i sar. (2006) ispitivali su antikancerogeno dejstvo četiri fenolna jedinjenja izolovana iz crvenog vina (kvercetin, (+)-katehin, *trans*-resveratrol i galna kiselina) na karcinom kože miševa (CD-1). Životinje su površinski tretirane (na obrijanim delovima kože) pomenutim polifenolima u dozi 0-25 μmol (rastvoreno u 200 μl acetona), dva puta nedeljno, tokom 18 nedelja. Utvrđeno je da je kvercetin bio najefikasniji ($\text{ED}_{50} < 1 \mu\text{mol}$), dok je galna kiselina bila najmanje efikasna (ED_{50} 5-10 μmol). (+)-katehin i *trans*-resveratrol su se pokazali srednje efikasnim (ED_{50} vrednost 5 i 6 μmol , respektivno). ED_{50} (srednja efektivna doza) je doza koja deluje na 50% populacije koja koristi lek. S obzirom da je pokazano da se *trans*-resveratrol absorbuje znatno efikasnije u ljudskoj plazmi prilikom oralne upotrebe od kvercetina i (+)-katehina, i uzimajući u obzir relativne koncentracije ovih polifenola u crvenom vinu, autori su

zaključili da bi se *trans*-resveratrol mogao smatrati najefikasnijim antikancerogenim fenolnim jedinjenjem crvenog vina.

Resveratrol je pokazao značajnu antikancerogenu aktivnost kao agens koji suzbija tri faze tumorskog rasta (inicijaciju, promociju i progresiju). Na inicijalnom nivou, smatra se da su važne antioksidativne sposobnosti resveratrola, dok pojačana apoptoza, ekspresija antiapoptotičnih proteina i smanjen broj ćelijskih aktivacionih puteva spadaju u efekte usmerene protiv faze promocije karcinogeneze. Aktivnosti usmerene protiv faze progresije karcinogeneze uključuju supresiju signalnih puteva faktora rasta, supresiju rasta tumorskih ćelija, kao i inhibiciju angiogeneze (Udenigwe i sar., 2008). Takođe, utvrđeno je da *cis*-resveratrol deluje inhibitorno na karcinogenezu inhibicijom enzima tirozin kinaze. Prirodni analog resveratrola, piceatanol (prisutan u vinu) inhibiše proliferaciju tumorskih ćelijskih linija putem apoptoze i zaustavljanja ćelijskog ciklusa. Postoji hipoteza da su antiproliferativni efekti resveratrola na tumorskim ćelijskim linijama rezultat konverzije resveratrola u piceatanol od strane citohroma P450 1B (CYP1B1). CYP1B1 je veoma izražen u tumorskom tkivu dojke, kolona, pluća, jednjaka, ezofagusa, kože, limfnih čvorova, mozga i testisa, dok u zdravom tkivu nije prisutan (Wolter i sar., 2002).

Antocijanini su pokazali antikancerogeno dejstvo protiv više vrsta ćelijskih linija karcinoma *in vitro*, kao i protiv različitih vrsta tumora *in vivo*. Rezultati *in vitro* studija ukazuju na sledeća hemopreventivna dejstva antocijana: sposobnost hvatanja slobodnih radikala, stimulacija aktivnosti detoksikujućih enzima, smanjenje proliferacije ćelija, inflamacija, angiogeneza i invazivnost, kao i indukcija apoptoze i diferencijacije. *In vivo* studije pokazale su da unos antocijana putem ishrane inhibira razvoj karcinoma gastrointestinalnog trakta, dok površinski primenjeni antocijani inhibiraju rak kože (Wang i Stoner, 2008).

Yang i sar. (2009) su utvrdili značajnu antiproliferativnu aktivnost ekstrakata grožđa na rast tri histološki različite ćelijske linije humanog kancera Caco-2 (adenokarcinom debelog creva), HepG2 (karcinom jetre) i MCF-7 (adenokarcinom dojke). Antiproliferativna aktivnost je bila u pozitivnoj korelaciji sa sadržajem fenolnih jedinjenja. Primena ekstrakata i vina od crne maline (*Rubus occidentalis*) dovela je do zaustavljanja proliferacije ćelija karcinoma debelog creva (HT-29) i karcinoma prostate (LNCaP). Ekstrakti maline u 60% etanolu imali su najveći inhibitorni efekat na proliferaciju ćelija HT-29 i LNCaP (IC_{50} vrednost 89,9 μ g/ml, odnosno 1420 μ g/ml). IC_{50} je količina uzorka potrebna da se smanji proliferacija ćelija za 50%. Vino od maline pokazalo je nešto nižu antiproliferativnu aktivnost u poređenju sa etanolnim ekstraktom (Jeong i sar., 2010). Istraživanje Sun i sar. (2002) ističu da je najveća antiproliferativna aktivnost među ispitanim ekstraktima različitog voća prema ćelijskoj liniji humanog karcinoma jetre HepG2 određena kod ribizle (IC_{50} 14,5 mg/ml, nakon 96 h inkubacije), a zatim kod limuna, jabuke, jagode, crnog grožđa, banane, grejpfruta, i na kraju, breskve. Byrne i sar. (2007) ističu u svom radu značajan inhibitorni efekat ekstrakata šljive na rast tri ćelijske linije humanog karcinoma dojke (MCF-7, MDA-MB-453 i MCF-10A), dve ćelijske linije humanog karcinoma debelog creva (HT-29 i Caco-2) i jednu ćelijsku liniju humanog karcinoma prostate (PC-3). IC_{50} vrednosti dobijene za različite ispitane sorte šljive bile su u opsegu 200-975 mg/l. Predmet

istraživanja bila je i identifikacija frakcija fenolnih jedinjenja šljive, nosioca antiproliferativne aktivnosti (Noratto i sar., 2009). U studiji su korišćene dve ćelijske linije humanog karcinoma dojke, estrogen zavisna (MCF-7) i estrogen nezavisna (MDA-MB-435). Ekstrakti šljive su pokazali veći inhibitorni efekat na MDA-MB-435 ćelijsku liniju, u poređenju sa MCF-7 i normalnom (zdravom) ćelijskom linijom dojke. U drugom delu istraživanja, razdvojene su četiri frakcije fenolnih jedinjenja, pri čemu se pokazalo da frakcije F₃ (flavonoidi) i F₄ (procijanidini) poseduju veću antiproliferativnu aktivnost u poređenju sa frakcijama F₁ (fenolne kiseline) i F₂ (antocijani) prema obe ćelijske linije karcinoma dojke. Analizom pojedinačnih komponenti frakcije F₃ utvrđeno je da najveće inhibitorno dejstvo na rast kancerogenih ćelija poseduje kvercetin-3β-glukozid.

Iako rezultati eksperimentalnih studija jasno potvrđuju antikancerogenu aktivnost različitih fenolnih jedinjenja, pozitivno dejstvo njihovog unošenja na smanjenje rizika od pojave raka kod ljudi još nije pouzdano potvrđeno epidemiološkim studijama. Štaviše, količine pojedinih fenolnih jedinjenja potrebne za izazivanje antiproliferativnog efekta *in vitro*, daleko prevazilaze količine ovih jedinjenja koje su određene u ljudskoj plazmi *in vivo*.

2.8. Optimizacija tehnoloških procesa metodom odzivne površine funkcije (RSM)

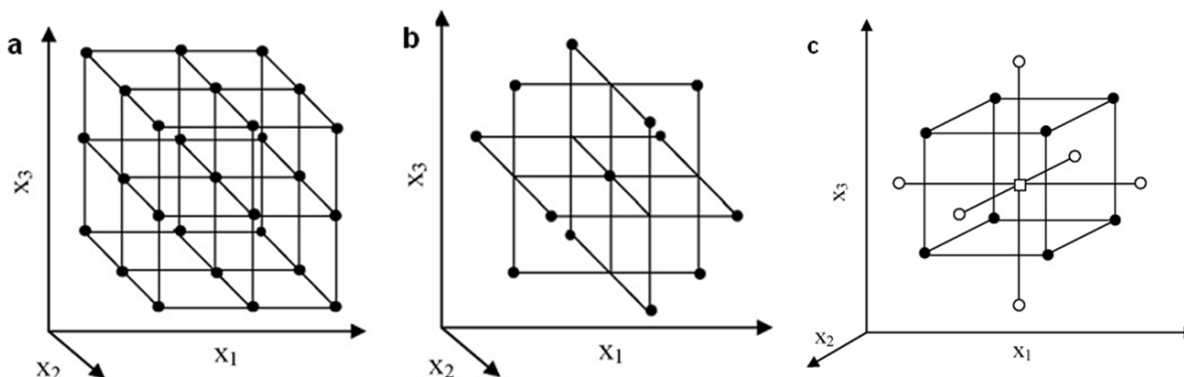
Konvencionalna tehnika za optimizaciju sistema sa više promenljivih ulaznih veličina obično posmatra postupno svaki pojedinačni faktor, umesto da ih sve testira istovremeno. Takva tehnika zahteva izvođenje velikog broja eksperimenata i nije u mogućnosti da otkrije alternativne zavisnosti između komponenti. Brojni statistički metodi planiranja eksperimenata su prethodnih godina primenjivani za optimizaciju različitih bioprocasa. Ove metode podrazumevaju korišćenje matematičkih modela za projektovanje fermentacionih procesa i analiziranje njihovih rezultata. Metoda odzivne površine funkcije (RSM - Response Surface Methodology) je jedna od najčešće primenjivanih tehnika u mnogim oblastima naučnog istraživanja.

Metoda odzivne površine funkcije može se definisati kao empirijska statističko-matematička tehnika primenjena za regresionu analizu podataka, dobijenih iz adekvatno planiranih eksperimenata, simultanim rešavanjem sistema jednačina. Osnovna prednost RSM je u tome što je potreban manji broj eksperimentalnih podataka da bi se obezbedio dovoljan broj informacija za dobijanje statistički validnih rezultata. Svaka od jednačina naziva se funkcija odziva, a njen geometrijski prikaz se naziva odzivna površina (Myers i Montgomery, 1995).

Odzivne funkcije su polinomskog oblika s obzirom da se kvalitet fitovanja eksperimentalnih podataka može poboljšati povećanjem stepena polinoma. Ovakvi modeli su posebno pogodni za rešavanje optimizacionih problema budući da je njima moguće opisati interakcije velikog broja faktora, a i procena kvaliteta fitovanja polinomskih modela se može lako odrediti (Lazić, 2004). Najjednostavniji polinom koji se može primeniti je polinom prvog reda koji u obzir uzima samo linearne uticaje pojedinačnih faktora. Ako se kao krajnji cilj postupka uzme pronalaženje optimalnog rešenja onda je neophodno koristiti polinome drugog reda za opisivanje odabranih odziva (Jokić, 2010).

RSM metoda je korisna kod ispitivanja efekata nekoliko nezavisnih promenjivih na odzivnu veličinu, kod planiranja eksperimenata, izrade modela i određivanja optimalnih vrednosti parametara za opisivanje datog procesa, a njenom primenom se i značajno smanjuju troškovi izvođenja velikog broja eksperimenata. Glavni nedostatak ove metode je nemogućnost dobrog prilagođavanja („fitovanja“) svih sistema polinomu drugog reda (Montgomery, 2005; Bas i Boyaci, 2007).

Izbor adekvatnog eksperimentalnog plana je od velike važnosti pri primeni RSM metode. Najčešće se u istraživanjima koriste sledeći eksperimentalni planovi: centralni kompozitni plan (*engl.* Central Composite Design - CCD), Box-Behnken-ov plan, potpuni faktorijalni plan i dr. (Montgomery, 2005). Zajedničko im je to da su svi definisani po principu ekvivalentne raspodele ulaznih promenjivih oko date nezavisne veličine, a razlikuju se po izboru eksperimentalnih tačaka i broju ponavljanja. Grafički prikaz najčešće korišćenih eksperimentalnih planova baziranih na praćenju tri faktora u tri nivoa dat je na slici 2.10. Nakon izbora eksperimentalnog plana određuje se jednačina modela i regresioni koeficijenti (Bas i Boyaci, 2007).



Slika 2.10. Eksperimentalni planovi bazirani na praćenju tri faktora u tri nivoa: a) kompletan faktorijalni plan, b) Box-Behnken dizajn, c) Centralni kompozitni dizajn (CCD).

Box-Behnken i centralni kompozitni dizajn (CCD) su najčešće korišćeni eksperimentalni planovi koji mogu da fituju polinomske kvadratne modele. Prednost Box-Behnken dizajna u odnosu na centralni kompozitni dizajn je u neophodnosti izvođenja manjeg broja eksperimenata za adekvatno predstavljanje praćenog procesa, što može učiniti postupak ekonomičnijim. Stoga u slučaju tri faktora, Box-Behnken dizajn predviđa 15 eksperimenata, dok je u slučaju CCD potrebno izvršiti 20 ogleda. Box-Behnken eksperimentalni plan zahteva tri nivoa za svaki faktor (kodirane vrednosti: -1, 0, +1) i tri ponavljanja u centralnoj tački (Bezerra i sar., 2008).

Zbog prirode regresione analize preko površina, u određenim slučajevima, moraju se uključiti podaci koji se nalaze izvan eksperimentalnog prostora (kocke) koji formiraju ugaone tačke potpunog faktorijalnog plana sa tri promenjive (slika 2.10.a). Ove spoljne tačke se zovu aksijalne tačke ili tačke „zvezdaste“ strukture (slika 2.10.c). Aksijalne tačke se nalaze na rastojanju α od centralne tačke (najčešće $\alpha = \sqrt{k}$, gde je k broj faktora). Za razliku od Box-Behnken dizajna, broj nivoa kod CCD iznosi pet (kodirane vrednosti: $-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$), usled

dodatnog generisanja ekstermnih vrednosti koje se nalaze van zadatog opsega posmatranog faktora, a ovaj eksperimentalni plan uključuje i šest ponavljanja u centralnoj tački. Prilikom primene CCD mora se razmotriti da li novogenerisane ekstremne vrednosti faktora imaju smisla u konkretnom procesu. Prednost CCD je u tome što eksperimenti obuhvataju vrednosti faktora u uglovima kocke (slika 2.10.c). Box-Behnken predstavlja dizajn rotirajućeg karaktera, koristi srednje vrednosti ivica kocke umesto ugaonih tački (slika 2.10.b) što rezultira manjim brojem oglada u odnosu na CCD. Ugaone tačke predstavljaju regione lošeg kvaliteta predviđanja Box-Behnken dizajna. Nepostojanje eksperimentalnih tačaka u uglovima kocke može bito korisno kada se smatra da bi kombinovana dejstva ekstremnih vrednosti faktora trebalo izbegavati (Bezerra i sar., 2008).

Postoji nekoliko pristupa postupku optimizacije procesa, a jedan od najčešće upotrebljivanih je takozvani koncept željene (tražene) funkcije (*desirability function concept*). Pomenuti pristup se sastoji od transformisanja individualnih odziva Y_n , u individualne željene (tražene) funkcije d_n čije se vrednosti kreću od 0 do 1. Vrednost individualne željene funkcije „0“ predstavlja najlošiju vrednost, dok vrednost „1“ predstavlja najbolju (najpoželjniju) vrednost posmatranog odziva. S obzirom da nemaju svi odzivi jednak značaj u optimizaciji, svakom od njih se dodeljuje prioritet, od kojeg će zavisiti i optimalne vrednosti parametara. Najmanje značajnom odzivu dodeljuje se vrednost prioriteta 1, a najznačajnijem 5 (Costa i sar., 2011). Ukupna željena funkcija (D) jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija. Visoke vrednosti D ukazuju na najpoželjnije vrednosti funkcija koje odgovaraju optimalnom rešenju posmatranog sistema (Jokić, 2010).

Mnogi istraživači su primenili metodu odzivne površine za optimizaciju biotehnoloških procesa, naročito za optimizaciju sastava hranljive podloge, utvrđivanje optimalnih vrednosti procesnih parametara kao što su pH, temperatura i aeracija. S obzirom da je primenom RSM moguće posmatrati istovremeno međusobne uticaje više nezavisnih parametara na odziv, ova metoda je naročito korisna za biotehnološke procese kod kojih su međusobni uticaju parametara izraženiji (sinergističko, antagonističko dejstvo itd.) (Bas i Boyaci, 2007). Metoda odzivne površine funkcije primenjivana je za utvrđivanje uticaja uslova fermentacije (temperature, pH i veličine inokuluma) na hemijske karakteristike (sadržaj etanola, glicerola i isparljivih kiselina) vina od manga (Kumar i sar., 2009). Torchio i sar. (2011) su primenili centralni kompozitni eksperimentalni plan za ispitivanje uticaja starenja na hromatske karakteristike i fenolni sastav crvenih penušavih vina.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

Eksperimentalni deo ove disertacije najvećim delom realizovan je u laboratorijama Katedre za biotehnologiju i farmaceutsko inženjerstvo, Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Deo istraživanja je urađen u laboratorijama Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Agronomskog fakulteta u Čačku (Univerzitet u Kragujevcu), kao u laboratoriji Promont destilerije u Novom Sadu. U sklopu disertacije ispitan je mehanički i fizičko-hemijski sastav tri sorte domaće šljive, različitih epoha sazrevanja, u cilju ocene mogućnosti njihove upotrebe kao sirovina za proizvodnju voćnog vina. Vršena je optimizacija uslova alkoholne fermentacije (temperature, vrednosti pH, trajanja fermentacije i doze enzimskog preparata), u sklopu koje je, takođe, ispitana i upotreba različitih pektolitičkih enzima za tretman kljuka, efekat učestalosti mešanja kljuka tokom fermentacije i ocenjen uticaj upotrebe različitih sojeva kvasaca, kao proizvodnih mikroorganizama, na kvalitet vina od šljive. Karakterizacija proizvedenog vina od šljive podrazumevala je određivanje sadržaja najvažnijih sastojaka: alkohola, kiselina, mineralnih materija, fenolnih i aromatičnih jedinjenja, kao i ocenu njegovih funkcionalnih karakteristika (antiradikalske, antimikrobne i antiproliferativne aktivnosti). Takođe, ispitan je efekat dodatka koštica u kljuk tokom fermentacije i uticaj starenja na kvalitet vina. Na kraju, ocenjena je mogućnost smanjenja produkcije metanola u vinu od šljive primenom različitih fizičko-hemijskih tretmana kljuka.

3.1. Sirovine

3.1.1. Šljive

U ovoj doktorskoj disertaciji su, kao sirovina, korištene tri sorte domaće šljive različitih epoha sazrevanja: Čačanska rana, Čačanska lepotica i Požegača. One predstavljaju jedne od najzastupljenijih i najkvalitetnijih sorti šljive koje se gaje u Republici Srbiji. Šljive su nabavljene od lokalnih, registrovanih poljoprivrednih proizvođača iz Vrdnika (Čačanska lepotica), Čalme (Čačanska rana) i Slankamena (Požegača). U pojedinim delovima disertacije upotrebljene su šljive sa različitih mikrolokaliteta (I, II i III). Autentičnost pojedinačnih sorti garantovana je potvrdama proizvođača sadnog materijala. Berba šljiva je obavljena u fazi tehnološke zrelosti, pa je tako sorta Čačanska rana brana krajem jula meseca, Čačanska lepotica sredinom avgusta, a Požegača u prvoj polovini septembra. Plodovi šljive su prerađivani i korišćeni za vinifikaciju neposredno nakon berbe, u svežem stanju.

Reprezentativnost uzoraka šljive (sve tri sorte) koji su korišćeni za mikrovinifikacije u različitim fazama disertacije obezbeđena je homogenizacijom celokupne količine kljuka dobijenog nakon mlevenja plodova bez koštica.

U cilju određivanja karakteristika upotrebljenih plodova šljive ispitan je njihov mehanički sastav i hemijski. Pod mehaničkim sastavom šljive podrazumeva se količina pojedinih sastavnih delova ploda (pokožice, mesa i koštice), izražena kao maseni udeo u procentima. Određivana je prosečna težina plodova različitih sorti šljive i izražavana kao srednja vrednost merenja deset nasumičnih uzoraka. Merenja su izvršena na elektonskoj tehničkoj vagi. Period u kome je

analiziran mehanički i hemijski sastav plodova šljive je tri godine (berbe 2011, 2012 i 2013). Vrednosti parametara mehaničkog i hemijskog sastava plodova ispitivanih sorti šljive iskazani su kao srednje vrednosti rezultata dobijenih tokom tri uzastopne berbe.

3.2. Optimizacija uslova alkoholne fermentacije vina od šljive

3.2.1. Enzimski tretman kljuka od šljiva

Različiti komercijalni pektolitički enzimi namenjeni primeni u vinskoj industriji korišteni su za tretman kljuka od šljiva kako bi se procenio njihov uticaj na parametre procesa proizvodnje i kvaliteta vina. Iznad svega pažnja je bila usmerena ka ispitivanju efekata primene enzima na prinos vina, efikasnost bistrenja, ekstartkciju fenolnih materija, produkciju etanola i metanola. Količine enzima koje su primenjene u eksperimentima bile su u skladu sa upustvima proizvođača (tabela 3.1.).

Tabela 3.1. Pektolitički enzimi korišteni za tretman kljuka od šljiva

Oznaka	Enzim	Doza	Proizvođač
E ₁	Lallzyme EX-V	2 g/100 kg	Lallemand, St. Simon, Francuska
E ₂	Lallzyme Cuvee Blanc	2 g/100 kg	Lallemand, St. Simon, Francuska
E ₃	Trenolin Color DF	2 g/100 kg	Erbslöh, Geisenheim, Nemačka
E ₄	Trenolin Frio DF	2 ml/100 kg	Erbslöh, Geisenheim, Nemačka
E ₅	Enartis zym balance	2 g/100 kg	Enartis, Novara, Italija

Eksperimenti čiji je cilj bio ispitivanje primene različitih pektolitičkih enzima u proizvodnji vina od šljiva podrazumevali su mikroviniifikacije u količini od 200 g kljuka po ogledu. Plodovi šljive sorte Čačanska lepotica su nakon pranja i uklanjanja koštica podvrgnuti mlevenju u laboratorijskom blenderu. Dobijeni kljuk je sulfitisan kalijum-metabisulfitom (50 mg SO₂/kg kljuka) u cilju sprečavanja oksidacije i neželjene mikrobiološke kontaminacije. Pojedinačni uzorci kljuka su nakon toga tretirani sa po jednim pektolitičkim enzimom čije je dejstvo ispitivano (tabela 3.1.). Kvasac *S. cerevisiae* (Spiriferm, Erbslöh, Geisenheim, Germany), prethodno rehidriran prema uputstvu proizvođača (20 min na 37 °C), inokuliran je u količini od 0,25 g/kg. Maceracija je izvršena na klasičan način i trajala je pet dana na temperaturi 27 °C. Tokom maceracije mešanje kljuka je vršeno dva puta na dan. Po završetku faze maceracije kljuk je isceden pomoću sterilne gaze, a dobijeno vino je pretočeno u staklene boce. Nakon završetka faze tihog doviranja i taloženja grubog taloga, vino je otočeno i analizirano.

Kao kontrolni uzorak korišteno je voćno vino proizvedeno po opisanom postupku, ali bez primene pektolitičkih enzima (K).

3.2.2. Efekat učestalosti mešanja kljuka tokom fermentacije

Uticao mešanja kljuka tj. kvašenja i potapanja klobuka je ispitan putem dve serije mikrovinifikacija, sa i bez dodatka pektolitičkog enzima. U svakoj od dve serije ogleđa mešanje kljuka je obavljano na tri načina koje karakteriše različita frekventnost. Mešanje tečne i čvrste faze ostvareno je potapanjem klobuka mehanički tj. potiskivanjem. Ogleđi su postavljeni na sledeći način:

bez upotrebe pektolitičkog enzima

V₁ – jedno mešanje nakon 48 h od početka fermentacije

V₂ – mešanje jedan put na dan

V₃ – mešanje dva puta na dan

upotreba pektolitičkog enzima

V₄ – jedno mešanje nakon 48 h od početka fermentacije

V₅ – mešanje jedan put na dan

V₆ – mešanje dva puta na dan

Mikrovinifikacija je vršena u količini od po 200 g kljuka po postavljenom ogleđu, a prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. Korišteni su plodovi šljive sorte Čačanska leptotica, pektolitički enzim Lallzyme EX-V, u količini od 2 g/100 kg kljuka i kvasac *S. cerevisiae* (Spirifer, Erbslöh, Geisenheim, Germany) u količini od 0,25g/kg.

3.2.3. Proizvodni mikroorganizmi i alkoholna fermentacija

Najznačajniji kvasci u procesu proizvodnje vina pripadaju rodu *Saccharomyces* (pre svih *S. cerevisiae* i *S. bayanus*), ali se poslednjih godina sve veća pažnja posvećuje i njihovoj kombinovanoj primeni sa ne-*Saccharomyces* kvascima (*Hanseniaspora (Kloeckera)*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces* i *Issatchenkia*) usled potencijalnog pozitivnog doprinosa karakteru i kvalitetu vina. Komercijalno dostupni sojevi vinskih kvasaca značajno se razlikuju u pogledu svojih karakteristika: (i) tolerantnost prema različitim temperaturama, vrednostima pH, sadržaju šećera i etanola, (ii) brzina rasta, prinosa i stabilnost, (iii) sposobnost flokulacije, (iv) produkcija inhibitora i rezistentnost na različite inhibitorne faktore, (v) enzimska aktivnost. Upotrebom različitih *Saccharomyces* i ne-*Saccharomyces* sojeva u fermentaciji dobijaju se vina različitog aromatskog profila koji zavisi od sastava i sadržaja velikog broja isparljivih materija.

U cilju ispitivanja mogućnost primene različitih proizvodnih mikroorganizama (kvasaca) u procesu proizvodnje vina od šljive, i ocenjivanju njihovog uticaja na karakteristike fermentacije i aromatski profil proizvedenih vina, primenjeno je pet komercijalno dostupnih sojeva kvasaca:

- Alchemy I (Anchor Yeast, Johannesburg, Južana Afrika) – *S. cerevisiae*
- Spirifer (Erbslöh, Geisenheim, Nemačka) – *S. cerevisiae*

- Spiriferm Arom (Erbslöh, Geisenheim, Nemačka) – *S. bayanus*
- Oenoferm PinoType (Erbslöh, Geisenheim, Nemačka) – *S. cerevisiae*
- Oenoferm Freddo (Erbslöh, Geisenheim, Nemačka) – *S. bayanus*
- *Schizosaccharomyces pombe* (Zbirka kultura Tehnološkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu) + *S. cerevisiae* (Spiriferm, inokulacija nakon 3 dana).

U eksperimentu su korišteni plodovi šljive sorte Čačanska lepotica koji su podvrgnuti mlevenju u laboratorijskom blenderu. Nakon pranja i usitnjavanja šljiva, dobijeni kljuk je tretiran kalijum-metabisulfitom (50 mg SO₂/kg kljuka) i komercijalnim pektolitičkim enzimom Lallzyme EX-V, u količini od 2 g/100 kg kljuka. Mikrovinifikacija je vršena u količini od po 2 kg kljuka po svakom pojedinačnom ogledu. Rehidratacija (aktivacija) komercijalnih kvasca izvršena je prema uputstvu proizvođača, nakon čega su inokulirani u količini od 0,25 g/kg. U slučaju fermentacije sa *Schizosaccharomyces pombe* za inokulaciju je korištena količina pripremljene suspenzije kvasca koja je obezbedila populaciju od 10⁶ cfu/ml upotrebljene količine kljuka na početku fermentacije.

Maceracija i ceđenje kljuka nakon završetka fermentacije izvršeni su prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. Nakon završetka faze tihog doviranja i taloženja grubog taloga, vino je otočeno, razliveno u staklene boce zapremine 0,5 l i zatvoreno krunskim zatvaračima. Vina su čuvana na temperaturi od oko 10 °C do analize isparljivih materija.

Kao kontrolni uzorak (K) korišteno je voćno vino proizvedeno po opisanom postupku, s tim što je na početku procesa prerade izostavljeno pranje plodova, a alkoholna fermentacija je izvršena aktivnošću autohtonih kvasaca prisutnih na pokožici plodova šljive (spontana fermentacija).

3.2.4. Preliminarni skrining uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljive

Za statističku obradu eksperimentalnih podataka i optimizaciju praćenih procesa upotrebljeni su softverski paketi STATISTICA 10.0 (StatSoft, SAD) i DESIGN-EXPERT 8.1 (StatEase, probna verzija, SAD). Značajnost uticaja pojedinačnih faktora i njihovih interakcija, kao i značajnost samih dobijenih modela, utvrđena je analizom varijanse (ANOVA) pomoću njihovih *F-vrednosti* (Fišerov F test) i *p-vrednosti*, pri stepenu značajnosti $\alpha=0,05$. Procenat ukupnih varijacija koje se mogu objasniti empirijskim modelom (adekvatnost fitovanja i pogodnost modela) opisan je pomoću koeficijenta determinacije (R²). Smatra se da je poklapanje eksperimentalnih podataka sa predloženim modelom dobro ukoliko R² prelazi vrednost 0,80 (Lazić, 2004).

Preliminarno ispitivanje uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljive izvedeno je primenom metode odzivne površine funkcije i centralnog kompozitnog eksperimentalnog plana (CCD) sa tri nezavisne promenljive, temperatura fermentacije (X₁), vreme fermentacije (X₂) i pH (X₃). Na osnovu primenjenog eksperimentalnog plana za tri nezavisne promenljive u tri nivoa i sa šest ponavljanja u centralnoj tački (n₀ = 6) došlo se do ukupnog broja od dvadeset eksperimenata.

Vrednosti nivoa ispitivanih faktora alkoholne fermentacije dati su u tabeli 3.2. Parametri kvaliteta vina koji su praćeni tokom fermentacije su sadržaj etanola, metanola i glicerola. Površine odziva crtane su tako što su dva parametra varirana dok je jedan održavan na konstantnoj vrednosti iz centra plana.

Tabela 3.2. Vrednosti nivoa ispitivanih faktora alkoholne fermentacije

Faktor	Simbol	Nivoi ispitivanih faktora		
		-1 (nizak nivo)	0 (srednji nivo)	+1 (visok nivo)
Temperatura (°C)	X ₁	15	20	25
Vreme fermentacije (dan)	X ₂	3	5	7
pH	X ₃	3,0	3,3	3,6

Dobijene vrednosti praćenih parametara fermentacije korišćene su za fitovanje modela predstavljenih polinomom drugog reda, koji će služiti za računanje potencijanih vrednosti ispitivanih parametara kvaliteta vina u zavisnosti od uslova fermentacije (nezavisnih promenljivih sistema):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{23}X_2X_3 + b_{13}X_1X_3$$

gde su:

- Y – odzivna funkcija,
- X₁₋₃ – procesni parametri,
- b₀ – odsečak,
- b₁, b₂ i b₃ – linearni koeficijenti,
- b₁₁, b₂₂ i b₃₃ – kvadratni koeficijenti i
- b₁₂, b₂₃ i b₁₃ – koeficijenti interakcije.

Mikroviniifikacija je vršena u količini od po 1 kg kljuka po postavljenom ogledu, a prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. Korišćeni su plodovi šljive sorte Čačanska leptotica obrani sredinom avgusta 2012. godine. Kljuk je tretiran pektolitičkim enzimom Lallzyme EX-V, u količini od 0,02 g/ kg kljuka a kvasac *S. cerevisiae* (Spiriferm, Erbslöh, Geisenheim, Germany) je dodat u količini od 0,25g/kg.

3.2.5. Postupak optimizacije

Na osnovu rezultata preliminarnog skrininga alkoholne fermentacije vina od šljive pristupilo se optimizaciji procesa radi utvrđivanja najpogodnijih uslova fermentacije i količine upotrebljenih pektolitičkih enzima. U eksperimentima su korištene tri sorte domaće šljive različitih epoha sazrevanja: Čačanska rana, Čačanska leptotica i Požegača. Berba tehnološki zrelih plodova obavljena je u periodu avgust-septembar 2013. godine.

U ovoj fazi istraživanja korišten je Box-Behnkenov eksperimentalni plan sa tri faktora na tri nivoa i sa pet ponavljanja u centralnoj tački ($n_0=5$). Eksperimentalni plan je na ovaj način podrazumevao ukupan broj od 17 nezavisnih ogleda (mikrovinifikacija). Nezavisne promenjive u predloženom sistemu bile su: temperatura (X_1), pH (X_2) i doza pektolitičkog enzima (X_3) (tabela 3.3.). Izbor nivoa za vrednost pH kljuka u eksperimentalnom planu zavisio je od stvarne vrednosti pH kljuka primenjenih sorti domaće šljive. Vrednost pH kljuka podešavana je pomoću rastvora jabučne, limunske i vinske kiseline (1:1:0.5) i Ca_2CO_3 . Odabrane doze pektolitičkog enzima bile su u opsegu preporučenom od strane proizvođača. Mikrovinifikacija je vršena u količini od po 1 kg kljuka po postavljenom ogledu, a prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. U eksperimentima korišten je pektolitički enzim Lallzyme EX-V i kvasac *S. cerevisiae* (Spiriferm, Erbslöh, Geisenheim, Germany) u količini od 0,25g/kg.

Sadržaj etanola, metanola i glicerola i prinos vina predstavljaju odzive ispitivanog sistema čije su vrednosti određivane po završetku fermentacije. Vrednosti odziva fermentacije korištene su za dobijanje modela koji reprezentuju zavisnosti odzivne funkcije od ispitivanih ulaznih veličina (poglavlje 3.2.4).

Tabela 3.3. Vrednosti nivoa posmatranih ulaznih promenljivih

Faktor	Simbol	Nivoi ispitivanih faktora		
		-1 (nizak nivo)	0 (srednji nivo)	+1 (visok nivo)
Temperatura (°C)	X_1	16	23	30
pH*	X_2	3,5	4,0	4,5
Doza enzima (g/100kg)	X_3	0	1	2

*nivoi vrednosti pH u slučaju sorte Požegača bili su: 3,6, 4,1 i 4,6;

3.3. Efekat dodatka koštica šljive u kljuk tokom fermentacije vina

Ispitivanje uticaja dodatka različitih količina koštica šljive u kljuk tokom fermentacije na neke od pokazatelja kvaliteta i prihvatljivosti (sadržaj etanola, metanola, cijanovodonične kiseline i benzaldehida) proizvedenih vina podrazumevalo je seriju mikrovinifikacija (K_{0-4} , tabela 3.4.). Koštice su u kljuk dodavane u delimično usitnjenom obliku. Korišteni su plodovi sorte Čačanska leptotica. Svaka mikrovinifikacija izvedena je sa po 250 g kljuka. Postupak primarne prerade plodova šljive opisan je u poglavlju 3.2.1.

Kao parametri fermentacije (temperatura, pH, doza pektolitičkog enzima) primenjene su vrednosti dobijene postupkom optimizacije (poglavlje 3.2.5.). U ogledima su upotrebljavani pektolitički enzim Lallzyme EX-V i kvasac *S. cerevisiae* (Spiriferm, Erbslöh, Geisenheim, Germany) u količini od 0,25g/kg kljuka. Maceracija, ceđenje kljuka nakon završetka fermentacije i pretakanje vina izvršeni su prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1.

Tabela 3.4. Količina koštica dodavana u kljuk tokom mikrovinifikacija

Mikrovinifikacija	Količina koštica (%) [*]
K ₀	0
K ₁	25
K ₂	50
K ₃	100
K ₄	200

^{*} količina dodatih koštica predstavlja udeo ukupne mase koštica odvojenih kod dobijanja 250 g kljuka

3.4. Smanjenje produkcije metanola u vinu od šljive

U cilju pronalaženja najefikasnijeg postupka za smanjenje produkcije metanola u vinu od šljiva ispitana je upotreba različitih fizičko-hemijskih tretmana tokom primarne prerade voća i alkoholne fermentacije. Ispitivanja u ovom delu disertacije podrazumevala su mikrovinifikacije u količini od po 200 g kljuka po pojedinačnom ogledu. Za parametre fermentacije (temperatura, pH, doza pektolitičkog enzima) uzete su vrednosti dobijene postupkom optimizacije (poglavlje 3.2.5.). Korišteni su plodovi šljive sorte Čačanska lepotica, pektolitički enzim Lallzyme EX-V i kvasac *S. cerevisiae* (Spiriferm, Erbslöh, Geisenheim, Germany) u količini od 0,25g/kg kljuka. Ispitivani tretmani kljuka prethodili su inokulaciji kvasca i početku fermentacije. Kao kontrolni uzorak (K) korišteno je vino od šljive koje nije podvrgavano postupcima za smanjenje sadržaja metanola.

U skladu sa literaturnim podacima, a u cilju pronalaženja mogućeg postupka ili tretmana za smanjenje produkcije metanola, primenjeni su sledeći postupci i sredstva: dodatak tanina u kljuk, dodatak fenolnih kiselina, dodatak D-galakturonske i pektinske kiseline, upotreba bentonita i zeolita, termički tretman kljuka, kombinovani termički i ultrazvučni tretman, kao i tretman kljuka mikrotalasima.

Primena tanina:

- T₁ – Gran Tanni - B (Essedielle, Ortona, Italija), količina 10 g/hl
- T₂ – Gran Tanni – B (Essedielle, Ortona, Italija), količina 20 g/hl
- T₃ – Tanni White (Essedielle, Ortona, Italija), količina 10 g/hl
- T₄ – Tanni White (Essedielle, Ortona, Italija), količina 20 g/hl
- T₅ – Gran-Tannics (Essedielle, Ortona, Italija), količina 10 g/hl
- T₆ – Gran-Tannics (Essedielle, Ortona, Italija), količina 20 g/hl

Eksperimentalnim planom predviđena količina tanina, rastvorena u manjoj količini vode, dodata je u odmerenu količinu kljuka koja je potom homogenizovana mešanjem. **Gran Tanni - B** je enološko sredstvo koje čini smeša tanina ekstrahovanih iz mahune *Caesalpinia spinosa* (Tara), leguminoze koja potiče iz Južne Amerike, šišarke *Quercus infectoria* iz Turske i drveta domaćeg kestena *Castanea sativa*, veoma zastupljenog u Evropi. Predstavlja balansiranu kombinaciju galotanina i elagitanina. Koristi se najviše za stabilizaciju i bistrenje belih i roze vina, često u

kombinaciji sa želatinom. Taninska kiselina čini preko 92% ukupnog sastava preparata. **Tanni White** poseduje kompleksnu taninsku strukturu, a ekstrahovan je iz drveta mimoze (*Acacia molissima*) uzgajanog na specijalnim plantažama u Južnoj Africi. Taninska kiselina čini preko 75% ukupnog sastava ovog enološkog sredstva. Poseduje značajan precipitacioni potencijal ka proteinima vina. **Gran-Tannics** je enološki tanin dobijen ekstrakcijom iz drveta Querbacho (*Schinopsis lorenzii*) koje raste spontano u Južnoj Americi. Ovaj tanin predstavlja kondenzovani tip tanina (proantocijanidoli). Preporučuje se u preradi nedovoljno zrelog grožđa i grožđa zahvaćenog sivom plesni (*Botrytis cinerea*) jer u određenoj meri inaktivira tirozinazu grožđa i lakazu sive plesni.

Primena fenolnih kiselina:

- F₁ – Protokatehinska kiselina (Fluka AG, St. Gallen, Švajcarska), količina 5 mg/kg
- F₂ – Protokatehinska kiselina (Fluka AG, St. Gallen, Švajcarska), količina 15 mg/kg
- F₃ – Protokatehinska kiselina (Fluka AG, St. Gallen, Švajcarska), količina 30 mg/kg
- F₄ – Galna kiselina (Fluka AG, St. Gallen, Švajcarska), količina 5 mg/kg
- F₅ – Galna kiselina (Fluka AG, St. Gallen, Švajcarska), količina 15 mg/kg
- F₆ – Galna kiselina (Fluka AG, St. Gallen, Švajcarska), količina 30 mg/kg

Ekperimentalnim planom predviđena količina fenolne kiseline, rastvorena u manjoj količini vode, dodata je u odmerenu količinu kljuka koja je potom homogenizovana mešanjem.

Primena D-galakturonske i pektinske kiseline:

- P₁ – D-galakturonska kiselina (Fluka AG, St. Gallen, Švajcarska), količina 3 g/kg
- P₂ – D-galakturonska kiselina (Fluka AG, St. Gallen, Švajcarska), količina 7 g/kg
- P₃ – D-galakturonska kiselina (Fluka AG, St. Gallen, Švajcarska), količina 15 g/kg
- P₄ – Pektinska kiselina (Fluka AG, St. Gallen, Švajcarska), količina 3 g/kg
- P₅ – Pektinska kiselina (Fluka AG, St. Gallen, Švajcarska), količina 7 g/kg
- P₆ – Pektinska kiselina (Fluka AG, St. Gallen, Švajcarska), količina 15 g/kg

Ekperimentalnim planom predviđena količina kiseline, rastvorena u manjoj količini vode, dodata je u odmerenu količinu kljuka koja je potom homogenizovana mešanjem.

Primena bentonita i zeolita:

- B₁ – Bentonit (NaCalit, Erbslöh, Nemačka), količina 50 g/100kg
- B₂ – Bentonit (NaCalit, Erbslöh, Nemačka), količina 100 g/100kg
- B₃ – Bentonit (NaCalit, Erbslöh, Nemačka), količina 150 g/100kg
- B₄ – Zeolit (Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Beograd, Srbija), količina 50 g/100kg
- B₅ – Zeolit (Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Beograd, Srbija), količina 100 g/100kg
- B₆ – Zeolit (Institut za tehnologiju nuklearnih i drugih mineralnih sirovina, Beograd, Srbija), količina 150 g/100kg

U eksperimentima su korištene 5% suspenzije bentonita i zeolita pripremljene po standardnom enološkom postupku (Jazić i Ružić, 1982).

Termički tretman kljuka:

U ovom delu ogleđa ispitan je uticaj temperature i trajanja termičkog tretmana na produkciju metanola tokom fermentacije vina od šljive.

H₁ – termički tretman kljuka na temperaturi 50 °C tokom 20 min

H₂ – termički tretman kljuka na temperaturi 50 °C tokom 40 min

H₃ – termički tretman kljuka na temperaturi 60 °C tokom 10 min

H₄ – termički tretman kljuka na temperaturi 60 °C tokom 20 min

H₅ – termički tretman kljuka na temperaturi 70 °C tokom 5 min

H₆ – termički tretman kljuka na temperaturi 70 °C tokom 10 min

H₇ – termički tretman kljuka na temperaturi 80 °C tokom 3 min

H₈ – termički tretman kljuka na temperaturi 80 °C tokom 6 min

Termički tretman uzoraka kljuka izveden je u vodenom kupatilu, a neposredno nakon isteka planom predviđenog vremena uzorci su hlađeni u ledenom kupatilu na sobnu temperaturu i potom inokulisani kvascem *S. cerevisiae*.

Kombinovani efekat toplote i ultrazvuka:

U₁ – tretman ultrazvučnim talasima na temperaturi 25 °C tokom 15 min

U₂ – tretman ultrazvučnim talasima na temperaturi 40 °C tokom 5 min

U₃ – tretman ultrazvučnim talasima na temperaturi 40 °C tokom 15 min

U₄ – tretman ultrazvučnim talasima na temperaturi 50 °C tokom 5 min

U₅ – tretman ultrazvučnim talasima na temperaturi 50 °C tokom 15 min

U₆ – tretman ultrazvučnim talasima na temperaturi 60 °C tokom 5 min

U₇ – tretman ultrazvučnim talasima na temperaturi 60 °C tokom 15 min

U₈ – tretman ultrazvučnim talasima na temperaturi 70 °C tokom 5 min

U eksperimentima je korišteno ultrazvučno kupatilo (EUP540A, Euinstruments, France) pri frekvenciji od 20 kHz i amplitudi od 65 μm. Uzorci su tokom tretmana bili smešteni u staklene čaše od 250 ml. Nakon tretmana uzorci su hlađeni u ledenom kupatilu.

Primena mikrotalasa:

M₁ – mikrotalasno zračenje do temperature 45 °C tokom 3 min

M₂ – mikrotalasno zračenje do temperature 60 °C tokom 4 min

M₃ – mikrotalasno zračenje do temperature 65 °C tokom 2 min

M₄ – mikrotalasno zračenje do temperature 70 °C tokom 1 min

M₅ – mikrotalasno zračenje do temperature 70 °C tokom 3 min

M₆ – mikrotalasno zračenje do temperature 85 °C tokom 1 min

U eksperimentima je korištena laboratorijska mikrotalasna pećnica (FOX M720) izlazne snage od 700 W i frekvencije talasa 2450 MHz. Uzorci su tokom tretmana bili smešteni u staklene čaše od 250 ml. Temperature prikazane u planu oglada izmerene su nakon isteka zadatog vremena (1-4 min) izlaganja uzoraka kljuka šljive određenim režimima rada mikrotalasne pećnice zasnovanim na emitovanju različite energije mikrotalasnog zračenja. Nakon tretmana uzorci su hlađeni u ledenom kupatilu.

Inaktivacija PME šljive

S obzirom da optimizovani postupak alkoholne fermentacije podrazumeva dodatak komercijalnog pektolitičkog enzima, postavljena je i dodatna serija oglada u kojoj je ispitano dejstvo opisanih postupaka za smanjenje produkcije metanola u vinu na aktivnost PME prirodno prisutne u šljivi. Dodatak pektolitičkog enzima u kljuk je, iz tog razloga, u ovom slučaju izostavljen. Kao kontrolni uzorak (K) korišteno je vino od šljive koje nije podvrgavano postupcima za smanjenje produkcije metanola, proizvedeno bez dodatka pektolitičkog enzima. Ostale varijante oglada podrazumevale su obradu kljuka primenom enoloških sredstava i fizičkih tretmana prema sledećoj šemi:

- L₁ – Gran-Tannics, količina 10 g/hl
- L₂ – Gran-Tannics, količina 20 g/hl
- L₃ – Gran Tanni - B, količina 20 g/hl
- L₄ – Bentonit, količina 100 g/100kg
- L₅ – Zeolit, količina 100 g/100kg
- L₆ – Ultrazvuk, 25 °C tokom 15 min
- L₇ – Ultrazvuk, 60 °C tokom 5 min
- L₈ – Ultrazvuk, 60 °C tokom 15 min
- L₉ – Mikrotalasi, 60 °C tokom 4 min
- L₁₀ – Mikrotalasi, 70 °C tokom 1 min
- L₁₁ – Temperatura, 60 °C tokom 10 min
- L₁₂ – Temperatura, 80 °C tokom 3 min

3.5. Analitički postupci

Sadržaj vode, suve materije i pepela u uzorcima šljive

Voda je najzastupljeniji sastojak svakog voća, pa tako i šljive. Sadržaj vode u plodu (ili odmerenoj masi) šljive određen je klasičnom gravimetrijskom metodom tj. sušenjem uzoraka u električnoj sušnici sa automatskom regulacijom temperature i cirkulacijom vazduha, na temperaturi od 105 °C, do konstantne mase. Maseni udeo vode i suve materije izražen je preko sledećih jednačina:

$$\text{maseni udeo vode (\%)} = \frac{a-b}{c} \cdot 100$$

$$\text{sadržaj suve materije (\%)} = 100 - \text{sadržaj vode (\%)}$$

a – masa posude sa uzorkom pre sušenja (g)

b – masa posude sa uzorkom posle sušenja (g)

c – masa odmerene količine uzorka (g)

Pepeo čine mineralne materije koje ostaju posle isparavanja vode i sagorevanja suve materije u uzorku. Sagorevanje uzorka ploda šljive poznate mase, odmerenog u platinsku šolju, vrši se u peći za žarenje, na 500-550 °C, do potpunog sagorevanja ugljenika (Jazić i Ružić, 1982; OIV, 2013).

Određivanje sadržaja šećera u soku od šljive

Sadržaj šećera u soku određen je pomoću ručnog refraktometra (Jacobson, 2006). Ručni refraktometar je optički instrument čiji se rad zasniva na merenju veličine ugla pod kojim se svetlost prelama pri prolasku kroz sloj tečnosti. Ugao prelamanja svetlosti zavisi od gustine soka, odn. količine šećera. U vidnom polju se nalazi skala po Oechle-u na kojoj se sadržaj šećera očitava izražen u Oechle-ovim stepenima (°Oe). Radi lakšeg praćenja, očitane vrednosti sadržaja šećera preračunate su u procenete (% m/v), po obrascu:

$$\% \text{ šećera (m/v)} = 0,266 \cdot \text{°Oe} - 4$$

Sadržaj pektinskih materija u šljivi

Količina pektinskih materija u šljivi određena je kolorimetrijski kao ukupni pektin, s obzirom da proizvodi termičke razgradnje galakturonske kiseline sa 3-fenilfenolom (meta-hidroksidifenil), u prisustvu koncentrovane sumporne kiseline, grade karakterističan bojeni kompleks (List i sar., 1985). Dobijene vrednosti izražene su u gramima galakturonske kiseline po kilogramu svežeg ploda šljive bez koštice.

Spektrofotometrijska merenja vršena su na UV/VIS spektrofotometru T80+ (PG Instruments, Hinckley, England).

Priprema uzorka

Uzorci su pripremljeni po postupku koji je opisao Jović (1991). Odmereno je 3-15 g samlevenog uzorka voća u kivetu za centrifugiranje zapremine 50 ml i dodato 30-40 ml 96%-tnog etanola zagrejanog na 75 °C. Kiveta je temperirana u vodenom kupatilu na temperaturi od 85 °C, uz povremeno mešanje sadržaja staklenim štapićem. Kiveta je potom centrifugirana 10 min na 4000 o/min, alkohol pažljivo dekantiran, a ostatak dva puta ispran sa 63%-tnim etanolom uz zagrevanje na vodenom kupatilu (85 °C) i centrifugiranje. Ostatak nakon drugog ispiranja, centrifugiranja i dekantiranja služio je za određivanje ukupnih pektinskih materija. Istaloženi

ostatak kvantitativno je prenet sa destilovanom vodom u normalni sud od 100 ml, dodato je 5 ml 1M NaOH, te je sud dopunjen destilovanom vodom do marke, promućkan i ostavljen da stoji najmanje 15 min. Nakon filtriranja, dobijeni filtrat je korišten za kolorimetrijsko određivanje ukupnih pektinskih materija.

Postupak određivanja

Postupak određivanja podrazumeva neznatno modifikovanu metodu opisanu u radu autora List i sar. (1985). Za konstruisanje kalibracione krive korišteni su rastvori galakturonske kiseline koncentracija 20, 40, 60, 80 i 100 mg/l. Za svaki uzorak ili standardni rastvor korištene su po tri epruvete (dve za uzorak (dva ponavljanja) i jedna za slepu probu). Odpipetirano je po 1 ml uzorka ili standardnog rastvora u svaku od tri epruvete koje se nalaze u ledenom kupatilu, nakon toga u epruvete je dodato 6 ml rastvora natrijum-tetraborata u sumpornoj kiselini (0,0125M rastvor), rastvor je homogenizovan i potom zagrevan 6 min na ključalom vodenom kupatilu. Nakon hlađenja u ledenom kupatilu, dodato je 100 µl rastvora 3-fenilfenola (0,15% rastvor u 0,5% NaOH) u dve epruvete i dobro promešano kako bi se formirao obojeni kompleks. U treću epruvetu, koja predstavlja slepu probu, umesto 3-fenilfenola dodato je 100 µl 0,5% rastvora NaOH. Nakon 15-20 min trajanja reakcije na sobnoj temperaturi, izmerena je apsorbancija na 520 nm. Finalna apsorbancija usled dodatka 3-fenilfenola dobija se oduzimanjem očitane apsorbancije za slepu probu od apsorbancije uzorka. Sadržaj pektinskih materija je potom dobijen interpolacijom dobijenih apsorbancija na kalibracionu krivu.

Određivanje stepena esterifikacije pektina šljive

Stepen esterifikacije odnosno metoksilacije pektina (SE) u ispitivanim uzorcima sorti domaće šljive određen je prema metodi opisanoj u radu autora Hou i sar. (2008). Za izračunavanje stepena esterifikacije korištena je sledeća jednačina:

$$SE (\%) = \frac{M \cdot 31 \cdot 100}{P \cdot 32 \cdot 16,32}$$

gde je M – sadržaj metanola, P – sadržaj pektina.

Vrednost pH

Vrednost pH uzoraka soka i vina od šljive određena je elektronskim multiparametarskim analizatorom Consort C860 (Consort, Belgija), uz dvostruku kalibraciju na pH 4 i pH 7.

Sadržaj ukupnih kiselina u kljuku i vinu od šljive

Sadržaj ukupnih kiselina određen je volumetrijski, potenciometrijskom titracijom sa rastvorom natrijum-hidroksida (0,1 M) (OIV, 2013). Sadržaj ukupnih kiselina izražen je u g/l, kao jabučna kiselina.

Izračunavanje:

Sadržaj ukupnih kiselina u širi (g/l), preračunat na jabučnu kiselinu, po obrascu:

$$\text{ukupne kiseline (g/l)} = V (\text{NaOH}) \cdot F (\text{NaOH}) \cdot 0,66$$

gde je:

- V (NaOH) - utrošak rastvora natrijum-hidroksida za titraciju, izražen u ml,
- F (NaOH) - faktor molariteta rastvora natrijum-hidroksida,
- 0,66 - faktor koji se izvodi iz mase jabučne kiseline koja reaguje sa 1 ml korišćenog rastvora natrijum-hidroksida i zapremine šire ili vina koja se titriše. Sa 1 ml rastvora natrijum-hidroksida, koncentracije 0,1 M, reaguje 0,0066 g jabučne kiseline.

Sadržaj glicerola, jabučne i limunske kiseline

U uzorcima soka i vina od šljive sadržaj glicerola, jabučne i limunske kiseline određen je enzimskim metodama (OIV, 2013) uz upotrebu komercijalnih enzimskih testova (Megazyme, CO, Wicklow, Republika Irska).

Sadržaj slobodnog i ukupnog ukupnog sumpor-dioksida

Sadržaj slobodnog i ukupnog sumpor-dioksida određen je jodometrijskom titracijom (OIV, 2013). Prvo je jodometrijskom titracijom određen slobodni sumpor-dioksid. Nakon dvostruke alkalne hidrolize, jodometrijski je određen vezani sumpor-dioksid. Pošto jod oksidiše i druge materije iz vina, u istom uzorku vina potrebno je izvršiti korektivnu titraciju kako bi se utvrdila količina joda koja se utroši za njihovu oksidaciju. Slobodni sumpor-dioksid se veže u potpunosti etanalom, a zatim je izvršena titracija jodom.

Određivanje boje vina

Boja vina sastavljena je od tri komponente: žute ($\lambda=420$ nm), crvene ($\lambda=520$ nm) i plave ($\lambda=620$ nm). Spektrofotometrijskim merenjem apsorbancija na ove tri talasne dužine izračunato je šest parametara: intenzitet boje, nijansa boje, udeo žute, crvene i plave boje u intenzitetu boje, kao i oblik spektra (Glories, 1984).

Izračunavanje:

Intenzitet boje predstavlja ukupnu boju vina prikazanu kao suma apsorbancija:

$$IB = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

Nijansa boje izračunava se kao odnos apsorbancija:

$$NB = A_{420} / A_{520}$$

Učešće pojedinih boja u intenzitetu:

$$\text{žuta boja: } A_{420} (\%) = (A_{420} / IB) \cdot 100$$

$$\text{crvena boja: } A_{520} (\%) = (A_{520} / IB) \cdot 100$$

$$\text{plava boja: } A_{620} (\%) = (A_{620} / IB) \cdot 100$$

Oblik spektra (sjajnost boje) definisan je (dA %) vrednošću, koja se izračunava po sledećem obrascu:

$$dA (\%) = [1 - (A_{420} + A_{620}) / 2 \cdot A_{520}] \cdot 100$$

Karakteristike boje vina koje potiču od reakcija kopigmentacije određene su na osnovu spektrofotometrijskih metoda opisanih u radu autora Boulton i sar. (1999) i mogu se izraziti preko sledećih parametara:

- Frakcija boje usled kopigmentacije tj. frakcija boja za koju su odgovorni kopigmentisani antocijani (%CA):

$$\%CA (\%) = (A^{\text{acet}} - A^{20}) / A^{\text{acet}} \cdot 100$$

- Frakcija boje koju čine slobodni antocijani (%FA):

$$\%FA (\%) = (A^{20} - A^{\text{SO}_2}) / A^{\text{acet}} \cdot 100$$

- Hemijska starost vina izražena kao udeo polimernih pigmentata u ukupnim pigmentima (%HS):

$$\%HS (\%) = (A^{\text{SO}_2} / A^{\text{HCl}}) \cdot 100$$

Oznake A^{acet} , A^{SO_2} , A^{HCl} i A^{20} predstavljaju apsorbancije uzoraka vina prethodno podvrgnutih različitim tretmanima (Boulton i sar., 1999).

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određen je spektrofotometrijski, po metodi Folin-Ciocalteu (Singleton i sar., 1999). Metoda se zasniva na oksidaciji fenolnih jedinjenja pomoću reagensa odn. rastvora Folin-Ciocalteu. Rastvor Folin-Ciocalteu sadrži smešu fosfovolframove ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) i fosfomolibdenske kiseline ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). Ovaj reagens oksidiše fenolna jedinjenja, a sam se redukuje u smešu volfram-oksida (W_8O_{23}) i molbden-oksida (Mo_8O_{23}). Rastvor postaje intenzivno plave boje čiji intenzitet je srazmeran količini fenolnih jedinjenja. Plava boja oksida je stabilna. Intenzitet boje se meri spektrofotometrijski, na talasnoj dužini: $\lambda = 750 \text{ nm}$. Rastvori hlorogenske kiseline poznatih koncentracija (0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 i 1,0 mg/ml) su po istom postupku korišteni za dobijanje kalibracione krive. Očitane vrednosti apsorbancija interpolirane su na kalibracionu krivu. Rezultati su izraženi u g/l, kao ekvivalenti hlorogenske kiseline.

Sadržaj flavan-3-ola

Sadržaj ukupnih flavan-3-ola u vinima određen je spektrofotometrijski prema vanilinskoj metodi opisanoj od strane Revilla i sar. (1991), korišćenjem (+)-katehina kao standarda. Uzorci vina su prethodno razblaživani u odnosu 1:5. Kalibraciona kriva konstruisana je očitavanjem apsorbancije rastvora (+)-katehina sledećih koncentracija 0,05 g/l, 0,1 g/l, 0,15 g/l, 0,2 g/l i 0,4 g/l. Interpolacijom dobijenih vrednosti apsorbancija za svaki uzorak vina na kalibracionu krivu, očitavan je sadržaj flavan-3-ola, a rezultati su iskazivani u g (+)-katehina / l vina.

Sadržaj ukupnih antocijana

Sadržaj ukupnih antocijana određivan je spektrofotometrijskom metodom dekoloracije kalijum metabisulfitom (Ribereau-Gayon i Stonestreet, 1965). Metoda se zasniva na svojstvu antocijana da pri pH 1,0 povećavaju apsorbanciju na talasnoj dužini $\lambda = 520 \text{ nm}$, a da se

obezbojavaju dodatkom sumpor-dioksida. Boja koja ostaje nakon dodatka sumpor-dioksida potiče od polimernih pigmenata.

Izračunavanje:

Sadržaj antocijana se izračunava po sledećem obrascu:

$$\text{Ukupni antocijani (mg/l)} = 875 \cdot (A_1 - A_2)$$

Apsorbancija A_1 odnosi se na smešu kojoj je dodavana destilovana voda, a A_2 je apsorbancija smeše kojoj je dodavan kalijum-metabisulfit.

Sadržaj monomernih antocijana

Sadržaj monomernih antocijana u uzorcima soka i vina od šljiva određivan je pH diferencijalnom metodom (Fuleki i Francis, 1968), koja se zasniva na osobini monomera antocijana da su pri pH 1,0 u obliku oksonijum jona (crveno obojeni), dok su pri pH 4,5 antocijani u poluketalnom obliku (bezbojni). Koncentracija nedegradiranih-monomernih antocijana (C_{mon}) u uzorcima izračunava se kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida prema formuli:

$$C_{\text{mon}} = \frac{A_{\text{mon}} M F 1000}{\epsilon l}$$

gde je A_{mon} apsorbancija razblaženog uzorka soka ili vina od šljiva, koja se izračunava prema formuli:

$$A_{\text{mon}} = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}1} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH}4,5}$$

$M = 449,2$ g/mol (molekulska masa cijanidin-3-glukozida)

$F =$ faktor razblaženja

$\epsilon = 26900$ l/mol cm (molarni koeficijent apsorpcije cijanidin-3-glukozida)

$l = 1$ cm (debljina kivete)

Sadržaj metanola

Sadržaj metanola određivan je uobičajenom metodom (OIV, 2013) baziranoj na oksidaciji metanola do formaldehida (metanala) sa kalijum-permanganatom zakišljenim fosfornom kiselinom. Količina formaldehida se određuje kolorimetrijski, merenjem intenziteta boje ljubičastog kompleksa (na 575 nm) nastalog reakcijom formaldehida sa rastvorom hromotropne kiseline. Metoda predviđa destilaciju uzorka vina i svodenje sadržaja alkohola u dobijenom destilatu na 5% vol. etanola. Sadržaj metanola dobija se interpolacijom očitane apsorbancije na kalibracionu krivu pripremljenu pomoću rastvora metanola sledećih koncentracija: 25, 50, 100, 150, 200 i 250 mg/l.

Sadržaj cijanovodonične kiseline i benzaldehida

Za određivanje sadržaja cijanovodonične kiseline i benzaldehida u uzorcima vina od šljive primenjene su kolorimetrijske metode definisane u Pravilniku o metodama uzimanja uzoraka i vršenja fizičkih i hemijskih analiza alkoholnih pića (Sl. list SFRJ, 70/1987). Primenjene metode podrazumevaju destilaciju uzoraka vina i određivanje cijanovodonične kiseline i benzaldehida u dobijenim destilatima.

Identifikacija i kvantifikacija mineralnih materija

Sastav i sadržaj mineralnih materija (mikro i makro elemenata) u uzorcima vina od šljive određivan je referentnim metodama baziranim na primeni atomske apsorpcione spektrofotometrije (OIV, 2013), na instrumentu VARIAN (SAD), model SpectrAA-10. Sadržaj mikro i makro elemenata izražen je u mg/l vina.

Identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja

Standardni rastvori i kalibracije

Resveratrol i piceid: serijom razređenja standardnog rastvora pripremljenog u metanolu, dobijeni su kalibracioni rastvori koncentracija 0,25-10 mg/l (koeficijent linearne korelacije $r=0,9999$).

Antocijanini: standardni rastvori antocijana pripremljeni su u metanolu zakiseljenim sa HCl do 1%. Standardi za kalibraciju pripremljeni su mešanjem svih pojedinačnih komponenti, razređenih mobilnom fazom do koncentracija 1-100mg/l (r vrednosti za sve antocijana iznosile su preko 0,998).

Fenolne kiseline i flavonoidi: standardni rastvori pojedinačnih jedinjenja dobijeni su rastvaranjem u dimetil-sulfoksidu (DMSO). Standardi za kalibraciju pripremljeni su mešanjem svih pojedinačnih komponenti, razređenih 0,1% rastvorom sirćetne kiseline do koncentracija 0,5-25mg/l ($r \geq 0,998$ za sve fenole).

HPLC analiza

Svi uzorci su profiltrirani kroz najlonski filter (0,45 μm , Sartorius, SAD) neposredno pre HPLC analize pod opisanim uslovima. HPLC analize su izvedene korišćenjem Agilent 1100 tečnog hromatografa (SAD), opremljenog sa kvaternarnom gradijent pumpom, autosemplerom sa sistemom ubrizgavanja (10-200 μl), grejačom kolone, UV-VIS i florescentnim detektorima, prema sledećim uslovima:

Resveratrol i piceid: određivanje je izvedeno injektovanjem 10 μl filtriranog vina u reverzno-faznu kolonu Zorbak SB-C18 (4,6mm \times 150mm, 5 μm ; Agilent, SAD) na 25 °C. Eluiranje je sprovedeno sa protokom mobilne faze (50 mM mravlja kiselina i metanol) od 0,5ml/min. Radno vreme je iznosilo 50 minuta. Korištena je florescentna detekcija (λ_{ex} 330nm, λ_{em} 374nm).

Antocijanini: hromatografsko razdvajanje pet glavnih antocijana u uzorku vina zapremine 25 μl postignuto je primenom reverzno-fazne kolone Poroshell 120 EC-C18 (4,6 \times 100mm, 2,7 μm ; Agilent, SAD) na 40 °C, gradijentnim eluiranjem smešom voda/mravlja kiselina/acetoni-tril (A – 87:10:3, B - 40:10:50; protok 0,8 ml/min; radno vreme 50 minuta). Detekcija je izvršena pomoću UV-VIS detektora na 518nm (OIV, 2013).

Fenolne kiseline i flavonoidi: analiza je vršena na reverzno-faznoj koloni Poroshell 120 EC-C18 (4,6 \times 100mm, 2,7 μm ; Agilent, SAD). Tokom analize, temperatura je održavana konstantnom (25 °C), a injekciona zapremina vina je iznosila 5 μl . Gradijentno eluiranje je izvršeno 0,1%

sirćetnom kiselinom (A – u vodi, B – u acetonitrilu; protok 1ml/min; radno vreme 34 minuta). Detekcija (UV-VIS) je izvršena na sledećim talasnim dužinama (nm): 225 (vanilinska i benzoeva kiselina), 280 (galna, 4-hidroksi-benzoeva, siringinska i trans-cimetna kiselina, katehin hesperetin, naringenin), 305 (p-kumarna kiselina), 330 (hlorogenska i kafena kiselina), 360 (rutin, kvercetin, kemferol).

Kvantifikacija jedinjenja od interesa je izvedena korišćenjem kalibracione krive dobijene injektovanjem rastvora za kalibraciju.

Identifikacija i kvantifikacija aromatičnih jedinjenja

Sadržaj i sastav isparljivih sastojaka odgovornih za aromu vina određivan je primenom gasne hromatografije. U analizama je korišten gasni hromatograf Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) sa plameno-jonizujućim detektorom (FID) i injektorom sa razdeljivačem (split/splitless).

Prilikom određivanja metanola, etanola i viših alkohola za razdvajanje komponenti korištena je kapilarna kolona HP-INNOWax (polietilen-glikol; 30 m x 250 µm, sa debljinom filma 0,25 µm). Uzorci zapremine 1 µl direktno su injektovani u kolonu. Temperatura detektora je iznosila 280 °C, a injektora 220 °C. Temperaturni program grejača gasnog hromatografa je bio podešen na: 35 °C (5 min) do 280 °C (2 min), sa gradijentom promene temperature od 5 °C/min. Kao gas-nosač korišten je helijum (protok 150 ml/min), dok je protok vodonika iznosio 30 ml/min, a vazduha 400 ml/min.

Određivanje ostalih aromatskih jedinjenja (estara, terpena itd.) u vinima zahtevalo je pripremu uzorka koja je obuhvatila Sokslet ekstrakciju (tečno-tečno) tokom 2 h, prema sledećoj proceduri: u Sokslet ekstraktor unese se 50 ml vina, 50 ml destilovane vode, 10 ml metilen-hlorida (rastvarača) i 200 µl metil-undekanoata (interni standard koncentracije 1mg/ml), dok se u balon za destilaciju koji se povezuje za ekstraktor unese 40 ml metilen-hlorida; nakon 2h ekstrakcije, dobijeni ekstrakt je uparen do zapremine od 1 ml pomoću vakuum uparivača na temperaturi 20 °C. Razdvajanje aromatičnih komponenti je izvršeno upotrebom kapilarne kolone Agilent 19091J-215 HP-5 (5% fenil-metil-siloksan, 50 m x 320 µm, sa debljinom filma 1,05 µm). Temperatura detektora je iznosila 300 °C, a injektora 250 °C. Temperatura je povećavana od 50 °C do 300 °C brzinom od 2 °C/min. Kao gas-nosač je korišten helijum sa protokom 45 ml/min, dok je protok vodonika iznosio 30 ml/min, a vazduha 400 ml/min.

3.6. Senzorna ocena vina

Uzorci proizvedenih vina od šljiva podvrgnuti su senzornoj oceni u skladu sa metodom Buxbaum-a (Amerine i Roessler, 1983) pri kojoj vino može dobiti maksimalno 20 poena. Tim sastavljen od pet iskusnih ocenjivača vrednovao je sledeće parametre: boja (maksimalno 2 poena), bistrina (maksimalno 2 poena), miris (maksimalno 6 poena) i ukus (maksimalno 12 poena).

3.7. Funkcionalne karakteristike vina od šljive

3.7.1 Antiradikalska aktivnost

Antiradikalska aktivnost proizvedenih vina od šljive ispitivana je spektrofotometrijski pomoću DPPH metode (Espin i sar., 2000). Ova metoda je zasnovana na određivanju sposobnosti neutralizacije DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikala, praćenjem promene boje ljubičasto obojenog rastvora stabilnog DPPH[•] radikala u redukovanu, žuto obojenu formu, DPPH-H.

Svi uzorci vina su profiltrirani kroz najlonski filter (0,45 μm) i potom korišćeni u daljem radu. U epruveti je određena količina vina pomešana sa 95% metanolom do različitih finalnih koncentracija vina (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; i 0,8 ml/ml), i do ukupne zapremine od 3 ml. Ovako dobijenim uzorcima je dodato 1 ml sveže pripremljenog radnog rastvora DPPH[•] radikala u 96% etanolu (90 μM). Kontrola je pripremljena dodatkom 1 ml radnog rastvora DPPH[•] radikala u 3 ml 95% metanola. Nakon 1h na tamnom mestu i na sobnoj temperaturi, očitavane su absorbance na spektrofotometru (Jenway 6405 UV/Vis, Essex, UK) na talasnoj dužini od 515 nm, uz 95% metanol kao referentni rastvor. Sve probe su rađene u tri ponavljanja.

Antiradikalska aktivnost vina na DPPH[•] izražena je preko kapaciteta hvatanja slobodnih radikala, RSC (engl. *Radical Scavenging Capacity*), i određena je na osnovu jednačine:

$$\text{RSC (\%)} = 100 - (A_{\text{uz}} \cdot 100 / A_{\text{kont}}) (\%)$$

gde su:

A_{uz} - apsorbance uzorka i

A_{kont} - apsorbance kontrole.

Konstruisana je kriva zavisnosti između RSC (%) i zapreminske koncentracije uzoraka vina u cilju određivanja vrednosti IC₅₀ (ml/ml). IC₅₀ vrednost definisana je kao zapreminska koncentracija vina pri kojoj je neutralisano 50% DPPH[•] radikala u uslovima koje definiše metoda, a dobijena je računski iz jednačine linearne regresije.

3.7.2. Antimikrobna aktivnost

Priprema uzoraka. Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišćeni su sledeći uzorci: uzorci vina od šljive (U₁, U₂, U₃), uzorci iz kojih je vakuum uparavanjem (30 °C, 40 min) uklonjen alkohol i SO₂ (A₁, A₂, A₃), uzorci iz kojih je pomoću pilivinilpolipirolidona (PVPP) uklonjen najveći deo fenolnih jedinjenja (FB₁, FB₂, FB₃). Kao kontrolni uzorci korišćeni su 8% rastvor etanola (K_{et}), rastvor jabučne i sirćetne kiseline podešen na pH 3,6 (K_{pH}), rastvor vinobrana (koncentracija SO₂ 20 mg/l) (K_{SO₂}), kao i fosfatni pufer (pH 7,0) koji je korišten za pripremu uzorka K_{pH}. Pod oznakama 1,2 i 3 podrazumevaju se redom uzorci vina koji potiču od sorti Čačanska lepotica, Požegača i Čačanska rana.

Svi uzorci su profiltrirani kroz membranske filtre prečnika pora 0,2 µm (Chromafil® CA-20/25S).

Priprema test organizama. Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti uzoraka vina upotrebljeni su referentni sojevi Gram-negativnih bakterija: *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (Gram-negativne bakterije), i referentni sojevi Gram-pozitivnih bakterija: *Staphylococcus aureus* (ATCC 11632), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932), kao i referentni sojevi kvasaca: *Saccharomyces cerevisiae* (112, Hefebank Weihenstephan) i *Candida albicans* (ATCC 10231).

Kulture se čuvaju u kolekciji kultura Laboratorije za mikrobiologiju Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, u kontejneru sa tečnim azotom (Chart BioMedical Division) na -96°C u Tripton Soja bujonu (Himedia, Mumbai, India) kome je dodat glicerol do koncentracije 20% (v/v). Priprema test sojeva za ispitivanja podrazumevala je dvostruko pasažiranje presejavanjem kultura na kosi Miler Hinton agar (MHA) za bakterije (Difco, Laboratories, Detroit, Michigan, USA), odnosno Sabouraud Maltose (SMA) agar za kvasce (Himedia, Mumbai, India) uz inkubiranje 24 h na 37 °C za bakterije, odnosno 30 °C za *Bacillus* sp. i za kvasce. Od fiziološki aktivnih kultura pripremljena je osnovna suspenzija prenošenjem biomase sa kosog agara u epruvetu sa sterilnim fiziološkim rastvorom. Od osnovnih suspenzija pripremljena je serija razređenja tako da je u poslednjoj epruveti serije broj ćelija bio reda veličine 10⁶ cfu/ml, što je procenjeno aparatom Densichek (bioMérieux, Durham, USA).

Postupak određivanja antimikrobne aktivnosti vina od šljive. U eksperimentima je korištena agar difuziona metoda sa „bunarčićima“. Po 2 ml suspenzija test mikroorganizama homogenizovano je sa 18 ml otopljene i na 45 °C ohlađene podloge (MHA i SMA), a potom razliveno u Petri ploče. Nakon želiranja podloge i isušivanja vlage (oko 2h na sobnoj temperaturi), u podlogama su izbušeni bunarčići prečnika 9 mm, pomoću sterilne staklene cevčice i vakuum pumpe. U njih je mikropipetom uneto po 100 µl pripremljenih uzoraka. Petri ploče su inkubirane na odgovarajućoj temperaturi (30 °C za *Bacillus* sp. i kvasce, za sve ostale bakterije 37 °C). Prvo očitavanje zona inhibicije obavljeno je nakon 24h, a konačni rezultati su očitani nakon 48h.

Statistička analiza. Ogledi su urađeni u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost prečnika zone inhibicije rasta (u mm) sa standardnom devijacijom.

3.7.3. Antiproliferativna aktivnost

Uticaj vina od sorti domaće šljive na rast maligno transformisanih ćelijskih linija procenjen je primenom MTT testa.

Korišćene su sledeće tumorske linije:

- Hep2 (podloga: MEM Eagle / 5% FCS) humana ćelijska linija - *human larynx carcinoma* (karcinom grla);

- RD (podloga: MEM Eagle / 10% FCS) – humana ćelijska linija *rhabdomyosarcoma* (karcinom mišićnog tkiva);

- L2OB (podloga: MEM Eagle / 10% FCS) – mišija tumorska fibroblastna linija u koju su transfektovani neki humani geni.

MTT test citotoksičnosti u *in vitro* uslovima:

Suspenzije gustine $2 \cdot 10^5$ ćelija/ml zasejane su na mikrotitar ploče (NUNC) sa 96 otvora (100 μ l/otvoru) i ostavljene da se inkubiraju na 37 °C i 5% CO₂, u inkubatoru pri visokoj relativnoj vlažnosti vazduha. Nakon 24 časa inkubacije u medijum je dodavano 100 μ l ispitivanih uzoraka vina od šljive i inkubacija je nastavljena na 37 °C i visokoj relativnoj vlažnosti vazduha tokom 48 sati. Kontrolnim ćelijama dodat je svež medijum (podloga MEM Eagle) bez dodatka vina. Pozitivnim kontrolama za svaku ćelijsku liniju smatraju se otvori na ploči kojima je dodato 100 μ l hranjive podloge. Nakon isteka predviđenog vremena (48 h) varijabilnost ćelija je određena MTT (3-[4,5-dimetilhumtiazol-2-ul]-2,5-dihemultetrazolijum-bromid, C₁₈H₁₆N₅SBr) testom citotoksičnosti (Mosmann, 1983). Test se zasniva na bojenoj reakciji mitohondrijskog enzima dehidrogenaze iz živih ćelija sa MTT. Po završetku inkubacije ćelija uz prisustvo vina od šljive, supernatanti su odbačeni i dodat je MTT (u finalnoj koncentraciji od 5 mg/ml) u svaki otvor na ploči (100 μ l/otvoru), koja je potom inkubirana 4 časa na 37 °C. Reakcije su zaustavljene dodatkom 10% SDS/10 mM HCl (100 μ l/otvoru). Obojeni kristali stvorenog formazina su rastvoreni sa 150 μ l DMSO. Nakon što su uzorci preko noći inkubirani na 37 °C, apsorbance je merena na 580 nm primenom ELISA Mikroplate čitača. Broj vijabilnih ćelija po otvoru ploče je izračunavan pomoću standardne krive zavisnosti broja ćelija i apsorbance na 580 nm. Kao standardi su korištene odgovarajuće ćelije koje su posebno uzgajane i prebrojavane pomoću hemocitometra. Standardne suspenzije su postavljane u seriji razređenja, centrifugirane na 800 o/min tokom 10 min, i nakon toga tretirane rastvorima MTT i 10% SDS/10 mM HCl, na isti način kao i u slučaju eksperimentalnih ploča. Broj vijabilnih ćelija u svakom otvoru je proporcionalan intezitetu apsorbancije svetlosti. Procenat preživelih ćelija je izračunavat tako što je apsorbancija uzorka u kome su ćelije rasle u prisustvu vina podeljena optičkom gustinom kontrole (apsorbancija kontrolnih ćelija koje su rasle samo u hranjivoj podlozi) i pomnožena sa 100. Citotoksična aktivnost je izražena kao IC₅₀ vrednost (koncentracija koja inhibira 50% ćelijskog rasta). U cilju ocene citotoksične aktivnosti vina od šljive dobijeni rezultati su upoređeni sa IC₅₀ vrednostima za rast ispitanih tumorskih linija u prisustvu *cis*-diamindihloroplatine (Cis-DDP) (Mosmann, 1983). Prikazani rezultati su dobijeni iz tri nezavisna eksperimenta (tri ponavljanja). Kriterijum za citotoksičnu aktivnost biljnih ekstrakata prema Američkom nacionalnom institutu za rak (American National Cancer Institute - NCI) iznosi IC₅₀ < 30 μ g/ml (Itharat i sar., 2004).

3.8. Ispitivanje uticaja starenja na kvalitet vina od šljive

Eksperimenti u ovom delu doktorske disertacije podrazumevali su mikroviniifikacije sa tri ispitivane sorte domaće šljive, u količini od po 4 kg kljuka po pojedinačnom ogledu. Postupak primarne prerade plodova šljive opisan je u poglavlju 3.2.1. Za parametre fermentacije (temperatura, pH, doza pektolitičkog enzima) uzete su vrednosti dobijene postupkom

optimizacije (poglavlje 3.2.5.). U oglecima su upotrebljavani pektolitički enzim Lallzyme EX-V i kvasac *S. cerevisiae* (Spirifer, Erbslöh, Geisenheim, Germany) u količini od 0,25g/kg kljuka. Maceracija i ceđenje kljuka nakon završetka fermentacije izvršeni su prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. Nakon završetka faze tihog doviranja i taloženja grubog taloga, vino je otočeno, razliveno u po pet staklenih boca zapremine 0,33 l i zatvoreno navojnim zatvaračima. Vina su čuvana na temperaturi od oko 10 °C. Plan eksperimenta čiji je cilj bio da se ispita uticaj starenja vina na parametre kvaliteta (pre svega boju i fenolna jedinjenja) podrazumevao je analize vina prema sledećem rasporedu:

T₀ – analiza vina neposredno nakon razlivanja u boce

T₁ – analiza vina nakon jednog meseca odležavanja

T₂ – analiza vina nakon tri meseca odležavanja

T₃ – analiza vina nakon šest meseci odležavanja

T₄ – analiza vina nakon dvanaest meseci odležavanja

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Ispitivanje osobina polazne sirovine

4.1.1. Mehanički sastav plodova šljive

S obzirom da je plod šljive polazni materijal, sirovina za proizvodnju vina, potrebno je izvršiti analizu njegovog mehaničkog sastava. Sastavni delovi ploda šljive su pokožica, mezokarp (meso, pulpa) i koštica. Procentualni odnos pojedinih delova ploda zavisi od sorte šljive, zdravstvenog stanja, ekoloških uslova uzgoja i vremena berbe. Mehanički sastav ploda je jedna od najvažnijih ampelografskih karakteristika svake sorte, a njegovo određivanje je važno za nekoliko tehnoloških aspekata proizvodnje vina:

- za primenu i definisanje uslova rada i iskorištenja pojedinih mašina,
- za odnos kapaciteta pojedinih mašina i randman kljuka, soka i vina.

Krupnoća plodova, zatim odnos mesa, položice i koštice, kao i lakoća odvajanja koštice od mezokarpa su veoma značajne karakteristike sorti šljiva namenjenih proizvodnji vina. Osnovne karakteristike mehaničkog sastava ploda ispitivanih sorti domaće šljive prikazane su u tabeli 4.1. Prosečna masa ploda značajno se razlikuje među ispitivanim sortama, te je tako ona najveća je kod Čačanske rane (36,2 g), zatim Čačanske lepotice (28,9 g), a najmanja kod sorte Požegača (13,1 g). Date vrednosti sugerišu da Čačansku ranu i Čačansku lepoticu možemo svrstati u kategoriju sorti sa krupnim do vrlo krupnim plodovima, dok Požegača pripada kategoriji sorti sitnog ploda. Analizom mase pokožice, tj. njenog procentualnog udela, uočava se da sorte Čačanska lepotica i Požegača imaju značajno veći udeo pokožice u plodu (9,4%, odnosno 9,8%) u odnosu na Čačansku ranu, koju karakteriše najveći udeo mezokarpa (87,5%). Najpovoljniji odnos mezokarpa i koštice ima sorta Čačanska lepotica (17,8%), nešto lošiji Čačanska rana (15,1) a najlošiji Požegača (13,5). Ispitivane sorte domaće šljive karakteriše lako odvajanje koštice od mezokarpa.

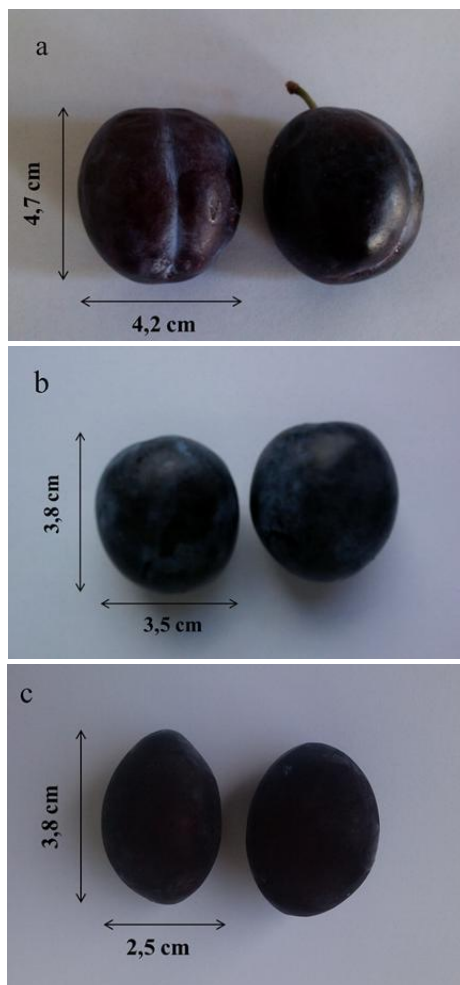
Tabela 4.1 Mehanički sastav plodova sorti domaće šljive

Sorta	Masa ploda (g) *	Mezokarp (% m/m)	Koštica (% m/m)	Pokožica (% m/m)	Mezokarp / koštica
Čačanska rana	36,2 ± 3,1 ^c	87,5 ± 0,4 ^c	5,8 ± 0,3 ^b	6,7 ± 0,5 ^a	15,1 ^b
Čačanska lepotica	28,9 ± 1,5 ^b	85,6 ± 0,2 ^b	4,8 ± 0,3 ^a	9,4 ± 0,7 ^b	17,8 ^c
Požegača	13,1 ± 0,9 ^a	83,8 ± 0,8 ^a	6,2 ± 0,7 ^b	9,8 ± 0,3 ^b	13,5 ^a

^{a, b, c} različita slova u okviru iste kolone označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$).

* težina ploda predstavlja srednju vrednost merenja deset nasumičnih uzoraka.

Prosečne dimenzije plodova tri ispitivane sorte domaće šljive prikazane su na slici 4.1. Dimenzije ploda su u pozitivnoj korelaciji sa masom ploda, pa tako sortu Čačanska rana, pored najveće mase, karakteriše i najveće dimenzije ploda (4,2 cm x 4,7 cm).



Slika 4.1 Prosečne dimenzije korišćenih plodova šljive: a) Čačanska rana, b) Čačanska leptotica, c) Požegača.

Dobijeni rezultati mogu poslužiti kao preliminarni pokazatelji potencijala pojedinih sorti za proizvodnju voćnog vina, s obzirom da maseni odnos pulpe, pokožice i koštice može imati značajan uticaj na brojne parametre kvaliteta vina kao što su randman i boja vina, sastav i sadržaj fenolnih i aromatičnih jedinjenja itd. S obzirom na najveći maseni udeo pokožice i najbolji odnos mezokarp/koštica, možemo zaključiti da sorta Čačanska leptotica poseduje najbolji mehanički sastav za proizvodnju voćnog vina.

4.1.2. Hemijski sastav kljuka i soka šljive

Hemijski sastav polazne sirovine u velikoj meri određuje kvalitet proizvedenog vina. Uvid u vrednosti pojedinih karakteristika sirovine (kljuka šljive), kao što su pH, sadržaj šećera, sadržaj asimilabilnog azota itd., ukazuje na eventualnu potrebu za korekcijom hemijskog sastava kako bi se alkoholna fermentacija vodila na adekvatan način i kako bi se dobilo vino najboljeg kvaliteta. Osnovne karakteristike tri ispitivane sorte šljive prikazane su u tabeli 4.2.

Tabela 4.2. Hemijske karakteristike kljuka i soka tri ispitivane sorte šljive

Parametar	sorta		
	Čačanska rana	Čačanska lepotica	Požegača
Suva materija (% m/m)	20,7 ± 0,7 ^{ab}	18,3 ± 0,8 ^a	21,7 ± 0,2 ^{ab}
Ukupni šećer (g/kg)	134,1 ± 4,1 ^a	152,2 ± 3,4 ^b	163,6 ± 2,8 ^c
Redukujući šećeri (g/kg)	73,9 ± 3,1 ^a	89,2 ± 4,9 ^b	111,4 ± 9,2 ^c
Saharoza (g/kg)	52,7 ± 2,5 ^b	53,1 ± 1,7 ^b	42,8 ± 3,3 ^a
pH	3,5 ± 0,0 ^a	3,45 ± 0,05 ^a	3,6 ± 0,0 ^a
Ukupne kiseline (g/l)	8,8 ± 0,1 ^c	7,8 ± 0,1 ^b	6,5 ± 0,2 ^a
Jabučna kiselina (g/l)	5,3 ± 0,8 ^b	5,6 ± 0,1 ^b	3,9 ± 0,4 ^a
Limunska kiselina (g/l)	1,9 ± 0,2 ^b	1,1 ± 0,2 ^a	0,8 ± 0,3 ^a
Ukupni azot (mg/l)	700 ± 33 ^a	800 ± 18 ^b	650 ± 25 ^a
Asimilabilni azot (mg/l)	280 ± 12 ^a	385 ± 20 ^c	322 ± 9 ^b
Pepeo (% m/m)	0,47 ± 0,01 ^b	0,39 ± 0,03 ^a	0,59 ± 0,02 ^c
Pektini (g/kg sv*)	37 ± 1 ^b	25 ± 3 ^a	30 ± 3 ^a
Stepen esterifikacije pektina (%)	55 ± 3 ^{bc}	47 ± 4 ^b	28 ± 3 ^a

*sv – po kg svežeg ploda bez koštice.

^{a, b, c} različita slova u okviru istog reda označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$).

Sadržaj suve materije ne razlikuje se statistički značajno kod sorti Čačanska rana i Požegača (20,9%, odnosno 21,7%), dok je ova vrednost bila nešto niža u slučaju Čačanske lepotice (18,3%). Ispitivane sorte šljive karakteriše povoljan odnos šećera (134-163 g/kg) i voćnih kiselina (6,5-8,8 g/l). Najniži sadržaj šećera i najviši sadržaj ukupnih kiselina utvrđen je u plodovima sorte Čačanska rana, što je i očekivano s obzirom da se radi o ranoj sorti šljive. Sa druge strane, Požegaču, kasnu sortu, karakteriše viši sadržaj šećera, viša vrednost pH i manje ukupnih kiselina. Udeo redukujućih šećera (glukoza i fruktoza) u ukupnim šećerima je kod sorti Čačanska rana i Čačanska lepotica oko 55-60%, dok kod Požegače on iznosi oko 70%. Preostali deo ukupnih šećera uglavnom čini saharoza (25-40%). Dobijene vrednosti su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (Mitrović i sar., 2006; Mišić, 2006). Vrednosti pH kljuka sve tri sorte šljive (3,45-3,6) nalaze se u optimalnom opsegu za fermentaciju vina (3,1-3,6) (Jackson, 2008). Jabučna kiselina predstavlja najdominantniju kiselinu u šljivi, i njen udeo u sadržaju ukupnih kiselina kreće se od 60%, kod Čačanske rane i Požegače, do 70%, kod Čačanske lepotice. Pored jabučne kiseline, u kljuku ispitivanih sorti šljive određene su i značajne koncentracije limunske kiseline (0,8-1,9 g/l). Sorta Čačanska rana sadrži značajno više limunske kiseline u odnosu na druge dve sorte šljive. Udeo limunske kiseline u sadržaju ukupnih kiselina je kod ove sorte 22% dok je kod Čačanske lepotice i Požegače on oko 12%. Sortu Čačanska lepotica karakteriše najniži sadržaj pepela (0,39%), dok je sorta sa najvišim sadržajem ove komponente Požegača (0,59%). Dobijene vrednosti su u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (Nergiz i Yildiz, 1997) koji iznose da je prosečan sadržaj pepela u šljivama 0,55%, dok je, poredjenja radi, prosečan sadržaj pepela u grožđu 0,45% (Ribéreau-Gayon i sar., 1999).

Mineralne materije, iskazane kroz sadržaj pepela, imaju značajan uticaj na rast i metaboličku aktivnost kvasca tokom fermentacije.

S obzirom na značaj azotnih jedinjenja za proces fermentacije, koji se iskazuje kroz uticaj na rast i metaboličku aktivnost kvasca i ulogu u formiranju jedinjenja koja značajno doprinose mirisu i aromi vina, analiza sastava tečne faze kljuka od šljiva uključila je i određivanje sadržaja asimilabilnog (usvojivog) azota. Sadržaj asimilabilnog azota u ispitivanim uzorcima šljive bio je najviši kod sorte Čačanska lepatica (385 mg/l) a najniži kod Čačanske rane. U konkretnom slučaju, asimilabilni azot čini oko 50% ukupnih azotnih materija kod sorti Požegača i Čačanska lepatica, dok je ovaj udeo znatno niži kod Čačanske rane (37%). S obzirom da literatura ističe da je minimalni sadržaj asimilabilnog azota potreban za normalnu aktivnost kvasca 120-140 mg/l (Henschke i Jiranek, 1993; Bell i Henschke, 2005), a da su vrednosti ovog parametra u kljuku ispitivanih sorti šljiva znatno iznad navedenog minimuma, može se očekivati brz rast kvasca, povećana brzina fermentacije, ali i značajna produkcija aromatičnih jedinjenja.

Najviši sadržaj pektinskih materija određen je kod sorte Čačanska rana (37 g/kg svežeg ploda), dok se vrednost ovog parametra nije statistički značajno razlikovala kod druge dve sorte. Dobijene vrednosti su u saglasnosti sa literaturnim podacima za sadržaj pektina kod sorti domaće šljive (21-36 g/kg svežeg ploda) (Rop i sar., 2009). Visok sadržaj pektina karakterističan je i za jabuke, 10-50 g/kg svežeg ploda (Bailoni i sar., 2005) i dunje, prosečno oko 30 g/kg svežeg ploda (Baker, 1997). Poznato je da pektinske materije imaju veliku nutritivnu vrednost kao komponenta prehrambenih vlakana, ali treba istaći i njihova tehnološka svojstva, koja mogu biti korisna (kod proizvodnje voćnih namaza i želea), ali i nepovoljna (kod proizvodnje sokova i alkoholnih pića od voća). Veliku važnost za postupak proizvodnje alkoholnih pića, pored sadržaja pektinskih materija, ima i njihov stepen esterifikacije, s obzirom da ovi parametri imaju direktan uticaj na količinu nastalog metanola (po čoveka toksične komponente). Stepen esterifikacije pektinskih materija sorti Čačanska rana i Čačanska lepatica (55%, odnosno 47%) znatno je viši u odnosu na sortu Požegača i nalazi se približno u opsegu karakterističnom za voće (50-80%). Sa druge strane, niži stepen esterifikacije pektina koji je određen kod sorte Požegača (28%) nalazi se u opsegu vrednosti više karakterističnim za grožđe nego za voće (25 do 50%) (Jović, 1991). Objašnjenje za nešto niže vrednosti stepena esterifikacije pektinskih materija ispitivanih sorti šljive, u odnosu na literaturne podatke, moguće je potražiti u različitom stepen zrelosti voća ili različitom postupku ekstrakcije pektina.

4.2. Optimizacija uslova alkoholne fermentacije vina od šljive

4.2.1. Efekat upotrebe različitih pektolitičkih enzima

Aktivnost pektolitičkih enzima tokom prerade voća bitna je za proizvodnju vina iz više razloga. Hidroliza pektinskih materija vodi otečnjavanju kljuka, povećanju prinosa vina, olakšavanju bistrjenja i filtracije, ali dovodi i do značajnog povećanja efikasnosti ekstrakcije bojnih i aromatičnih materija voća. Istraživanja u sklopu ove doktorske disertacije su, stoga,

bila usmerena i ka ispitivanju primene različitih komercijalnih pektolitičkih enzima za tretman kljuka od šljiva. Uticaj primenjenih enzima na prinos i parametre kvaliteta vina prikazan je u tabeli 4.3.

Tabela 4.3. Uticaj pektolitičkih enzima na prinos i parametre kvaliteta vina od šljive

	Etanol (% v/v)	Metanol (mg/l)	Glicerol (g/l)	Prinos vina* (%)	Ukupni fenoli (g/l)
K	7,38 ± 0,12 ^a	480 ± 17 ^a	5,78 ± 0,09 ^a	48 ± 4 ^a	2,01 ± 0,08 ^a
E ₁	7,71 ± 0,10 ^b	1109 ± 13 ^b	6,05 ± 0,12 ^{ab}	67 ± 1 ^c	2,21 ± 0,04 ^b
E ₂	7,79 ± 0,27 ^b	1150 ± 24 ^b	6,03 ± 0,09 ^{ab}	60 ± 8 ^b	1,96 ± 0,10 ^a
E ₃	7,58 ± 0,15 ^{ab}	1232 ± 5 ^c	6,19 ± 0,25 ^{ab}	58 ± 3 ^b	2,19 ± 0,03 ^b
E ₄	7,89 ± 0,02 ^b	1310 ± 18 ^d	6,06 ± 0,17 ^{ab}	72 ± 3 ^c	2,29 ± 0,06 ^{bc}
E ₅	7,66 ± 0,22 ^b	1121 ± 29 ^b	5,8 ± 0,31 ^a	58 ± 5 ^b	2,07 ± 0,05 ^{ab}

* prinos vina u procentima izražen kao ml vina na 100 g kljuka.

^{a, b, c} različita slova u okviru istog reda označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$).

Obrada kljuka pektolitičkim enzimima značajno je uticala na prinos i hemijski sastav proizvedenih vina od šljive. Dobijeni rezultati, prikazani u tabeli 4.3., ukazuju na stitistički značajno ($p < 0,05$) povećanje prinosa vina, kao i sadržaja etanola, metanola, glicerola i ukupnih fenolnih jedinjenja u poređenju sa kontrolnim uzorkom (K) proizvedenim bez primene enzima. Upotreba različitih pektolitičkih enzima nije značajno uticala na koncentraciju etanola u vinima. Sadržaj metanola u vinima E₁₋₅ značajno se razlikovo u zavisnosti od primenjenog enzimskog preparata (1109-1310 mg/l). Enzimski tretman kljuka odgovoran je za nastajanje i do tri puta većih koncentracija metanola u vinima u odnosu na kontrolni uzorak. S obzirom da komercijalne pektinaze predstavljaju smešu poligalakturonaza, pektin lijaza i pektin metil esteraze (PME) (Dietrich i sar., 1991), koncentracija metanola u vinu u velikoj meri zavisi od specifične aktivnosti PME u konkretnom enzimskom preparatu. Izrazito visoka koncentracija metanola (1410 mg/l) određena je u vinu kod koga je kljuk u fazi primarne prerade tretiran enzimom Trenolin Frio DF (E₄). Pektolitički enzimi sa najmanjom aktivnošću pektin metil esteraze su Lallzyme EX-V, Lallzyme Cuvee Blanc i Enartis zym balance (vina E₁, E₂ i E₅), što potvrđuje značajno ($p < 0,05$) manja koncentracija metanola u odnosu na vina E₃ i E₄.

Primena pektolitičkih enzima tokom vinifikacije nije dovela do značajnijih promena u sadržaju glicerola. Sa druge strane, prinos vina u slučaju kontrolnog uzorka je bio značajno manji u odnosu na vina koja su proizvedena od enzimski tretiranog kljuka. Upotrebom pektolitičkih enzima prinos vina je povećan i do 50%. Povećanje prinosa vina bilo je najizraženije u slučaju primene enzima Trenolin Frio DF i Lallzyme EX-V. Enzimski tretman kljuka od šljiva uticao je i na povećanje efikasnosti ekstrakcije fenolnih jedinjenja šljive. Aktivnošću enzima Trenolin Frio DF sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu E₄ povećan je za 15% u odnosu na kontrolno vino. Značajno povećanje sadržaja ukupnih fenola zabeleženo je i u vinima E₁ i E₄.

Dobijeni rezultati ukazuju da se primenom enzima Lallzyme EX-V postižu najbolje tehnološke karakteristike vina od šljiva koje se manifestuju visokim sadržajem etanola, glicerola i ukupnih fenolnih jedinjenja, velikim prinosom vina i najmanjom koncentracijom metanola.

4.2.2. Efekat učestalosti mešanja kljuka tokom fermentacije

Efikasnost ekstrakcije rastvorljivih materija iz sirovine za proizvodnju vina, kao što je već naglašeno u pregledu literature, veoma zavisi od učestalosti i tehnike mešanja kljuka. S obzirom na rad u laboratorijskim uslovima mešanje tečne i čvrste faze ostvareno je klasičnim mehaničkim potapanjem tj. potiskivanjem klobuka, dok je uticaj različite frekventnosti mešanja na prinos i parametre kvaliteta vina bio predmet ispitivanja. Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 4.4.

Tabela 4.4. Efekat učestalosti mešanja kljuka na prinos i parametre kvaliteta vina od šljive

	Etanol (% v/v)	Metanol (mg/l)	Glicerol (g/l)	Prinos vina (%)	Ukupni fenoli (g/l)
V ₁	7,51 ± 0,12 ^a	460 ± 11 ^a	5,71 ± 0,11 ^a	44 ± 3 ^a	1,68 ± 0,10 ^a
V ₂	7,34 ± 0,08 ^a	496 ± 17 ^a	5,81 ± 0,16 ^a	50 ± 5 ^b	1,95 ± 0,03 ^b
V ₃	7,44 ± 0,15 ^a	482 ± 22 ^a	5,94 ± 0,08 ^{ab}	47 ± 2 ^{ab}	2,05 ± 0,07 ^b
V ₄	7,62 ± 0,22 ^{ab}	1088 ± 27 ^b	6,1 ± 0,17 ^b	61 ± 1 ^c	1,75 ± 0,03 ^a
V ₅	7,84 ± 0,12 ^b	1121 ± 19 ^b	5,98 ± 0,12 ^{ab}	65 ± 1 ^{cd}	2,22 ± 0,05 ^c
V ₆	7,63 ± 0,04 ^{ab}	1125 ± 18 ^b	6,12 ± 0,09 ^b	66 ± 3 ^d	2,16 ± 0,09 ^c

* prinos vina u procentima izražen kao ml vina na 100 g kljuka.

^{a, b, c} različita slova u okviru istog reda označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$).

Različita frekventnost mešanja kljuka nije značajnije uticala na sadržaj etanola, metanola i glicerola u vinu. Prinos vina kod vinifikacija bez primene pektolitičkog enzima statistički značajno ($p < 0,05$) se povećao usled učestalijeg mešanja kljuka (V₂ i V₃), u odnosu na režim V₁. Sličan trend povećanja prinosa vina zabeležen je i u slučaju kljuka tretiranog enzimima (V₅ i V₆ u odnosu na V₄). Sa druge strane, značajnijih razlika u prinosu vina nije bilo kod uzoraka kljuka mešanih jedan i dva puta na dan. Potpunija ekstrakcija fenolnih jedinjenja šljive postignuta je primenom frekventnijih režima mešanja. Primećuje se da jedno mešanje kljuka nakon 48 h od početka fermentacije ne obezbeđuje proizvodnju vina adekvatnog fenolnog sadržaja. Mešanje kljuka jednom i dva puta dnevno dovodi do povećanja sadržaja ukupnih fenola za 20-25%. Međusobnim poređenjem sadržaja ukupnih fenola i prinosa vina proizvedenih mešanjem kljuka jedan (V₂ i V₅) i dva (V₃ i V₆) puta na dan, uočene su statistički značajne razlike ($p < 0,05$). Primena pektolitičkog enzima tokom fermentacije ima mnogo veći uticaj na prinos vina u odnosu na frekventnost mešanja tečne i čvrste faze kljuka. Sa druge strane, efekat frekventnosti mešanja kljuka je znatno izraženiji po pitanju sadržaja ukupnih fenola. S obzirom na različit sastav čvrste faze kljuka tj. odsustvo semenki kao važnog izvora fenolnih jedinjenja, može se zaključiti da je, za razliku od vina od grožđa, efekat učestalosti mešanja kljuka na sadržaj fenolnih jedinjenja vina od šljive manje značajan. Efikasna ekstrakcija polifenola pokožice šljive

postiže se mešanjem kljuka jedan put na dan, dok dalje povećanje frekventnosti ove operacije nije imalo značajnog ($p < 0,05$) efekta.

4.2.3. Ispitivanje uticaja primene različitih kvasaca na karakteristike alkoholne fermentacije i aromatski profil proizvedenih vina

Primarna uloga kvasaca u proizvodnji vina ne podrazumeva samo obezbeđivanje brze i efikasne konverzije fermentabilnih šećera polazne sirovine do etanola i ugljen-dioksida, već se odnosi i na produkciju velikog broja važnih metabolita koji utiču na senzorna svojstva vina. Takođe, kvasci, pored šećera, tokom fermentacije usvajaju i metabolišu i mnoge druge komponente fermentacionog medijuma (kljuka, šire). Sekundarna uloga kvasca se odnosi na modifikaciju i/ili oslobađanje komponenti grožđa ili voća, kao što su gliko- i cistein-konjugovani prekursori, koji poboljšavaju sorte karakteristike vina (Pretorius, 2000). Cilj upotrebe starter kultura kvasaca je brza inicijacija fermentacije i uspostavljanje brojčane dominantnosti u odnosu na autohtone vrste, čime se limitira mogućnost potencijalnog kvarenja vina. Različiti sojevi vinskih kvasaca (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*) nisu podjednako pogodni za fermentaciju vina, i mogu se značajno razlikovati u fermentativnim performansama i doprinosu koji daju finalnoj aromi vina. Veliki broj sojeva vinskih kvasaca je danas komercijalno dostupan, a ono što izbor čini teškim je veliki broj kompleksnih mehanizama interakcija između sojeva, šire i uslova fermentacije (Pretorius, 2000; Sweigers i sar., 2005a).

Glavni cilj istraživanja u okviru ovog poglavlja bio je da se ispita mogućnost primene različitih sojeva kvasca u fermentaciji vina od šljive, kako bi se, izborom adekvatnog proizvodnog mikroorganizma, poboljšale karakteristike fermentacije i produkcija aromatičnih jedinjenja. Uticaj primene različitih sojeva kvasaca na karakteristike fermentacije vina od šljive, prikazani su u tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Karakteristike i sadržaj pojedinih produkata fermentacije u vinima od šljive (sorte Čačanska lepotica) proizvedenih upotrebom različitih vrsta kvasaca

Kvasac	Etanol (% v/v)	pH	Isparljive kiseline (g/l)	Dužina fermentacije (dan)	Brzina produkcije etanola* (g/l/dan)
K	6,75±0,04 ^a	3,30± 0,04 ^a	0,56±0,02 ^c	7 ± 0,00 ^c	7,6 ^a
Alchemy I	7,52±0,06 ^b	3,42±0,02 ^b	0,32±0,10 ^b	4,5 ± 0,25 ^a	13,3 ^d
Spiriferm	7,85±0,11 ^c	3,46±0,05 ^b	0,34±0,04 ^b	4 ± 0,00 ^a	15,5 ^e
Spiriferm Arom	7,78±0,03 ^c	3,51± 0,04 ^b	0,15±0,07 ^a	5,5 ± 0,25 ^b	11,0 ^b
Oenoferm PinoType	7,87±0,08 ^c	3,39±0,00 ^{ab}	0,23±0,11 ^{ab}	5 ± 0,00 ^{ab}	12,3 ^c
Oenoferm Freddo	7,49±0,08 ^b	3,55± 0,03 ^b	0,35±0,05 ^b	5,5 ± 0,00 ^b	10,7 ^b
<i>Schiz. pombe</i> + <i>S. cerevisiae</i>	8,11±0,05 ^{cd}	3,71± 0,00 ^c	0,84±0,07 ^d	9 ± 0,25 ^d	7,1 ^a

rezultati prikazani u tabeli predstavljaju srednju vrednost dva ponovljena eksperimenta

^{a, b, c} različita slova u okviru iste kolone označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$).

* date vrednosti predstavljaju prosečnu brzinu produkcije etanola.

Na osnovu prikazanih rezultata zapaža se postojanje statistički značajne razlike u pogledu fermentativnih karakteristika različitih komercijalnih sojeva kvasaca pod primenjenim eksperimentalnim uslovima. Najniži sadržaj etanola određen je u vinu proizvedenom spontanom fermentacijom (K) (6,75% v/v), dok je sekvencijalna inokulacija kljuka sa *Schiz. pombe* i *S. cerevisiae* rezultirala produkcijom najveće količine ovog jedinjenja (8,11% v/v) u ispitivanim vinima od šljive. Ova dva fermentativna postupka karakteriše najduže vreme trajanja fermentacije (7-9 dana) i najmanja brzina produkcije etanola (7,1-7,6 g/l/dan).

U slučaju spontane fermentacije, šira nakon muljanja grožđa sadrži oko 10^6 cfu/ml kvasaca (Pretorius, 2000). Budući da fazu burne fermentacije karakteriše populacija kvasaca reda veličine 10^8 cfu/ml (Pretorius, 2000), vreme potrebno za rast (umnožavanje) ćelija autohtonih kvasca i potpunu konverziju šećera u alkohol je znatno duže u odnosu na fermentaciju sa inokulacijom čiste kulture selekcionisanog kvasca. I pored stalnog prisustva određenih ne-*Saccharomyces* kvasca u fermentišućoj širi, većina njih odumire početkom faze burne fermentacije, pre svega, zbog sporog rasta i inhibicije koja je posledica kombinovanog dejstva više faktora (SO_2 , nizak pH, visok sadržaj etanola, nedostatak kiseonika). Ovo je u skladu sa njihovim oksidativnim ili slabo-fermentativnim metabolizmom (Ribéreau-Gayon i sar., 2006).

Spontanu fermentaciju vina od šljive karakteriše najniža vrednost pH vina (3,3), kao posledica povećane produkcije isparljivih kiselina. U ogledu koji je uključivao sekvencijalnu inokulaciju, *Schiz. pombe*, u početnoj fazi fermentacije vina, efikasno obavlja delimičnu deacidifikaciju soka od šljive metabolišući 1,9 g/l jabučne kiseline. Aktivnost ovog kvasca značajno se smanjuje sa povećanjem sadržaja etanola u vinu iznad 4% v/v (rezultati nisu prikazani). Potreba za prilagođavanjem uslovima sredine i manji broj ćelija (10^6 cfu/ml) *Schiz. pombe* u kljuku nakon inokulacije, odgovorni su za sporiji početak i duže vreme trajanja fermentacije. Produkcija etanola je delimično započeta aktivnošću *Schiz. pombe* i autohtonih kvasaca, a punim intenzitetom nastavljena aktivnošću selekcionisanog soja *S. cerevisiae*, čija je inokulacija izvršena tri dana nakon zasejavanja *Schiz. pombe*. Viši sadržaj etanola u vinu proizvedenom sekvencijalnom inokulacijom kljuka sa *Schiz. pombe* i *S. cerevisiae*, u poređenju sa vinima proizvedenim upotrebom čistih kultura *S. cerevisiae* i *S. bayanus*, može se objasniti činjenicom da *Schiz. pombe* svojom metaboličkom aktivnošću jabučnu kiselinu transformiše u etanol (Benito i sar., 2012). Bhardwaj i Joshi (2009) u svom radu ističu da vina od šljive proizvedena aktivnošću *Schiz. pombe*, u poređenju sa *S. cerevisiae*, karakteriše viši sadržaj etanola. Benito i sar. (2012) ističu da je pomenutoj vrsti kvasca potrebno oko 15 dana za potpunu fermentaciju šire sa 220 g/l šećera. Ovi autori ističu i da, u zavisnosti od primenjenog soja *Schiz. pombe*, konverzija jabučne kiseline iznosi 50-100%.

Vino od šljive proizvedeno aktivnošću *Schiz. pombe* i *S. cerevisiae* karakterišu i najviše vrednosti pH (3,71) i sadržaja isparljivih kiselina (0,84 g/l). Značajno smanjenje sadržaja jabučne kiseline dovelo je do povećanja vrednosti pH vina, bez obzira na produkciju isparljivih kiselina tokom fermentacije. Efekat smanjenog sadržaja jabučne kiseline snažniji je odnosu na efekat nastalih isparljivih kiselina, s obzirom da je jabučna kiselina (pK_a 3,46) jača u odnosu na sirćetnu (pK_a 4,73) i da je količina jabučne kiseline koja se transformiše (1,9 g/l) veća u odnosu na

količinu sirćetne kiseline koja nastaje (oko 0,8 g/l). Negativan uticaj *Schiz. pombe* na aromu vina ogleda se u povećanoj produkciji sirćetne kiseline (1-2 g/l) (Benito i sar., 2012). Pod definisanim uslovima fermentacije vina od šljive, aktivnost *Schiz. pombe* se smanjuje sa povećanjem sadržaja etanola iznad 4% (4-5. dan fermentacije), što vodi smanjenju negativnog dejstva pomenutog kvasca na kvalitet vina. Sadržaj isparljivih kiselina u sprovednim ogledima nalazi se na pragu senzorne detekcije, koji se prema Zoecklien i sar. (1999) nalazi u opsegu 0,7-1,1 g/l.

Sa druge strane, vina proizvedena primenom čistih kultura sojeva *S. cerevisiae* (Alchemy I, Spiriferom i Oenoferom PinoType) i *S. bayanus* (Spiriferom arom i Oenoferom Freddo) karakteriše ujednačeno visok sadržaj etanola (7,49-7,87% v/v) i skoro potpuno iskorišćenje fermentabilnih šećera. Vrednost pH u prethodno pomenutim vinima nije se međusobno statistički značajno ($p < 0,05$) razlikovala. Najslabija produkcija isparljivih kiselina registrovana je u vinima proizvedenim inokulacijom sojeva Spiriferom Arom i Oenoferom PinoType. Primena čistih kultura selekcionisanih kvasaca u proizvodnji vina od šljive, generalno, obezbeđuje brzu i efikasnu fermentaciju tj. veliku brzinu produkcije etanola. Najkraće vreme trajanja fermentacije (4-5 dana) i najveća brzina produkcije etanola (12,3-15,5 g/l/dan) odlike su ispitanih sojeva *S. cerevisiae*: Alchemy I, Oenoferom PinoType i, naročito, Spiriferom. Od kultura selekcionisanih kvasaca *S. cerevisiae* i *S. bayanus* se očekuje da, ili suzbiju rast autohtonih ne-*Saccharomyces* vrsta i *Saccharomyces* sojeva, ili ograniče njihovu ulogu u fermentaciji. Takođe, primena antiseptičkih sredstava (npr. SO₂), na koju je većina ne-*Saccharomyces* kvasaca slabo otporna, trebalo bi da obezbedi dominantnost inokulisanih sojeva u fermentaciji (Ciani i sar., 2010). Ciani i sar. (2010) su pokazali da rast „divljih“ kvasaca *K. apiculata* i *C. stellata* nije suzbijen u fermentaciji sa selekcionisanim kulturama *S. cerevisiae*, i da su ovi kvasci često prisutni u značajnom broju u završnim fazama fermentacije. Dominantnost inokulisanih čistih kultura kvasca u fermentaciji ne mora uvek biti obezbeđena, shodno činjenici da zavisi od više faktora kao što su: (1) količina i viabilnost inokuluma, kao i njegova pravilana upotreba; (2) fiziološke i metaboličke karakteristike upotrebljene kulture kvasca (kvasaca); (3) primenjena tehnologija u proizvodnji vina (npr. postupci bistrenja, temperatura fermentacije, dodatak SO₂).

Pored primarnih aromatičnih komponenti, koje se formiraju tokom faze sazrevanja voća i bivaju ekstrahovane tokom vinifikacije, aromu vina od šljiva određuju i sekundarne aromatične komponente koje nastaju tokom fermentacije. Pino i Quijano (2012), kao i Nikićević i Paunović (2013), ističu da su najvažnija jedinjenja odgovorna za karakterističnu aromu šljive: 1-heksanol, 1-nonanol, nonanal, benzaldehid, etil-heksanoat, etil-nonanat, etil-oktanoat, etil-dekanoat, butil-acetat, heksil-acetat, linalol, 1-feniletanol i γ -dekalakton. Najznačajnije grupe aromatičnih jedinjenja koja se formiraju tokom fermentacije kljuka od šljive su viši alkoholi, aldehidi i estri. Među nastalim estrima najdominantniji su acetatni estri etanola i viših alkohola (etil-acetat, izoamil-acetat, izobutil-acetat, benzil-acetat itd.) i etil estri masnih kiselina (etil-butirat, etil-laurat, etil-palmitat, etil-kaprinat itd.) (Tešević i sar., 2005).

U tabeli 4.6. prikazan je uticaj različitih vrsta kvasaca (autohtonih i selekcionisanih) na sastav i sadržaj aromatičnih jedinjenja vina od šljive.

Tabela 4.6. Aromatična jedinjenja vina od šljive (sorte Čačanska lepatica) proizvedenih upotrebom različitih vrsta kvasaca

Isparljiva komponenta	K	Alchemy I	Spiriferm	Spiriferm Arom	Oenoferm PinoType	Oenoferm Freddo	<i>Schiz. pombe</i> + <i>S.cerevisie</i>
Acetaldehid	2,9 ± 0,3 ^{cd}	1,1 ± 0,2 ^{ab}	1,4 ± 0,2 ^b	0,7 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,2 ^a	1,0 ± 0,1 ^{ab}	2,3 ± 0,2 ^c
Etil-acetat	36 ± 1 ^c	25 ± 0 ^a	29 ± 3 ^{ab}	30 ± 2 ^b	25 ± 4 ^a	21 ± 10 ^a	51 ± 20 ^d
Metanol	1158 ± 40 ^c	1110 ± 32 ^b	1115 ± 24 ^b	1068 ± 18 ^a	1148 ± 11 ^c	1099 ± 18 ^b	1179 ± 14 ^c
1-propanol	11,8 ± 1,1 ^b	9,1 ± 1,8 ^b	3,4 ± 0,8 ^a	8,2 ± 1,1 ^{ab}	4,0 ± 1,1 ^a	6,3 ± 0,7 ^a	3,0 ± 0,8 ^a
1-butanol	1,4 ± 0,2 ^a	3,3 ± 0,3 ^c	3,9 ± 0,5 ^{cd}	2,3 ± 0,1 ^{ab}	3,0 ± 0,2 ^{bc}	2,7 ± 0,3 ^b	1,7 ± 0,3 ^a
Izobutanol	9,5 ± 0,6 ^a	23,8 ± 1,2 ^c	24,9 ± 1,3 ^c	18 ± 0,9 ^b	15,1 ± 0,4 ^b	15,5 ± 0,5 ^b	17,2 ± 1 ^b
3-metil-1-butanol	3,7 ± 0,8 ^a	22,3 ± 1,6 ^{bc}	23,9 ± 1,7 ^c	20,2 ± 1,8 ^b	29,6 ± 2,2 ^d	16,9 ± 1,7 ^b	17,8 ± 1,0 ^b
1-heksanol	4,3 ± 0,2 ^{bc}	5,7 ± 0,6 ^c	3,3 ± 0,3 ^b	2,1 ± 0,3 ^a	3,7 ± 0,4 ^b	3,8 ± 0,5 ^b	1,4 ± 0,1 ^a
1-heptanol	10,6 ± 0,8 ^a	12,8 ± 0,8 ^b	13,4 ± 0,3 ^c	12,9 ± 0,5 ^b	13,8 ± 0,7 ^c	11,4 ± 0,4 ^a	11,8 ± 1,0 ^a
Furfural	-	0,9 ± 0,1 ^{ab}	1,5 ± 0,2 ^b	0,6 ± 0,1 ^a	0,4 ± 0,2 ^a	-	-
Benzaldehid	0,8 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,2 ^a	0,8 ± 0,0 ^a	1,3 ± 0,0 ^a	1,1 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,3 ^a	1,4 ± 0,1 ^a
1-oktanol	12,9 ± 0,2 ^b	12,6 ± 0,5 ^b	13 ± 0,5 ^b	13,8 ± 0,6 ^{bc}	14,9 ± 1,3 ^c	10,7 ± 1,1 ^a	9,6 ± 0,5 ^a
1-nonanol	3,7 ± 0,4 ^a	10,6 ± 0,0 ^b	14,6 ± 1,0 ^d	12,3 ± 1,1 ^c	9,9 ± 0,8 ^b	9,2 ± 0,7 ^b	10,1 ± 0,4 ^b
1-dekanol	3,8 ± 0,3 ^a	5,7 ± 0,3 ^b	4,7 ± 0,7 ^{ab}	5,2 ± 0,2 ^b	4,1 ± 0,8 ^a	4,4 ± 0,4 ^a	3,6 ± 0,2 ^a
Benzilalkohl	2,3 ± 0,1 ^{ab}	2,0 ± 0,3 ^a	2,6 ± 0,2 ^{ab}	2,3 ± 0,3 ^{ab}	-	1,7 ± 0,0 ^a	2,2 ± 1 ^{ab}
Etil-laktat	12,9 ± 1,2 ^c	13,8 ± 1,5 ^c	2,8 ± 0,1 ^a	4,4 ± 0,2 ^a	8,4 ± 0,8 ^b	6,4 ± 0,4 ^b	2,4 ± 0,3 ^a
Etil-izovalerat	0,4 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,2 ^b	0,7 ± 0,2 ^{ab}	0,4 ± 0,1 ^a	0,6 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,1 ^a	-
Izoamil-acetat	1,2 ± 0,1 ^{ab}	1,1 ± 0,3 ^{ab}	0,7 ± 0,1 ^a	1,7 ± 0,4 ^b	0,9 ± 0,2 ^a	1,7 ± 0,2 ^b	1,0 ± 0,1 ^a
Amil-acetat	0,8 ± 0,4 ^a	1,4 ± 0,2 ^b	1,5 ± 0,3 ^b	0,6 ± 0,2 ^a	-	0,5 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,3 ^a
Linalol	1,2 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,2 ^a	1,4 ± 0,3 ^a	1,1 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,1 ^a
1-feniletanol	6,9 ± 0,8 ^a	19,7 ± 1,1 ^b	27,9 ± 0,8 ^c	18,5 ± 1,3 ^b	21,5 ± 1,0 ^b	22,5 ± 1,3 ^b	19,5 ± 0,7 ^b
Etil-heksanoat	-	-	0,4 ± 0,3 ^a	0,6 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,2 ^a	-	-
Etil-oktanoat	0,8 ± 0,2 ^a	0,8 ± 0,3 ^a	0,7 ± 0,3 ^a	0,4 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,3 ^a	0,5 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,2 ^a
α-terpineol	0,3 ± 0,2 ^a	-	0,4 ± 0,1 ^a	0,7 ± 0,4 ^a	-	-	0,5 ± 0,1 ^a
Benzil-acetat	0,8 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,3 ^b	0,6 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,1 ^{ab}	0,8 ± 0,2 ^a	0,6 ± 0,3 ^a
Geraniol	1,7 ± 0,3 ^a	1,5 ± 0,4 ^a	1,6 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,3 ^a	1,8 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,4 ^a	1,6 ± 0,2 ^a
Etil-dekanoat	-	0,7 ± 0,2 ^a	0,7 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,3 ^a	0,6 ± 0,2 ^a	0,5 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,1 ^a
Etil-laurat	*	0,4 ± 0,1 ^a	0,9 ± 0,3 ^b	-	0,3 ± 0,1 ^a	0,5 ± 0,3 ^a	0,3 ± 0,2 ^a
Etil-palmitat	1,6 ± 0,1 ^{ab}	1,9 ± 0,2 ^b	1,6 ± 0,2 ^{ab}	1,3 ± 0,3 ^a	1,6 ± 0,3 ^{ab}	1,1 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,2 ^a

^{a, b, c} različita slova u okviru istog reda označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$).

* - nije detektovano.

Metabolička aktivnost različitih autohtonih i/ili selekcionisanih kvasaca tokom fermentacije kljuka od šljive rezultirala je značajnim razlikama u sadržaju pojedinih aromatičnih jedinjenja u proizvedenim vinima. Izobutanol, 3-metil-1-butanol, 1-heptanol i 1-oktanol čine preko 80% ukupne količine viših alkohola u ispitanim uzorcima vina. Najdominantniji estar u

vinima od šljive je etil-acetat (21-51 mg/l), dok su u većim količinama prisutni i etil-laktat, amil-acetat, izoamil-acetat i etil-palmitat (estri odgovorni za voćne i cvetne mirisne tonove).

Vino proizvedeno aktivnošću autohtonih kvasaca šljive (K) karakteriše visok sadržaj acetaldehida i etil acetata, kao posledica izražene aktivnosti oksidativnih (ne-*Saccharomyces*) kvasaca. U istom vinu određen je značajan sadržaj pojedinih viših alkohola (1-propanol, 1-heksanol i 1-oktanol) i aromatičnih estara (etil-laktat, izoamil-acetat i etil-palmitat). Može se primetiti da je produkcija viših alkohola od strane autohtonih kvasaca šljive, generalno, značajno slabija u odnosu na čiste kulture selekcionisanih sojeva *S. cerevisiae* i *S. bayanus*. Do sličnih rezultata su u svom radu došli Satora i Tuszyński (2010). Oni ističu da je sadržaj viših alkohola u jakim alkoholnim pićima proizvedenim spontanom fermentacijom kljuka šljive približno dva puta manji u odnosu na uzorke dobijene fermentacijom selekcionisanim sojevima *S. cerevisiae*. Slabije izražena produkcija ovih jedinjenja može se pripisati aktivnosti kvasca *K. apiculata* u početnim fazama spontane fermentacije. Ovaj kvasac karakteriše slaba produkcija viših alkohola. Takođe, vino proizvedeno spontanom fermentacijom karakteriše značajno niži sadržaj 1-feniletanola, alkohola kojeg kvasci, u anaerobnom uslovima, stvaraju iz L-fenilalanina. 1-feniletanol daje vinu prijatne mirisne tonove ruže. Kvasci epifitne mikroflore voća (*Kloeckera* / *Hanseniaspora*, *Candida stellata*), za razliku od *S. cerevisiae* i *Hansenula anomala*, produkuju znatno niže koncentracije ovog aromatičnog alkohola (Clemente-Jimenez i sar., 2004). Rezultati studije autora Zohre i Erten (2002) ukazuju da predstvanike rodova *Kloeckera* / *Hanseniaspora* karakteriše veoma intenzivno formiranje jedinjenja estarske strukture. Međutim, čiste kulture selekcionisanih kvasaca *S. cerevisiae* i *S. bayanus*, korištene u ovoj disertaciji, pokazale su se efikasnijim u proizvodnji aromatičnih estara od kvasaca epifitne mikroflore.

Upotrebom kvasca Alchemy I dobijeno je vino u kome su određene značajno veće koncentracije 1-butanola, izobutanola, 3-metil-1-butanola, 1-dekanola, etil-laktata, etil-izovalerata i amil-acetata, u odnosu na ostala eksperimentalna vina. Vino proizvedeno ovim sojem kvasca sadrži i najveću količinu 1-heksanola, jedinjenja koje doprinosi tzv. „zelenim“ tonovima arome šljive. Najviši sadržaj 1-nonanola i 1-feniletanol, jednih od najznačajnijih determinatora arome šljive, određen je u vinu proizvedenom upotrebom kvasca Spiriferm. Ovo vino karakteriše i najviši sadržaj benzilalkohola, amil-acetata, benzil-acetata, izobutanola, etil-laurata i furfurala, kao i izrazito male koncentracije etil-laktata i izoamil-acetata. Kvasac Spiriferm Arom odgovoran je za dobijanje vina sa najvišim sadržajem izoamil-acetata i etil-heksanoata, dok vino proizvedeno upotrebom kvasca Oenoferm PinoType sadrži najviše 3-metil-1-butanola, 1-heptanola i 1-oktanol. Vina proizvedena aktivnošću sojeva Oenoferm PinoType i Oenoferm Freddo ne razlikuju se značajnije u sastavu i sadržaju aromatičnih jedinjenja. Statistički značajne ($p < 0,05$) razlike uočavaju se samo u sadržaju 3-metil-1-butanola, 1-heptanola, benzilalkohola i izoamil-acetata. Sekvencijalna inokulacija kljuka šljive sa *Schiz. pombe* i *S. cerevisie* rezultirala je proizvodnjom vina kod kojeg je sadržaj aromatičnih jedinjenja uglavnom manji u odnosu na mikroviniifikacije u kojima je korištena po jedna kultura selekcionisanog kvasca. Može se zapaziti da je u ovom vinu određen najviši sadržaj etil-acetata

(51 mg/l), koji se smatra posledicom povećane produkcije sirćetne kiseline od strane *Schiz. pombe*. Takođe, vino karakteriše i odsustvo furfurala, etil-izovalerata i etil-heksanoata.

Kvasci autohtone mikrobiote sorte Čačanska leptotica, soj *S. cerevisiae* Oenoferm PinoType i sekvencijalno inokulirani sojevi *Schiz. pombe* i *S. cerevisiae* stvaraju pektin metil esterazu najizraženije aktivnosti, što se ogleda u statistički značajno ($p < 0,05$) višem sadržaju metanola u odnosu na vina proizvedena upotrebom preostalih ispitanih kvasaca. Upotreba različitih radnih mikroorganizama nije statistički značajno ($p < 0,05$) uticala na sadržaj benzaldehida, benzilalkohola, linalola, etil-heksanoata, α -terpineol, geraniola i etil-dekanoata u proizvedenim vinima. Jedinjenja terpenke prirode (linalol, geraniol i α -terpineol) su nosioci olfaktivnih svojstava same sirovine (sorte šljive) i njihov sadržaj se ne menja značajno tokom fermentacije vina. Etil-heksanoat, jedan od glavnih nosioca arome šljive (Nikićević i Paunović, 2013), određen je samo u vinima proizvedenim aktivnišću sojeva Spirifer, Spirifer Arom i Oenoferm PinoType (0,3-0,6 mg/l), dok je u ostalim vinima bio ispod granice detekcije. Takođe, treba istaći da je sadržaj etil-dekanoata, jednog od estara odgovornih za cvetne i voćne tonove arome šljive (Tešević i sar., 2005), nešto niži u proizvedenim vinima od šljive u poređenju sa literaturnim podacima.

S obzirom da je uticaj različitih radnih mikroorganizama na aromatična jedinjenja vina sorte Čačanska leptotica detaljno analiziran (tabela 4.6.), cilj istraživanja, u sklopu ovog poglavlja, bio je i da se razdvoji, međusobno uporedi, i oceni uticaj autohtone mikrobiote tri ispitivane sorte šljive. U tabeli 4.7. dat je uporedni prikaz sadržaja aromatičnih jedinjenja vina od ispitivanih sorti domaće šljive proizvedenih spontanom fermentacijom.

Spontana fermentacija kljuka od ispitanih sorti domaće šljive rezultirala je proizvodnjom vina različitih aromatskih karakteristika. Najveće razlike među vinima zabeležene su po pitanju sadržaja 1-propanola, 1-heksanola, etil-laktata, izoamil-acetata, 1-feniletanola, etil-oktanoata, etil-dekanoata i etil laurata. Sadržaj 1-butanola, 1-heptanola, benzaldehida, 1-oktanol, 1-dekanol i benzilalkohol nije se statistički značajno ($p < 0,05$) razlikovao u proizvedenim vinima. Vino sorte Čačanska rana karakteriše najviši sadržaj izoamil-acetata, linalol, α -terpineol, etil-laurat i etil-palmitat. U poređenju sa vinima druge dve sorte, može se zapaziti odsustvo etil-izovalerata i geraniola, kao i prisustvo male količine, za šljive karakterističnog, estera etil-heksanoata. Sa druge strane, najviši sadržaj acetaldehida, izobutanol, furfural, 1-nonanol, etil-izovalerata, 1-feniletanol i etil-dekanoat, najniži sadržaj 1-propanol i izoamil-acetata, kao i odsustvo etil-heksanoata, etil-oktanoata i benzil-acetata, odlike su vina proizvedenog od sorte Požegača. Nastajanje metanola, kao posledica sadržaja i strukture pektinskih materija i aktivnosti pektin metil esteraze šljive, komercijalnog enzimskog preparata i kvasca (u manjoj meri), bilo je najintenzivnije kod vina sorte Čačanska rana (1250mg/l), a najmanje izraženo kod Požegače (1056 mg/l). Glavne karakteristike vina sorte Čačanska leptotica su najviši sadržaji 1-propanol, 1-heksanol, etil-laktat i etil oktanoat, kao i odsustvo furfurala, etil-heksanoata, etil dekanol i etil laurata. Rezultati koji ukazuju na odsustvo pojedinih aromatičnih jedinjenja u vinu ne isključuju mogućnost njihovog prisustva u količinama manjim od granice detekcije primenjene metode.

Tabela 4.7. Aromatična jedinjenja vina od ispitivanih sorti domaće šljive proizvedenih spontanom fermentacijom

Isparljiva komponenta	Čačanska rana	Čačanska lepoticica	Požegača
	[mg/l vina]		
Acetaldehid	3,1 ± 0,1 ^a	2,9 ± 0,3 ^a	4,3 ± 0,5 ^b
Etil-acetat	28 ± 3 ^a	36 ± 1 ^{ab}	31 ± 5 ^a
Metanol	1250 ± 22 ^c	1158 ± 40 ^b	1056 ± 19 ^a
1-propanol	7,4 ± 0,7 ^b	11,8 ± 1,1 ^c	3,9 ± 0,2 ^a
1-butanol	1,1 ± 0,2 ^a	1,4 ± 0,2 ^{ab}	0,9 ± 0,3 ^a
Izobutanol	8,8 ± 0,4 ^a	9,5 ± 0,6 ^a	15,6 ± 16 ^b
3-metil-1-butanol	10,3 ± 1,1 ^b	3,7 ± 0,8 ^a	9,9 ± 12 ^b
1-heksanol	1,3 ± 0,3 ^a	4,3 ± 0,2 ^c	2,9 ± 0,1 ^b
1-heptanol	9,8 ± 1,2 ^a	10,6 ± 0,8 ^a	11,1 ± 1,1 ^a
Furfural	0,9 ± 0,2 ^a	-	2,5 ± 4 ^b
Benzaldehid	0,6 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,0 ^a
1-oktanol	13,1 ± 0,5 ^a	12,9 ± 0,2 ^a	13,8 ± 0,6 ^a
1-nonanol	3,9 ± 0,2 ^a	3,7 ± 0,4 ^a	8,1 ± 0,4 ^b
1-dekanol	3,8 ± 0,4 ^a	3,8 ± 0,3 ^a	4,3 ± 0,7 ^a
Benzilalkohol	1,7 ± 0,0 ^a	2,3 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,3 ^a
Etil-laktat	1,1 ± 0,2 ^a	12,9 ± 1,2 ^c	4,1 ± 0,2 ^b
Etil-izovalerat	-	0,4 ± 0,2 ^a	0,9 ± 0,1 ^b
Izoamil-acetat	1,8 ± 0,2 ^c	1,2 ± 0,1 ^b	0,6 ± 0,2 ^a
Amil-acetat	0,9 ± 0,2 ^a	0,8 ± 0,4 ^a	1,2 ± 0,1 ^a
Linalol	1,9 ± 0,3 ^b	1,2 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,2 ^a
1-feniletanol	9,4 ± 0,5 ^b	6,9 ± 0,8 ^a	16,5 ± 0,4 ^c
Etil-heksanoat	0,6 ± 0,1 ^a	-	-
Etil-oktanoat	0,3 ± 0,1 ^a	0,8 ± 0,2 ^b	-
α-terpineol	0,9 ± 0,1 ^b	0,3 ± 0,2 ^a	0,3 ± 0,2 ^a
Benzil-acetat	0,6 ± 0,4 ^a	0,8 ± 0,2 ^a	-
Geraniol	-	1,7 ± 0,3 ^a	1,4 ± 0,1 ^a
Etil-dekanoat	0,8 ± 0,4 ^a	-	1,4 ± 0,1 ^b
Etil-laurat	1,5 ± 0,2 ^b	-*	0,8 ± 0,1 ^a
Etil-palmitat	2,4 ± 0,2 ^b	1,6 ± 0,1 ^a	1,5 ± 0,1 ^a

^{a, b, c} različita slova u okviru istog reda označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$).

* - nije detektovano.

Senzorna analiza dobijenih vina

Posebna pažnja prilikom ispitivanja uticaja različitih procesnih parametara i postupaka vinifikacije mora biti usmerena ka oceni senzorne prihvatljivosti i kvaliteta svakog proizvedenog vina. S obzirom da je upotreba ispitanih vrsta i sojeva kvasaca rezultovala proizvodnjom vina različitog sastava isparljivih komponenti cilj je bio i da se oceni uticaj uočenih razlika na senzorne karakteristike vina. Evaluacija senzornih svojstava vina od šljive sprovedena je od strane panela sastavljenog od pet kvalifikovanih ocenjivača. Rezultati senzorne analize vina

proizvedenih prema optimizovanom postupku fermentacije, upotrebom različitih vrsta kvasaca, prikazani su u tabeli 4.8.

Tabela 4.8. Rezultati senzorne analize vina od šljive sorte Čačanska lepotica proizvedenih upotrebom različitih vrsta kvasaca.

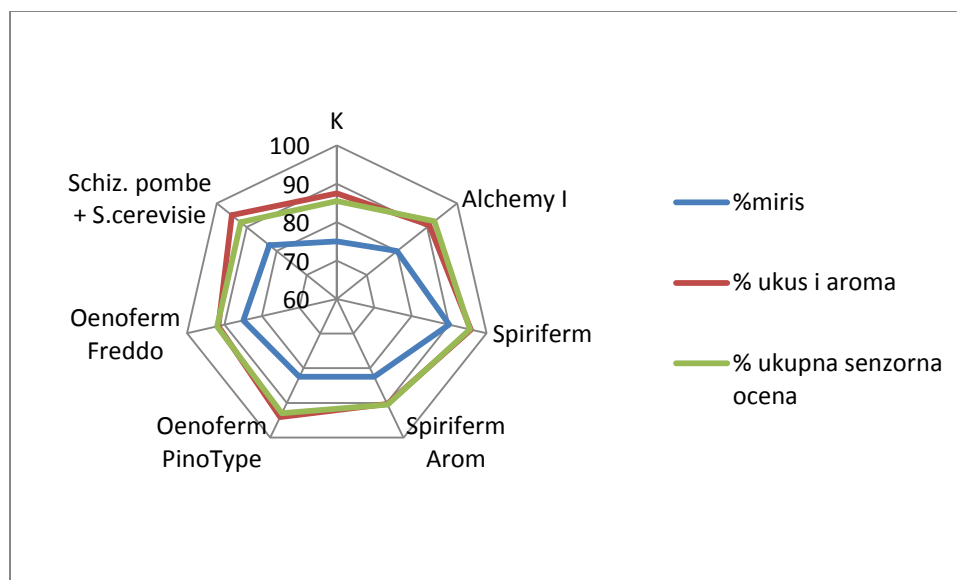
	Boja (max 2 poena)	Izgled (max 2 poena)	Miris (max 4 poena)	Ukus i aroma (max 12 poena)	Ukupno (max 20 poena)
K	1,8 ^a	1,8 ^a	3 ^a	10,5 ^a	17,1 ^a
Alchemy I	2 ^a	2 ^a	3,2 ^{ab}	11,3 ^b	18,5 ^c
Spiriform	2 ^a	2 ^a	3,6 ^c	11,5 ^c	19,1 ^d
Spiriform Arom	1,9 ^a	2 ^a	3,3 ^b	10,9 ^b	18,1 ^b
Oenoferm PinoType	2 ^a	2 ^a	3,3 ^b	11,3 ^c	18,6 ^c
Oenoferm Freddo	2 ^a	2 ^a	3,4 ^{bc}	11,0 ^b	18,4 ^{bc}
<i>Schiz. pombe</i> + <i>S.cerevisie</i>	1,8 ^a	1,9 ^a	3,3 ^b	11,4 ^c	18,4 ^{bc}

rezultati prikazani u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ocena pet članova panela.

^{a, b, c} različita slova u okviru istog reda označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$).

Rezultati senzorne analize (tabela 4.8.) ukazuju da statistički značajne ($p < 0,05$) razlike u mirisu, kao i ukusu i aromi karakterišu vina od šljive proizvedena upotrebom različitih vrsta kvasca. Sa druge strane, razlike u boji i izgledu (bistrini) vina mogu se smatrati neznačajnim. Po pitanju mirisa, najbolje je ocenjeno vino proizvedeno aktivnošću kvasca Spiriform. Sekvencijalna inokulacija kljuka šljive sa *Schiz. Pombe* i *S.cerevisie*, kao i primena kvasca Spiriform i Oenoferm PinoType, rezultirala je proizvodnjom vina sa najbolje ocenjenim ukusom i aromom (11,3-11,5 poena). Treba istaći da sojevi *S. cerevisiae* (komercijalnih oznaka Alchemy I, Spiriform I Oenoferm PinoType) daju vina koja karakteriše intenziviji i harmoničniji ukus i aroma, u poređenju sa sojevima *S. bayanus* (komercijalnih naziva Spiriform arom i Oenoferm Freddo), što je i potvrđeno rezultatima senzorne analize. Može se uočiti da su vina sojeva *S. cerevisiae* dobila statistički značajno veće ocene za ukus i aromu u odnosu na vina sojeva *S. bayanus*. Najveću ukupnu ocenu senzorne analize dobilo je vino proizvedeno upotrebom kvasca Spiriform (19,1). Dobre senzorne karakteristike i visoka ukupna ocena panela ocenjivača (18,4-18,5) zabeleženi su i kod vina dobijenih aktivnošću sojeva Alchemy I i Oenoferm PinoType. Najslabija senzorna svojstva utvrđena su kod vina proizvedog spontanom fermentacijom (K), koje je ponelo ukupno 17,1 poen.

U cilju potpunijeg prikaza rezultata senzorne analize ocene pojedinačnih parametara (miris, ukus i aroma), kao i ukupna ocena, takođe su izraženi preko procenata (stepena) senzorne prihvatljivosti (slika 4.2.). Pod stepenom senzorne prihvatljivosti podrazumeva se odnos broja ostvarenih poena u odnosu na definisani maksimum.



Slika 4.2. Senzorna analiza vina od šljive proizvedenih upotrebom različitih vrsta kvasaca izražena preko procenta ukupne prihvatljivosti, kao i prihvatljivosti pojedinih parametara.

U tabeli 4.9. prikazani su rezultati senzorne analize vina od sorti domaće šljive proizvedenih spontanom fermentacijom.

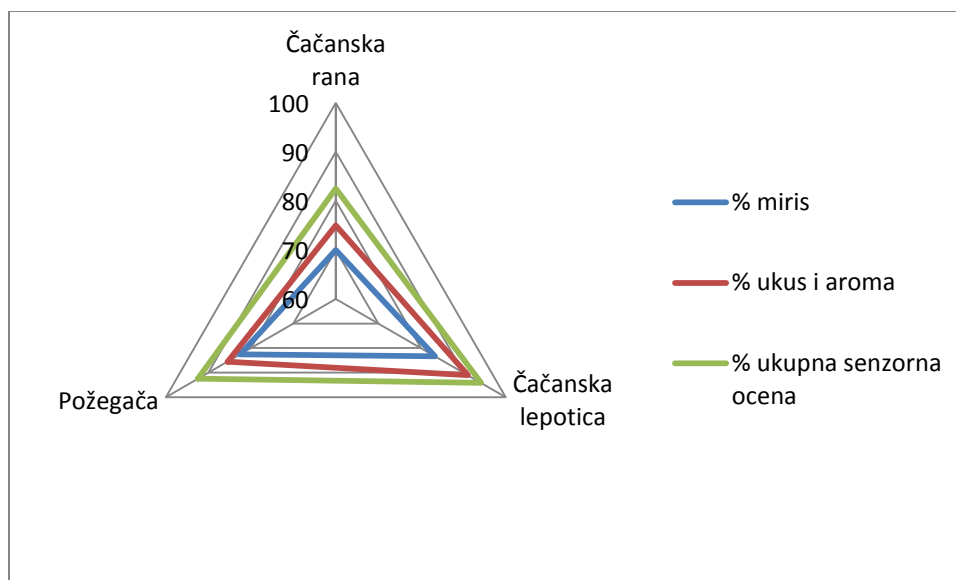
Tabela 4.9. Senzorna analiza vina od sorti domaće šljive proizvedenih spontanom fermentacijom.

	Boja (max 2 poena)	Izgled (max 2 poena)	Miris (max 4 poena)	Ukus i aroma (max 12 poena)	Ukupno (max 20 poena)
Čačanska rana	1,7 ^a	2 ^a	2,8 ^a	10,0 ^a	16,5 ^a
Čačanska lepotica	1,8 ^a	1,8 ^a	3 ^a	10,5 ^b	17,1 ^b
Požegača	1,9 ^a	2 ^a	3,3 ^b	11,3 ^c	18,5 ^c

Rezultati prikazani u tabeli predstavljaju srednje vrednosti ocena pet članova panela.

^{a, b, c} različita slova u okviru istog reda označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$).

Poređenjem senzornih karakteristika vina od tri ispitivane sorte šljive proizvedenih spontanom fermentacijom uočavaju se statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u njihovom mirisu, ukusu i aromi, nasuprot relativno ujednačenih ocena za boju i izgled (bistrinu). Najveća prosečna ocena za miris dodeljena je vinu sorte Požegača, s obzirom da su u njemu utvrđeni najčistiji i najkarakterističniji tonovi mirisa šljive. Takođe, ovo vino karakteriše najbolji ukus i aroma, te je i sveukupno ocenjeno najvišim brojem poena. Požegača se smatra najpogodnijom sortom šljive za proizvodnju rakije pre svega zbog visoke koncentracije mirisnih materija u plodu (Nikićević i Paunović, 2013). Sa druge strane, u slučaju vina sorte Čačanska rana, fermentacija od strane autohtone miktobiote rezultirala je vinom nešto lošijih senzornih karakteristika. Ukupan broj poena dodeljen ovom vinu statistički je značajno ($p < 0,05$) manji u odnosu na vina druge dve sorte. Rezultati senzorne analize su, i u ovom slučaju, prikazani i preko procenata (stepena) senzorne prihvatljivosti mirisa, ukusa i arome vina (slika 4.3).



Slika 4.3. Senzorna analiza vina od šljive proizvedenih spontanom fermentacijom izražena preko procenta ukupne prihvatljivosti, kao i prihvatljivosti pojedinih parametara.

Može se zaključiti da upotreba čistih kultura selekcionisanih kvasaca rezultira proizvodnjom vina od šljive boljih senzornih karakteristika u odnosu na postupak koji uključuje spontanu fermentaciju.

Uzimajući u obzir dobijene rezultate za efikasnost fermentacije, sadržaj aromatičnih jedinjenja, kao i ocene senzorne analize, može se zaključiti da kvasac Spriferm daje vino od šljive najboljeg kvaliteta, te je ovaj *S. cerevisiae* soj bio primenjen u daljim istraživanjima.

4.2.4. Ispitivanje uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljive: Preliminarni skrining

Da bi se obezbedili najbolji pokazatelji kvaliteta vina od šljiva, neophodno je ispitati i optimizovati parametre fermentacije. Najvažniji procesni parametri koji utiču na fermentaciju vina su, generalno, temperatura, vrednost pH i vreme trajanja fermentacije. Poređenjem rezultata analiza hemijskog sastava tri sorte domaće šljive (tabela 4.2) i literaturnih podataka (Bisson, 1991; Henschke i Jiranek, 1993; Ribéreau-Gayon i sar., 1999; Bell i Henschke, 2005) može se zaključiti da ove polazne sirovine za proizvodnju vina sadrže dovoljnu količinu azotnih i mineralnih materija za nesmetanu metaboličku aktivnost kvasca kao proizvodnog mikroorganizma tokom alkoholne fermentacije. Prema tome, može se smatrati da sadržaji azota i mineralnih materija ne predstavljaju limitirajuće faktore pri primenjenim eksperimentalnim uslovima.

Preliminarni skrining procesa fermentacije podrazumevao je ispitivanje uticaja odabranih procesnih parametara (temperatura, pH i vreme fermentacije) koji su varirani u granicama karakterističnim (optimalnim) za proizvodnju vina, na kvalitet voćnog vina od šljive izražen

preko sadržaja etanola, glicerola i metanola. Etanol je glavni proizvod alkoholne fermentacije šećera iz voćnih sokova i doprinosi harmoničnosti ukusa vina. Kao organski rastvarač, etanol doprinosi ekstrakciji bojnih i fenolnih jedinjenja iz pokožice voća tokom fermentacije. Pored uticaja na senzorne karakteristike on takođe doprinosi i mikrobiološkoj stabilnosti vina. Glicerol je neisparljivi trohidroksilni alkohol, slatkog ukusa, bez aromatičnih svojstava, koji znatno doprinosi kvalitetu vina obezbeđujući punoću ukusa (Ribereau-Gayon i sar., 1999; Remize i sar., 2000). Metanol je prirodni sastojak alkoholnih pića i sokova koji nastaje demetoksikacijom pektinskih materija i predstavlja bitan parametar kvaliteta s obzirom da je ovo jedinjenje, tj. produkti koji nastaju njegovim metaboličkim transformacijama (formaldehid i, naročito, mravlja kiselina), toksično za čoveka ukoliko se unese u organizam u većim količinama.

Optimalne vrednosti temperature i pH za aktivnost kvasca *Saccharomyces cerevisiae* nalaze su u opsegu 30-35 °C, odnosno 4,5-6,5 (Walker, 1998). Generalno, optimalnim uslovima za fermentaciju vina smatraju se temperature 15-25 °C i vrednosti pH u opsegu 3,0-3,6 (Ribereau-Gayon i sar., 1999; Jackson, 2008). Primena pomenutih uslova odgovorna je za sporišu produkciju etanola, ali smanjuje rizik od potencijalnog kvarenja vina.

Rezultati ispitivanja uticaja praćenih parametara fermentacije na sadržaj etanola, glicerola i metanola u vinu od šljiva prikazani su u tabeli 4.10. Višestruka regresiona analiza je izvršena u cilju fitovanja eksperimentalnih rezultata odzivnih funkcija (Y_{1-3}), pri čemu su dobijene zavisnosti koje se mogu aproksimirati polinomom drugog reda (tabela 4.11).

Regresioni koeficijenti ($b_0, b_1, b_2, \dots, b_{13}$) korišteni su za konstruisanje odzivnih površina ispitivanih izlaznih promenljivih (Y_{1-3}). Dobijeni modeli doprinose boljem razumevanju uticaja različitih vrednosti pH, temperature i vremena fermentacije, kao i međusobnih interakcija ovih promenljivih, na tok fermentacije i kvalitet proizvedenih vina. Krajnji cilj primene metode odzivne površine funkcije je optimizacija posmatranog procesa.

Na osnovu dobijenih odzivnih površina (slike 4.4-4.6) može se lakše uočiti i analizirati efekat temperature, pH i vremena trajanja fermentacije na posmatrane odzive. U cilju procene prihvatljivosti postavljenih fitovanih modela određen je koeficijent determinacije (R^2). Za određivanje stepena adekvatnosti i značajnosti dobijenih kvadratnih modela korišćena je analiza varijanse (ANOVA). U tom smislu, značajnost modela, kao i uticaja pojedinačnih faktora, ocenjena je pomoću Fišerov-og F testa (*F-vrednosti*) i *p-vrednosti* pri stepenu značajnosti $\alpha=0,05$, a rezultati su prikazani u tabeli 4.12. Sa pouzdanošću od 95%, utvrđena je značajnost dobijenih regresionih modela parametara kvaliteta vina. Visoke vrednosti koeficijenata determinacije ($R^2 > 0,90$) ukazuju na to da se najmanje 90% varijacija ispitivanih odziva može objasniti fitovanim jednačinama drugog reda.

Tabela 4.10. Ispitivanje uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljive sorte Čačanska leptotica primenom centralnog kompozitnog eksperimentalnog plana (CCD)

Temperatura (°C)	Vreme fermen. ¹ (dan)	pH	Etanol (% v/v)	Metanol (mg/l)	Glicerol (g/l)
X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
11,59	5	3,3	1,11	387	1,3
15,00	3	3,6	0,64	787	2,53
15,00	3	3,0	0,4	580	2,1
15,00	7	3,6	4,35	1094	3,41
15,00	7	3,0	3,64	955	3,1
20,00	1,64	3,3	0,6	489	0,96
20,00	5	3,3	4,23	1207	4,25
20,00	5	3,3	3,97	1169	4,05
20,00	5	3,3	4,34	1222	4,4
20,00	5	3,8	4,42	1240	4,7
20,00	5	3,3	4,62	1199	4,3
20,00	5	3,3	4,41	1135	4,1
20,00	5	3,3	4,19	1188	4,39
20,00	5	2,8	3,72	1006	3,75
20,00	8,36	3,3	6,08	1204	4,95
25,00	3	3,6	3,74	1101	3,45
25,00	3	3,0	3,34	1028	3,15
25,00	7	3,0	5,9	1240	5,34
25,00	7	3,6	6,23	1265	5,72
28,41	5	3,3	5,96	1236	4,8

¹Vreme fermentacije

Tabela 4.11. Polinomski oblici fitovanih odziva ispitivanih parametara

Parametri	Model	R ²
Etanol	$Y_1 = -27,8149 + 0,9035X_1 + 1,8612X_2 + 7,6636X_3 - 0,0237X_1X_2 - 0,0183X_1X_3 + 0,0833X_2X_3 - 0,0114X_1^2 - 0,0884X_2^2 - 1,0631X_3^2$	0,987
Metanol	$Y_2 = -5550,7745 + 306,2226X_1 + 489,5587X_2 + 919,1365X_3 - 3,8250X_1X_2 - 20,6667X_1X_3 - 24,1667X_2X_3 - 4,5037X_1^2 - 25,0548X_2^2 - 27,3553X_3^2$	0,934
Glicerol	$Y_3 = -3,0893 + 0,6409X_1 + 0,9975X_2 - 3,3613X_3 + 0,0259X_1X_2 - 4,1667E-3X_1X_3 - 0,0104X_2X_3 - 0,0144X_1^2 - 0,0982X_2^2 + 0,6226X_3^2$	0,958

Tabela 4.12. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva i regresionih koeficijenata

Izvor	F-vrednost			p-vrednost		
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
Model	152,02	19,09	32,17	< 0,0001*	< 0,0001*	< 0,0001*
X ₁	548,74	76,44	110,91	< 0,0001*	< 0,0001*	< 0,0001*
X ₂	734,62	48,53	122,73	< 0,0001*	< 0,0001*	< 0,0001*
X ₃	13,32	9,24	6,56	0,0045*	0,0125*	0,0283*
X ₁ X ₂	10,06	0,64	8,19	0,0100*	0,4408**	0,0169*
X ₁ X ₃	0,13	0,23	0,0044	0,7211**	0,6425**	0,9483**
X ₂ X ₃	0,45	0,24	0,0019	0,5195**	0,6320**	0,9655**
X ₁ ²	26,06	21,74	19,72	0,0005*	0,0009*	0,0013*
X ₂ ²	40,20	17,22	23,43	< 0,0001*	0,0020*	0,0007*
X ₃ ²	2,94	0,038	0,26	0,1172**	0,8495**	0,6231**

X₁: temperatura (°C); X₂: vreme trajanja fermentacije (dan); X₃: pH;

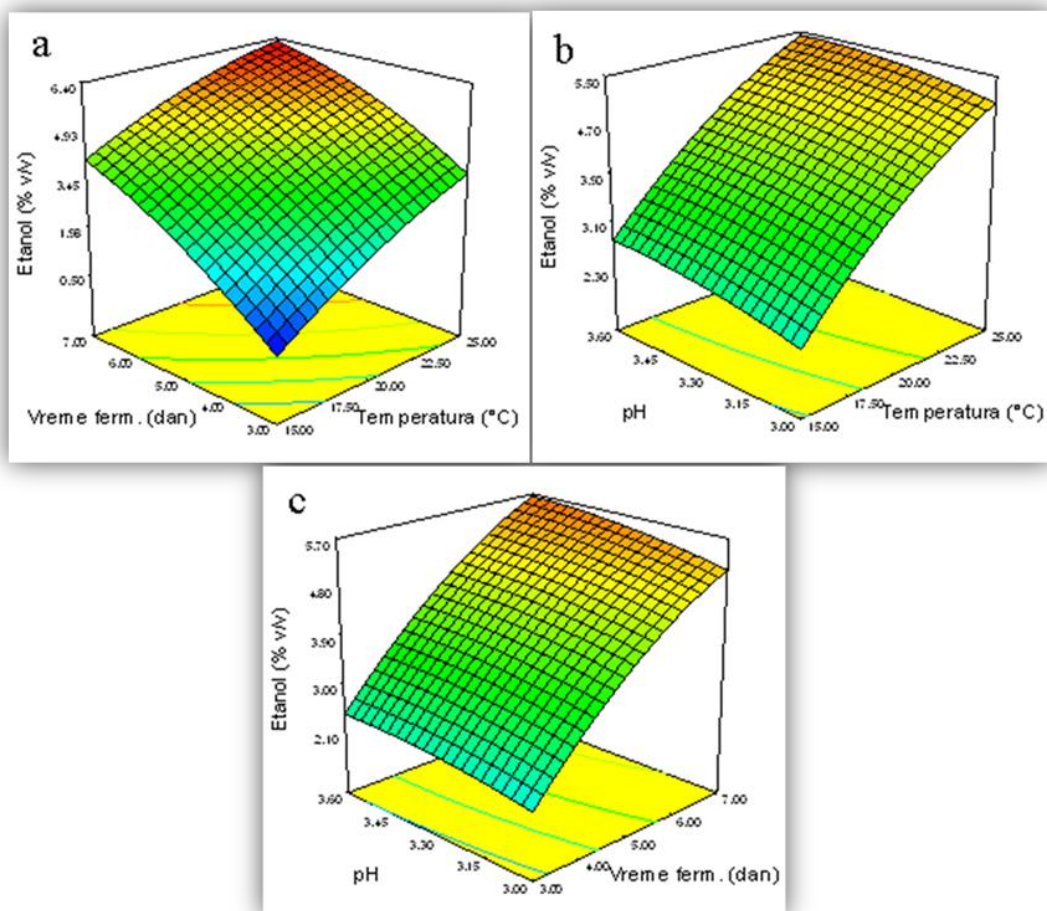
Y₁: etanol (% v/v); Y₂: metanol (mg/l); Y₃: glicerol (g/l);

* Značajno pri $p < 0,05$, ** nije značajno;

Na osnovu dobijenih rezultata za sadržaj etanola (3,64 – 4,35% v/v) u proizvedenim vinima i neprevrelog šećera u komini šljive može se uočiti da se fermentacije na 15 °C nisu završile u posmatranom vremenu (7 dana). Maksimalan sadržaj etanola (6,23%) postignut je tokom fermentacije na 25 °C, pri vrednosti pH 3,6, nakon 7 dana fermentacije. Povećanje temperature fermentacije dovodi do intenzivnog povećanja produkcije etanola, dok uticaj pH nije bio toliko značajno izražen.

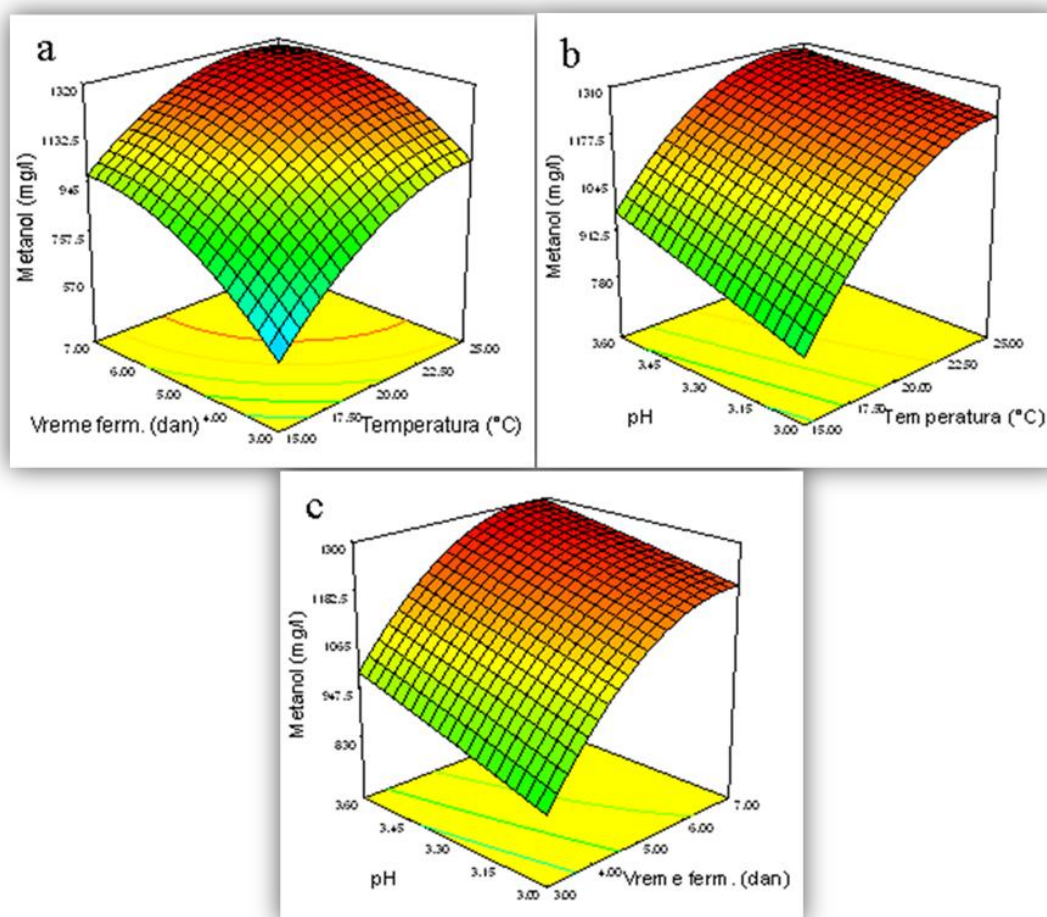
Slika 4.4_{a-c} prikazuje efekat uticaja ispitivanih nezavisnih promenljivih na sadržaj etanola u vinu. Visoka vrednost koeficijenta determinacije od 0,987 ukazuje da fitovani polinom drugog reda dobro aproksimira eksperimentalne rezultate za sadržaj etanola budući da svega 1,13% varijacija nije obuhvaćeno dobijenim modelom. Takođe, potvrđena je adekvatnost i značajnost modela Y₁ ($p < 0,05$). Parametri X₁, X₂, X₃, X₁², X₂² i X₁X₂ su značajni na nivou 0,05 ($p < 0,05$), dok parametri X₁X₃ i X₂X₃ i X₃² nemaju statistički značajan uticaj na sadržaj etanola (tabela 4.12). Na osnovu p -vrednosti ($p < 0,0001$) na nivou značajnosti od 95%, može se zapaziti da najveći efekat na ovaj odziv imaju linearni efekti temperature i vremena fermentacije, kao i kvadratni član vremena fermentacije.

Posmatranjem regresionih koeficijenata statistički značajnih članova ovog fitovanog modela (tabela 4.11) može se zaključiti da sadržaj etanola u pozitivnoj korelaciji sa temperaturom, vremenom fermentacije i pH, i negativnoj sa interakcijom temperature i vremena fermentacije, kao i kvadratnim efektima temperature i vremena fermentacije.



Slika 4.4. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na sadržaj etanola u vinu od šljive sorte Čačanska lepotica:
 a) temperatura i vreme fermentacije (pH=3,3),
 b) temperatura i pH (vreme fermentacije=5 dana)
 c) vreme fermentacije i pH (temperatura=20 °C).

Kao što je već naglašeno u pregledu literature ove disertacije, metanol nije proizvod alkoholne fermentacije, već isključivo nastaje enzimskom hidrolizom metoksi grupa pektinskih materija (Ribereau-Gayon i sar., 1999). Sa slike 4.5_{a-c} može se primetiti da se najveći deo metanola formira u prvih četiri dana, što je u skladu sa literaturnim podacima koji ističu da je aktivnost enzima pektin metil esteraze najveća na početku fermentacije vina (Lee i sar., 1979). Pored toga, zabeležen je eksponencijalni rast koncentracije metanola sa povećanjem temperature fermentacije. Sa druge strane, povećanje vrednosti pH kljuka u ispitanom opsegu, dovodi samo do blagog porasta koncentracije ove komponente vina. Dakle, maksimalni sadržaj metanola (1265 mg/l) dobijen je primenom sledećih parametara fermentacije: 25 °C, pH 3,6 i 7 dana trajanja fermentacije.

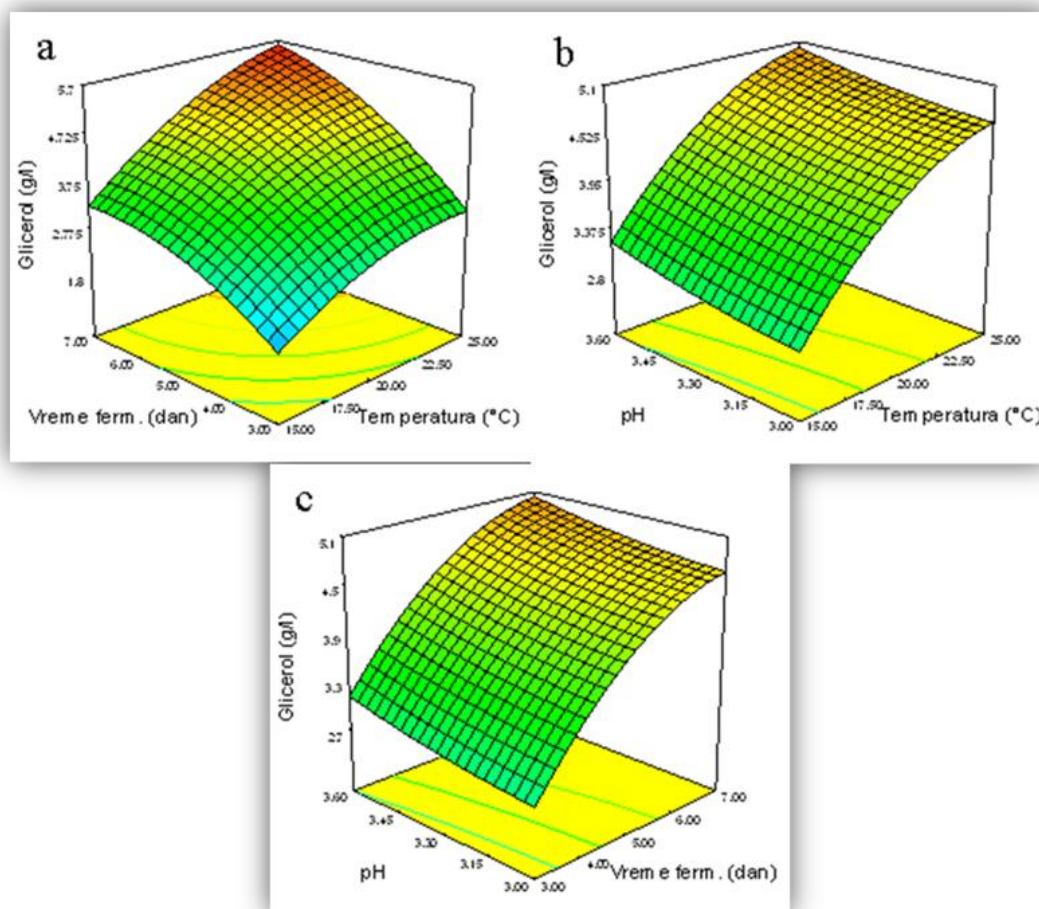


Slika 4.5. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na koncentraciju metanola u vinu od šljive sorte Čačanska leptotica:

- temperature i vremena fermentacije (pH=3,3),
- temperature i pH (vreme fermentacije=5 dana),
- vremena fermentacije i pH (temperatura=20 °C)

Visok sadržaj metanola je generalno dobijen u svim uzorcima vina od šljive. Metanol je sličnog mirisa i ukusa kao i etanol i nema značajan uticaj na senzorne karakteristike vina, ali visoka koncentracija ovog jedinjenja predstavlja problem jer njegovom oksidacijom dolazi do nastanka formaldehida i mravlje kiseline, jedinjenja koja imaju toksično dejstvo na centralni nervni sistem ljudi (Ribereau-Gayon i sar., 1999). Moguće objašnjenje za dobijene rezultate može se naći u činjenici da šljive imaju visok sadržaj pektina (2,0-3,5 % m/m) visokog stepena esterifikacije (Rop i sar., 2009). Poređenja radi, mango sadrži 0,7-1% m/m pektinskih materija (Prasanna i sar., 2003), dok njegovo vino može da sadrži do 800 mg/l metanola (Craig, 1998). Vino od jabuka, voća koje, takođe, ima visok sadržaj pektina 0,7-0,84% m/m (Baker, 1997), može sadržati velike količine metanola (do 700 mg/l) (Hang i Woodmas, 2010). Visok sadržaj metanola (485- 768 mg/l) zabeležen je u i voćnom vinu od kivija (Soufleros i sar., 2001).

Upotreba komercijalnih pektolitičkih enzima korištenih u fermentaciji kljuka od šljiva doprinela je dodatnom povećanju sadržaja ovog jedinjenja u vinu, s obzirom da primenjeni enzimski preparat podrazumeva i aktivnost pektin metil esteraze. Vina proizvedena bez dodatka pektinaza imaju i do nekoliko puta manji sadržaj metanola u odnosu na vina kod kojih je kljuk tretiran ovim enzimima (Reddy i Reddy, 2005).



Slika 4.6. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na sadržaj glicerola u vinu od šljive sorte Čačanska lepotica:
 a) temperature i vremena fermentacije (pH=3,3),
 b) temperature i pH (vreme fermentacije=5 dana),
 c) vremena fermentacije i pH (temperatura=20 °C)

Uticaj temperature, vremena fermentacije i pH na sadržaj metanola u fermentišućem kljuku prikazan je na slici 4.5_{a-c}. Dobijeni model za koncentraciju metanola (Y_2), koji karakteriše koeficijent determinacije $R^2=0,945$, pokazao se adekvatnim i pouzdanim ($p<0,05$), sa samo 5,5% od ukupnog broja varijacija koje se ne mogu objasniti pomenutim modelom. Parametri modela X_1 , X_2 , X_3 , X_1^2 i X_2^2 su značajni pri nivou značajnosti od 95% (tabela 4.12), dok efekti interakcije između X_1 , X_2 i X_3 , kao i kvadratni efekat X_3^2 , nemaju značajan uticaj na sadržaj metanola. p -

vrednosti na nivou značajnosti od 95%, ukazuju da najveći efekat na ovaj odziv imaju linearni članovi temperature i vremena trajanja fermentacije ($p < 0,0001$). Uticaj vrednosti pH je manje značajan u odnosu na uticaj temperature i dužine trajanja fermentacije. Regresioni koeficijenti statistički značajnih članova fitovanog modela za sadržaj metanola ukazuju da na formiranje metanola pozitivno utiču linearni efekti temperature, vremena fermentacije i pH, dok kvadratni efekti temperature i vremena imaju negativan uticaj.

U pogledu glicerola, sa slike 4.6_{a-c} može se primetiti da njegov sadržaj raste sa porastom temperature fermentacije i pH kljuka. Najviši sadržaj glicerola (5,72 g/l) dobijen je prilikom fermentacije na 25 °C i pH 3,6. Proizvodnja glicerola je intenzivnija u prvih 4 dana fermentacije, posebno na višim temperaturama (25 °C). Kao što je već pomenuto, fermentacija na temperaturi od 15 °C nije se završila u posmatranom periodu (prisustvo neprevrelog šećera u komini), ali u skladu sa tvrdnjom da je produkcija glicerola povezana sa fermentacijom prvih 50 g/l šećera u sirovini (Ribereau-Gayon i sar., 1999), produženje fermentacije ne bi značajno uticalo na povećanje njegove koncentracije. Prethodna istraživanja su, takođe, pokazala da povećanje temperature fermentacije voćnih vina dovodi do povećanja proizvodnje glicerola (Remize i sar., 2000; Kumar i sar., 2009; Reddy i Reddy, 2010). Povećanje vrednosti pH od 2,8 do 3,7 imalo je neznatan uticaj na prinos glicerola (Rankine i Bridson, 1971).

Efekti uslova fermentacije (X_1 , X_2 , X_3) na sadržaj glicerola u fermentišućem kljuku šljive prikazani su na slici 4.6_{a-c}. Eksperimentalni rezultati za sadržaj glicerola adekvatno se fituju modelom drugog reda, te se na osnovu vrednosti koeficijenta determinacije $R^2 = 0,958$, može zaključiti da samo 4,2% od ukupnog broja varijacija ne može biti objašnjeno dobijenim, statistički značajnim ($p < 0,05$) modelom Y_3 . Značajnost pri nivou od 95% ($p < 0,05$) imaju parametri modela: X_1 , X_2 , X_3 , X_1X_2 , X_1^2 i X_2^2 , dok, sa druge strane, parametri X_1X_3 , X_2X_3 i X_3^2 nisu statistički značajni ($p > 0,05$). Najveći efekat na ovaj odziv imaju linearni efekti temperature i vremena fermentacije, što se može zapaziti na osnovu dobijenih p -vrednosti ($p < 0,0001$) na nivou značajnosti od 95%. Na osnovu regresionih koeficijenata statistički značajnih članova fitovanog modela za sadržaj glicerola može se uvideti da efekti temperature, vremena fermentacije i interakcije između ova dva faktora, pozitivno utiču na sadržaj ovog jedinjenja u vinu. Međutim, pH i kvadratni efekti temperature i vremena fermentacije negativno utiču na produkciju glicerola.

Dobijene odzivne površine funkcija (slike 4.4-4.6) korištene su u definisanju kriterijuma optimizacije ispitivanih parametara fermentacije vina od šljiva. Optimizacija posmatranih parametara je sprovedena korišćenjem metode željene funkcije. Nakon transformacije dobijenih odziva u pojedinačne vrednosti željenih funkcija (od 0 do 1), ukupna poželjnost procesa (ukupna željena funkcija) računa se kao geometrijska sredina pojedinačnih željenih funkcija. U skladu sa literaturnim podacima i opštom proizvođačkom praksom, cilj optimizacije fermentacije je usmeren ka odabiru vrednosti procesnih parametara (temperatura, vreme fermentacije i pH) koje će omogućiti da prinos etanola i glicerola bude maksimalan, u prvoj optimizaciji, te da se uz pomenute kriterijume obezbedi i minimalno formiranje metanola, u drugoj optimizaciji. Ovakav pristup postupku optimizacije primenjen je zbog činjenice da visok sadržaj metanola koji je

određen u svim eksperimentalnim vinima od šljive tokom preliminarnog skrininga predstavlja ograničavajući faktor za dobijanje visokih vrednosti ukupne željene funkcije posmatranog procesa. Zadavanjem definisanih kriterijuma za produkciju etanola i glicerola u prvoj optimizaciji utvrđeni su sledeći optimizovani uslovi fermentacije vina od šljive: temperatura 24,5 °C, pH 3,55 i vreme fermentacije 6,6 dana, dok je vrednost ukupne željene funkcije iznosila 1. Pri datim uslovima fermentacije predviđa se proizvodnja 6,4% v/v etanola i 5,72 g/l glicerola. Primenom metode željene funkcije u drugoj optimizaciji koja je uključila i zahtev za minimizacijom produkcije metanola, utvrđeni su sledeći optimizovani uslovi fermentacije vina od šljive: temperatura 18,3 °C, pH 3,0 i vreme fermentacije 7 dana, koji bi trebalo da obezbede proizvodnju 4,72% v/v etanola, 1122 mg/l metanola i 4,23 g/l glicerola. Vrednost ukupne željene funkcije iznosi 0,559. Poređenjem vrednosti željenih funkcija koje su dobijene u primenom dva opisana pristupa postupku optimizacije jasno se može uočiti da je relativno niska vrednost ove funkcije u drugoj optimizaciji rezultat ograničavajućeg efekta visokog sadržaja metanola. Primećuje se i da predložene optimizovane vrednosti pH i vremena fermentacije odgovaraju grančnim vrednostima posmatranih opsega, što ukazuje na neophodnost proširenja opsega i/ili tretmana kljuka tokom fermentacije koji će omogućiti smanjenje produkcije metanola.

Senzornom analizom dobijenih uzoraka utvrđeno je da snižavanjem vrednosti pH kljuka ispod 3,6 dolazi do pogoršavanja ukusa proizvedenih vina tj. do prenaglašavanja njihove kiselosti. Takođe, primećeno je da fermentacija na nižim temperaturama rezultira proizvodnjom vina čiji se ukus može opisati kao prazan. Ovakvi rezultati preliminarnog skrininga fermentacije vina od šljive ističu potrebu za detaljnijim ispitivanjem, kao i optimizacijom, uticaja primene manjih količina pektolitičkog enzima, viših vrednosti pH i temperatura fermentacije, na kvalitet i randman vina. U cilju povećanja kvaliteta vina od šljive u ovom radu je ocenjena i mogućnost primene različitih fizičko-hemijskih postupaka za smanjenje visokih vrednosti sadržaja metanola.

4.2.5. Postupak optimizacije

4.2.5.1. Čačanska lepotica

U skladu sa rezultatima i izvedenim zaključcima preliminarnog skrininga pristupilo se detaljnijem ispitivanju uticaja uslova fermentacije na parametre kvaliteta vina od šljive. Postupku finalne optimizacije uslova fermentacije vina od šljive, prethodila su i istraživanja koja su imala za cilj izbor optimalnog pektolitičkog enzima, soja kvasca i režima mešanja kljuka. Definisani su procesni parametri i njihovi opsezi, kao i odzivi koji će biti praćeni i na osnovu kojih će se oceniti kvalitet proizvedenih vina. Nezavisne promenljive u sprovedenom istraživanju bile su: temperatura (X_1), vrednost pH (X_2) i doza pektolitičkog enzima (X_3), dok su za odzive ispitivanog sistema postavljeni sadržaj etanola, metanola i glicerola i prinos vina.

U eksperimentima su korištene tri sorte domaće šljive različitih epoha sazrevanja, dok su u ovom poglavlju prikazani samo rezultati dobijeni za sortu Čačanska lepotica. Primenjen je Box-Behnkenov eksperimentalni plan sa tri faktora na tri nivoa i sa pet ponavljanja u centralnoj tački, a dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 4.13. Razlog za primenu ovog eksperimentalnog

plana je u potrebi izvođenja manjeg broja oglada u odnosu na centralno kompozitni (CCD) plan, ali i postojanju većeg broja tačaka (kombinacija praćenih parametara) koje se nalaze u posmatranom opsegu. Na taj način dobijeni modeli bolje reprezentuju efekte parametara u celokupnom opsegu razmatranja, za razliku od CCD dizajna koji pri formiranju modela više favorizuje granične vrednosti zadanog opsega. Takva struktura CCD dizajna je, u slučaju optimizacije uslova fermentacije vina od šljive, bila primenjivija u fazi preliminarnog skrininga procesa.

Tabela 4.13. Ispitivanje uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljive sorte Čačanska lepotica primenom Box-Behnken eksperimentalnog plana

Temperatura (°C)	pH	Pektinaza (g/100 kg)	Etanol (% v/v)	Metanol (mg/l)	Glicerol (g/l)	Prinos vina (%)
X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
16	3,5	1	7,1	705	3,5	46
16	4,5	1	7,12	745	4,8	49
16	4,0	2	7,41	850	4,37	53
16	4,0	0	6,82	299	4,51	37
23	4,0	1	7,56	912	5,4	51
23	4,0	1	7,52	903	5,62	48
23	4,5	0	7,3	499	5,74	42
23	4,5	2	7,8	1042	5,99	59
23	4,0	1	7,67	900	5,57	53
23	4,0	1	7,54	907	5,54	51
23	4,0	1	7,48	887	5,31	52
23	3,5	0	7,3	520	4,8	43
23	3,5	2	7,85	970	5,17	54
30	3,5	1	7,62	865	5,35	50
30	4,5	1	7,7	955	6,67	52
30	4,0	0	7,35	409	5,8	42
30	4,0	2	8,0	1098	6,06	57

* prinos vina u procentima izražen kao ml vina na 100 g kljuka.

Da bi se ispitao uticaj nezavisnih promenljivih procesa fermentacije i njihovih interakcija (temperatura, vrednost pH i doza pektolitičkog enzima) na zavisne promenjive tj. odzive (sadržaj etanola, metanola i glicerola i prinos vina) i proverila prikladnost Box-Behnkenovog dizajna u modelovanju i optimizaciji pracenog procesa, proverena je aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom, polinomom drugog reda prema ranije datom izrazu (poglavlje 3.2.4). Modeli (Y₁₋₄) i njihovi koeficijenti (b₀, b₁, b₂... b₁₃) koji reprezentuju funkcionalnu zavisnost između zavisnih i nezavisnih promenljivih dobijeni su statističkom metodom nelinearne regresije eksperimentalnih podataka i prikazani su u tabeli 4.14. Prihvatljivost i značajnost dobijenih modela procenjena je na temelju vrednosti koeficijenta determinacije (R²), koji je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka (u idealnom slučaju iznosi 1). Značajnost dobijenih regresionih modela parametara kvaliteta vina od šljive utvrđena je sa pouzdanošću od 95%. Visoke vrednosti koeficijenata determinacije (R²>0,95) ukazuju na to da

se najmanje 95% varijacija ispitivanih odziva može objasniti fitovanim jednačinama drugog reda.

Tabela 4.14. Polinomski oblici fitovanih odziva ispitivanih parametara

Parametri	Model	R ²
Etanol	$Y_1 = + 5,244 + 0,1792X_1 - 0,2628X_2 + 0,3031X_3 + 0,0071X_1X_2 + 0,0036X_1X_3 - 0,025X_2X_3 - 0,0037X_1^2 + 0,17X_2^2 + 0,0043X_3^2$	0,979
Metanol	$Y_2 = - 36,8781 + 77,3602X_1 - 234,593X_2 + 277,318X_3 + 3,571X_1X_2 + 4,929X_1X_3 + 46,5X_2X_3 - 1,8168X_1^2 + 18,9X_2^2 - 148,775X_3^2$	0,989
Glicerol	$Y_3 = - 10,3692 + 0,4038X_1 + 3,8101X_2 - 0,0381X_3 + 0,0014X_1X_2 + 0,0143X_1X_3 - 0,06X_2X_3 - 0,0066X_1^2 - 0,336X_2^2 + 0,021X_3^2$	0,971
Prinos vina	$Y_4 = + 25,319 + 2,4847X_1 - 7,107X_2 - 0,3036X_3 - 0,0714X_1X_2 - 0,0357X_1X_3 + 3X_2X_3 - 0,0408X_1^2 + X_2^2 - 1,75X_3^2$	0,970

S obzirom da odabrani modeli aproksimacije eksperimentalnih podataka često ne opisuju u potpunosti ispitivano eksperimentalno područje sprovedene su i detaljnije statističke analize (analiza varijanse ANOVA) na osnovu kojih se može preciznije utvrditi opravdanost odabranog modela. Adekvatnost svih dobijenih polinomnih modela (Y_{1-4}) potvrđena je pomoću Fišerov-og F testa (F-vrednosti) i p -vrednosti pri stepenu značajnosti $\alpha=0,05$, što se može uočiti na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 4.15. p -vrednosti za određene članove odzivnog polinoma manje od 0,05, odnosno verovatnoća dobijanja niske F-vrednosti manja od 5%, ukazuje na značajnost primenjenog modela i njegovih članova.

Tabela 4.15. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva i regresionih koeficijenata

Izvor	F-vrednost				p -vrednost			
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
Model	36,26	73,91	25,90	25,59	< 0,0001*	< 0,0001*	0,0001*	0,0002*
X ₁	136,86	52,82	151,99	14,22	< 0,0001*	0,0002*	< 0,0001*	0,0070*
X ₂	0,071	3,27	64,96	4,50	0,798**	0,1137**	< 0,0001*	0,0716**
X ₃	156,15	496,98	1,85	193,39	< 0,0001*	< 0,0001*	0,2155**	< 0,0001*
X ₁ X ₂	0,57	0,50	0,0027	0,11	0,4756**	0,5030**	0,9599**	0,7486**
X ₁ X ₃	0,57	3,80	1,08	0,11	0,4756**	0,0924**	0,3325**	0,7486**
X ₂ X ₃	0,11	1,72	0,098	4,0	0,718**	0,2306**	0,7639**	0,0856**
X ₁ ²	31,98	26,61	11,97	7,49	0,0008*	0,0013*	0,0105*	0,0291*
X ₂ ²	0,017	0,075	0,80	0,12	0,8993**	0,7922**	0,3995**	0,7424**
X ₃ ²	0,017	74,31	0,050	5,73	0,8993**	< 0,0001*	0,8290**	0,0479*

X₁: temperatura (°C); X₂: pH; X₃: doza pektinaze (g/100 kg);

Y₁: etanol (% v/v); Y₂: metanol (mg/l); Y₃: glicerol (g/l); Y₄: prinos vina (%);

*Značajno pri $p < 0,05$, ** nije značajno;

Rezultati eksperimentalnim planom predviđenih mikroviniifikacija (tabela 4.13) pokazuju da, u zavisnosti od vrednosti procesnih parametara, sadržaj etanola u vinu iznosi 6,82-8,0% v/v,

sadržaj metanola 299-1098 mg/l, sadržaj glicerola 3,5-6,67 g/l, a prinos vina 37-59%. Regresioni koeficijenti (b_0 , b_1 , b_2 ... b_{13}) dobijeni primenom metode najmanjih kvadrata korišteni su za konstruisanje odzivnih površina dobijenih modela (slika 4.7.-4.9). Dobijene odzivne površine omogućavaju lakše praćenje uticaja temperature, pH i doze pektinaze na posmatrane zavisne promenjive postavljenog sistema. Prilikom konstrukcije odzivnih površina jedna od promenjivih se zadržava konstantnom na centralnom nivou, dok se druge dve variraju u okviru ekperimentalnog opsega.

Uticaj temperature, vrednosti pH i doze pektolitičkog enzima na sadržaj etanola u vinu od šljive sorte Čačanska leptotica prikazan je na slici 4.7_{a-c}. Uočava se da fermentacija kljuka na višim temperaturama obezbeđuje veću produkciju etanola. Takođe, dužina trajanja fermentacije je kraća na višim temperaturama. Ovakvi rezultati se mogu dovesti u vezu sa manjom količinom neprevrelog šećera u vinu fermentisanom na višoj temperaturi, ali i sa manjom količinom ukupnog šećera koju, u ovom slučaju, kvasac koristi za povećanje svoje biomase. Ribéreau-Gayon i sar. (2006) ističu da povećanje temperature fermentacije (25-30 °C) dovodi do smanjenja količine energije potrebne kvascu za umnožavanje, te, stoga, veća količina fermentabilnih šećera ostaje dostupna za prevođenje u etanol. Pomenuti autori ističu da je fermentacija šećera dva puta brža na 30 °C u odnosu na 20 °C, tj. da za svako povećanje temperature od 1 °C (do 40 °C) kvasac transformiše 10% više šećera za isto vreme. Međutim, fermentacija šire sa visokim početnim sadržajem šećera (iznad 200 g/l) na visokim temperaturama, rezultira smanjenim prinosom etanola. Smanjena produkcija etanola može biti posledica delimične inhibicije aktivnosti kvasca supstratom. Takođe, određena količina ovog alkohola se gubi usled intenzivnog oslobađanja ugljen-dioksida. Pomenuti efekat visokih temperatura nije zabeležen kod fermentacije kljuka ispitivanih sorti domaće šljive usled znatno nižeg početnog sadržaja šećera (ispod 160 g/l) u odnosu na širu grožđa. Sadržaj etanola raste i sa porastom doze pektolitičkog enzima. Ovakvi rezultati se mogu smatrati posledicom aktivnosti enzima čijom primenom dolazi do hidrolize pektinskih materija, otečnjavanja kljuka i povećanja dostupnosti ukupnih rastvorljivih čestica i redukujućih šećera (Espejo i Armada, 2010). Fermentacijom kljuka od šljiva pri različitim vrednostima pH (3,5-4,5) nisu zabeležene znatne razlike u sadržaju etanola u proizvedenim vinima. Međutim, sa sniženjem vrednosti pH kljuka produžava se vreme trajanja fermentacije. Dobijeni rezultati se mogu objasniti činjenicom da su rast i fermentativna aktivnost kvasca slabije izraženi na nižoj pH. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima koji ističu da je optimalna vrednost pH za rast većine kvasaca u opsegu 4,5-6,5 (Walker, 1998). U kiselijoj sredini (pH<4,0) ćelije kvasca su izložene hemijskom stresu i zahtevaju više vremena za prilagođavanje uslovima sredine (ulaganje energije za održavanje optimalne intracelularne vrednosti pH), pa je samim tim i početak fermentacije sporiji. Dobijeni koeficijent determinacije (R^2) ima vrednost od 0,979 što ukazuje na visoku saglasnost između postignutih i predviđenih rezultata. Ovo znači da fitovani polinom drugog reda dobro aproksimira eksperimentalne rezultate za sadržaj etanola definišući 97,9% ukupne varijabilnosti u okviru opsega ispitivane veličine. Analizom varijanse potvrđena je adekvatnost i značajnost modela Y_1 ($p<0,05$). Uočava se da značajnost na nivou 0,05 ($p<0,05$) pokazuju linearni članovi

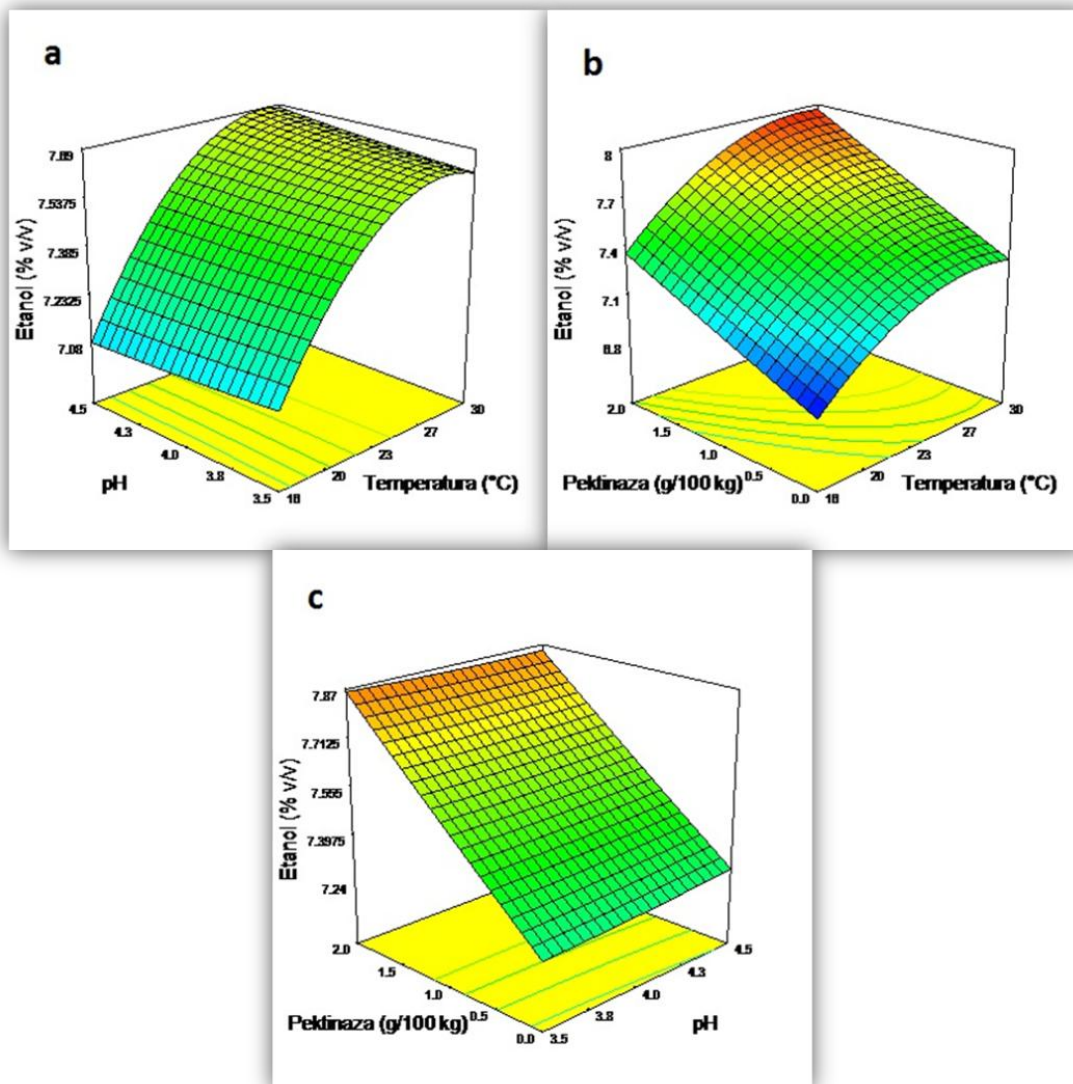
temperature i doze pektinaze i kvadratni član temperature (X_1 , X_3 i X_1^2). Ostali članovi modela, među kojima i vrednost pH, nemaju statistički značajan uticaj na sadržaj etanola (Tabela 4.15). Na osnovu p -vrednosti na nivou značajnosti od 95%, može se zapaziti da najveći efekat na ovaj odziv imaju linearni efekti temperature i doze pektinaze. Regresioni koeficijenti statistički značajnih članova ovog fitovanog modela (tabela 4.14) ukazuju da na sadržaj etanola pozitivno utiče temperatura i doza pektinaze, a negativno kvadratni efekat temperature.

Slika 4.8_{a-c} prikazuje efekat uticaja ispitivanih nezavisnih promenljivih na koncentraciju metanola u vinu. U skladu sa rezultatima preliminarnog skrininga, potvrđeno je da koncentracija metanola u vinu značajno raste sa porastom temperature fermentacije, dok primena različitih vrednosti pH iz eksperimentalnim planom predviđenog opsega nije imala značajnijeg uticaja na formiranje ove komponente vina. Takođe, uočava se da sinergističko dejstvo pektin metil esteraza šljive i komercijalnog enzimskog preparata nije umanjeno smanjenjem vrednosti pH, i pored činjenice da je optimalna vrednost ovog parametra za aktivnost pektin metil esteraze oko 4,5 (Lozano, 2006). S obzirom da je optimalna temperatura za aktivnost enzima pektin metil esteraze u opsegu 45-55 °C (Lozano, 2006), očekivano je najniža koncentracija metanola utvrđena u vinu koje je fermentisalo na najnižoj temperaturi (16 °C). Povećanjem temperature fermentacije na 30 °C njegova koncentracija se povećava i do 40%. Upotreba pektolitičkog enzima dovodi do značajnog povećanja koncentracije metanola usled intenzivnije hidrolize pektinskih materija i oslobađanja metoksi grupa. Primena pektinaze u količini 2 g/100 kg kljuka, rezultirala je formiranjem i do tri puta veće količine metanola u odnosu na postupak koji nije uključivao enzimski tretman kljuka. Visoka vrednost koeficijenta determinacije od 0,989 ukazuje da fitovani polinom drugog reda (Y_2) dobro aproksimira eksperimentalne rezultate budući da svega 1,1% varijacija nije obuhvaćeno modelom. Dobijeni model se, takođe, pokazao adekvatnim i pouzdanim ($p < 0,05$). Rezultati ANOVA testa (tabela 4.15) pokazuju da prilikom fermentacije vina od šljiva, linearni i kvadratni članovi temperature i doze pektinaze (X_1 , X_3 , X_1^2 i X_3^2) imaju statistički značajan ($p < 0,05$) uticaj na formiranje metanola predviđeno modelom Y_2 . Članovi modela koji reprezentuju linearni i kvadratni efekat pH i interakcije među procesnim parametrima nemaju značajan uticaj na koncentraciju metanola. Najveći, kako linearni, tako i kvadratni efekat na ovaj odziv ima doza pektolitičkog enzima (dobijene p -vrednosti manje od 0,0001). Manji, ali takođe statistički značajan uticaj na koncentraciju metanola ima temperatura fermentacije ($p = 0,0002$). Posmatranjem regresionih koeficijenata statistički značajnih članova fitovanog modela (tabela 4.14) može se zaključiti da na koncentraciju ovog parametra kvaliteta vina pozitivno utiču linearni efekti temperature i doze pektinaze, a negativno njihovi kvadratni efekti.

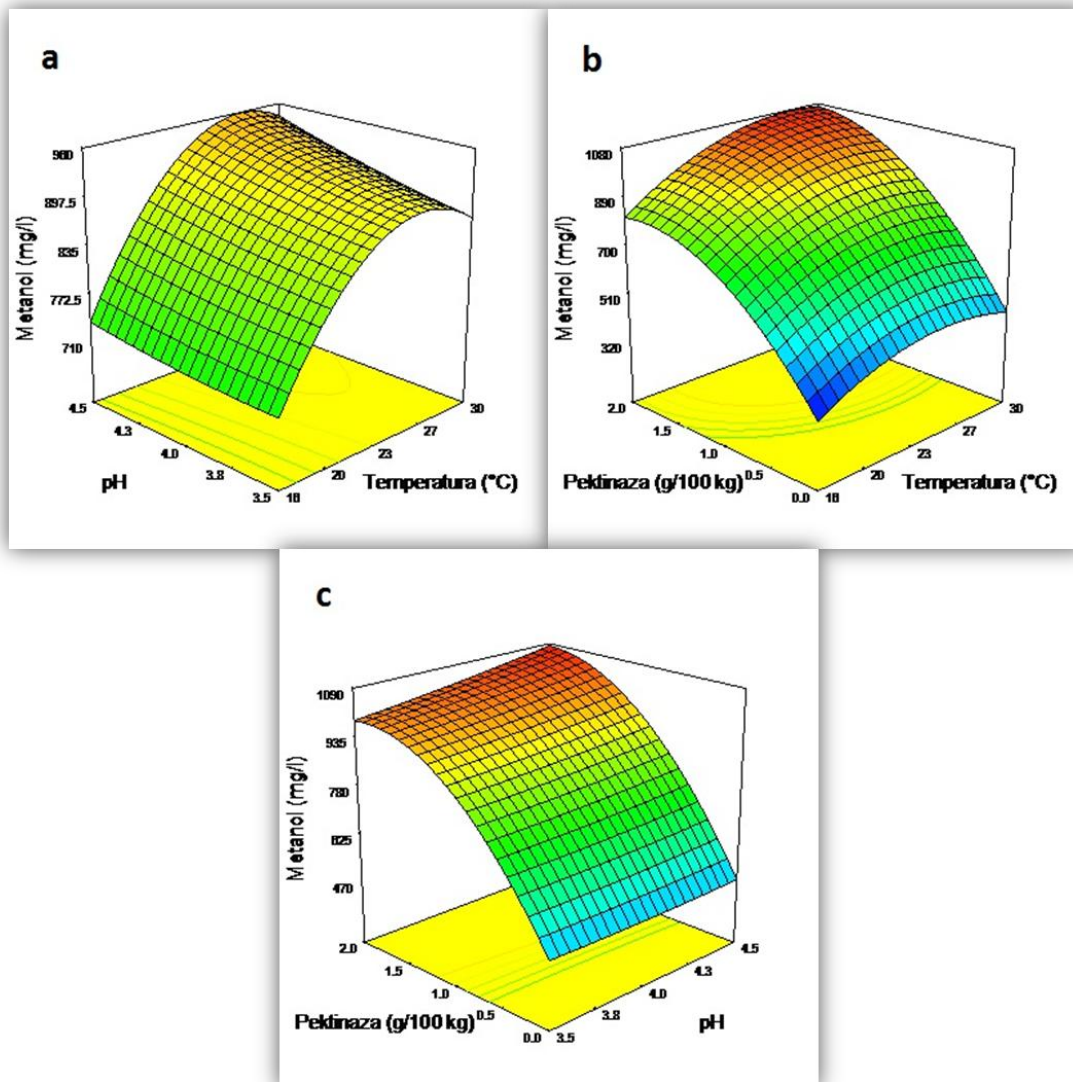
Slika 4.9_{a-c} ilustruje modelom predviđeni uticaj procesnih parametara fermentacije na sadržaj glicerola u vinu. Utvrđeno je da povećanje temperature fermentacije i vrednosti pH kljuka dovodi do značajnog povećanja sadržaja glicerola u vinu. Time su ujedno i potvrđeni rezultati preliminarnog skrininga uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljiva, ali i brojnih naučnih studija (Remize i sar., 2000; Kumar i sar., 2009; Reddy i Reddy, 2010). Vina od šljiva čija je fermentacija vođena na pH 4,5 sadrže 25-35% više glicerola u odnosu na uzorke

fermentisane na nižoj vrednosti pH (3,5). Produkcija ovog jedinjenja je za oko 30% veća na temperaturi od 30 °C u odnosu na 16 °C. Optimalna temperatura za produkciju glicerola tokom fermentacije vina 25-30 °C (Yalcin i Ozbas, 2008). Takođe, pomenuti autori ističu da fermentacija na pH 6,0-6,5 rezultira proizvodnjom vina sa 40-50% više glicerola u poređenju sa fermentacijom na pH 3,5-4,0. Upotreba različitih doza pektolitičkog enzima (1-2 g/100kg) nije značajno uticala na sadržaj ove komponente u vinima od šljiva. Dobijeni model za sadržaj glicerola (Y_3), koji karakteriše koeficijent determinacije $R^2=0,971$, pokazao se kao adekvatnim i pouzdanim ($p<0,05$), sa samo 2,9% od ukupnog broja varijacija koje se ne mogu objasniti pomenutim modelom. Analiza varijanse je pokazala da se, sa pouzdanošću od 95% ($p<0,05$), statistički značajnim koeficijentima tj. članovima u regresionoj jednačini smatraju samo linearni i kvadratni efekti temperature i linearni efekat pH (X_1 , X_2 i X_1^2). Ostali članovi fitovane jednačine drugog reda za sadržaj glicerola nisu statistički značajni ($p>0,05$). Najveći efekat na ovaj odziv imaju linearni članovi temperature i pH (p -vrednosti $< 0,0001$). Regresioni koeficijenti statistički značajnih članova fitovanog modela za sadržaj glicerola ukazuju da linearni efekti temperature i pH pozitivno doprinose sadržaju glicerola. Sa druge strane, kvadratni efekat temperature negativno utiče na produkciju ovog jedinjenja.

Odzivne površine (slici 4.10_{a-c}) prikazuju zavisnost prinosa vina od promena ulaznih veličina sistema, u ovom slučaju temperature, vrednosti pH i doze pektolitičkog enzima. Može se uočiti da prinos vina raste sa povećanjem temperature fermentacije i doze pektolitičkog enzima, dok u slučaju uticaja vrednosti pH iz ispitanog opsega nisu zabeležene značajnije promene. Kao što je već naglašeno, aktivnost pektinaze se povećava na višim temperaturama fermentacije (25-30 °C), te usled toga dolazi do inteziviranja hidrolize pektinskih materija i povećanja prinosa vina. Primena 2 g pektinaze /100 kg kljuka, tokom fermentacije na različitim temperaturama (16-30 °C) rezultirala je povećanjem prinosa vina za 35-40%, u odnosu na postupak koji nije uključivao enzimski tretman kljuka. Polinomom drugog reda Y_4 se veoma uspešno aproksimiraju eksperimentalni rezultati dobijeni za prinos vina s obzirom da dobijeni model definiše 97,0% ukupne varijabilnosti u okviru opsega ispitivane veličine ($R^2=0,970$). Utvrđeno je da statističku značajnost na nivou 0,05 ($p<0,05$) u dobijenom modelu pokazuju linearni i kvadratni članovi temperature i doze pektinaze (X_1 , X_3 , X_1^2 i X_3^2). Ostali članovi kvadratnog polinoma nemaju statistički značajan uticaj na prinos vina. Rezultati ANOVA testa (tabela 4.15) ukazuju da se sa pouzdanošću od 95% ($p<0,05$) može smatrati da je fitovani model adekvatan i značajan. Doza pektolitičkog enzima predstavlja parametar sa najvećim linearnim uticajem na porast prinosa vina, što se može zapaziti na osnovu dobijenih p -vrednosti ($p<0,0001$). Sa druge strane, uticaj kvadratnih članova temperature i doze pektinaze je mnogo manje izražen (p -vrednosti 0,0291, odnosno 0,0479). Na osnovu regresionih koeficijenata statistički značajnih članova fitovanog modela uviđa se da jedino linearni efekat temperature pozitivno utiče na prinos vina od šljive, dok kvadratni efekat temperature, kao i linearni i kvadratni efekat doze pektolitičkog enzima daju negativan doprinos.

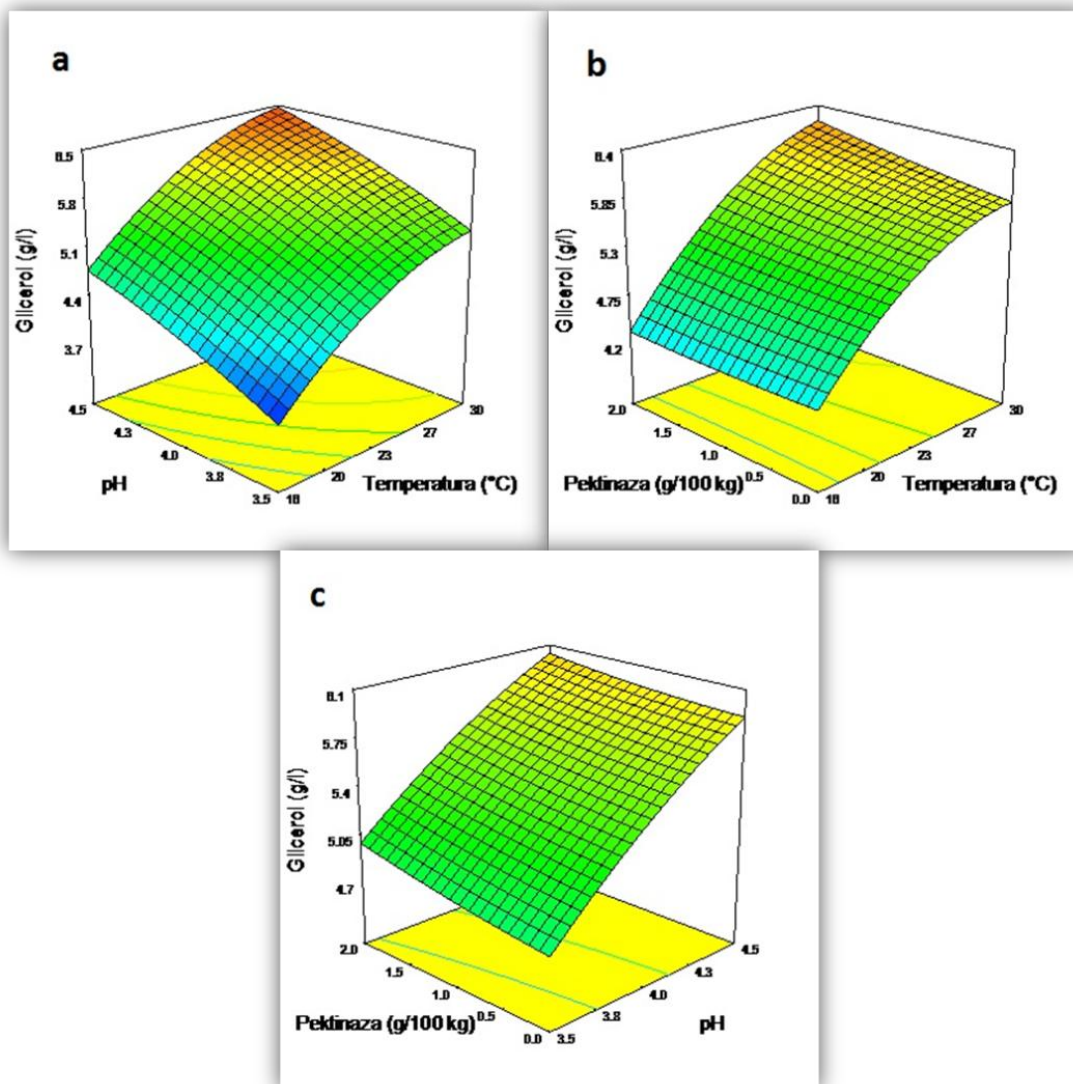


Slika 4.7. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na sadržaj etanola u vinu od šljive sorte Čačanska lepotica:
a) temperature i pH (doza pektinaze=1,0 g/100kg),
b) temperature i doze pektinaze (pH=4,0),
c) doze pektinaze i pH (temperatura=23 °C)

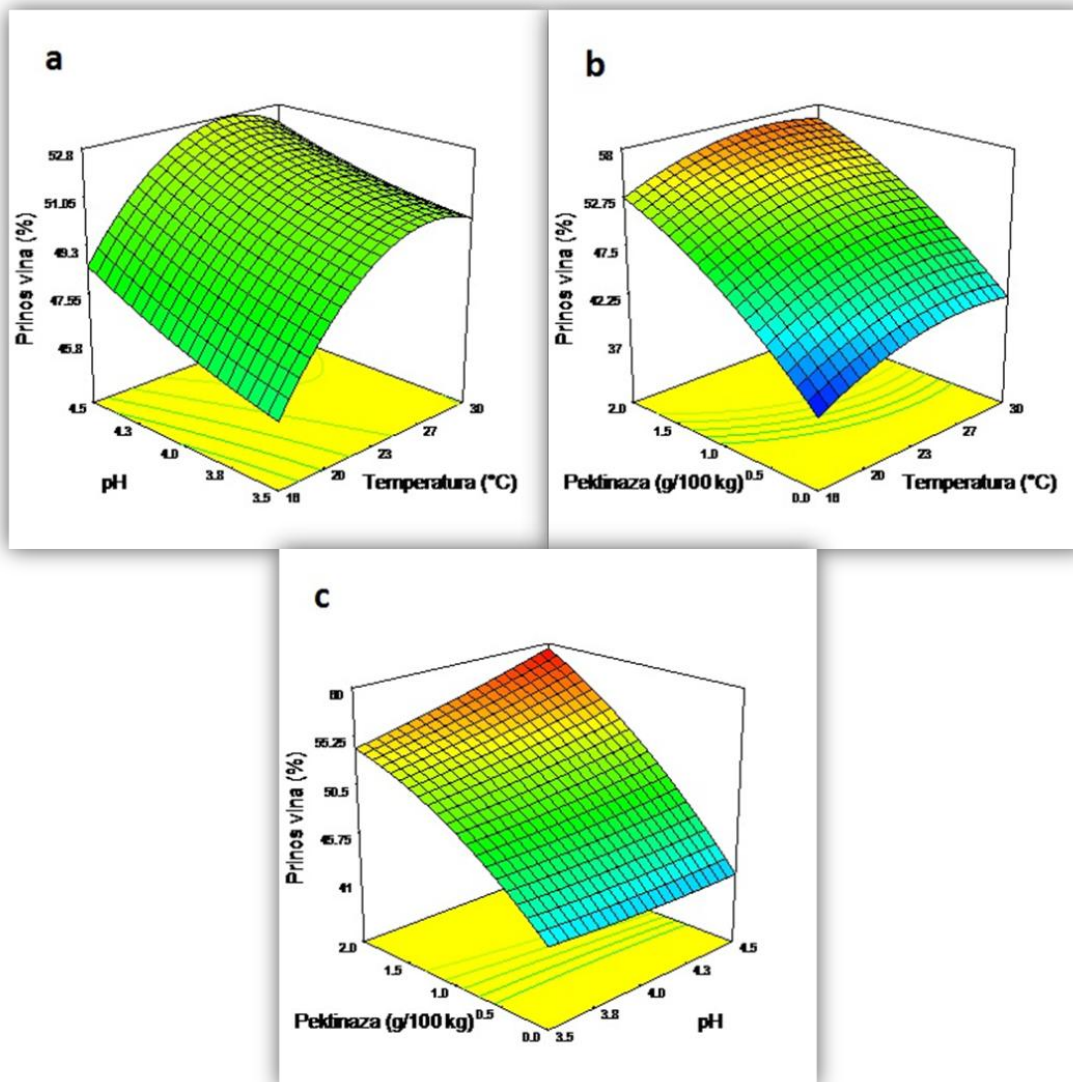


Slika 4.8. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na koncentraciju metanola u vinu od šljive sorte Čačanska leptotica:

- temperature i pH (doza pektinaze=1,0 g/100kg),
- temperature i doze pektinaze (pH=4,0),
- doze pektinaze i pH (temperatura=23 °C).



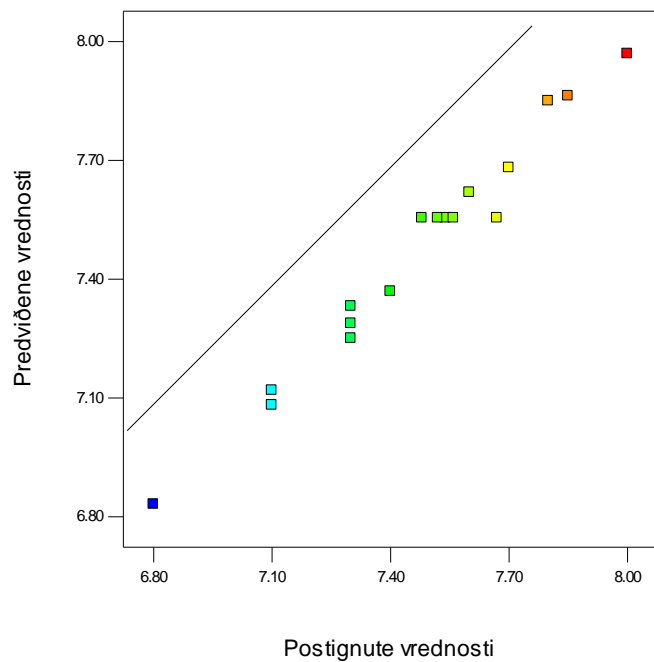
Slika 4.9. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na sadržaj glicerola u vinu od šljive sorte Čačanska leptotica:
 a) temperature i pH (doza pektinaze=1,0 g/100kg),
 b) temperature i doze pektinaze (pH=4,0),
 c) doze pektinaze i pH (temperatura=23 °C).



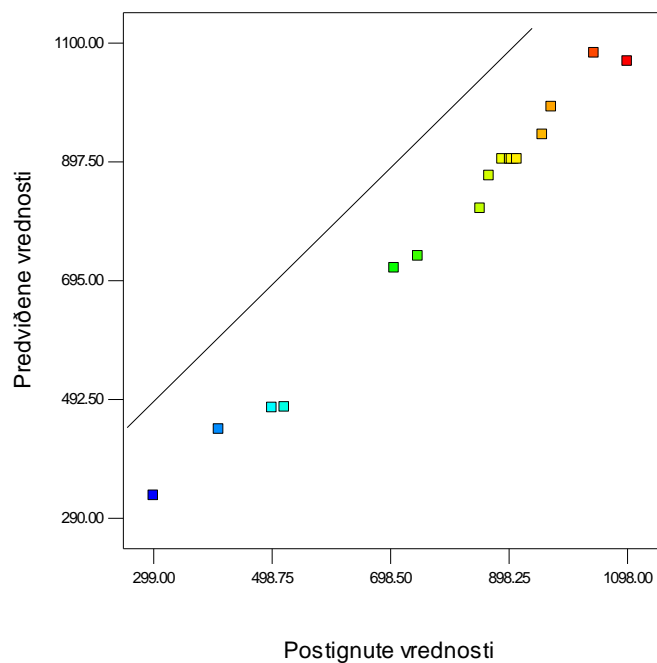
Slika 4.10. Odzivne površine funkcije koje reprezentuju uticaj procesnih parametara na prinos vina od šljive sorte Čačanska lepotica:

- temperature i pH (doza pektinaze=1,0 g/100kg),
- temperature i doze pektinaze (pH=4,0),
- doze pektinaze i pH (temperatura=23 °C).

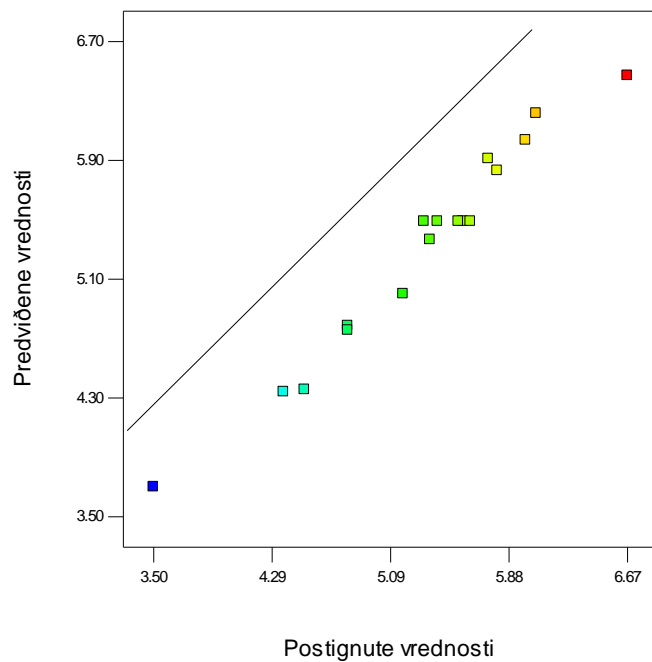
Grafici zavisnosti ekperimentalno postignutih vrednosti za sadržaj etanola, metanola glicerola i prinos vina, i vrednosti dobijenih na osnovu fitovane jednačine drugog reda (*engl.* Parity plot) prikazani su na slikama 4.11-4.14. U slučaju adekvatno predviđene jednačine (modela) dobija se visoka linearna zavisnost između ovih vrednosti. Dobijeni grafici (slika 4.11-4.14) ukazuju na adekvatnost fitovanih modela tj. visok stepen pozitivne korelacije između postignutih i predviđenih vrednosti odziva.



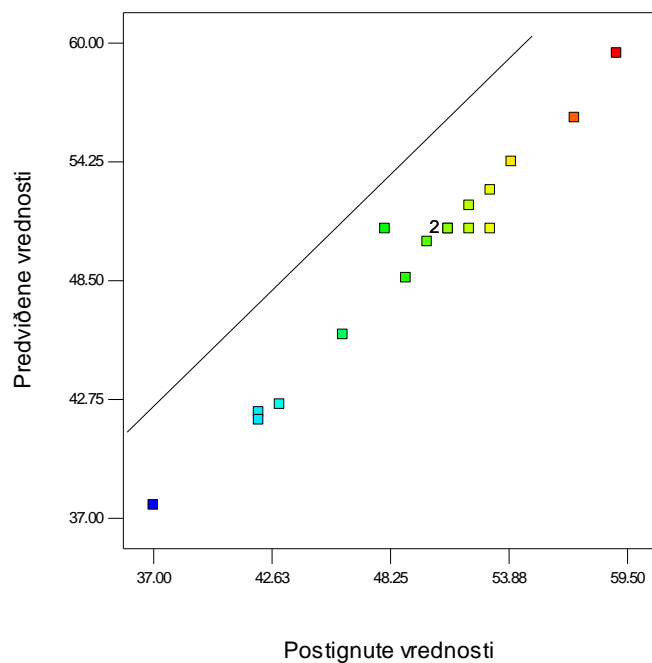
Slika 4.11. „Parity plot“ postignutih i predviđenih vrednosti sadržaja etanola



Slika 4.12. „Parity plot“ postignutih i predviđenih vrednosti koncentracije metanola



Slika 4.13. „Parity plot“ postignutih i predviđenih vrednosti sadržaja glicerola



Slika 4.14. „Parity plot“ postignutih i predviđenih vrednosti prinosa vina

Primenom metode odzivne površine funkcije (RSM) i metode željene funkcije, komponenti softverskog paketa Design Expert, definisani su optimalni uslovi fermentacije za postizanje maksimalnih vrednosti sadržaja etanola, glicerola i prinosa vina, i minimalne koncentracije metanola u vinu. Optimalne vrednosti eksperimentalnih parametara određuju se iz vrednosti pojedinačnih željenih funkcija koje optimizuju ukupnu željenu funkciju. Rezultati senzorne analize dobijenih uzoraka vina korišteni su za dodatno definisanje opsega procenih parametara fermentacije koji podležu postupku optimizacije. Tako je utvrđeno je da najbolje senzorne karakteristike poseduju vina proizvedena na najnižoj vrednosti pH (3,5), koja ujedno predstavlja originalni pH kljuka sorte Čačanska lepotica. Vrednosti pH iznad 4,0 su, pored lošijih senzornih svojstava, uticale i na pojavu mikrobiološkog kvarenja vina u značajnom broju uzoraka. Sa druge strane, fermentacija na temperaturama višim od 25 °C rezultirala je proizvodnjom vina slabijih aromatskih karakteristika. Prilikom optimizacije uslova fermentacije metodom željene funkcije je, iz tih razloga, veći stepen značajnosti dodeljen fermentaciji na nižim vrednostima pH ($pH < 4,0$) i temperature (nižim od 26 °C).

Postupkom numeričke optimizacije dobijene su sledeće vrednosti procesnih parametara fermentacije vina od šljive: temperatura 25 °C, vrednost pH 3,5 i doza pektolitičkog enzima 0,5 g/100 kg. Pri navedenim uslovima dobijeni fitovani modeli predviđaju prinos etanola od 7,5% v/v, prinos glicerola od 5g/l, prinos vina od 48% (48 ml vina na 100 g kljuka) i formiranje 710 mg/l metanola. Vrednost ukupne željene funkcije u pomenutom slučaju iznosi 0,823. U cilju provere dobijenih modela i optimizovanog postupka fermentacije, postavljena je kontrolna vinifikacija (tri ponavljanja) u kojoj su primenjene dobijene optimalne vrednosti ispitivanih procesnih parametara. Predviđeni optimum postupka fermentacije vina od šljive je ovim kontrolnim eksperimentom verifikovan, a modeli su još jednom pokazali adekvatnost i značajnost, što potvrđuju dobijene vrednosti praćenih odziva: sadržaj etanola 7,7% v/v, sadržaj glicerola 4,67 g/l, koncentracija metanola 683 mg/l i prinos vina 48%.

U sklopu izrade ove disertacije takođe je ispitan i optimizovan uticaj identičnih uslova fermentacije na kvalitet i prinos vina od sorti Čačanska rana i Požegača. Primenjen je i identičan metodološki pristup tj. metoda odzivne površine funkcije (RSM) i metoda željene funkcije (program Design Expert). S obzirom da su zavisnosti odziva od ispitivanih procesnih parametara, kao i dobijeni optimalni uslovi fermentacije veoma slični vrednostima utvrđenim za sortu Čačanska lepotica, rezultati nisu prikazani i posebno komentarisani u ovom poglavlju. Prikaz dobijenih fitovanih modela, kao i potvrda njihove adekvatnosti i značajnosti (analiza varijanse – ANOVA) su, stoga, dati u Prilogu.

4.3. Uticaj dodatka koštica u kljuk na sastav vina od šljive

Koštice šljive, prvobitno odvojene tokom faze primarne prerade, dodavane su u različitim udelima u kljuk neposredno pred početak fermentacije. S obzirom da koštice sadrže značajnu količinu amigdalina, glikozida koji se u kiseloj sredini i pod dejstvom enzima beta-glukozidaze razgrađuje na dva molekula glukoze, benzaldehid i cijanovodoničnu kiselinu (HCN), prisustvo koštica tokom fermentacije vina od šljive može značajno uticati na njegov hemijski sastav.

Posebna pažnja je posvećena praćenju sadržaja benzaldehida i cijanovodonične kiseline usled njihovog toksičnog dejstva na zdravlje ljudi. Sadržaj ovih jedinjenja nije definisan pravnim aktima koja regulišu kvalitet vina, ali jeste odgovarajućim nacionalnim tehničkim propisom o kvalitetu alkoholnih pića (Pravilnik o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakije i drugih alkoholna pića, 2010), gde je maksimalni dozvoljeni sadržaj benzaldehida i cijanovodonične kiseline u rakijama od šljive 100 mg/l, odnosno 70 mg/l, izraženo po litri apsolutnog alkohola, što je za alkoholno piće sa sadržajem etanola od 7 % v/v, ekvivalentno količini od 7 mg/l, odnosno 5 mg/l. U tabeli 4.16. prikazan je uticaj prisustva različite količine koštica u fermentaciji vina od šljive, na parametre kvaliteta i zdravstvene prihvatljivosti proizvedenih vina.

Tabela 4.16. Pokazatelji uticaja dodatka koštica na hemijski sastav vina od šljive

	Etanol (% v/v)	Metanol (mg/l)	HCN (mg/l)	Benzaldehid (mg/l)
K ₀	7,43 ± 0,05 ^a	703 ± 5 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	0,81 ± 0,07 ^a
K ₁	7,39 ± 0,11 ^a	722 ± 18 ^a	0,23 ± 0,02 ^b	1,75 ± 0,11 ^b
K ₂	7,52 ± 0,05 ^a	691 ± 6 ^a	0,5 ± 0,04 ^c	2,53 ± 0,04 ^c
K ₃	7,64 ± 0,13 ^a	705 ± 5 ^a	0,75 ± 0,1 ^d	3,74 ± 0,13 ^d
K ₄	7,59 ± 0,07 ^a	712 ± 11 ^a	1,19 ± 0,09 ^e	5,95 ± 0,18 ^e

^{a, b, c} različita slova u okviru istog reda označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$).

Koncentracija etanola u proizvedenim oglednim vinima (K₀₋₄) nije se statistički značajno ($p < 0,05$) menjala sa povećanjem (25-200%) količine dodatih koštica. Dobijeni rezultati ukazuju da su količine etanola nastale previranjem glukoze oslobođene enzimskom razgradnjom amigdalina bile statistički zanemarljive. Dodatak koštica nije uticao ni na koncentraciju metanola u vinima K₁₋₄ s obzirom da, u poređenju sa kontrolnim uzorkom K₀, nije uočeno značajno povećanje koncentracije ove komponente. Može se zaključiti da sastav i količina koštica nisu uticali na parametre koji su odgovorni za nastajanje metanola (sadržaj i struktura pektinskih materija i aktivnost pektin metil esteraze).

Sa druge strane, povećanje količine dodatih koštica u fermentaciji kljuka od šljive značajno je uticalo na sadržaj cijanovodonične kiseline i benzaldehida u vinu. Sa porastom udela dodatih koštica značajno se povećava sadržaj ovih jedinjenja. Maksimalan sadržaj cijanovodonične kiseline iznosio je 1,19 mg/l (15,5 mg/l apsolutnog alkohola) i utvrđen je u vinu K₄. U istom oglednom vinu (K₄) izmeren je i najviši sadržaj benzaldehida (5,95 mg/l tj. 78 mg/l apsolutnog alkohola). Međutim, i pored nešto većih količina ovih jedinjenja nastalih kao posledica vođenja fermentacija uz prisustvo koštica, pre svega u vinima K₃ i K₄, utvrđeni sadržaji su značajno manji od maksimalno dozvoljenih u voćnim rakijama od koštičavog voća (Pravilnik, 2010). Povećan udeo koštica u fermentaciji odrazio se i na senzorna svojstva proizvedenih vina. Karakteristična aroma badema, koja u alkoholnim pićima nastaje usled povećanog sadržaja benzaldehida, bila je naročito izražena u vinima K₃ i K₄.

Budući da nastavak istraživanja u sklopu disertacije obuhvata detaljno ispitivanje funkcionalnih karakteristika vina od šljive, a uzevši u obzir u naučnim krugovima nedovoljno

razjašnjeno dejstvo amigdalina u borbi protiv raka, određena je i antiproliferativna aktivnost vina proizvedenih uz dodatak koštica. Dobijeni rezultati izneti su u poglavlju 4.6.3.

4.4. Hemijski sastav vina od šljive

Vina od tri ispitivane sorte domaće šljive proizvedena su optimizovanim postupkom fermentacije opisanim u poglavlju 3.2.5. Karakterizacija proizvedenih vina omogućava procenu potencijalne iskoristivosti sorti domaće šljive kao sirovina za proizvodnju kvalitetnog voćnog vina. Najznačajniji pokazatelji hemijskog sastava vina od šljive prikazani su u tabeli 4.17.

Tabela 4.17. Hemijski sastav vina od šljive

Parametar	sorta		
	Čačanska rana	Čačanska lepotica	Požegača
Etanol (% v/v)	6,32 ± 0,1 ^a	7,64 ± 0,19 ^b	7,85 ± 0,1 ^b
Neprevreli šećer (g/l)	0,8 ± 0,1 ^a	1,0 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,2 ^b
pH	3,45 ^a	3,4 ^a	3,5 ^a
Ukupne kiseline (g/l)	8,6 ± 0,2 ^c	7,9 ± 0,1 ^b	6,7 ± 0,3 ^a
Jabučna kiselina (g/l)	5,0 ± 0,4 ^b	5,3 ± 0,1 ^b	3,8 ± 0,2 ^a
Limunska kiselina (g/l)	2,0 ± 0,3 ^b	1,1 ± 0,2 ^a	1,1 ± 0,3 ^a
Isparljive kiseline (g/l)	0,41 ± 0,07 ^a	0,37 ± 0,04 ^a	0,8 ± 0,0 ^b
Metanol (mg/l)	735 ± 7 ^c	658 ± 10 ^a	694 ± 6 ^b
Glicerol (g/l)	4,6 ± 0,4 ^a	6,2 ± 0,3 ^c	5,4 ± 0,1 ^b
Mineralne materije (mg/l)			
K	2451	1589	2100
Na	5,41	9,35	4,74
Ca	68,2	74,8	96,3
Mg	95,7	86,7	79,3
Fe	1,35	6,52	3,96
Zn	0,85	1,36	0,52
Cu	< 0,1	0,13	< 0,1

^{a, b, c} različita slova u okviru istog reda označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$).

Sadržaj etanola, glavnog proizvoda alkoholne fermentacije, predstavlja jedan od najznačajnijih parametara kvaliteta vina. Sadržaj etanola u ispitanim vinima od šljive nalazi se u opsegu 6,32-7,85% v/v, pri čemu je minimalan sadržaj ove komponente utvrđen u vinu sorte Čačanska rana. S obzirom da je analizom hemijskog sastava ispitivanih šljiva (tabela 4.2.) kod ove sorte utvrđen najmanji sadržaj fermentabilnih šećera, dobijeni rezultat se može smatrati očekivanim. Sa druge strane, mogu se zapaziti neznatne razlike u sadržaju etanola u vinima sorti Čačanska lepotica i Požegača, i pored statistički značajno ($p < 0,05$) većeg sadržaja ukupnih fermentabilnih šećera kod sorte Požegača. Nepostojanje statistički značajne razlike u sadržaju etanola moguće je objasniti prisustvom značajno ($p < 0,05$) veće količine neprevrelog šećera (2,1

g/l) u vinu sorte Požegača u odnosu na Čačansku lepoticu (1,0 g/l), ali i različitom aktivnošću kvasca tokom fermentacije ova dva vina. Poređenja radi, sadržaj etanola u vinima od jabuke (sajder) i kruške (peri) nalazi se u opsegu 1,5-8,5% v/v (Jarvis, 1996), dok u vinima od manga on iznosi 6,5-8,5% v/v (Reddy i Reddy, 2005).

Malo, statistički neznačajno, smanjenje vrednosti pH u odnosu na polaznu sirovinu registrovano je u vinima sve tri sorte šljive i može se pripisati uticaju kiselina koje nastaju kao nusprodukti fermentacije. Najveća koncentracija isparljivih kiselina određena je u vinu sorte Požegača (0,8 g/l), dok je u slučaju vina druge dve sorte ova vrednost bila značajno niža i nije se međusobno statistički ($p < 0,05$) razlikovala. Kvasci tokom alkoholne fermentacija šire i kljuka od grožđa uobičajeno produkuju 0,3-0,4 g/l isparljivih kiselina u vinu, kao nusprodukata fermentacije (Ribéreau-Gayon i sar., 1999). Nešto veće količine ovih kiselina u vinu sorte Požegača mogu biti posledica razgradnje neprevrelog šećera i glicerola aktivnošću anaerobnih bakterija mlečne kiseline ili oksidacije etanola pod dejstvom bakterija sirćetne kiseline. Zoecklein i sar. (1999) ističu da među isparljivim kiselinama dominira sirćetna kiselina (preko 90%), a da je prag senzorne detekcije ove kiseline 0,7-1,1 g/l. Sadržaj isparljivih kiselina od 0,8 g/l nije se negativno odrazio na senzorna svojstva vina od sorte Požegača. Vina proizvedena od ispitivanih sorti šljive karakterišu značajne ($p < 0,05$) razlike u sadržaju ukupnih kiselina (6,7-8,5 g/l). Najviši sadržaj ukupnih kiselina određen je u vinu sorte Čačanska rana, a najmanji u vinu Požegače, što je i očekivano s obzirom na značajno različite epohe sazrevanja ove dve sorte. Sadržaj jabučne i limunske kiseline u proizvedenim vinima nije se značajnije promenio tokom fermentacije u odnosu na njihov sadržaj u polaznom soku od šljive (tabela 4.2.). Utvrđene količine organskih kiselina utiču pozitivno na senzorne karakteristike vina, doprinoseći osećaju svežine i reskosti. Ispitujući fizičko-hemijske karakteristike voćnih vina od breskve, trešnje, maline i kupine, Bish (2011) je utvrdio da se vrednost pH ovih vina nalazi u opsegu 3,0-3,4, dok je sadržaj ukupnih kiselina iznosio od 4,75 g/l (vino od trešnje) do 9,6 g/l (vino od maline), izraženo na jabučnu kiselinu. Analizom vina od različitih sorti manga utvrđene su sledeće vrednosti pokazatelja kvaliteta: pH (3,6-4,0), sadržaj ukupnih kiselina (6,1-8,2 g/l, izraženo na jabučnu kiselinu) i sadržaj isparljivih kiselina (0,07-1,3 g/l, izraženo na sirćetnu kiselinu) (Reddy i Reddy, 2005).

Koncentracija metanola u vinima se statistički značajno ($p < 0,05$) razlikovala u zavisnosti od upotrebene sorte šljive, i kretala se u opsegu 658-735 mg/l. Sadržaj i stepen esterifikacije pektinskih materija u polaznoj sirovini direktno je uticao na koncentraciju metanola u vinima. Najveća koncentracija metanola je tako određena u vinu sorte Čačanska rana koju ujedno karakteriše i najveći sadržaj i stepen esterifikacije pektina. Koncentracija metanola u vinu sorte Požegača značajno je veća u odnosu na vino Čačanske lepotice, i pored statistički neznačajne razlike u sadržaju pektina i znatno manjeg stepena esterifikacije ovih materija. Objašnjenje ovakvih rezultata moguće je potražiti u različitoj aktivnosti pektin metil esteraze ove dve sorte. Literatura ističe povišene koncentracija metanola u voćnim vinima od jabuke (445 mg/l), kruške (691 mg/l), trešnje (335 mg/l), šljive (504 mg/l) (Francot i Geoffroy, 1956) i manga (530 mg/l) (Reddy i Reddy, 2005).

Glicerol je neisparljivi sastojak vina, bez aromatičnih svojstava, koji znatno doprinosi kvalitetu vina dajući slast i punoću ukusa. Sadržaj ovog jedinjenja je naročito važan za punoću i harmoničnost ukusa voćnih vina s obzirom na značajno niži sadržaj ekstrakta, alkohola i, najčešće, veći sadržaj kiselina u odnosu na vina od grožđa. Statistički značajne razlike u sadržaju glicerola su određene u vinima različitih sorti šljive. Maksimalan sadržaj ovog jedinjenja utvrđen je kod vina sorte Čačanska lepatica (6,2 g/l). Količina glicerola u vinu od šljive je, uglavom, nešto niža nego u vinu proizvedenom od grožđa (4-9 g/l) (Rankine i Bridson, 1971), manga (6,0-8,4 g/l) (Reddy i Reddy, 2011) i maline (6-10 g/l) (Duarte i sar., 2010). Veće koncentracije glicerola nastaju u podlogama sa višim sadržajem glukoze (Radler i Schütz, 1982).

Vino od šljive karakteriše i značajan sadržaj mineralnih materija. Sadržaj pojedinih makro- i mikrolemenata u vinu je važan zbog njihovog zdravstvenog uticaja, uloge u stabilnosti vina i mogućeg toksikološkog rizika (Frias i sar., 2002). Profil mineralnih materija vina predložen je, takođe, kao mogući „otisak prsta“ (*fingerprint*) koji bi mogao da se koristi za karakterizaciju vina na osnovu njihovog geografskog porekla (Taylor i sar., 2003). Najdominantniji makroelement u ovim voćnim vinima je kalijum, dok su, u manjoj meri, prisutni kalcijum, magnezijum i, naročito natrijum. Najviši sadržaj K i Mg određen je u vinu sorte Čačanska rana. Vino sorte Čačanska lepatica karakteriše najviši sadržaj Na, ali i izrazito niža vrednost sadržaja K, u poređenu sa vinima druge dve sorte. Takođe, vino sorte Požegača se izdvaja po nešto većem sadržaju Ca (96 mg/l). Najzastupljeniji mikroelementi u ispitanim vinima su gvožđe, cink i bakar, i njihov sadržaj se značajno razlikuje u zavisnosti od upotrebljene sorte šljive. Najviši sadržaj Fe, Zn i Cu određen je u vinu sorte Čačanska lepatica (6,52 mg/l, odnosno 1,36 mg/l i 0,13 mg/l). Sadržaj Cu je na granici detekcije primenjene metode u vinima sorti Čačanska rana i Požegača. Voćna vina, generalno sadrže slične količine mineralnih elemenata kao vina od grožđa (Taylor i sar., 2003). Bhutani i Joshi (1995) u svom radu ističu prosečan sadržaj mineralnih elemenata (mg/l) u vinima od šljive sorte Santa Rosa (*Prunus domestica*): K – 2000, Ca – 160, Mg – 36, Na – 40, Fe – 24, Zn – 2, Cu – 0,4. Može se uočiti da vino pomenute sorte šljive karakteriše sličan sadržaj K, Zn i Cu, viši sadržaj Ca, Na i Fe, kao i niži sadržaj Mg, u poređenju sa vinima od sorti domaće šljive ispitanim u ovoj disertaciji. Rupasinghe i Clegg (2007) analizirali su sastav mineralnih elemenata u vinima od grožđa (sorte Kaberne sovinjon i Šardone), borovnice, maline, crne ribizle, brusnice, trešnje i jabuke. Autori ističu da je K najdominantniji element u svim ispitanim vinima i da je njegov najviši sadržaj određen u vinu od crne ribizle (1201 mg/l). Nivo kalcijuma se kretao u opsegu 62-108 mg/l, izuzev u slučaju vina od brusnice kod koga je zabeležen značajno viši sadržaj ovog elementa (643 mg/l), Najviši sadržaj Mg određen u vinima od grožđa (108-349 mg/l) dok se u slučaju voćnih vina on kretao u opsegu 38-82 mg/l. Sadržaj Na je bio približan u svim ispitanim vinima (31-63 mg/l). Poređenjem rezultata autora Rupasinghe i Clegg (2007) sa rezultatima do kojih se došlo u ovoj doktorskoj disertaciji, može se uočiti da vino od sorti domaće šljive karakteriše značajno viši sadržaj K, sličan sadržaj Ca i Mg i značajno niži sadržaj Na.

4.5. Fenolna jedinjenja i hromatske karakteristike vina od šljive

Fenolna jedinjenja spadaju među najvažnije komponente vina koje se direktno vezuju, ne samo, za organoleptičke karakteristike vina (boju, astringenciju i gorčinu), već i za brojna fiziološka svojstva koja imaju pozitivan uticaj na zdravlje ljudi (smanjenje rizika od kardiovaskularnih i neurodegenerativnih oboljenja, dijabetesa itd). Ova jedinjenja se smatraju najjačim i najaktivnijim antioksidantima vina (Ribéreau-Gayon i sar., 1999). Najvažniji faktori koji utiču na količinu fenolnih jedinjenja u vinu su njihov sadržaj u polaznoj sirovini (grožđu, voću), upotrebljen postupak vinifikacije i promene (transformacije) do kojih dolazi tokom starenja vina (Gómez-Plaza i sar., 2000; Castillo- Sánchez i sar., 2006). Slobodni (monomerni) antocijani, ekstrahovani iz pokožice grožđa odgovorni su za boju mladih crvenih vina (Boulton, 2001). S obzirom da slobodni antocijani nisu stabilni, reakcije kopigmentacije su od presudne važnosti za kvalitet i stabilnost boje. Stabilnost boje naročito zavisi od reakcija kondenzacije sa flavan-3-olima i proantocijanidolima, kao i od formiranja piranoantocijana (Ribéreau-Gayon i sar., 1999). Voćna vina od višnje, borovnice, kupine, crne ribizle često karakteriše viši sadržaj ukupnih fenola i antocijana u odnosu na crveno vino (Heinonen i sar., 1998; Sanchez-Moreno i sar., 2003; Yildirim, 2006; Buglass, 2011). Dostupna naučna literatura daje jako malo podataka o hromatskim karakteristikama voćnih vina. U tabeli 4.18. prikazani su parametri boje i sadržaj najvažnijih grupa fenolnih jedinjenja vina od ispitivanih sorti domaće šljive.

Tabela 4.18. Sadržaj fenolnih jedinjenja i hromatske karakteristike vina od šljive

Parametar	sorta		
	Čačanska rana	Čačanska lepotica	Požegača
Ukupni fenoli (g/l, kao hlorogenska kiselina)	1,65 ± 0,07 ^a	2,18 ± 0,04 ^c	1,88 ± 0,05 ^b
Ukupni fenoli (g/l, kao galna kiselina)	0,87 ^a	1,16 ^c	1,01 ^b
Flavan-3-oli (mg/l)	86,3 ± 2,3 ^a	198,9 ± 4,4 ^c	180,6 ± 3,8 ^b
Ukupni antocijani (mg/l)	169,8 ± 2,1 ^a	187,2 ± 3,7 ^b	173,3 ± 6,2 ^a
Monomerni antocijani (mg/l)	96,9 ± 2,5 ^a	95,4 ± 4,1 ^a	111,7 ± 3,3 ^b
Intenzitet boje	0,58 ^a	0,73 ^b	0,61 ^a
Nijansa boje	0,81 ^a	0,85 ^a	1,22 ^b
Udeo žute boje, A ₄₂₀ (%)	40 ^a	47,7 ^b	43,9 ^{ab}
Udeo crvene boje, A ₅₂₀ (%)	47,3 ^b	38,9 ^a	42,6 ^{ab}
Udeo plave boje, A ₆₂₀ (%)	12,7 ^a	13,4 ^a	13,5 ^a
Oblik spektra, dA (%)	95 ^a	93 ^a	95 ^a
%CA (%)	16,4 ^b	4,9 ^a	36,7 ^c
%FA (%)	33,7 ^a	46,6 ^b	31,9 ^a
%HS (%)	16,8 ^b	11,3 ^a	17,6 ^b

%CA (%) - frakcija boje usled kopigmentacije; %FA (%) - frakcija boje usled slobodnih antocijana; %HS (%) - hemijska starost;

^{a, b, c} različita slova u okviru istog reda označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$).

Sadržaj ukupnih fenola i flavan-3-ola u vinima statistički značajno ($p < 0,05$) se razlikovao u zavisnosti od upotrebene sorte šljive. Posmatranjem rezultata prikazanih u tabeli 4.18. zapaža se visok sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (1,65-2,18 g/l), izraženih kao hlorogenska kiselina. Vino sorte Čačanska lepotica karakteriše najviši sadržaj ukupnih fenola. Izražavanje sadržaja ukupnih fenola preko hlorogenske kiseline predloženo je u literaturi (Chun i Kim, 2004), s obzirom da je reč o jednoj od najzastupljenijih fenolnih komponenti šljive. Sa druge strane, kod vina od grožđa, ali i mnogih voćnih vina, opšte je prihvaćeno izražavanje ukupnih fenola preko galne kiseline, kao najdominantnijeg predstavnika ove grupe jedinjenja u grožđu. Kako bi se omogućilo poređenje sadržaja ukupnih fenola vina od šljive sa literaturnim podacima o sadržaju ovih jedinjenja u drugim vinima, rezultati dobijeni u ovom radu su iskazani preko obe pomenute kiseline. Heinonen i sar. (1998) ističu da se sadržaj ukupnih fenola u voćnim vinima od crne ribizle, borovnice, brusnice, jagode i jabuke nalazi u opsegu 260-1800 mg/l, kao ekvivalent galne kiseline. Upoređujući parametre kvaliteta vina od grožđa i drugog voća dostupnih na tržištu Kanade, Rupasinghe i Clegg (2007) su utvrdili da je sadržaj ukupnih fenola u vinu od šljive značajno manji u odnosu na crveno vino (Kaberne sovignon) i vina od borovnice, maline, crne ribizle i brusnice, a veći u odnosu na vina od breskve, kruške i jabuke i belo vino sorti Šardone i Rizling. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u vinu od šljive analiziranom u radu pomenutih autora (555 mg/l, kao ekvivalent galne kiseline) značajno je manji u odnosu na rezultate do kojih se došlo za vina od sorti domaće šljive (870-1160 mg/l), prikazanim u tabeli 4.18. Uočeno neslaganje rezultata može biti posledica upotrebe različitih sorti šljive, kao i različitog postupka vinifikacije, s obzirom da postupci proizvodnje voćnih vina često uključuju razblaženje kljuka vodom tokom faze primarne prerade. Joh (2007) ističe da sadržaj fenolnih jedinjenja u gotovom vinu od kupine (1670-2150mg/l) predstavlja oko 26% količine ovih jedinjenja određenih u svežem plodu, oko 73% količine određene u soku nakon presovanja i oko 87% količine prisutne u vinu pre pretakanja. Isti autor naglašava i da je gotovo vino od kupine zadržalo oko 1% od ukupne količine antocijana u svežem plodu. Vino sorte Čačanska lepotica sadrži i najveće količine ukupnih antocijana (187,2 mg/l) i flavan-3-ola (198,8 mg/l). Najveći udeo monomernih u ukupnim antocijanima (65%), kao i najviši sadržaj ove frakcije antocijana (111,7 mg/l), određeni su u vinu sorte Požegača. Poređenja radi, sadržaj ukupnih antocijana u vinu od kupine iznosi 135-165 mg/l (Mudnić i sar., 2011), a u penušavom vinu od šljive 110-120 mg/l (Joshi i sar., 1999). Intenzitet boje vina od šljive naizraženiji je kod vina sorte Čačanska lepotica, dok vino Požegače karakteriše najveća vrednost nijanse boje. Vino sorte Čačanska rana odlikuju najmanje vrednosti intenziteta i nijanse boje, kao i najveći udeo crvene boje spektra (47,3%). Intenzitet boje crvenih vina od grožđa se kreće od 0,3 do 1,8, u zavisnosti od upotrebene sorte i tipa vina koji se proizvodi. Nijansa boje se u mladim crvenim vinima nalazi u opsegu 0,5-0,7, dok proces starenja vodi povećanju vrednosti ovog parametra (1,2-1,3) (Ribéreau-Gayon i sar., 1999). Van Balen (1984) ističe da je ekstrakcija pigmenta iz pokožice grožđa pre, tokom i nakon fermentacije vina daleko od potpune (prosečno oko 30-40%). Može se uočiti da kod sorti Čačanska lepotica i Požegača najdominantniji uticaj na boju vina imaju žuti tonovi (43,9-47,7%), dok je kod Čačanske rane registrovan najveći udeo crvenih tonova. Oblik spektra (svetloća) (93-

95%) i udeo plave boje (12,7-13,5%) nisu se značajno razlikovali kod proizvedenih vina od šljive. Visoka vrednost oblika spektra ukazuje na dominantnost crvene boje u mladom vinu (Ribéreau-Gayon i sar., 1999). Frakcija boje vina usled kopigmentacije značajno se razlikovala u zavisnosti od sorte šljive. Najveći uticaj kopigmentacije na boju vina zabeležen je kod vina sorte Požegača. Sa druge strane, izrazit doprinos visokog udela slobodnih antocijana (46,6%) karakteriše boju vina sorte Čačanska lepotica. Takođe, hemijska starost ovog vina (11,3%) je značajno manje izražena nego u slučaju vina druge dve sorte šljive (16,8-17,6%). Vrednosti indeksa hemijske starosti mladih vina su najčešće u opsegu 2-20%. Ubrzan porast vrednosti ovog parametra boje tokom odležavanja ukazuje da konkretno vino nema potencijal dugog starenja, odn. stabilnosti boje. Yildirim (2006) je u svom radu poredio hromatske karakteristike voćnih vina od borovnice, kupine, crnog dudu, maline, jagode, višnje, dunje, jabuke i kajsije, i tom prilikom utvrdio da vino od borovnice karakteriše najveći intenzitet boje, udeo žutih, crvenih i plavih tonova boje (A_{620} (%)) i udeo polimernih pigmenata.

Karakterizacija vina od sorti domaće šljive izvršena je i utvrđivanjem kvalitativnog i kvantitativnog sastava najvažnijih fenolnih jedinjenja, upotrebom visoko-performansne tečne hromatografije (HPLC). Kako bi se procenio uticaj različitih ekoloških činioca (mikroklima, zemljište) na sastav i sadržaj pojedinih polifenola, u ovom delu istraživanja, za proizvodnju vina su korištene šljive sorte Požegača sa dva dodatna lokaliteta. Sadržaji identifikovanih komponenti prikazani su u tabeli 4.19.

Tabela 4.19. HPLC analiza fenolnih jedinjenja vina od sorti domaće šljive, (mg/l)

Fenolno jedinjenje	Čačanska rana	Čačanska lepotica	Požegača I*	Požegača II*	Požegača III*
Cijanidin-3-glukozid	0,41	-	1,87	2,48	-
Peonidin-3-glukozid	0,22	0,4	24,44	29,23	61,6
Cijanidin-3-rutinozid	97,2	8,4	21,6	25,47	9,89
Peonidin-3-rutinozid	0,47	9,35	0,67	0,75	1,3
Hlorogenska kiselina	2,11	12,92	2,09	2,56	3,22
Vanilinska kiselina	7,62	15,81	-	-	1,25
Kafena kiselina	5,4	11,86	1,48	1,19	1,32
Benzoeva kiselina	0,74	5,19	2,63	7,42	11,35
p-kumarinska kiselina	2,84	4,82	5,7	-	-
Katehin	-	9,59	14,91	14,67	19,65
Rutin	3,8	21,07	3,51	9,85	10,48
Kvercetin	0,94	0,66	-	1,15	1,52
Kemferol	0,35	-	0,84	0,38	-

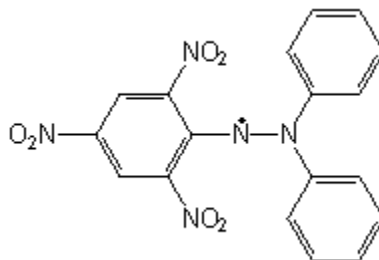
* oznake I, II i III predstavljaju uzorke šljive sa tri različita lokaliteta.

HPLC analizom vina od sorti domaće šljive i upotrebom dostupnih standarda, utvrđeno je prisustvo 13 polifenolnih komponenti (8 flavonoida i 5 fenolnih kiselina). Koncentracije galne, siringinske i t-cimetne kiseline, kao i resveratrola, piceida, naringenina i hesperetina u proizvedenim vinima od šljive bile su ispod granica detekcije primenjene metode. Prisustvo peonidin-3-glukozida, cijanidin-3-rutinozida, peonidin-3-rutinozida, hlorogenske kiseline, kafene kiseline i rutina detektovano je u svim ispitanim vinima, dok je prisustvo ostalih fenolnih jedinjenja karakteristika pojedinih sorti ili lokaliteta uzgajanja. U proizvedenim vinima značajno se po svom sadržaju ističu dva antocijana, peonidin-3-glukozid i cijanidin-3-rutinozid. Ovakve rezultate potvrđuje sopštenje autora Walkowiak-Tomczak (2008) koji ističe da su cijanidin-3-glukozid, cijanidin-3-rutinozid i peonidin-3-rutinozid najzastupljeniji antocijani u šljivi. Malvidin-3-glukozid, petunidin-3-glukozid i delfinidin-3-glukozid nisu detektovani u vinima od šljive. Najdominantnije fenolne kiseline u vinima od šljive su hlorogenska i vanilinska. Sadržaji kvercetina i kemferola u vinima su ispod 1 mg/l. Značajno viši sadržaj ova dva jedinjenja (do 19,4 mg/l, odnosno 3,3 mg/l) karakterističan je za crveno vino i vina od crne ribizle i jagode (Dey i sar., 2009). Vino sorte Čačanska rana karakteriše relativno visoka koncentracija cijanidin-3-rutinozida (97,2 mg/l), niske koncentracije peonidin-3-glukozida (0,22 mg/l) i benzojeve kiseline (0,74 mg/l), i odsustvo katehina. Sadržaj peonidin-3-rutinozida, fenolnih kiselina (izuzev p-kumarinske) i rutina značajno je viši u vinu sorte Čačanska leptotica, u odnosu na vina ostale dve sorte. Najvažnije karakteristike vina sorte Požegača su visoki sadržaji peonidin-3-glukozida (24,44 mg/l) i katehina (14,91 mg/l), kao i odsustvo vanilinske kiseline i kvercetina. Kvalitativni i kvantitativni sastav polifenola u vinu sorte Požegača značajno se razlikovao u zavisnosti od lokaliteta na kome su šljive uzgajane. Najuočljivije razlike su bile prisutne po pitanju sadržaja peonidin-3-glukozida, cijanidin-3-rutinozida, benzojeve kiseline i rutina. Sa druge strane, značajnijih razlika u sadržaju peonidin-3-rutinozida, hlorogenske i kafene kiseline u vinima od šljiva sa različitim lokalitetima nije bilo. Šljive sa lokaliteta I i II dale su vina sa najmanjim razlikama u sastavu i sadržaju polifenola. Značajnije razlike između ova dva vina prisutne su samo po pitanju sadržaja benzojeve i p-kumarinske kiseline. Vino sorte Požegača sa lokaliteta III odlikuje najviši sadržaj peonidin-3-glukozida (61,6 mg/l), benzojeve kiseline (11,35 mg/l) i katehina (19,65 mg/l), ali i najniži sadržaj cijanidin-3-rutinozida (9,89 mg/l). p-kumarinska kiselina određena je samo u vinu sa lokaliteta I, a vanilinska kiselina u vinu sa lokaliteta III. Razlike u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu polifenola u proizvedenim vinima od šljive (tabela 4.19.) i vinima od grožđa i višnje (Pantelić i sar., 2014) jasno se mogu uočiti. Vino od šljive uglavnom sadrži veće količine hlorogenske kiseline, katehina i rutina u odnosu na druga dva vina. Kvalitativni sastav antocijana u vinu od šljive mnogo je sličniji vinu od višnje nego od grožđa. Jedini antocijanin koji je detektovan u vinima od sve tri vrste voća je cijanidin-3-glukozid. Najdominantniji antocijanin u vinima od šljive i višnje je cijanidin-3-rutinozid, a oba vina karakteriše i prisustvo peonidin-3-glukozida i peonidin-3-rutinozida. Acetilglukozid i kumarilglukozid derivati malvidina, cijanidina, peonidina, petunidina i delfinidina detektovani su samo u vinima od grožđa (Pantelić i sar., 2014).

4.6. Ispitivanje funkcionalnih karakteristika vina od šljive

4.6.1. Antiradikalska aktivnost

Antiradikalska aktivnost vina od sorti domaće šljive na stabilene DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikale ispitana je spektrofotometrijski pomoću DPPH metode. U svom slobodnom, radikalnom obliku, DPPH[•] ima apsorpcionu traku na 515 nm koja se smanjuje u prisustvu antioksidativnih komponenti. Hemijska struktura stabilnog DPPH[•] radikala prikazana je na slici 4.15.



Slika 4.15. Hemijska struktura stabilnog DPPH[•] radikala

Različitim hemijskim transformacijama antioksidanti redukuju DPPH[•] radikale u neradikalni DPPH-H oblik. Mehanizam antiradikalskog delovanja fenolnih jedinjenja prema ovim radikalnim vrstama zasniva se na njihovoj sposobnosti da otpuste H-atom i tako formiraju stabilni aroksil radikal, koji u reakciji sa DPPH[•] radikalom dovodi do formiranja stabilnog jedinjenja (Kurechi, 1983). Opisane hemijske promene mogu se pratiti spektrofotometrijski, praćenjem promene boje od ljubičaste do žute, ili ESR (elektron spin rezonantnom) spektrometrijom tj. direktnim merenjem koncentracije DPPH[•] radikala. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, antocijana i flavan-3-ola i antiradikalska aktivnost na DPPH[•] radikale vina od šljive prikazani su u tabeli 4.20.

Tabela 4.20. Sadržaj fenolnih jedinjenja i antiradiklaska aktivnost analiziranih vina od šljive

	Ukupni fenoli (g/l)	Ukupni antocijani (mg/l)	Flavan-3-oli (mg/l)	DPPH [•] IC ₅₀ (ml/ml)
Čačanska rana I*	1,65 ± 0,07 ^a	171,8 ± 2,1 ^a	86,3 ± 2,3 ^a	0,2 ± 0,02 ^b
Čačanska rana II*	1,72 ± 0,05 ^a	178,8 ± 5,2 ^{ab}	85,5 ± 3,4 ^a	0,17 ± 0,00 ^{ab}
Čačanska lepotica I	2,18 ± 0,04 ^c	187,2 ± 3,7 ^b	198,9 ± 4,4 ^c	0,1 ± 0,02 ^a
Čačanska lepotica II	2,04 ± 0,09 ^c	194,6 ± 6,4 ^b	178,9 ± 5,6 ^b	0,13 ± 0,01 ^a
Požegača I	1,88 ± 0,05 ^b	173,3 ± 6,2 ^a	180,6 ± 3,8 ^b	0,21 ± 0,02 ^b
Požegača II	1,73 ± 0,11 ^a	168 ± 2,5 ^a	169,7 ± 4,8 ^b	0,23 ± 0,00 ^b

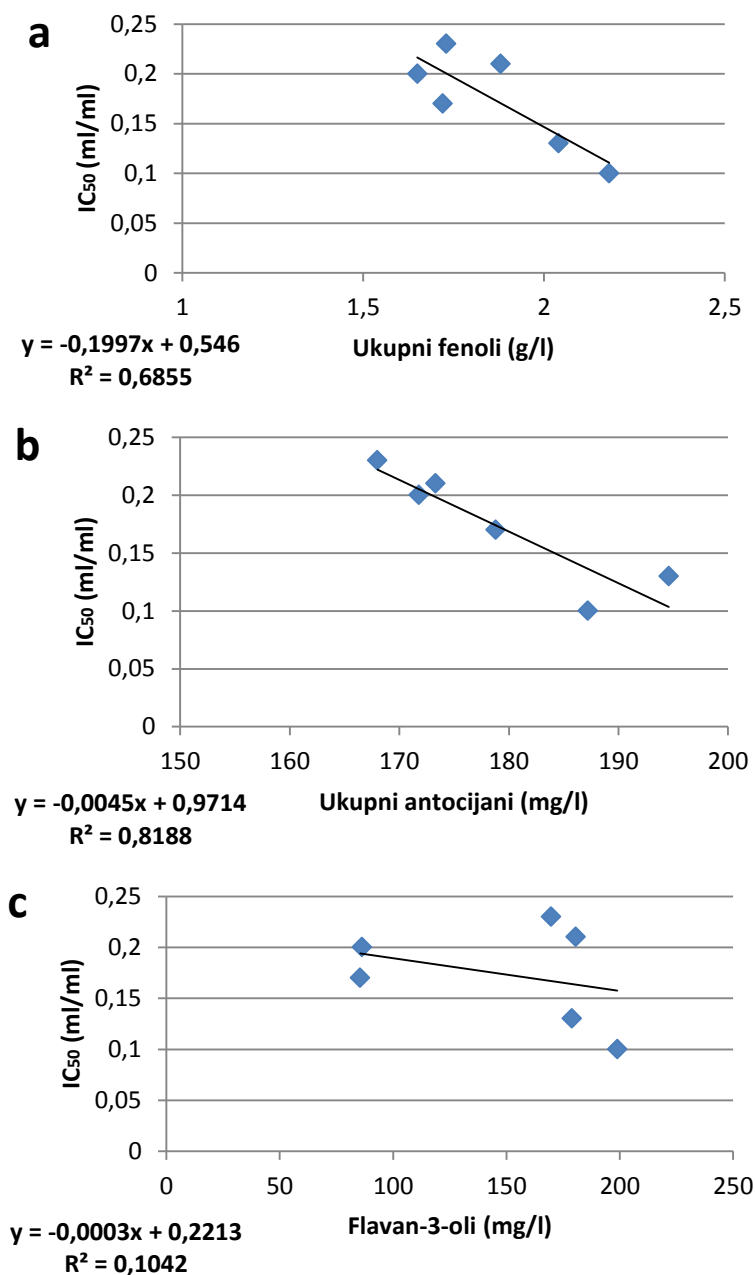
^{a, b, c} različita slova u okviru istog reda označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$); * Oznake I i II se odnose na uzorke šljive sa dva različita mikrolokaliteta.

Analizirana su vina proizvedena od sorti domaće šljive sa dva različita mikrolokaliteta, u cilju potpunije karakterizacije njihovog antioksidativnog potencijala. Vrednosti kapaciteta hvatanja slobodnih radikala (RSC, %), korištene su za određivanje IC_{50} vrednosti (ml/ml) vina, te stoga nisu direktno prikazane u radu.

Sva analizirana vina od šljive pokazala su značajnu antiradikalnu aktivnost (IC_{50} 0,1-0,23 ml/ml). Kapacitet hvatanja slobodnih radikala (RSC (%)) ispitivanih vina iznosio je maksimalnih 100%, a visoke vrednosti ovog pokazatelja antiradikalne aktivnosti zabeležene su i u slučaju analiziranih vina prvobitno razblaženih dva puta (RSC 80-93%). Vina sorte Čačanska lepotica, proizvedena od šljiva sa oba mikrolokaliteta, karakterišu najveći sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, antocijana i flavan-3-ola i najniže IC_{50} vrednosti (najviša antiradikalna aktivnost). Značajno ($p < 0,05$) niža sposobnost neutralizacije DPPH^{*} radikala utvrđena je kod vina od druge dve sorte šljive. Vina sorte Čačanska rana i Požegača ne pokazuju razlike u antioksidativnom potencijalu i pored značajne razlike u sadržaju ukupnih fenola i flavan-3-ola. Razlike u sadržaju ukupnih fenolnih jedinjenja kod vina od šljiva sa različitim mikrolokaliteta nisu prouzrokovale razlike u antiradikalnoj aktivnosti, što se može primetiti u slučaju vina sorte Požegača (tabela 4.20). Literaturni podaci ističu i slučajeve gde vina čiji se sadržaj ukupnih fenola statistički značajno ne razlikuje karakteriše različit antioksidativni potencijal (Atanacković, 2012). Antiradikalna aktivnost fenolnih jedinjenja značajno zavisi od njihove strukture (broja i položaja hidroksilnih grupa).

Rezultati brojnih istraživanja (De Beer i sar., 2003; Rupasinghe i Clegg, 2007; Radovanović i sar., 2009; Puškaš, 2010) dokazali su visok stepen pozitivne korelacije sadržaja fenolnih jedinjenja i antioksidativnog potencijala vina izraženog preko kapaciteta hvatanja slobodnih radikala (RSC, %). Korelaciona analiza pokazala je značajnu ($p < 0,05$) negativnu linearnu korelaciju ($r = -0,828$) između sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i IC_{50} vrednosti (slika 4.16.) kod proizvedenih vina od šljive. Negativan predznak koeficijenta pravca u dobijenom regresionom modelu ukazuje da se pri porastu koncentracije fenolnih jedinjenja IC_{50} vrednost smanjuje, tj. da se antiradikalna aktivnost vina povećava. Značajna pozitivna linearna korelacija između antioksidativnog potencijala i sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja utvrđena je i kod voćnih vina od šljive, kruške, jabuke, kajsije, maline, borovnice, kupine, dunje, jagode i višnje (Yildirim, 2006; Rupasinghe i Clegg, 2007; Zhuang i sar., 2011). Analizom korelacije između sadržaja ukupnih antocijana i IC_{50} vrednosti utvrđen je još veći stepen kvantitativnog slaganja izmenju promenljivih nego što je to slučaj sa sadržajem ukupnih fenola. Vrednost koeficijenta linearne korelacije $r = -0,905$ ukazuje da postoji jaka negativna korelaciona veza između sadržaja ukupnih antocijana i IC_{50} vrednosti, tj. da je u slučaju vina sa većim sadržajem antocijana potrebna njegova manja zapreminska koncentracija za neutralizaciju 50% DPPH^{*} radikala. Radovanović i sar. (2009) su, takođe, potvrdili značajnu korelaciju između sadržaja antocijana i sposobnosti neutralizacije DPPH^{*} radikala. Sa druge strane, između sadržaja flavan-3-ola i IC_{50} vrednosti utvrđen je veoma slab stepen linearne korelacije ($r = -0,323$), pa stoga vina sa većim sadržajem ovih jedinjenja ne karakteriše i veći antioksidativni potencijal. Na osnovu rezultata

korelacione analize može se zaključiti da se vina sa većim sadržajem ukupnih fenola i antocijana, stoga, mogu smatrati boljim antioksidansima. Puškaš (2010) u svom radu visok antioksidativni potencijal vina proizvedenih sa dodatkom semenki objašnjava povećanim sadržajem fenolnih jedinjenja (pre svega flavan-3-ola) u odnosu na kontrolna vina. Slab uticaj flavan-3-ola na antiradikalsu aktivnost vina od šljive, u poređenju sa vinom od grožđa, može se objasniti različitim sastavom i sadržajem ovih jedinjenja u polaznoj sirovini.



Slika 4.16. Korelacija između antiradikalske aktivnosti vina i a) ukupnih fenola, b) ukupnih antocijana i c) flavan-3-ola.

Vrednosti koeficijenta determinacije (R^2), prikazane na slici 4.16, pokazuju procenat ukupnih varijacija antiradikalske aktivnosti (odnosno IC_{50} vrednosti) koje se mogu objasniti posmatranim faktorom fenolnog sastava vina. Vrednost $R^2=0,8188$ ukazuje da je približno 82% ukupnih varijacija antiradikalske aktivnosti objašnjeno sadržajem ukupnih antocijana, a 18% je rezultat drugih uticaja. Slično tumačenje se može izvesti i u slučaju uticaja sadržaja ukupnih fenola i flavan-3-ola na antiradikalnu aktivnost vina od šljiva, s tim da je u slučaju sadržaja flavan-3-ola dobijena vrednost koeficijenta determinacije veoma niska ($R^2 = 0,1042$).

Razlike u antioksidativnom potencijalu vina zavise više od koncentracije pojedinih fenolnih jedinjenja nego od sadržaja ukupnih fenola. Sadržaj pojedinih fenolnih jedinjenja različito korelira sa antiradikalnom aktivnošću, pa je, stoga, i njihov doprinos antioksidativnom potencijalu vina različit. Najizraženiju aktivnost u pogledu hvatanja slobodnih radikala imaju galna, taninska, kafena i ferulna kiselina, kvercetin, rutin, kao i pojedine frakcije antocijana (de Gaulejac i sar., 1999; Sanchez-Moreno i sar., 1999). Vino od šljive karakterišu upravo značajne koncentracije nekih od ovih jedinjenja (kafena kiselina, kvercetin, rutin, cijanidin-3-rutinozid) (tabela 4.19). Dobijeni rezultati idu u prilog istraživanjima koja ističu veću antiradikalnu aktivnost vina od šljive u odnosu na neka druga voćna vina (jabuka, kruška, breskva, trešnja, malina) (Rupasinghe i Clegg, 2007). Veće antiradikalno delovanje antioksidanti vina ispoljavaju u kombinaciji (sinergističko dejstvo), nego svaki pojedinačno (Meyer i sar., 1997).

4.6.2. Antimikrobna aktivnost

S obzirom na brojne literaturne podatke koji ukazuju na značajnu antimikrobnu aktivnost vina prema velikom broju patogenih mikroorganizama, ispitano je dejstvo proizvedenih vina od sorti domaće šljive prema odabranim sojevima Gram-negativnih bakterija (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), Gram-pozitivnih bakterija (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) i kvasaca (*Saccharomyces cerevisiae* i *Candida albicans*). Sa druge strane, relativni doprinos različitih aktivnih komponenti vina njegovoj ukupnoj antimikrobnoj aktivnosti ni danas nije potpuno razjašnjen. Kako bi se razdvojio uticaj polifenola vina, sadržaja etanola, sadržaja SO_2 , sadržaja kiselina i vrednosti pH od uticaja drugih sastojaka vina, antimikrobno delovanje netretiranih uzoraka vina od šljive upoređeno je sa delovanjem odgovarajućih uzoraka vina iz kojih su uklonjeni alkohol i SO_2 (A_{1-3}) i uzoraka iz kojih je uklonjen najveći deo fenolnih jedinjenja (FB_{1-3}). Kao kontrolni uzorci za ocenu antimikrobnog dejstva pojedinih sastojaka vina korišteni su još i 8% v/v rastvor etanola (K_{et}), rastvor jabučne i sirćetne kiseline podešen na pH 3,6 (K_{pH}) i rastvor kalijum metabisulfita (koncentracija SO_2 20 mg/l) (K_{SO_2}), kao i fosfatni pufer (pH 7,0) koji je korišten za pripremu uzorka K_{pH} . Sastav pripremljenih kontrolnih uzoraka reprezentuje realne vrednosti datih parametara u testiranim vinima od šljive.

Antimikrobna aktivnost vina od šljive i kontrolnih uzoraka, izražena kao prečnik zone inhibicije (mm) prikazana je u tabeli 4.21.

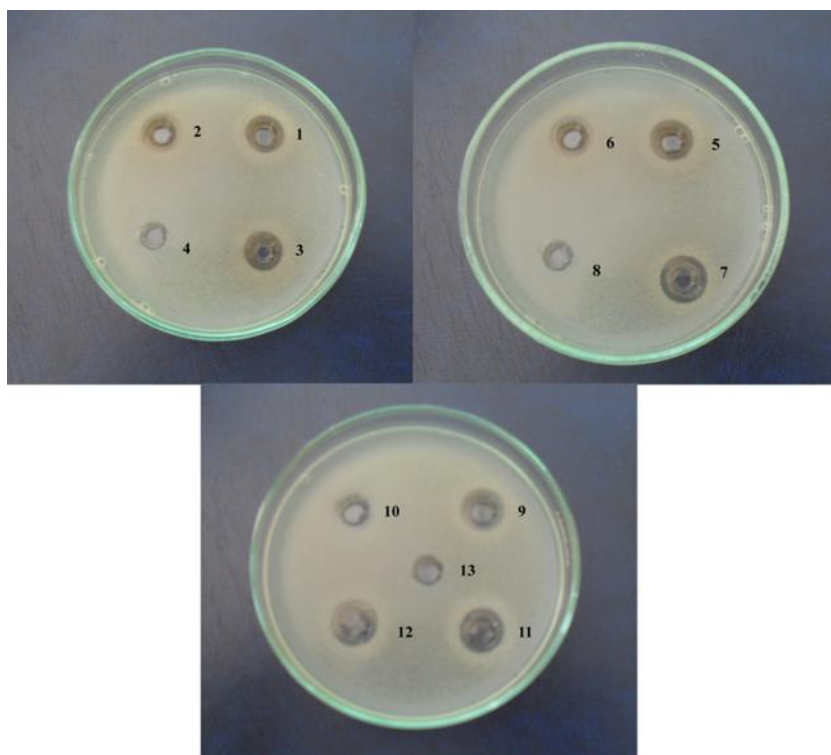
Tabela 4.21. Antimikrobna aktivnost vina od šljive i kontrolnih uzoraka, izražena kao prečnik zone inhibicije, (mm)

Test mikroorganizam	Uzorci												
	U ₁	U ₂	U ₃	A ₁	A ₂	A ₃	FB ₁	FB ₂	FB ₃	K _{et}	K _{pH}	K _{SO₂}	pufer
<i>Salmonella typhimurium</i>	12 ± 0	12 ± 0	13 ± 0	12 ± 0	13 ± 0	11 ± 0	12,33 ± 0,58	13,33 ± 0,58	12,33 ± 1,15	nd	17 ± 0	nd	nd
<i>Escherichia coli</i>	11,67 ± 0,58	14,67 ± 0,58	13,33 ± 0,58	13 ± 0	17 ± 1	15 ± 0	12 ± 0	13 ± 0	12,5 ± 0,75	nd	17 ± 1	nd	nd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14 ± 0	12,67 ± 0,58	15 ± 0	14 ± 1	13,67 ± 0,58	13 ± 0	13,67 ± 0,58	14,67 ± 0,58	15 ± 1	nd	18 ± 0	nd	nd
<i>Staphylococcus aureus</i>	12 ± 0	13,67 ± 0,58	16 ± 1	11,67 ± 0,58	12,67 ± 1,53	14,67 ± 0,58	12,33 ± 1,15	14,33 ± 1,15	17 ± 1	nd	12 ± 0	nd	nd
<i>Bacillus cereus</i>	13,67 ± 0,58	13,67 ± 0,58	15 ± 0	13,33 ± 0,58	14 ± 1	14 ± 1	13 ± 0	14 ± 1	12,33 ± 0,58	nd	12 ± 0	nd	nd
<i>Listeria monocytogenes</i>	13 ± 0	11 ± 0	13 ± 0	11 ± 0	12 ± 0	11 ± 0	12,67 ± 0,58	12 ± 0	13,67 ± 0,58	nd	15 ± 0	nd	nd
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	nd	nd	nd	15,33 ± 0,58	11,67* ± 0,58	14,67 ± 0,58	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>Candida albicans</i>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd – nije detektovana zona inhibicije

* - zona redukovano rasta

Ispitani netretirani uzorci vina (U_{1-3}), uzorci iz kojih je uklonjen alkohol i SO_2 (A_{1-3}) i uzorci iz kojih su uklonjeni fenoli (FB_{1-3}) pokazali su antibakterijsku aktivnost prema svim bakterijskim sojevima. Oko bunarčića pojavile su se čiste zone inhibicije (slika 4.17.) koje mogu da ukažu na baktericidno delovanje pomenutih uzoraka. Nije uočena značajna razlika u delovanju među ispitanim uzorcima (prečnik zone inhibicije prosečno 12-13 mm), kao ni razlika u osetljivosti/otpornosti Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija, izuzev u slučaju netretiranog vina od sorte Čačanska rana, kod koga je antimikrobno dejstvo prema bakterijama *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus* bilo nešto izraženije (prečnik zone inhibicije od 15 do 16 mm).



Slika 4.17. Zone inhibicije za uzorke vina od šljive i kontrolne uzorke prema *Pseudomonas aeruginosa* (1-U1, 2-U2, 3-U3, 4- Ket, 5-A1, 6-A2, 7-A3, 8-KSO₂, 9-FB1, 10-FB2, 11-FB3, 12-KpH, 13-pufer).

Nepostojanje značajne razlike između dejstva uzoraka A_{1-3} i FB_{1-3} i njima odgovarajućih netretiranih vina ukazuje na to da se fenolna jedinjenja, kao i sadržaj etanola i SO_2 , ne mogu smatrati nosiocima antimikrobne aktivnosti vina od sorti domaće šljive. Vino sorte Čačanska lepotica pokazuje znatno slabije antimikrobno dejstvo od vina sorte Čačanska rana i pored značajno većeg sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja (tabela 4.18). Sugita-Konishi i sar. (2001) u svojoj studiji dolaze do istog zaključka na osnovu rezultata koji ukazuju da vino, kod koga je sredstvima za bistrenje uklonjena najveća količina fenolnih jedinjenja, pokazuje skoro istovetna antimikrobna svojstva kao i netretirano vino. Primenjujući sličan metodološki pristup u nameri da ispituju antimikrobnu aktivnost pojedinačnih aktivnih sastojaka crvenog vina prema

alimentarnim patogenima (*S. enteritidis* i *E. coli*), Boban i sar. (2010) su utvrdili da najveće inhibitorno dejstvo na rast bakterija poseduje netretirano crveno vino, pa zatim vino iz koga su uklonjeni fenoli, vino iz koga je uklonjen etanol, kombinacija rastvora etanola i pufernog rastvora, puferni rastvor, i na kraju rastvor etanola. S obzirom da se vino iz koga su uklonjeni fenoli pokazalo najefikasnijim antibakterijskim sredstvom posle netretiranog vina, moglo se zaključiti da su nefenolne komponente vina odgovorne za najveći deo njegove antimikrobne aktivnosti. Sa druge strane, ovakvi zaključci nisu u saglasnosti sa rezultatima brojnih studija u kojima se fenolna jedinjenja smatraju glavnim aktivnim komponentama odgovornim za antimikrobnu aktivnost vina (Nohynek i sar., 2006; Rodriguez Vaquero i sar., 2007; Gaňan i sar., 2009). Radovanović i sar. (2009) čak ističu značajnu linearnu korelaciju između sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja ($r^2 = 0,83-0,91$), sadržaja monomernih antocijana ($r^2 = 0,82-0,88$) i antibakterijske aktivnosti prema *S. aureus* i *E. coli*.

Prilikom razmatranja antimikrobne aktivnosti fenolnih jedinjenja mora se uzeti u obzir činjenica da su ova jedinjenja veoma osetljiva na fizičko-hemijske promene medijuma u kome se nalaze. Te promene mogu značajno uticati na njihovu rastvorljivost, precipitaciju i interakcije sa proteinima, pa samim tim i na njihove biohemijske karakteristike i biološku aktivnost. Iz ovih razloga frakcije fenolnih jedinjenja izdvojene iz različitih ekstrakata vina u najvećem broju slučajeva ne pokazuju antimikrobno dejstvo koje bi demonstrirali u fizičko-hemijskom okruženju netretiranog vina.

Kvasci *S. cerevisiae* i *C. albicans* pokazali su veću otpornost prema test uzorcima u odnosu na bakterije. Prema kvascu *Saccharomyces cerevisiae* delovanje su ispoljili jedino uzorci iz kojih je uklonjen alkohol i SO₂. Delovanje ovih uzoraka je mikrobiostatsko jer se oko bunarčića javljaju zone smanjenog rasta. Najveću otpornost prema dejstvu ispitanih uzoraka pokazao je kvasac *Candida albicans* kod koga zona inhibicije nije detektovana ni u jednoj od postavljenih proba. Odsustvo antifugalne aktivnosti može se delimično objasniti činjenicom da su kvasci acidotolerantniji mikroorganizmi od većine bakterija. Izrazita rezistentnost *Candida albicans* potvrđena je i prilikom ispitivanja antimikrobnog delovanja dvanaest ekstrakata raličitih vrsta bobičastog voća. Minimalna osetljivost *C. albicans* utvrđena je samo prilikom primene ekstrakata maline i jagode (Nohynek i sar., 2006).

Antimikrobno delovanje uzoraka vina iz kojih je uklonjen etanol i SO₂ ukazuje da nosioci aktivnosti u vinu od šljive nisu ova jedinjenja. To potvrđuje i izostanak delovanja kontrolnih uzoraka (etanola i rastvora SO₂). Od ostalih kontrolnih uzoraka, pufer nije ispoljio antimikrobnu aktivnost, dok je K_{pH} pokazao značajno antibakterijsko delovanje, ali ne i dejstvo na rast kvasaca. Antibakterijsko dejstvo kontrolnog uzorka K_{pH} je naročito izraženo prema Gram-negativnim bakterijama (prečnik zone inhibicije 17-18 mm). Delovanje K_{pH} prema većini bakterija (osim *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*) bilo je izraženije u odnosu na uzorke vina i kontrolne uzorke, što ukazuje da su kiseline i vrednost pH glavni nosioci antibakterijske aktivnosti u vinu od šljive. Ovom zaključku ide u prilog i činjenica da vino sorte Čačanska rana, koje karakteriše značajno viši sadržaj kiselina, poseduje veću antimikrobnu aktivnost u odnosu na vina od druge dve sorte. Sorta Čačanska rana sadrži i najveću količinu jabučne kiseline za

koju je utvrđeno da poseduje najizraženiji antimikrobni efekat među organskim kiselinama (Fernandes i sar., 2007). Harding i Maidment (1996), takođe, ističu značajnu antibakterijsku aktivnost vina prema patogenim bakterijama (*E. coli*, *Salmonella enteritidis* i *Shigella sonnei*), ali ne i pufernog rastvora odgovarajuće vrednosti pH (kao u vinima). Do sličnog zaključka došli su i Sugita-Konishi i sar. (2001) upoređujući antibakterijska svojstva vina *in vitro* i *in vivo*. Autori ističu odsustvo antibakterijskog dejstva rastvora fosfatnog pufera (pH 3,3), za razliku od primenjenih uzoraka belog i crvenog vina. Upoređivanjem pomenutih literaturnih podataka sa rezultatima do kojih se došlo u sklopu izrade ove doktorske disertacije, može se izvesti zaključak da su sadržaj ukupnih kiselina i vrednosti pH u najvećoj meri zaslužni za antimikrobnu aktivnost vina od šljive.

Za razliku od vina od šljiva, konvencionalna vina od grožđa (pre svega crvena) karakteriše viši sadržaj i različit sastav fenolnih jedinjenja, viši sadržaj etanola i dominantnost vinske kiseline u sadržaju ukupnih kiselina (slabiji antimikrobni efekat u odnosu na jabučnu kiselinu). Različit sastav i sadržaj aktivnih komponenti stoga može poslužiti kao objašnjenje za razlike u ispoljavanju antimikrobnog dejstva ove dve vrste vina. Boban i sar. (2010), koji su u svom radu odredili izraženije antimikrobno dejstvo netretiranog vina u odnosu na sve kontrolne uzorke, u zaključku ističu da se antimikrobna aktivnost kompleksnog medijuma kao što je netretirano vino ne može isključivo pripisati njegovim fenolnim ili nefenolnim komponentama. Sa druge strane, u slučaju vina od sorti domaće šljive proizvedenih u sklopu ove doktorske disertacije sinergističko antimikrobno dejstvo sadržaja kiselina i vrednosti pH bilo je izraženije u odnosu na efekat ostalih aktivnih komponenti. Zajedničko za oba slučaja je stanovište da se antimikrobna aktivnost vina ne može se predvideti na osnovu sadržaja pojedinih aktivnih komponenti.

Izvesna odstupanja rezultata antimikrobne aktivnosti vina dobijena od različitih autora su očekivana, i često se javljaju i kod ispitivanja antimikrobnog dejstva uzoraka različite prirode (npr. biljni ekstrakti). Jedan od razloga jesu različite metode ispitivanja antimikrobne aktivnosti (agar difuziona metoda sa papirnim diskovima, bunarčićima ili cilindrima, odnosno diluciona metoda, mikrodiluciona i makrodiluciona) zbog čega se difuzija aktivnih komponentata ne odvija na isti način i u istom stepenu, tako da nije uvek moguće izvesti pouzdana kvantitativna merenja. Osim toga, broj ćelija u primenjenim inokulumima i količina inokuluma nisu standardizovani, a u nekim israživanjima taj podatak i nije naveden. Količina i sastav podloge (bujona ili agara) takođe može uticati na rezultat, zatim veličina bunarčića i papirnih diskova, količina antimikrobne supstance, period inkubacije, rastvarači za pojedine ekstrakte itd. Zato je potrebno standardizovati ove metode kako bi se izbegle značajne razlike u rezultatima koje su posledica ovih faktora (Velićanski, 2012).

4.6.3. Antiproliferativna aktivnost

Skining prirodnih ili sintetskih organskih proizvoda (jedinjenja) radi otkrivanja njihove potencijalne aktivnosti u terapiji tumora može se obaviti primenom *in vitro* bioloških testova. U ovim testovima koriste se neoplastične ćelijske linije humanog porekla ili poreklom od tumora drugih sisara. Sposobnost jedinjenja koje se testira da inhibira rast ovih tumorskih ćelija u kulturi predstavlja indikaciju njegove potencijalne vrednosti kao terapeutskog sredstva *in vivo* (Lieberman i sar., 2001).

Antiproliferativna aktivnost vina od sorti domaće šljive ispitana je u *in vitro* uslovima na tri histološki različite ćelijske linije karcinoma: Hep2, RD i L2OB. Citotoksični efekat proizvedenih vina izražen je kao IC_{50} vrednost (koncentracija koja inhibira 50% ćelijskog rasta) prikazan je u tabeli 4.22. Kao kontrolni uzorak primenjene metode korištene su nestimulisane ćelije, odnosno ćelije u kulturi čiji je rast 100%.

Tabela 4.22. Antiproliferativna aktivnost vina od sorti domaće šljive

Uzorak	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)		
	Hep2 ćelije	RD ćelije	L2OB ćelije
Čačanska rana	23,39 \pm 0,46	24,53 \pm 0,94	32,28 \pm 7,10
Čačanska leptotica	36,77 \pm 5,91	40,59 \pm 2,34	50,34 \pm 0,90
Požegača	27,29 \pm 0,72	42,57 \pm 2,29	33,35 \pm 1,29
K ₁	22,26 \pm 7,25	27,34 \pm 0,76	31,21 \pm 3,77
K ₃	26,83 \pm 2,88	40,12 \pm 2,93	30,76 \pm 0,46
cis-diamindihloroplatina (cis-DDP)	0,94 \pm 0,55	1,4 \pm 0,97	0,72 \pm 0,64

American National Cancer Institute (NCI), kriterijum za citotoksičnu aktivnost biljnih ekstrakata je $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ (Itharat i sar., 2004).

količina dodatih koštica K₁- 25%, K₃- 100% (predstavlja udeo ukupne mase koštica odvojenih kod dobijanja 250 g kljuka)

Ogledna vina od šljive pokazuju značajnu aktivnost na primenjene ćelijske linije s obzirom da sva ispitana vina pokazuju citotoksičnu aktivnost pri koncentracijama manjim od 50 $\mu\text{g/ml}$. Najpotentnijim inhibitorom rasta ćelija sve tri linije pokazalo se vino sorte Čačanska rana. Ćelije Hep2 su se pokazale najosetljivijim dok je efekat ovog vina bio najslabije izražen kod ćelija L2OB. Prema Američkom nacionalnom institutu za rak (NCI), kriterijum za citotoksičnu aktivnost biljnih ekstrakata je $IC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$ (Itharat i sar., 2004), što vino ove sorte zadovoljava za ćelijske linije Hep2 i RD, dok je u sličaju ćelija L2OB utvrđena vrednost IC_{50} neznatno iznad definisane granice. Sa druge strane, efekat vina sorte Čačanska leptotica je među ispitanim vinima bio najslabiji. Vino pomenute sorte za 50% smanjuje preživljavanje ispitanih tumorskih ćelija pri koncentracijama 35-50 $\mu\text{g/ml}$. Može se uočiti da je koncentracija vina sorte Čačanska rana koja dovodi do inhibicije 50% ćelijskog rasta linija RD i L2OB skoro dva puta manja nego što je to slučaj za vino Čačanske leptotice. Vino sorte Požegača karakteriše značajno citotoksično dejstvo na ćelije Hep2 ($IC_{50} = 27,29 \mu\text{g/ml}$), dok u slučaju druge dve ćelijske linije

njegova aktivnost je slabije izražena (naročito za RD). Značajnije razlike u antiproliferativnoj aktivnosti vina sorti Čačanska rana i Požegača prisutne su samo po pitanju inhibicije rasta ćelijske linije RD.

Vina proizvedena fermentacijom kljuka koji je sadržao 25% (K_1) i 100% (K_3) koštica, odvojenih tokom primarne prerade šljiva sorte Čačanska lepotica, takođe, karakteriše značajna antiproliferativna aktivnost. U poređenju sa vinom proizvedenim klasičnim postupkom (bez koštica), primećuje se da prisustvo koštica u kljuku tokom fermentacije dovodi do značajnog povećanja citotoksičnog dejstva prema ispitanim ćelijskim linijama karcinoma. Izraženo preko IC_{50} vrednosti, efekat dodatka koštica odgovoran je za povećanje citotoksične aktivnosti vina od oko 35-40%. Povećanje citotoksične aktivnosti može se smatrati posledicom toksičnog dejstva cijanovodonične kiseline na ćeliju karcinoma. Ova toksična kiselina nastaje razgradnjom molekula amigdalina (redovne komponente koštica) u ćeliji. Zhou i sar. (2012) ističu da produkti razgradnje amigdalina aktivnošu enzima β -glukozidaze poseduju snažno citotoksično dejstvo prema ćelijskoj liniji HepG2 humanog karcinoma jetre. Takođe, može se uočiti da se inhibitorno dejstvo vina na rast ćelija karcinoma Hep2 i L2OB ne povećava srazmerno sa porastom upotrebjene količine koštica tokom fermentacije, tj. sa porastom koncentracije cijanovodonične kiseline. U slučaju ćelija RD povećanje količine koštica dovodi do pada citotoksične aktivnosti. Upotreba veće količine koštica obezbeđuje prelazak veće količine amigdalina u kljuk, a razgradnjom ovog jedinjenja oslobađaju se, pored cijanovodonične kiseline, i molekuli glukoze koje ćelije karcinoma mogu da koriste za svoj rast. Može se primetiti da se suprotstavljajući efekti glukoze i cijanovodonične kiseline na rast ćelija karcinoma RD, u slučaju prisustva veće količine koštica (K_3), međusobno poništavaju, što rezultuje proizvodnjom vina čija se antiproliferativna aktivnost neznatno razlikuje od vina proizvedenog po klasičnom postupku.

Antiproliferativna aktivnost vina od šljive ocenjena je i poređenjem dobijenih rezultata sa IC_{50} vrednošću cis-diamindihloroplastine (cis-DDP). cis-DDP je neorganski agens sa veoma izraženom antineoplastičnom aktivnošću. Antineoplastici (citostatici) su lekovi čiji se mehanizam delovanja zasniva na sposobnosti da interferiraju sa metabolizmom ili reproduktivnim ciklusom ćelije kancera koju razaraju. Koristi se kao referentna supstanca za izražavanje citotoksičnog dejstva s obzirom da dovodi do snažne inhibicije rasta ćelija kancera. Uočava se da je antiproliferativna aktivnost cis-DDP 25-40 puta jača od aktivnosti vina od sorti domaće šljive. Međutim, treba imati u vidu da antineoplastici (među kojima i cis-DDP) zbog često neselektivnog delovanja ne prave razliku između tumorskih i normalnih ćelija, što se može klinički ispoljiti različitim nepoželjnim delovanjima (Rošin-Grget i Linčir, 1990).

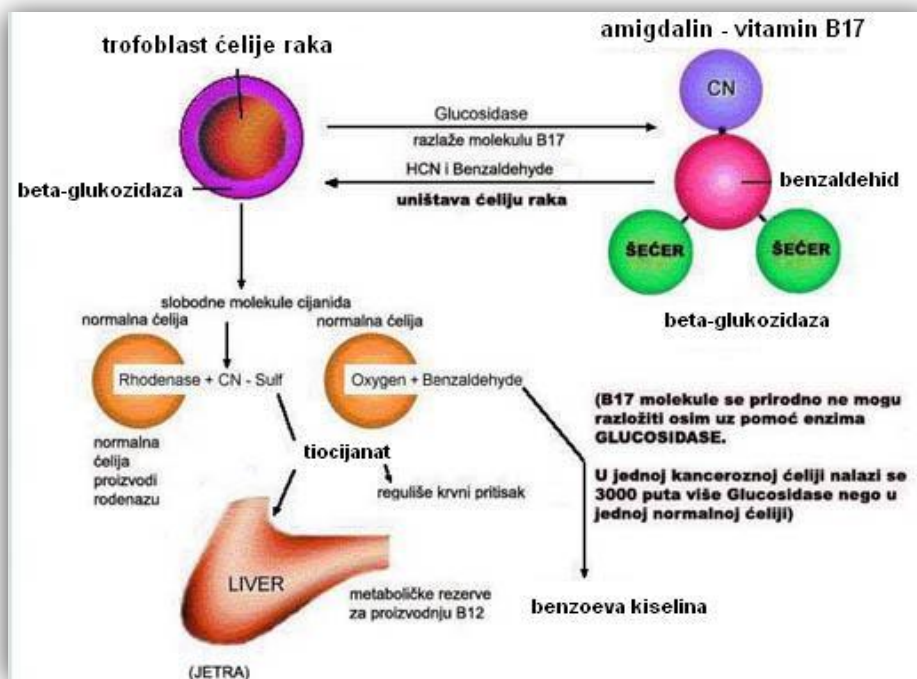
Za razliku od brojnih studija u kojima je utvrđena visoka pozitivna korelacija između sadržaja fenolnih jedinjenja i antiproliferativne aktivnosti (Soleas i sar., 2006; Yang i sar., 2009), u slučaju vina od sorti domaće šljive ispitanih u ovom radu, ovakva zavisnost nije utvrđena. Sa druge strane, Noratto i sar. (2009) ističu da izolovane frakcije fenolnih jedinjenja (pre svega flavonoidi) šljive poseduju izraženo citotoksičko dejstvo prema tumorskim ćelijama karcinoma dojke. Značajan inhibitorni efekat ekstrakata šljive na rast ćelijskih linija humanih karcinoma dojke (MCF-7, MDA-MB-453 i MCF-10A), debelog creva (HT-29 i Caco-2) i prostate (PC-3)

utvrđen je od strane Byrne i sar. (2007). Vina od šljiva sorti Čačanska rana, Čačanska lepatica i Požegača poseduju jače antikancerogeno dejstvo u odnosu na vina od maline (Jeong i sar., 2010), koja karakterišu IC_{50} vrednosti iznad 100 $\mu\text{g/ml}$.

Razlike u delovanju vina od sorti domaće šljive dobijene na histološki različitim ćelijskim linijama mogu biti objašnjene različitim zaštitnim osobinama ispitivanih ćelijskih linija. Velićanski (2012) u svom radu rezistentnost ćelijskih linija karcinoma dojke (MCF-7) i debelog creva (HT-29) na aktivnost čajnog i kombuha napitka od melise objašnjava činjenicom da su ćelijski mehanizmi koji kontrolišu gensku ekspresiju RON-a (protein receptor povezan sa Met receptorom tirozin kinaze) disfunkcionalni u ćelijama karcinoma debelog creva i dojke. Sa druge strane, visoka ekspresija RON-a nije karakteristična za tkiva humanih karcinoma grlića materice te je i efekat inhibicije čajnog i kombuha napitka od melise na ovu ćelijsku liniju bio jače izražen.

Citotoksično dejstvo amigdalina nije dovoljno istraženo i u literaturi se mogu naći suprotna stanovišta po pitanju njegove primenljivosti u tretmanu različitih oblika raka. Amigdalina se sastoji od po jednog molekula benzaldehida i cijanovodonične kiseline i dva molekula glukoze. Benzaldehid i cijanid su otrovna jedinjenja, ali u spoju s molekulama glukoze u amigdalinu su inertni i nemaju toksično delovanje. Prema jednom stanovištu, da bi se cijanovodonična kiselina i benzaldehid mogli osloboditi iz molekula amigdalina, potrebno je da dođu kontakt sa specifičnim enzimom β -glukozidazom. Ovaj enzim je normalno prisutan u humanim ćelijama u malim količinama, ali je znatno više prisutan u ćelijama karcinoma (do 3000 puta više). U normalnim ćelijama postoje enzimi koji hvataju slobodne molekule cijanida i uključuju ih u reakcije sa sumporom, čineći ih tako bezopasnim po zdravlje ljudi. Enzim koji deluje kao katalizator u reakciji povezivanja slobodnog cijanida i sumpora naziva se rodanaza. Spajanjem cijanida sa sumporom nastaju tiocijanati, jedinjenja koja jednostavno prelaze u urin ne oštećujući zdrave ćelije.

Mehanizam antikancerogenog efekta amigdalina (slika 4.18.) zasniva se na činjenici da ćelije raka za svoj rast trebaju ogromne količine energije, odnosno glukoze. Prilikom unošenja amigdalina u organizam, ćelije raka aktivnošću enzima beta-glukozidaze oslobađaju i usvajaju molekule glukoze, ali takođe i benzaldehid i cijanovodoničnu kiselinu, uzrokujući vlastito odumiranje. Tako se praktično otrovna cijanovodonična kiselina formira samo na mestu gde je kancer, što ima za posledicu razaranje ovih ćelija. Maligne ćelije nemaju mogućnost odbrane od toksičnog dejstva cijanida jer, za razliku od normalnih ćelija, ne sadrže enzim rodanazu. Sa, druge strane brojni autori opovrgavaju pomenutu tvrdnju da cijanovodonična kiselina oslobođena iz molekula amigdalina toksično deluje samo na tumorske ćelije. Oni se pozivaju na rezultate istraživanja koji ukazuju da normalne i tumorske ćelije poseduju slične koncentracije enzima rodanaze. Takođe, utvrđeno je da do razgradnje amigdalina ne dolazi samo pod dejstvom β -glukozidaze, već pomenutu reakciju katalizuje i enzim emulzin, prirodno prisutan u koštici, koja stoga neizbežno sadrži određene količine slobodne cijanovodonične kiseline i benzaldehida. Prisustvo ovog enzima je utvrđeno i u tankom crevu čoveka, kao i u nekim namirnicama biljnog porekla (Poulton, 1983).



Slika 4.18. Mehanizam citotoksičnog dejstva amigdalina na ćelije kancera

4.7. Ispitivanje uticaja starenja na kvalitet vina od šljive

U toku nege vina (sazrevanja, starenja), faze koja sledi nakon alkoholne fermentacije, vino ne postiže samo stabilnost već stiče i druga svojstva koja dublje odražavaju njegovu prirodu i koja su pravi nosioci njegovog kvaliteta. Ova faze proizvodnje treba da vodi skladnom razvoju komponenti boje, mirisa i arome vina. Od posebnog interesa za kvalitet vina su promene kojima podležu fenolna jedinjenja i hromatske karakteristike. Boja crvenih vina postepeno se menja od intezivno crvene, preko tamno crvene (bordo), do braon (narandžasto) crvene. Ovakve promene se mogu pripisati formiranju novih, stabilnijih pigmentata koji nastaju u reakcijama između antocijana i drugih polifenola (posebno monomera i polimera flavan-3-ola), i promeni pH sredine. Reakcije koje se smatraju odgovornim za opisane promene uključuju: nastajanje piranoantocijana, kopigmentaciju i samoasocijaciju (polimerizaciju) (Boulton, 2001). Dužina odležavanja značajno utiče na stabilnost boje vina jer je većina promena koje se dešavaju u tom periodu zavisna od vremena (Dallas i Laureano, 1994). Promene u hromatskim karakteristikama su najizraženije tokom prve godine odležavanja vina.

Uticaj starenja vina na odabrane parametre kvaliteta praćen je tokom dvanaest meseci odležavanja, a dobijeni rezultati prikazani su u tabeli 4.23.

Tabela 4.23. Efekat starenja na parametre kvaliteta vina od šljive

		pH	Isparljive kiseline (g/l)	Ukupni fenoli (g/l)	Flavan-3-oli (mg/l)	Ukupni antocijani (mg/l)	Intenzitet boje	%HS (%)
Čačanska rana	T ₀	3,45 ^a	0,41 ^a	1,94 ^a	86,3 ^a	169,8 ^a	0,58 ^a	16,8 ^a
	T ₁	3,45 ^a	0,42 ^a	1,98 ^a	88,1 ^a	102,3 ^b	0,63 ^a	17,9 ^a
	T ₂	3,37 ^a	0,40 ^a	1,89 ^a	71,5 ^b	98,8 ^b	0,57 ^a	21,3 ^a
	T ₃	3,38 ^a	0,45 ^a	1,85 ^{ab}	72,4 ^b	94,3 ^b	0,55 ^a	38,9 ^b
	T ₄	3,39 ^a	0,49 ^a	1,67 ^b	38,7 ^c	79,7 ^c	0,51 ^b	54,8 ^c
Čačanska lepotica	T ₀	3,4 ^a	0,37 ^a	2,28 ^a	198,9 ^a	187,2 ^a	0,73 ^a	11,3 ^a
	T ₁	3,4 ^a	0,36 ^a	2,21 ^a	178,2 ^b	88,9 ^b	0,72 ^a	14,2 ^a
	T ₂	3,42 ^a	0,40 ^a	2,25 ^a	166,8 ^c	79,6 ^b	0,78 ^b	22,1 ^b
	T ₃	3,43 ^a	0,40 ^a	2,20 ^a	136,6 ^d	83,6 ^b	0,68 ^c	29,6 ^c
	T ₄	3,45 ^a	0,42 ^a	2,16 ^b	119,3 ^c	66,6 ^c	0,64 ^c	46,3 ^d
Požegača	T ₀	3,5 ^a	0,8 ^a	1,88 ^a	180,6 ^a	173,3 ^a	0,61 ^a	17,6 ^a
	T ₁	3,47 ^a	0,82 ^a	1,93 ^a	179,1 ^a	123,1 ^b	0,62 ^a	18,1 ^a
	T ₂	3,5 ^a	0,76 ^a	1,85 ^a	177,9 ^a	115,9 ^c	0,64 ^a	26,0 ^b
	T ₃	3,51 ^a	0,83 ^a	1,79 ^{ab}	132,4 ^b	110,8 ^c	0,59 ^a	33,5 ^c
	T ₄	3,49 ^a	0,85 ^a	1,62 ^b	88,1 ^c	97,4 ^d	0,55 ^b	56,9 ^d

T₀ – analiza vina neposredno nakon razlivanja u boce; T₁ – analiza vina nakon jednog meseca odležavanja; T₂ – analiza vina nakon tri meseca odležavanja; T₃ – analiza vina nakon šest meseci odležavanja; T₄ – analiza vina nakon dvanaest meseci odležavanja.

Rezultati prikazani u tabeli prdstavljaju srednje vrednosti tri (n=3) merenja.

^{a, b, c} različita slova u okviru istog reda označavaju statistički značajne razlike među vrednostima ($p < 0,05$).

Starenje vina od šljive tokom dvanaest meseci nije značajnije uticalo na vrednost pH koja je i nakon posmatranog vremena odležavanja bila u opsegu 3,3-3,5. Međutim, literatura (Castillo-Sánchez i sar., 2008) ističe da starenje vina uglavnom karakteriše određeno povećanje vrednosti pH, usled taloženja soli vinske kiseline. S obzirom da u vinu od šljiva nisu utvrđene značajnije količine ove kiseline, i pomenuti efekat je slabije izražen. U vinima ispitanih sorti šljiva registrovano je uobičajeno, statistički neznačajno ($p > 0,05$), povećanje sadržaja isparljivih kiselina, kao rezultat oksidacije etanola tokom poslednjih šest meseci odležavanja.

Sadržaj fenolnih jedinjenja nije se značajno menjao tokom prvih tri do šest meseci. Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje sadržaja ukupnih fenola registrovano je nakon dvanaest meseci starenja u vinima sve tri sorte. Pomenuti efekat starenja vina najviše je izražen u slučaju sorte Čačanska rana (smanjenje za 15%), dok je smanjenje kod Čačanske lepoticice iznosilo svega 5%. Sa druge strane, mnogo značajnije promene tokom posmatranog perioda zabeležene su po pitanju sadržaja flavan-3-ola i antocijana. Sadržaj flavan-3-ola značajno je smanjen u vinu sorte Čačanska leptotica već nakon mesec dana starenja, dok je u slučaju druga dva vina ovakva pojava registrovana znatno kasnije (nakon 3-6 meseci). U pogledu sadržaja antocijana, najveće smanjenje u svim vinima registrovano je nakon jednomesečnog starenja. Daljim odležavanjem vina trend smanjenja sadržaja ovih bojnih materija bio je slabijeg intenziteta. Na taj način, nakon početnog smanjenja za oko 35-50%, u narednih jedanaest meseci sadržaj antocijana umanjen je za svega 15-25%. Analizom vina na kraju posmatranog perioda starenja (12 meseci), najveći sadržaj flavan-3-ola određen je kod sorte Čačanska leptotica (119,3 mg/l), dok je najveća

količina antocijana prisutna u vinu sorte Požegača (97,4 mg/l). Intenzitet boje vina od šljive generalno pokazuje trend porasta u prva tri meseca odležavanja, nakon kojih vrednost ovog parametra boje blago opada sa vremenom. Kod vina sorte Čačanska leptotica pomenuti rast intenziteta boje je statistički značajan ($p < 0,05$), dok je u slučaju vina druge dve sorte šljive utvrđeno povećanje neznatno. Smanjenje sadržaja flavan-3-ola i antocijana i povećanje intenziteta boje tokom starenja vina, pojava karakteristična i za crveno vino (Gomez-Plaza i sar., 1999; Castillo-Sánchez i sar., 2008), može biti rezultat reakcija kopigmentacije između ove dve grupe polifenola. Proizvodi kopigmentacije dovode do povećanja stabilnosti i intenziteta boje. Određeni procenat slobodnih antocijana učestvuje u reakcijama kondenzacije sa nusproizvodima metaboličke aktivnosti kvasaca (acetaldehid, piruvinska kiselina), pri čemu se formiraju piranoantocijani, pigmenti koji dodatno doprinose stabilnosti boje (Ribéreau-Gayon i sar., 1999; Boulton, 2001). Rezultati prikazani u tabeli 4.23. ukazuju da vrednost hemijske starosti vina gotovo linearno raste sa vremenom starenja. Povećanje vrednosti ovog pokazatelja tokom starenja vina iznosi od 3,2 do 4,2 puta. Najmanju hemijsku starost pokazuje vino sorte Čačanska leptotica. Krajnje vrednosti ovog parametra boje (46-57%) potvrđuju da vina od sorti domaće šljive, proizvedena po optimizovanom postupku opisanom u ovom radu, poseduju značajan potencijal starenja koji prevazilazi period od dvanaest meseci. Hemijska starost crvenog vina nakon dvanaest meseci odležavanja iznosi 15-18% (Gomez-Plaza i sar., 1999), što ukazuje na značajno veći potencijal starenja u odnosu na vino od šljive.

4.8. Smanjenje produkcije metanola u vinima od šljive

Produkti metabolizma metanola u ljudskom organizmu (formaldehid i mravlja kiselina) su toksični za čoveka (Ribéreau-Gayon i sar., 1999). Letalna, oralno uneta, doza metanola za čoveka nalazi se u opsegu 300-1000 mg/kg telesne težine (WHO, 1997).

Preliminarna istraživanja vezana za proizvodnju vina od šljive (poglavlje 4.2.4) ukazala su na povišen sadržaj metanola (i do 1100-1200 mg/l) koji je, pre svega, posledica visokog sadržaja pektinskih materija u plodu i tretmana kljuka pektolitičkim enzimima. Vina od šljive proizvedena po optimizovanom postupku fermentacije, dobijenom i opisanom u ovom radu (poglavlje 4.2.5), karakteriše niža koncentracija metanola (600-750 mg/l). Prema odgovarajućem nacionalnom tehničkom propisu o kvalitetu alkoholnih pića (Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za alkoholna pića, 2004), maksimalni dozvoljeni sadržaj metanola u voćnim vinima je 250 mg/l, međutim postoji neusaglašenost sa propisima Evropske Unije koji dozvoljavaju maksimalnu koncentraciju od 10 g metanola po litri apsolutnog alkohola (1000 mg/l u piću koje sadrži 10% alkohola) (Paine i Dayan, 2001). Sa druge strane, gornja granica sadržaja metanola u belim i roze vinima iznosi 150 mg/l, a u crvenim 300 mg/l (Pravilnik o vinu Republike Srbije, 2011). Nedovoljna usaglašenost tehničkih propisa uočava se i u činjenici da je maksimalno dozvoljen sadržaj metanola u voćnim vinima niži nego u crvenim vinima, iako je normalno očekivati da veće količine ovog jedinjenja nastaju iz sirovina koje karakteriše viši sadržaj pektinskih materija tj. manje vrednosti odnosa šećer/pektin, a što je slučaj sa brojnim vrstama

voća. Takođe, Pravilnik o voćnim vinima Republike Hrvatske (2006) ne definiše maksimalno dozvoljeno sadržaj metanola.

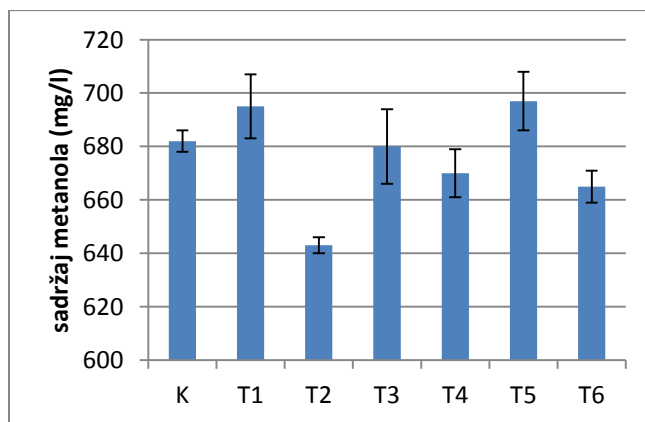
U cilju pokušaja redukcije formiranja metanola u alkoholnim pićima predlagana je fermentacija voćnog soka umesto kljuka (Adam i Versini, 1996). Ceđenjem voća pre fermentacije uklanja se najveći deo pektinskih materija koje su ulavnom locirane u voćnoj pulpi, što dovodi do redukcije sadržaja pektina u fermentišućoj komini. Pokazano je da su koncentracije metanola mnogo niže u sveže iscedenom soku (93 mg/l) nego u kljuku (324 mg/l) u kojem se putem pulverizovanja povećava aktivnost enzima. Upoređeni su i destilati kruške Viljamovke koji su dobijeni fermentacijom soka sa destilatima preizvedenim tradicionalnim postupkom tj. fermentacijom kljuka. Problem do koga se došlo odnosio se na neophodnost tretmana kljuka pektolitičkim enzimima tokom nekoliko sati, kako bi se obezbedio dovoljan prinos soka. Tokom ovog perioda formiranje metanola je bilo ubrzano tako da je, na kraju, efekat smanjenja produkcije metanola fermentacijom voćnog soka bio praktično zanemarljiv. Još jedan razlog zbog kojeg je ovakav postupak neinteresantan proizvođačima vina i drugih alkoholnih pića je da se presovanjem voća ne prenose svi fermentabilni šećeri u sok, što uzrokuje gubitak u prinosu alkohola, ali i indirektno dodatno povećava sadržaj metanola u krajnjem proizvodu.

Glavni cilj istraživanja u okviru ovog poglavlja bio je da se ispita mogućnost primene različitih fizičko-hemijskih tretmana kljuka od šljive u cilju pronalaženja najefikasnijeg i, po senzorna svojstva vina najneutralnijeg, postupka za smanjenje produkcije metanola.

4.8.1. Primena tanina

Tanini su polifenoli sa sposobnošću da talože jedinjenja proteinske strukture. Oni inhibiraju aktivnost enzima formiranjem taninsko-enzimskog kompleksa. Tanini u kiseloj sredini kakava je voćni kljuk ispoljavaju negativan električni naboj. Veliki broj tanina biljnog porekla komercijalno je dostupan u vidu enoloških preparata.

Uticaj tretmana kljuka različitim komercijalnim taninskim preparatima na sadržaj metanola u vinima prikazan je na slici 4.19.



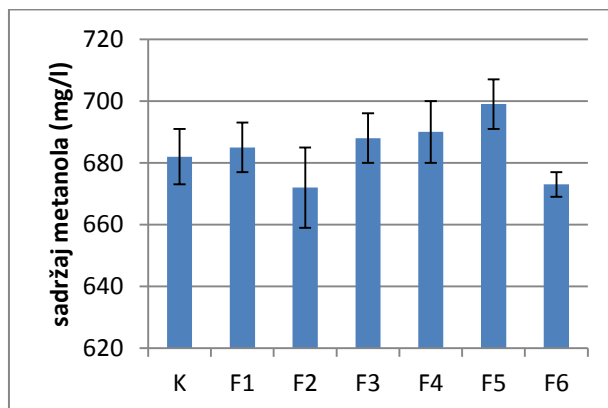
Slika 4.19. Prikaz uticaja dodavanja tanina u kljuk na sadržaj metanola u vinu

Upotreba komercijalnih tanina u dozama preporučenim od strane proizvođača (10-20 g/hl) nije dala značajnije rezultate po pitanju smanjenja produkcije metanola u vinima od šljive. Može se uočiti da među ispitanim preparatima tanina samo *Gran Tanni-B*, u količini od 20 g/hl, dovodi do značajnijeg smanjenja (za oko 7%) produkcije metanola u vinu, u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Tanin *Gran-Tannics* se preporučuje u preradi nedovoljno zrelog grožđa i grožđa zahvaćenog sivom plesni (*Botrytis cinerea*) jer u određenoj meri inaktivira enzime iz grupe polifenoloksidaza, tirozinazu grožđa i lakazu sive plesni. Međutim upotreba tanina nije imala značajnog efekta na inaktivaciju pektin metil esteraza šljive i komercijalnog pektolitičkog enzima. Upotreba ispitanih tanina u većim dozama dovodi do promene karakterističnih senzornih svojstava vina od šljive, te se stoga ne preporučuje i pored mogućeg pozitivnog dejstva na redukciju formiranja metanola.

Binder i Laugel (1989) ispitivali su mogućnost inaktivacije enzima pektin metil esteraze primenom dva tanina poreklom iz hrasta i kestena. U istraživanju je korišten sintetički medijum (sastavljen od pektina jabuke) u koji su dodavane rastuće koncentracije tanina (1-8 g/kg medijuma). Reakciono vreme je iznosilo 24 h na temperaturi od 35 °C. Hrastov tanin se pokazao efikasnijim inhibitorom ispitivanog enzima, s obzirom da je minimalna primenjena koncentracija (1 g/kg) omogućila smanjenje produkcije metanola od 90%. Sa druge strane, ponavljanjem eksperimenta na realnim uzorcima voćnog kljuka, uočena je statistički neznačajna redukcija formiranja metanola. Adam i Versini (1996) u svojoj studiji saopštavaju rezultate istraživanja tretmana kljuk kruške različitim taninima (0,5-12 g/kg) u cilju smanjenja produkcije metanola tokom fermentacije. Utvrđena je redukcija sadržaja metanola od 30 do 72%, u zavisnosti od koncentracije i vrste primenjenog tanina. Međutim, senzornom analizom dobijenih destilata utvrđeno je značajno pogoršanje arome. Treba istaći da su doze tanina korištene u pomenutom istraživanju oko pet puta veće od doza korištenih u ogledima vršenim u okviru ove disertacije.

4.8.2. Primena fenolnih kiselina

Na slici 4.20. prikazan je efekat dodatka fenolnih kiselina u kljuk šljive na sadržaj metanola u gotovim vinima.

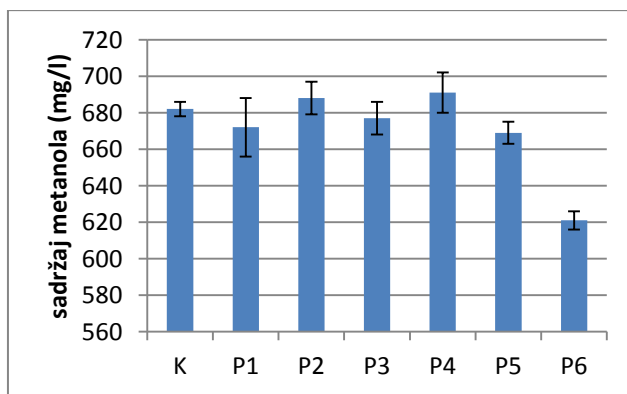


Slika 4.20. Prikaz uticaja dodavanja fenolnih kiselina na sadržaj metanola u vinu

Uočava se da ispitani postupak nije imao mnogo uticaja na smanjenje produkcije metanola u vinima od šljive. Takođe, utvrđene razlike u koncentraciji metanola vina proizvedenih dodatkom različitih doza protokatehinske i galne kiseline (5-30 mg/kg kljuka) statistički su neznačajne ($p > 0,05$). Suprotno dobijenim rezultatima, naučna literatura ističe mogućnost primene različitih fenolnih kiselina u inaktivaciji pektin metil esteraze (PME). Hou i sar., (2008) ističu da dodatak 0,1 mg/l galne, kumarinske, kafene, cimetine ili felurne kiseline u kljuk grožđa značajno umanjuje enzimsku aktivnost PME i pektin lijaze. Sa druge strane, inhibicija aktivnosti poligalakturonaze nije registrovana ni prilikom dodatka 0,5 mg/l fenolnih kiselina. U uzorcima vina proizvedenim dodatkom galne ili kumarinske kiseline, uz upotrebu komercijalnog pektolitičkog enzima, sadržaj metanola je smanjen za prosečno 27 mg/l, u odnosu na vina proizvedena bez dodatka fenolnih kiselina (sadržaj metanola u ovim vinima iznosi 57 mg/l). Takođe, inhibicija aktivnosti PME od skoro 100%, određena je u slučaju dodatka 0,5 mg/l galne ili kumarinske kiseline u kljuk grožđa. Chen i sar. (2009) si ispitivali efikasnost galne i kumarinske kiseline u inhibiciji pektin metil esteraze, pa tako i redukciji formiranja metanola u vinima. Primena ove dve kiseline u količini od 0,2 mg/l dovela je do značajnog smanjenja produkcije metanola. Autori su došli do rezultata koji ukazuju da galna i kumarinska kiselina pokazuju mešoviti mehanizam inhibicije prema PME. Različiti inhibitorni mehanizmi fenolnih kiselina pokazuju da hemijska struktura i hidrofobnost ovih malih molekula u velikoj meri utiču na jačinu inhibitornog efekta prema PME.

4.8.3. Primena D-galakturonske i pektinske kiseline

S obzirom da sve enzimske reakcije zavise od određene ravnoteže između supstrata i krajnjih proizvoda, pomenuta reakcija može biti stopirana ili pak usporena povećanjem koncentracije krajnjih proizvoda u medijumu. Stoga, mogućim inhibitorima pektin metil esteraze mogu se smatrati D-galakturonska ($C_6H_{10}O_2 \cdot H_2O$) i pektinska ($((C_6H_8O_6)_n)$) kiselina. Ove kiseline imaju istu strukturu ali različitu dužinu glavnog lanca. Uticaj tretmana kljuka D-galakturonskom i pektinskom kiselinim na sadržaj metanola u vinima prikazan je na slici 4.21.



Slika 4.21. Prikaz uticaja dodavanja D-galakturonske i pektinske kiseline na sadržaj metanola u vinu

Dobijeni rezultati ukazuju da se pektinska kiselina pokazala efikasnijom u inaktivaciji pektin metil esteraza, tj. smanjenju produkcije metanola. Količina pektinske kiseline od 15 g/kg dodata u kljuk šljiva, odgovorna je za proizvodnju vina sa oko 10% nižim sadržajem metanola, u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Manje doze ove kiseline nisu se pokazale efikasnim. Sa druge strane, dodatak D-galakturonske kiseline, u količini od 3-15 g/kg, nije izazvao značajne promene koncentracije metanola.

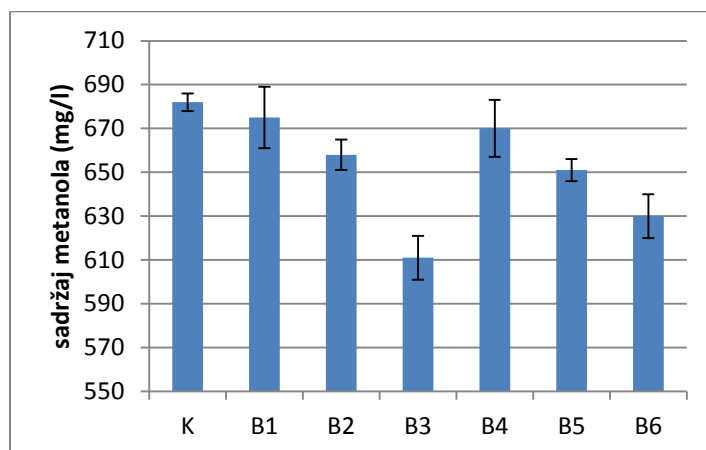
Binder i Laugel (1989) ispitivali su efekat ove dve kiseline, u koncentracijama od 0,05% do 0,6%, na redukciju formiranja metanola u sintetičkom medijumu dobijenom pomoću pektina jabuke koji ima zadatak da simulira uslove voćnog kljuka. Pektinska kiselina se pokazala efikasnijim inhibitorom. Dodatak ove kiseline u količini od 0,2% u testiranom medijumu dovodi do smanjenja produkcije metanola od 60%, dok se pri većem udelu kiseline (0,6%) postiže i redukcija od 100%. Pomenuti efekat inhibicije nije uočen u medijumu sa višom vrednošću pH (6,5). U cilju potvrde dobijenih rezultata, korišten je realni uzorak (200 g pektinske kiseline na 100 kg voćnog kljuka). U ovom slučaju skoro da nije bilo razlike u sadržaju metanola u poređenju sa uzorkom od netretiranog kljuka.

Može se zaključiti da je inhibicija pektin metil esteraze produktima enzimske reakcije primenjiva u laboratorijskim okvirima, dok je u realnim uslovima pomenuti efekat znatno slabije izražen.

4.8.4. Primena bentonita i zeolita

Bentonit je alumosilikatna glina koja se koristi za bistrenje i stabilizaciju vina zahvaljujući svojim adsorpcionim i elektrostatičkim svojstvima. Bentonit u vodi bubri i formira stabilnu koloidnu suspenziju koja u vinu ispoljava negativan električni naboj i veliku moć adsorpcije. Osim čestica mutnoće, bentonit iz vina uklanja i jedinjenja proteinske strukture (pozitivno naelektrisane), među kojima se nalaze i enzimi. Upotreba bentonita se preporučuje i tokom fermentacije šire (Jazić i Ružić, 1982). Zeolit je mineral slične strukture (alumosilikat alkalnih i zemnoalkalnih metala) i osobina (adsorpcionih i elektrostatičkih svojstava) kao bentonit, koji ima primenu u industriji hrane i pića (netoksičan je). Stabilna koloidna suspenzija zeolita u vinu ispoljava negativan električni naboj. Istaknuta je i mogućnost njegove primene za bistrenje i proteinsku stabilizaciju vina (Mercurio i sar., 2010). Ciambelli i sar. (1998) saopštavaju da zeolit ima sposobnost smanjenja sadržaja isparljivih kiselina (i za 60%) u vinu putem selektivne adsorpcije sirćetne kiseline. Takođe, Wyss i Cuénat (2005) demonstrirali su da upotreba zeolita dovodi do selektivne redukcije koncentracije kalijumovih jona u vinu (za 10-30%), sprečavanja taloženja kalijum-bitartarata i da ima neznatan uticaj na sadržaj fenolnih i aromatičnih jedinjenja. S obzirom da primenom bentonita i zeolita dolazi do inaktiviranja (vezivanja) mnogih proteina (enzima) koji u vinu ispoljavaju pozitivan električni naboj, može se očekivati da upotreba ovih sredstava u određenoj meri utiče i na smanjenje aktivnosti pektin metil esteraze.

Na slici 4.22. prikazan je uticaj tretmana kljuka bentonitom i zeolitom na sadržaj metanola u proizvedenim vinima od šljive.



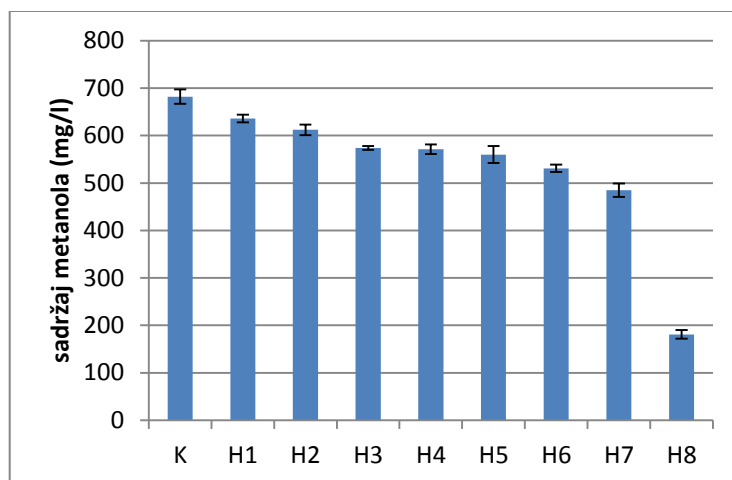
Slika 4.22. Prikaz uticaja dodatka bentonita i zeolita na sadržaj metanola u vinu

Upotreba jednakih doza bentonita i zeolita (50, 100 i 150 g/100 kg kljuka) imala je sličan efekat na sadržaj metanola u vinima. Smanjenja produkcije metanola u vinima od 4% i 11%, u poređenju sa kontrolnim uzorkom, registrovana su prilikom tretmana sa 100, odnosno 150 g bentonita po 100 kg kljuka. Slični rezultati su dobijeni i za tretman kljuka zeolitom, pri čemu su doze od 100 i 150 g/100 kg rezultirale smanjenjem produkcije metanola za 5%, odnosno 9%. Dodatak manjih količina (50 g/100 kg) ovih neorganskih sredstava nije se pokazao efikasnim.

4.8.5. Termički tretman kljuka

Mehanizam inaktivacije pektin metil esteraze povišenim temperaturama bazira se na denaturaciji proteinske strukture enzima. Temperatura na kojoj dolazi do denaturacije ne zavisi samo do vrste enzima već i od vrste voća iz kojeg enzim potiče. Temperaturni opseg 40-55 °C smatra se optimalnim za aktivnost ovog, uglavnom termolabilnog, enzima, (Jolie i sar., 2010). Na slici 4.23. prikazan je uticaj termičkog tretmana kljuka na sadržaj metanola u proizvedenim vinima od šljive.

Termički tretman kljuka se pokazao veoma efikasnim u smanjenju produkcije metanola u vinima od šljive. U zavisnosti od primenjene temperature i dužine trajanja tretmana redukcija metanola je iznosila od 6% do 74%, u poređenju sa kontrolnim, netretiranim, uzorkom. Najveći efekat smanjenja produkcije metanola registrovan je korišćenjem temperature 80 °C tokom 6 min (74%), dok je ista temperatura tokom 3 min odgovorna za redukciju od svega 30%. Izlaganje kljuka šljive temperaturama od 60 °C i 70 °C, tokom 5-20 min, pokazuje značajno slabiji inhibitorni efekat prema PME. U pomenutim ogledima utvđena je redukcija sadržaja metanola od 15-20%. Poređenja radi, skoro identičan efekat se postiže primenom tretmana H₄ (60 °C tokom 20 min) i H₅ (70 °C tokom 5 min). Temperatura od 50 °C nije dala značajnije rezultate uprkos mnogo dužem vremenu delovanja (40 min).



Slika 4.23. Prikaz uticaja termičkog tretmana na sadržaj metanola u vinu

Vina proizvedena nakon termičkog tretmana kljuka šljive karakterišu slabija senzorna svojstva u poređenju sa kontrolnim uzorkom. Izlaganje voćnog kljuka povišenim temperaturama tokom određenog vremena dovodi do gubitka isparljivih jedinjenja, degradacije bojenih materija (pre svega antocijana) i formiranja aromatskih kompleksa koji nastaju preko Majlardovih reakcija. Miris i ukus „na kuvano“ i braon-crvena boja neke su od odlika, na ovaj način, dobijenih vina. Pomenute posledice na senzorna svojstva vina bile su manje izražene u slučajevima tretmana višim temperaturama tokom kraćeg vremena (H₅, H₇ i H₈).

Binder i Laugel (1989) ispitivali su uticaj temperature i dužine zagrevanja na aktivnost PME. Smanjenje produkcije metanola od preko 90% postignuto je primenom 50 °C tokom 120 min, 60 °C tokom 20 min i 70 °C tokom 10 min, dok je zagrevanjem 10 min na 80 °C postignuto smanjenje od 100%. Dobijeni rezultati ukazuju da je PME iz kruške Viljamovke relativno stabilna na termičku inaktivaciju. Za kompletnu i brzu inaktivaciju ovog enzima temperatura treba da bude iznad 80 °C.

Inaktivacija PME izolovanih iz različitih voćnih izvora je čest predmet istraživanja. Denes i sar. (2000) su u svom radu ispitivali kinetiku termičke inaktivacije PME izolovane iz jabuke sorte Zlatni delišes. Efikasnost inaktivacije izražavana je preko D-vrednosti (vreme zagrevanja na konstantnoj temperaturi potrebno za inaktivaciju 90% početne aktivnosti enzima). Dobijene D-vrednosti bile su u opsegu od 32 min (pri temperaturi od 45 °C) do 0,2 min (pri temperaturi od 65°C). Rezultati ove studije zahtevaju potvrdu u vidu termičkog tretmana realnih uzoraka voćnog kljuka. Termička inaktivacija PME prisutne u soku paradajza bila je predmet istraživanja Anthon i sar. (2002). Efikasnost primenjenog procesa može se oceniti preko dobijenih D-vrednosti koje su bile u opsegu 7,2-10,4 min za temperaturu od 70 °C.

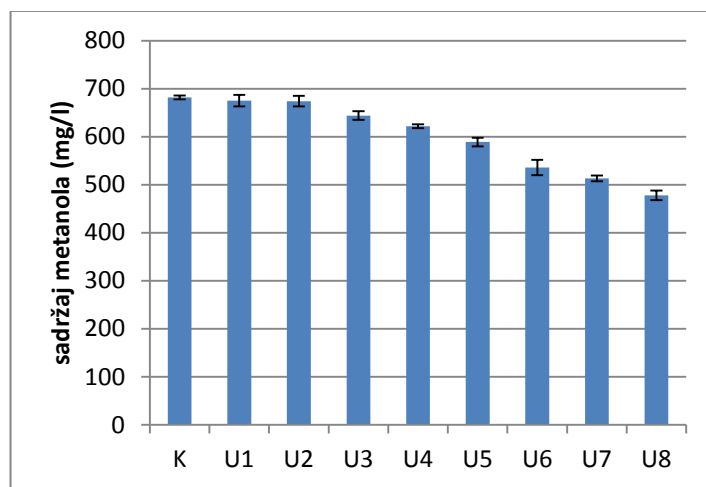
Inaktivacija pri nižim temperaturama zahteva više vremena što može izazvati spontano oslobađanje metanola. Takođe, izlaganje voćnog kljuka visokim temperaturama tokom dužeg vremena izrazito nepovoljno utiče na senzorna svojstva dobijenih pića. Stoga se prihvatljivijim smatraju kratki procesi na višim temperaturama. Negativa odlika primene toplote u cilju

smanjenja sadržaja metanola jeste velika potrošnja energije potrebna za postizanje i održavanje željenih temperatura.

4.8.6. Kombinovani efekat toplote i ultrazvuka

Mehanizam inaktivacije enzima ultrazvukom se uglavnom pripisuje mehaničkim i hemijskim efektima kavitacije koja podrazumeva formiranje, rast i imploziju mehurića (Raviyan i sar., 2005). Raspad mehurića je praćen lokalizovanim ekstremnim porastom pritiska (50 MPa) i temperature (5000 K) na mikroskopskom nivou. Takođe, ultrazvuk izaziva vibracije stabilnih kavitirajućih mehurića proizvodeći talase koji izazivaju snažno mikrostrujanje tečnosti. Pod ovim ekstremnim uslovima ultrazvučni talasi mogu izazvati raskidanje vodoničnih i Van der Valsovih veza u polipeptidnim lacima molekula proteina (uključujući enzime), i dovesti do promene sekundarne i tercijarne strukture molekula. Opisane promene uzrokuju gubitak biološke aktivnosti enzima. Neki autori smatraju da su za inaktivaciju enzima najvećim delom odgovorni slobodni radikali (hidroksi i vodonični) koji se formiraju pod dejstvom ultrazvuka. Ultrazvučni talasi niske frekvencije su efikasniji u inaktivaciji enzima kada se koriste u kombinaciji sa drugim inaktivacionim metodama kao što su umerene temperature i/ili pritisci (Terefe i sar., 2009).

Uticaj tretmana kljuka zajedničkim dejstvom toplote i ultrazvuka na sadržaj metanola u vinima od šljive prikazan je na slici 4.24.



Slika 4.24. Prikaz uticaja zajedničkog dejstva toplote i ultrazvuka na sadržaj metanola u vinu

Frekvencija ultrazvučnih talasa održavana je konstantnom u svim eksperimentalnim ogledima (20 kHz), dok su temperatura i trajanje dejstva varirani. Dobijeni rezultati ukazuju da istovremeno dejstvo toplote i ultrazvuka pokazuje različitu efikasnost smanjenja produkcije metanola u vinima, u zavisnosti od primenjenje temperature i dužine trajanja pomenutog

tretmana. U slučaju primenjenih tretmana kljuka U_1 i U_2 , nije registrovano statistički značajno smanjenje produkcije metanola. Prema tome, dejstvo ultrazvuka pri niskim temperaturama (tj. odsustvo sinergističkog efekta toplote i ultrazvuka) ne može se smatrati efikasnim postupkom redukcije formiranja metanola u vinima. Porastom temperature povećava se i efikasnost postupka. Testirani temperaturni režimi na 50 °C i 60 °C (tokom 5 i 15 min) pokazuju efekte smanjenja produkcije metanola od 10-15%, odnosno 22-26%. Maksimalno smanjenje produkcije metanola od 30% postignuto je prilikom izlaganja kljuka temperaturi od 70 °C tokom 5 min. Poređenjem rezultata dobijenih primenom termičkih tretmana (H_{1-8}) i tretmana toplotom i ultrazvukom (U_{1-8}) može se jasno uočiti značajan doprinos (sinergistički efekat) ultrazvuka inhibiciji aktivnosti PME. Eksperimentalni ogled U_8 podrazumeva izlaganje kljuka identičnom termičkom tretmanu kao i H_5 (70 °C tokom 5 min), s tim da je kljuk u prvom slučaju istovremeno podvrgnut i dejstvu ultrazvuka, što značajno doprinosi smanjenju produkcije metanola (30% kod U_8 , naspram 17% kod H_5). Negativan uticaj na senzorna svojstva primećen je i kod vina proizvedenih nakon tretmana kljuka povišenim temperaturama i ultrazvukom.

Primena ultrazvuka i temperatura od 75 °C tokom 3 min, ili 70 °C tokom 4 min, dovode do skoro potpune inaktivacije PME u soku paradajza (Terefe i sar., 2009). Pomenuti autori ističu i da je stepen inaktivacije PME usled sinergističkog dejstva toplote i ultrazvuka povećan od 1,5 do 6 puta u temperaturnom opsegu 60-75 °C, u odnosu na primenu samo termičkog tretmana.

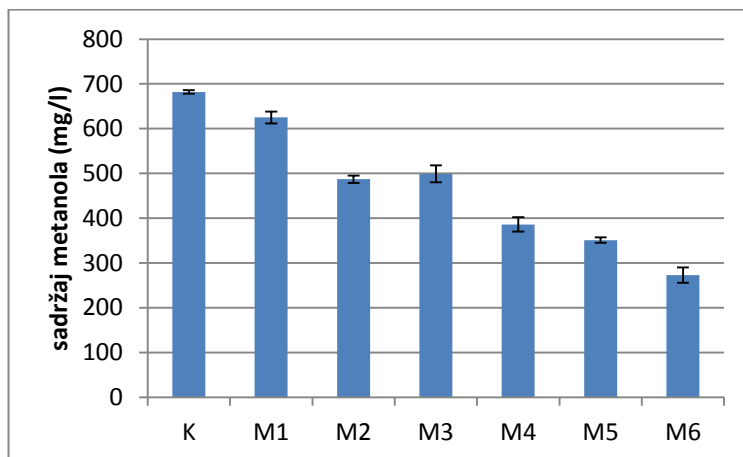
4.8.7. Primena mikrotalasa

Tretiranje hrane visokim temperaturama dovodi do gubitka senzornih i nutritivnih svojstava. Prema literaturnim podacima, primena mikrotalasa u proizvodnji hrane i pića ima prednost u odnosu na klasične termičke postupke (sterilizacija i pasterezacija) s obzirom da obezbeđuje efikasniju inaktivaciju enzima pri nižim temperaturama i manje negativne efekte po kvalitet proizvoda (Matsui i sar., 2007).

Mehanizmi koji su odgovorni za inaktivaciju enzima mikrotalasa mogu se podeliti u tri velike grupe: 1) termički efekat; 2) kinetički efekat; i 3) hemijski efekat (Tajchakavit, 1997). Efekat toplote, na molekularnom nivou, odgovoran je za strukturne promene sloja vezane vode, koje dovode do narušavanja stabilnosti i funkcionalnosti makromolekula (denaturacija proteina), a naknadno, i do promena u metaboličkoj aktivnosti ćelije. Ukupno naelektrisanje ćelija može pretrpeti promene u elektromagnetnom polju mikrotalasa, što može dovesti do brzih oscilacija koje nadjačavaju elastičnost ćelijskog zida i dovode do razaranja ćelijske membrane. Ovakav kinetički efekat ne uzrokuje samo promene u propustljivosti ćelijske membrane koje mogu dovesti do odumiranja ćelije, već utiče i na strukturu različitih makromolekula, među kojima su i proteini (enzimi). Nivoi kvanta energije mikrotalasa su nekoliko magnituda niži od vrednosti zahtevanih za raskidanje hemijskih veza, te je, stoga, malo verovatno da primena mikrotalasa može izazvati raskidanje bilo kojih hemijskih veza u hrani. Međutim, vrlo je moguće nastajanje slobodnih radikala kiseonika i vodonika, kao i hidroksi i vodonik-peroksid radikala, usled

simultane adsorpcije energije. Dejstvom ovih radikalskih oblika može doći do narušavanja strukture enzima, pa samim tim i do njihove inaktivacije.

Na slici 4.25. prikazan je uticaj tretmana kljuka mikrotalasima na sadržaj metanola u proizvedenim vinima od šljive.



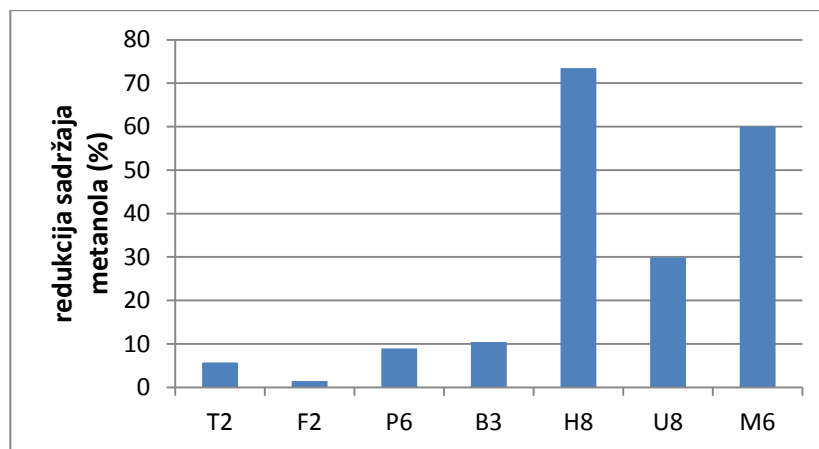
Slika 4.25. Prikaz uticaja tretmana kljuka mikrotalasima na sadržaj metanola u vinu

Na osnovu dobijenih rezultata, može se uočiti da se primena mikrotalasa pokazala efikasnim postupkom za smanjenje produkcije metanola u vinima od šljive. U zavisnosti od maksimalne postignute temperature (45-85 °C) i dužine izlaganja kljuka dejstvu mikrotalasa (1-4 min), smanjenje produkcije metanola je iznosilo od 10% do 60%. Najveći efekat inhibicije PME registrovan je kod ogleda M₆ (maksimalna temperatura 85 °C, vreme 1 min). Posmatranjem slika 4.23. i 4.25. uočava se da je efikasnost tretmana kljuka mikrotalasima (M₁₋₆) značajno veća u poređenju sa klasičnim termičkim tretmanom (H₁₋₈). Redukcija formiranja metanola kod postupka H₅ (70 °C tokom 5 min) iznosila je 18%, dok u slučaju postupka M₄ (maksimalna temperatura 70 °C, vreme 1 min) ona iznosi 46%. Pomenuti primer demonstrira značaj ne-termičkih efekata mikrotalasnog zračenja za inhibiciju aktivnosti PME tj. smanjenje produkcije metanola. Efekat zagrevanja kljuka mikrotalasima značajno je manje uticao na senzorna svojstva vina nego što je to slučaj kod klasičnog termičkog tretmana i istovremene primene toplote i ultrazvuka. Primena visokih temperatura (iznad 70 °C) u kratkom vremenu (oko 1 min), kao i doprinos mehanizama ne-toplotne prirode (kinetički i hemijski), uticali su da efekat smanjenja produkcije metanola mikrotalasnim zračenjem na senzorna svojstva vina bude neznatan.

Tajchakavit i Ramaswamy (1997) su upoređivali kinetiku inaktivacije PME u soku narandže primenom mikrotalasa i klasičnog termičkog tretmana. Inaktivacija PME u soku narandže bila je značajno brža i efikasnija kod postupka zagrevanja mikrotalasima (D-vrednost na temperaturi od 60 °C iznosi 7,4 s) nego u slučaju klasičnog termičkog tretmana (D-vrednost na temperaturi od 60 °C iznosi 155 s). Dobijeni rezultati ukazuju na značajan doprinos efekata ne-toplotne prirode inaktivaciji enzima u slučaju primene mikrotalasa.

4.8.8. Poređenje primenjenih tretmana za smanjenje produkcije metanola u vinu od šljive

Na Slici 4.26. dat je uporedni prikaz efikasnosti ispitanih fizičko-hemijskih tretmana kljuka u redukciji formiranja metanola u proizvedenim vinima od šljive. Tretmani predstavljeni na slici 4.26. (T₂, F₂, P₆ ...) odnose se na kombinacije faktora u sklopu ispitanih postupaka pri kojima je zabeležena najveća redukcija formiranja metanola.



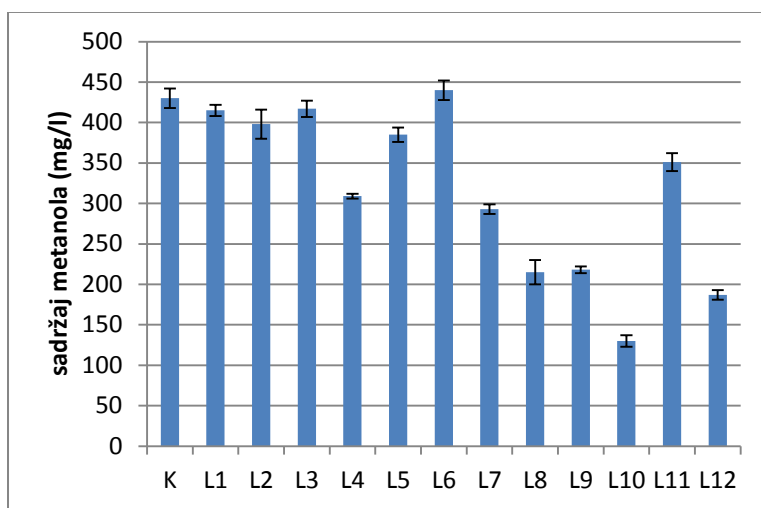
Slika 4.26. Uporedni prikaz najefikasnijih fizičko-hemijskih tretmana kljuka za smanjenje produkcije metanola u vinu

Može se uočiti da postupke koji uključuju neki vid termičkog tretmana (H₈, U₈, M₆) karakterišu značajno veće vrednosti smanjenja produkcije metanola. Sa druge strane, ovakvi postupci imaju negativan uticaj na senzorna svojstva proizvedenih vina. Najmanje efikasnim se pokazala primena fenolnih kiselina. Redukcija sadržaja metanola primenom tanina, pektinske kiseline i bentonita je slabo izražena (smanjenje do 10%) ali je efekat ovih tretmana po senzorna svojstva vina praktično zanemarljiv.

4.8.9. Inaktivacija pektin metil esteraze šljive

S obzirom da optimizovani postupak fermentacije vina od šljive (poglavlje 4.2.5) podrazumeva upotrebu komercijalnog preparata pektolitičkog enzima (0,5 g/100 kg kljuka), sa značajnom aktivnošću PME, stepen formiranja metanola značajno je veći u poređenju sa postupkom koji ne uključuje enzimski tretman kljuka. Može se uočiti da upotreba pektolitičkog enzima dovodi do povećanja produkcije metanola u vinu za skoro 60% (porast od 430 mg/l do 682 mg/l). Budući da je inhibicija zajedničkog dejstva PME prirodno prisutne u šljivi i PME enzimskog preparata ocenjena u prethodnim poglavljima, cilj istraživanja je bio i da se ispita efikasnost primenjenih postupaka u uslovima koji ne uključuju upotrebu komercijalnih pektolitičkih enzima.

Uticaj različitih fizičko-hemijskih postupaka na stepen inaktivacije PME šljiva, izražen preko sadržaja metanola u gotovom vinu, prikazan je na slici 4.27.



Slika 4.27. Prikaz uticaja različitih fizičko-hemijskih tretmana kljuka na sadržaj metanola formiranog aktivnošću PME šljive

Tretman kljuka taninima, u količini od 10-20 g/hl (L₁₋₃), uzrokovao je niži sadržaj metanola u vinu za 5 do 10%. Primena bentonita i zeolita u količini od 100g/100kg kljuka, rezultovala je značajnom inhibicijom aktivnosti PME. Bentonit je efikasnije inhibirao PME nego zeolit, s obzirom na utvrđeno smanjenje produkcije metanola u vinu (28%, odnosno 14%), u odnosu na kontrolni uzorak. Može se uočiti da primena ultrazvuka na sobnoj temperaturi (L₆) ne dovodi do smanjenja produkcije metanola. Sa druge strane, sinergističko dejstvo toplote i ultrazvuka pokazuje se znatno efikasnijim u inhibiciji aktivnosti PME šljive, pa je u vinu proizvedenom od kljuka zagrevanog na temperaturu od 60 °C, tokom 5 i 15 minuta (L₇ i L₈), utvrđen 32% i 50% manji sadržaj metanola. PME šljive se pokazala naročito osetljivom na tretman mikrotalasnim zračenjem, posmatrano preko smanjenja produkcije metanola. Upotrebom mikrotalasa (L₉ i L₁₀) obezbeđeno je izlaganje kljuka visokim temperaturama (krajnje temperature 70-80 °C) u kratkom vremenu (1-4 min), a što je rezultovalo za 50-70% nižim sadržajem metanola u vinu. Termički tretman kljuka na temperaturi od 80 °C tokom 3 minuta (L₁₂) takođe je doveo do značajne inhibicije aktivnosti PME, pa je u vinu utvrđeni sadržaj metanola bio manji za 55%, u odnosu na kontrolni uzorak (K). Dobijeni rezultati ukazuju da je, za svaki pojedinačni tretman, efekat smanjenja produkcije metanola jače izražen nego u slučaju primene istog načina obrade enzimski tretiranog kljuka šljive. Pored prisustva manje količine enzima (PME) u kljuku, ovakvi rezultati se mogu objasniti i slabijom rezistentnošću PME šljive na ispitane fizičko-hemijske postupke, u odnosu na PME aktivnost komercijalnog enzimskog preparata koji je mikrobiološkog porekla (*Aspergillus niger*). Tako, na primer, redukcija formiranja metanola usled izlaganja kljuka mikrotalasila M₄ (70 °C, 1 min) iznosi 45%, dok je u slučaju ocene efikasnosti inhibicije PME šljive, ekvivalentan tretman L₁₀ (70 °C, 1 min), uzrokovao smanjenje od 70%.

5. ZAKLJUČAK

U okviru ove doktorske disertacije ocenjena je upotrebna vrednost sorti domaće šljive (*Prunus domestica* L.) različitih epoha sazrevanja, kao sirovine za proizvodnju voćnog vina. Izvršena je optimizacija uslova alkoholne fermentacije, karakterizacija proizvedenih vina i ocena njihovih funkcionalnih karakteristika. Na kraju, ispitana je mogućnost smanjenja produkcije metanola u vinu od šljive primenom različitih fizičko-hemijskih tretmana polazne sirovine. Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su sledeći zaključci:

- ✓ Analiza mehaničkog sastava korištenih plodova tri ispitivane sorte šljive pokazuje je da sorte Čačanska leptotica i Požegača imaju značajno veći udeo pokožice u plodu (9,4%, odnosno 9,8%) u odnosu na Čačansku ranu, dok najpovoljniji odnos mase mezokarpa i koštice (17,8) ima sorta Čačanska leptotica. S obzirom na značajan uticaj datih pokazatelja na parametre kvaliteta kao što su randman i boja vina, sastav i sadržaj fenolnih i aromatičnih jedinjenja, može se zaključiti da sorta Čačanska leptotica, poseduje najbolji mehanički sastav tj. najveći potencijal za proizvodnju voćnog vina.
- ✓ S obzirom da sastav polazne sirovine u velikoj meri određuje kvalitet proizvedenog vina, utvrđene hemijske karakteristike kljuka i soka ispitivanih sorti šljive ukazuju da se Čačanska leptotica i Požegača mogu smatrati boljim sirovinama za proizvodnju voćnog vina u odnosu na sortu Čačanska rana. Ove dve sorte šljive karakteriše povoljniji odnos šećera (152-163 g/kg) i voćnih kiselina (6,5-7,8 g/l), kao i viši sadržaj asimilabilnog azota (320-385 mg/l). Požegaču, kasnu sortu, karakteriše viši sadržaj šećera, viša vrednost pH i manje ukupnih kiselina, u odnosu na Čačansku leptoticu. Požegača je i sorta sa najvišim sadržajem pepela tj. mineralnih materija (0,59%).
- ✓ Ispitivanjem upotrebe pet komercijalnih pektolitičkih enzima za tretman kljuka od šljiva ustanovljeno je da se primenom enzima Lallzyme EX-V postižu najbolje karakteristike vina koje se manifestuju visokim sadržajem etanola (7,71% v/v), glicerola (6,05 g/l) i ukupnih fenolnih jedinjenja (2,21 g/l), najvećim prinosom vina (67%) i najmanjom koncentracijom metanola (1109 mg/l).
- ✓ Različita učestalost mešanja kljuka ne utiče značajnije na sadržaj etanola, metanola i glicerola u vinu od šljive. Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje prinosa vina utvrđeno je pri režimima učestalijeg mešanja kljuka (jedan i dva puta na dan), bez obzira na primenu pektolitičkog enzima. Sa druge strane, nema značajnijih razlika u prinosu vina kod uzoraka kljuka mešanih jednom i dva puta dnevno. Učestalije mešanje kljuka dovodi do povećanja sadržaja ukupnih fenola za 20-25%. Efikasna ekstrakcija polifenola pokožice šljive postiže se mešanjem kljuka jedan put na dan, dok dalje povećanje frekventnosti ove operacije nema značajnog ($p < 0,05$) efekta.
- ✓ Ispitivanjem mogućnosti primene različitih kvasca u fermentaciji vina od šljive, ustanovljeno je postojanje statistički značajne razlike u pogledu fermentativnih karakteristika različitih komercijalnih sojeva pod primenjenim eksperimentalnim uslovima. Vina proizvedena primenom čistih kultura *S. cerevisiae* (Alchemy I, Spiriferm i Oenoferm PinoType) i *S. bayanus* (Spiriferm arom i Oenoferm Freddo) karakteriše

ujednačeno visok sadržaj etanola (7,49-7,87% v/v), brza i efikasna fermentacija. Najkraće vreme trajanja fermentacije (4-5 dana) i najveća brzina produkcije etanola (12,3-15,5 g/l/dan) odlike su ispitanih sojeva *S. cerevisiae*: Alchemy I, Oenoferm PinoType i, naročito, Spiriferm. Najviši sadržaj 1-nonanola i 1-feniletanol, jednih od najznačajnijih determinatora arome šljive, određen je u vinu proizvedenom upotrebom kvasca Spiriferm. Vina proizvedena aktivnošću kvasaca Oenoferm PinoType i Oenoferm Freddo ne razlikuju se značajnije u sastavu i sadržaju aromatičnih jedinjenja.

- ✓ Spontana fermentacija kljuka od tri korišćene sorte domaće šljive rezultira proizvodnjom vina različitih aromatskih karakteristika. Najveće razlike među vinima prisutne su po pitanju sadržaja 1-propanola, 1-heksanola, etil-laktata, izoamil-acetata, 1-feniletanola, etil-oktanoata, etil-dekanoata i etil laurata. Dugo vreme trajanja fermentacije (7-9 dana) i najmanje brzine produkcije etanola (7-8 g/l/dan) generalno karakterišu spontanu fermentaciju. Vino proizvedeno aktivnošću autohtonih kvasaca šljive Čačanska lepotica karakteriše visok sadržaj acetaldehida i etil acetata, kao posledica izražene aktivnosti oksidativnih (ne-*Saccharomyces*) kvasaca, ali i značajan sadržaj pojedinih viših alkohola (1-propanol, 1-heksanol i 1-oktanol) i aromatičnih estara (etil-laktat, izoamil-acetat i etil-palmitat).
- ✓ Rezultati senzorne analize ukazuju da statistički značajne ($P < 0,05$) razlike u mirisu, kao i ukusu i aromi karakterišu vina od šljive proizvedena upotrebom različitih vrsta i sojeva kvasca. Sa druge strane, razlike u boji i izgledu (bistrini) vina mogu se smatrati neznačajnim. Sojevi *S. cerevisiae* (komercijalnih oznaka Alchemy I, Spiriferm i Oenoferm PinoType) daju vina koja karakteriše intenziviji i harmoničniji ukus i aroma, u poređenju sa sojevima *S. bayanus* (komercijalnih naziva Spiriferm arom i Oenoferm Freddo). Najveću ukupnu ocenu senzorne analize dobilo je vino proizvedeno upotrebom kvasca Spiriferm (19,1). Takođe, upotreba čistih kultura selekcionisanih kvasaca rezultira proizvodnjom vina od šljive boljih senzornih karakteristika u odnosu na postupak koji uključuje spontanu fermentaciju.
- ✓ Uzimajući u obzir fermentativne karakteristike, sadržaj aromatičnih jedinjenja u proizvedenom vinu, kao i ocene senzorne analize, zaključeno je da, među ispitanim proizvodnim organizmima, kvasac Spiriferm (*S. cerevisiae*) daje vino od šljive najboljeg kvaliteta.
- ✓ Primenom metode odzivne površine funkcije (RSM) i metode željene funkcije, komponenti softverskog paketa Design Expert, definisani su optimalni uslovi fermentacije za postizanje maksimalnih vrednosti sadržaja etanola, glicerola i prinosa vina, i minimalne koncentracije metanola u vinu od šljive. Postupkom numeričke optimizacije dobijene su sledeće vrednosti procesnih parametara fermentacije vina od šljive: temperatura 25 °C, vrednost pH 3,5 i doza pektolitičkog enzima 0,5 g/100 kg. Pri navedenim uslovima dobijeni fitovani modeli predviđaju prinos etanola od 7,5% v/v, prinos glicerola od 5g/l, prinos vina od 48% (48 ml vina na 100 g kljuka) i formiranje 710 mg/l metanola.

- ✓ Povećanje količine dodatih koštica za 25-200%, u fermentaciji kljuka od šljive, dovodi do značajnog ($p < 0,05$) povećanja sadržaja cijanovodonične kiseline i benzaldehida u vinu. Utvrđene vrednosti ovih parametara su ipak značajno niže od maksimalno dozvoljenih.
- ✓ Rezultati fizičko-hemijskih analiza ukazuju na dosta ujednačen kvalitet vina sorti Čačanska lepatica i Požegača, proizvedenih optimizovanim postupkom fermentacije. Sadržaj etanola u ovim vinima nalazi se u opsegu 7,60-7,85% v/v. Vina sorte Čačanska rana karakteriše, pre svega, niži sadržaj etanola, i viši sadržaj ukupnih kiselina i metanola, u poređenju sa vinima druge dve sorte. Utvrđene količine organskih kiselina utiču pozitivno na senzorne karakteristike vina, doprinoseći osećaju svežine i reskosti, izuzev u slučaju vina sorte Čačanska rana, kod koga je ta kiselost blago prenaplašena. Koncentracija metanola u vinima od šljive nalazi se u opsegu 658-735 mg/l, što je značajno više u odnosu na uobičajene vrednosti za vino od grožđa (< 200 mg/l).
- ✓ Sadržaj ukupnih fenola, flavan-3-ola i ukupnih antocijana u vinima statistički značajno ($p < 0,05$) se razlikuje u zavisnosti od upotrebene sorte šljive. Vino sorte Čačanska lepatica karakteriše najviši sadržaj ukupnih fenola (2,18 g/l), ukupnih antocijana (187,2 mg/l) i flavan-3-ola (198,8 mg/l), ali i najveći intenzitet boje vina (0,73). Najveći udeo monomernih u ukupnim antocijanima (65%) određen je u vinu sorte Požegača. Najveći uticaj reakcija kopigmentacije na boju vina zabeležen je kod vina sorte Požegača.
- ✓ Prisustvo peonidin-3-glukozida, cijanidin-3-rutinozida, peonidin-3-rutinozida, hlorogenske kiseline, kafene kiseline i rutina detektovano je u svim ispitanim vinima, dok je prisustvo ostalih fenolnih jedinjenja karakteristika pojednih sorti ili lokaliteta uzgajanja. U proizvedenim vinima ističe se visok sadržaj dva antocijana, peonidin-3-glukozida i cijanidin-3-rutinozida, dok su najdominantnije fenolne kiseline hlorogenska i vanilinska. Kvalitativni i kvantitativni sastav polifenola u vinu sorte Požegača značajno se razlikuje u zavisnosti od lokaliteta na kome su šljive uzgajane.
- ✓ Proizvedena vina od šljive pokazuju značajnu antiradikalnu aktivnost (IC_{50} 0,1-0,23 ml/ml) prema DPPH slobodnim radikalima. Vina sorte Čačanska lepatica, proizvedena od šljiva sa dva mikrolokaliteta, karakterišu najniže IC_{50} vrednosti (najviša antiradikalna aktivnost). Postoji značajna pozitivna linearna korelacija ($r = 0,828-0,905$) između antioksidativnog potencijala i sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja i ukupnih antocijana.
- ✓ Vina od sorti domaće šljive pokazala su antibakterijsku aktivnost prema svim testiranim bakterijskim sojevima. Značajnija razlika u osetljivosti/otpornosti Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija na dejstvo vina nije registrovana, izuzev u slučaju vina od sorte Čačanska rana, kod koga je antimikrobno dejstvo prema bakterijama *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus* bilo nešto izraženije. Kvasci *S. cerevisiae* i *C. albicans* pokazali su veću otpornost prema test uzorcima vina u odnosu na bakterije. Na osnovu rezultata antimikrobne aktivnosti kontrolnih uzoraka, može se izvesti zaključak da su glavni nosioci antimikrobne aktivnosti vina od šljive sadržaj ukupnih kiselina i vrednosti pH.

- ✓ Ogljedna vina od šljive pokazuju značajno dejstvo na primenjene ćelijske linije karcinoma grla (Hep2) i mišićnog tkiva (RD) i mišije tumorske fibroblastne linije u koju su transfektovani neki humani geni (L2OB), s obzirom da sva ispitana vina pokazuju citotoksičnu aktivnost pri koncentracijama manjim od 50 µg/ml. Najpotentnijim inhibitorom rasta ćelija sve tri linije pokazalo se vino sorte Čačanska rana. Sa druge strane, efekat vina sorte Čačanska leptotica je među ispitanim vinima bio najslabiji. Prisustvo koštica u kljuku tokom fermentacije, dovodi do značajnog povećanja (35-40%) citotoksičnog dejstva prema ispitanim ćelijskim linijama karcinoma.
- ✓ Sadržaj fenolnih jedinjenja ne menja se značajno tokom prvih tri do šest meseci starenja. Statistički značajno ($p < 0,05$) smanjenje sadržaja ukupnih fenola registruje se tek nakon dvanaest meseci starenja u vinima sve tri sorte. Izraženije promene tokom posmatranog perioda dešavaju se po pitanju sadržaja flavan-3-ola i antocijana, s obzirom da je značajno smanjenje njihovog sadržaja generalno uočljivo već nakon mesec dana odležavanja. Opisane promene ovih bojenih materija su znatno slabijeg intenziteta u periodu od šestog do dvanaestog meseca. Intenzitet boje vina od šljive generalno pokazuje trend porasta u prva tri meseca odležavanja, nakon kojih vrednost ovog parametra boje blago opada sa vremenom.
- ✓ Primenjeni fizičko-hemijski postupci pokazuju različitu efikasnost u smanjenju produkcije metanola u vinu od šljive. Može se uočiti da postupke koji uključuju neki vid termičkog tretmana (H, U, M) karakteriše značajno smanjenje produkcije metanola (i do 60-70%). Sa druge strane, ovakvi postupci uglavnom imaju negativan uticaj na senzorna svojstva proizvedenih vina. Međutim, izlaganje kljuka intenzivnijem mikrotalasnom zračenju u kratkom vremenu, usled doprinosa mehanizama ne-toplotne prirode (kinetički i hemijski), omogućuje značajno smanjenje produkcije metanola i neznatan uticaj na senzorna svojstva vina. Najmanje efikasnim se pokazala primena fenolnih kiselina. Redukcija formiranja metanola primenom tanina, pektinske kiseline i bentonita je slabo izražena (smanjenje do 15%), ali je efekat ovih tretmana po senzorna svojstva vina praktično zanemarljiv. Efekat primenjenih postupaka na smanjenje produkcije metanola jače je izražen u slučaju tretmana kljuka u koji nije dodavan komercijalni pektolitički enzim. Pored prisustva manje količine enzima (PME) u kljuku, ovakvi rezultati se mogu objasniti i slabijom rezistentnošću PME šljive na ispitane fizičko-hemijske postupke, u odnosu na PME aktivnost komercijalnog enzimskog preparata koji je mikrobiološkog porekla.

6. LITERATURA

- Adam, L., Versini, G. (1996) A study on the possibilities to lower the content of methyl-alcohol in eaux-de-vie de fruits. European Commission, Directorate-General XII Science, Research and Development, Brussels, Belgium.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1993) Methanol toxicity. *American Family Physician* 47, 162–171.
- Akagawa, M., Shigemitsu, T., Suyama, K. (2003) Production of hydrogen peroxide by polyphenols and polyphenol-rich beverages under quasi-physiological conditions. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 67(12), 2632-2640.
- Álvarez, I., Aleixandre, J.L., García, M.J., Lizama, V. (2005) Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta* 563, 109–115.
- Akubor, P.I., Obio, S.O., Nwdomere, K.A., Obiomah, E. (2003) Production and quality evaluation of banana wine. *Plant Food for Human Nutrition* 58, 1–6.
- Amerine, M.A., Roessler, A.B. (1983) *Wines and their sensory evaluation*. Freeman W.H., New York.
- Amerine, M.A., Kunkee, R., Ough, K.C.S., Singleton, V.L., Webb, A.D. (1980) *The technology of wine making*. (4th Ed). AVI, Westport, Connecticut, 185-703.
- Anderson, J.W., Baird, P., Davis, R.H., Ferreri, S., Knudtson, M., Koraym, A., Waters, V., Williams, C.V. (2009) Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews* 67(4), 188-205.
- Anthon, G.E., Sekine, Y., Watanabe, N., Barrett, D.M. (2002) Thermal inactivation of pectin methylesterase, polygalacturonase, and peroxidase in tomato juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6153–6159.
- Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C., Carnacini, A. (1999) Yeast influence on volatile composition of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1139–1144.
- Atanacković, M. (2012) Resveratrol - analiza u prirodnim proizvodima i ispitivanje rastvorljivosti u micelarnim i lipozomalnim sistemima. Doktorska disertacija. Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Bailoni, L., Schiavon, S., Pagnin, G., Tagliapietra, F., Bonsembiante, M. (2005) Quantitative evaluation of pectins in the dietary fibre of 24 foods. *Italian Journal of Animal Sciences* 4, 49–58.
- Bafrcova, P., Smogrovicova, D., Salvikova, I., Patkova, J., Domyeny, Z. (1999) Improvement of very gravity ethanol fermentation by media supplementation using *S. cerevisiae*. *Biotechnological Letters* 21, 337–341.
- Baker, R.A. (1997) Reassessment of some fruit and vegetable pectin levels. *Journal of Food Science* 62, 225–229.
- Balestrieri, C., Castaldo, D., Giovane, A., Quagliuolo, L., Servillo, L. (1990) A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *European Journal of Biochemistry* 193, 183-187.

- Barnavon, L., Doco, T., Terrier, N., Ageorges, A., Romieu, C., Pellerin, P. (2000) Analysis of cell wall neutral sugar composition, β -galactosidase activity and a related cDNA clone throughout the development of *Vitis vinifera* grape berries. *Plant Physiology and Biochemistry* 38, 289–300.
- Barnett, J.A., Payne, R.W., Yarrow, D. (2000) *Yeasts: Characteristics and Identification*. 3rd Edition, Cambridge University Press, Cambridge.
- Bas, D., Boyaci, I.H. (2007) Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78, 836-845.
- Basak, S., Ramaswamy, H.S. (2001) Pulsed high pressure inactivation of pectin methyl esterase in single strength and concentrated orange juices. *Canadian Biosystems Engineering* 43, 25-29.
- Bayindirli, A. (2010) *Enzymes in Fruit and Vegetable Processing: Chemistry and Engineering Applications*. CRC Press, Florida, USA.
- Bell, S.-J., Henschke, P.A. (2005) Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. In: Blair, R.J., Francis, M.E., Pretorius I.S. (Eds.) *AWRI, Advances in Wine Science. Commemorating 50 Years of the Australian Wine Research Institute*, The Australian Wine Research Institute, Australia, 45-91.
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J. M. (2005) Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(4), 996-1002.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masnuef-Pomarede, I., Dubourdieu, D. (2008) Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 122, 312-320.
- Benen, J.A.E., van Alebeek, G.J.W.M., Voragen, A.G.J., Visser, J. (2003) Pectic Esterases. In: Whitaker, J.R., Voragen, A.G.J., Wong, D.W.S. *Handbook of Food Enzymology*, Marcel Dekker, 849–856.
- Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderon, F., Suarez-Lepe, J.A. (2012) New applications for *Schizosaccharomyces pombe* in the alcoholic fermentation of red wines. *International Journal of Food Science and Technology* 47(10), 2101-2108.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escaleira, L.A. (2008) Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76, 965–977.
- Bhardwaj, J.C., Joshi, V.K. (2009) Effect of cultivar, addition of yeast type, extract and form of yeast culture on foaming characteristics, secondary fermentation and quality of sparkling plum wine. *Natural Product Radiance* 8(4), 452-464.
- Bhutani, V.P., Joshi, V.K. (1995) Plum. In: Salunkhe, D.K., Kadam, S.S. *Handbook of Fruit Science and Technology. Production, Composition, Storage and Processing*. Marcel Dekker Inc., New York, SAD, 203-243.

- Bindler, F., Laugel, P. (1989) Le problème de la limitation du methanol dans les eaux-de-vie de fruits. *Annales des falsifications, de l'expertise chimique et toxicologique* 82, 423-434.
- Bish, T.J. (2011) Inactivation of foodborne pathogens by fruit wines. MSc thesis. University of Missouri, Faculty of the Graduate School.
- Bisson, L.F. (1991). Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. *International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*, American Society for Enology and Viticulture, 78-89.
- Blagojević, R., Božić, V. (2012) Tehnologija proizvodnje šljive. Kancelarija za program podrške razvoju privatnog sektora u oblasti voćarstva i bobičastog voća u Južnoj Srbiji, Niš.
- Blunt, M.K. (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances* 18, 355-383.
- Boban, N., Tonkic, M., Budimir, D., Modun, D., Sutlovic, D., Punda-Polic, V., Boban, M. (2010) Antimicrobial effects of wine: Separating the role of polyphenols, pH, ethanol, and other wine components. *Journal of Food Sciences* 75(5), 322-326.
- Bordenave, M. (1996) Analysis of Pectin Methyl Esterases. In: Linskens, H. F. *Plant Cell Wall Analysis*, Springer, New York, 165–180.
- Boulton, R. (2001) The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 52 (2), 67-87.
- Boulton, R., Neri, R., Levengood, J., Vaadia, M. (1999) Copigmentation of anthocyanins in Cabemet Sauvignon and Merlot wines from the Napa valley of California. In: Lonvaud-Funel, A. (ed). *Proc. 6th Symposium International d'CEnologie*, Tec. & Doc. Publ., Paris, France. pp. 35 - 38.
- Buglass, A.J. (2011) *Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects*, John Wiley & Sons, Ltd. New Jersey, 423-429.
- Byarugaba-Bazirake, G.W. (2008) The effect of enzymatic processing on banana juice and wine. PhD dissertation. Stellenbosch University, Institute for Wine Biotechnology, South Africa.
- Byrne, D., Cisneros, L., Weston, C., Ramming, D. (2007) Health benefits of peaches and plums. *California Tree Fruit Agreement, Annual Research Report*, 50-69.
- Cabaroglu, T. (2005) Methanol contents of Turkish varietal wines and effect of processing. *Food Control* 16, 177–181.
- Cao, G., Prior, R.L. (2000) Red wine in moderation: potential health benefits independent of alcohol. *Nutrition and Clinical Care* 3, 76-82.
- Castillo-Sánchez, J. J., Mejuto, J. C., Garrido, J., García-Falcón, S. (2006) Influence of wine-making protocol and fining agents on the evolution of the anthocyanin content, colour and general organoleptic quality of Vinhão wines. *Food Chemistry* 97, 130–136.
- Castillo-Sánchez, J.X., Garcia-Falco, M.S., Garrido, J., Martinez-Carballo, E., Martins-Dias, L.R., Mejuto, X.C. (2008) Phenolic compounds and colour stability of Vinhao wines: Influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chemistry* 106, 18-26.

-
- Cendres, A., Chemat, F., Maingonnat, J.-F., Renard, C.M.G.C. (2011) An innovative process for extraction of fruit juice using microwave heating. *LWT - Food Science and Technology* 44(4), 1035-1041.
 - Cendres, A., Chemat, F., Page, D., Le Bourvellec, C., Markowski, J., Zbrzezniak, M., Renard, C.M.G.C., Plochanski, W. (2012). Comparison between microwave hydrodiffusion and pressing for plum juice extraction. *LWT - Food Science and Technology* 49, 229-237.
 - Chen, C.-H., Wu, M.-C., Hou, C.-Y., Jiang, C.-M., Huang, C.-M., Wang, Y.-T., (2009) Effect of phenolic acid on antioxidant activity of wine and inhibition of pectin methyl esterase. *Journal of Institute of Brewing* 115(4), 328–333.
 - Chinnam, N., Dadi, P.K., Sabri, S.A., Ahmad, M., Kabir, M.A., Ahmad, Z. (2010) Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner. *International Journal of Biological Macromolecules* 46(5), 478-486.
 - Chun, O.K., Kim, D.-O., Moon, H.Y., Kang, H.G., Lee, C.Y. (2003) Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7240-7245.
 - Chun, O.K., Kim, D.-O. (2004) Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums. *Food Research International* 37(4), 337–342.
 - Chung, J.H., Mok, C.Y., Park, Y.S., Lim, S.B. (2003) Changes of physicochemical properties during fermentation of peach wine and quality improvement by ultrafiltration. *Journal of Korean Society of Food Science and Technology* 32(4), 506-512.
 - Ciambelli, P., di Matteo, M., Nota, G., Romano, R., Spagna Musso, S. (1998) Abatement of volatile acidity in wines with zeolite-based adsorbents. *Industrial Bevande* 27, 120-122.
 - Ciani, M. (1995) Continuous deacidification of wine by immobilized *Schizosaccharomyces pombe* cells: evaluation of malic acid degradation rate and analytical profiles. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 631-634.
 - Ciani, M., Ferraro, L. (1996) Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Applied Environmental Microbiology* 62, 128-132.
 - Ciani, M., Maccareli, F. (1998) Oenological properties of non-Saccharomyces yeasts associated with wine-making. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 199-203.
 - Ciani, M., Beco, L., Comitini, F. (2006) Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology* 108, 239-245.
 - Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P. (2010) Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-Saccharomyces yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research* 10, 123-133.
 - Clemente-Jimenez, J.M., Mingorance-Cazorla, L., Martinez-Rodriguez, S., Las Heras Vazquez, F.J., Rodriguez-Vico, F. (2004) Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiology* 21, 149-155.

- Costa, N., Lourenço, J., Pereira, Z. (2011) Desirability function approach: A review and performance evaluation in adverse conditions. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 107(2), 234-244.
- Craig, A. (1998) Comparison of the headspace volatiles of kiwifruit wine with those wines of *Vitis vinifera* variety Muller-Thurgau. *American Journal of Enology and Viticulture* 39, 321-324.
- Dallas, C., Laureano, O. (1994) Effects of pH, sulphur dioxide, alcohol content, temperature and storage time on colour composition of a young portuguese red table wine. *Journal of Science of Food and Agriculture* 65, 477-485.
- de Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W.C.A., Manley, M. (2003) Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 902–909.
- de Galulejac, N.S., Glories, Y., Vivas, N. (1999) Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. *Food Research International* 32(5), 327-333.
- Delehanty, J.B., Johnson, B.J., Hickey, T.E., Pons, T., Ligler, F.S. (2007) Binding and neutralization of lipopolysaccharides by plant proanthocyanidins. *Journal of Natural Products* 70(11), 1718-1724.
- Denes, J.M., Baron, A., Drilleau, J.F. (2000) Purification, properties and heat inactivation of pectin methylesterase from apple (cv *Golden Delicious*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1503-1509.
- Dey, G., Negi, B., Gandhi, A. (2009) Can fruit wines be considered as functional food? An overview. *Natural Products Radiance* 8(4), 314-322.
- Dharmadhikari, M. (2001) Nitrogen metabolism during fermentation. *Vineyard and Vintage View* 17(2), 5-7.
- Dietrich, H., Patz, C., Schöpplain, F., Will, F. (1991) Problems in evaluation and standardization of enzyme preparations. *FruitProcessing* 1, 131–134.
- Donovan, J.L., Meyer, A.S., Waterhouse, A.L. (1998) Phenolic composition and antioxidant activity of prunes and prune juice (*Prunus domestica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1247–1252.
- Duarte, W.F., Dias, D.R., Oliveira, J.M., Vilanova, M., Teixeira, J.A., Almeida e Silva, J.B., Schwan, R.F. (2010) Raspberry (*Rubus idaeus* L.) wine: Yeast selection, sensory evaluation and instrumental analysis of volatile and other compounds. *Food Research International* 43, 2303-2314.
- Ducasse, M.A., Williams, P., Canal-Llauveres, R.M., Mazerollest, G., Cheynier, V., Doco, T. (2011) Effect of macerating enzymes on the oligosaccharide profiles of Merlot red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 6558-6567.
- Dufresne, C., Farnworth, E. (2000) Tea, Kombucha, and health: a review. *Food Research International* 33, 409-421.

- Duvetter, T., Sila, D.N., Van Buggenhout, S., Jolie, R., Van Loey, A., Hendrickx M. (2009) Pectins in processed fruit and vegetables: Part I - Stability and catalytic activity of pectinases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8, 75–85.
- Espejo, S., Armada, F. (2010) Effect of enzyme addition in the making of Pedro Ximenez sweet wines using dynamic pre-fermentative maceration. *South African Journal of Enology and Viticulture* 31(2), 133-142.
- Espin, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J. (2000) Characterization of total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48, 648-656.
- FAO - Food and Agriculture Organisation of the United Nations, The Statistic Division of FAO (faostat), <http://faostat.fao.org/>.
- Fernandes, J., Gomes, F., Couto, J.A., Hogg, T. (2007) The antimicrobial effect of wine on *Listeria innocua* in a model stomach system. *Food Control* 18(12), 1477–1483.
- Fischer, U., Gutzler, K.H., Strasser, M., Michel, H. (1999) Red wine making by thermovinification versus fermentation on the skins: comparison of phenol and aroma composition. In: *Proceedings of 24th OIV World Congress of Vines and Wine in Mainz, Germany*, 64-69.
- Fleet, H.H. (1998). *Microbiology of alcoholic beverages*. In: Wood, B.J. (Ed.), *Microbiology of Fermented Foods* 2nd ed., Volume 1., Blackie, London, 217-262.
- Fleet, G.H. (2003) Yeast interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology* 86, 11-22.
- Francot, P., Geoffroy, P. (1956) Le Méthanol dans les jus de fruits, les boissons fermentées, les alcools et spiritueux. *Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires* 11, 279-287.
- Frias, F., Conde, J.E., Rodriguez, M.A., Dohnal, V., Perez-Trujillo, J.P. (2002) Metallic content of wines from the Canary Islands (Spain). Application of artificial neural networks to the data analysis. *Nahrung* 46, 370–375.
- Fugelsang, K.C., Edwards, C.G. (2007) *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. 2nd Edition, Springer, New York.
- Fulcrand, H., Benabdeljalil, J., Rigaud, V., Cheyner, M., Moutounet, M. (1998) A new class of wine pigments yielded by reactions between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry* 47, 1401-1407.
- Fuleki, T., Francis, F.J. (1968) Quantitative determination of anthocyanins 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Journal of Food Science* 33, 78–83.
- Gañan, M., Martínez-Rodríguez, A.J., Carrascosa, A.V. (2009) Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. *Food Control* 20(8), 739-742.
- Ghiulai, V.M., Socaciu, C., Jianu, I., Ranga, F., Fetea, F. (2006) Identification and quantitative evaluation of amygdalin from apricot, plum and peach oils and kernels. *Buletin USAMV-CN* 62, 246-253.

-
- Glories, Y. (1984) La couler des vins rouges. *Connaissance Vigne Vin* 18(4), 253-271.
 - Gomez, E., Ledbetter, C.A., Hartsell, P.L. (1993) Volatile compounds in apricot, plum, and their interspecific hybrids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41, 1669-1676.
 - Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J.M., Martínez, A. (1999) Color and phenolic compounds of a young red wine as discriminating variables of its ageing status. *Food Research International* 32, 503-507.
 - Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J.M., Martínez, A. (2000) Colour and phenolic compounds of a young red wine, influence of wine-making techniques, storage temperature, and length of storage time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 736-741.
 - Gómez-Plaza, E., Gil-Munoz, R., Lopez-Roca, J.M., Martinez-Cutillas, A., Fernandez-Fernandez, J.L. (2001) Phenolic compounds and colour stability of red wines: Effect of skin maceration time. *American Journal of Enology and Viticulture* 52, 266–270.
 - Gómez-Plaza, E., Gil-Munoz, R., Lopez-Roca, J.M., Martinez-Cutillas, A., Fernandez-Fernandez, J.L. (2002) Maintenance of colour composition of a red wine during storage. Influence of prefermentative practices, maceration time and storage. *Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie* 35, 46–53.
 - Hang, Y.D., Woodmas, E.E. (2010) Influence of apple cultivar and juice pasteurization on hard cider and eau-de-vie methanol content. *Bioresource Technology* 101, 1396–1398.
 - Harding, C., Maidment, C. (1996) An investigation into the anti-bacterial effects of wine and other beverages. *Journal of Biological Education* 30(4), 237.
 - Heard, G.M. (1999) Novel yeasts in winemaking-looking to the future. *Food Australia*, 51, 347-352.
 - Heinonen, I.M., Lehtonen, P.J., Hopia, A.I. (1998) Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 25-31.
 - Henn, T., Stehle, P. (1998) Total phenolics and antioxidant activity of commercial wines, teas and fruit juices. *Ernahrungs-Umchau* 45(9), 308-313.
 - Henschke, P.A., Jiranek, V. (1991) Hydrogen sulfide formation during fermentation: Effect of nitrogen composition in model grape musts. *Proceedings of International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine, 18-19 June 1991, Seattle Davis, California, American Society for Enology and Viticulture*, 172-184.
 - Henschke, P.A., Jiranek, V. (1993) Yeast-metabolism of nitrogen compounds. In: Fleet G. H. *Wine Microbiology and Biotechnology*, Chur Harwood Academic Publishers, 77-164.
 - Horvat, R.J., Chapman, G.W., Senter, S.D., Norton, J.D., Okie, W.R., Robertson, J.A. (1992) Comparison of the volatile compounds from several commercial plum cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 60(1), 21-23.
 - Hou, C.Y., Lin, Y.S., Wang, Y.T., Jiang, C.M., Lin, K.T., Wu, M.C. (2008) Addition of phenolic acids on the reduction of methanol content in wine. *Journal of Food Science* 73(5), 432-437.

- Hou, C.Y., Lin, Y.S., Wang, Y.T., Jiang, C.M., Wu, M.C. (2008) Effect of storage conditions on methanol content of fruit and vegetable juices. *Journal of Food Composition and Analysis* 21, 410–415.
- Hui, Y.H., Barta, J., Cano, M.P., Gusek, T.W., Sidhu, J.S., Sinha, N.K. (2006) *Handbook of Fruits and Fruit Processing*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 553-564.
- Itharat, A., Houghton, P., Eno-Amooguaye, E., Burke, P., Sampson, J., Raman, A. (2004) In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plant used traditionally to treat cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 90, 33-38.
- Jacobson, J.L. (2006) *Introduction to Wine Laboratory Practices and Procedures*. Springer Science+Business Media, Inc., New York, SAD.
- Jackson, R.S. (2008) *Wine Science. Principles and Applications*. Academic Press, Elsevier, San Diego, SAD.
- Jarvis, B. (1996) Cider, perry, fruit wines and other alcoholic fruit beverages. In: Arthey, D., Ashhurst, P.R. *Fruit Processing*. 1st ed. Bishopbriggs, Blackie Academic and Professional, Glasgow, 97-134.
- Jay, J.M., Loessner, M., Golden, D.A. (2005) *Modern Food Microbiology*, 7th Ed., Springer, New York.
- Jazić, Lj., Ružić, N. (1982) *Praktikum za tehnologiju vina*. Tehnološki fakultet, Univerzitet Novi Sad.
- Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P.A. (1995) Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *American Journal of Enology and Viticulture* 46, 75-83.
- Jeong, J.-H., Jung, H., Lee, S.-R., Lee, H.-J., Hwang, K.T., Kim, T.-Y. (2010) Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. *Food Chemistry* 123, 338–344.
- Joh, Y.J. (2007) *Quantification of quality attributes, functional compounds, and antioxidant capacity of blackberry and blackberry wines*. Bachelor Thesis, New Mexico State University, SAD.
- Johnson, I.T., Williamson, G.M., Musk, S.R.R. (1994) Anticarcinogenic factors in plant foods: a new class of nutrients?. *Nutrition Research Reviews* 7, 175-204.
- Jolie, R.P., Duvetter, T., Van Loey, A.M., Hendrickx, M.E. (2010) Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research* 345(18), 2583-2595.
- Jokić, A. (2010). Modelovanje „cross-flow“ mikrofiltracije suspenzija kvasca primenom koncepta neuronskih mreža i postupka odzivne površine. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet Novi Sad.
- Jolly, N.P., Augustyn, O.P.H, Pretorius, I.S. (2006) The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture* 27(1), 15-39.
- Jones, A.M., Ingledew, W.M., (1994) Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very-high gravity fermentation. *Applied Environmental Microbiology* 60, 1048–1051.

-
- Jooyandeh, H. (2013) Production of non-alcoholic fermented plum beverages. Middle East Journal of Scientific Research 13(6), 836-843.
 - Joshi, V.K., Sandhu, D.K., Attri, B.L., Walla, R.K. (1991) Cider preparation from apple juice concentrate and its consumer acceptability. Indian Journal of Horticulture 48, 321-327.
 - Joshi, V.K., Sharma, P.C., Attri, B.L. (1991) A note on deacidification activity of *Schizosaccharomyces pombe*, Journal of Applied Bacteriology 70, 385-390.
 - Joshi, V.K., Sharma, S.K., Goyal, R.K., Thakur, N.S. (1999) Effect of method of secondary fermentation and type of base wine on physico-chemical and sensory qualities of sparkling plum wine. Brazilian Archives of Biology and Technology 42(3), 315-322.
 - Joshi, V.K., Bhardway, J.C. (2011) Effect of different cultivars yeasts (free and immobilized cultures) of *S. cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* on physico-chemical and sensory quality of plum based wine for sparkling wine production. International Journal of Food and Fermentation Technology 1, 69-81.
 - Jović, S. (1991) Uticaj načina prerade grožđa i vinifikacije na sadržaj metanola i viših alkohola u vinu. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
 - Kashyap, D.R., Vohra, P.K., Chopra, S., Tewari, R. (2001) Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technology 77, 215-227.
 - Kelebek, H., Canbas, A., Cabaroglu, T., Selli, S. (2007) Improvement of anthocyanin content in the cv. Öküzgözü wines by using pectolytic enzymes. Food Chemistry 105, 334–339.
 - Kerry, N.L., Abbey, M. (1997) Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. Atherosclerosis 135(1), 93-102.
 - Kim, D.-O., Jeong, S.W., Lee, C.Y. (2003) Antioxidant capacity of phenolic phytochemical from various cultivars of plums. Food Chemistry 81, 321–326.
 - King, S.E., Swiegers, H.J., Travis, B., Francis, L.I., Bastian, E.P.S., Pretorius, I.S. (2008) Coinoculated fermentations using *Saccharomyces* yeasts affect the volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56, 10829-10837.
 - Kumar, Y.S., Prakasam, R.S., Reddy, O.V.S. (2009) Optimisation of fermentation conditions for mango (*Mangifera indica* L.) wine production by employing response surface methodology. International Journal of Food Science and Technology 44, 2320-2327.
 - Kurechi, T., Aizawa, N., Kunugi, A. (1983) Studies of the antioxidants XVIII: Oxidation products of tertiary butyl hydroquinone (TBHQ). Journal of the American Oil Chemists' Society, 60(11), 1878-1882.
 - Laurentiu Itu, N., Rapeanu, G., Hopulele, T. (2011) Effect of maceration enzymes addition on the aromatic white winemaking. The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati 35(1), 77-91.
 - Lazić, Z.R. (2004) Design of Experiments in Chemical Engineering: A Practical Guide, Wiley–VCH, Weinheim.
 - Lee, J., Koo, N., Min, D.B. (2004) Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. CRFSFS 3, 21-33.

- Lee, C.Y., Smith, N.L., Nelson, R.R. (1979) Relationship between pectin methylesterase activity and the formation of methanol concord grape juice and wine. *Food Chemistry* 4, 143-148.
- Lieberman, M.M., Patterson, G.M.L., Moore, R.E. (2001) In vitro bioassays for anticancer drug screening: effects of cell concentration and other assay parameters on growth inhibitory activity. *Cancer Letters* 173, 21–29.
- List, D., Buddruss, S., Bodtke, M. (1985) Pectin – bestimmung mit meta-phelylphenol. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* 180, 48-52.
- Łoś, J., Wilska-Jeszka, J., Pawlak, M. (2000) Polyphenolic compounds of plums (*Prunus domestica*). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 50(1), 35–38.
- Lozano, J.E. (2006) *Fruit Manufacturing: Scientific basis, engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance*. Springer, USA, 21-54.
- Lozano, M., Vidal-Aragón, M.C., Hernández, M.T., Ayuso, M.C., Bernalte, M.J., García, J., Velardo, B. (2009) Physicochemical and nutritional properties and volatile constituents of six Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars. *European Food Research and Technology* 228, 403-410.
- Matsui, K.N., Granadob, L.M., de Oliveirac, P.V., Tadini, C.C. (2007) Peroxidase and polyphenol oxidase thermal inactivation by microwaves in green coconut water simulated solutions. *LWT - Food Science and Technology* 40(5), 852-859.
- Mauricio, J.C, Ortega, J.M., Salmon, J.M. (1995) Sugar uptake by three strains of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation at different initial ammoniacal nitrogen concentrations. *Acta Horticulturae* 388, 197-202.
- Medinsky, M.A., Dorman, D.C. (1995) Recent developments in methanol toxicity. *Toxicology Letters* 82–83, 707–711.
- Mendoza, L.M., Manca de Nadra, M.C., Farias, M.E. (2007) Kinetics and metabolic behaviour of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnological letters* 29, 1057-1063.
- Mercurio, M., Mercurio, V., de' Gennaro, B., de' Gennaro, M., Grifa, C., Langella, A., Morra, V. (2010) Natural zeolites and white wines from Campania region (Southern Italy): a new contribution for solving some oenological problems. *Periodico di Mineralogia* 79(1), 95-112.
- Merida, J., Moyano, L., Millan, C., Medina, M. (1991) Extraction of phenolic compounds in controlled macerations of Pedro Ximenez grapes. *Vitis* 30, 117-127.
- Meyer, A.S., Yi, O.S., Pearson, D.A., Waterhouse, A.L., Frankel, E.N. (1997) Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1638-1643.
- Mitrović, O., Gavrilović-Damnjanović, J-, Popović, B., Kandić, M. (2006) Karakteristike čačanskih sorti šljive pogodnih za sušenje. *Voćarstvo* 40(155), 255-261.

- Milala, J., Kosmala, M., Sójka, M., Kołodziejczyk, K., Zbrzeźniak, M., Markowski, J. (2013) Plum pomaces as a potential source of dietary fibre: Composition and antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology* 50(5), 1012-1017.
- Miljić, U., Puškaš, V. (2014) Influence of fermentation conditions on production of plum (*Prunus domestica* L.) wine: A response surface methodology approach. *Hemijska Industrija*, DOI:10.2298/HEMIND130307044M.
- Mišić, P. (2006) Šljiva. Nolit, Beograd.
- Molina, A.M., Swiegers, J.H., Varela, C., Pretorius, I.S., Agosin, E. (2007) Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 675–687.
- Montgomery, D. C. (2005) Design and Analysis of Experiments: Response surface method and designs. John Wiley and Sons, New Jersey.
- Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., Vasconcelos, I. (2008) Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guillermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology* 124, 231-238.
- Moreno, J.J., Millan, C., Ortega, J.M., Medina, M. (1991) Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *Journal of Industrial Microbiology* 7, 181-190.
- Morrissey, W.F., Davenport, B., Querol A., Dobson, A.D.W. (2004) The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology* 97,647–655.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunological Methods* 65, 55–63
- Mudnić, I., Budimir, D., Modun, D., Gunjača, G., Generalić, I., Skroza, D., Katalinić, V., Ljubenkoy, I., Boban, M. (2012) Antioxidant and vasodilatory effects of blackberry and grape wines. *Journal of Medicinal Food* 15(3), 315–321.
- Murcia, M.A., Jiménez, A.M., Martínez-Tomé, M. (2001) Evaluation of the antioxidant properties of Mediterranean and tropical fruits compared with common food additives. *Journal of Food Protection* 64, 2037–2046.
- Myers, R.H., Montgomery, C.M. (1995) Response Surfaces Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, Wiley, New York.
- Nakatani, N., Kayano, S., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K., Mitani, T. (2000) Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5512–5516.
- Nergiz, C., Yildiz, H. (1997) Research on chemical composition of some varieties of european plums (*Prunus domestica* L.) adapted to the Aegean district of Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2820-2823.
- Nikićević, N., Paunović, R. (2013) Tehnologija jakih alkoholnih pića. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet.

- Nohynek, L.J., Alakomi, H.L., Kähkönen, M.P., Heinonen, M., Helander, I.M., Oksman-Caldentey, K.M., Puupponen-Pimiä, R.H. (2006) Berry phenolics: Antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer* 54(1), 18-32.
- Noratto, G., Porter, W., Byrne, D., Cisneros-Zevallos, L. (2009) Identifying peach and plum polyphenols with chemopreventive potential against estrogen-independent breast cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 5219–5226.
- OIV - Office International del la Vigne et du Vin (2013) Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Volume 1 and 2, Paris.
- Ough, C.S. (1991) Influence of nitrogen compounds in grapes on ethyl carbamate formation in wines. In: Rantz J. M., Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine, American Society for Enology and Viticulture, 18-19 June 1991., Seattle Davis, California, 165-171.
- Paine, A.J, Dayan, A.D. (2001) Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks. *Human and Experimental Toxicology* 20, 563-568.
- Pantelić, M., Dabić, D., Matijašević, S., Davidović, S., Dojčinović, B., Milojković-Opsenica, D., Tešić, Ž. Natić, M. (2014) Chemical characterization of fruit wine made from oblačinska sour cherry. *Scientific World Journal* 2014, 1-9.
- Pifferi, P.G., Buska, G., Manenti, I., Lo Presti, A., Spagna, G. (1989) Immobilization of pectinesterase on γ -alumina for the treatment of juices. *Belgian Journal of Food Chemistry and Biotechnology* 44, 173-182.
- Piletić, M.V., Milić, B.Lj., Đilas, S.M. (1993) *Organska hemija II deo*, Prometej, Novi Sad.
- Pilnik, W. (1996) From traditional ideas to modern fruit juice wining processes. Agricultural University, Department of Food Science, Wageningen, The Netherlands, 159-179.
- Pinelo, M., Arnous, A., Meyer, A.S. (2006) Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology* 17, 579-590.
- Pinhero, R.G., Paliyath, G. (2001) Antioxidant and calmodulin-inhibitory activities of phenolic components in fruit wines and its biotechnological implications. *Food Biotechnology* 15(3), 179-92.
- Pino, J.A., Quijano, C.E. (2012) Study of the volatile compounds from plum (*Prunus domestica* L. cv. Horvin) and estimation of their contribution to the fruit aroma. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 32(1), 76-83.
- Polychroniadou, E., Kanellaki, M., Iconomopoulou, M., Koutinas, A.A., Marchant, R., Banat, I.M. (2003) Grape and apple wines volatile fermentation products and possible relation to spoilage. *Bioresource Technology* 87(3), 337-339.
- Poulton, J.E. (1983) Cyanogenic compounds in plants and their toxic effects. In: Keeler, R.F., Tu, A.T. Plant and fungal toxins – Handbook of natural toxins, Marcel Dekker, New York, 117-160.

- Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za alkoholna pića (2004) Službeni list Srbije i Crne Gore 24, 3-9.
- Pravilnik o kategorijama, kvalitetu i deklarisanju rakije i drugih alkoholna pića (2010) Službeni glasnik Republike Srbije, 74/2010.
- Pravilnik o načinu i postupku proizvodnje i o kvalitetu stonih vina kao i vina sa geografskim poreklom (2011) Službeni glasnik Republike Srbije, 87/2011.
- Pravilnik o voćnim vinima (2006) Republika Hrvatska, Narodne novine 73/2006.
- Prasanna, V., Yashoda, H., Prabha, T., Tharanathan, R. (2003) Pectic polysaccharides during ripening of mango. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 1182-1186.
- Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.
- Puškaš, V., Kovač, V., Dodić, J., Dodić, S. (2005) Effect of fermentation conditions on content of phenolic compounds in red wine, *Acta Periodica Technologica* 36, 61-69.
- Puškaš, V. (2010) Uticaj tehnoloških faktora u proizvodnji crvenih vina na sadržaj i stabilnost katehina i njihovih oligomera. Doktorska disertacija. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Radler, F., Schütz, H. (1982) Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. *American Journal of Enology and Viticulture* 33, 36-40.
- Radovanović, A., Radovanović, B., Jovančević, B. (2009) Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chemistry* 117, 326-331.
- Rankine, B.C., Bridson, D.A. (1971) Glycerol in Australian wines and factors influencing its formation. *American Journal of Enology and Viticulture* 22(1), 6-12.
- Rauhut, D., Kürbel, H., Dittrich, H. H., Großmann, M. (1996) Properties and differences of commercial yeast strains with respect to their formation of sulfur compounds. *Die WeinWissenschaft* 51, 187-192.
- Raviyan, P., Zhang, Z., Feng, H. (2005) Ultrasonication for tomato pectin methylesterase inactivation: Effect of cavitation intensity and temperature on inactivation. *Journal of Food Engineering* 70, 189-196.
- Reddy, L.V.A., Reddy, O.V.S. (2005) Production and characterization of wine from mango fruit. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21, 1345-1350.
- Reddy, L.V.A., Reddy, O.V.S. (2009) Production, optimization and characterization of wine from Mango (*Mangifera indica* Linn.). *Natural Product Radiance* 8(4), 426-435.
- Reddy, L.V.A., Reddy, O.V.S. (2011) Effect of fermentation conditions on yeast growth and volatile composition of wine produced from mango (*Mangifera indica* L.) fruit juice. *Food Bioproducts Processing* 89(4), 487-491.
- Remize, F., Sablayrolles, J.M., Dequin, S. (2000) Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. *Journal of Applied Microbiology* 88, 371-378.

-
- Revilla, E., Alonso, E., Burzeix, M., Heredia, N. (1991) Dosage des catéchines et des proanthocyanidols dans les vins, Bulletin de l' O.I.V, 829.
 - Revilla, I., González-San José, M.L. (1998) Methanol release during fermentation of red grapes treated with pectolytic enzymes. Food Chemistry 63, 307-312.
 - Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2006) Handbook of Enology Vol. 1: The Microbiology of Wine and Vinifications. 2 nd Ed., John Wiley & Sons, Chichester.
 - Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (1999) Handbook of Enology, Vol. 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, John Willey & sons, New York.
 - Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1965) Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge, Bulletin de la Societe Chimique de France 9, 2649-2652.
 - Rodriguez Vaquero, M.J., Alberto, M.R., de Nadra, M.C.M. (2007) Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. Food Control 18(2), 93-101.
 - Romero, C., Bakker, J. (1999) Interactions between grape anthocyanins composition and pyruvic acid, with effect of pH and acid concentration on anthocyanin composition and color in model systems. Journal of Agricultural and Food Chemistry 47, 3130-3139.
 - Romero-Cascales, I., Fernández-Fernández, J.I., Ros-Garcia, J.M., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza, E (2008) Characterisation of the main enzymatic activities present in six commercial macerating enzymes and their effects on extracting colour during winemaking of Monastrell grapes. International Journal of Food Science and Technology 43, 1295–1305.
 - Rommel, A. Heatherbell, D.A., Wroslad, R.E. (1990) Red raspberry juice and wine. Effect of processing and storage on anthocyanin pigment, colour and appearance. Journal of Food Science 55(4), 1011-1017.
 - Rommel, A., Wroslad, R.E., Heatherbell, D.A. (2006) Blackberry juice and wine: Processing and storage effects on anthocyanin composition, color and appearance. Journal of Food Science 57(2), 385-391.
 - Rop, O., Jurikova, T., Mlcek, J., Kramarova, D., Sengee, Z. (2009) Antioxidant activity and selected nutritional values of plums (*Prunus domestica* L.) typical of the White Carpathian Mountains. Scientia Horticulturae 122, 545–549.
 - Rosi, I.M., Bertuccioli, M., Giovani, G. (2008) Effect of source, amount and timing of nitrogen addition on yeast fermentative performance and flavour compound formation in Trebbiano wine. In: Chassagne, D., Wine Active Compounds-Proceeding of the WAC 2008 International Conference, Beaune, 252-254.
 - Rošin-Grget, K., Linčir, I. (1990) Stomatološki pacijent pod antineoplastičnom terapijom. Acta Stomatologica Croatica 24(2), 133-138.
 - Rufián-Henares, J.A., Morales, F.J. (2008) Microtiter plate-based assay for screening antimicrobial activity of melanoidins against *E. coli* and *S. aureus*. Food Chemistry 111(4), 1069-1074.

- Rupasinghe, V.H.P., Jayasankar, S., Lay, W. (2006) Variation in total phenolic and antioxidant capacity among European plum genotypes. *Scientia Horticulturae* 108, 243–246.
- Rupasinghe, V.H.P., Clegg, S. (2007) Total antioxidant capacity, total phenolic content, mineral elements and histamine concentrations in wines of different fruit sources. *Journal of Food Composition and Analysis* 20, 133–137.
- Sablayrolles, J.M. (2009) Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International* 42, 418-424.
- Sacchi, K., Bisson, L., Adams, D.O. (2005) A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 56, 197–206.
- Sadilova, E., Stintzing E.C., Carle, R. (2006) Thermal degradation of acylated and nonacylated anthocyanins. *Journal of Food Science* 71, 504–512.
- Sanchez-Moreno, C., Larrauti, J.A., Saura-Calixto, F. (1999) Free radical scavenging of selected red, rose and white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(10), 1301-1304.
- Sanches-Moreno, C., Satue-Gracia, M.T., Frankel, E.N. (2000) Antioxidant activity of selected Spanish wines in corn oil emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48, 5581-5587.
- Sanches-Moreno, C., Cao, G., Ou, B., Prior, R. (2003) Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 4889-4896.
- Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ohkubo, T., Takeuchi, M., Ochi, H. (1996) Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 44(1), 37-41.
- Satora, P., Tuszyński, T. (2003) Microbiological characteristics of the Wegierka Zwyczajna plum orchard in submontane region. *Polish Journal of Food and Nutrition Science* 12/53(2), 43-48.
- Satora, P., Tuszyński, T. (2005) Biodiversity of yeasts during plum Wegierka Zwyczajna spontaneous fermentation. *Food Technology and Biotechnology* 43(3), 277-282.
- Satora, P., Tuszyński, T. (2010) Influence of indigenous yeasts on the fermentation and volatile profile of plum brandies. *Food Microbiology* 27, 418-424.
- Scalbert, A. (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30(12), 3875-3883.
- Scanes, K.T., Hohmann, S., Prior, B.A. (1998) Glycerol production by yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: A review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 19(1), 17-24.
- Seeram, N.P., Aviram, M., Zhang, Y., Henning, S.M., Feng, L., Dreher, M., Heber, D. (2008) Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(4), 1415-1422.

-
- Sheth, N.K., Wisniewski, T.R., Franson, T.R. (1988) Survival of enteric pathogens in common beverages: An in vitro study. *American Journal of Gastroenterology* 83(6), 658-60.
 - Shinohara, T., Kubodera, S., Yanagida, F. (2000) Distribution of phenolic yeasts and production of phenolic off-flavors in wine fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90(1), 90-97.
 - Sidari, R., Postorino, S., Caparello, A., Caridi, A. (2007) Evolution during wine aging of colour and tannin differences induced by wine starters. *Annals of Microbiology* 57(2), 197-201.
 - Sieiro, C., García-Fraga, B., López-Seijas, J., da Silva, A.F., Villa, T.G. (2012) Microbial pectic enzymes in the food and wine industry. In: Valdez, B. *Food Industrial Processes - Methods and Equipment*, InTech, USA.
 - Singleton, V.L., Orhofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology* 299, 152-178.
 - Siwach, R. (2012) Pectin Methylsterase Inactivation in Mosambi Juice. *Journal of Life Sciences* 4(2), 81-85.
 - Snow, P.G., Gallender, G.F. (1979) Deacidification of white table wines through partial fermentation by *Schizosaccharomyces pombe*. *American Journal of Enology and Viticulture* 30, 45-48.
 - Soleas, G.J., Grass, L., Josephy, P.D., Goldberg, D.M., Diamandis, E.P. (2006) A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry* 39, 492–497.
 - Soufleros, E.H., Pissa, I., Petridis, D., Lygerakis, M., Mermelas, K. (2001) Instrumental analysis of volatile and other compounds of Greek kiwi wine; sensory evaluation and optimization of its composition. *Food Chemistry* 75, 487-500.
 - Srisamatthakarn, P., Rauhut, D., Brückner, H. (2010) Impact of commercial yeast strains on wine fermentation and formation of metabolites of yellow passion fruit juice (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degner). *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 3(2), 282-292.
 - Srisamatthakarn, P. (2011) Improvement of varietal aroma in grape and tropical fruit wines by optimal choice of yeasts and nutrient supplements. PhD thesis, Faculty of Agricultural Sciences, Nutritional Sciences and Environmental Management, Justus-Liebig-University Giessen, Germany.
 - Suarez Valles, B., Pando Bedriñana, R., Fernández Tascón, N., Querol Simón, A., Rodríguez Madrera, R. (2007) Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology* 24, 25–31.
 - Sugita-Konishi, Y., Hara-Kudo, Y., Iwamoto, T., Kondo, K. (2001) Wine has activity against entero-pathogenic bacteria in vitro but not in vivo. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 65(4), 954-957.

-
- Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X., Liu, R.H. (2002) Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 7449–7454.
 - Swiegers, J.H., Willmott, R.L., Hill-Ling, A., Capone, D.L., Pardon, K.H., Elsey, G.M., Howell, K.S., de Barros Lopes, M.A., Sefton, M.A., Lilly, M., Pretorius, I.S. (2005) Modulation of volatile thiol and ester aromas in wine by modified wine yeast. *Proceedings of the Weurman Flavour Research Symposium*, 21-26 June 2005. Roskilde, Denmark, 113-116.
 - Swiegers, J.H., Barowasky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S. (2005a) Yeast and bacteria modulation of wine aroma and flavour. In: Blair, R.J., Francis, M.E., Pretorius, I.S. *Advances in Wine Science. Commemorating 50 Years of The Australian Wine Research Institute*, Australia, 159-187).
 - Swiegers, J.H., Francis, I.L., Herderich, M.J., Pretorius, I.S. (2006) Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery: the choice of yeast for fermentation offers great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal* 21, 34-42.
 - Swiegers, J.H., Willmott, R.L., Siebert, T.E., Lattey, K., Bramley, B.R., Francis, I.L., King, E.S., Pretorius, I.S. (2009). The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food Microbiology* 26(2), 204-211.
 - Tajchakavit, S. (1997) Microwave heating on fruit juices: kinetics of enzyme inactivation, microbial destruction and evaluation of enhanced thermal effects. PhD thesis, Department of Food Science and Agricultural Chemistry, Macdonald Campus of McGill University, Montreal, Canada.
 - Tajchakavit, S., Ramaswamy, H.S. (1997) Thermal vs. microwave inactivation kinetics of pectin methylesterase in orange juice under batch mode heating conditions. *LWT - Food Science and Technology* 30(1), 85-93.
 - Taherzadeh, M.J., Adler, L., Liden, G. (2002) Strategies for enhancing fermentative production of glycerol - A review. *Enzyme and Microbial Technology* 31, 53–66.
 - Taylor, V.F., Longerich, H.P., Greenough, J.D. (2003) Multielement analysis of Canadian wines by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and multivariate statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 856–860.
 - Terefe, N.S., Gamage, M., Vilku, K., Simons, L., Mawson, R., Versteeg, C. (2009) The kinetics of inactivation of pectin methylesterase and polygalacturonase in tomato juice by thermosonication. *Food Chemistry* 117, 20–27.
 - Tešević, V., Nikićević, N., Jovanović, A., Đoković, D., Vujisić, Lj., Vučković, I., Bonić, M. (2005) Volatile components from old plum brandies. *Food Technology and Biotechnology* 43(4), 367–372.
 - Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Hess-Pierce, B., Kader, A.A. (2001) HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 4748–4760.

- Torchio, F., Río Segade, S., Gebri, V., Cagnasso, E., Rolle, L. (2011) Changes in chromatic characteristics and phenolic composition during winemaking and shelf-life of two types of red sweet sparkling wines. *Food Research International* 44, 729e738.
- Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamon, J.M., Mas, A. (2002). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* 80, 47–53.
- Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J. M., Mas, A. (2003) Effect of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology* 85, 126-136.
- Torija, M.J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J. M.. (2003) Effect of organic acids and nitrogen source on alcoholic fermentation: Study of their buffering capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(4), 916-922.
- Udenigwe, C.C., Ramprasath, V.R., Aluko, R.E., Jones, P.J.H. (2008) Potential of resveratrol in anticancer and anti-inflammatory therapy. *Nutrition Reviews* 66(8), 445–454.
- Valero, E., Millán, C., Ortega, J., Mauricio, J. (2003) Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83, 830-835.
- Van Balen, J. (1984) Recovery of anthocyanins and other phenols from converting grapes into wine. M.Sc. Thesis, University of California, Davis.
- Velićanski, A. (2012) Karakterizacija funkcionalnog napitka od melise (*Melissa officinalis* L.) dobijenog fiziološkom aktivnošću čajne gljive. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu.
- Voća, S., Galić, A., Šindrak, Z., Dobričević, N., Plietić, S., Družić, J. (2009) Chemical composition and antioxidant capacity of three plum cultivars. *Agriculturae Conspectus Scientificus* 74(3), 273-276.
- Vyas, K.K., Joshi, V.K. (1988) Deacidification activity of *Schizosaccharomyces pombe* in plum must. *Journal of Food Science and Technology* 25, 306-307.
- Walker, G.M. (1998) *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons, England.
- Walkowiak-Tomczak, D. (2008) Characteristics of plums as a raw material with valuable nutritive and dietary properties – A review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 58(4), 401-405.
- Wang, H, Cow, G., Prior, R.L. (1996) Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 701–705.
- Wang, X.D., Bohlscheid, J.C., Edwards, C.G. (2003) Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology* 94, 349-359.
- Wang, L.-S., Stoner, G.D. (2008) Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters* 269, 281–290.

- Weisse, M.E., Eberly, B., Person, D.A. (1995) Wine as a digestive aid: Comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine. *British Medical Journal* 311(7021), 1657-1660.
- World Health Organization (WHO) (1997) *Environmental Health Criteria 196, Methanol*. Geneva, Switzerland.
- Will, F., Dietrich, H. (2006) Optimised processing technique for colour- and cloud-stable plum juices and stability of bioactive substances. *European Food Research and Technology* 223(3), 419-425.
- Williams, A.A., Ismail, H.M.M. (1991) The volatile flavour components of plums and their sensory evaluation. In: Solms, Hall (Eds) *Criteria of Food acceptance*, foster Verlag AG, Switzerland, 333-354.
- Wolter, F., Clausnitzer, A., Akoglu, B., Stein, J. (2002) Piceatannol, a natural analog of resveratrol, inhibits progression through the Sphase of the cell cycle in colorectal cancer cell lines. *Journal of Nutrition* 132(2), 298-302.
- Wyss, C., Cuénat, P. (2005) Stabilisation tartrique des vins par traitement aux zéolithes. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture Horticulture* 37(6), 341-347.
- Yalcin, S.K., Ozbas, Z.Y. (2008) Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology* 39, 325-332.
- Yang, J., Martinson, T.E., Liu, R.H. (2009) Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. *Food Chemistry* 116, 332–339.
- Yildirim, H.K. (2006) Evaluation of colour parameters and antioxidant activities of fruit wines. *International Journal of Food Science and Nutrition* 57(1/2), 47-63.
- Yuan, Z.L. (2013) Comparison of antioxidant activity in five fruit wine of Guangxi in China. *Advanced Materials Research* 641-642, 875-881.
- Zhou, C., Qian, L., Ma, H., Yu, X., Zhang, Y., Qu, W., Zhang, X, Xia, W. (2012) Enhancement of amygdalin activated with β -d-glucosidase on HepG2 cells proliferation and apoptosis. *Carbohydrate Polymers* 90, 516–523.
- Zhuang, H., Du, J., Wang, Y. (2011) Antioxidant capacity changes of 3 cultivar Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) juices and corresponding wines. *Journal of Food Science* 76(4), 606-611.
- Zimman, A., Joslin, W., Lyon, M., Meier, J., Waterhouse, A. (2002) Maceration variables affecting phenolic composition in commercial-scale Cabernet Sauvignon winemaking trials. *American Journal of Enology and Viticulture* 53, 93–98.
- Zoecklein, B. (1991) An overview of maceration during red winemaking. *Australian & New Zeland Wine Industry Journal* 6, 265-267.
- Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H., Nury, F. (1999) *Wine Analysis and Production*, Kluwer Academic, New York.
- Zohre, D.E., Erten, H., (2002) The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochemistry* 38, 319-324.

- www.phschool.com
- www.vina.rs

7. PRILOZI

7.1. Čačanska rana

Tabela 7.1. Ispitivanje uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljive sorte Čačanska rana primenom Box-Behnken eksperimentalnog plana

Temperatura (°C)	pH	Pektinaza (g/100 kg)	Etanol (% v/v)	Metanol (mg/l)	Glicerol (g/l)	Prinos vina (%)
X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
16	4,0	0	5,8	499	3,73	38,5
16	4,0	2	6,07	1077	3,85	56
16	3,5	1	6,55	972	3,4	50,5
16	4,5	1	5,51	932	4,02	53,5
23	4,0	1	6,37	1085	4,46	55
23	4,0	1	6,25	1059	4,45	51
23	3,5	2	6,8	1180	4,13	59
23	4,5	2	6,23	1222	4,89	63
23	4,0	1	6,31	1082	4,39	56
23	4,0	1	6,42	1020	4,36	53
23	4,0	1	6,3	1065	4,38	55
23	4,5	0	6,04	655	4,62	43,5
23	3,5	0	6,67	569	4,35	45
30	4,0	2	6,51	1291	4,81	66
30	4,5	1	6,12	1089	5,25	63
30	4,0	0	6,37	643	4,77	47,5
30	3,5	1	6,87	1123	4,59	58

Tabela 7.2. Polinomski oblici fitovanih odziva ispitivanih parametara

Parametri	Model	R ²
Etanol	$Y_1 = + 14,4255 + 0,1043X_1 - 4,1339X_2 + 0,0481X_3 + 0,0207X_1X_2 - 0,0046X_1X_3 + 0,03X_2X_3 - 0,0032X_1^2 + 0,36X_2^2 + 0,015X_3^2$	0,965
Metanol	$Y_2 = -180,66 + 36,8745X_1 + 92,8429X_2 + 638,2X_3 + 0,4286X_1X_2 + 2,5X_1X_3 - 22X_2X_3 - 0,6347X_1^2 - 8,4X_2^2 - 153,6X_3^2$	0,934
Glicerol	$Y_3 = + 3,5077 + 0,211X_1 - 1,5652X_2 - 0,9525X_3 + 0,0028X_1X_2 - 0,0028X_1X_3 + 0,245X_2X_3 - 0,0031X_1^2 + 0,229X_2^2 + 0,0323X_3^2$	0,990
Prinos vina	$Y_4 = +142,9503 - 0,7271X_1 - 49,4107X_2 + 2,4911X_3 + 0,1429X_1X_2 + 0,0357X_1X_3 + 2,75X_2X_3 + 0,0166X_1^2 + 5,75X_2^2 - 2,8125X_3^2$	0,975

X₁: temperatura (°C); X₂: pH; X₃: doza pektinaze (g/100 kg);

Tabela 7.3. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva i regresionih koeficijenata

Izvor	F-vrednost				p-vrednost			
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
Model	22,49	81,96	65,09	30,69	0,0002*	< 0,0001*	< 0,0001*	< 0,0001*
X ₁	52,50	46,14	435,47	53,84	0,0002*	0,0003*	< 0,0001*	0,0002*
X ₂	124,71	0,30	118,94	4,58	< 0,0001*	0,5989**	< 0,0001*	0,0496*
X ₃	7,43	601,16	0,98	200,66	0,0295*	< 0,0001*	0,3545**	< 0,0001*
X ₁ X ₂	2,35	0,0074	0,071	0,33	0,1694**	0,9335**	0,7971**	0,5823**
X ₁ X ₃	0,47	1,02	0,29	0,083	0,5144**	0,3463**	0,6098**	0,7815**
X ₂ X ₃	0,10	0,40	10,70	2,51	0,7605**	0,5458**	0,0136*	0,1569**
X ₁ ²	11,66	3,39	16,95	0,92	0,0112*	0,1082**	0,0045*	0,3685**
X ₂ ²	3,81	0,015	2,46	2,89	0,0920**	0,9046**	0,1607**	0,1328**
X ₃ ²	0,11	82,67	0,78	11,07	0,7546**	< 0,0001*	0,4062**	0,0126*

X₁: temperatura (°C); X₂: pH; X₃: doza pektinaze (g/100 kg);

Y₁: etanol (% v/v); Y₂: metanol (mg/l); Y₃: glicerol (g/l); Y₄: prinos vina (%);

*Značajno pri $p < 0,05$, ** nije značajno;

7.2. Požegača

Tabela 7.4. Ispitivanje uticaja uslova fermentacije na kvalitet vina od šljive sorte Požegača primenom Box-Behnken eksperimentalnog plana

Temperatura (°C)	pH	Pektinaza (g/100 kg)	Etanol (% v/v)	Metanol (mg/l)	Glicerol (g/l)	Prinos vina (%)
X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
16	4,6	1	5,03	899	4,67	54
16	4,1	2	5,92	985	4,17	57
16	3,6	1	7,04	865	3,55	50
16	4,1	0	5,55	350	4,03	36
23	4,1	1	7,26	944	4,55	54
23	4,1	1	7,35	934	4,6	55
23	3,6	0	7,5	314	4,15	41
23	3,6	2	7,6	1169	4,29	57
23	4,6	2	6,6	1205	5,1	60
23	4,6	0	6,35	640	4,7	43
23	4,1	1	7,35	955	4,3	52
23	4,1	1	7,44	947	4,44	57
23	4,1	1	7,31	939	4,5	54
30	3,6	1	7,4	1100	5,15	54
30	4,1	2	7,45	1210	5,48	63
30	4,1	0	6,89	445	5,3	44
30	4,6	1	6,12	1168	5,9	58

Tabela 7.5. Polinomski oblici fitovanih odziva ispitivanih parametara

Parametri	Model	R ²
Etanol	$Y_1 = -4,821 + 0,5628X_1 + 3,6715X_2 - 0,0291X_3 + 0,0521X_1X_2 + 0,0068X_1X_3 + 0,075X_2X_3 - 0,0154X_1^2 - 0,769X_2^2 - 0,1372X_3^2$	0,950
Metanol	$Y_2 = +4222,14 + 9,643X_1 - 2233,537X_2 + 1212,514X_3 + 2,429X_1X_2 + 4,643X_1X_3 - 145X_2X_3 - 0,207X_1^2 + 297,4X_2^2 - 186,15X_3^2$	0,990
Glicerol	$Y_3 = +4,9417 + 0,0427X_1 - 1,248X_2 - 0,4678X_3 - 0,0264X_1X_2 + 0,0014X_1X_3 + 0,13X_2X_3 + 0,0054X_1^2 + 0,309X_2^2 + 0,0047X_3^2$	0,981
Prinos vina	$Y_4 = +10,695 + 0,7694X_1 + 5,21X_2 + 16,868X_3 + 0,0001X_1X_2 - 0,0714X_1X_3 + 0,5X_2X_3 - 0,0066X_1^2 - 0,3X_2^2 - 4,075X_3^2$	0,970

X₁: temperatura (°C); X₂: pH; X₃: doza pektinaze (g/100 kg);

Tabela 7.6. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva i regresionih koeficijenata

Izvor	F-vrednost				p-vrednost			
	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
Model	15,01	77,62	42,24	25,58	0,0009*	< 0,0001*	< 0,0001*	0,0002*
X ₁	34,45	45,75	255,96	16,97	0,0006*	0,0003*	< 0,0001*	0,0045*
X ₂	54,63	14,51	91,24	5,93	0,0002*	0,0066*	< 0,0001*	0,0451*
X ₃	3,02	535,80	6,47	186,89	0,1256**	< 0,0001*	0,0385*	< 0,0001*
X ₁ X ₂	1,97	0,16	2,39	0,001	0,2035**	0,7048**	0,1657**	0,9999**
X ₁ X ₃	0,13	2,28	0,028	0,28	0,7258**	0,1750**	0,8719**	0,6127**
X ₂ X ₃	0,083	11,33	1,18	0,070	0,7815**	0,0120*	0,3129**	0,7988**
X ₁ ²	35,18	0,23	20,26	0,12	0,0006*	0,6435**	0,0028*	0,7343**
X ₂ ²	2,30	12,55	1,76	0,0064	0,1733**	0,0094*	0,2265**	0,9373**
X ₃ ²	1,17	78,64	0,0066	19,62	0,3150**	< 0,0001*	0,9373**	0,0030*

X₁: temperatura (°C); X₂: pH; X₃: doza pektinaze (g/100 kg);

Y₁: etanol (% v/v); Y₂: metanol (mg/l); Y₃: glicerol (g/l); Y₄: prinos vina (%);

*Značajno pri $p < 0,05$, ** nije značajno;

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Uroš Miljić, dipl. inž.
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Vladimir Puškaš, docent Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu
Naslov rada: NR	Proizvodnja i ocena kvaliteta voćnog vina od sorti domaće šljive (<i>Prunus domestica</i> L.)
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2015
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21 000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1

Fizički opis rada: FO	7 poglavlja, 168 stranica, 37 slika, 39 tabela, 282 reference
Naučna oblast: NO	Tehnološko inženjerstvo
Naučna disciplina: ND	Tehnologija vina

Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Šljiva, voćno vino, fermentacija, ocena kvaliteta, karakterizacija
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu, 21 000 Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, Srbija
Važna napomena: VN	nema
Izvod: IZ	<p>Cilj ove doktorske disertacije je bio da se oceni mogućnost upotrebe tri sorte domaće šljive, različitih epoha sazrevanja (Čačanska rana, Čačanska lepotica i Požegača), kao sirovina za proizvodnju voćnog vina. Utvrđeni mehanički sastav plodova i hemijske karakteristike kljuka i soka ispitivanih sorti šljive ukazuju da se Čačanska lepotica i Požegača mogu smatrati boljim sirovinama za proizvodnju voćnog vina u odnosu na sortu Čačanska rana. Vršena je optimizacija uslova alkoholne fermentacije (temperature, vrednosti pH, trajanja fermentacije i doze enzimskog preparata), u sklopu koje je, takođe, ispitana i upotreba različitih pektolitičkih enzima za tretman kljuka i ocenjen uticaj upotrebe različitih sojeva kvasaca, kao proizvodnih mikroorganizama, na kvalitet vina od šljive. Utvrđeno je da, među ispitanim proizvodnim organizmima, kvasac Spriferm (<i>S. cerevisiae</i>) daje vino od šljive najboljeg kvaliteta. Postupkom numeričke optimizacije dobijene su sledeće vrednosti procesnih parametara fermentacije vina od šljive: temperatura 25 °C, vrednost pH 3,5 i doza pektolitičkog enzima 0,5 g/100 kg. Pri navedenim uslovima dobijeni fitovani modeli predviđaju prinos etanola od 7,5% v/v, prinos glicerola od 5g/l, prinos vina od 48% (48 ml vina na 100 g kljuka) i formiranje 710 mg/l metanola. Karakterizacija proizvedenog vina od šljive podrazumevala je određivanje sadržaja najvažnijih sastojaka: alkohola, kiselina, mineralnih materija, fenolnih i aromatičnih jedinjenja, kao i ocenu njegovih funkcionalnih karakteristika (antiradikalske, antimikrobne i antiproliferativne aktivnosti). Na kraju, ocenjena je mogućnost smanjenja produkcije metanola u vinu od šljive primenom različitih fizičko-hemijskih tretmana kljuka. Utvrđena je značajno veća efikasnost postupaka koji uključuju neki vid toplotnog tretmana kljuka u odnosu na postupke koji podrazumevaju upotrebu određenog enološkog sredstva.</p>

Datum prihvatanja teme od strane Senata: DP	31.03.2014.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	predsednik: dr Jelena Dodić, vanredni profesor, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu član-mentor: dr Vladimir Puškaš, docent, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sad član: dr Jovana Grahovac, docent, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu član: dr Radmila Pajović-Šćepanović, docent, Biotehnički fakultet, Univerzitet Crne Gore član: dr Nenad Magazin, docent, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Uroš Miljić, MSc
Mentor: MN	Vladimir Puškaš, PhD, Assistant Professor, Faculty of Technology, Univeristy of Novi Sad
Title: TI	Production and quality assessment of fruit wines from native plum (<i>Prunus domestica</i> L.) varieties
Language of text: LT	Serbian (latin)
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2015
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	21 000 Novi Sad, Blvd. cara Lazara 1
Physical description: PD	7 chapters, 168 pages, 37 figures, 39 tables, 282 references
Scientific field SF	Technological engineering
Scientific discipline SD	Wine Technology
Subject, Key words SKW	plum, fruit wine, fermentation, quality assessment, characterization

UC	
Holding data: HD	Library of Faculty of Technology Novi Sad, 21 000 Novi Sad, Blvd. Cara Lazara 1, Serbia
Note: N	none
Abstract: AB	<p>The aim of this PhD thesis was to assess the possibility of using three native plum varieties, with different ripening periods (Čačanska rana, Čačanska leptica and Požegača), as raw material for the production of fruit wines. Determined mechanical composition and chemical characteristics of fruit pomace and juice indicate that the Čačanska leptica and Požegača are considered as better raw materials for the production of fruit wine compared to Čačanska rana. Optimization of fermentation conditions (temperature, pH, the duration of fermentation and the dose of pectolytic enzyme) was conducted. This step also included investigation of the different pectolytic enzymes use for the treatment of pomace and evaluated the impact of using different yeast strains, as well as the effect of different production microorganisms on the plum wine quality. It was found that, among the tested production microorganisms, Spriferm (<i>S. cerevisiae</i>) yeast gives the plum wine of best quality. Numerical optimization procedure resulted with the following values of the process parameters of plum wine fermentation: temperature 25 °C, pH value 3.5 and pectolytic enzyme dose of 0.5 g/100 kg. Under these conditions the obtained fitted models predict the ethanol yield of 7.5% v/v, glycerol yield 5 g/l, the wine yield of 48% (48 ml from 100 g of pomace) and the formation of 710 mg/l of methanol. Characterization of the produced plum wines included the determination of the most important ingredients: alcohol, acids, minerals, phenolic and aromatic compounds, as well as evaluation of their functional characteristics (antiradical, antimicrobial and antiproliferative activities). Finally, the possibility of reducing the methanol production in plum wine was estimated by applying different physico-chemical treatments of the pomace. Significantly higher efficiency of procedures that involve some form of heat treatment of pomace, compared to treatments which involve the use of certain oenological means, was observed.</p>
Accepted on Senate on: AS	31.03.2014.

Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	president: Jelena Dodić, PhD, full professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad član-mentor: Vladimir Puškaš, PhD, assistant professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad član: Jovana Grahovac, PhD, assistant professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad član: Radmila Pajović-Šćepanović, PhD, assistant professor, Biotechnical faculty, University of Montenegro član: Nenad Magazin, PhD, assistant professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad