МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Навчально-науковий інститут харчових технологій
Кафедра біотехнології продуктів бродіння і виноробства

«До захисту в ЕК»
Директорка ННІХТ
_____ Оксана КОЧУБЕЙ-ЛИТВИНЕНКО
(підпис)
« » лютого 2023 р.

«До захисту допущено»
Завідувач кафедри БПБВ
_____ Анатолій КУЦ
(підпис)
« » лютого 2023 р.

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
НА ЗДОБУТТЯ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА

зі спеціальності 181 Харчові технології»
(шифр та назва спеціальності)

на тему: «**ОБҐРУНТУВАННЯ ВИБОРУ РОСЛИННИХ ФЕНОЛЬНИХ ЕКСТРАКТІВ ЯК АНТИСЕПТИЧНОЇ АЛЬТЕРНАТИВИ ДІОКСИДУ СІРКИ В ТЕХНОЛОГІЇ ВИНОГРАДНИХ ВИН**»

Виконала: здобувачка 2 курсу, групи ТБ-2-7М — Оваденко Олена Рафіківна
(прізвище, ім'я, по-батькові)

Керівник — Марина БІЛЬКО (прізвище, ім'я, по-батькові) _____ (підпис)

Рецензент — Андрій ТАРАСОВ (прізвище, ім'я, по-батькові) _____ (підпис)

Я, як здобувачка Національного університету харчових технологій, розумію і підтримую політику університету з академічної доброчесності. Я не надавала і не одержувала недозволеної допомоги під час підготовки цієї роботи. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на

_____ О. Р. Оваденко
(підпис)

Київ – 2023 р.

НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Навчально-науковий інститут харчових технологій
Кафедра біотехнології продуктів бродіння та виноробства
Освітній ступень – «магістр»
Спеціальність – 181 «Харчові технології»
Освітня програма – «Технології продуктів бродіння і виноробства»

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувач кафедри біотехнології
продуктів бродіння та виноробства

_____Анатолій КУЦ

31 березня 2022 року

З А В Д А Н Н Я
НА КВАЛІФІКАЦІЙНУ РОБОТУ ЗДОБУВАЧУ

Оваденко Олені Рафіківні
(прізвище, ім'я, по-батькові)

1. Тема роботи Обґрунтування вибору рослинних фенольних екстрактів як антисептичної альтернативи діоксиду сірки в технології виноградних вин
Керівник роботи Білько Марина Володимирівна, д.т.н., професор
(прізвище, ім'я, по батькові, науковий ступінь, вчене звання)
затверджені наказом вищого навчального закладу від 31 жовтня 2022 року № 773-КС
2. Строк подання здобувачем роботи 01 лютого 2023 р.
3. Вихідні дані до роботи
1. Матеріали, зібрані під час переддипломної практики.
2. Методичні рекомендації до виконання кваліфікаційної роботи.
3. Проаналізувати існуючі антисептичні альтернативи діоксиду сірки у виноробстві.
4. Дослідити вплив фенольного препарату на сторонню мікрофлору вина.
4. Зміст пояснювальної записки (перелік питань, які потрібно розробити)
Титульна сторінка. Завдання на роботу. Анотація. Зміст. Перелік умовних позначень. Вступ. 1. Сучасні антимікробні альтернативи діоксиду сірки у виноробній промисловості (аналітичний огляд). 2. Матеріали, методи та методика досліджень. 3. Дослідження впливу фенольного препарату Estaan на мікроорганізми (експериментальна частина). 4. Оптимізація технологічних процесів. 5. Соціально-економічна ефективність роботи. 6. Охорона праці 7. Цивільний захист. Загальні висновки. Список використаної літератури. Додатки.

5. Перелік графічного матеріалу (з точним зазначенням обов'язкових креслень)
Таблиці з результатами досліджень — 3 шт.
Рисунки з результатами досліджень — 11 шт.

6. Консультація розділів кваліфікаційної роботи

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв

7. Дата видачі завдання 31 серпня 2022 року

КАЛЕНДАРНИЙ ПЛАН

№ з/п	Назва етапів кваліфікаційної роботи	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1.	Літературний пошук та підготовка аналітичного огляду за темою дослідження	13.10.22-29.10.22	Виконано
2.	Складання планів експериментів, організація робочого місця, підбір і опанування методики визначення показників та статистичної обробки отриманих результатів	30.10.22-04.11.22	Виконано
	1-а атестація	**05.11.2022**	
3.	Проаналізувати існуючі антисептичні альтернативи діоксиду сірки	05.11.22-27.11.22	Виконано
4.	Експериментальні дослідження	28.11.22-22.12.22	Виконано
	2-а атестація	**23.12.2022**	
5.	Підготовка розділу з цивільного захисту та погодження його з керівником	23.12.22-30.12.22	Виконано
6.	Підготовка розділу з охорони праці та погодження його з керівником	01.01.23-03.01.23	Виконано
7.	Оптимізація технологічних процесів	04.01.23-14.01.23	Виконано
8.	Розрахунок соціально-економічної ефективності роботи	14.01.23-24.01.23	Виконано
9.	Оформлення пояснювальної записки і презентації роботи	25.01.23-31.01.23	Виконано
10.	Подання роботи в комісію по перевірці на антиплагіат	01.02.23-05.02.23	Виконано
11.	Попередній розгляд роботи на кафедрі	06.02.23-10.02.23	Виконано
12.	Отримання зовнішньої рецензії і підготовка до захисту в ЕК	11.02.23-13.02.22	Виконано
13.	Захист роботи в ЕК	Згідно з графіком	

Здобувач Олена ОВАДЕНКО

Керівник роботи, професор Марина БІЛЬКО

АНОТАЦІЯ

Оваденко Олена Рафіківна «Обґрунтування вибору рослинних фенольних екстрактів як антисептичної альтернативи діоксиду сірки в технології виноградних вин». Кваліфікаційна робота на здобуття освітнього ступеня магістра за спеціальністю 181 «Харчові технології» за освітньою програмою «Технології продуктів бродіння і виноробства». Національний університет харчових технологій, Київ, 2023.

На сьогоднішній день все більше уваги приділяється зменшенню кількості найпоширенішого консерванту — діоксиду сірки — у виноробстві через негативні наслідки для здоров'я людини: алергічні реакції, головний біль, астму, нудоту, подразнення шлунку, а також можливі органолептичні зміни виноматеріалів і вина, що погіршує якість готової продукції.

Метою роботи є аналіз існуючих антимікробних хімічних і фізичних альтернатив, які використовуються або можуть бути використані у виноробній галузі на заміну діоксиду сірки.

У кваліфікаційній роботі досліджено ефективність впливу продукту із рослинних фенольних екстрактів *ESTAAN* компанії *Biolethics Europe* на сторонні мікроорганізми у вині, на прикладі *Brettanomyces spp*., а також вивчено його потенціал як антимікробної альтернативи діоксиду сірки.

За результатами проведених досліджень встановлено ефективність антимікробної дії препарату *ESTAAN*. Наведено соціальну ефективність заміни діоксиду сірки рослинним фенольним екстрактом, розглянуті заходи щодо забезпечення охорони праці та цивільного захисту населення.

Ключові слова: виноградні вина, діоксид сірки, антисептик, фенольні екстракти, альтернатива, Estaan.

ABSTRACT

Olena R. Ovadenko*, Substantiation of Choosing Plant Phenolic Extracts as Antiseptic Alternatives to Sulphur Dioxide in Grape Wine Technology*. Qualifying Thesis for the degree of Master in 'Food Technologies' (181) according to the Educational Program of 'Fermentation and Winemaking Technologies'. National University of Food Technologies, Kyiv, 2023.

Currently, more and more attention has been concentrated on reducing the amount of sulphur dioxide, the most employed preservative in the winemaking, because of its negative health consequences such as allergic reactions, headache, asthma, nausea, stomach irritation, as well as possible organoleptic alterations in wine, which deteriorate the finished product quality.

This master thesis was aimed at the analysis of antimicrobial chemical and physical alternatives that are now in use or can be possibly used in wine industry instead of sulphur dioxide.

In the process, the effect of *ESTAAN* (the product from plant phenolic extracts by *Biolethics Europe*) on undesirable microorganisms in wine, and also its potential use as an alternative to sulphur dioxide were studied by the example of *Brettanomyces spp*.

The experiments performed have shown the efficiency of the *ESTAAN* antimicrobial action. This master thesis brings up also the efficiency of the sulphur dioxide replacement with the plant phenolic extract, and considers the measures to ensure safety procedures and civil protection.

Key words: grape wines; sulphur dioxide; plant phenolic extracts; antimicrobial alternative; Estaan.

ABSTRACT

Olena R. Ovadenko, ***Begründung der Wahl von pflanzlichen Phenolextrakten als antiseptische Alternativen zu Schwefeldioxid in der Traubenwein-Technologie***. Master-Thesis für das Masterprogramm "Lebensmitteltechnologien" (181) gemäß dem Studienprogramm "Gärungs- und Weinbautechnologien". Nationale Universität für Lebensmitteltechnologie, Kiew, 2023.

Derzeit wird viel Aufmerksamkeit auf die Verringerung des Einsatzes von Schwefeldioxid gelenkt, dem am häufigsten verwendeten Konservierungsmittel bei der Weinherstellung. Grund dafür sind seine negativen gesundheitlichen Folgen wie allergische Reaktionen, Kopfschmerzen, Asthma, Übelkeit und Magenreizungen sowie mögliche organoleptische Veränderungen des Weins, die die Qualität des Endprodukts beeinträchtigen.

Das Ziel dieser Masterarbeit ist die Analyse der antimikrobiellen chemischen und physikalischen Alternativen, die derzeit in der Weinindustrie anstelle von Schwefeldioxid verwendet werden, oder möglicherweise verwendet werden können.

Die Effekte von ESTAAN (dem Produkt aus pflanzlichen Phenol-Extrakten von Biolethics Europe) auf unerwünschte Mikroorganismen im Wein und auch seine mögliche Verwendung als Alternative zu Schwefeldioxid wurden am Beispiel von Brettanomyces spp. untersucht.

Die Experimente zeigten die Effizienz der antimikrobiellen Wirkung von ESTAAN. In dieser Masterarbeit wird auch die Effizienz des pflanzlichen Phenol-Extrakts als Schwefeldioxid-Ersatz diskutiert, und es werden die Sicherheitsmaßnahmen und der Konsumentenschutz berücksichtigt.

Schlüsselwörter: Traubenwein; Schwefeldioxid; phenolische Pflanzenextrakte; antimikrobielle Alternative; Estaan.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ……8
ВСТУП……..9
1 СУЧАСНІ АНТИМІКРОБНІ АЛЬТЕРНАТИВИ ДІОКСИДУ СІРКИ У ВИНОРОБНІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ (аналітичний огляд)…….11
1.1 Загальна характеристика діоксиду сірки у виноробстві……11
1.2 Стороння мікрофлора виноматеріалів і вина……..13
1.2.1 Дріжджі роду *Brettanomyces*……13
1.2.2 Молочнокислі бактерії *Oenococcus oeni*……16
1.3 Хімічні альтернативи сульфітації……17
1.3.1 Диметилдикарбонат……..19
1.3.2 Лізоцим……..20
1.3.3 Хітозан……...21
1.3.4 Нізин……..22
1.4 Рослинні фенольні екстракти……22
1.5 Висновки з аналітичного огляду літератури, мета та задачі досліджень……26
2 МАТЕРІАЛИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ……28
2.1 Матеріали досліджень……...28
2.2 Методи досліджень……...29
2.3 Методика досліджень……...33
3 ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ФЕНОЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ ESTAAN НА МІКРООРГАНІЗМИ (експериментальна частина)…….38
3.1 Дослідження впливу Estaan на дріжджі роду *Brettanomyces*…….38
3.1.1 Результати попередніх випробувань із *Brettanomyces*……..….38
3.2.1 Результати основного експерименту з *Brettanomyces*……..….38
3.2 Дослідження впливу Estaan на молочнокислі бактерії *Oenococcus oeni*……43
3.3 Висновки……44
4 ОПТИМІЗАЦІЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ……..47
5 СОЦІАЛЬНО-ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ РОБОТИ……..51
6 ОХОРОНА ПРАЦІ…….53
7 ЦИВІЛЬНИЙ ЗАХИСТ……..56
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ……...60
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ……...61
ДОДАТКИ……..64

СЛОВА ПОДЯКИ

Хочу висловити щиру подяку німецькому університету Hochschule Geisenheim University за надання доступу до лабораторії, бібліотеки та репозитарію, до всіх ресурсів, необхідних для проведення експериментальних досліджень (виноматеріалів, фенольного препарату, культур мікроорганізмів, додаткових матеріалів, приладдя тощо), а також за підтримку на всіх етапах підготовки даної кваліфікаційної роботи.

Окрема подяка професору університету Гайзенхайму, доктору хімічних наук Андрію Тарасову за підтримку та створення необхідних умов, аспіранту Феліпе Боніх, у рамках дисертаційного проекту якого була проведена дана кваліфікаційна робота, а також Нілу ван Віку, науковцю-досліднику, за допомогу у проведенні всіх експериментів.

Також хочу подякувати Національному університету харчових технологій за надану можливість взяти участь у міжнародній програмі обміну студентів Еразмус+, під час якої було набуто нових знань та зібрано матеріали для написання кваліфікаційної роботи. Висловлюю особливу вдячність моєму науковому керівникові, професору, доктору технічних наук Білько Марині Володимирівні, завідувачу кафедри Біотехнології продуктів бродіння і виноробства, доценту, кандидату технічних наук Куцу Анатолію Михайловичу, а також заступнику директора з навчальної роботи Навчально-наукового інституту харчових технологій, доценту, кандидату технічних наук Карпович Інні Віталіївні за всебічну підтримку, професійну допомогу та розуміння.

Дуже дякую!

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

FTIR (Fourier-Transform Infrared Spectroscopy)— інфрачервона спектроскопія з перетворенням Фур'є

GCMS (Gas-chromatography Mass-spectrometry) — хромато-мас-спектометрія

HPLC (High-performance Liquid Chromatography) — рідинна хроматографія високого тиску

MRS (De Man, Rogosa and Sharpe Agar) — де Ман, Рогоза та Шарпе агаризоване середовище

OIV (International Organisation of Vine and Wine) — міжнародна організація винограду і вина

PBS (Phosphate Buffered Saline) — фізіологічний розчин з фосфатним буфером

YPD (Yeast Peptone Dextrose) — дріжджовий пептонно-декстрозний бульйон

ДМДК — диметилдикарбонат

ДСТУ — державний стандарт України

ЄС — Європейський Союз

КУО — колонієутворюючі одиниці

НХР — небезпечна хімічна речовина

ЯМБ — яблучно-молочне бродіння

ВСТУП

Діоксид сірки (SO_2) довгий час вважався найкращим консервантом у виноробній промисловості завдяки його здатності інгібувати розвиток сторонніх мікроорганізмів у суслі, виноматеріалах і вині, а також попереджати окиснення й уповільнювати ферментативні й неферментативні реакції потемніння. Знайти діоксид сірки можна в кожній пляшці вина, незалежно від країни-виробника та вартості продукту. Даний консервант задіяний на всіх етапах виноробства: обприскування виноградників, подрібнення ягід, бродіння сусла, обкурювання бочок та розлив по пляшках.

Актуальність обраної теми полягає в тому, що в останні роки все більше уваги приділяється зменшенню кількості SO_2 у вині через негативні наслідки для здоров'я людини. У споживачів, чутливих до консерванту, можуть виникати алергічні реакції, головний біль, астма, нудота, подразнення шлунку тощо. Більше того, високі дози діоксиду сірки можуть спричиняти органолептичні зміни виноматеріалів і вина, що погіршує якість готової продукції.

З мікробіологічної точки зору, діоксид сірки має лише вибірковий антимікробний ефект. Це означає, що деякі види мікроорганізмів є стійкими до дії SO_2 і можуть продовжувати розвиватися у виноматеріалах навіть після сульфітації, через що виноробам потрібно використовувати додаткові методи захисту, тим самим перенасичуючи вино хімічними сполуками.

З постійним збільшенням кількості питань, пов'язаних зі здоров'ям населення та поширенням здорового образу життя, споживачі все частіше надають перевагу продуктам, які не містять хімічні добавки. У результаті спостерігається тенденція до зменшення використання SO_2 у виноробстві, використання його в поєднанні з додатковими альтернативними методами або повна відмова від сульфітації.

Основною метою даної кваліфікаційної роботи є дослідження ефективності впливу продукту із рослинних фенольних екстрактів *ESTAAN* компанії «Biolethics Europe» на сторонні мікроорганізми у вині, на прикладі *Brettanomyces spp.* та *Oenococcus oeni*, а також вивчення потенціалу як антимікробної альтернативи діоксиду сірки. Оскільки даний продукт ще не є в повному комерційному використанні, дослідження із даної кваліфікаційної роботи є частиною великого проекту, мета якого — доведення ефективності продукту та (за умови позитивних результатів) подальшого впровадження його на ринок.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **завдання**:

- охарактеризувати діоксид сірки як антимікробний та антиоксидантний засіб захисту виноматеріалів;
- ознайомитися зі сторонніми мікроорганізмами вина на прикладі дріжджів *Brettanomyces* та молочнокислих бактерій *Oenococcus oeni,* їх кондиціями для розмноження та негативними наслідками для виноматеріалів;
- охарактеризувати хімічні та фізичні альтернативи діоксиду сірки;

- провести дослідження впливу препарату *ESTAAN* на вищеописані мікроорганізми;
- зробити відповідні висновки з досліджень та надати рекомендації;
- навести соціально-економічну ефективність впровадження даного продукту для використання у виноробній промисловості за умови позитивних результатів, а також умови охорони праці та цивільного захисту.

Предмет досліджень — технологія обробки виноматеріалів.

Об'єкт досліджень — антимікробні альтернативи діоксиду сірки: препарат *ESTAAN (Biolethics Europe, Нідерланди)* на основі рослинних екстрактів, які містять в собі фенольні сполуки; культури мікроорганізмів *Brettanomyces bruxellensis* та *Oenococcus oeni.*

Наукова новизна отриманих результатів. Доведено ефективність використання фенольного препарату *ESTAAN* як антисептичної альтернативи діоксиду сірки проти дріжджів роду *Brettanomyces* у виноробстві.

Практичне значення отриманих результатів полягає у розробленні рекомендацій щодо застосування препарату *ESTAAN* в технології виноградних вин на заміну сульфітації або зниження кількості діоксиду сірки.

Публікації.

1. Ovadenko O. R, Tarasov A., Bilko M. V. The Study of Organic Acid Effect on the Formation of Minerality Perception in White Wines. *XI Міжнародна науково-технічна конференція* від 8 листопада 2022 р. Київ: Нухт, 2022. С. 117-118.

2. Оваденко Е. Р., Билько М. В. Использование препаратов танина в технологии виноградных вин. *XI Международная конференция «Теоретические подходы фундаментальных наук. Теория, практика, перспективы»*, апрель 26-28, 2021, Женева, Швейцария. С. 255-257.

Обсяг і структура роботи. Дана кваліфікаційна робота викладена на 63 аркушах формату А4. Вона складається зі вступу, 7 розділів (аналітичного огляду, експериментальної частини та загальних висновків), містить 41 літературне джерело, 12 таблиць та 17 рисунків.

1 СУЧАСНІ АНТИМІКРОБНІ АЛЬТЕРНАТИВИ ДІОКСИДУ СІРКИ У ВИНОРОБНІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ (аналітичний огляд)

1.1 Загальна характеристика діоксиду сірки у виноробстві

Діоксид сірки — безбарвний газ неприємного запаху, який знайшов використання в харчовій промисловості як консервант для запобігання розмноження мікроорганізмів. Завдяки своїм антимікробним і антиоксидантним властивостям, SO_2 століттями використовується у виноробстві в якості універсальної ефективної добавки.

У виноробній промисловості діоксид сірки застосовують на всіх етапах виробництва: при зборі врожаю, пресуванні ягід, бродінні та розливу виноматеріалів по пляшках. Здебільшого, його використовують у вигляді рідини (5% об.), однак, у вині найчастіше зустрічаються сірковмісні солі, такі як метабісульфат натрію ($Na_2S_2O_5$), метабісульфат калію ($K_2S_2O_5$), бісульфат калію ($KHSO_3$), бісульфат натрію ($NaHSO_3$), бісульфат кальцію ($CaHSO_3$) і сульфат натрію (Na_2SO_3). При додаванні до вина, сульфідовмісні сполуки дисоціюють до сірчаної кислоти (H_2SO_3) і сульфід-іонів (HSO_3^-, SO_3^{2-}). Останні реагують із киснем.

Загалом, діоксид сірки — це газ, легко розчинний у воді з утворенням сульфітів. У водному розчині SO_2 називається молекулярним. Сульфіти реагують із цукрами, ацетальдегідом і фенольними сполуками, які містяться в суслі та вині. Таким чином, коли сульфіт реагує з іншою молекулою, стає частиною її структури, він більше не бере участі в рівноважній реакції та називається зв'язаним. У свою чергу, сульфіти, які беруть участь у рівноважній реакції, називаються вільними. Разом вільні та зв'язані сульфіти називаються загальним SO_2. Реакції хімічного перетворення діоксиду сірки наведені нижче:

$$H_2O + SO_2 \longleftrightarrow H^+ + HSO_3^- \longleftrightarrow 2H^+ + SO_3^-$$
$$2HSO_3^- + O_2 \longleftrightarrow 2H^+ + 2SO_4^{2-}$$

Антимікробну дію має лише вільна сірчиста кислота, яка називається активною. Вона дифундує в мікробну клітину, блокує ферменти, порушує обмін речовин, у результаті чого мікроорганізми клітини припиняють свою життєдіяльність. Таким чином, сірчиста кислота здатна пригнічувати життєдіяльність дріжджів, бактерій і плісняви [18].

Кількість активної сірчистої кислоти в продукті залежить від температури і pH. З підвищенням температури і зменшенням pH вміст активної сірчистої кислоти збільшується.

Загалом, бактерії стають неактивними в присутності SO_2 у кількості 40…50 мг/дм^3, у той час як винні дріжджі здатні витримувати до 150…400 мг/дм^3 SO_2. Верхня межа, дозволена Міжнародною організацією винограду та вина (OIV), знаходиться в діапазоні від 150 до 400 мг/дм^3 загального SO_2, залежно від типу вина та вмісту в ньому відновлювальних речовин.

Для порівняння, у табл. 1.1 наведена максимальна концентрація загальної сірчистої кислоти, дозволена державним стандартом України, Європейським союзом та Міжнародною організацією винограду та вина.

Таблиця 1.1 — Дозволені концентрації загальної сірчистої кислоти

Тип вина	Масова концентрація загальної сірчистої кислоти, мг/дм^3, не більше			
	Україна	ЄС	OIV	Органічні, натуральні вина
	ДСТУ 4806:2007 [29]; 4807:2007 [30]	Регулювання ЄС № 934/2019 [8]	Міжнародний кодекс енологічних практик (2019) [16]	Регулювання ЄС № 203/2012 [9]
1	2	3	4	5
Червоні вина:				
сухі	200	150	150	100
напівсухі	250	200	300	120
напівсолодкі	250	200	300	170
Білі та рожеві вина:				
сухі	200	200	200	150
напівсухі	250	250	300	170
напівсолодкі	250	250	300	220
Десертні та лікерні вина (білі, рожеві, червоні)	200	250	300	—
Ігристі вина	200	—	—	—
Особливі випадки (максимально дозволений вміст)	—	400	350	—

Згідно з ДСТУ 4806:2007 «Вина. Загальні технічні умови» [29], дозволена масова концентрація вільної сірчистої кислоти для столових сухих і кріплених вин становить 20 мг/дм^3, а для столових напівсухих і напівсолодких — 30 мг/дм^3.

Окрім тієї кількості діоксиду сірки, що додається, під час виготовлення виноматеріалів може утворюватися близько 10…50 мг/дм^3 за рахунок дріжджів. Однак, навіть із урахуванням цього, така концентрація SO_2 є недостатньою для деяких мікроорганізмів.

Незважаючи на усталені позитивні властивості діоксиду сірки, на сьогоднішній день є тенденція до зменшення його використання у виноробстві, аж до повної відмови. Насамперед, це питання важливе для виробників натуральних і органічних вин, оскільки вміст діоксиду сірки в таких винах і так повинен бути нижчим, ніж у звичайних (табл. 1.1). Крім того, в останні роки, з популяризацією здорового способу життя, почали говорити про негативні наслідки, які може мати SO_2 на життя і здоров’я споживачів: напади астми, алергічні реакції, головний біль тощо [1].

По-друге, перенавантаження виноматеріалів діоксидом сірки може негативно вплинути й на органолептичні властивості готової продукції: спричинити появу неприємного смаку та аромату або навіть виникнення певних дефектів чи втрату інтенсивності забарвлення.

По-третє, деякі мікроорганізми просто не чутливі до SO_2. Наприклад, дріжджі роду *Brettanomyces*, особливо *Brettanomyces bruxellensis*, мають здатність розвивати толерантність до діоксиду сірки. Крім того, не завжди дозволених концентрацій SO_2 може бути достатньо для пригнічення розвитку мікроорганізмів [3].

Отже, питання антимікробних альтернатив діоксиду сірки є вкрай важливим сьогодні.

1.2 Стороння мікрофлора виноматеріалів і вина

Вино — це багатокомпонентна жива система, саме тому необхідно ретельно стежити за процесом його виробництва. Будь-яка неточність (негерметичне обладнання, погано вимиті ємності, брудне приміщення або одяг персоналу) може призвести до псування кінцевого продукту. Як правило, це пов’язано зі сторонніми мікроорганізмами, які існують у повітрі, на стелі, підлозі та інших поверхнях. У рамках даної кваліфікаційної роботи сторонню мікрофлору вина буде розглянуто на прикладі дріжджів *Brettanomyces spp*. та молочнокислих бактерій *Oenococcus oeni*.

1.2.1 Дріжджі роду Brettanomyces

Найпоширенішою проблемою сучасних виноробень є присутність неспороутворюючих дріжджів роду *Brettanomyces* (у перекладі *Brettanomyces* означає «британський гриб»). Деякі винороби сходяться на думці, що присутність незначної кількості сполук, які виробляють *Brettanomyces*, може позитивно впливати на вино, сприяючи його комплексності та надаючи витриманий характер деяким молодим червоним винам. Однак, оскільки потенційно *Brettanomyces* можуть зіпсувати вино, їх зазвичай сприймають як такі, що викликають псування, а присутність у вині сполук, які вони продукують — як дефект вина.

Назва *Brettanomyces* найчастіше застосовується як синонім до *Dekkera*. Проте, між ними є різниця: за сучасною класифікацією, *Brettanomyces* описує рід дріжджів без спороутворення (анаморф), тоді як *Dekkera* відноситься до спороутворюючих дріжджів (телеморф). Однак у межах даної кваліфікаційної роботи різницею між цими двома термінами можна знехтувати.

Рід *Brettanomyces* налічує 6 видів, а саме: *B. anomalus, B. bruxellensis, B. custersianus, B. nanus, B. claussenii* та *B. naardenesis* [17].

На відміну від багатьох інших видів дріжджів, *Brettanomyces* є дуже стійкі до суворих умов, серед яких високий вміст спирту (14,5…15% об.), кисле середовище (pH 3), низький вміст азоту та цукру. Для деяких видів достатньо 300 мг цукру на $дм^3$ та менш ніж 6 мг азоту. Дріжджі *Brettanomyces* можуть рости за температури від 10 до 35 °C. Крім того, молоді аеробні культури виявляють негативний ефект Пастера [2]. Ефект Пастера передбачає, що за присутності

кисню дріжджі надають перевагу диханню, а не бродінню. Це вказує на значно сильнішу, на відміну від інших дріжджів, ферментативну здатність *Brettanomyces* в аеробних умовах, ніж в анаеробних.

Brettanomyces продукує велику різноманітність летких сполук: феноли, кислоти, складні ефіри, спирти. Коли вміст метаболітів цих сполук перевищує поріг сприйняття, вони негативно впливають на сенсорний профіль вина, надаючи неприємні присмаки, такі як «запах тварин», «скотний двір», «кінський піт», «ліки», «лак», «волога шкіра», «металік», «мишачий тон» тощо. Найпоширеніші сполуки, які можуть продукувати дріжджі роду *Brettanomyces*, а також їх сенсорні характеристики та порогові концентрації, за яких вони стають помітними, наведені в табл. 1.2.

Таблиця 1.2 — Сторонні запахи, які створюють дріжджі роду Brettanomyces у вині [5, 25]

Назва сполук	Органолептичні характеристики	Поріг виявлення (мкг/дм^3)
4-етилфенол	Шкіра, пластир	230…650
4-етилгваякол	Бекон, дим, ліки	33…135
4-етилкатехол	Кінський піт, дим	60…400
4-вінілфенол	Шкарлупа мигдалю	200
4-вінілгваякол	Квіти, спеції	300
4-вінілкатехол	Запах фенолів, ліки, дим	23…178
2-етилтетрагідропірідин, 2-ацетилтетрагідропірідин, 2-ацетилпіролін	Мишачий тон, крекери	—
Ізовалер’янова кислота	Прогірклий запах, запах сиру	1000…1500

У присутності вільного кисню повітря, *Brettanomyces spp*. виробляє велику кількість оцтової кислоти — від 1,4 до 8,4 г/дм^3, залежно від штамів [34] — та етанол. Так, *B. bruxellensis* може продукувати 4-вінілфенол і 4-етилфенол із р-кумарової кислоти, а також 4-вінілгваякол і 4-етилгваякол із ферулової кислоти (рис. 1.1).

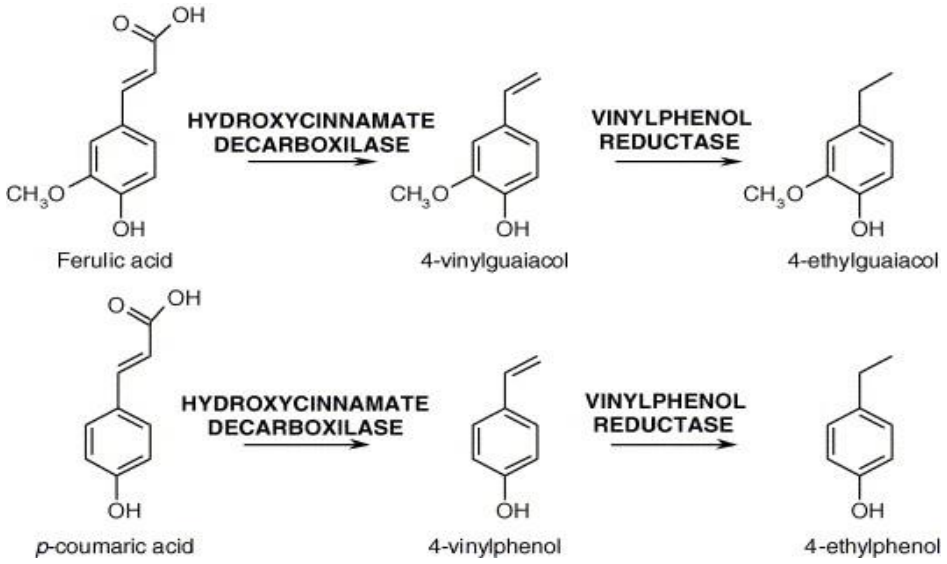


Рисунок 1.1 — Утворення 4-вінілфенолу, 4-вінігваяколу, 4-етилфенолу та 4-етилгваяколу з їх прекурсорів у вині [25]

Утворення летких фенолів у вині визначається наявністю прекурсорів і пропорційно розміру популяції *Brettanomyces*. Це більш суттєво при нижчому вмісті спирту (більше летких речовин утворюється при 12% об., ніж при 14% об.) і вищих температурах (більше утворюється за 18 °C, ніж за 13 °C) [26].

Частіше *Brettanomyces* зустрічається в червоних винах, витриманих в бочках, хоча нерідко зустрічається і в білих, як, наприклад, Шардоне або Совіньйон Блан. Крім того, *Brettanomyces* часто зустрічаються при традиційному способі виробництва ігристих вин.

Інші явища псування пов'язані з утворенням токсичних біогенних амінів, гідролізом антоціанів з подальшою втратою кольору вина, а також утворенням тетрагідропіридинів з лізину, оцтової кислоти, гваяколу та кількох етилових ефірів з коротколанцюгових жирних кислот [25].

Крім того, *Brettanomyces* мають властивість утворювати біоплівки, за допомогою яких клітини прикріплюються до неживих поверхонь, таких як пластик та нержавіюча сталь. Це дозволяє їм виживати навіть в умовах сильного стресу.

Дріжджі роду *Brettanomyces* можуть знаходитися в бочках на глибині до 8 мм, наприклад, навколо пробкових отворів, всередині пор дубу, у дріжджовому осаді тощо. Розвиток *Brettanomyces* в дубових бочках безпосередньо пов'язаний із віком бочки. Так, коли бочка зовсім нова, вона містить у вільному доступі багато вуглеводів та інших поживних речовин, необхідних для розмноження. Важливим фактором також є кисень, який відносно легко проникає крізь пори. З часом використання бочки, пори блокуються, тим самим зменшуючи надходження кисню та розвиток *Brettanomyces*. З іншого боку, популяції дріжджів, які залишаються всередині бочок досить довгий час, складно вилучити та усунути, а етилфіоли, що продукуються дріжджами, міцно прикріплюються всередині бочки.

Дубові бочки, заражені *B. bruxellensis*, неможливо ефективно стерилізувати. Будь-які спроби забезпечити стерилізацію шляхом ретельного

промивання та ополіскування сульфітованою водою, або випалювання та обробки озоном, зазнають невдачі.

Для санітарної обробки бочкової деревини потрібно щонайменше 7 г газу SO_2 на бочку. Наповнені винні бочки повинні отримувати 20–25 мг/дм^3 вільного SO_2 (30–35 мг/дм^3 у випадку спекотного літа). Крім того, для очищення бочок часто використовують озон, і у вигляді газу, і як водний розчин, що дозволяє глибоко видаляти *B. bruxellensis*. Теплова обробка також може допомогти їх позбутися, наприклад, 60 °C протягом 20 хвилин [26].

1.2.2 Молочнокислі бактерії Oenococcus oeni

Протягом останніх років молочнокислі бактерії все частіше використовуються для проведення яблучно-молочного бродіння (ЯМБ) через тенденцію до зменшення використання SO_2 та надання споживачами переваги винам із меншою кислотністю та більшою комплексністю.

Oenococcus oeni (стара назва *Leuconostoc oenos*) — це молочнокислі бактерії, які в природі зустрічаються у фруктових пюре та схожих із ними середовищах існування.

З трьох видів *Oenococcus* саме *O. oeni* асоціюється з вином. Вид *O. oeni* — це грампозитивні, нерухомі, хемоорганотрофні молочнокислі бактерії, еліпсоїдально-сферичні клітини яких зазвичай розташовані парами або короткими ланцюжками. Їх оптимальний діапазон росту становить від 20°C до 30°C і pH 4,8…5,5.

На відміну від багатьох інших бактерій, *Oenococcus oeni* може жити в середовищі як кисневому, так і безкисневому. Вона витримує кисле pH до 3 і вміст етанолу більше 13% об. [3].

Найбільш значущою властивістю *O. oeni* є здатність перетворювати малат на лактат (яблучно-молочне бродіння). Цей процес відомий як вторинне бродіння у виробництві вина, яке відбувається після (або іноді під час) первинного (спиртового) бродіння. ЯМБ передбачає поглинання малату та його декарбоксилювання до L-молочної кислоти і CO_2 (рис. 1.2).

Рисунок 1.2 — Хімічне перетворення яблучної кислоти на молочну під час яблучно-молочного бродіння

O. oeni є гетероферментативними, тобто здатними утворювати кілька кінцевих продуктів у результаті бродіння цукрів, а саме: вуглекислий газ, етанол і ацетат, а також характерні ароматичні молекули, такі як діацетил. Останній у невеликих кількостях надає вину позитивні нотки фундука та карамелі, однак, коли його вміст перевищує 5 мг/дм^3, створює маслянистий присмак, що

вважається недоліком. Залежно від штамів, *Oenoccocus oeni* може по-різному впливати на динаміку бродіння і якість готових виноматеріалів [3].

Також від *Oenococcus oeni* може залежати стабілізація готових виноматеріалів, оскільки вони використовують для свого росту поживні речовини вина, знижуючи, таким чином, потенційний ріст інших мікроорганізмів. Однак, не завжди ЯМБ може бути бажаним і корисним.

Здебільшого, ЯМБ проводять для червоних вин. Яблучна кислота, присутня у всіх виноматеріалах, надає їм різкого смаку, обумовлюючи так звану зелену кислотність. У результаті проведення ЯМБ, заміщення яблучної кислоти на менш агресивну молочну кислоту, а також завдяки виділенню молочнокислими бактеріями деяких полісахаридів, амінокислот, нуклеїнових кислот тощо, червоні вина стають більш округлими, м'якими, бархатистими та маслянистими. Єдиним недоліком проведення цього процесу для червоних вин є невелике зниження інтенсивності забарвлення через певне підвищення значення pH. У теплих регіонах і в роки низької кислотності червоних сортів винограду, ЯМБ є небажаним, і в такому випадку цей процес необхідно попереджати.

У білих винах ЯМБ, як правило, призводить до небажаних змін: втрачається свіжість та аромат, виноматеріали виходять невираженого смаку, а іноді мають навіть неприємний присмак молочної кислоти. ЯМБ проводять лише для деяких вин із південних регіонів, коли вміст яблучної кислоти набагато вищий за винну, і для тих виноматеріалів, які зброджують або витримують у бочках (наприклад, виноматеріали з сорту Шардоне).

При виготовленні вин із ароматичних сортів винограду, таких як Мускат, наприклад, рекомендується не проводити ЯМБ зовсім або проводити не до кінця, щоб зберегти частину яблучної кислоти незбродженою, оскільки після біологічного кислотопониження аромат сорту в букеті може послабитися або взагалі зникнути.

Однак, коли виноматеріали готуються в промислових масштабах, може початися розвиток небажаних молочнокислих бактерій в ході спиртового бродіння або після ЯМБ (навіть під час зберігання або витримки). Бактеріальний метаболізм може спричинити зміни складу вина, що, у свою чергу, може призвести до знецінення вина. Саме тому, загальноприйнятою практикою є сульфітація виноматеріалів після проведення ЯМБ, з метою мінімізації росту і метаболізму бактерій після повного розкладання яблучної кислоти. Активний механізм SO_2 впливає на мембрану *Oenococcus oeni* та викликає зниження активності АТФази [3].

1.3 Хімічні альтернативи сульфітації

Оскільки проблема заміни діоксиду сірки у вині не є новою, існує цілий ряд альтернатив, які можуть використовуватися замість сульфітації. Так, серед фізичних методів виділяють термічну обробку (пастеризація, стерилізація, заморожування), використання високого гідростатичного тиску, ультразвуку та ультрафіолетових випромінень, технології імпульсивного електричного поля.

Існує також ряд хімічних альтернатив SO_2, які можуть пригнічувати розвиток сторонніх мікроорганізмів. Так, у практиці виноробства вже впроваджено лізоцим (фермент з бактерицидними властивостями), диметилдикарбонат (хімічну добавка з антимікробною дією), хітозан (природний заряджений полісахарид) і нізин (бактеріоцин) [13]. Основні характеристики альтернативних методів, їх переваги та недоліки зведено в табл. 1.3.

Таблиця 1.3 — Хімічні та фізичні альтернативи сульфітації

Назва	Переваги	Недоліки	Додаткова інформація
1	2	3	4
Хімічні методи			
Лізоцим	• Інгібує активність молочнокислих бактерій; • Інактивує дріжджі; • Мікробіологічна стабілізація після ЯМБ	• Спричиняє алергічні реакції; • Не активний проти грам негативних бактерій (наприклад, оцтовокислих)	Білок, одержаний із яєчних білків
Хітозан	• Пригнічує дріжджі роду *Brettanomyces*	• Не запобігає розвитку бактерій	Доза в діапазоні від 10 до 500 г/дал
ДМДК	• Ефективніший за SO_2 проти дріжджів	• Не захищає від окиснення	До 200 мг/дм^3
Глутатіон	• Антиоксидант; • Захищає білі вина від потемніння та втрату сортових ароматів	• Не має антимікробного захисту	20 мг/дм^3
Фенольні сполуки	• Інгібують деякі штами молочнокислих бактерій	• Потемніння білих вин	—

Продовження табл. 1.3

1	2	3	4
Фізичні методи			
Термічна обробка	• Пригнічує небажані мікроорганізми та ферменти; • Можна поєднувати з іншими методами	• Може викликати зміни кольору, смаку, аромату та якості вина	Пастеризація, стерилізація, заморожування
Високий гідростатичний тиск	• Сильний антимікробний ефект на плісняву, дріжджі, оцтовокислі та молочнокислі бактерії	• Ще не використовувався у виноробній промисловості	200…800 МПа
Ультразвук	• Інактивує небажану мікрофлору без зміни кольору та смаку вина	• Необхідна інтенсивність та час обробки призводять до значного підвищення температури	20…100 кГц
Ультрафіолет	• Пригнічує мікроорганізми	• Може спричиняти зміну кольору; • Більш ефективний для білих вин	100…400 нм
Імпульсивне електричне поле	• Знищує мікроорганізми; • Зменшує час мацерації	• Низька інтенсивність кольору; • Зменшується кількість антоціанів	До 70 кВ/см

Однак, окрім того, що не всі фізичні способи обробки є доцільними й ефективними для виноробства, основний їх недолік — необхідність спеціального обладнання, переважно дорогого, що, відповідно, вимагає більших інвестицій та збільшує собівартість готового продукту. Основні ефекти хімічних альтернатив коротко описані нижче.

1.3.1 Диметилдикарбонат

Диметилдикарбонат [$(CH3OCO)_2O$] — хімічна добавка, що пригнічує розвиток мікроорганізмів, а також деякі ферменти (алкогольдегідрогеназу та гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу). На сьогоднішній день його широко використовують як консервант при виробництві продуктів харчування з антимікробною дією. Європейським Союзом і Сполученими Штатами Америки дозволено додавання ДМДК до виноматеріалів у кількості не більше 200 мг/дм^3.

Дослідження показують, що ДМДК є більш ефективним проти дріжджів, ніж діоксид сірки: при додаванні цієї сполуки дріжджові клітини гинуть, тоді як при сульфітації вони лише переходять у життєздатний стан без можливості культивування.

Ефективність ДМДК обернено залежить від pH, тобто чим нижчий pH, тим менше його потрібно для еквівалентної антимікробної дії.

При додаванні до виноматеріалів ДМДК здатний зупинити ріст *B. bruxellensis*, а також розвиток інших дріжджів (*Saccharomyces cerevisiae, Candida guilliermondii, Brettanomyces intermedius, Pichia membranaefaciens, Saccharomyces bayanus* і *Saccharomyces uvarum*) при концентрації від 250 до 400 мг/дм^3. Мінімальна інгібуюча концентрація для найбільш чутливих штамів (*Zygosaccharomyces bailii, Zygoascus hellenicus* і *Lachancea thermotolerans*) становить 25 мг/дм^3.

Проте, щодо бактерій, ДМДК менш ефективний, ніж SO_2. Саме тому у практиці виноробства законодавчо допустима максимальна доза ДМДК є ефективною для контролю низького рівня забруднення дріжджами, але не ефективною проти молочнокислих та оцтовокислих бактерій. Крім того, ДМДК є відносно токсичним через присутність метил-групи і важко піддається обробці, а його антимікробна дія є тимчасовою [18].

Більше того, як і у випадку з фізичними альтернативами діоксиду сірки, для дозування ДМДК у виноматеріали необхідне спеціальне обладнання, що потребує додаткових вкладень і певних навичок використання.

1.3.2 Лізоцим

Лізоцим — це фермент, одержаний із яєчного білка, він також міститься в молоці, сльозах і слині ссавців. Лізоцим гідролізує пептидоглікан, що призводить до лізису клітин ряду бактерій. Відомо, що більшість грампозитивних бактерій особливо чутливі до лізоциму, хоча й серед грамнегативних деякі теж чутливі до цього ферменту. Складна структура зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій часто захищає шар пептидоглікану від активності лізоциму. Додавання лізоциму для контролю бактеріальних популяцій є особливо цінним у харчовій промисловості та виробництві напоїв [19].

У виноробстві лізоцим можна використовувати для профілактики мікробного псування грампозитивними бактеріями, щоб затримати ЯМБ або відкласти сульфітацію по його завершенню.

Лізоцим активний в діапазоні pH від 2,8 до 4,2. У вині він може пригнічувати розвиток різних мікроорганізмів, зокрема деяких видів молочнокислих бактерій.

Комбінована антибактеріальна система на основі лізоциму може бути застосована для стабілізації вина при старінні, для зниження вмісту SO_2, а також для ефективної профілактики забруднення молочнокислими бактеріями.

Лізоцим зазвичай діє протягом 1-3 днів, але не забезпечує тривалого захисту червоних вин. У білих винах, навпаки, лізоцим залишається активним до шести місяців. При цьому дуже важливо стежити за масовою часткою летких кислот і наявністю сторонніх мікроорганізмів [20].

Додавання лізоциму разом із фенольними сполуками під час бродіння може бути перспективною альтернативою використанню сульфітації, яка забезпечить виробництво вин із низьким вмістом SO_2. А у поєднанні з ДМДК і діоксидом сірки лізоцим є корисним для утворення летких сполук вина [18].

Однак існує два основних недоліки щодо використання лізоциму. По-перше, він дорогий і тому мало використовується у виноробстві. По-друге, і це більш важливо, у людей, схильних до алергії, цей білок може викликати певні імунні реакції. Саме тому про використання лізоциму має бути зазначено на етикетках. І, нарешті, існують деякі проблеми, пов'язані з нестабільністю лізоциму у вині.

Зрештою, лізоцим не може замінити SO_2, тому що він ефективно атакує лише *O. Oeni*, залишаючись абсолютно неефективним проти інших важливих шкідливих мікроорганізмів, таких як *L. hilgardii, P. pentosaceus, Acetobacter* або *Brettanomyces* [10].

1.3.3 Хітозан

Хітозан є природним полісахаридом, який утворюється шляхом деацетилювання хітину [полі-β-(1 → 4)-N-ацетил-D-глюкозамін] у лужних умовах. Існують численні варіації хітозану через відмінності в деацетилюванні, молекулярній масі, характеристиках і активності. Він схвалений європейськими органами влади та Міжнародною організацією винограду та вина (OIV) для використання як освітлювач, а також антимікробний засіб.

Незважаючи на те, що хітозан нерозчинний у вині (або воді), тільки грибковий хітозан і хітин-глюкан (з *Aspergillus niger*) дозволені у виноробстві, задля запобігання будь-яким алергічним реакціям, викликаним домішками від переробленого матеріалу ракоподібних.

Грибковий хітозан можна використовувати для багатьох цілей у виноробстві, зокрема для пригнічення розвитку шкідливих мікроорганізмів, таких як *Brettanomyces*. Він також знижує вміст окислених поліфенольних сполук у суслі та виноматеріалах.

Завдяки своїм антибактеріальним властивостям, хітозан привернув велику увагу в харчовому та винному секторі. Гіпотетично антимікробні механізми хітозану включають зміну проникності клітини, спричинену електростатичною взаємодією між позитивно зарядженими молекулами хітозану та негативно зарядженими молекулами клітинних мембран мікроорганізмів (що викликає витік компонентів цитоплазми). Інші механізми включають взаємодію між продуктами гідролізу та мікробною ДНК (що спричиняє інгібування мРНК), а

також синтез білка, на додаток до хелатування металів, спорових елементів і основних поживних речовин.

При використанні від 20 до 50 г/гал (з мінімальним часом контакту 10 днів) хітозан (і хітин-глюкан) різко знижує популяцію бактерій і запобігає росту останніх у виноматеріалах, особливо після ЯМБ, виступаючи, таким чином, альтернативою для лізоциму та/або великої кількості SO_2.

Хітозан може знижувати метаболічну активність оцтовокислих бактерій так само, як і SO_2. У виробництві білих вин можливе використання плівок хітозан-геніпін. У цьому випадку вина будуть менш схильні до потемніння через утворення комплексу залізо-тартрат-хітозан, що пригнічує реакції окислення, а також ріст мікробів [18].

1.3.4 Нізин

Нізин — це 35-мерний бактеріоцин групи лантибіотиків, використання якого як харчового консерванту схвалено Європейським Союзом (номер харчової добавки E234, EEC, 1983) та Об'єднаною продовольчою та сільськогосподарською організацією/Всесвітньою організацією охорони здоров'я.

Нізин виявляє пригнічувальну дію на ріст патогенних бактерій *Listeria, Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus, Bacillus, Salmonella, Clostridium spores, Pseudomonas* та *Escherichia coli*. Він також може зменшувати здатність *O. oeni* та *L. mesenteroides* утворювати свої біоплівки.

Крім того, чутливими до нізину є молочнокислі бактерії. При додаванні під час бродіння він здатний вбити небажані бактерії, при цьому не впливаючи на сам процес бродіння.

Відповідні комбінації нізину та метабісульфіту можуть контролювати ріст бактерій, що псують вино, дозволяючи, таким чином, знизити рівні діоксиду сірки.

Також слід зазначити, що нізин — єдиний бактеріоцин, який можливо отримати комерційно, але, незважаючи на доведену ефективність у пригніченні росту бактерій у винах, він поки не є офіційно дозволеним для використання у виноробстві [23].

1.4 Рослинні фенольні екстракти

На сьогоднішній день популярною альтернативою сульфітам є використання фенольних сполук, що мають антимікробну активність і природно зустрічаються у винограді чи інших рослинах, таких як розмарин, какао, оливкова олія, журавлина, чорниця, цибуля, часник, манго [4].

Рослинні фенольні сполуки можуть діяти як антиоксиданти, структурні полімери (лігнін), атрактанти (флавоноїди та каротиноїди), сигнальні сполуки (саліцилова кислота та флавоноїди) та хімічні речовини захисної реакції (таніни та фітоалексини), а також поглинати ультрафіолетове випромінювання (флавоноїди). З фізіологічної точки зору фенольні сполуки є життєво важливими для захисних реакцій, таких як антистаріння, протизапальна, антиоксидантна та

антипроліферативна дія. Крім того, найважливішою функцією фенольних сполук є ефективний захист рослин від стресу.

До фенолів відносяться сполуки, молекули яких містять хоча б одне ароматичне кільце, до якого прикріплені одна або декілька гідроксильних груп. Відомо понад 10000 різноманітних структур фенольних сполук. Як правило, їх поділяють на групу флавоноїдів та не-флавоноїдів.

Флавоноїди відносяться до гетероароматичних сполук і є продуктами вторинного метаболізму рослинних тканин. Фенольний каркас їх молекул містить 15 атомів карбону, які формуюють два ароматичних кільця (А та В), з'єднані через три атоми карбону. Загальна формула флавоноїдів є наступною: C_6-C_3-C_6. Усі флавоноїди, що містяться у винограді та вині, мають гідроксильну групу в положенні 5 і 7 кільця А. Антиоксидантна дія флавоноїдів залежить, головним чином, від їх здатності відновлювати вільні радикали та зв'язувати молекули металів (Cu та Zn), запобігаючи каталітичним реакціям вільних радикалів.

Залежно від наявності або відсутності карбонільної групи, подвійного зв'язка, кількості й положення гідроксильних груп, а також за характером приєднання кільця, флавоноїди підрозділяють на підкласи, основними з яких є флавони та їх похідні флавоноли, дегідрофлавоноли, флаванони, дегідрофлаванони, флавани, халкони, катехіни, антоціани (рис. 1.3) [40].

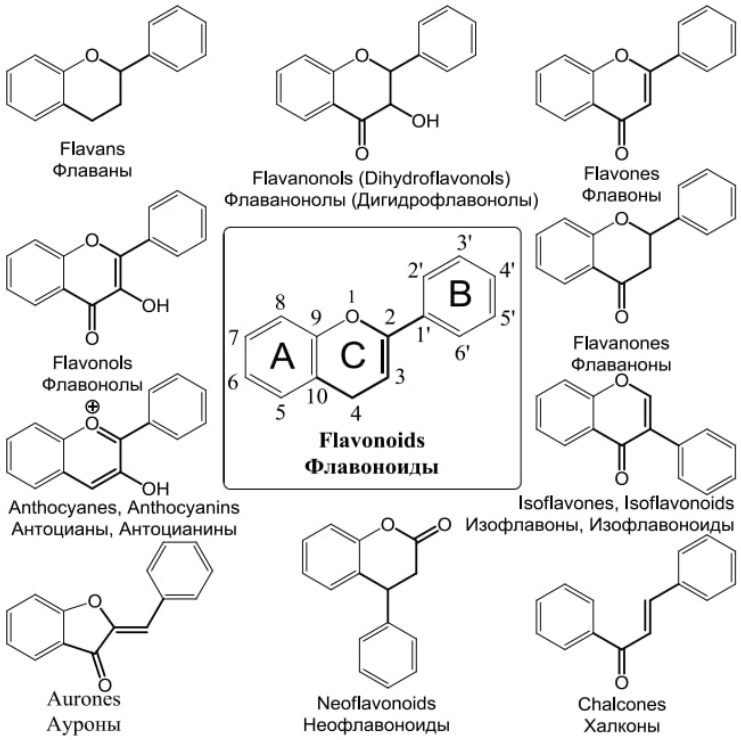


Рисунок 1.3 — Класифікація флавоноїдів [40]

Не-флавоноїди утворюють велике сімейство поліфенолів, які зазвичай мають простішу структуру, ніж флавоноїди. Вони, в основному, складаються з фенольних кислот (гідроксибензойної та гідроксикоричної) і стильбенів. У червоних винах їх концентрації досягають від 60 до 566 мг/дм^3 [12].

Кількість та тип поліфенольних сполук у винограді та виноматеріалах залежить від цілого ряду факторів, включаючи сорт, тривалість і температуру мацерації, бродіння сусла разом із шкіркою або без (для червоних вин), пресування, додавання ферментів, масової концентрації діоксиду сірки тощо. Загальний вміст поліфенолів становить близько 150…400 мг/дм^3 для білих вин і 900…1400 мг/дм^3 для молодих червоних вин [27].

Збільшити вміст поліфенолів у виноматеріалах і вині можна природним шляхом, однак, це не завжди є виправданим. Наприклад, певна кількість фенольних сполук міститься в гребнях, і якщо переробляти грона винограду не відокремлюючи гребені, вміст фенолів у суслі збільшується. Проте, для білих вин такий прийом загрожує появою гіркоти та терпкістю в смаку. Крім того, фенольні сполуки являються субстратами окиснення, що означає, чим більше їх, тим активніше проходитиме окиснення та потемніння білих виноматеріалів. У червоних винах надмірний вміст фенольних сполук також призводить до терпкості та гіркоти.

Основні поліфеноли та їх вміст у виноматеріалах наведені в табл. 1.4.

Таблиця 1.4 — Діапазон концентрацій фенольних сполук у білих і червоних виноматеріалах [14]

Назва фенольної сполуки	Вміст у виноматеріалах (мг/дм^3)
Конденсовані таніни	1200…3300
Антоціани	90…700
Флаваноли	15…25 (молоді білі); 4…120 (молоді червоні)
Флавоноли	до 60
Флавони	0,2…1,0
Гідроксибензойна кислота	до 218 (червоні)
Гідроксикорична кислота	до 130 (червоні); до 60 (білі)
Тирозол	до 45 (білі); 20…60 (червоні)
Гідролізовані таніни	0,4…50
Стільбени	0…5

Багато фенольних сполук полімеризуються у великі молекули – таніни, які, у свою чергу, поділяються на конденсовані, гідролізовані та комплексні.

Гідролізовані таніни являють собою складні ефіри фенілкарбонових кислот із вуглеводним залишком, які, в умовах кислотного або екзоматичного (таназою) гідролізу, розкладаються на вуглеводи та фенолкислоти. Їх підрозділяють на наступні групи:

- Галотаніни — ефіри галової кислоти;
- Несахаридні ефіри галової кислоти — ефіри хінної та оксикоричної кислоти з флаванами;

- Елаготаніни — при своєму гідролізі вони відщеплюють елагову кислоту.

Конденсовані таніни, головним чином, утворюються лише з фенолів флаванового типу. Їх часто називають флаволанами. Вони не розпадаються під дією кислот, а лише утворюють продукти конденсату — флобафени.

На відміну від гідролізованих танінів, конденсовані ніколи не містять залишки цукрів. Утворення конденсованих танінів відбувається як у самій рослині в процесі біосинтезу, так і в процесі технологічної обробки. Джерелом цих речовин є деревина дубу, каштану, кора хвойних дерев, верби тощо.

Гідролізовані таніни не такі важливі у виноматеріалах, частіше за все вони переходять із дубових бочок, в яких проходить бродіння та/або витримка. Конденсовані ж таніни є основними танінами винограду.

Під час витримки та зберігання виноматеріалів як гідролізовані, так і конденсовані таніни полімеризуються у великі високомолекулярні комплексні таніни, які зв'язуються з антоціанами та осаджуються у вигляді комплексів танін-антоціанін, що згодом призводить до освітлення та зменшення гіркоти вина. Ця реакція та осадження відбуваються протягом тривалого періоду часу залежно від хімічного складу вина та умов зберігання.

Загалом, таніни утворюють міцні комплекси з алкалоїдами, деякими білками та поліпептидами, а також солями різних металів. Вони реагують із полісахаридними колоїдами, частково гальмують активність окислювальних ферментів, зв'язуючи білкову частину їх молекули.

На відміну від SO_2, фенольні сполуки є відносно безпечними, вони не мають видимого негативного ефекту. Більш того, вважається, що на здоров'я людини вони впливають позитивно, надаючи антиоксидантну, протизапальну, антиканцерогенну, протидіабетичну, кардіопротекторну та гіполіпідемічну дії.

У вині фенольні сполуки відіграють важливу роль для органолептичних властивостей, таких як колір, терпкість і гіркота тощо.

Експериментально доведено, що більшість фенольних кислот (зокрема гідроксикоричних) підвищують проникність клітинної мембрани бактерій. Крім того, в ряді досліджень було показано, що фенольні сполуки, виявлені в природних екстрактах з виноградних кісточок і лушпиння, мають високу антимікробну активність проти патогенних бактерій. Вони можуть впливати на ріст і метаболізм бактерій, активуючи або пригнічуючи їх ріст, залежно від складу та концентрації [22].

Бактеріостатична та бактерицидна дії поліфенолів пов'язані з їх впливом на клітинні мембрани, що призводить до порушення мембранної структури, виділення калію та лізису клітин. Деякі флавоноїди можуть специфічно взаємодіяти з білками бактеріальних клітин, порушуючи їх функціонування. Поліфеноли здатні втручатися в роботу генетичного апарату бактеріальних клітин. Загалом, антибактеріальна дія поліфенолів реалізується через пригнічення функцій цитоплазматичної мембрани, уповільнення синтезу нуклеїнових кислот і перешкоджання енергетичному обміну, що веде до витоку

компонентів бактеріальної клітини, таких як білки, нуклеїнові кислоти та неорганічні іони [7].

Однак, інгібуюча дія фенольних сполук вина проявляється вибірково і залежить від виду бактерій. Наприклад, поліфеноли можуть пригнічувати ріст молочнокислих бактерій, таких як *O. oeni, P. pentosaceus* та *L. hilgardii*. Це зумовлено їх складом (гідроксибензойна та гідроксикорична кислоти, фенольні спирти, стильбени, флаван-3-оли та флавоноли) [10].

Деякі фенольні речовини можуть впливати на ріст бактерій як позитивно, так і негативно. Так, експериментально показано, що кавова кислота в концентрації 50–150 мг/дм^3 підтримує ріст і деградацію яблучної кислоти у вині Мерло, ферулова кислота є інгібіторною; тоді як кумарова кислота має ще більший негативний вплив. У тому ж дослідженні фенольні речовини з виноградних кісточок пригнічували ріст молочнокислих бактерій [12].

Однак фенольні кислоти, які містяться, в основному, у фенольних екстрактах, є більш активним проти бактерій, ніж проти дріжджів, що свідчить про сильнішу стійкість дріжджів до дії цих сполук.

Загалом, антимікробний ефект поліфенольних сполук проявляється при більш високих дозах, ніж ті, які зазвичай містяться у винах. З іншого боку, антимікробна активність фенолів може підвищуватися через синергічний ефект між ними або з іншими антимікробними агентами, такими як SO_2, що дозволяє зменшити дозу кожного з них.

Додавання фенольних екстрактів також може бути ефективним для збереження білих вин під час їх витримки в бочках, сприяючи зменшенню кількісті доданого SO_2.

1.5 Висновки з аналітичного огляду літератури, мета і задачі дослідження

Отже, після огляду літератури стало очевидно, що у виноробній промисловості з’явилась тенденція до зменшення використання або навіть повної відмови від діоксиду сірки, який століттями використовували винороби в якості універсальної ефективної добавки завдяки його антимікробним і антиоксидантним властивостям.

На сьогоднішній день існує ціла низка альтернатив, які можуть використовуватися замість сульфітації. Це фізичні методи (термічна обробка, використання високого гідростатичного тиску та ультразвуку, ультрафіолетового випромінення і імпульсивного електричного поля), а також ряд хімічних альтернатив: лізоцим (фермент з бактерицидними властивостями), диметилдикарбонат (хімічна добавку з антимікробною дією), хітозан (природний заряджений полісахарид) і нізин (бактеріоцин).

З популяризацією здорового способу життя, споживачі все більше надають перевагу натуральним і органічним продуктам, корисним для здоров’я людини.

У цьому контексті здається актуальним і своєчасним використання фенольних сполук, що мають антимікробну активність і природно зустрічаються у винограді чи інших рослинах. На відміну від SO_2, фенольні сполуки є відносно безпечними. Більш того, вважається, що на здоров’я людини вони впливають

позитивно. У вині ж, фенольні сполуки відіграють важливу роль для органолептичних властивостей, таких як колір, терпкість і гіркота тощо.

Метою даної кваліфікаційної роботи є дослідження ефективності впливу продукту із рослинних фенольних екстрактів *ESTAAN* компанії «Biolethics Europe» на сторонні мікроорганізми у вині, на прикладі *Brettanomyces spp*. та *Oenococcus oeni*, а також вивчення потенціалу як антимікробної альтернативи діоксиду сірки.

Серед *задач* роботи:

- охарактеризувати діоксид сірки як антимікробний та антиоксидантний засіб захисту виноматеріалів;
- ознайомитися зі сторонніми мікроорганізмами вина на прикладі дріжджів *Brettanomyces* та молочнокислих бактерій *Oenococcus oeni,* їх кондиціями для розмноження та негативними наслідками для виноматеріалів;
- охарактеризувати хімічні та фізичні альтернативи діоксиду сірки;
- провести дослідження впливу препарату *ESTAAN* на вищеописані мікроорганізми;
- зробити відповідні висновки з досліджень та надати рекомендації;
- навести соціально-економічну ефективність впровадження даного продукту для використання у виноробній промисловості за умови позитивних результатів, а також умови охорони праці та цивільного захисту.

2 МАТЕРІАЛИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали досліджень

2.1.1 Виноматеріали

Для експериментів використовувалися червоні сухі виноматеріали сорту Мерло, виготовлені у виноробні університету Гайзенхайму (Hochschule Geisenheim University), фізико-хімічні характеристики, якісний та кількісний склад ароматутворювальних сполук наведено в табл. 2.1.

Таблиця 2.1 — Фізико-хімічні характеристики, якісний та кількісний склад ароматутворювальних сполук виноматеріалу із винограду сорту Мерло

Назва показника	Розмірність	Значення
1	2	3
Об'ємна частка етилового спирту	%	13,2
Щільність	20/20	0,9940
Масова концентрація залишкових цукрів, у т.ч. глюкози фруктози	г/дм^3	0,3 0,0 0,3
Масова концентрація приведеного екстракту	г/дм^3	29,6
pH	г/дм^3	3,5
Загальна кислотність	г/дм^3	6,5
Масова концентрація винної кислоти	г/дм^3	3,2
Масова концентрація яблучної кислоти	г/дм^3	2,1
Масова концентрація молочної кислоти	г/дм^3	0,7
Масова концентрація сірчистої кислоти, у т. ч.: вільної загальної	мг/дм^3	 8,0 2,0
Масова концентрація летких кислот, у т. ч.: Етилацетат Ізобутанол Етилпропіонат 3-Метил-бутанол 2-Метил-бутанол Ізометилбутират Етилбутират	г/дм^3 мг/дм^3 мг/дм^3 мкг/дм^3 мг/дм^3 мг/дм^3 мкг/дм^3 мкг/дм^3	13,2 82 99 260 503 148 48 221

Закінчення табл. 2.1

1	2	3
Етиллактат	мг/дм^3	37
Ізовалер'янова кислота	мкг/дм^3	1857
Гексанол	мкг/дм^3	1404
3-Метилбутиловий естер оцтової кислоти	мкг/дм^3	1185
2-Метилбутиловий естер оцтової кислоти	мкг/дм^3	237
Капронова кислота	мг/дм^3	5
Етиловий естер капронової кислоти	мкг/дм^3	164
2-Фенілетиловий спирт	мг/дм^3	93
Каприлова кислота	мг/дм^3	3
Діетиловий естер бурштинової кислоти	мкг/дм^3	736
Фенілетиловий естер оцтової кислоти	мкг/дм^3	74
Капринова кислота	мкг/дм^3	1508
Етиловий естер капринової кислоти	мкг/дм^3	4

2.1.2 Препарат Estaan

Estaan — рослинний препарат, який є розробкою нідерландської компанії *«Biolethics Europe»* і складається з екстрактів розмарину лікувального (Rosmarinus officinalis), чорниці звичайної (Vaccinium myrtillus), шовковиці білої (Morus alba), Melissa officinalis (меліси лікувальної), ананасу звичайного (Ananas comosus), манга індійського (Manfigera indica), гранату звичайного (Punica granatum), сливи домашньої (Prunus domestica), плодів годжі (дерези китайської) (Lycium chinense fructus) та рути духмяної. Оскільки цей продукт ще не є комерційним, його фенольний склад тримається в таємниці [11].

2.1.3 Культури мікроорганізмів Brettanomyces bruxellensis та Oenococcus oeni

Для проведення експериментів використовувалися дві культури мікроорганізмів: дріжджі роду *Brettanomyces bruxellensis* раси 21B37 та молочнокислі бактерії *Oenococcus oeni* компанії *MaloStar Vitale SK11*.

2.2 Методи досліджень

Для аналізу ефективності дії продукту з фенольних екстрактів *Estaan* використовувалися мікробіологічні методи дослідження: інокуляція виноматеріалів підготовленими культурами, посів інокульованих виноматеріалів на тверді поживні середовища в чашки Петрі, їх витримка та підрахунок колоній.

Для інокуляції у попередньо простерилізовані виноматеріали із глюкозно-фруктозною сумішшю додавали стерильні дубові щепки. Це дало змогу створити подобу дубових бочок, у яких, як правило, витримуються виноматеріали і проводиться ЯМБ, а також які найбільше схильні до зараження мікроорганізмами, особливо дріжджами роду *Brettanomyces*, та у яких можуть залишатися молочнокислі бактерії після проведення ЯМБ. Витримувалися інокульовані виноматеріали у звичайному світлому приміщенні за кімнатної

температури в колбах, заповнених на половину та закритих пробками для бродіння. Висівання всіх матеріалів проводилося на тверді поживні середовища в чашки Петрі за асептичних умов (в ламінарних боксах) з використанням лише стерильних приладів та устаткувань (колб, піпеток, циліндрів тощо).

Для підрахунку мікроорганізмів використовувалися методи, суть яких наведена нижче [28].

Визначення кількості клітин шляхом висівання на тверді поживні середовища (чашковий метод Коха). В основі метода полягає принцип Коха, згідно якого кожна колонія є потомством однієї клітини. Це дозволяє робити судження про вміст клітин мікроорганізмів у досліджуваному розчині, ґрунтуючись на кількості колоній, які виросли після посіву на поживне середовище. Результати кількісного підрахунку мікроорганізмів виражають в умовних одиницях — колонієутворюючих одиницях (КУО). Визначення кількості мікроорганізмів даним методом включає в себе три етапи: приготування розведень, посів на тверде середовище в чашки Петрі та підрахунок колоній, які виросли.

Численність популяції мікроорганізмів, як правило, велика, тому для отримання ізольованих колоній необхідно підготувати ряд послідовних розведень. Розведення готують у стерильній водопровідній воді, рідкому поживному середовищі або 0,9%-м розчині NaCl (фізіологічному розчині). У межах експерименту даної кваліфікаційної роботи використовувався останній.

Для приготування розведень стерильний фізіологічний розчин розливають по 9 $см^3$ у стерильні сухі пробірки. Після цього 1 $см^3$ досліджуваного розчину стерильною піпеткою переносять у пробірку з 9 $см^3$ фізичного розчину — це перше розведення (10^2). Отримане розведення ретельно перемішують, а далі новою стерильною піпеткою переносять у наступну пробірку, одержуючи друге розведення (10^3) і так далі. Ступінь розведення залежить від щільності досліджуваної популяції мікроорганізмів, відповідно, він тим більший, чим більша щільність популяції.

Перед посівом поживне середовище, попередньо підготовлене та агаризоване, розливають у ряд стерильних чашок Петрі по 15-20 $см^3$ у кожну. Чашки залишають на горизонтальній поверхні, поки середовище не застигне. Після того, як середовище готове до використання, на його поверхню наносять точно виміряний об'єм (0,1 або 0,05 $см^3$) відповідного розведення та рівномірно розподіляють по поверхні середовища. Потім чашки Петрі інкубують за оптимальної температури (25 °С) до проростання колоній (від 1 до 15 діб).

Підрахунок, як правило, проводять не відкриваючи чашки Петрі. Для зручності кожну підраховану колонію помічають точкою на зовнішній стороні чашки. Результати враховують на тих чашках Петрі, де виросло не менше 30 колоній.

Метод Горяєва-Тома. Підрахунок загальної кількості клітин дріжджів проводиться під мікроскопом у камері Горяєва. Вона складається з товстого предметного скла із нанесеними на нього поперечними прорізами, які утворюють три плоскі площадки. Середня площадка поздовжнім прорізом

розділена на дві, кожна з яких має вигравірувану на ній сітку. Сітка містить 225 великих квадратів, розграфлених вертикально і горизонтально, а також не розграфлених.

Покривне скло камери Горяєва притирають до камери. Готують дріжджову суспензію, додаючи 1 краплю 0,9 %-го фізичного розчину, після чого стерильною піпеткою вносять під покривне скло та мікроскопують. Підраховують кількість клітин у 5-10 великих квадратах сітки з об'єктивом збільшення в 8 або 40 разів. Кількість клітин дріжджів підраховують у випадкових квадратах, не розміщених поряд один із одним. Враховують усі клітини, які лежать у квадраті сітки, а також ті, що пересікають верхню та праву сторони квадрату. Для отримання достовірного результату загальна кількість підрахованих клітин мікроорганізмів повинна бути не менше 600.

Число клітин у 1 см^3 вихідного розчину розраховують за формулою 1.1:

$$M = \frac{A \cdot V}{HS} \cdot N, \qquad (1.1)$$

де A — середня кількість клітин у квадратах;

V — об'єм вихідного розчину = 1000 мм^3;

H — глибина камери = 0,1 мм;

S — площа квадрату сітки = 0,04 мм^2;

N — розбавлення вихідного розчину.

Для аналізу виноматеріалів використовували:

- інфрачервону спектроскопію з перетворенням Фур'є (FTIR);
- рідинну хроматографію високого тиску (HPLC);
- хромато-мас-спектрометрію (GCMS).

Для математичної оцінки результатів експерименту використовували дисперсійний аналіз.

Загальна схема досліджень наведена на рис. 2.1.

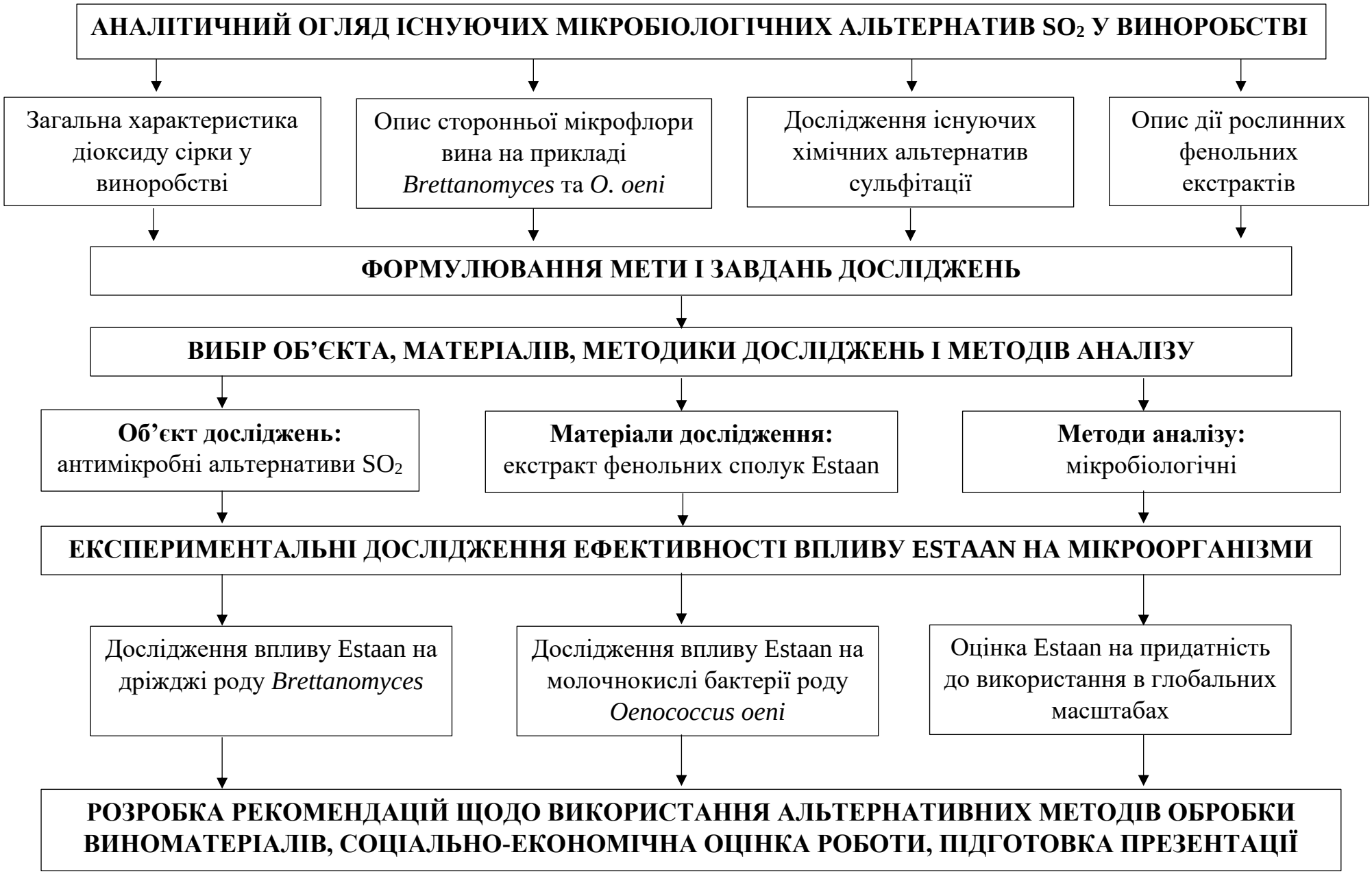


Рисунок 2.1 — Загальна схема досліджень

2.3 Методика досліджень

2.3.1 Підготовка матеріалів

На підготовчому етапі було проведено стерильну фільтрацію та пастеризацію виноматеріалів для запобігання забрудненню будь-якими сторонніми мікроорганізмами, які могли б завадити експерименту.

Для розмноження дріжджів використовувалося середовище YPD, склад якого наведено в табл. 2.2.

Таблиця 2.2 — Склад середовища YPD

Назва компоненту	Вміст (г/дм^3 води)
Глюкоза	20,0
Пептон із казеїну (від *Carl Roth*)	20,0
Бактеріологічний дріжджовий екстракт (від *VWR Life Science*)	10,0
Агар	20,0

Перед початком культуру дріжджів, яку зберігали за температури мінус 80 °С у спеціальній морозильній камері, оживили та посіяли на середовище YPD (дріжджовий пептонно-декстрозний бульйон) в чашку Петрі для подальшого розмноження. За три дні одну з тих колоній, що проросли, перенесли в 100 см^3 рідкого середовища YPD. Суміш інкубували у спеціальному інкубаторі-шейкері марки *Innova 4230* за температури 25 °С та 130 об./хв протягом трьох днів. Ті ж самі маніпуляції провели з культурою молочнокислих бактерій, використовуючи відповідне середовище — агар MRS (середовище Блікфельда).

У двох різних ємностях підготували дві суміші: змішали, відповідно, глюкозу та агар з 500 см^3 дистильованої води і дріжджовий екстракт та пептон з 500 см^3 дистильованої води. Обидві ємності помістили в автоклав при 121 °С на 20 хв для стерилізації, після чого колбу з агаром перенесли в духовку при 70 °С до повного застигання агару. Далі суміші змішали між собою та розлили по чашках Петрі.

Для розмноження молочнокислих бактерій використовувався попередньо підготовлений агар MRS компанії *PanReac AppliChem*, склад якого наведений у табл. 2.3.

Таблиця 2.3 — Склад середовища MRS

Назва компоненту	Вміст (г/дм^3 води)
1	2
Амонія дігідроцитрат	2,0
М’ясний екстракт	8,0
Дріжджовий екстракт	4,0
D(+)-глюкоза	20,0
Магнію сульфат	0,2
Марганцю (II) сульфат	0,05
Бактеріологічний пептон	10,0
Калію дігідрофосфат	2,0

Закінчення табл. 2.3

1	2
Натрію ацетат	5,0
Полісорбат 80	1,0

Для розведення середовища, в 1 дм^3 дистильованої води додали 52,25 г порошку, змішали і розчинили нагріванням, часто перемішуючи. Потім прокип'ятили протягом однієї хвилини до повного розчинення. Після цього розчин помістили в автоклав і стерилізували протягом 12 хвилин за температури 121°С. Готовий розчин зберігали за температури 2…8 °С.

Для створення сприятливих умов розмноження мікроорганізмів використовували цукровий розчин: 15 г чистої глюкози та 15 г чистої фруктози розчинили у 750 см^3 дистильованої води. Далі суміш помістили в автоклав за 121 °С на 20 хв для стерилізації.

Також на підготовчому етапі автоклавували всі колби, мірні ємності, пінцети, циліндри та інше приладдя, необхідне в ході експерименту, так само, як і дубові тріски компанії *Odyse Innovation*.

Стерилізацію проводили в автоклаві марки *Fedegari Autoklaven AG*.

Випробування проводили з використанням таких вихідних розчинів: 100 см^3 0,5% водного розчину лимонної кислоти, 4 см^3 5% водного розчину метабісульфату калію (SO_2) та 0,4 см^3 фенольного продукту *Estaan*.

2.3.2 Методика попереднього та основного експериментів із Brettanomyces

До початку експерименту попередньо простерилізовані виноматеріали розлили в стерильні пляшки. Для дослідження використовувалася колба на 5000 см^3. У неї внесли по 750 см^3 виноматеріалів та глюкозно-фруктозного водного розчину (для створення більш сприятливих умов розмноження мікроорганізмів, оскільки виноматеріали були зброджені насухо).

Дріжджі, пророщені на рідкому середовищі YPD, помістили в центрифугу марки *5804 R* компанії *Eppendorf* для відокремлення від середовища при 3000 об./хв, 22 °С на 5 хв. Далі додали 10 см^3 буферного сольового розчину PBS (фізіологічний розчин з фосфатним буфером) для промивання.

У колбу з виноматеріалами внесли 15 кубиків дубових трісок та 10 см^3 культури. Зі зразку відразу піпеткою відміряли 0,1 см^3 суміші та посіяли на чашки Петрі в розведеннях 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, щоб підрахувати кількість контамінуючих мікроорганізмів. Так, кількість дріжджів *Brettanomyces* після контамінації становила $53 \cdot 10^5$ КУО на см^3 суміші.

Контаміновані виноматеріали витримали за кімнатної температури протягом трьох днів. По проходженню часу, у колбах на 500 см^3 з вихідних розчинів підготували наступні тест-розчини (по три повторення для кожного):

- №1-3 — лише дистильована вода у кількості 100 см^3 (контроль);
- №4-6 — дистильована вода у кількості 100 см^3, а також фенольний препарат у кількості 0,4 см^3 на 100 см^3 суміші;

- №7-9 — дистильована вода у кількості 100 $см^3$, лимонна кислота у кількості 0,5 г, а також 5-% розчин SO_2 у кількості 4 $см^3$ на 100 $см^3$ суміші.

У кожну колбу додали по одній дубовій трісці контамінованих виноматеріалів, перемішали та залишили за кімнатної температури для витримки. Із контрольних зразків відразу ж відібрали проби для посіву на чашки Петрі у двох розведеннях (10^1 та 10^2).

Через 3 дні по 0,1 $см^3$ суміші з кожної колби посіяли на чашки Петрі у двох розведеннях (10^1 та 10^2) і залишили у термостаті за температури 25 °С для проростання.

Для проведення основного експерименту 750 $см^3$ виноматеріалів змішали з 750 $см^3$ глюкозно-фруктозного водного розчину, додали 21 дубову тріску, попередньо простерилізовану, та інокулювали дріжджами роду *Brettanomyces*.

Для підрахунку початкову концентрацію дріжджових клітин використовували камеру Горяєва (рис. 2.2) та формулу для розрахунку 1.1.

Так, кількість *Brett.* до інокуляції становила:

$$M = \frac{(\frac{133+113+122+123+109}{5})\cdot 1000\cdot 10^3}{0{,}1\cdot 0.04} = 3.07 \cdot 10^{10}\ (кл./см^3) \qquad (1.2)$$

У колбу з виноматеріалами внесли 10 $см^3$ дріжджової суспензії, ретельно перемішали, закрили пробкою та витримали за кімнатної температури три дні. Кожного дня суміш декілька разів перемішували для рівномірного розподілення дріжджових клітин.

По проходженню часу, у колбах на 500 $см^3$ з вихідних розчинів підготували наступні тест-розчини (по три повторення для кожного):

- №1-3 — лише дистильована вода у кількості 100 $см^3$ (контроль);
- №4-6 — дистильована вода у кількості 100 $см^3$, лимонна кислота у кількості 0,5 г, а також 5-% розчин SO_2 у кількості 4 $см^3$ на 100 $см^3$ суміші;
- №7-9 — дистильована вода у кількості 100 $см^3$, а також фенольний препарат у кількості 0,4 $см^3$ на 100 $см^3$ суміші;
- №10-12 — дистильована вода у кількості 100 $см^3$, а також фенольний препарат у кількості 0,2 $см^3$ на 100 $см^3$ суміші;
- №13-15 — дистильована вода у кількості 100 $см^3$, а також фенольний препарат у кількості 0,1 $см^3$ на 100 $см^3$ суміші;
- №16-18 — дистильована вода у кількості 100 $см^3$, а також фенольний препарат у кількості 0,05 $см^3$ на 100 $см^3$ суміші.

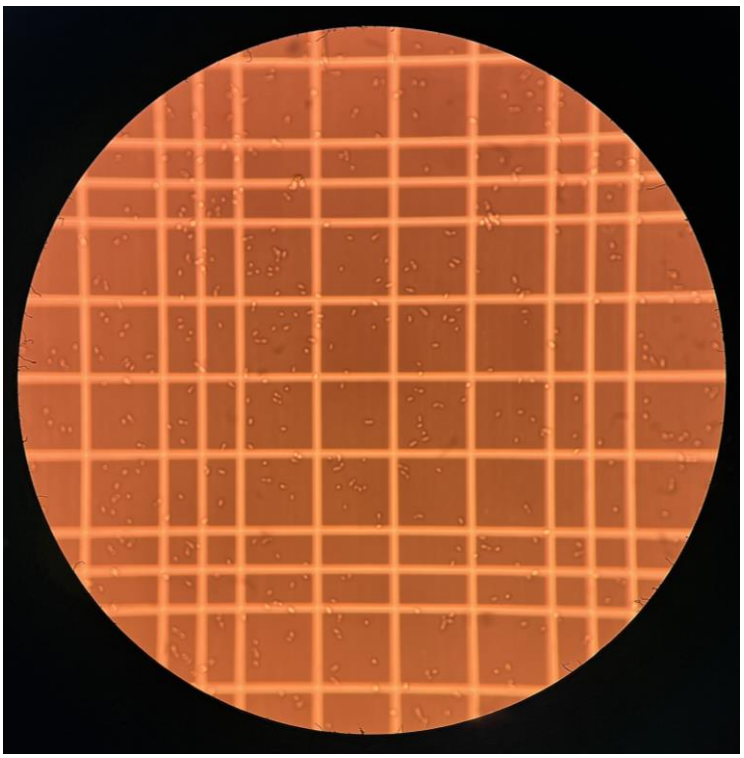


Рисунок 2.2 — Знімок мікроскопу з камерою Горяєва для підрахунку клітин дріжджів *Brettanomyces*

У кожну колбу додали по одній дубовій трісці, яку дістали з контамінованих виноматеріалів, перемішали та залишили за кімнатної температури для витримки. Із контрольних зразків відразу ж відібрали проби для посіву на чашки Петрі у двох розведеннях (10^1 та 10^2).

Через 3 дні по 0,1 $см^3$ суміші з кожної колби посіяли на чашки Петрі у двох розведеннях (10^1 та 10^2) і залишили у термостаті за температури 25 °С для проростання. Через 3 дні після посіву чашки Петрі дістали з термостату та проаналізували результат дії різних концентрацій препарату *Estaan*, порівняно з діоксидом сірки.

2.3.3 Методика експерименту з молочнокислими бактеріями

На початку експерименту з молочнокислими бактеріями було вирішено використовувати культуру компанії *MaloStar Vitale SK11* із вмістом життєздатних клітин 10^{11} КУО/г. Рекомендовано використовувати 1 г закваски *O. oeni* на 100 $дм^3$ вина, попередньо суспендованого в 0,2 $дм^3$ води. 0,1 г культури змішали з 2 $см^3$ води та витримали 15 хвилин. Далі культуру внесли в попередньо підготовлену суміш виноматеріалів (750 $см^3$), глюкозно-фруктозного водного розчину (750 $см^3$) та 15 дубових трісок. Відразу ж із суміші відібрали 0,1 $см^3$ і зробили розведення у сольовому розчині до 10^6. По 0,1 $см^3$ кожного розведення (10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6) посіяли на чашки Петрі з середовищем MRS та залишили в термостаті за температури 25 °С для проростання. По проходженню трьох днів на жодній із чашок Петрі колоній виявлено не було.

Наступним етапом було вирішено інокулювати виноматеріали не комерційним, а лабораторним штамом молочнокислих бактерій *ML Prime, 1040*.

Культуру підготували для розмноження, додавши одну колонію у 10 $см^3$ розчину MRS та залишили в камері-шейкері за температури 30 °С на три дні. Після цього так само додали культуру до підготовлених виноматеріалів, зробили розведення (10^1, 10^2, 10^3, 10^4) та посадили на чашки Петрі з середовищем MRS. Знову залишили для проростання в термостаті за температури 25 °С на три дні.

Оскільки тепер ріст бактерій був активнішим, експеримент було вирішено продовжити за тією ж схемою, як і для *Brettanomyces.* У колбах на 500 $см^3$ з вихідних розчинів підготували наступні тест-розчини (по три повторення для кожного):

- №1-3 — лише дистильована вода у кількості 100 $см^3$ (контроль);
- №4-6 — дистильована вода у кількості 100 $см^3$, а також фенольний препарат у кількості 0,4 $см^3$ на 100 $см^3$ суміші;
- №7-9 — дистильована вода у кількості 100 $см^3$, лимонна кислота у кількості 0,5 г, а також 5-% розчин SO_2 у кількості 4 $см^3$ на 100 $см^3$ суміші.

У кожну колбу додали по одній дубовій трісці з контамінованих молочнокислими бактеріями виноматеріалів та залишили за кімнатної температури на декілька днів. Із контролю (№1-3) відразу ж взяли 0,1 $см^3$ суміші, зробили розведення до 10^3 і 10^4 та посадили на чашки Петрі із середовищем MRS. За три дні жодного росту бактерій знову виявлено не було (рис. 3.8).

Експеримент було повторено втретє. Для цього знову використали культуру молочнокислих бактерій компанії *MaloStar Vitale SK11*. На цей раз порівнювалися виноматеріали двох сортів — червоні (Мерло) та рожеві (Сіра). У дві колби на 5000 $см^3$ додали по 750 $см^3$ виноматеріалів, стільки ж глюкозно-фруктозного водного розчину, а також по 0,015 г додаткових нутрієнтів (суміші компонентів інактивованих дріжджів, багатих на амінокислоти та полісахариди кліткової сітки, а також целюлози) компанії *Bi-Start*, призначених для використання як засіб оптимального постачання поживних речовин під час ЯМБ.

У кожну з колб також додали по 15 дубових трісок, ретельно перемішали та взяли відразу по 0,1 $см^3$ для висіву на чашки Петрі з середовищем MRS. Залишили у термокамері за температури 25 °С, однак, ні за три, ні за сім, ні за десять днів жодного росту культури бактерій помічено не було.

3 ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ФЕНОЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ ESTAAN НА МІКРООРГАНІЗМИ (експериментальна частина)

3.1 Дослідження впливу Estaan на дріжджі роду Brettanomyces

3.1.1 Результати попередніх випробувань із Brettanomyces

Результати дії препарату *Estaan*, а також діоксиду сірки, на розмноження дріжджів роду *Brettanomyces* через 3 дні після посіву показані на рис. 3.1. Як видно з рисунку, дія фенольного продукту відносно *Brettanomyces,* за ефективністю еквівалентна варіанту класичної обробки з використанням SO_2, що вказує на можливість використання препарату як антимікробної альтернативи діоксиду сірки проти дріжджів даного роду.

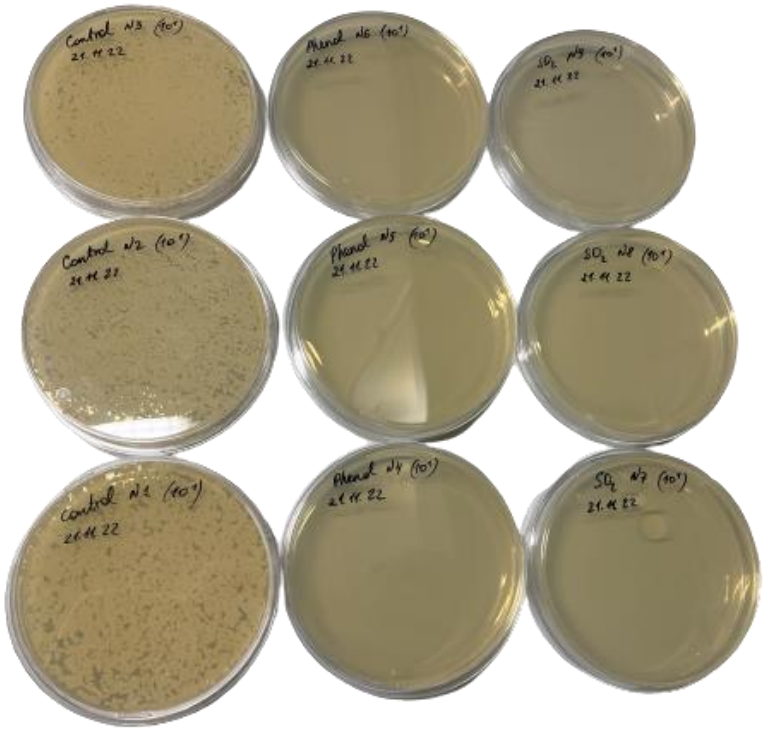


Рисунок 3.1 — Результати триденної витримки дубових трісок із дріжджами *Brett.* у декількох вихідних розчинах (контрольного водного, фенольного продукту і SO_2)

3.1.2 Результати основного експерименту із Brettanomyces

Після одержання позитивних результатів попередніх випробувань, експеримент було вирішено повторити, використовуючи більший ранг концентрацій фенольного продукту для аналізу його дії в менших концентраціях. Результати експерименту наведені на рис. 3.2…3.6.

На кожному рисунку показано чашки Петрі з контролем без обробки препаратами, чашки Петрі з обробкою діоксидом сірки (стандартною) та чашки Петрі з обробкою фенольним препаратом за різних концентрацій.

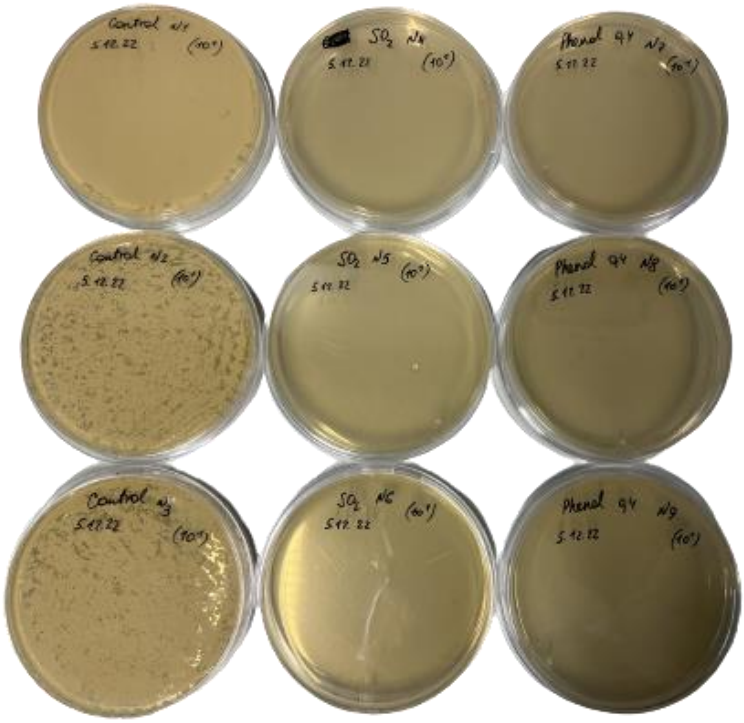


Рисунок 3.2 — Результати триденної витримки дубових трісок із дріжджами *Brett.* у розчині з 0,4 см^3 фенольного препарату, порівняно з контролем та зразками, обробленими SO_2

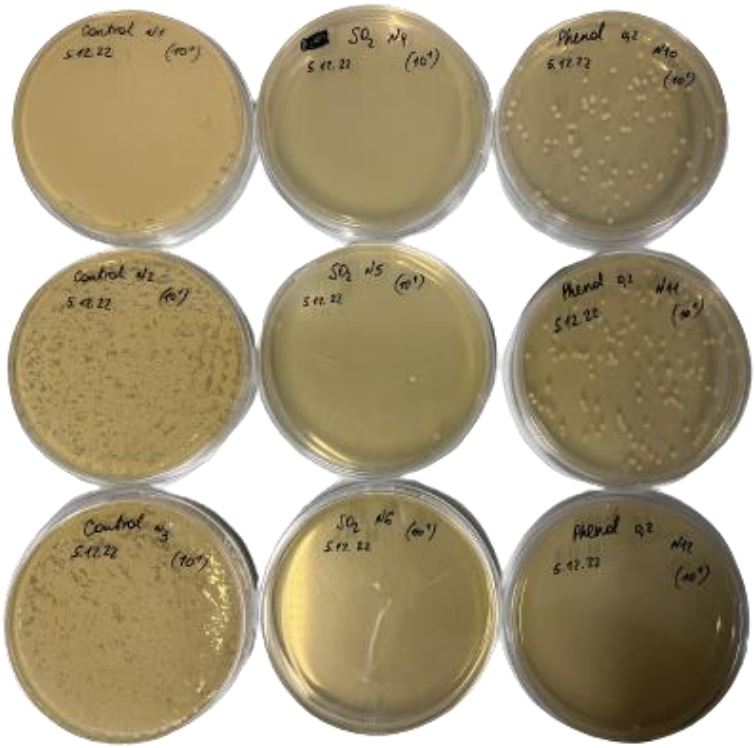


Рисунок 3.3 — Результати триденної витримки дубових трісок із дріжджами *Brett.* у розчині з 0,2 см^3 фенольного препарату, порівняно з контролем та зразками, обробленими SO_2

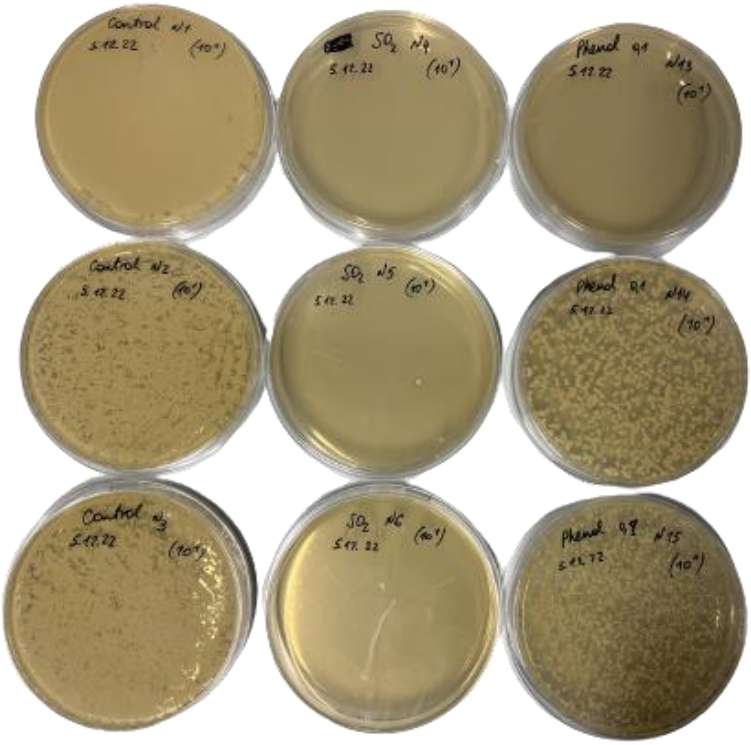


Рисунок 3.4 — Результати триденної витримки дубових трісок із дріжджами *Brett.* у розчині з 0,1 см^3 фенольного препарату, порівняно з контролем та зразками, обробленими SO_2

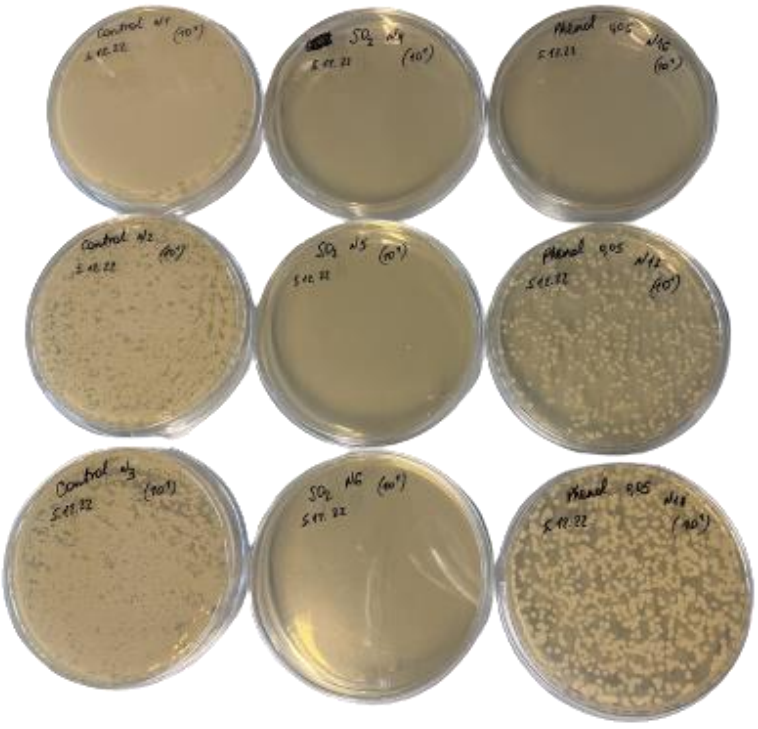


Рисунок 3.5 — Результати триденної витримки дубових трісок із дріжджами *Brett.* у розчині з 0,05 см^3 фенольного препарату, порівняно з контролем та зразками, обробленими SO_2

Рисунок 3.6 — Порівняння контрольних зразків висіяних відразу після інокуляції та після триденної витримки

Як видно з рис. 3.2, результат дії фенольного препарату *Estaan* у кількості 0,4 см^3 є таким самим, як і в першому експерименті, а, отже, його дія є ефективною. Однак менші концентрації цього препарату такого ефекту не мали.

На чашках Петрі, де після обробки препаратом *Estaan* був помітний ріст дріжджів, підрахували колонії мікроорганізмів. Результати підрахунків наведені в табл. 3.1. Очевидно, що лише за максимальної концентрації продукт працює максимально ефективно, тобто повністю знешкоджує дріжджі та пригнічує їх розвиток. Однак, менші концентрації є також дієвими, щоправда, їх дія охоплює не 100% клітин мікроорганізмів. Так, порівняно з контрольними зразками, де середня кількість дріжджів становила 35000 КУО/см^3, 0,2 см^3 фенольного препарату зменшило вміст *Brett*. на 97,7%, 0,1 см^3 фенольного препарату зменшило вміст *Brett*. на 78,4%, а 0,05 см^3 фенольного препарату зменшило вміст *Brett*. на 54,0%. Таким чином, ефективність препарату Estaan навіть за найменшої концентрації становить більше 50%.

Таблиця 3.1 — Кількість дріжджів *Brettanomyces*, що проросли після триденної витримки в різних тестових розчинах

Номер зразку	Склад розчину	Кількість дріжджів (КУО/см^3)	Кількість знешкоджених дріжджів порівняно з контролем (%)
1	Дистильована вода (контроль)	39 000	—
2	Дистильована вода (контроль)	32 000	—
3	Дистильована вода (контроль)	33 000	—
4	Діоксид сірки, лимонна кислота, дистильована вода	0	100,00
5	Діоксид сірки, лимонна кислота, дистильована вода	0	100,00
6	Діоксид сірки, лимонна кислота, дистильована вода	0	100,00
7	Фенольний препарат (0,4 см^3), дистильована вода	0	100,00
8	Фенольний препарат (0,4 см^3), дистильована вода	0	100,00
9	Фенольний препарат (0,4 см^3), дистильована вода	0	100,00
10	Фенольний препарат (0,2 см^3), дистильована вода	1130	96,77
11	Фенольний препарат (0,2 см^3), дистильована вода	1250	96,43
12	Фенольний препарат (0,2 см^3), дистильована вода	0	100
13	Фенольний препарат (0,1 см^3), дистильована вода	0	100
14	Фенольний препарат (0,1 см^3), дистильована вода	5100	85,43
15	Фенольний препарат (0,1 см^3), дистильована вода	10 000	71,43
16	Фенольний препарат (0,05 см^3), дистильована вода	0	100
17	Фенольний препарат (0,05 см^3), дистильована вода	17100	51,14
18	Фенольний препарат (0,05 см^3), дистильована вода	15100	56,86

3.2 Дослідження впливу Estaan на молочнокислі бактерії *O. oeni*

За час експерименту бактерії роду *O.oeni* не вдалося розмножити та приживити на середовище MRS. Експеримент було проведено тричі, але жодного разу культура не залишалася живою довгий час (рис. 3.7-3.8). Таким чином подальші експерименти із *O.oeni* вирішили припинити.

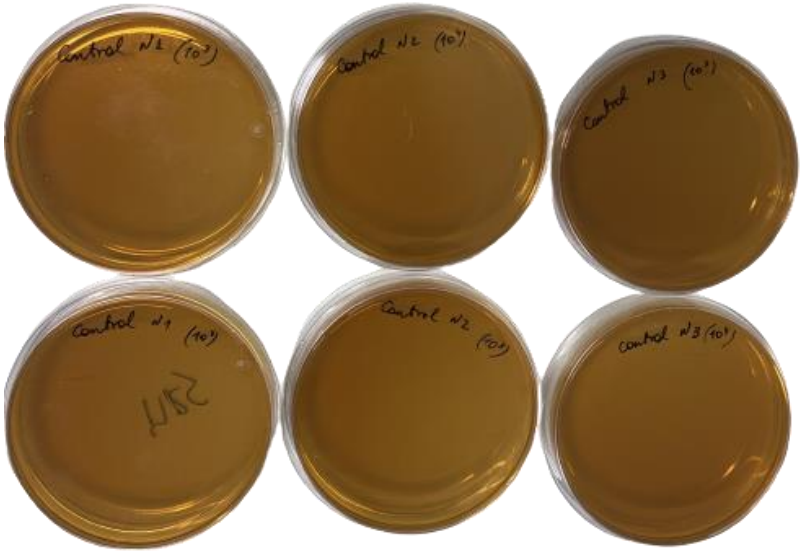


Рисунок 3.7 — Чашки Петрі з контрольними зразками №1-3 після триденної витримки

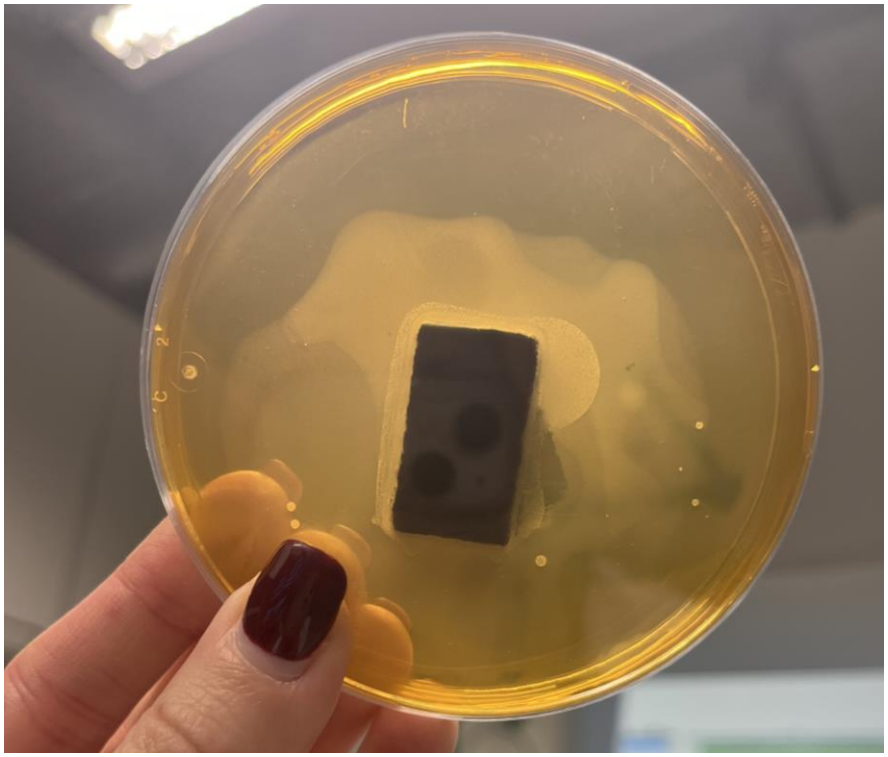


Рисунок 3.8 — Чашки Петрі з дубовою тріскою після інокуляції виноматеріалів *O. oeni*

3.3 Висновки

Отже, результати експериментальних досліджень дозволяють зробити наступні висновки:

1. Фенольний препарат *Estaan* нідерландської компанії *Biolethics Europe* є ефективним для пригнічення росту і розвитку дріжджів роду *Brettanomyces* у кількості 4 $см^3$ на 1 $дм^3$ розчину на тому ж самому рівні, що й стандартні концентрації діоксиду сірки. При цьому менші концентрації даного препарату є теж ефективними, щоправда, не дають 100% результату, тобто, не знешкоджують всю культуру мікроорганізмів повністю, а лише пригнічують розвиток деяких колоній. Результати дії Estaan за різних концентрацій узагальнено на рис. 3.9.

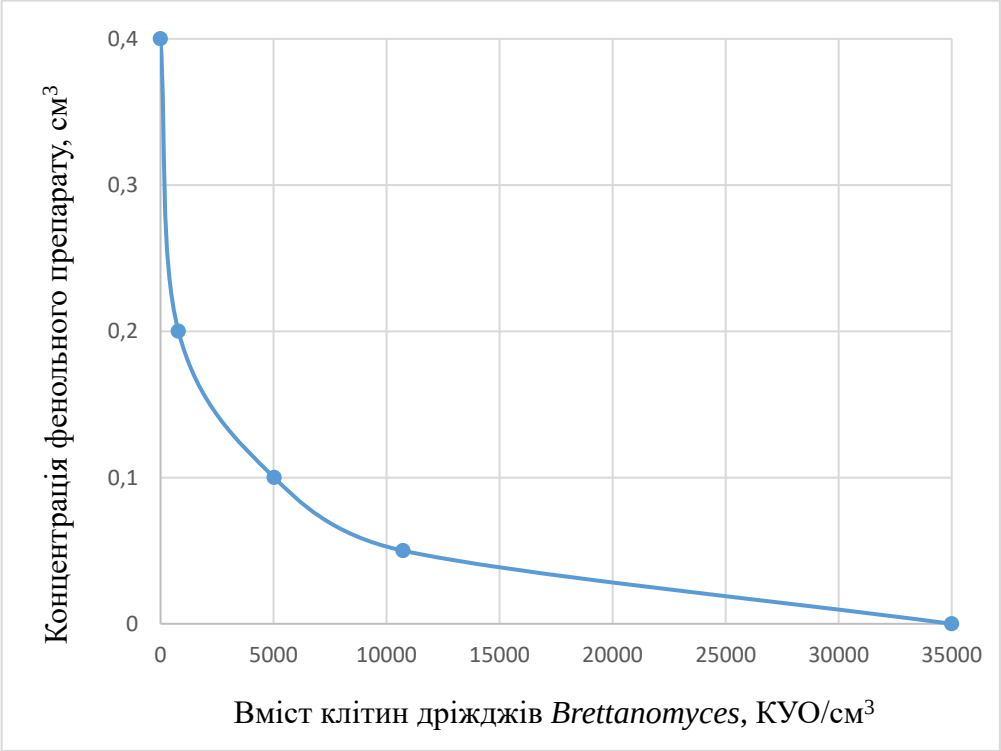


Рисунок 3.9 — Графік залежності ефективності дії фенольного препарату Estaan на дріжджі роду *Brettanomyces* від концентрації

2. Спроби підсадити культуру молочнокислих бактерій *O. oeni* у виноматеріали виявилися невдалими, оскільки жодного росту мікроорганізмів не було помічено. Загалом, якщо одиночну бактерію помістити в поживне середовище за оптимальних умов росту, то вона та її потомки будуть ділитися кожні 30 хвилин (табл. 3.2.) [28].

Таблиця 3.2 — Ріст модельної популяції бактерій

Час, год	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Число поділів	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Число бактерій	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024

Оскільки ні за 3, ні за 7 днів витримки на поживному середовищі не з’явилося жодної колонії бактерій, скоріш за все проблема крилася у зовнішньому середовищі. Можливими причинами могли бути:

а. *Склад виноматеріалів*. Червоні виноматеріали сорту Мерло було отримано від виноробні німецького університету Гайзенхайму. При цьому, не зважаючи на те, що вони зберігалися кілька місяців у бочках, яблучно-молочне бродіння в них проведено на той момент ще не було. Залишається відкритим питання, чи не було у виноматеріалах певної вади, яка могла б завадити проведенню ЯМБ. З іншого боку, росту культури після інокуляції інших, рожевих виноматеріалів сорту Сіра теж виявлено не було.

б. *Доступ кисню повітря*. Оскільки загалом молочнокислі бактерії є мікро-аерофілами, тобто організмами, які для свого розвитку потребують присутність кисню в обмежених концентраціях, завеликий доступ повітря міг стати фатальним. Так, інокуляція проводилася в колбах на 5000 см^3, куди додавалося всього лише 1500 см^3 досліджуваного розчину, що залишало певний повітряний простір (рис. 3.10). Крім того, при витримці культури у термокамері в чашках Петрі додаткових методів захисту від проникнення повітря задіяно не було.

Рисунок 3.10 — Колба з інокульованими виноматеріалами під час витримки

в. *Низький вміст життєздатних клітин у маточній культурі*. Незважаючи на те, що виробник зазначив вміст клітин культури до 10^{11} КУО/г, цілком можливо, що дійсно живих і життєздатних клітин містилося набагато менше. Так могло статися через неправильне зберігання пакету до проведення експериментів, хоча, варто зазначити, що упаковка була нерозкрита і з гарантованим терміном зберігання до червня 2025 року.

г. *Вода*. Оскільки під час використання некомерційної лабораторної культури молочнокислих бактерій їх ріст був помітним до початку експерименту з фенольним препаратом, а після внесення дубових трісок у воду (контрольні зразки) жодна колонія на поживному середовищі не проросла, можливо, причиною пригнічення росту бактерій стала дистильована вода.

Загалом, експеримент із молочнокислими бактеріями *O. oeni* є незавершеним і вимагає свого продовження для повного дослідження ефективності фенольного препарату. Без сумніву, у наступних експериментах, варто врахувати вищезазначені причини та удосконалити протокол і техніку проведення експериментів.

3. У експерименті з дріжджами роду *Brettanomyces* один зразок із трьох повторень концентрацій фенольного препарату 2, 1 та 0,05 $см^3$ не мав виросліх колоній, тоді як два інші показували, що дія продукту не є 100% , і продукт знешкоджує не всі дріжджові клітини. Можливою причиною такої різниці результатів є різний розмір дубових трісок, які було внесено у виноматеріали, та не ідентична кількість мікроорганізмів на них. Оскільки перевірка кожної тріски на вміст дріжджів до та після витримки у розчинах не передбачалася протоколом експерименту, зробити достеменно об'єктивні висновки не вважається можливим.

4. Крім того, варто зауважити, що всі експерименти проводилися не в реальних виноматеріалах, а у розведених розчинах, тобто, навмисне збільшувався вміст цукрів (поживних речовин), зменшувалася об'ємна частка спирту та підвищувалося pH. Це було зроблено задля того, щоб забезпечити для мікроорганізмів оптимальні умови росту, не такі суворі кондиції.

5. Загалом, фенольний препарат *Estaan* виявився ефективною альтернативою діоксиду сірки проти дріжджів роду *Brettanomyces*, які найчастіше зустрічаються у виноробстві та є найпоширенішими шкідниками. Використання препарату є доцільним з точки зору антимікробної ефективності, за умови такого ж позитивного антиоксидантного ефекту та відсутності впливу на органолептичні властивості готових виноматеріалів. У цьому напрямку також ведуться дослідження.

4 ОПТИМІЗАЦІЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

Для перевірки достовірності залежності вмісту КУО дріжджів *Brettanomyces* у 1 см^3 продукту від внесеної концентрації препарату *Estaan* було проведено дисперсійний аналіз однофакторного експерименту.

Дисперсійний аналіз — це статистичний метод вивчення взаємозв'язку. Він застосовується для дослідження впливу однієї чи кількох якісних змінних на одну залежну кількісну змінну. В основі дисперсійного аналізу лежить припущення, що одні змінні можуть розглядатися як причини (незалежні змінні), а інші — як наслідки (залежні змінні або відгуки).

Основна мета дисперсійного аналізу — дослідити значущість різниці між середніми значеннями залежної кількісної змінної за групами фактору. Досягається це з допомогою розкладання загальної дисперсії залежної змінної на складові: дисперсію за рахунок розбиття на групи (міжгрупова дисперсія) і дисперсію за рахунок інших чинників (внутрішньогрупова дисперсія). Аналізуючи ці компоненти дисперсії можна оцінити частку впливу кожного фактору на залежну змінну.

Параметрична схема математично-статистичної залежності наведена на рис. 4.1.

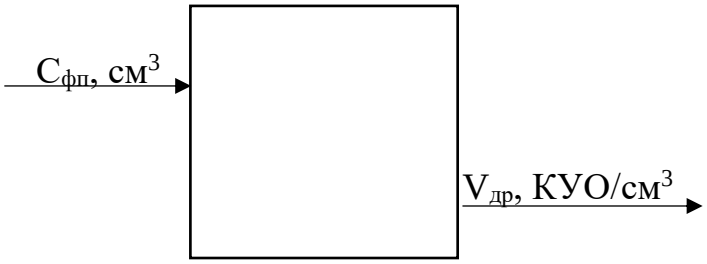


Рисунок 4.1 — Параметрична модель залежності вмісту дріжджів від концентрації фенольного препарату

Алгоритм дисперсійного аналізу наведено в табл. 4.1 [40].

Таблиця 4.1 — Алгоритм дисперсійного аналізу однофакторного комплексу

Номер дії	Зміст організаційної або математичної дії	Результат дії
1	2	3
1	Групування вибіркових матеріалів у комбінаційну таблицю дисперсійного комплексу	Таблиця дисперсійного комплексу
2	Визначення значень середнього арифметичного всього комплексу (x) і групових середніх за градаціями організованого фактору (x_i)	Середні значення x і x_i
3	Визначення загальної суми квадратів відхилень (D_y), тобто суми квадратів відхилень від загальної середньої: $D_y = (x - \text{x})^2$	Значення D_y

Закінчення табл. 4.1

1	2	3
4	Визначення міжгрупової суми квадратів відхилень, яка дорівнює сумі квадратів відхилень групових середніх від загальної середньої з урахуванням статистичної ваги (n_i) групових середніх: $D_x = n_i \Sigma(x_i - x)^2$	Значення D_x
5	Визначення внутрішньогрупової суми квадратів, тобто суми квадратів відхилень групових від групових середніх	Значення D_z
6	Визначення дисперсій (середніх квадратів відхилень): загальна: $\sigma_{заг}^2 = D_y/(N\text{-}1)$; факторна: $\sigma_{факт}^2 = D_x/(a\text{-}1)$; остаточна: $\sigma_{ост}^2 = D_z/(N\text{-}a)$	Значення дисперсій $\sigma_{заг}^2$, $\sigma_{факт}^2$, $\sigma_{ост}^2$
7	Визначення фактичного значення критерію	Значення фактичного критерію F
8	Порівняння фактичного значення критерію з його табличним (стандартним) значенням для відповідного рівня значимості та даних чисел	Висновки про відхилення або визнання нульової гіпотези

Досліджувався вплив різних значень концентрації фенольного препарату Estaan на дріжджі роду *Brettanomyces*. Дослід закладався в трьох повторностях з градаціями регульованого фактору (концентрації) — відсутність, 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 см^3/дм^3.

1. Результати згруповані в табл. 4.2. Однакова кількість повторностей по всіх варіантах досліду та участь лише одного регульованого фактору підтверджує класифікацію комплексу як однофакторіального і рівномірного.

Таблиця 4.2 — Результати досліджень залежності вмісту КУО дріжджів *Brettanomyces* у 1 см^3 продукту від внесеної концентрації препарату *Estaan*

Концентрація препарату, см^3	Кількість дріжджів *Brett.* за повторностями, КУО/см^3				Середнє значення по всіх повторностях
	1	2	3	n_i	
Контроль (0)	39000	32000	33000	3	35000
0,5	0	17100	15100	3	10733
1	0	5100	10000	3	5033
2	1130	1250	0	3	793
4	0	0	0	3	0

Результати дослідів можуть також бути представлені графічно (рис. 4.2).

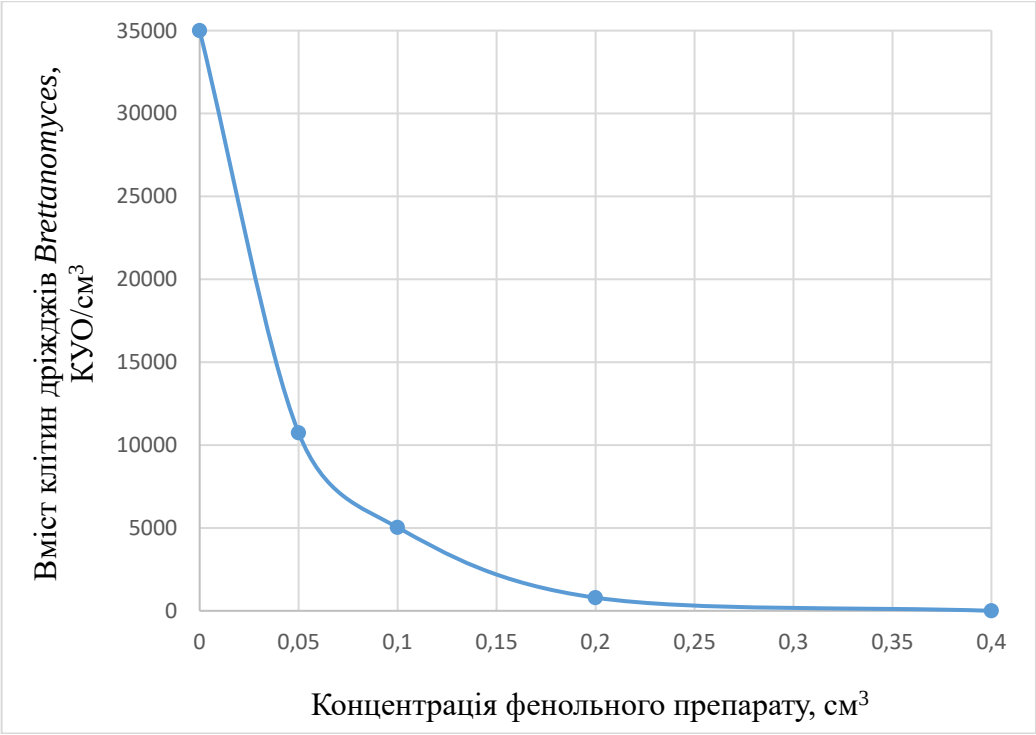


Рисунок 4.2 — Графік залежності вмісту дріжджів *Brettanomyces* від концентрації фенольного препарату

2. Сума кількості КУО по всіх повторностях складає:

$$\sum x = 39000 + 32000 + 33000 + 0 + 17100 + 15100 + 0 + 5100 + 10000 + 1130 + 1250 + 0 + 0 + 0 + 0 = 153680;$$

квадрат цієї суми дорівнює:

$$(\sum x)^2 = 153680^2 = 236175 \cdot 10^5;$$

сума квадратів усіх варіантів дорівнює:

$$\sum x^2 = 39000^2 + 32000^2 + 33000^2 + 0 + 17100^2 + 15100^2 + 0 + 5100^2 + 10000^2 + 1130^2 + 1250^2 + 0 + 0 + 0 + 0 = 42833 \cdot 10^5.$$

3. Квадрати групових середніх становлять:

$$\sum \bar{x}_i^2 = 35000^2 + 10733^2 + 5033^2 + 793^2 + 0 = 13662 \cdot 10^5.$$

Загальна сума квадратів відхилень дорівнює:

$$D_y = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N} = 42833 \cdot 10^5 - \frac{236175 \cdot 10^5}{15} = 27088 \cdot 10^5,$$

де N — загальна кількість всіх повторень експерименту.

4. Міжгрупова сума квадратів відхилень складає:

$$D_x = n \sum \bar{x}_i^2 - \frac{(\sum x)^2}{N} = 3 \cdot 13662 \cdot 10^5 - \frac{236175 \cdot 10^5}{15} = 25240 \cdot 10^5.$$

5. Внутрішньогрупова (остаточна) сума квадратів відхилень становить:

$$D_z = \sum x^2 - n \sum \bar{x}_i^2 = 42833 \cdot 10^5 - 3 \cdot 13662 \cdot 10^5 = 1848 \cdot 10^5.$$

6. Число ступенів вільності для загальної дисперсії складає:

$$K_z = K_y - K_x = (N-1) - (a-1) = (15-1) - (5-1) = 10,$$

де а — кількість груп.

Значення загальної дисперсії становить:

$$\sigma^2_{\text{заг}} = \frac{D_y}{K_y} = \frac{27088 \cdot 10^5}{14} = 1935 \cdot 10^5.$$

Значення міжгрупової (факторіальної) дисперсії становить:

$$\sigma^2_{\text{факт}} = \frac{D_x}{K_x} = \frac{25240 \cdot 10^5}{4} = 6310 \cdot 10^5.$$

Значення внутрішньогрупової (остаточної) дисперсії становить:

$$\sigma^2_{\text{ост}} = \frac{D_z}{K_z} = \frac{1848 \cdot 10^5}{10} = 184{,}8 \cdot 10^5.$$

7. F-критерій Фішера становить:

$$F_{\text{факт}} = \frac{\sigma^2_{\text{факт}}}{\sigma^2_{\text{ост}}} = \frac{6310 \cdot 10^5}{184{,}8 \cdot 10^5} = 34{,}1.$$

8. Табличне значення F-критерію Фішера на рівні значимості α = 0,05 становить $F_{табл}$ = 3,48, а на рівні значимості α = 0,01 — $F_{табл}$ = 5,99 (Додаток Б).

Одержані результати зведено в табл. 4.2.

Таблиця 4.2 — Результати дисперсійного аналізу експерименту

Дисперсія	Ступені	Сума відхилень ($\times 10^5$)	Середнє значення відхилень ($\times 10^5$)	$F_{факт}$	$F_{табл}$	
					0,05	0,01
Факторна	4	25240	6310	34,1	3,48	5,99
Залишкова	10	1848	185			
Загальна	14	27088	1935			

В обох випадках $F_{факт} > F_{табл}$, отже, це означає, що на рівнях 0,05 та 0,01 нульова гіпотеза є недопустимою, розбіжність між дисперсіями є значимою. Це вказує на те, що збільшення концентрації фенольного препарату *Estaan* впливає на зменшення вмісту КУО дріжджів роду *Brettanomyces* в досліджуваному розчині.

5 СОЦІАЛЬНО-ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ РОБОТИ

На сьогоднішній день проблема виробництва виноматеріалів і вин із зниженим вмістом діоксиду сірки або за повної його відсутності поставлена дуже гостро. Багато виноробень переходять на виготовлення біодинамічних, натуральних та/або органічних вин (жодний із цих термінів не має загальноприйнятого визначення та не регламентується державними стандартами України). Це означає, що окрім відмови від діоксиду сірки, при виробництві таких виноматеріалів не використовуються жодні сторонні компоненти для покращення стабілізації та зовнішнього вигляду (наприклад, флокулянти і/або коагулянти). Таким чином, виноматеріали є необробленими, не містять сторонніх сполук, але водночас вони досить нестабільні й не мають великого гарантійного терміну зберігання.

І якщо інші альтернативи діоксиду сірки можуть мати певні серйозні недоліки, наприклад, лізоцим, спроможний викликати алергічні реакції в людей з непереносимістю яєчного білка, або термічні методи, які негативно вливають на органолептичні властивості готової продукції, рослинні фенольні екстракти є абсолютно безпечними та достатньо ефективними.

Estaan — продукт нідерландської компанії *Biolethics Europe*, заснованої Робом тен Херкелем і Тоном Клебергом. Це природний комплекс поліфенолів, видобутих із рослин. Інгредієнти одержують із десяти різних рослин з трьох континентів. При цьому, в складі *Estaan* немає жодного синтетичного компоненту. Технологія виготовлення базується на послідовному багатоетапному розділенні компонентів із подальшим кількоступеневим очищенням. Під час цього процесу активні інгредієнти та поживні речовини залишаються недоторканими. Компоненти змішуються в певних відсотках, які, на даному етапі, є комерційною таємницею.

Першочерговий продукт, у якому може бути використаний *Estaan*, — вино. Однак розробники стверджують, що він може виступати антиоксидантом і при виробництві інших харчових продуктів, таких як гірчиця, сухофрукти, овочеві нарізки, замінники м’ясної продукції, картопляні чіпси, а також косметичні засоби.

Ідея розробки препарату на рослинній основі, який може замінити небажаний, але необхідний консервант у виноробстві, діоксид сірки, з’явилася у 2014 році. Компанією *Biolethics Europe* було проведено 600 тестів *in vitro*, щоб визначити, які рослинні екстракти підходять для охоплення всіх властивостей сульфіту. З 2016 року проводилися фактичні випробування на рекомендованих виноробнях по всьому світі. У 2019 році *Biolethics Europe* отримала дозвіл Нідерландів від Міністерства сільського господарства на проведення великого енологічного експерименту відповідно до статті 80 Регламенту ЄС 1308/2013 та статті 4 Регламенту ЄС 606/2009.

Перші 4000 пляшок вина з *Estaan* були виготовлені з винограду сорту Піно Нуар на нідерландській виноробні «*Colonjes*» та успішно продані в роздрібній торгівлі. Сьогодні *Colonjes* є першою компанією органічного вина, яка отримала ліцензію на використання *Estaan* як альтернативи діоксиду сірки [11].

Експерименти щодо дії препарату *Estaan* досі ведуться. Так, у німецькому університеті Гайзенхайму Hochschule Geisenheim University дослідження антиоксидантних й антисептичних властивостей продукту, так само, як і його вплив на органолептичні властивості готового вина є темою дисертації одного із аспірантів, частиною проекту якого виступає дана кваліфікаційна робота.

Отже, зважаючи на одержані та описані вище результати, а також на результати інших експериментів, проведених Hochschule Geisenheim University, препарат *Estaan* — ефективна альтернатива діоксиду сірки у виноробстві, оскільки діє як антиоксидант, інгібує дію ферментів лаккази та тирозинази, що особливо важливо при виробництві білих виноматеріалів, має антибактеріальний ефект, органолептично нейтральний, і, крім того, не викликає алергічних реакцій.

6 ОХОРОНА ПРАЦІ

Згідно ст. 1 Закону України «Про охорону праці» [37] *охорона праці* — це система правових, соціально-економічних, організаційно-технічних, санітарно-гігієнічних і лікувально-профілактичних заходів та засобів, спрямованих на збереження здоров'я і працездатності людини в процесі праці.

Державна політика в галузі охорони праці визначається відповідно до Конституції України Верховною Радою України та спрямована на створення належних, безпечних і здорових умов праці, запобігання нещасним випадкам та професійним захворюванням.

Пріоритет життя і здоров'я працівників означає, що в першу чергу слід дотримуватися вимог нормативних актів про охорону праці, щоб робітник не зазнавав погіршення здоров'я, не отримував травм, професійних захворювань, і лише після цього має звертатися увага на результати діяльності підприємства.

Власник підприємства несе відповідальність за створення і підтримання належних безпечних та нешкідливих умов праці на кожному робочому місці підприємства [38].

На виноробному підприємстві діють «Правила охорони праці для виноробного виробництва» [35], згідно з якими:

Роботодавець повинен забезпечити безпечні і нешкідливі умови праці, створити службу охорони праці, розробити інструкції з охорони праці, забезпечити безпечну та надійну експлуатацію виробничих будівель і споруд, забезпечити стан пожежної безпеки. Працівники повинні забезпечуватися спеціальним одягом, спеціальним взуттям та всіма іншими засобами індивідуального захисту.

6.1 Вимоги щодо безпеки під час сульфітації виноматеріалів

Технологічні процеси із застосуванням горючих продуктів, які здатні створювати вибухонебезпечні суміші з повітрям, повинні проводитися у герметичному технологічному обладнанні, яке виключає можливість утворення небезпечних концентрацій цих речовин у повітрі робочої зони при будь-якому режимі роботи. Такі технологічні процеси повинні бути оснащені:

системами автоматичного або автоматизованого регулювання;

- засобами контролю параметрів, значення яких визначають вибухонебезпечність процесу;
- ефективними швидкодійними системами приведення технологічних параметрів до регламентованих значень або зупинки технологічного процесу.

У закритих приміщеннях забороняється проводити сульфітацію у відкритих резервуарах. Процеси сульфітування соко- і винопродуктів повинні виключати можливість виділення парів діоксиду сірки в робочі зони виробничих приміщень.

Приготування робочих розчинів діоксиду сірки у воді і виноматеріалах, сульфіт-сусла, а також заряджання сульфітометрів необхідно проводити в герметично закритих посудинах у приміщеннях, обладнаних механічною припливно-витяжною вентиляцією, або на відкритих майданчиках під навісами.

Майданчики повинні бути огороджені і позначені відповідними попереджувальними знаками.

Переміщення робочих розчинів необхідно здійснювати в закритих посудинах з попереджувальними написами.

Для дегазації пролитого розчину повинні бути передбачені нейтралізуючі речовини.

При сульфітуванні газоподібним діоксидом сірки подавання газу з балона в продукт повинно проводитися через редукційний клапан. Проведення сульфітування подаванням діоксиду сірки безпосередньо з балона забороняється. Ваги для балонів з діоксидом сірки необхідно обладнати пристроями, що забезпечують надійне укладення на них балонів.

Експлуатація десульфітаційної установки при відсутності термоізоляції і порушенні герметичності апаратів, трубопроводів і арматури забороняється.

У приміщеннях, де проводиться сульфітація і десульфітація соку, приготування сокової суспензії ферментних препаратів, а також в інших виробничих приміщеннях, де здійснюються технологічні операції з виробництва соку, забороняється перебування сторонніх осіб.

Операції з перемішування, дозування і введення суспензії у ферментатор необхідно виконувати із застосуванням відповідних засобів індивідуального захисту, не допускаючи її потрапляння на незахищені частини тіла.

Перед дезінфекцією приміщення необхідно герметизувати з метою виключення витоку діоксиду сірки. Перебування у приміщеннях під час дезінфекцією працівників, не задіяних у процесі, заборонено.

Перед дезінфекцією приміщень необхідно переконатися у відсутності в них сторонніх осіб. Після дезінфекції необхідно закрити двері, запломбувати і встановити знак «Вхід заборонено». Роботи в приміщенні після закінчення дезінфекції дозволяється розпочинати лише після ретельного провітрювання і зменшення вмісту діоксиду сірки в повітрі до значення, що не перевищує граничнодопустимої концентрації.

6.2 Пожежна безпека на виноробному підприємстві

Евакуаційні шляхи і виходи повинні втримуватися вільними, нічим не захаращуватися і у разі виникнення пожежі забезпечувати безпеку під час евакуації, а також і безпечну евакуацію всіх людей, які перебувають у приміщеннях будівель та споруд. Кількість евакуаційних виходів з будівель з кожного поверху і з приміщень слід приймати згідно з вимогами відповідних нормативних актів, але не менше двох.

У разі розміщення технологічного, експозиційного та іншого обладнання у приміщеннях повинні бути забезпечені евакуаційні проходи до сходових кліток та інших шляхів евакуації відповідно до будівельних норм.

У приміщенні, яке має один евакуаційний вихід, дозволяється одночасне перебування не більше 50 осіб.

Двері на шляхах евакуації повинні відчинятися в напрямку виходу з будівель (приміщень). При наявності людей у приміщенні двері евакуаційних виходів можуть замикатися лише на внутрішні запори, які легко відмикаються.

Сходові марші й площадки повинні мати справні огорожі із поручнями, котрі не повинні зменшувати встановлену будівельними нормами ширину сходових маршів і площадок. Сходові клітки, внутрішні відкриті та зовнішні сходи, коридори, проходи та інші шляхи евакуації мають бути забезпечені евакуаційним освітленням відповідно до вимог будівельних норм та правил улаштування електроустановок.

Світильники евакуаційного освітлення повинні вмикатися з настанням сутінків у разі перебування в будівлі людей. Шляхи евакуації, що не мають природного освітлення, повинні постійно освітлюватися електричним світлом (у разі наявності людей).

Промислові приміщення повинні мати зовнішнє та внутрішнє водопостачання. Гідранти розташовуються на території підприємства на відстані не більше 100 м по периметру будівель вздовж доріг, від стін будівель — не менше 5 м і не далі 2,5 м від краю проїзної частини дороги. Внутрішній протипожежний водогін обладнується пожежними кранами, які встановлюються на висоті 1,35 м від підлоги всередині приміщень біля виходів, у коридорах, на сходах. Кожний пожежний кран споряджається прогумованим рукавом та пожежним стволом. Довжина рукава — 10 або 20 м. Пожежні крани не рідше одного разу на 6 місяців підлягають технічному обслуговуванню і перевірці на працездатність.

Водопостачання при пожежах залежить від вогнестійкості приміщень та їх розміру, а також категорії виробництва. Водопровідна мережа на території підприємства обладнується пожежними гідрантами, від яких забирається вода для внутрішнього і зовнішнього гасіння пожежі.. На стіні будівлі, де розміщено гідрант, має бути відповідний вказівник.

Розташування кранів повинно забезпечувати подачу в кожне приміщення будівлі не менше двох струменів води. Якщо з технічних причин неможливо подавати необхідну кількість води із пожежного водопроводу або економічно не вигідно, то передбачають створення недоторканого запасу води в водоймищах-резервуарах. Об'єм недоторканого запасу води в резервуарах визначається із розрахунку гасіння пожежі протягом 3 годин [33].

7 ЦИВІЛЬНИЙ ЗАХИСТ

7.1 Розробка аварійної картки для діоксиду сірки (НХР), що використовується в технологічних процесах на виноробних підприємствах

Цивільний захист — це система організаційних інженерно-технічних, санітарно-гігієнічних, протиепідемічних та інших заходів, які здійснюються центральними і місцевими органами виконавчої влади, органами місцевого самоврядування, підпорядкованими їм силами і засобами, підприємствами, установами та організаціями незалежно від форми власності, добровільними рятувальними формуваннями, що забезпечують виконання цих заходів із метою запобігання та ліквідації надзвичайних ситуацій, які загрожують життю та здоров'ю людей, завдають матеріальних збитків у мирний час і в особливий період [31].

Метою цивільного захисту на підприємстві є забезпечення захисту виробничого персоналу в надзвичайних ситуаціях і створення умов для своєчасного та якісного проведення рятувальних та інших невідкладних робіт на відповідному об'єкті для ліквідації наслідків надзвичайних ситуацій [41].

На сьогоднішній день, найвикористовуванішим консервантом, антиоксидантом та антисептиком у виноробній промисловості залишається діоксид сірки. Його використовують практично на всіх виноробних підприємствах. SO_2 являє собою безбарвний газ із різким задушливим запахом, що нагадує запах палаючого сірника. Він є вибухонебезпечною високотоксичною речовиною, яка при пожежі, вибуху або розсипу може вкрай негативно впливати на здоров'я та життя людей (працівників виноробних підприємств).

Так, ознаками отруєння дихальних шляхів є нежить, кашель, задишка, печіння, сильне першіння в горлі та своєрідний присмак. При вдиханні сірчистого газу вищої концентрації — ядуха, розлад мови, утруднення ковтання, блювання, гострий набряк легень. При забрудненні шкіри з'являється сильне подразнення та роз'їдання. При потраплянні в очі — серйозне пошкодження/подразнення.

Міри з надання першої медичної допомоги постраждалим від отруєння наступні:

1. При отруєнні інгаляційних шляхів — перемістіть постраждалого в незаражене місце, одягнувши автономний дихальний апарат. Постраждалий повинен перебувати у теплі та у стані спокою. Зробіть штучне дихання у разі його припинення. Зверніться за медичною допомогою.

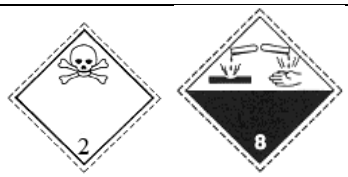
2. При пошкодженні шкіри — зніміть забруднений одяг. Змочуйте пошкоджену ділянку водою протягом не менше 15 хвилин. У разі обмороження поливайте водою протягом щонайменше 15 хвилин. Накладіть стерильну пов'язку. Зверніться за медичною допомогою.

3. При потраплянні в очі — негайно промийте очі протягом 15 хвилин великою кількістю води. У разі збереження роздратування зверніться за допомогою до медичного персоналу.

7.1.1 Аварійна картка діоксиду сірки

Аварійна картка, розроблена для діоксиду сірки, наведена в таблиці 7.1.

Таблиця 7.1 — Аварійна картка НХР

Найменування речовини	**Номер ООН**	**Ступінь токсичності**
Двоокис сірки зріджений (Ангідрид сірчистий; Сірки діоксид)	1079	3
ОСНОВНІ ВЛАСТИВОСТІ ТА НЕБЕЗПЕЧНІ ФАКТОРИ		
Основні властивості	Безбарвний газ із характерним різким подразнюючим запахом, у незначній кількості розчинний у воді. Газоподібний діоксид сірки у 2,5 рази важчий за повітря, накопичується у низьких ділянках поверхні, підвалах, тунелях. Корозійний. Під впливом низьких температур до мінус 75,5 °С набуває твердого стану, кипить при температурі мінус 10 °С. Під дією тиску скраплюється.	
Вибухо- та пожежонебезпека	Негорюча речовина. Ємності можуть вибухати при нагріванні. Взаємодія з металами при зволоженні може викликати утворення займистих газів.	
МАРКУВАННЯ		
Ідентифікаційний номер небезпеки		
Характеристика небезпеки	H280 — Містить газ під тиском, при нагріванні може вибухати H331 — Токсична при вдиханні H314 — Викликає серйозні опіки шкіри та пошкодження очей EUH071 — Роз'їдає дихальні шляхи	
ДІЇ ЩОДО ЗАХИСТУ ПІД ЧАС ЛІКВІДАЦІЇ НАСЛІДКІВ АВАРІЇ		
Гасити пожежу з максимально можливої відстані, за якої забезпечується гасіння пожежі. Охолоджувати ємності водою. Не наближатися до ємностей. Для розсіювання (осадження, ізоляції) парів використовувати розпилену воду. Встановити небезпечну зону в радіусі не менше 200 м. Розміри зони хімічного забруднення уточнюються за результатами хімрозвідки. Викликати газорятувальну службу району. Повідомити в СЕС. Усунути витікання з дотриманням запобіжних заходів. При інтенсивному витіканні дати газу цілком вийти. Триматися навітряного боку. Уникати низьких місць. У небезпечну зону входити в засобах захисту. Потерпілим надати першу допомогу. Відправити людей з осередку ураження на медобстеження. Не торкатися до розлитої		

речовини. Організувати евакуацію людей з урахуванням напрямку руху хмари токсичного газу.
ВОГНЕГАСНІ РЕЧОВИНИ
За наявності розлиття використовувати розпилену воду. Для гасіння пожежі використовувати засоби, найбільш придатні для гасіння речовини, що горить.
ЗАСОБИ ІНДИВІДУАЛЬНОО ЗАХИСТУ, ЯКІ РЕКОМЕНДУЮТЬСЯ
Ізольовані протигази ІП-4М, УІП-12, спецодяг; для хімрозвідки — ПДУ-З.
ОЗНАКИ УРАЖЕННЯ
Діоксид сірки — сильнодіюча отруйна речовина, яка має загальнотоксичну і подразнюючу дію на організм людини, а також викликає хімічні опіки. При вдиханні у високих концентраціях викликає задишку, задуху, синюшність шкіри, збудження, гучне клекотливе дихання, непритомність; при середніх і низьких концентраціях — різкий загрудинний біль, болісний сухий кашель, задишку, багато пінистого мокротиння, серцебиття. При потраплянні на шкіру та в очі викликає подразнення та/або хімічний опік. При вибухах можливі травми.
ЗАХОДИ ПЕРШОЇ ДОПОМОГИ
Викликати швидку медичну допомогу. Особи, які надають першу допомогу, повинні використовувати індивідуальні засоби захисту органів дихання та шкіри. Вивести потерпілого із забрудненої зони, звільнити від забрудненого одягу, розстебнути одяг, який утруднює дихання. Дати потерпілому зволожений кисень. Місця ураження шкіри негайно промити великою кількістю мильної води, потім змити мильну воду струменем чистої теплої води протягом 10-15 хв. Обережно видалити вологу з уражених ділянок тіла за допомогою м’якого чистого рушника. Штучне дихання тільки при зупинці дихання і кровообігу.
НЕЙТРАЛІЗАЦІЯ
Для осадження (розсіювання, ізоляції) газу використовувати розпилену воду. Місце розливу промити великою кількістю води, лужними розчинами. Ізолювати піском, повітряно-механічною піною. Промиті поверхні рухомого складу, території обробити лужним розчином (вапняним молоком, розчином кальцинованої соди). Пошкоджені ємності (балони) винести із зони аварії, перекинути в ємкість із водою, слабким лужним розчином.

7.1.2 Рекомендації щодо дотримання мір безпеки при роботі з діоксидом сірки та в разі надзвичайних ситуацій

Балони з діоксидом сірки мають бути герметичні. Обов’язковою є присутність обладнання, що забезпечує контроль за складом повітряного середовища у робочих приміщеннях, витяжною вентиляцією для провітрювання приміщень. Необхідно застосовувати заходи, що запобігають падінню, ударам один об одного, пошкодженню балонів. З речовиною потрібно працювати відповідно до вимог промислової гігієни та правил техніки безпеки. Тільки досвідчені та відповідно підготовлені працівники повинні працювати зі стислими газами.

Необхідно забезпечити повну (або регулярну) перевірку газової системи щодо витоків перед використанням. Заборонено палити, працюючи з газом. Рекомендується використовувати лише обладнання, яке підходить для цього продукту, тиску його подачі та температури. У разі сумнівів, необхідно зв’язатися з постачальником.

Рекомендується встановити пристрій для перехресного продування між балоном та регулятором. Продувайте систему сухим інертним газом (наприклад, гелієм або воднем) перед тим, як у неї буде подано газ, і в той час, коли система перебуває в неробочому стані. Уникайте зворотного просочування води, кислоти та лугів. Заборонено вдихати газ і допускати його потрапляння до атмосфери.

Необхідно забезпечити загальну та локальну систему вентиляції. Із продуктом необхідно працювати у замкнутій системі, яка повинна постійно перебувати під тиском і перевірятися на відсутність витоків. У випадках, коли можуть виділятися токсичні речовини, слід використовувати детектори сигналізації. Не можна викидати діоксид сірки в атмосферу.

Транспортування балонів повинне проводитися в горизонтальному положенні з прокладками між балонами або у вертикальному положенні з обов’язковим огородженням від можливого падіння.

У разі пожежі використовуйте розпилену воду, туман або сухий порошок. Не допускається використання вуглекислого газу або струмені води. При тушінні пожежі обов’язково потрібно використовувати автономний дихальний апарат і захисний від хімічного впливу одяг. Потрібно охолодити контейнери, що опинилися в небезпеці, розпиливши воду з безпечного місця. Не можна спускати забруднену воду для пожежогасіння у водостік. По можливості необхідно зупинити потік продукту і перемістити контейнери подалі від зони пожежі.

Не можна використовувати газ не за призначенням [33].

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

У даній кваліфікаційній роботі було проаналізовано існуючі антисептичні альтернативи діоксиду сірки, а також досліджено вплив рослинного препарату на основі фенольних екстрактів *ESTAAN* нідерландської компанії *Biolethics Europe* на сторонні мікроорганізми у вині, на прикладі *Brettanomyces spp*. та *Oenococcus oeni,* а також його антимікробний потенціал як альтернативи сульфітації у виноробстві.

На підставі проведеного аналізу та експериментів було зроблено наступні висновки:

1. Фізичні методи заміни сульфітації є ефективними, однак, вони вимагають наявності спеціального коштовного обладнання та можуть негативно впливати на якість готової продукції.
2. Серед хімічних альтернатив діоксиду сірки, ДМДК є відносно токсичним та потребує спеціальне обладнання; лізоцим може викликати алергічні реакції; нізин не є дозволеним до використання у виноробній промисловості.
3. Порівняно з іншими хімічними альтернативами, фенольні сполуки — відносно безпечні, мають явно виражену антиоксидантну та антимікробну дію. Вони також мають важливий вплив на органолептичні властивості, такі як колір, терпкість і гіркота тощо.
4. Фенольний препарат на основі рослинних екстрактів *Estaan* нідерландської компанії *Biolethics Europe* є ефективним для пригнічення росту і розвитку дріжджів роду Brettanomyces у кількості 4 $см^3$ на 1 $дм^3$ розчину на тому ж самому рівні, що й стандартні концентрації діоксиду сірки. Крім того, він діє як антиоксидант, інгібуючи дію ферментів лаккази та тирозинази, що особливо важливо при виробництві білих виноматеріалів, має антибактеріальний ефект, є органолептично нейтральним, а також не викликає алергічних реакцій.

Проведено дисперсійний аналіз достовірності результатів експерименту, обґрунтовано соціально-економічну ефективність роботи, наведені заходи із забезпечення умов охорони праці, а також цивільного захисту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. A Winery-Scale Trial of the Use of Antimicrobial Plant Phenolic Extracts as Preservatives During Wine Ageing in Barrels/ E. M. González-Rompinelli et al. *Food Control*. 2013. № 33 (2). P. 440–447.
2. Agnolucci M., Tirelli A., Cocolin L., Toffanin A. *Brettanomyces Bruxellensis* Yeasts. Impact on wine and winemaking. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017. № 33 (10). P. 180.
3. Analysis of Transcriptomic Response to SO_2 by *Oenococcus oeni* Growing in Continuous Culture/ C.A. Onetto et al. *Microbiology spectrum*. 2021. № 9 (2).
4. Antimicrobial Phenolic Extracts Able to Inhibit Lactic Acid Bacteria Growth and Wine Malolactic Fermentation/ A. García-Ruiz et al. *Food Control*. 2012. № 28 (2). P. 212–219.
5. Botha J. J. Sensory, Chemical and Consumer Analysis of *Brettanomyces* Spoilage in South African Wines: thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of master of science in food science. Stellenbosch University, 2010. 160 p.
6. Brettanomyces Yeasts — From Spoilage Organisms to Valuable Contributors to Industrial Fermentations/ J. Steensels et al. *International journal of food microbiology*. 2015. № 206. P. 24–38.
7. Cell Membrane Damage Induced by Phenolic Acids on Wine Lactic Acid Bacteria/ F. M. Campos et al. *International Journal of Food Microbiology*. 2009. № 135 (2). P. 144–151.
8. Commission Delegated Regulation (EU) № 2019/934 from 2019-10-31. URL: https://www.legislation.gov.uk/eur/2019/934/2019-10-31.
9. Commission Implementing Regulation (EU) № 203/2012 from 2013-03-09. URL: https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:071:0042:0047:en:PDF.
10. Comparative Study of the Inhibitory Effects of Wine Polyphenols on the Growth of Enological Lactic Acid Bacteria/ A. García-Ruiz et al. *International Journal of Food Microbiology*. 2011. № 145 (2-3). P. 426–431.
11. Estaan. *Biolethics Europe*: веб-сайт. URL: https://biolethics.com/estaan/.
12. Fröhlich J., König H., Unden G. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. *Springer International Publishing*. 2017.
13. Growth Inhibitory Effect of Grape Phenolics against Wine Spoilage Yeasts and Acetic Acid Bacteria/ E. Pastorkova et al. *International Journal of Food Microbiology*. 2013. № 161 (3). P. 209–213.
14. Gutiérrez-Escobar R., Aliaño-González M. J., Cantos-Villar E. Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties. *Molecules*. 2021. № 26 (3).
15. Hao Z., Zhang Y., Sun Z., Li X. Chitooligosaccharide as A Possible Replacement for Sulfur Dioxide in Winemaking. *Applied Sciences*. 2020. № 10 (2). P. 578.

16. International Code of Oenological Practices (OIV). Issue 2019. Paris, 2019. URL: https://www.oiv.int/.
17. Jolly N. P., Varela C., Pretorius I. S. Not Your Ordinary Yeast. Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production Uncovered. *FEMS Yeast Research*. 2014. № 14 (2). P. 215–237.
18. Kalkan Y., Darici B. (2020): Alternative Methods of Sulfur Dioxide Used in Wine Production. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*. 2020. № 9 (4). P. 675–687.
19. Lisanti M. T., Blaiotta G., Nioi C., Moio L. Alternative Methods to SO_2 for Microbiological Stabilization of Wine. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019. № 18 (2). P. 455–479.
20. López I. Evaluation of Lysozyme to Control Vinification Process and Histamine Production in Rioja Wines. In *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009. № 19 (9). P. 1005–1012.
21. Molecular Diagnosis of *Brettanomyces Bruxellensis*' Sulfur Dioxide Sensitivity Through Genotype Specific Method/ M. Avramova et al. *Frontiers in Microbiology*. 2018. № 9. P. 1260.
22. Potential of Phenolic Compounds for Controlling Lactic Acid Bacteria Growth in Wine/ A. García-Ruiz et al. *Food Control*. 2008. № 19 (9). P. 835–841.
23. Production and Antimicrobial Activity of Nisin Under Enological Conditions/ R. Fernández-Pérez et al. *Frontiers in Microbiology*. 2018. № 9. P. 1918.
24. Stivala M. G., Villecco M. B., Enriz D., Aredes Fernández P. Effect of Phenolic Compounds on Viability of Wine Spoilage Lactic Acid Bacteria. A Structure-Activity Relationship Study. *American Journal of Enology and Viticulture*. 2017. № 68 (2). P. 228–233.
25. Suárez R., Suárez-Lepe J. A., Morata A., Calderón F. The Production of Ethylphenols in Wine by Yeasts of the Genera *Brettanomyces* and *Dekkera*. A review. *Food Chemistry*. 2007. № 102 (1). P. 10–21.
26. Šućur S., Čadež N., Košmerl T. (2016): Volatile Phenols in Wine. Control Measures of *Brettanomyces/Dekkera* Yeasts. *Acta Agriculturae Slovenica*. 2016. № 107 (2). P. 453.
27. Vaquero M. J., Alberto M. R., Nadra M. Antibacterial Effect of Phenolic Compounds from Different Wines. *Food Control*. 2007. № 18 (2). P. 93–101.
28. Грегірчак Н. М. Мікробіологія харчових виробництв. Лабораторний практикум. Київ: НУХТ, 2009. 302 с.
29. ДСТУ 4806:2007. Вина. Загальні технічні умови. [Чинний від 2007-01-01]. Київ: Держспоживстандарт України, 2008. 14 с.
30. ДСТУ 4807:2007. Вина ігристі. Технічні умови. [Чинний від 2007-07-05]. Київ: Держспоживстандарт України, 2008. 14 с.
31. Кодекс цивільного захисту України від 02 жовтня 2012 р. № 5403-VI. *Відомості Верховної Ради України*. 2013. № 34-35. Ст. 458.

32. Методичні рекомендації до виконання кваліфікаційної роботи на здоб. осв. ступеня «магістр» спец. 181 «Харчові технології» освітньо-професійної програми «Технології продуктів бродіння і виноробства» ден. та заоч. форм навч. [Електронний ресурс]/ уклад. А.М. Куц, В.Л. Прибильський, М.В. Білько. Київ: НУХТ, 2022. 66 с.
33. Методичні рекомендації до виконання розділу «Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях» дипломного проекту, магістерської роботи для студ. спец. 7.05170112, 8.05170112 «Технології харчування» ден. та заоч. форм навч. [Електронний ресурс]/ уклад. В.С. Гуць, О.А. Коваль. Київ: НУХТ, 2014. 67с.
34. Новикова И.В., Юрицин И.А., Муравьев А.С. Исследования влияния интенсивности аэрации на жизнедеятельность дрожжей *Brettanomyces bruxellensis*. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019. Т. 9, № 1. С. 102-108.
35. Про затвердження Правил охорони праці для виноробного виробництва: наказ М-ва надзвичайних ситуацій України від 26 листоп. 2012 р. № 1351. *Офіційний вісник України*. 2013. № 99. Ст. 4021.
36. Про об'єкти підвищеної небезпеки: Закон України від 19 січня 2001 р. № 2245-III. *Відомості Верховної Ради України*. 2001. №15. Ст. 73.
37. Про охорону праці: Закон України від 24 листоп. 1992 р. № 2695-XII. *Відомості Верховної Ради України*. 1992. № 49. Ст. 668.
38. Сірик А.О. Безпека життєдіяльності та охорона праці: конспект лекцій для здоб. осв. ступеня «бакалавр» спец. 181 «Харчові технології». Київ: НУХТ, 2020. 73 с.
39. Статистичні задачі та аналіз в технологіях: лаб. практикум для здоб. осв. ступеня «магістр» спец. 161 «Хімічні технології та інженерія» освітньо-професійної програми «Хімічні технології харчових добавок та косметичних засобів» ден. та заоч. форм навч./ уклад. Т. Г. Мисюра, Н.В. Попова. Київ: НУХТ, 2019. 127 с.
40. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина/ Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Пущино, 2013. 311 с.
41. Цивільний захист на підприємствах харчової промисловості: навч. посіб./ О. В. Хіврич, Б. Д. Халмурадов, О. П. Слободян, Н.В. Володченкова та ін. Київ: ЦУЛ, 2015. 192 с.

ДОДАТОК А

Затверджена на засіданні кафедри
біотехнології продуктів бродіння і
виноробства НУХТ,
протокол №
від 2022 р.
Зав. кафедри Анатолій КУЦ

РОБОЧА ПРОГРАМА
кваліфікаційної роботи на тему:
«Обґрунтування вибору рослинних фенольних екстрактів як антисептичної альтернативи діоксиду сірки в технології виноградних вин»

Виконавиця: магістрантка
Оваденко Олена Рафіківна

Керівник: професор, д.т.н.
Білько Марина Володимирівна

Київ НУХТ 2023

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ
ВСТУП
1 СУЧАСНІ АНТИМІКРОБНІ АЛЬТЕРНАТИВИ ДІОКСИДУ СІРКИ У ВИНОРОБНІЙ ПРОМИСЛОВОСТІ (аналітичний огляд)
1.1 Загальна характеристика діоксиду сірки у виноробстві
1.2 Стороння мікрофлора виноматеріалів і вина
1.2.1 Дріжджі роду *Brettanomyces*
1.2.2 Молочнокислі бактерії *Oenococcus oeni*
1.3 Хімічні альтернативи сульфітації
1.3.1 Диметилдикарбонат
1.3.2 Лізоцим
1.3.3 Хітозан
1.3.4 Нізин
1.4 Рослинні фенольні екстракти
1.5 Висновки з аналітичного огляду літератури, мета та задачі досліджень
2 МАТЕРІАЛИ, МЕТОДИ ТА МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ
2.1 Матеріали досліджень
2.2 Методи досліджень
2.3 Методика досліджень
3 ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ФЕНОЛЬНОГО ПРЕПАРАТУ ESTAAN НА МІКРООРГАНІЗМИ (експериментальна частина)
3.1 Дослідження впливу Estaan на дріжджі роду *Brettanomyces*
3.1.1 Результати попередніх випробувань із *Brettanomyces*
3.2.1 Результати основного експерименту з *Brettanomyces*
3.2 Дослідження впливу Estaan на молочнокислі бактерії *Oenococcus oeni*
3.3 Висновки
4 ОПТИМІЗАЦІЯ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ
5 СОЦІАЛЬНО-ЕКОНОМІЧНА ЕФЕКТИВНІСТЬ РОБОТИ
6 ОХОРОНА ПРАЦІ
7 ЦИВІЛЬНИЙ ЗАХИСТ
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ
ДОДАТКИ

Здобувачка Олена ОВАДЕНКО

Керівник роботи, професор Марина БІЛЬКО

ДОДАТОК Б

Таблиця 1. Табличні значення F-критерія Фішера

$\alpha = 0{,}05$

k_2 \ k_1	1	2	3	4	5	6	8	12	24	∞
1	161,45	199,50	215,72	224,57	230,17	233,97	238,89	243,91	249,04	234,52
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,37	19,41	19,45	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,84	8,74	8,64	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,04	5,91	5,77	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,82	4,68	4,53	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,15	4,00	3,84	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,73	3,57	3,41	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,44	3,28	3,12	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,23	3,07	2,90	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,07	2,91	2,74	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	2,95	2,79	2,61	2,40
12	4,75	3,88	3,49	3,26	3,11	3,00	2,85	2,69	2,50	2,30
13	4,67	3,80	3,41	3,18	3,02	2,92	2,77	2,60	2,42	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,70	2,53	2,35	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,64	2,48	2,29	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,59	2,42	2,24	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,55	2,38	2,19	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,51	2,34	2,15	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,48	2,31	2,11	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,45	2,28	2,08	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,42	2,25	2,05	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,40	2,23	2,03	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,38	2,20	2,00	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,36	2,18	1,98	1,73
25	4,24	3,38	2,99	2,76	2,60	2,49	2,34	2,16	1,96	1,71
26	4,22	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,32	2,15	1,95	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,30	2,13	1,93	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,44	2,29	2,12	1,91	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,54	2,43	2,28	2,10	1,90	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,27	2,09	1,89	1,62
35	4,12	3,26	2,87	2,64	2,48	2,37	2,22	2,04	1,83	1,57
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,18	2,00	1,79	1,51
45	4,06	3,21	2,81	2,58	2,42	2,31	2,15	1,97	1,76	1,48
50	4,03	3,18	2,79	2,56	2,40	2,29	2,13	1,95	1,74	1,44
60	4,00	3,15	2,76	2,52	2,37	2,25	2,10	1,92	1,70	1,39
70	3,98	3,13	2,74	2,50	2,35	2,23	2,07	1,89	1,67	1,35
80	3,96	3,11	2,72	2,49	2,33	2,21	2,06	1,88	1,65	1,31
90	3,95	3,10	2,71	2,47	2,32	2,20	2,04	1,86	1,65	1,31
100	3,94	3,09	2,70	2,46	2,30	2,19	2,03	1,85	1,63	1,26
125	3,92	3,07	2,68	2,44	2,29	2,17	2,01	1,83	1,60	1,21
150	3,90	3,06	2,66	2,43	2,27	2,16	2,00	1,82	1,59	1,18
200	3,89	3,04	2,65	2,42	2,26	2,14	1,98	1,80	1,57	1,14
300	3,87	3,03	2,64	2,41	2,25	2,13	1,97	1,79	1,55	1,10
400	3,86	3,02	2,63	2,40	2,24	2,12	1,96	1,78	1,54	1,07
500	3,86	3,01	2,62	2,39	2,23	2,11	1,96	1,77	1,54	1,06
1000	3,85	3,00	2,61	2,38	2,22	2,10	1,95	1,76	1,53	1,03
∞	3,84	2,99	2,60	2,37	2,21	2,09	1,94	1,75	1,52	1,00

Рівень значущості α = 0,01												
k_2	k_1											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	4052	4999	5403	5625	5764	5889	5928	5981	6022	6056	6082	6106
2	98,49	99,01	99,17	99,25	99,30	99,33	99,34	99,36	99,38	99,40	99,41	99,42
3	34,12	30,81	29,46	28,71	28,24	27,91	27,67	27,49	27,34	27,23	27,13	27,05
4	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,98	14,80	14,66	14,54	14,45	14,37
5	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,67	10,45	10,27	10,15	10,05	9,96	9,89
6	13,74	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,26	8,10	7,98	7,87	7,79	7,72
7	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	7,00	6,84	6,71	6,62	6,54	6,47
8	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,19	6,03	5,91	5,82	5,74	5,67
9	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,62	5,47	5,35	5,26	5,18	5,11
10	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,21	5,06	4,95	4,85	4,78	4,71
11	9,86	7,20	6,22	5,67	5,32	5,07	4,88	4,74	4,63	4,54	4,46	4,40
12	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,65	4,50	4,39	4,30	4,22	4,16
13	9,07	6,70	5,74	5,20	4,86	4,62	4,44	4,30	4,19	4,10	4,02	3,96
14	8,86	6,51	5,56	5,03	4,69	4,46	4,28	4,14	4,03	3,94	3,86	3,80
15	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,14	4,00	3,89	3,80	3,73	3,67
16	8,53	6,23	5,29	4,77	4,44	4,20	4,03	3,89	3,78	3,69	3,61	3,55
17	8,40	6,11	5,18	4,67	4,34	4,10	3,93	3,79	3,68	3,59	3,52	3,45

ДОДАТОК В

Міністерство освіти і науки України
24-та секція за фаховим напрямом
«Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології»
Наукової ради Міністерства освіти і науки України
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

XI МІЖНАРОДНА НАУКОВО-ТЕХНІЧНА КОНФЕРЕНЦІЯ

"Наукові проблеми харчових технологій та промислової біотехнології в контексті євроінтеграції"

ПРОГРАМА ТА ТЕЗИ МАТЕРІАЛІВ

8 листопада 2022 р.

Присвячена 45-й річниці створення
Проблемної науково-дослідної лабораторії НУХТ

КИЇВ НУХТ 2022

УДК 663.253

2. THE STUDY OF ORGANIC ACID EFFECT ON THE FORMATION OF MINERALITY PERCEPTION IN WHITE WINES

O.R. Ovadenko*, A. Tarasov, M.V. Bilko*

**National University of Food Technologies, Kyiv, Ukraine*

University of Geisenheim, Geisenheim, Germany

Recently, the term "*minerality" has been increasingly used to describe the wine sensory properties. At the same time, there is no uniform understanding of wine "minerality" among tasters. Some perceive* it primarily as a smell, some as a taste, and there are some other for whom "minerality" is a specific mouthfeel sensation.

According to Hanan I. et al., "minerality" is defined as perception of aromatics (smell) and nonvolatile minerals (aroma) generally associated with a liquid which is kept in a clay vessel over several days and resembles a wet soil after the rainy day [1].

Minerality is mainly associated with white wines. The imprint of "minerality" is typical of such whites as Riesling, Chardonnay, Chenin Blanc, Sauvignon Blanc, and Albariño. In many cases these are dry white wines of high acidity and corresponding poor fruity aroma profile, grown in a cold environment, harvested at the stage of technical maturity, and having a high CO_2 content [2].

Over the past 20 years, several investigations were carried out on the origin of wine "minerality" to identify the substances responsible for the development of this perception. The investigations were aimed at studying the influence of a terroir and vineyard soil, certain varieties of grapes and methods of their treatment, and wine chemical components. As is evident from the analysis of the results obtained, there is no consensus of opinion among scientists on this issue.

The objective of our study was as follows:

1) to take a further look at the effect of organic acids on the development of wine mineral taste, since this factor is often mentioned when describing wines manufactured in a cool climate marked by the acidic wines;

2) to reveal the effect of thiols, C_{13}-norisoprenoids, and extraction of oak chips on the

formation of "minerality" tones in wine aroma.

In the course of study, dry white Riesling wines from 2020 vintage were used (their concentration of residual sugars being 7,8 g/l, titrating acids – 7,1 g/l, and ABV – 12,5 %. To evaluate the taste minerality, it was decided to add tartaric, malic and lactic acids, 1 g/L each in terms of tartaric acid, namely: 0,75 g TA, 0,67 g MA and 0,45 g LA per 0.75 l of wine. For the aroma minerality, we chose to add 12 μg/l of 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronapthalene (TDN), 0.35 μg/l of ethanethiol (EtSH) and an oak chips wine solution. Sixteen experts were engaged in the evaluating wine minerality with the help of a triangle test, as well as a ranking test.

The results obtained made it apparent that the samples with adding tartaric acids were reasonably noteworthy, but the experts distinguished an increase in the acidic descriptor to a greater extent than in the mineral one. TDN and EtSH were found in their perception threshold by almost all participants. At the same time, the mineral topnotes in the TDN and EtSH samples were noticed by less than 50 % of participants, while most of tasters described the aroma as petrol-like. For the most part, the participants marked the samples with EtSH as acceptable for the "mineral" wine. As to ranking test, most participants consider samples with lactic acid (among other acids) and oak (among aromas) to have the strongest associations with minerality. This runs counter to the previous hypotheses that both lactic acid and oak are negative predictors of minerality.

So to sum up, it is clear from the results obtained that "minerality" does not strongly depend on the acid content. Moreover, not all the participants have associated "minerality" and petrol-like aromas, provided by TDN and EtSH. Nonetheless, this topic is only in its infancy and calls for further investigations regarding the compounds responsible for the specific "mineral" taste and smell characteristics.

References

1. Effect of Aging Vessel (Clay-Tinaja versus Oak Barrel) on the Volatile Composition, Descriptive Sensory Profile, and Consumer Acceptance of Red Wine / Hanan, I.; Lipan, L.; Cano-Lamadrid, M. et. al. *Beverages*. 2021, 7 (2), 35.

2. Zaldivar-Santamaria E.; Daga D. M.; Garcia A. T. Statistical Modelization of the Descriptor "Minerality" Based on the Sensory Properties and Chemical Composition of Wine. *Beverages*. 2019, 5 (4), 66.

EUROPEAN CONFERENCE

Conference Proceedings

The XI International Science Conference «Theoretical approaches of Fundamental Sciences. Theory, Practice and prospects»

April 26 – 28, 2021

Geneva, Switzerland

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ ТАНИНА В ТЕХНОЛОГИИ ВИНОГРАДНЫХ ВИН

Оваденко Елена Рафиковна,
студентка IV курса
Национальный университет пищевых технологий, Украина

Билько Марина Владимировна,
доктор технических наук, доцент,
профессор кафедры биотехнологии продуктов
брожения и виноделия
Национальный университет пищевых технологий, Украина

Введение. Препараты танина нашли широкое применение в виноделии. Ранее их активно использовали при оклейке виноматериалов в комплексе с желатином и другими препаратами для стабилизации вин от помутнений. В современном виноделии препараты танина все чаще применяют еще на стадии переработки винограда как для белых и розовых, так и для красных вин. При обработке мезги или сусла до брожения препараты танина выступают в качестве антиоксидантов, способных предотвратить нежелательное окисление, образовывая комплексы с антоцианами и связывая белковую часть молекул оксидаз [1-2].

Танины делятся на два класса: конденсированные и гидролизируемые, различный химический состав которых обусловливает их технологические свойства.

Цель данной работы заключалась в определении влияния препаратов танина разного происхождения и химического состава на эффективность защиты красных сухих вин от окисления.

Объектом исследования были красные сухие виноматериалы, изготовленные из винограда сорта Мальбек в условиях микровиноделия.

В исследованиях были использованы препараты танина (Martin Vialatte, Франция), изготовленные из разного растительного сырья: галловых орешков, семян и кожицы винограда, коры и древесины дуба, каштана, акации, дерева квебрахо, которые имели разную химическую природу – конденсированные, гидролизуемые и смешанного типа.

Препараты танина вносили в мезгу винограда в количестве 2 г/дал одновременно с сульфитацией, из расчета 50-70 мг/дм^3, тщательно перемешивали и направляли на брожение по-красному способу.

В виноматериалах определяли массовые концентрации терпеновых спиртов, фенольных веществ, в том числе и антоцианов, а также редокс-потенциал. После сульфитации из расчета 20 мг/дм^3 виноматериалы подвергали индуцированному окислению, которое предусматривало выдержку образцов в термокамере со свободным доступом воздуха при температуре 45 ± 5 °С в течении 7 суток. В

виноматериалах определяли оптические показатели (интенсивность, оттенок цвета) до и после индуцированного окисления.

Результаты исследования показали, что использование гидролизируемых танинов способствует повышению содержания фенольных веществ в красных виноматериалах в среднем на 20 %, по сравнению с конденсированными танинами. При этом танины смешанного типа занимают промежуточное значение между конденсированными и гидролизируемыми.

Также было отмечено, что в образцах, технология которых предусматривала использование гидролизируемых танинов, содержание антоцианов увеличивалось на 13 % в сравнении с конденсированными танинами. Все препараты способствовали сохранению антоцианов, в отличие от контрольного образца, где танины не использовались.

Известно, что терпеновые спирты мацерируются из винограда и обусловливают цветочную ноту в аромате виноматериалов. Они, как и фенольные вещества, окисляются при переработке винограда [3]. Анализ содержания терпеновых спиртов в виноматериалах позволил установить, что во всех опытных образцах их значения были больше, чем в контроле, на 19…54 %. Зависимость влияния на этот показатель между конденсированными и гидролизируемыми танинами установить не удалось, хотя следует отметить, что наибольшее содержание терпеновых спиртов было в образце, где использовали танин кожицы белых сортов винограда, который относится к конденсированному типу.

Внесение препаратов танина в процессе производства виноматериалов сопровождалось подавлением окислительной полимеризации, на что указывало снижение значений начального редокс-потенциала на 2…43 мВ. Наибольшее значение было отмечено при использовании гидролизируемого танина галлового, а также конденсированного танина из кожицы белого винограда. Танин смешанного типа не показал существенной разницы с контролем.

Результаты исследования оптических показателей виноматериалов после индуцированного окисления позволили установить, что в образцах усилились оттенки желтой составляющей в цвете и уменьшились красные пигменты. Наивысшие значения интенсивности цвета и оттенка были отмечены при использовании гидролизируемых танинов. Полученные результаты указывают на сохранение антоцианов гидролизируемыми танинами за счет снижения активности оксидаз еще на стадии переработки винограда, вместе с тем предотвращение окисления фенольных веществ приведет к увеличению значений оттенка цвета, что связано с их окислением на стадии хранения.

Вывод. Таким образом, использование препаратов гидролизируемого танина в технологии красных вин позволяет увеличить содержание фенольных и красящих веществ, защитить антоцианы от окисления, стабилизировать цвет вина, не оказывая при этом существенного влияния на его вкусовые и ароматические свойства.

Список литературы

1. Способи підвищення та збереження біологічної цінності червоних столових вин/ М.В. Білько та ін. *Біоресурси та природокористування*. 2018. Том 10, №3-4. С. 228-234.

2. Яковенко Т., Білько М.В. Дослідження застосування танінів для захисту антоціанів червоних столових вин. *Наукові здобутки молоді—вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті*: зб. матеріалів доп. учасн. 84 Міжнар. наук. конф. Київ: НУХТ, 2018. С. 260.

3. Ткаченко О.Б., Тринкаль О.В. Химия ароматов вина. *Харчова наука і технологія*. 2015. №1. С. 42-50.