

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mitja KREVS

**OPTIMIZACIJA OCETNOKISLINSKE
FERMENTACIJE JABOLČNIH VIN**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mitja KREVS

**OPTIMIZACIJA OCETNOKISLINSKE FERMENTACIJE
JABOLČNIH VIN**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

OPTIMIZATION OF ACETIC FERMENTATION OF CIDER

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Delo je bilo opravljeno na Katedri za tehnologije, prehrano in vino, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Rajka Vidriha, za somentorico prof. dr. Tatjano Košmerl in za recenzenta doc. dr. Tomaža Požrla.

Mentor: prof. dr. Rajko Vidrih

Somentorica: prof. dr. Tatjana Košmerl

Recenzent: doc. dr. Tomaž Požrl

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Mitja Krevs

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 663.318:661.741.1:579.67:543.92(043)=163.6
KG	sadna vina/jabolčno vino/kis/jabolčni kis/očetnokislinska fermentacija/tehnologija kisa/kemijska analiza/senzorična analiza
AV	KREVS, Mitja, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
SA	VIDRIH, Rajko (mentor)/KOŠMERL, Tatjana (somentorica)/POŽRL, Tomaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	OPTIMIZACIJA OCETNOKISLINSKE FERMENTACIJE JABOLČNIH VIN
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo)
OP	X, 53 str., 14 pregl., 11 sl., 10 pril., 97 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen magistrske naloge je bil, da z različnimi deleži suhe snovi (SS) v jabolčnem soku, ki smo ga pripravili z dodatkom jabolčnega koncentrata oz. saharoze, ugotovimo najbolj optimalen delež suhe snovi za očetnokislinsko fermentacijo. V prvem delu eksperimentalnega dela smo vodili alkoholno fermentacijo v jabolčnem soku iz jabolčnega koncentrata z deleži suhe snovi 13,5 %, 16,5 % in 19,5 % SS ter po dodatku saharoze jabolčnemu soku z 16,5 % in 19,5 % SS. Vsem vzorcem smo dodali kvasovke (Fermol Associées) in hrano (Enovit). Po končani alkoholni v fermentacijskih steklenicah in očetnokislinski fermentaciji, ki je potekala v acetatorju je bila izvedena kemijska in senzorična analiza vzorcev jabolčnega kisa. Rezultati kemijske analize so pokazali, da vsebnost skupnih kislin narašča z večjim deležem suhe snovi, ob tem pa je bil delež kislin večji pri vzorcih kisa z dodatkom jabolčnega koncentrata od tistih, ki jim je bila dodana saharoza. Hkrati se je pokazal vpliv višjega deleža suhe snovi na večjo vsebnost jabolčne kisline, metanola in sorbične kisline, skupnega ekstrakta in sladkorja prostega ekstrakta (SPE). Vzorci z večjim deležem suhe snovi so imeli tudi pričakovano nižji pH. Pri dodatku saharoze so bile vrednosti merjenih parametrov manjše v primerjavi s koncentratom. Najvišjo oceno sta dobila vzorca z največjim deležem suhe snovi. Ocene vzorcev so se gibale med 17,83 (vzorec kisa iz jabolčnega koncentrata s 16,5 % SS) in 18,65, ki jo je prejel vzorec kisa z 19,5 % SS, katerega smo pripravili z jabolčnim koncentratom. Senzorične ocene so pokazale podobne trende, kot rezultati kemijskih analiz. Vzorci kisa z višjo oceno oz. večjim deležem suhe snovi so namreč vsebovali tudi več skupnih in hlapnih kislin, skupni ekstrakt in sladkorja prosti ekstrakt je bil višji, vsebnost jabolčne, sorbične kisline je bila višja, prav tako je bilo prisotnega več glicerola, omenjeni dejavniki pa tudi pozitivno vplivajo na izoblikovanje končnega okusa, arome, vonja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
 DC UDK 663.318:661.741.1:579.67:543.92(043)=163.6
 CX fruit wines/apple wine/vinegar/cider vinegar/acetic fermentation/vinegar
 technology/physico-chemical analysis/sensory analysis
 AU KREVS, Mitja
 AA VIDRIH, Rajko (supervisor)/KOŠMERL, Tatjana (co-advisor)/POŽRL, Tomaž
 (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
 Technology
 PY 2016
 TI OPTIMIZATION OF ACETIC FERMENTATION OF CIDER
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
 NO X, 53 p., 14 tab., 11 fig., 10 ann., 97 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The purpose of the master thesis was to find out the optimum soluble solids (SS)
 content for acetic fermentation of cider produced from apple concentrate or cider
 produced from apple concentrate and fortified with the addition of sucrose. In the
 first part of the experiment we carried out the alcoholic fermentation of apple juice
 containing 13.5 %, 16.5 % and 19.5 % SS, and also after the addition of sucrose to
 apple juice with 16.5 % and 19.5 %. SS All the juice samples were provided with
 yeasts (Fermol Associées) and nutrients (Enovit). The alcoholic fermentation was
 carried out in bottles. After the completion of fermentation, wines were transferred
 to acetator, provided with blender, air input and temperature control. Chemical and
 sensory analyses were carried out in wines and vinegars. The results of chemical
 analysis showed that the content of total acids increases with higher content of
 soluble solids, at the same time the content of acids is higher in samples with apple
 concentrate addition, than in samples with the addition of sucrose. Higher SS
 content resulted in higher contents of malic acid, methanol, and sorbic acid, total
 extract and sugar-free extract. Samples with higher SS content had lower pH. The
 highest sensory score got samples with the highest level of SS. Scores correlate
 with chemical analysis. Scores have ranged between 17.83 (vinegar produced from
 apple concentrate with 16.5 % SS) and 18.65 which received the vinegar with 19.5
 % SS (prepared with apple concentrate). Sensory scores correlate positively with
 chemical analysis, vinegars with higher scores and highest level of SS contained
 more acids, total extract and sugar-free extract, malic acid, sorbic acid as well as
 more glycerol. These factors have positive affect on the formation of the final taste,
 flavor and smell.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KIS	3
2.1.1 Zgodovina kisa	4
2.1.2 Uporaba kisa	5
2.1.3 Vrste kisa	6
2.1.3.1 Sintetični kis	6
2.1.3.2 Naravni kis	6
2.1.3.2.1 Jabolčni kis	6
2.1.3.2.2 Vinski kis	7
2.1.3.2.3 Balzamični kis	8
2.1.3.2.4 Sladni kis	9
2.1.3.2.5 Rižev kis	10
2.1.3.2.6 Melasin kis	10
2.1.3.2.7 Medeni kis	10
2.1.3.2.8 Kis iz sirotke	10
2.1.3.2.9 Alkoholni kis	10
2.1.3.2.10 Sadni kis	11
2.2 PROIZVODNJA JABOLČNEGA KISA	11
2.2.1 Surovine in priprava	11
2.2.2 Alkoholna fermentacija	13
2.2.3 Očetnokislinska fermentacija	14
2.2.4 Zorenje	14
2.2.5 Bistrenje	15
2.2.6 Ultrafiltracija	15
2.2.7 Pasterizacija in polnjenje	16
2.2.8 Aditivi	16
2.3 TEHNOLOGIJE PROIZVODNJE KISA	17
2.3.1. Proizvodnja z uporabo površinske kulture	17
2.3.2 Proizvodnja z imobilizirano kulturo	18
2.3.3 Submerzni postopek proizvodnje kisa	19
2.3.4 Proizvodnja posebnih vrst kisa	22

2.5. ORGANSKE KISLINE	23
2.5.1 Očetna kislina.....	24
2.5.2 Jabolčna kislina	24
2.5.3 Vinska kislina.....	25
2.5.4 Citronska kislina.....	25
2.5.5 Mlečna kislina	25
2.5.6 Sorbična kislina	26
2.5.7 Glukonska kislina	26
2.5.8 Jantarna kislina	26
2.6. NAPAKE JABOLČNEGA KISA	27
2.7 SENZORIČNA ANALIZA	27
2.7.1 Uporaba senzorične analize	29
2.7.2 Senzorični preskusi.....	29
2.7.2.1 Opisna ali deskriptivna analiza.....	30
3 MATERIAL IN METODE	31
3.1 MATERIAL	31
3.1.1 Laboratorijska oprema	31
3.2 METODE DELA	32
3.2.1 Priprava vzorca.....	32
3.2.2 Potek fermentacije.....	32
3.2.3 Fizikalno-kemijske analize WineScanTM Foss	33
3.2.4 Senzorična analiza	34
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	36
5 SKLEPI	44
6 POVZETEK	45
7 VIRI	46
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO SLIK

Slika 1: Razširjenost različnih vrst kisa po svetu leta 2005 (The Vinegar Institute, 2016)...	6
Slika 2: Različne vrste sodov pri izdelavi tradicionalnega balzamičnega kisa (Plessi, 2003)	9
Slika 3: Shema proizvodnje jabolčnega kisa (Joshi in Sharma, 2009).....	13
Slika 4: Shematični prikaz proizvodnje kisa (Adams, 1985)	14
Slika 5: Slika soda za proizvodnjo kisa po orleanskem postopku (Adams, 1985).....	18
Slika 6: Shematični prikaz generatorja (Adams, 1985).....	19
Slika 7: Shema acetatorja (Adams, 1985)	21
Slika 8: Shematični prikaz Fringsovega acetatorja (Ebner in Follman, 1983).....	21
Slika 9: Vrednosti skupnih kislin, hlapnih kislin, jabolčne kisline, skupnega ekstrakta v jabolčnem kisu ter vsebnost alkohola v jabolčnem vinu.	38
Slika 10: Vzorci jabolčnega kisa in jabolčnega vina pred senzorično analizo	42
Slika 11: Vzorci kisov iz jabolčnega koncentrata z različnimi deleži suhe snovi (od leve proti desni, vzorec 1, vzorec 2 in vzorec 3).....	43

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Proizvodnja kisa v nekaterih evropskih državah (Adams, 1985)	5
Preglednica 2: Parametri sestave jabolčnega kisa (Joshi in Sharma, 2009)	22
Preglednica 3: Pregled senzoričnih preskusov (Golob in sod., 2005)	30
Preglednica 4: Legenda okrajšav vzorcev jabolčnega kisa in vina	33
Preglednica 5: Vrstni red vzorcev pri senzorični analizi	34
Preglednica 6: Preglednica za ocenjevanje vin z Buxbaumovo 20-točkovno metodo (Košmerl in Kač, 2009)	35
Preglednica 7: Preglednica za ocenjevanje kisa z 20-točkovno metodo	35
Preglednica 8: Čas alkoholne in očetnokislinske fermentacije	36
Preglednica 9: Vsebnost alkohola v vzorcih jabolčnega vina po alkoholni fermentaciji	36
Preglednica 10: Vsebnost skupnega ekstrakta, skupnih in hlapnih kislin ter jabolčne kisline v vzorcih kisa	37
Preglednica 11: Vsebnost alkohola, glicerola in metanola v vzorcih kisa	38
Preglednica 12: Vrednost relativne gostote pri 20 °C in pH v vzorcih kisa	40
Preglednica 13: Rezultati senzorične analize jabolčnih vin	40
Preglednica 14: Rezultati senzorične analize vzorcev kisa	41

KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Povprečna vsebnost alkohola v vzorcih jabolčnih vin
- PRILOGA B: Povprečna vsebnost skupnih in hlapnih kislin v vzorcih kisa
- PRILOGA C: Povprečna vsebnost jabolčne kisline v vzorcih kisa
- PRILOGA D: Povprečne vrednosti skupnega ekstrakta v vzorcih kisa
- PRILOGA E: Povprečna vsebnost alkohola v vzorcih kisa
- PRILOGA F: Povprečne vrednosti pH v vzorcih kisa
- PRILOGA G: Povprečna vsebnost glicerola v vzorcih kisa
- PRILOGA H: Povprečna vsebnost sorbične kisline v vzorcih kisa
- PRILOGA I: Povprečna vsebnost metanola v vzorcih kisa
- PRILOGA J: Povprečne skupne ocene senzorične analize vzorcev kisa

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

°Brix	vsebnost sladkorja v vodni raztopini
% SS	delež suhe snovi
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (angl. Food and Drug Administration)
GRAS	splošno priznano kot varno (angl. Generally Recognized as Safe)
GLM	(angl. General Linear Model).
JAB. 13,5	jabolčni koncentrat s 13,5 % deležem suhe snovi
JAB. 16,5	jabolčni koncentrat s 16,5 % deležem suhe snovi
JAB. 19,5	jabolčni koncentrat s 19,5 % deležem suhe snovi
SAH. 16,5	jabolčni koncentrat z dodatkom saharoze s 16,5 % deležem suhe snovi
SAH. 19,5	jabolčni koncentrat z dodatkom saharoze s 19,5 % deležem suhe snovi
kDa	kilodalton
MKB	mlečno kislinske bakterije
SPE	sladkorja prostega ekstrakta
SS	suha snov
SO ₂	žveplov dioksid
vol.	volumski

1 UVOD

Kis je razredčena raztopina očetne kisline v vodi. Očetna kislina nastane v procesu oksidacije etanola s pomočjo očetnokislinskih bakterij. Kis je zelo pogosto uporabljeno živilo v vsakdanji prehrani, ki se pogosto uporablja tudi kot sredstvo za konzerviranje zelenjave ali kot začimba. Tradicionalni kisi in alkoholne pijače v posameznih državah so pogosto proizvedene iz enake surovine.

Poznano več postopkov proizvodnje kisa, ki se razlikujejo predvsem glede na hitrost poteka očetnokislinske fermentacije, kar vpliva tudi na tvorbo sekundarnih metabolitov (Adams, 1985).

Kis je rezultat dvostopenjske fermentacije. V prvi fazi se sladkor, ki je prisoten v sokovih, v anaerobnih razmerah pretvori v alkohol s pomočjo kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. V drugi fazi pa se alkohol s pomočjo očetnokislinskih bakterij v aerobnih razmerah pretvori v očetno kislino. V zaključni fazi kis določen čas zori, pri tem pa se oblikujejo spojine, ki dajejo okus in aromo kisu (Solieri in Giudici, 2008).

V Sloveniji je največja proizvodnja in poraba jabolčnega, vinskega in alkoholnega kisa. Značilen okus kisa dajejo izbrane surovine ter spojine, ki nastanejo tekom fermentacije in v času zorenja. V prvi fazi alkoholne fermentacije, ko kvasovke pretvorijo sladkor v alkohol, se tvorijo mnogi sekundarni metaboliti. Prav tako tudi očetnokislinske bakterije med očetnokislinsko fermentacijo tvorijo nekatere nove aromatične spojine oz. stranske produkte metabolizma. Novonastale spojine, ki se tvorijo med procesom, oblikujejo končno aromo in okus posameznega kisa. Vsak kis tako pridobi svoj specifičen okus, ki je poleg naštetih dejavnikov odvisen tudi od postopka izdelave in uporabljene surovine. Poleg kisa pridobljenega s fermentacijo, poznamo tudi sintetični oz. nefermetiran kis, ki ga pridobimo iz očetne kisline nekmetijskega izvora in mora biti razredčen z vodo. Sintetični kis je osiromašen s senzoričnega in prehranskega vidika, čeprav mu dodajo tudi aromo in barvila. Zaradi nižjih stroškov proizvodnje ga uporabljajo tudi za potvarjanje naravnega kisa.

Kis velja tudi za dobro topilo eteričnih olj in začimb. Z dodatki začimb, zelišč, dišavnic in sadja, lahko naredimo kis po svojem okusu in potrebah. Največkrat se uporablja pri pripravi omak, začimb, solat in konzerviranje zelenjave.

1.1 NAMEN DELA

Namen naloge je bil z različnimi začetnimi deleži suhe snovi (SS) jabolčnega koncentrata, ki smo ga pripravili s pomočjo dodatka jabolčnega koncentrata oz. saharoze, ugotoviti najbolj optimalen delež suhe snovi za očetnokislinsko fermentacijo. Kot osnovno surovino smo uporabili jabolčni koncentrat podjetja Šampionka d.o.o., alkoholno fermentacijo pa smo izpeljali s pomočjo dodatka kvasovk Fermol Associées in hrane Enovit, medtem ko je očetnokislinska fermentacija potekala ob dodatku mikroflore iz kisa proizvedenega na biotehniški fakulteti oddelku za živilstvo.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da bomo pri vzorcih jabolčnega soka, ki smo jim dodali več jabolčnega koncentrata oz. saharoze, prišli do večje vsebnosti alkohola v vinu in posledično tudi več oetne kisline v jabolčnem kisu.

Predpostavljali smo tudi, da bodo vzorci z večjim deležem suhe snovi in vzorci z dodanim jabolčnim koncentratom prejeli višjo senzorično oceno, saj je bilo pričakovati, da se bo v vzorcih z večjim deležem suhe snovi sprostilo več spojin, ki dajejo kisu specifičen okus.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KIS

Kis je tradicionalni produkt očetnokislinske fermentacije alkoholne raztopine. Ime »vinegar« (kis) izhaja iz francoske besede »vinaigre«, ki pomeni kislo vino (Plessi, 2003). Je raztopina, ki jo uporabljamo v naši prehrani in je proizvedena iz surovin, ki vsebujejo škrob ali sladkor ali škrob in sladkor, s procesom dvojne fermentacije, alkoholne in očetnokislinske. Kis vsebuje določeno količino očetne kisline in sekundarne metabolite, ki dajejo okus (Codex, 1992).

Potrebna mikroflora za nastanek kisa je običajno prisotna v osnovni surovini, v posameznih fazah pa moramo omejiti rast nezaželenih mikroorganizmov. Kis običajno ni tako cenjen, kot so cenjene alkoholne pijače in zato ne dosega tako visoke cene na trgu. Kljub temu je kis zelo pomembna začimba in sestavina v hrani. Skozi zgodovino je imel velik prispevek h kakovosti, varnosti in dostopnosti hrane. Njegova pomembna vloga se kaže še danes, saj se še vedno uporablja v precejšni meri, kljub novim alternativnim metodam konzerviranja (Adams, 1999).

Po Pravilniku o kakovosti kisa in razredčene očetne kisline (2004) je po definiciji kis izdelek, pri katerem je očetna kislina nastala po biološkem postopku z dvojno fermentacijo, alkoholno in očetnokislinsko, iz surovin kmetijskega porekla. Vsebovati mora značilne fermentacijske produkte, kot so 2-ketoglukonska kislina, 5-ketoglukonska kislina, glukonska kislina, citronska kislina, aminokisline, acetoin, 2,3-butilenglikol in podobno.

Prav tako po omenjenem pravilniku iz leta 2004 velja, da mora biti kis izdelan iz ene od naslednjih surovin:

- * vina, ki je primerno za pripravo kisa, v skladu s predpisom, ki ureja kakovost vina;
- * plodov sadja ali jagodičevja, sadnega vina, vina iz jagodičevja, jabolčnega mošta (cider);
- * destiliranega alkohola kmetijskega porekla;
- * drugih izdelkov kmetijskega porekla, ki vsebujejo škrob, sladkorje, ali škrob in sladkor, žitnih zrn, ječmenovega sladu in sirotke.

Kis, ki je v prometu, mora izpolnjevati naslednje pogoje glede najnižjih vrednosti kemijskih parametrov:

- vsebnost skupne kisline, računano kot očetna kislina, za:
 - kis, razen za vinski kis in razredčen vinski kis, najmanj 50 g/L,
 - vinski kis najmanj 60 g/L,
 - razredčen vinski kis najmanj 40 g/L;
- ostanek vsebnosti alkohola za:
 - kise, razen za vinski in specialni kis, največ 0,5 vol.%,
 - vinski kis največ 1,5 vol.%,
 - specialni kis, izdelan na osnovi vinskega kisa, največ 3 vol.%;
- vsebnost pepela za:

– vinski kis in razredčeni vinski kis največ 3,5 g/L (Pravilnik o kakovosti kisa in razredčene očetne kisline, 2004).

Kis lahko vsebuje le toliko skupnih kislin, izraženih kot očetna, kot se jih tvori pri očetnokislinski fermentaciji. Kis lahko vsebuje poleg očetne kisline samo tiste organske kisline, ki izvirajo iz uporabljene surovine ali ki se tvorijo pri očetnokislinski fermentaciji (Pravilnik o kakovosti kisa in razredčene očetne kisline, 2004).

2.1.1 Zgodovina kisa

Človek pozna in uporablja kis že zelo dolgo, po nekaterih navedbah že več kot 10.000 let. Uporabljal se je v mnogih različnih državah v prehrani, kot tudi v zdravilne namene (Plessi, 2003).

Odkar poznajo ljudje alkoholne pijače, tudi vedo, da te pijače na zračnem in toplem mestu preidejo v kis. Kisanje je naravno dogajanje, ki spremlja procese gnitja in fermentacije v naravi. Človek je odkril kisanje in kis obenem z alkoholno fermentacijo in s pridelavo vina. Pri kisu gre za naraven in spontan proces. Če ustrezen substrat pustimo izpostavljen okolju, bo s spontano fermentacijo najprej nastal alkohol, s časom pa izdelek podoben kisu. Po vsej verjetnosti gre za eno izmed zgodnejših človeških odkritij, ki je verjetno sledilo kmalu po odkritju alkoholnih pijač (Adams, 1985).

Priprava piva in vina je bila znana že v starodavnem Egiptu in Mezopotamiji več tisočletij pred našim štetjem (Corran, 1975). Egipčani so fermentacijo nadaljevali do kisa, ki so ga kasneje zelo cenili tudi stari Grki in Rimljani (Soyer, 1978; Derry in Williams, 1960). Babilonci so za proizvodnjo kisa pogosto uporabljali različne surovine, kot so dateljni, drevesni sok palm, žitni slad, v kis pa so pogosto dodajali tudi različna zelišča. Kis so uporabljali pri pripravi in konzerviranju hrane. S Srednjega vzhoda in verjetno tudi Kitajske se je znanje o postopku izdelave kisa širilo tudi v druge dežele (Adams, 1985). V Veliko Britanijo je kis prišel okrog prvega stoletja pr. n. št., saj je potrjeno, da so ga uporabljali tudi Kelti ob francoski obali Atlantskega oceana (Wilson, 1976).

Kis so v srednjem veku uporabljali v različne namene, proti prebavnim motnjam, slabi krvi, glistam, vnetem grlu, vročini in izgubi las (Plessi, 2003).

Dolgo časa je veljalo mnenje, da očetnokislinska fermentacija ni biološki proces, ampak da je posledica razgradnje mrtve organske materije, ki služi kot katalizator (Adams, 1985).

Klub razširjeni uporabi kisa, se je o njem in z njim povezani fermentaciji vedelo zelo malo. Leta 1723 je Stahl uspel pridobiti očetnokislinsko iz kisa, vendar ni poznal pravega vzroka za nastanek kisline. Berzelius je na začetku 19. stoletja, pojasnil, kako očetna kislina nastane iz alkohola v procesu okisidacije. Persoon (1882) in Kützing (1837) sta prva predlagala inokulacijo mikroorganizmov (Plessi, 2003). Šele Pasteur je leta 1868 s svojim delom »Etudes sur le vinaigre et sur le vin« dokazal, da v pasterizirani alkoholni tekočini ob prisotnosti zraka ni očetnokislinskega vrenja. Ko pa je v to tekočino cepil samo malo

kulture *Mycoderma aceti*, je nastopila fermentacija. Od takrat so naprej so znanstveniki izolirali mnoge vrste očetnokislinskih bakterij in jih razporedili v sistem (Adams, 1985).

V 18. in 19. stoletju so bili med najbolj znanimi proizvajalci kisa Francozi, saj so poznali več kot 50 različnih vrst kisa, ki so jih uporabljali v različne namene. Ženske so ga uporabljale proti slabosti in so ga zato nosile tudi s seboj v stekleničkah (Angerer, 1997).

Kis so sprva proizvajali v manjših količinah, predvsem za domačo rabo. V 14. stoletju je bil ustanovljen prvi ceh proizvajalcev kisa, in sicer v Franciji (Adams, 1985).

Preglednica 1: Proizvodnja kisa v nekaterih evropskih državah (Adams, 1985)

Država	Proizvodnja kisa v hL
Belgija	172 000
Danska	157 717
Nemčija	1 731 761
Francija	1 133 110
Italija	563 000
Velika Britanija	775 800

2.1.2 Uporaba kisa

V obdobju antike je kis veljal za najmočnejšo poznano kislino, zato se je uporabljal tudi v druge namene in ne samo v prehrani. Uporabljali so ga tudi za odstranjevanje velikih skal, ki so jih najprej segreli nato pa ohladili s polivanjem kisa, da so tako postale drobljive. Kis in destiliran kis so uporabljali predvsem za raztapljanje različnih snovi (Adams, 1985).

Danes je kis, ki se ne uporablja v prehranske namene, zamenjala očetna kislina, ki se pridobiva s suho destilacijo lesa ali s sintezo. Kljub temu, da očetno kislino kot industrijsko kemikalijo ponekod še pridobivajo z destilacijo kisa (Conner in Allgeier, 1976), so v novjšem času bolj običajne poti ekstrakcija iz t.i. lesnega kisa in pa kemijska oksidacija etanola (Adams in Flynn, 1982).

V 20. stoletju se je kis obdržal predvsem v kuhinji kot začimba in kot sredstvo za vlaganje, v industriji pa se ga uporablja za proizvodnjo začimb, gorčice in majoneze. Novi izdelki pa so nadomestili uporabo kisa kot razkužilo, čistilo in sredstvo proti slabosti. Včasih ga je mogoče zaslediti v ljudski medicini kot sredstvo za zniževanje visoke telesne temperature, pri zvinih in izpahih (Angerer, 1997). Nekateri pa ga še dandanes uporabljajo za čiščenje madežev na oblačilih ali pri čiščenju različnih površin (Thacker, 1997).

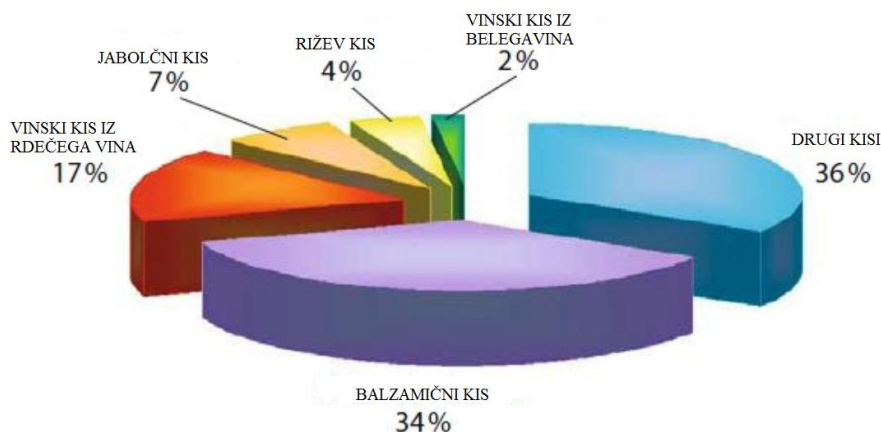
Proizvodnja kisa je postala komercialna in namenjena predvsem domači uporabi pri pripravi hrane. Uporablja se pri pripravi vrsto živil kot so majoneza, kečap, omake ter pri vlaganju zelenjave (Binsted in sod., 1962).

Vlaganje zelenjave v kis je poleg sušenja, soljenja in dimljenja še eden izmed tradicionalnih postopkov shranjevanja hrane. Omenjenim tehnikam je skupno, da se po obdelavi živilom precej poslabšajo senzorične lastnosti.

2.1.3 Vrste kisa

Glede na izvor delimo kis na naravni in sintetični. Naravni nastane iz alkohola s pomočjo očetnokislinskih bakterij, sintetični kis pa je razredčena raztopina očetne kisline (Plessi, 2003).

Po svetu je znanih veliko različnih vrst kisa, nekateri niso razširjeni in poznani izven izvirnega kraja. Večina kisov je rastlinskega izvora z dvema izjemama, to sta kis iz sirotke in medu.



Slika 1: Razširjenost različnih vrst kisa po svetu leta 2005 (The Vinegar Institute, 2016)

2.1.3.1 Sintetični kis

Številne države dovolijo, da se nefermentiran kis uporablja v prehrani. Gre za kis, ki ga pridobimo iz čiste očetne kisline. Kis mora biti razredčen z vodo, dodana mu je aroma, potrebno pa ga je tudi umetno obarvati, za kar se uporablja karamel. Aromatiziramo ga z dodatkom sladkorjev, kemijskih začimb, soli in naravnega kisa. Na koncu mora kis vsebovati vsaj 40 g/L očetne kisline (toliko kot pri fermentiranih kisih), razlike so možne glede na zakonodajo v posamezni državi (Plessi, 2003).

2.1.3.2 Naravni kis

Naravni kis je razredčena raztopina očetne kisline (4 do 10 %). Poleg očetne kisline najdemo v naravnem kisu še arome, estre in snovi, ki nastanejo v procesu staranja, česar pri umetnem kisu ni (Adams, 1985). Značilne lastnosti kisov se razlikujejo glede na izbrane osnovne surovine in tehnologijo proizvodnje. Nekateri najpogosteje uporabljeni kisi so predstavljeni v nadaljevanju.

2.1.3.2.1 Jabolčni kis

Po pravilniku o kakovosti kisa in razredčene očetne kisline (2004) je jabolčni kis izdelan izključno iz jabolčnega mošta (vina) z biološkim postopkom očetnokislinske fermentacije.

Jabolčni kis je narejen iz svežih in zdrobljenih jabolk, ki jih lahko pustimo zoreti v lesenih sodih. Po tradicionalni metodi tako alkoholno, kot tudi očetnokislinsko fermentacijo jabolčnega soka izvedemo v istem sodu z naravno prisotnimi kvasovkami in očetnokislinskimi bakterijami. Sod, ki ima na vrhu luknjo, je postavljen na toplo in vlažno mesto. Luknjo soda se pokrije s kosom tkanine, da ne pride do vstopa prahu ali muh. Da poteče alkoholna in očetnokislinska fermentacija traja približno 5 do 6 mesecev, ko se jabolčni sok pretvori v kis. Glavna pomanjkljivost tega procesa je, da je alkoholno vrenje pogosto nepopolno in počasno, prav tako to velja za očetnokislinsko fermentacijo. Posledica je premajhna vsebnost očetne kisline in slaba kakovost. Danes se jabolčni kis v glavnem pridobiva s submerzno metodo, kot pri vinskem kisu, metoda je natančneje opisana v nadaljevanju (Joshi in Sharma, 2009).

Jabolčni kis je zelo cenjen med kisi, tako zaradi svojega okusa kot tudi bogate sestave. Jabolko je v našem podnebnem pasu pomembna in zelo pogosta sadna vrsta. Ugodno deluje na prebavo oz. mikrofloro, veže strupene snovi v telesu, pozitivno deluje na ožilje, znižuje holesterol itd. Jabolčni kis je jabolko v tekočini, obogateni obliki s pisano vsebnostjo vitaminov (B1, B2, B6 in C) in mineralov (Mg, K, P, Ca in Fe), antioksidantov predvsem iz skupine fenolnih spojin (galna kislina, katehin, kavna in ferulna kislina) ter organskih kislin (vinska, citronska, jabolčna in mlečna kislina). Je zelo primeren za pripravo pijač in se odlično obnese v solatah vseh vrst (Cortese, 2001).

Najmanjša predpisana kislost za jabolčni kis se razlikuje od države do države, v Severni Ameriki npr. velja 50 do 60 g/L očetne kisline. Vsebnost skupnih kislin v kisu, izraženih kot očetna kislina v g/100 mL, mora biti na označbi izražena kot ».....% kislosti«, kar pomeni volumski odstotek očetne kisline (Pravilnik o kakovosti kisa in razredčene očetne kisline, 2004).

Jabolčni kis razvrščamo med šibke in močne. Med šibkejšje spadajo tisti z nižjim deležem suhe snovi 8-9 %, med močne pa 9-13 % (Joshi in Sharma, 2009). Je rumenkaste barve in je široko razširjen kot namizni kis. Zanj je značilno, da ni pretirano kisel, ima rahlo sladek jabolčni okus in vonj, zato se v veliki meri uporablja za solatne prelive (Plessi, 2003).

2.1.3.2.2 Vinski kis

Po pravilniku o kakovosti kisa in razredčene očetne kisline (2004) je vinski kis izdelan izključno iz vina z biološkim postopkom očetnokislinske fermentacije.

Vinski kis se prideluje iz rdečega ali belega vina in je najpogosteje uporabljen kis v gospodinjstvih v sredozemskih državah in srednji Evropi. Tako kot pri vinu je tudi pri kisu lahko zelo širok razpon v kakovosti. Boljši vinski kisi so zorjeni v lesenih sodih do 2 leti in imajo zato kompleksen okus (Sellmer-Wilsberg, 2009).

Glavni spojini v vinskem kisu sta očetna kislina in etilacetat, vendar na končno kakovost vplivajo tudi ostale spojine, ki določajo značilen okus (Morales in sod., 2001).

Vinski kis se lahko proizvaja s tradicionalno ali submerzno metodo. Pri submerzni metodi so bakterije potopljene v tekočini, ki se ji stalno dodaja kisik. Tak kis je proizveden v kratkem času (24-48 ur), vendar je slabše kakovosti, kot kis proizveden po tradicionalni

metodi. Pri tradicionalni metodi očetnokislinske bakterije rastejo na površini in so v neposrednem stiku z zrakom. Gre za dolgotrajnejšo metodo, vendar se med fermentacijo tvorijo tudi sekundarni metaboliti, ki pozitivno vplivajo na senzoriko kisa. Tak kis je zaradi boljših senzoričnih lastnosti boljše kakovosti, vendar so stroški proizvodnje zaradi dolgotrajnejšega postopka večji. Na kakovost kisa vplivajo izbrane surovine, metabolizem očetnokislinskih bakterij, interakcije med kisom in sodom ter proces zorenja, ko se oblikuje končni okus kisa (Mas in sod., 2014).

Za kisanje se uporabljajo vina, ki imajo manjšo vsebnost alkohola in sicer 7 do 9 vol.% alkohola ali takšna, pri katerih so hlapne kisline previsoke. Pokvarjenih vin ne smemo uporabljati. Če uporabljamo vina z visokim deležem alkohola, jih moramo primerno razredčiti, saj lahko visok delež alkohola inhibira razvoj očetnokislinskih bakterij. Iz istega razloga morajo biti tudi brez SO₂ in usedline. Za pripravo vinskega kisa se lahko ločeno uporabljajo rdeča in bela vina kot tudi rose vina. V domači rabi ali v majhni proizvodnji vino vlijejo v lesene sode, ki mu dodajo domač kis, ki že vsebuje kolonije očetnokislinskih bakterij rodu *Acetobacter*. Sodi se ne napolnijo do vrha, da ostane še nekaj prostora za zrak. Kisanje je počasno in se spontano ustavi, ko kislost doseže 7-8 %. Počasno prehajanje vina v kis vodi do tvorbe mnogih metabolitov, ki dajejo kisu nato končni okus. Najbolj pomembna produkta sta acetaldehid in etil acetat, pomembni pa so tudi hlapni alkoholi (zlasti 3-metil-1-butanol) in 3-hidroksi-2-butanon (acetoin) (Plessi, 2003).

Večina proizvodnje vinskega kisa je danes industrijske in mora ustrezati predpisom in standardom. Vinski kis mora tako vsebovati vsaj 60 g/L skupnih kislin, računano kot očetna kislina in hkrati največ 1,5 vol.% ostanka alkohola. Barva kisa se giblje med blede rumeno do rdeče, odvisno od uporabljenega vina. Bister kis iz belega vina je primeren za konzerviranje zelenjave (Plessi, 2003).

2.1.3.2.3 Balzamični kis

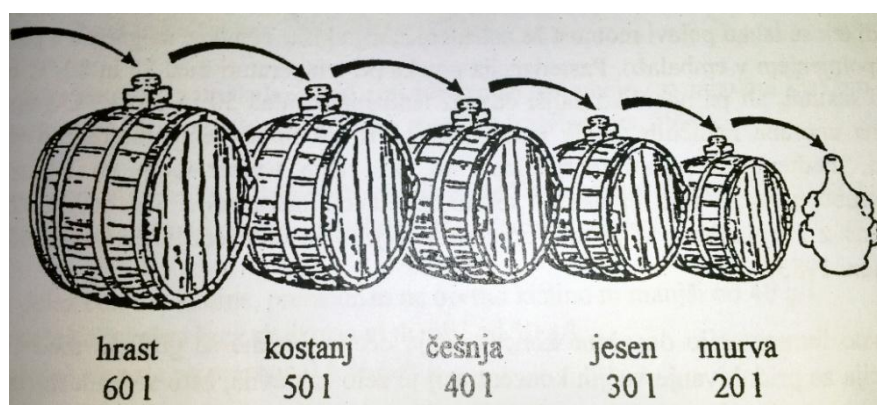
Izraz "balzamični kis" se pogosto uporablja za opis omak, začimb in prelivov s posebnim sladkim okusom. V Italiji obstajata dve vrsti balzamičnega kisa, "balzamični kis iz Modene" in "tradicionalni balzamični kis". Prvi je aromatiziran vinski kis, pridobljen z mešanjem mošta in vinskega kisa, v nekaterih primerih pa mu je dodana tudi majhna količina karamele. Tradicionalni balzamični kis proizvajajo v Modeni in Reggio Emilii. Po alkoholni in očetnokislinski fermentaciji, mora kis zoreti še vsaj 12 let, v tem času pa se izoblikujejo specifične lastnosti, ki dajejo kisu značilno aromo. Končni produkt je zelo kakovosten, temno rjave barve, sladko-kislega okusa in z značilnim aromatičnim vonjem (Giudici in sod., 2009).

Surovina za izdelavo je mošt iz grozdja sorte 'Trebiano'. Alkoholna fermentacija se začne približno 24 ur po stiskanju, takrat mošt segrevajo, da počasi vre, dokler se začetni volumen ne zmanjša za polovico ali tretjino. Rezultat je liker z visoko vsebnostjo sladkorja (približno 30 %), kjer alkoholna in očetnokislinska fermentacija potekata zelo počasi. Za nastanek kisa so potrebne kvasovke (rodova *Saccharomyces* in *Zygosaccharomyces*) in očetnokislinske bakterije (rodova *Acetobacter* in *Gluconobacter*) (Plessi, 2003).

Pri proizvodnji tradicionalnega balzamičnega kisa se uporablja pet do sedem sodov padajočih velikosti, ki so napolnjeni s predhodno fermentiranim grozdnim moštom. Del

vsebine iz manjšega soda se vsako leto odlije za porabo in se nadomesti z enakim volumnom iz naslednjega večjega soda. Ta je napolnjen iz sosednjega in tako naprej po vrsti. Na koncu je največji sod poln do vrha sin se nadomesti s sezonskim moštom. Vsak sod tako vsebuje mešanico različno starih kisov (Giudici in sod., 2009).

Med procesom fermentacije, zorenjem in staranjem kis postane močno koncentriran, sladkorji, alkoholi, aldehydi in organske kisline pa so podvržene zaporednim kemičnim transformacijam. Izplen je sicer zelo majhen (nič več kot 1 liter kisa iz 100 kg svežega mošta). (Plessi, 2003).



Slika 2: Različne vrste sodov pri izdelavi tradicionalnega balzamičnega kisa (Plessi, 2003)

V tradicionalnem balzamičnem kisu je delež suhe snovi 20 do 70 %, medtem ko kislost variira med 60 in 180 g/L očetne kisline, tu so še velike količine sladkorjev (glukoze in fruktoze), kot tudi številne aromatične substance, ki se postopoma oblikujejo skozi leta (Plessi, 2003).

2.1.3.2.4 Sladni kis

Najbolj cenjen in razširjen je v Veliki Britaniji, pripravljen je iz slada, ki se sicer uporablja v pivovarstvu. V Veliki Britaniji in severni Evropi uporabljajo ječmenov slad z ali brez dodatka ostalih žit. Škrob se pomočjo encimov α -amilaz pretvori v enostavne sladkorje. Proizvodnja sladnega kisa obsega drozganje, alkoholno fermentacijo in očetnokislinsko fermentacijo. Med drozganjem ječmenov slad pomešajo z ostalimi žiti (koruzo in ržjo). To se zmelje in pomeša z vročo vodo, kjer se škrob pretvori v fermentirajoče sladkorje. Sladek liker ločimo od drozge skozi perforirano dno soda in ga zberemo v posodah, kjer poteka alkoholna fermentacija ob dodatku kvasovk, ki fermentirajoče sladkorje spremenijo v etanol in ogljikov dioksid. Ko je fermentacija končana, dobljeni liker ločimo od kvasovk, začne pa se očetnokislinska fermentacija z inokulacijo očetnokislinskih bakterij. Pri tem se alkohol oksidira do očetne kisline v prisotnosti kisika. Kis je bolj ali manj aromatičen, najboljši kis dobimo s starim in počasnim orleanskim postopkom. Sladni kis je močnega okusa, rahlo obarvan in mora vsebovati najmanj 40 g/L očetne kisline. Destilirani sladni kis je pripravljen z destilacijo tega kisa. Tak proizvod vsebuje hlapne sestavine originalnega kisa, je brezbarven in primeren za konzerviranje zelenjave, kot so kumarice (Plessi, 2003).

2.1.3.2.5 Rižev kis

Na Daljnem vzhodu, kjer je riž najpomembnejše žito, pripravljajo kis iz riža oz. riževega fermentacijskega produkta imenovanega »*sake*«. Tradicionalne metode, podobne orleanskemu postopku so še vedno v uporabi, ampak jih je v veliki meri izpodrinila moderna submerzna tehnika. Rižev kis ima nizko kislost in visoko vsebnost aminokislin. Zanj je značilna svetla barva ter čist in nežen okus. Prav zato je zelo cenjen v vzhodni kuhinji, zaradi njegovega milega okusa pa mu pogosto dodajajo tudi zelišča, začimbe in sadje (Plessi, 2003).

2.1.3.2.6 Melasin kis

Melasin kis je pripravljen iz sladkornega sirupa ali melase preko dvojne fermentacije, alkoholne fermentacije sladkorjev in poznejše očetnokislinske fermentacije. Proizvaja se kot stranski produkt v industriji sladkorjev, vendar uporaba ni razširjena (Plessi, 2003).

2.1.3.2.7 Medeni kis

Med vsebuje veliko sladkorjev (70 do 80 %), predvsem fruktozo in glukozo in še nekatere druge sladkorje. Pred alkoholno fermentacijo je med potrebno vedno razredčiti. Medeno vino tako vsebuje do 17 vol.% etanola (Solieri in Giudici, 2009).

Za to vrsto kisa najprej pripravimo ali kupimo medico (fermentirano raztopino medu, ne medeno žganje). Čeprav za kakovosten med velja, da ni segret, ga za pripravo medice prekuhamo. Med raztopimo v vodi in segrejemo do vretja. Ko je tekočina mlačna, jo zlijemo v steklen balon, dodamo vodo in rehidrirane kvasovke. Nato pustimo vreti, po končanem alkoholnem vrenju pa pretočimo v drug steklen balon, dodamo kozarec kisa, da poteče očetnokislinska fermentacija temu pa sledi zorenje kisa (Cortese, 2001).

2.1.3.2.8 Kis iz sirotke

Sirotka, ki je mlečni serum oz. preostanek pri proizvodnji sira, je bogata z laktozo in hidroliziranimi sladkorji, galaktozo in glukozo, odvisno od tehnologije proizvodnje sira. Poleg tega je kisl sirotka precej kontaminirana z mlečnokislinskimi bakterijami (MKB) in jo je potrebno zato pred alkoholno in očetnokislinsko fermentacijo pasterizirati (Solieri in Giudici, 2009).

2.1.3.2.9 Alkoholni kis

Po pravilniku o kakovosti kisa in razredčene očetne kisline (2004) je alkoholni kis izdelek, izdelan iz alkohola kmetijskega porekla z biološkim postopkom očetnokislinske fermentacije.

Alkoholni kis je pripravljen z očetnokislinsko fermentacijo razredčenega alkohola, ki je v večini primerov pridobljen iz sladkornega trsa, krompirja ali koruze (Cortese, 2001). Je najmočnejša vrsta kisa, zato se uporablja izključno za vlaganje. Zanj je značilno, da je

brezbarven in ga zato pogosto barvajo s karamelom, je zelo kisel, vendar ni aromatičen. Takšen kis je cenejši in najbolj razširjen po vsem svetu (Plessi, 1993).

2.1.3.2.10 Sadni kis

Po pravilniku o kakovosti kisa in razredčene očetne kisline (2004) je sadni kis izdelan izključno iz sadnega vina z biološkim postopkom očetnokislinske fermentacije.

Sadni kisi so proizvedeni iz različnih vrst sadja po tradicionalni metodi, ali s sodobnimi tehnikami predelave. Bogati so z organskimi kislinami, aminokislinami, vitamini in mineralnimi snovmi. Glavni organske kisline v sadnih kis so očetna, vinska, mravljična, mlečna, citronska in jabolčna kislina. Lastnosti kisa se razlikujejo glede na izbrano vrsto sadja (Chang, 2005).

2.2 PROIZVODNJA JABOLČNEGA KISA

Kis velja na splošno za poceni izdelek, saj tudi sama proizvodnja zahteva manj kakovostne surovine, kot npr. sadje slabše kakovosti, sezonske kmetijske presežke, stranske produkte pri predelavi hrane in odpadke sadja. Kljub temu obstajajo tudi nekateri zelo dragi kisi, proizvedeni iz regionalnih surovin v skladu z dobro uveljavljenimi metodami, čeprav so ti bolj izjema kot pravilo. Taki primeri so tradicionalni balzamični kis iz Modene v Italiji, sherry kis iz Španije ali oxos iz Grčije. Obstajajo tudi alkoholni kisi, pri katerih očetnokislinske bakterije oksidirajo etanol (pridobljen z destilacijo fermentirane drozge) v očetno kislino (Mu in sod., 2003; Mu in sod., 2006).

Tako kot pri proizvodnji drugih živil se morajo tudi pri proizvodnji kisa v vseh korakih upoštevati načela dobre kmetijske, proizvodne in higienske prakse. To velja še zlasti pred začetkom fermentacije, ko okoljski dejavniki dovolijo rast neželenih škodljivih bakterij in plesni, ki proizvajajo mikotoksine. To še posebej velja, dokler poteka proizvodnja pri sobni temperaturi. Po kisanju ne obstaja realna nevarnost kvarjenja, saj očetna kislina pri nizkem pH deluje močno antibakterijsko (Solieri in Giudici, 2009).

Predelavo iz jabolk do jabolčnega kisa je mogoče povzeti v treh glavnih korakih. Priprava surovine, alkoholna fermentacija jabolčnega soka do mošta ter očetnokislinska fermentacija do jabolčnega kisa (Joshi in Sharma, 2009).

Spodnja enačba (1) prikazuje, da teoretično dobimo iz 1 g glukoze 0,51 g etanola in nato iz etanola 0,67 g očetne kisline.



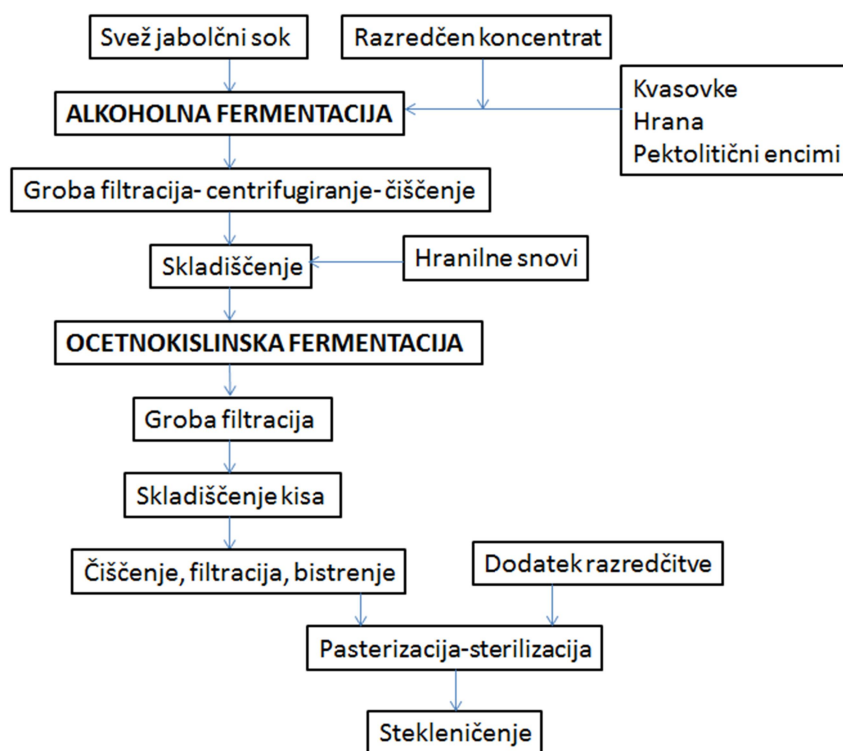
2.2.1 Surovine in priprava

Jabolka morajo biti za predelavo v jabolčni sok dovolj zrela, brez mehanskih poškodb, plesni in gnilobe. Optimalna zrelost jabolk je takrat, ko se večina škroba pretvori v sladkor, kar lahko preverimo z jodavico in sicer tako, da vanjo namočimo prerezan plod. Če se

meso obarva temno to kaže, da je v plodu še veliko škroba in bo potrebno z obiranjem še počakati, kadar pa se barva bistveno ne spremeni, je to znak za ustrezno zrelost. Zaradi neenakomerne zrelosti plodov je včasih potrebno obiranje v intervalih. Po obiranju sledi obvezno pranje jabolk, ki ponavadi poteka v kadi. Prvotno se jabolka za nekaj časa omočijo, saj se tako hitreje zgubijo nečistoče. Nato je priporočljivo, da se jabolka še enkrat operejo v čisti vodi in odcedijo. Jabolka se nato v stiskalnici fino zmeljejo z ustreznimi mlini za sadje, ki vplivajo na čim boljši izkoristek. Nastala jabolčna kaša omogoča boljši izkoristek in hitrejše stiskanje. Na izkoristek pomembno vplivata zmogljivost mlina in predvsem stiskalnice, ta naj bi bil pri jabolčnem soku iz jabolčne kaše vsaj 70 %. Takšne izkoristke lahko dosežemo s slojnimi ali tračnimi stiskalnicami. Kadar se predelujejo prezrela jabolka lahko za boljši izkoristek dodamo pektolitične encime (Mavsar, 2016).

Vsebnost sladkorjev in kislin v svežih jabolkih se lahko bistveno razlikujejo glede na sorto, regijo, sezono in zrelost jabolk. Jabolčni sokovi v Evropi dosegajo suho snov od 10 do 15 °Brix (v povprečju 9 do 11 °Brix), vsebnost kislin pa dosega vrednosti 1,2 g/L do 3,2 g/L, izražena kot jabolčna kislina. Vsebnosti taninov, ki povzročajo trpkost, se gibljejo v območju od 0,37 do 2,33 g/L, medtem ko so pektini (0,25 do 0,75 %) večinoma odgovorni za konsistenco oziroma viskoznost jabolčnega soka. Nezreli plodovi dajejo soku manj suhe snovi in arome, večjo vsebnost škroba in kislin in hkrati grenko in trpko aromo. Sok, ki je narejen iz preveč zrelih jabolk, ima nižje donose zaradi težje ekstrakcije, ima pa slajši, prijeten okus. pH se giblje v območju 3,0 do 3,8 odvisno od koncentracije jabolčne kisline (3 do 5 g/L). Pod vplivom mehanske obdelave v mlinih iz nerjavnega jekla in delovanjem pektolitičnih encimov pride do razgradnje celične strukture in povečanja količine soka, ki se izloči zaradi mehanskega pritiska na naribana jabolka. Pri tradicionalni pripravi jabolčnika se celice pod tlakom hidravličnega valja ali zračnega tlaka stisnejo oziroma popokajo. Predelava peščišča in lupine ima za posledico povečanje ne-sladkega deleža, prav tako pa lahko pride kasneje do težav pri kisu zaradi vpliva na motnost in oblikovanje barve. Ponavadi se sladkorna stopnja v jabolčnem soku giblje med 10 in 11 °Brix (Lea, 1989), vsaj 90 % topljencev predstavljajo ogljikovi hidrati, predvsem glukoza, fruktoza in saharoza (Joshi in Sharma, 2009).

V nekaterih državah se pridobiva jabolčni kis iz jabolčnega koncentrata, ki lahko vsebuje tudi 60 do 72 % skupnih sladkorjev. Glavne metode, ki se uporabljajo za koncentriranje jabolčnega soka, vključujejo izhlapevanje, reverzno osmozo in zmrzovanje bistrega jabolčnega soka (Sharma in Joshi, 2005). V tem primeru koncentriran jabolčni sok pred alkoholno fermentacijo razredčimo z vodo do želene koncentracije (10 do 13 % suhe snovi). Voda za pripravo soka mora biti bakteriološko čista, bistra, brezbarvna, brez vonja in brez usedline ali delcev (Joshi in Sharma, 2009).



Slika 3: Shema proizvodnje jabolčnega kisa (Joshi in Sharma, 2009)

2.2.2 Alkoholna fermentacija

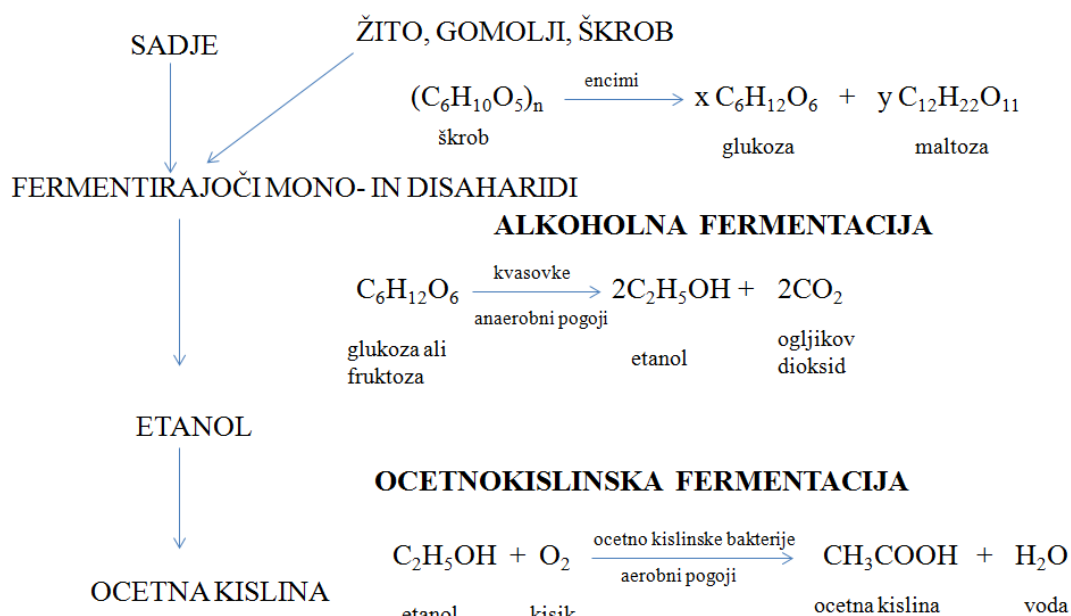
Alkoholna fermentacija jabolčnega soka poteka s pomočjo kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* in se lahko izvede z inokulacijo čiste kulture ali z naravno spontano fermentacijo. Danes je dodajanje suhih vinskih kvasovk v mošt postalo že rutina, dodajajo se v koncentraciji 150 mg/L oz. po specifikaciji proizvajalca. Običajno SO₂ ni dodan jabolčnemu vinu, ki se uporablja za proizvodnjo kisa, tudi če je priporočljivo (Joshi in Sharma, 2009). Fermentacija drozge v splošnem ni temperaturno kontrolirana, vendar v hladnih podnebjih, ko je fermentacija zaradi nizkih temperatur počasna, se drozga segreva s pomočjo toplotnih izmenjevalcev. Med spontano fermentacijo so aktivne kvasovke naslednjih rodov oziroma vrst: *Kloeckera/Hanseniaspora uvarum*, ki prevladujejo na začetku, medtem ko *Saccharomyces cerevisiae* prevladuje na koncu fermentacije, *Dekkera/Brettanomyces* pa so najbolj pomembne v fazi zorenja (Morrissey in sod., 2004).

Na koncu fermentacije se kvasovke in sadna kaša oblikujeta v kompaktno maso na dnu rezervoarja, iz katerega ločimo fermentirano tekočino. Proizvajalci se sicer ponavadi poslužujejo ločevanja kvasovk in kaše iz jabolčnega vina s centrifugiranjem. Bistra tekočina se shrani v posodah za naknadno pretvorbo v kis s pomočjo očetnokislinske fermentacije (Joshi in Sharma, 2009). Končna vsebnost alkohola jabolčnega vina in trajanje fermentacije sta odvisni od suhe snovi in delovanja kvasovk. Vsebnost alkohola v jabolčnem vinu se lahko med državami razlikuje. Na Irskem lahko vsebnost alkohola znaša 9 do 10 vol.% , medtem ko v Severni Ameriki med 5 in 6,5 vol.% alkohola, trajanje fermentacije pa je blizu enega tedna (Seo in sod., 2001).

2.2.3 Očetnokislinska fermentacija

Jabolčno vino z visoko vsebnostjo alkohola tipiziramo na vrednosti 7 do 8 vol.% alkohola z dodatkom vode in mu nato dodamo jabolčni kis prejšnje očetnokislinske fermentacije z namenom inokulacije očetnokislinskih bakterij ter zaradi preprečevanja rasti nezaželenih mikroorganizmov. Ponavadi dodamo 1 enoto kisa na 5 enot jabolčnega vina. Z uporabo specifičnih očetnokislinskih bakterij se močno izboljša oksidacija etanola (Joshi in Sharma, 2009).

S tehnološkega vidika, se lahko kisanje jabolčnega vina doseže bodisi s počasnimi tradicionalnimi metodami, kot je orleanski postopek, ali pa s hitrimi submerznimi metodami, ki temeljijo na različnih vrstah acetatorjev, kar poveča stopnjo kislosti in donos očetne kisline z uporabo pol-prekinjenih ali neprekinjenih procesov (Joshi in Thakur, 2000).



Slika 4: Shematični prikaz proizvodnje kisa (Adams, 1985)

2.2.4 Zorenje

Med procesom zorenja, stik kisa z lesom povečuje aromatsko kompleksnost končnega produkta (Callejón in sod., 2010). V času zorenja prihaja do različnih reakcij, poteka polimerizacija, sproščanja spojin iz lesa, kemijska oksidacija, hkrati pa prihaja tudi do izgub spojin zaradi izhlapevanja. Sproščanje spojin je odvisno predvsem od vrste lesa, stične površine lesa in kisa ter časa zorenja (García-Parrilla in sod., 1999).

Jabolčni kis se shranjuje in zori v lesenih sodih ali cisternah iz nerjavečega jekla. V preteklosti je bila razširjena praksa zorenja kisa najmanj eno leto, danes pa kis zaradi višjih stroškov proizvodnje in skladiščenja zori samo 1 do 2 meseca. V nekaterih obratih se v tej

fazi poslužujejo tudi grobe filtracije. Med skladiščenjem kisa prihaja do sprememb, ostre arome se spremenijo v prijeten vonj, verjetno zaradi oksidacije kisa z zrakom, ki vstopa skozi pore v lesu. Prav tako lahko očetna kislina reagira s preostankom alkohola, pri tem pa se tvori etil acetat, ki daje sadni okus. Poleg omenjenih sprememb pride tudi do spremembe barve. Barva zbledi med fermentacijo in zorenjem, verjetno zaradi polimerizacije procianidinov in drugih polifenolov. Barva jabolčnega kisa, proizvedenega iz jabolčnega koncentrata, se pripisuje Maillardovi reakciji, medtem ko na barvo jabolčnega kisa iz svežega jabolčnega soka vpliva predvsem oksidacija polifenolov (Lea, 1989). Zorenje igra pomembno vlogo pri končni kakovosti kisa. Razvoj tehnologije bo v prihodnosti zagotovo usmerjen v skrajšanje časa zorenja, ne da bi se pri tem poslabšala kakovost kisa (Tsfaye in sod., 2002).

2.2.5 Bistrenje

Bistre proizvode lahko dosežemo z odstranitvijo suspendiranih trdnih delcev. Suspendirani delci so lahko polisaharidi (pektin, celuloza, hemiceluloza, lignin in škrob) beljakovine, tanini, kovine in mikroorganizmi (Vaillant in sod., 2001).

Za doseganje stabilnega in bistrega kisa se uporabljajo različne tehnološke prakse. Samobistrenje s sedimentacijo je odvisno od kislosti in starosti. Jabolčni kisi z nizko kislostjo se običajno ne zbistrijo tudi po daljšem skladiščenju, medtem ko se močni kisi zbistrijo v nekaj mesecih. Bistrenje zmanjša vsebnost suspendiranih delcev (predvsem odmrlih celic očetnokislinskih bakterij) in lahko pripomore k zmanjšanju vsebnosti polifenolov. To se šteje kot alternativna praksa grobe filtracije. V splošnem postopek bistrenja vključuje dodatek želatine, bentonita in/ali tekočega silicijevega dioksida po spodaj opisanih dveh protokolih. V prvem primeru dodamo na 1000 L jabolčnega kisa 260 g želatine in 400 g bentonita, suspenzijo mešamo in pustimo vsaj 1 teden, da se delci usedejo. Druga možnost je dodatek tekočega silicijevega dioksida (5 L 30 % raztopine na 5000 L jabolčnega kisa), ki mu sledi dodatek želatine (1 kg na 5000 L). Na koncu je potrebna še filtracija, da se povsem odstranijo suspendirani delci in celice očetnokislinskih bakterij (Joshi in Sharma, 2009).

2.2.6 Ultrafiltracija

Filtracija je pomembna faza, zaradi ohranjanja mikrobiološko stabilnega proizvoda. V večjih evropskih in ameriških tovarnah se zadnje čase uporablja ultrafiltracija kot nadomestilo za klasično filtracijo in sterilizacijo (Sellmer-Wilsberg, 2009).

Jabolčni kis se stalno črpa in se ga delno vrne v obtok skozi membrano z mejno vrednostjo molekulske mase 50 kDa. Kis, ki pride skozi membrano, velja za očiščenega in stabilnega, medtem ko so se kvasovke in bakterijske celice z večjo molekulsko maso zadržale na filtru. Da se zmanjša možnost bakterijske kontaminacije, se ultrafiltracija izvaja tik pred stekleničenjem. Ultrafiltracija ne preprečuje nastajanje meglice, ki ni mikrobiološkega izvora in nastane po polnjenju, kadar imajo prekurzorske molekule (procianidini) meglice molekulske maso med 500 in 2500 Da, saj gredo molekule skozi membrano (Joshi in Sharma, 2009).

2.2.7 Pasterizacija in polnjenje

Pasterizacija je pomembna zaradi mikrobiološke stabilnosti kisa, hkrati pa prepreči nastanek motnosti in površinskega filma zaradi rasti očetnokislinskih bakterij (Adams, 1999).

Po zorenju in bistrenju se jabolčni kis pasterizira, da se prepreči kvarjenje. Jabolčni kis lahko obdelamo s hitro pasterizacijo in sicer tako, da ga za kratek čas (do 5min) spustimo skozi cevni toplotni izmenjevalec s temperaturo 66 °C. Medtem ko je kis še vroč, ga prelijemo v steklenice, lahko pa ga prelijemo tudi ohlajenega. Ustekleničen kis lahko pasteriziramo tudi s potopitvijo steklenic v vročo vodo, dokler kis znotraj posode ne doseže temperaturo 60 °C (Joshi in Sharma, 2009).

2.2.8 Aditivi

Kemikalije se lahko dodaja, da se prepreči porjavenje, motnost, ki ni mikrobiološkega izvora ter da preprečimo rast bakterij. Železo, baker, kisik, procianidin in oksidirana askorbinska kislina so glavni dejavniki, ki pospešujejo nastanek motnosti in potemnenja po polnjenju. Zato je potrebno količino omenjenih spojin zmanjšati na najnižjo možno vsebnost (Joshi in Sharma, 2009).

Glavni aditivi za stabilizacijo kisa jabolčnega vina so:

- SO₂ je najbolj učinkovito protimikrobno sredstvo, zlasti pri nizkem pH. Poleg tega zavira encimsko polimerizacijo polifenolov in ima antioksidativne lastnosti. Dodaja se ga 50-200 mg/L (Adams, 1999).
- Askorbinska kislina je antioksidant, ki je manj učinkovit od SO₂, razen če se uporablja v zelo velikih količinah (> 250 mg/L). Vendar pri večjih količinah je potrebno biti previden saj so razgradnji produkti askorbinske kisline (karbonili) močni pro-oksidanti, ki pospešujejo reakcije porjavenja in nastanek motnosti, če je askorbinska kislina dodana v presežkih. Dodatek majhnih količin askorbinske kisline (<100 mg/L) k jabolčnemu kisu pa je neučinkovit.
- Pektin in gumiarabika se lahko dodajata k stabilnemu jabolčnemu kisu proti oblikovanju motnosti.
- Citronska kislina tvori stabilen kompleks s kovinami, kot sta železo in baker, ki katalizirajo oksidativno polimerizacijo polifenolov.
- Kalijev heksacianoferat(VI) se uporablja kot sredstvo za odstranjevanje kovinskih ionov iz kisa (Joshi in Sharma, 2009).

Po Pravilniku o kakovosti kisa in razredčene očetne kisline (2004), je v proizvodnji kisa glede na tehnološko upravičenost, dovoljena uporaba naslednjih pomožnih tehnoloških sredstev:

- kvasni ekstrakti, sladni pripravki, glukozni sirup in anorganske snovi, kot so fosfati, amonijeve soli in drugo, za oskrbo očetnokislinskih bakterij;
- sredstva za bistrenje, čiščenje in filtriranje.

Ta pravilnik določa tudi, da se kisu za namen oplemenitenja vonja in okusa lahko dodajo:

- rastline ali deli rastlin, ki vključujejo zelišča ter sadje:
 - ali sveže ali posušene, ali narezane ali ne,
 - ali kot ekstrakti;
- zgoščeni ali nezgoščeni sadni sokovi ter mošti;
- med;
- sladkor;
- sol.

Tak kis se šteje za specialni kis.

Omenjeni pravilnik (2004) v proizvodnji kisa prepoveduje uporabo naslednjih snovi:

- umetnih arom iz predpisa, ki ureja arome za živila;
- oljne frakcije pešk in tropin;
- ostankov alkoholne destilacije in ostankov fermentacije in njihovih stranskih proizvodov
- snovi, iztisnjenih iz tropin;
- vseh vrst kislin;
- snovi za povečanje ekstrakta in pepela.

2.3 TEHNOLOGIJE PROIZVODNJE KISA

Poznamo dva načina proizvodnje kisa. Prva je tradicionalna metoda z uporabo površinske kulture (počasnejša), drugi način pa je submerzna metoda, ki je hitrejša od tradicionalne (Turhan in Canbaş 2016). Poznana je tudi proizvodnja z imobilizirano kulturo, vendar ni več v uporabi (Plessi, 2003).

Da prihaja do razlik v vinskem kisu, ki so proizvedeni s tradicionalno metodo ali submerznim načinom pridelave sta potrdila tudi Turhan in Canbaş (2016). Ugotovila sta, da pogoji očetnokislinske fermentacije vplivajo na senzorične lastnosti, aromo in kemijsko sestavo, kar je potrdila tudi statistična analiza. Rezultati so pokazali prisotnost več aromatičnih spojin, ki vplivajo na končen okus in večjo kislost v kisu, ki je bil proizveden s tradicionalno metodo.

2.3.1. Proizvodnja z uporabo površinske kulture

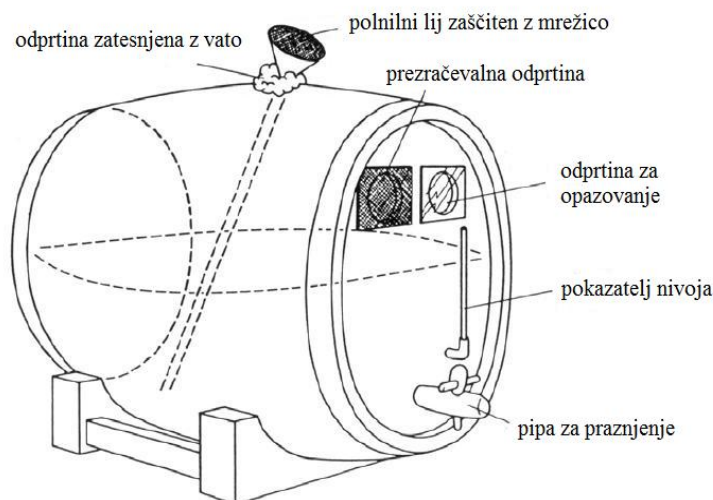
Za kise proizvedene z uporabo površinske kulture je značilno, da imajo boljšo senzorično kakovost, vendar je pretvorba etanola v očetno kislino počasnejša, zato je proizvodnja kisa s to metodo dražja (Turhan in Canbaş 2016).

Pri tradicionalni metodi očetnokislinske bakterije, ki pretvarjajo etanol v očetnokislino, rastejo na površini alkoholnega substrata. Sodi so napolnjeno do 2/3 kapacitete, da ostane še zračna komora, ki je v stiku z zunanjim zrakom. Ta postopek se šteje za tradicionalno metodo. Za bolj standardizirano različico te metode poznamo Orleanski način proizvodnje,

pri katerem imajo sodi stranske luknje za kroženje zraka in lijak na dnu sode, preko katerega se dotaka svež alkoholni substrat. S tem, ko je lijak na dnu sode, se ob dodajanju substrata prepreči večje poškodbe površinskega filma očetnokislinskih bakterij. Ko kis doseže določeno kislost, se del kisa odstrani, dotoči pa se svež alkoholni substrat (Mas in sod., 2014).

Kisi proizvedeni po tradicionalni metodi veljajo za zelo kakovostne zaradi njihove senzorične kompleksnosti. Kljub temu pa na samo kakovost vpliva več dejavnikov, kot so kakovost surovine, metabolizem očetnokislinskih bakterij, interakcije med kisom in sodom ter proces zorenja (Mas in sod., 2014).

Opisani postopek je dobil ime po pokrajini Orléans v Franciji, kjer so ga že v 14. stoletju uporabljali za industrijsko proizvodnjo kisa. Danes se ta metoda uporablja zelo malokrat, kljub temu, da je znano, da daje kakovostne kise. Glavna slabost orleanskega postopka v primerjavi z ostalimi tehnologijami je v tem, da je dolgotrajen. Poleg tega je pri tem postopku za kisarne večjih zmogljivosti potrebna tudi velika proizvodna površina in večje število zaposlenih. Na drugi strani pa so tudi prednosti, kot je preprosta in relativno poceni oprema, zaradi počasnosti postopka je poraba hladilne vode zelo majhna, potrebe po energiji pa so zanemarljive. Tak način proizvodnje bi bil zato najbolj primeren v državah z nizkimi cenami zemljišč in poceni delovno silo (Adams, 1985).



Slika 5: Slika soda za proizvodnjo kisa po orleanskem postopku (Adams, 1985)

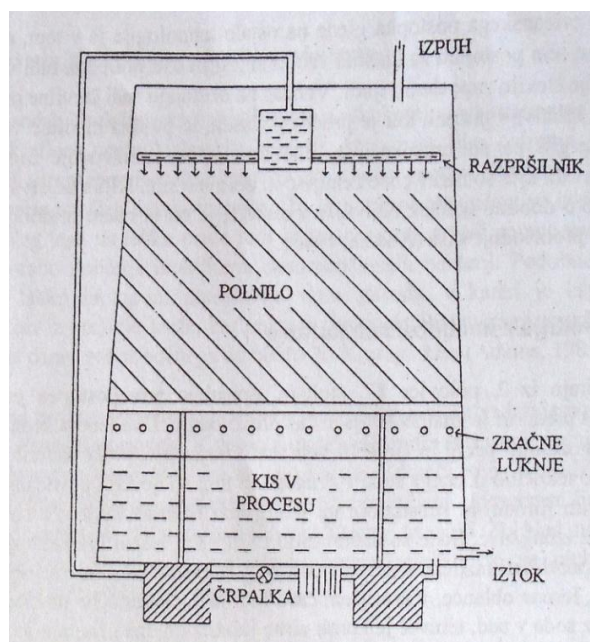
2.3.2 Proizvodnja z imobilizirano kulturo

Pri tej metodi so bakterije imobilizirane na lesenih oblancih, ki so razporejeni po celotni prostornini generatorja, preko teh oblancev pa pronica kis (Mas in sod., 2014).

Večinoma se uporabljajo leseni fermentorji, včasih pa tudi iz nerjavnega jekla. Generatorji so opremljeni s hladilnimi tuljavami, ki omogočajo kroženja zraka, hkrati pa imajo perforirano dno, ki omogoča prezračevanje in s tem ustvarja nekakšno oporo oblancem v cisterni. Z razprševanjem z vrha generatorja se razporedi alkoholna tekočina po celotni

prostornini cisterne. Tekočina pronica preko lesenih oblancev (zaželena je bukev) ali grozdnih pecljev, na katerih se nahajajo bakterije *Acetobacter*, tekočina se nato iz dna črpa nazaj do šobe na vrhu cisterne, da se cikel ponovi. Očetnokislinska fermentacija poteka približno teden dni pri temperaturi 27 - 30 °C, kis se iztoči na dnu cisterne, zanj pa je značilno, da je dokaj bister in da ima dobre senzorične lastnosti, zaradi izhlapevanja pa lahko sicer pride tudi do 20 % izgub kisa (Plessi, 2003).

Življenjska doba oblancev in generatorja je zelo odvisna od vrste surovine. Daljšo omogočajo surovine z manj hranili, saj je rast imobiliziranih bakterij na nosilcih v tem primeru manj intenzivna. Kot nosilce se običajno poleg bukovih oblancev in pecljev grozdja uporablja tudi lignino-celulozne materiale kot so brezove vejice, veje vinske trte, koruzne storže in druge vrste lesa. Medtem ko so generatorji uporabni 5 do 30 let, je potrebno oblance v primeru zasluzenja menjati vsako leto. Da se leseni generatorji ohranijo tako dolgo, morajo biti zaradi korozivnosti vsi ventili, črpalke, cevi in armature narejeni iz plastičnih mas ali nerjavnega jekla (Plessi, 1993).



Slika 6: Shematični prikaz generatorja (Adams, 1985)

2.3.3 Submerzni postopek proizvodnje kisa

Ta metoda se je najprej razvila v ZDA in v Nemčiji in se je nato kot nadomestilo za tradicionalno metodo hitro razširila po celem svetu (Plessi, 2003).

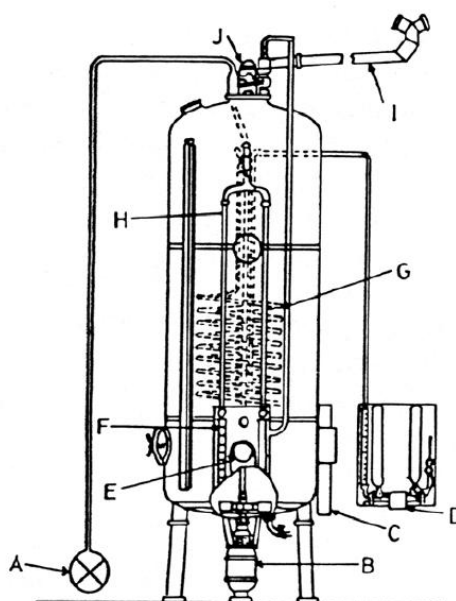
Submerzni način proizvodnje je veliko hitrejša metoda od tradicionalne. Za to metodo je značilno vpihovanje zračnih mehurčkov v vino oz. alkoholni substrat s pomočjo ustreznih turbin. Očetnokislinska fermentacija poteka na površini zračnih mehurčkov, ki so v stiku s tekočim substratom. Izboljšave, ki bi bile potrebne pri tem postopku, so ohranjanje obstojnosti mehurčkov, enakomerna velikost mehurčkov, preprečevanje izgubljanja arome itd. Pretok zraka znatno prispeva k izgubi hlapnih spojin v vinu, kar vpliva na osiromašene

senzoričnih lastnosti v kisu. Prvotno so bili bioreaktorji iz lesa, danes pa so večinoma iz nerjavnega jekla zaradi lažje higiene in večje trpežnosti. Čeprav naj bi leseni bioreaktorji zagotavljali dodatno senzorično kompleksnost, je prenos spojin iz lesa na kis slab, zaradi neravnovesja med kontaktno površino in obsegom ter zaradi hitrosti postopka. Ta pomanjkljivost se lahko izboljša s poznejšim staranjem kisa v lesenih sodih, kar lahko prispeva k obnovitvi nekaterih manjkajočih senzoričnih lastnosti. Kljub slabši kakovosti kisa ima ta metoda dve pomembni prednosti, to sta hitrost (kis nastane v ciklu 24 h) ter kislost (doseže lahko koncentracije očetne kisline do 23-25 %, ostale metode 6-13%) (Mas in sod., 2014).

Izkoristek metode je zelo velik (90- 95 %), do nekaj izgub pa pride zaradi izhlapevanja (Plessi, 2003). Proizvodnja kisa s submerznim postopkom se uporablja v komercialne namene, ker ima več prednosti za proizvajalce, kot so visok donos, manj stroškov in hitrejši način proizvodnje (Turhan in Canbaş 2016).

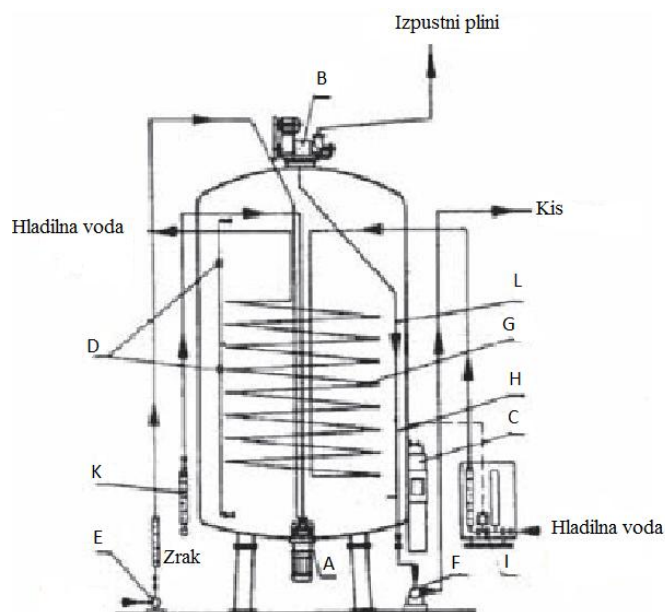
Danes je Frings acetator® najpogosteje uporabljeni fermentor za proizvodnjo vseh vrst kisa s submerzno metodo fermentacije (Palmer in sod., 2006). Za komercialno proizvodnjo ima submerzni fermentor pred fermentorjem z imobilizirano kulturo več prednosti in sicer:

- oksidacija alkohola do očetne kisline je zaradi hitrega prenosa kisika 30-krat hitrejša,
- potreben je manjši volumen fermentorja za proizvodnjo enake količine kisa
- 5-8 % večji donos očetne kisline,
- proces je avtomatiziran, saj so ugotovili, da so očetnokislinske bakterije zelo občutljive na kratka obdobja nizke koncentracije O₂ med submerznim postopkom, zato je potrebno stalno prezračevanje,
- ne prihaja do zamašitve in prekinitve pretoka,
- postopek omogoča enostavno zamenjavo kisa (Desmond in Lee, 2006).



Slika 7: Shema acetatorja (Adams, 1985)

LEGENDA: A- črpalka, B- motor za mešalo, C- odvodna cev, D- ventil za zrak, E- kontrolni termometer, F- merilec pretoka, G- hladilne cevi, H- pregrada za stabilizacijo, I- odvod zraka, J- regulator količine zraka



Slika 8: Shematični prikaz Fringsovega acetatorja (Ebner in Follman, 1983)

LEGENDA: A- aerator, B- regulator pene, C- merilec za določanje vsebnosti alkohola, D- stikalo za nadzor nivoja, E- črpalka, F- črpalka, G- hladilne cevi, H- termometer za nadzor temperature, I- ventil za hladilno vodo, K- merilnik za pretok zraka, L- odvodna cev

2.3.4 Proizvodnja posebnih vrst kisa

Znanih je nekaj posebnih tehnologij proizvodnje kisa, ki načeloma potekajo na enak način že več desetletij oz. stoletij. Opisan je bil že postopek pridobivanja balzamičnega kisa, poznamo pa tudi šeri kis. Značilen je za pokrajino Jerez de la Frontera na jugu Španije. Pridobivajo ga iz šeri vin in je tako kot šeri vino staran po tradicionalni metodi solera. Pri tem gre za serijo sodov, ki so postavljeni v kleti pri sobni temperaturi in v katerih so mešanice kisov različne starosti. Pri tem sodi niso napolnjeni do vrha, kar omogoča sekundarno rast mikroflora v obliki mrene na površini substrata. S pretakanjem iz soda v sod, izboljšamo prezračevanje kar še dodatno pospeši tvorbo očetne kisline iz etanola. Končni izdelek je pridobljen z mešanjem dela vsebine iz različnih sodov. Ti sodi se nato dopolnijo z vsebino iz različnih sodov, medtem ko se pri proizvodnji balzamičnega kisa dopolnijo le iz enega soda. Način mešanja se sicer med različnimi pridelovalci lahko razlikuje. S to metodo pridobljen kis je značilnega močnega in prijetnega okusa, cenovno pa dosega šeri vino (Blanch in sod., 1992).

2.4 SESTAVA JABOLČNEGA KISA

Sestava jabolčnega kisa je močno odvisna od uporabljenih surovin in tehnologije pri proizvodnji. Prav zato je zelo težko oblikovati celovito tabelo o sestavi jabolčnega kisa proizvedenega po svetu. V tabeli so predstavljene glavne sestavine jabolčnega kisa.

Preglednica 2: Parametri sestave jabolčnega kisa (Joshi in Sharma, 2009)

Parameter	vrednosti
Relativna gostota	1,013 - 1,024
Skupna kislina, izražena kot očetna (g/L)	33 - 90
Nehlapne kisline, izražene kot jabolčne (g/L)	0,3 - 4,0
Skupna suha snov (g/L)	13 - 55
Skupni pepel (g/L)	2 - 5
Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	12 - 29
Skupni sladkorji (g/L)	1,5 - 7,0
Proteini (g/L)	0,3
Glicerol (g/L)	2,3 - 4,6
Sorbitol (g/L)	1,1 - 6,4
Barva	Svetla do jantarna
Sledi kovin	
Baker (mg/L)	5,0 max
Železo (mg/L)	10,0 max
Težke kovine (mg/L)	1,0 max
Vsebnost alkohola (vol.%)	0,5 max

Jabolčni kis vsebuje veliko hlapnih in nehlapnih spojin. V enem ali več od šestih komercialnih vzorcev kisa je bilo identificiranih kar 61 spojin (De Ley, 1959), vsaj še 20 prisotnih spojin pa je ostalo neidentificiranih. Podatki o manj pomembnih spojinah so dokaj skopi, saj je prisotnost teh odvisna od več dejavnikov (postopka fermentacije, tehnologije in uporabljenih surovin). Uporaba različnih sort jabolk lahko pomembno vpliva

na sestavo kisa, še zlasti na nehlapne spojine. Pri počasni očetnokislinski fermentaciji po orleanski metodi se proizvede kakovostnejši kis z višjimi vrednostmi estrov, kot z uporabo submerznega postopka. Glavne hlapne spojine v jabolčnem kisu so poleg očetne kisline še acetaldehid, etil formiat, etil acetat, etanol izobutanoat, 2- metilbutanol, 2- butanol, izobutil acetat, acetoin, izopentanol in 2- feniletanol. Najdemo pa tudi druge karbonilne estre in alkohole. Dietil sukcinat, β - fenetil formiat in β - fenetil alkohol so bile prepoznane kot bistvene spojine, ki dajejo jabolčnemu kisu okus in aromo. Acetaldehid, spojine z acetalno skupino in etil acetat nastanejo med metabolizmom kvasovk. Ostale spojine v sledovih se pojavijo med katabolizmom očetnokislinskih bakterij iz snovi v jabolčnem soku, kot je glukonska kislina iz glukoze in acetoin iz DL-laktata. Acetoin se tvori med aktivnostjo mlečnokislinskih in očetnokislinskih bakterij (Joshi in Sharma, 2009).

2.5. ORGANSKE KISLINE

Organske kisline so značilen produkt mikrobnega metabolizma. Vse organske kisline se naravno nahajajo v različnih vrstah zelenjave in živalskih substratih, zato so lahko prisotne bodisi kot sestavine v živilu, ki izvirajo iz običajnih biokemijskih metabolnih procesov ali se dodajo kasneje posredno ali neposredno živilu (Gomis, 1992).

Organske kisline so organske spojine s kislimi lastnostmi, ki vsebujejo ogljik in funkcionalno -COOH skupino. Najbolj pogoste organske kisline so karboksilne kisline, katerih kislost je povezana z njihovo karboksilno skupino -COOH. V splošnem gre za šibke kisline. Kisline z nižjo molsko maso kot sta mravljinčna in očetna kislina so topne v vodi, tiste z višjo molsko maso kot je benzojska kislina pa so netopne. Vseeno je večina organskih kislin zelo dobro topnih v organskih topilih (Theron in Lues, 2007). Organske kisline, ki jih najdemo v živilih, se znatno razlikujejo po strukturi in njihovem inhibitornem delovanju na različne bakterije (Nakai in Siebert, 2003).

Različne organske kisline ali njihovi derivati se uporabljajo kot aditivi, ki so neposredno dodani živilom. Kisline so lahko rezultat fermentacijske aktivnosti starterske kulture, ki se pogosto dodaja mlečnim, zelenjavnim in mesnim izdelkom. Organske kisline lahko izvirajo tudi iz surovin ali pa nastanejo med fermentacijo pri predelavi in skladiščenju (Ricke, 2003). Ena pomembnejših lastnosti je, da imajo neposreden vpliv na aromo ter kakovost nekaterih naravnih in številnih predelanih živil, katerim so bile dodane kot stabilizatorji ali konzervansi (Gomis, 1992). Organske kisline so učinkovit konzervans v živilih, ker poleg njihove protimikrobne aktivnosti, delujejo tudi kot sredstvo za kisanje in tako z znižanjem pH zavirajo rast bakterij (Hinton, 2006).

Moč šibkih kislin merimo s pomočjo pK_a skale. pK_a je pH, pri katerem je kislina polovično disociirana. Nižja kot je vrednost pK_a , močnejša je kislina (Theron in Lues, 2007).



Vsebnost in vrsta organskih kislin v posameznem kisu lahko daje informacije o izvoru, v manjši meri o načinu predelave in staranju, ki jim je bil kis izpostavljen. V kisu prevladuje očetna kislina, ki lahko variira glede na uporabljen substrat ogljikovih hidratov. Očetna kislina je edina organska kislina v kisih pridobljena iz čistega alkohola (Tesfaye in sod., 2009).

Tip in vsebnost nehlapnih organskih kislin sta odvisna od vrste kisa. V jabolčnem kisu prevladuje jabolčna kislina, medtem ko v sladnem kisu prevladujeta mlečna in jabolčna kislina (Tesfaye in sod., 2009).

2.5.1 Očetna kislina

Do konca 19. stoletja se je vsa očetna kislina pridobivala iz klasične fermentacije sladkorjev do etanola, čemur je sledila druga faza oz. očetnokislinska fermentacija do očetne kisline. Razredčena raztopina očetne kisline, ki je proizvedena s pomočjo metabolizma mikrobov, se imenuje kis (Rodgers in sod., 2006).

Očetna kislina nastane s pomočjo očetnokislinskih bakterij, ki oksidirajo etanol. Očetna kislina predstavlja 98 % skupnih kislin v kisu. Do nastanka manjšega deleža očetne kisline pride tudi pri mlečnokislinski fermentaciji iz sladkorjev in citronske kisline, ob prisotnosti mlečnokislinskih bakterij. Delež očetne kisline se lahko od kisa do kisa razlikuje, v balzamičnem kisu je lahko tako vsebnost celo do 18 %, v alkoholnem kisu od 10 do 12,5 %, medtem ko so vrednosti v riževem kisu med 4 in 5 % (Plessi, 1993).

Očetna kislina ima GRAS status in je dovoljena za uporabo kot aditiv in konzervans v živilih po vsem svetu (Smulders in Greer, 1998). Znana je potem, da daje močan okus in hkrati povečuje učinkovitost ostalih aditivov okusa in snovi prisotnih v različnih živilih (Šimšek in sod., 2006).

2.5.2 Jabolčna kislina

Jabolčno kislino najbolj pogosto najdemo v jabolkih in drugem sadju. V zelenjavi velja za močnega zaviralca rasti kvasovk in nekaterih bakterij (Barbosa- Cánovas in sod., 2003). Jabolčna kislina inhibira rast termofilnih bakterij učinkoviteje od očetne in mlečne kisline, medtem ko je manj učinkovita pri zaviranju rasti patogenih bakterij *Listeria monocytogenes* (Theron in Lues, 2011). Ima bolj zaokrožen in dolgotrajen okus, čeprav ima kiselkast okus; ta ni ostrejši od citronske kisline, vendar je dolgotrajnejši. Ugotovljeno je bilo, da prekrije grenak priokus umetnih sladil, kot je npr. aspartam (Fowlds in Rycroft, 1998).

Jabolčna kislina je bila leta 1924 identificirana kot produkt fermentacije kvasovk. Od takrat je znano, da se za proizvodnjo lahko uporablja širok spekter mikroorganizmov. Fermentacijsko pridobivanje jabolčne kisline se je pokazalo kot najbolj uspešno s plesnimi vrste *Aspergillus flavus*. Jabolčna kislina se v glavnem uporablja kot aditiv ter ojačevalec okusa pijač v živilski industriji (Rintze in sod., 2008).

Na vsebnost jabolčne kisline v kisu vplivajo osnovna surovina, alkoholna fermentacija in prisotnost mlečnokislinskih bakterij. Kvasovke jabolčno kislino porabljajo ali sintetizirajo.

Koncentracije jabolčne kisline v kisu po fermentaciji se gibljejo med 0,6 do 2 g/L (Bertolini in sod., 1994).

2.5.3 Vinska kislina

Vinska kislina je naravno prisotna v sadju kot so grozdje ter ananas in posledično je glavna kislina v vinu (Theron in Lues, 2011). Zaradi njene nizke vrednosti pK_a je vinska kislina pogosto uporabljena kot sredstvo za kisanje živil (Comes in Beelman, 2002). Kisel okus vinske kisline je bolj gladek kot pri citronski kislini, hkrati pa je tudi bolj kislega in dolgotrajnejšega okusa. Spada me najdražje kisline, ki se uporabljajo v živilih (Fowlds in Rycroft, 1998).

Vinska kislina je značilna predvsem za vinske kise, ki vsebujejo razmeroma malo jabolčne kisline. Vrednost kislin je odvisna predvsem od porekla vina in enoloških tehnik, ki so bile uporabljene (Tesfaye in sod., 2009).

2.5.4 Citronska kislina

Citronska kislina je priljubljen aditiv, ki se pogosto dodaja živilom (Theron in Lues, 2011). S svojini solmi je ena izmed najbolj pogosto uporabljenih organskih kislin v živilih kot tudi v farmacevtski industriji (Couto in Sanroman, 2006). Deluje kot antioksidant, saj kelira kovinske ione, ki bi sicer delovali kot katalizatorji. Citronska kislina je tipični produkt fermentacije, ki so jo najprej proizvajala velika podjetja zahodnih držav (Theron in Lues, 2011).

Citronska kislina ima osvežilen in prijetno kiselkast okus ter je dobro topna v vodi. Zaradi teh pozitivnih lastnosti je najbolj pogosto uporabljena kislina v živilski industriji. Živilska industrija je hkrati tudi največji potrošnik, saj je porabi 70 % celotne proizvodnje, sledi ji farmacevtska industrija z okrog 12 % (Couto in Sanroman, 2006).

2.5.5 Mlečna kislina

Mlečna kislina je glavni končni produkt fermentacije ogljikovih hidratov, pri kateri sodelujejo mlečnokislinske bakterije (Tormo in Izco, 2004).

Mlečna kislina je organska kislina s širokim spektrom uporabe v industriji. FDA jo uvršča v skupino GRAS, zelo pogosto se uporablja kot sredstvo za kisanje, okus, pufer ali kot konzervans (Vall in sod., 2006). Mlečna kislina ni naravno prisotna v živilih, ampak je proizvedena med fermentacijo živila s pomočjo mlečnokislinskih bakterij. Sem spadajo kislo zelje, kumarice, olive, nekatere vrste mesa in mlečni izdelki (Barbosa- Cánovas in sod., 2003). Uporablja se v različnih vrstah živil, kot so meso, ribe, zelenjava, žita in slaščice. V fermentiranih pijačah prispeva specifično aromo in podaljša obstojnost. (De la in sod., 2005).

Lahko je proizvedena bodisi s kemično sintezo ali fermentacijo. Pri kemični sintezi je rezultat reakcije mešanica dveh izomer, medtem ko dobimo med fermentacijo čisto obliko mlečne kisline. Ta je odvisna od vrste mikroorganizmov, fermentacijskega substrata in

fermentacijskih pogojev. Mlečna kislina se lahko proizvaja iz obnovljivih materialov s pomočjo različnih vrst gliv *Rhizopus*. To ima veliko prednosti pred bakterijsko proizvodnjo, zaradi manjših zahtev po hranilih in biomase gliv, ki je dragocen stranski proizvod fermentacije (Zhang in sod., 2007).

2.5.6 Sorbična kislina

Sorbična kislina je šibka organska kislina, ki se uporablja za konzerviranje hrane. Uporablja se v živilih in živalskih krmilih (Piper, 1999).

Skupaj z benzojsko in očetno kislino je sorbična kislina najbolj pogosto uporabljen konzervans v hrani s širokim protimikrobnim spektrom delovanja (Plumridge in sod. 2004).

Sorbični kislini se daje prednost pred ostalimi organskimi kislinami, ker je fiziološko neškodljiva in senzorično nevtralna. Sorbična kislina in njene soli imajo več prednosti kot konzervans. Imajo visoko aktivnost proti glivam, kakor tudi proti širokemu spektru bakterij, zlasti na katalaza pozitivne organizme. Uporabljena koncentracija običajno ne spremeni okusa ali vonja živila, hkrati pa velja za neškodljivo (Gonzalez - Fandos in Dominguez, 2007).

2.5.7 Glukonska kislina

Glukonska kislina velja za blago organsko kislino, ki jo pridobimo iz glukoze s preprosto oksidacijo, ki jo katalizirajo encimi glukoza oksidaza v glivah in glukoza dehidrogenaza v bakterijah (npr. *Glukonobacter*). Mikrobnna proizvodnja glukonske kisline sega več desetletij nazaj in od takrat velja za primarno metodo proizvodnje. Za najbolj pogosto uporabljen mikroorganizem pri fermentacijskem postopku velja *Aspergillus niger*. Glukonska kislina in njeni derivati (npr. natrijev glukonat) se pogosto uporabljajo v živilih in farmacevtski industriji. Poleg tega je blaga organska kislina, nekorozivna, nehlapna in netoksična. Živilom daje osvežilno kiselkast okus in se uporablja za preprečevanje nastanka mlečnih kamnov (usedline) v mlečni industriji (Ramanchandran in sod., 2006).

Glukonska kislina je dobro topna v vodi in velja za varen aditiv v živilih v večini držav, zato se uporablja pri številnih postopkih v živilski industriji. V mlekarski industriji se dodaja kot čistilo, za preprečevanje usedline kalcijevih soli pri molznih strojih in posodah za shranjevanje (Rodgers in sod., 2006).

2.5.8 Jantarna kislina

Jantarna kislina je dikarboksilna kislina, sestavljena iz štirih ogljikovih atomov. V naravi se pojavlja v rastlinskih in živalskih tkivih. Jantarna kislina se uporablja v živilih kot sekvestrant ter nevtralizator. Kot vmesni kemijski produkt se uporablja tudi v medicini ter v proizvodnji lakov in parfumov (Theron in Lues, 2011).

Jantarna kislina ima nenavadno slan in grenek okus. Predstavlja pomembno organsko kislino, ki nastane z metabolizmom kvasovk. Sevi kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*

proizvajajo jantarno kislino v zelo različnih količinah do 2 g/L, medtem ko *Saccharomyces bayanus* in *Saccharomyces uvarum* proizvajajo nekoliko večje količine (Ugliano in Henschke, 2009).

2.6. NAPAKE JABOLČNEGA KISA

Večje pomanjkljivosti, ki se lahko pojavijo pri jabolčnem kisu so:

- Matična mrena: na vrhu prihaja do celuloznega filma, ki ga proizvaja *Gluconacetobacter xylinus*.
- Jeguljica *Turbatrix aceti* rastejo na vrhu fermentacijske tekočine in posode za shranjevanje. Pojavi se lahko v katerikoli fazi izdelave kisa, vendar se vseeno bolj pogosto dogaja med skladiščenjem ali zorenjem kisa. Prisotnost jegulije ima prednosti in slabosti. Prednost je v tem, da se kis očisti mrtvih ali umirajočih celic *Acetobacter* ter ohrani proces očetnokislinske fermentacije čist in aktiven. Slabost pa se kaže predvsem v zmanjšanju skupnega števila bakterij in zmanjšanju kislosti kisa. Jeguljico lahko nadziramo z dvigom temperature kisa na 40 do 45 °C, s katero ubijemo jeguljico, vendar pa ne celic *Acetobacter*, druga možnost pa je dodatek SO₂. Odstranitev je možno doseči tudi s filtracijo in pasterizacijo.
- Ne-mikrobiološki izvor motnosti: Jabolčni sok, jabolčno vino in jabolčni kis so zelo bogati s polifenoli, ki so glavni vzrok za pojav motnosti v kisu. V splošnem večina polifenolov polimerizira med zorenjem jabolčnega kisa, usedlina pa pade na dno posode. Tako postane kis stabilen. Če jabolčni kis ni povsem dozorel, polifenoli ne polimerizirajo. Ko se steklenica odpre in pride v stik s kisikom, hitro pride do polimerizacije na dnu pa se tvori usedlina. Motnost, ki ni mikrobiološkega vzroka, lahko nadziramo z dodatkom konzervansa (predvsem SO₂), s podaljšanjem časa zorenja ali z uporabo sredstev za bistrenje kot so želatina ali bentonit (Joshi in Sharma, 2009).

2.7 SENZORIČNA ANALIZA

Senzorična analiza je definirana kot znanstvena disciplina, ki prepozna in interpretira senzorične lastnosti živil, ki jih lahko zaznamo z vsemi petimi čutili (vid, okus, voh, sluh, dotik) (Stone in Sidel, 2004). S senzorično analizo se lahko zaznava prisotnost ali intenzivnost izraženih lastnosti izdelka, ocenjuje razlike med posameznimi vzorci in kvantitativno ocenjuje izdelke (Lawless in Heymann, 2010).

Senzorični testi so zelo uporabni pri razvoju novih ali obstoječih izdelkov na trgu. Z njimi lahko ugotovimo, katere lastnosti si potrošniki želijo in jih nato pri razvoju bolj izrazimo, hkrati pa se na drugi strani izognemo tistim lastnostim, ki so potrošnikom nesprejemljive. Senzoričnimi testi tako pomembno prispevajo k razvoju novih in optimiziranju že obstoječih izdelkov na trgu (Resurreccion, 2007). Panel je skupina preskuševalcev, izbranih in usposobljenih za delo na določenem senzoričnem preskusu. Izbor senzorične metode je odvisen predvsem od našega namena ocenjevanja, vrste, narave in števila izdelkov, ki se jih ocenjuje ter tudi od usposobljenosti preskuševalcev. Glede na to, kakšen

je naš cilj, izbiramo med hedonskimi in analitičnimi preskusi. Kadar želimo ugotoviti stopnjo sprejemljivosti ali se sprašujemo kateremu izdelku dati prednost, uporabljamo hedonske preskuse, medtem ko se pri ugotavljanju razlik in merjenju specifičnih senzoričnih lastnosti izdelka poslužujemo analitičnih preskusov (Golob in sod., 2005).

Senzorično ocenjevanje je kvantitativna znanost, ki prikazuje povezavo med značilnostmi proizvoda in percepcijo preskuševalca. Preskuševalci lahko razlikujejo med majhnimi razlikami vzorcev ali izrazijo prednost vzorca pred drugim. Druga možnost ocenjevanja je z uporabo lestvic, kjer preskuševalec ocenjuje intenzivnost izražene neke lastnosti. Tretji način ocenjevanje je opisna analiza. Pri tem načinu ocenjevanja so lahko rezultati zelo spremenljivi, saj na njih vplivajo razpoloženje, motivacija, občutljivost, pretekle izkušnje itd. Da lahko opredelimo rezultate kot resnične in ne kot posledica nekontroliranih variacij v odgovorih, je potrebna tudi statistična obdelava podatkov in na koncu interpretacija rezultatov (Lawless in Heymann, 2010).

Senzorični preskuševalci se morajo šolati v več fazah senzorične analize in sicer v zaznavanju, merjenju, analizi in interpretaciji. Poznati morajo izdelek, ki se testira, razumeti panel kot merilni instrument, obvladati statistično analizo in znati interpretirati podatke glede na postavljeno začetno hipotezo raziskave (Lawless in Heymann, 2010).

Za dober preskus, potrebujemo dober panel oziroma merilni instrument, ki nam lahko zagotovi, da so napake meritev, zaključkov in odločitev minimalne, šele takrat lahko govorimo o uspešnem in dobrem preskusu. Posameznikov (npr. vodja razvoja ali proizvodnje ali avtoritativna oseba), ki so nekoč v podjetjih predstavljali ocenjevalce kakovosti, danes ne poznamo več. Senzorično ocenjevanje poteka v skupini ljudi, ki jo predstavlja panel ali strokovna komisija. Panel je usposobljen za ocenjevanje specifičnih lastnosti izdelka, da nam kvantitativni opis izdelka, rezultate pa lahko statistično obdelamo. Panel je usposobljen za usklajeno ugotavljanje lastnosti izdelkov (Puri in sod., 2016).

Pri tem moramo razlikovati med zahtevami pri izvedbi analitičnih ali hedonskih preskusov. Pri hedonski analizi, kjer gre za ugotavljanje potrošniške sprejemljivosti nekega izdelka, pri čemer nam izšolani preskuševalci ne koristijo, saj želimo vključiti povprečne predstavnike potrošnikov. Iz omenjenih razlogov izšolani preskuševalci niso vključeni v tovrstne analize (Golob in sod., 2005).

Senzorično analizo lahko izvajajo trije tipi preskuševalcev:

- preskuševalci– to so laiki in začetniški preskuševalci,
- izbrani preskuševalci- tisti, ki so bili izbrani in šolani za delo na določenem problemu,
- izvedenci (eksperti ali strokovnjaki) so lahko
 - izvedeni preskuševalci (strokovni preskuševalci), ki so pri delu v panelu pokazali določeno izostrenost svojih čutov in razvili dober, dolgotrajen spomin
 - ali specializirani izvedeni preskuševalci (specializirani strokovni preskuševalci), ki uporabljajo specialno znanje, pridobljeno na določenih strokovnih področjih (Golob in sod., 2005).

Senzorična kakovost kisa je v glavnem odvisna od arome. Okus kisa določajo predvsem uporabljene surovine, komponente, ki se oblikujejo med fermentacijo in tiste, ki nastanejo v času zorenja (Tsfaye in sod., 2009).

Po Pravilniku o kakovosti kisa in razredčene očetne kisline (2004) morata biti vonj in okus značilna za vrsto surovine, iz katere je kis izdelan. Kis mora biti bister, brez motnosti in usedlin, ki jih povzročajo mikroorganizmi, izjema sta jabolčni in vinski kis, pri katerih se lahko pojavijo primesi in usedline, ki izhajajo iz surovine (Golob in sod., 2005).

2.7.1 Uporaba senzorične analize

Senzorična analiza je zelo uporabna veda v živilski industriji in v vsakdanjem življenju. Živilska industrija jo uporablja predvsem pri razvijanju novih izdelkov, za kontrolo izdelkov in surovin, primerjanje konkurenčnih izdelkov itd. Potrošniki se s senzorično analizo vsakodnevno srečujejo pri okušanju hrane in pri ugotavljanju vsečnosti izdelkov s čimer pomembno vpliva tudi na smernice živilske industrije.

Potencialni bodoči kupci lahko preko senzorične analize nakažejo svoje želje in tako vplivajo na njegovo končno podobo (Crawford, 1997).

Živilska podjetja pogosto opažajo, da potrošniki ne znajo natančno opisati, kaj si želijo v določenem produktu. Te informacije pa poskušajo pridobiti z dobrim opazovanjem njihovih navad (Moskowitz in sod., 2005).

Senzorične ocene nam lahko pokažejo pomembne smernice pri razvoju izdelkov. Na podlagi ocen se lahko podjetja odločijo za spreminjanje izdelkov oz. receptur, prav tako pa lahko znižajo stroške ali se odločijo za zamenjavo surovin s cenejšimi ali bolj kakovostnimi.

2.7.2 Senzorični preskusi

Vsaka vrsta preskusov ima svoje značilnosti, prednosti in omejitve tako glede izvedbe kot tudi zahtev po potrebnem predhodnem znanju. Na izbor preskusa vpliva problem, ki ga želimo rešiti, število vzorcev in tudi število ter usposobljenost članov panela, ki ocenjujejo vzorce. Ko izbiramo preskus, si lahko pomagamo z vprašanjem, kaj nas zanima? To je lahko sprejemljivost izdelka ali razlika med dvema izdelkoma v neki senzorični lastnosti. Glede na odgovore izberemo ustrezno vrsto preskusa in določimo pogoje za izvedbo.

Preglednica 3: Pregled senzoričnih preskusov (Golob in sod., 2005)

Vrsta preskusov	Preskusi	Vprašanje	Značilnost preskuševalcev
Hedonski	Afektivni	Kako ti je vzorec všeč? Kateri vzorec je bolj sprejemljiv?	Izbrani za določeno vrsto izdelka, nešolani.
Analitični	Preskusi razlikovanja	Ali se vzorci med seboj razlikujejo?	Izbrani glede na senzorične sposobnosti.
	Preskusi z uporabo lestvic	Kako bi z uporabo lestvice ocenili določeno senzorično lastnost v vzorcih ali ugotovili sprejemljivost vzorcev?	Analitični, šolani ali nešolani.
	Opisna analiza	Kakšne so razlike v eni ali več senzoričnih značilnostih?	Izbrani glede na senzorične sposobnosti in motivacijo, šolani ali celo visoko usposobljeni.

2.7.2.1 Opisna ali deskriptivna analiza

Po definiciji je opisna analiza postopek opisovanja zaznanih senzoričnih lastnosti izdelka, običajno v takem vrstnem redu, kot jih zaznamo. Je popoln senzorični opis, ki vključuje vse občutke, zaznane med ocenjevanjem izdelka (vidne, slušne, vohalne, tipne, itd.). Opisna analiza velja za najbolj izpopolnjeno senzorično metodo, saj omogoča pridobitev popolnega senzoričnega opisa izdelka, pomaga prepoznati osnovne sestavine, ugotoviti tehnološke spremembe in/ali določiti, katera senzorična značilnost je pomembna za sprejemljivost danega izdelka. Ker opisno analizo izvajajo le šolani in ustrezno usposobljeni senzorični strokovnjaki, jo smatramo za objektivno metodo. Odvisno od uporabljene tehnike pa je lahko kvalitativna ali kvantitativna (Gacula, 1997; Lawless in Heymann, 1999).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Pri poskusu smo kot osnovno surovino uporabljali jabolčni koncentrat dobavljen iz podjetja Šampionka d.o.o., ki je bil shranjen v 50 L plastičnih posodah v skladišču fakultete. Za alkoholno fermentacijo smo uporabili kvasovke Fermol Associées, katerim smo dodali hrano za kvasovke Enovit.

Kvasovke Fermol Associées združujejo dva kompatibilna seva kvasovk in sicer vrsti *Saccharomyces cerevisiae* in *Saccharomyces bayanus*. Za njih je značilno hitro razmnoževanje z nizko tvorbo pene, odporne so na visoko stopnjo alkohola in hkrati porabljajo sladkor tudi v primeru nenadnih sprememb temperature. Poleg tega se tvorba H_2S , očetne kisline in acetaldehida zmanjša na minimum. Vina pridobljena iz Fermol Associées vsebujejo kompleksne in intenzivne vonje kot posledica kombinacije dveh sevov kvasovk. To vodi do izražanja številnih prekurzorjev, poudari pa tudi primarne sadne arome. Uporaba je primerna za rdeča ali bela vina (AEB, 2016b).

Enovit je hrana za kvasovke, za katero je značilno, da aktivira in uravnana fermentacijo mošta oz. vina. Spodbudi se aktivacija in razmnoževanje kvasovk. Zagotavlja tudi zadosten vir dušika, vitaminov ter mikroelementov, ki so potrebni za metabolizem kvasovk. Uporaba Enovita preprečuje nastanek H_2S in hkrati rušenje metabolizma kvasovk. Vsebnost dušika, ki se hitro asimilira in ga vsebuje pripravek Enovit spodbudi proizvodnjo aromatičnih hlapnih spojin in zavira tvorbo višjih alkoholov, ki dajejo grob okus. Pri fermentaciji Enovit omogoča popolno pretvorbo sladkorja. Zanj je značilno, da je topen v vodi in je rahlo alkalen, po videzu pa zgleda kot bel fin prah (AEB, 2016a).

3.1.1 Laboratorijska oprema

- merilna pipeta (1 mL, 2 mL, 25 mL)
- merilni valj (50 mL, 100 mL, 250 mL, 1 L)
- pH meter
- čaše (100 mL, 250 mL)
- centrifugirke (100 mL)
- stojalo za centrifugirke
- kapalka
- lij
- erlenmajerica (3 L)
- refraktometer
- steklenice (7 L, 5 L)
- zamaški za steklenice
- platenke (500 mL)
- plastični zamaški
- acetator
- plastične posode (50 L)
- tehtnica

- vrelna veha
- spatula.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Priprava vzorca

Priprava jabolčne raztopine

Vzorec jabolčnega koncentrata smo najprej razredčili z vodo do stopnje 13,5 % SS. Iz pripravljenega vzorca (13,5 % SS) smo z dodajanjem jabolčnega koncentrata pripravili še vzorca s 16,5 % in 19,5 % SS. Vzoredno smo pripravili tudi vzorca s 16,5 % in 19,5 % SS, ki smo ju po pripravljeni 13,5 % SS raztopini, dosladkali s saharozo.

Posebej smo zatehtali 30 g/hL hrane za kvasovke (Enovit), ki smo jo najprej raztopili v 100 mL vode ter jo nato dodali v vse vzorce za fermentacijo.

Priprava kvasnega nastavka

Kvasovke (Fermol) in sladkor smo zatehtali in raztopili v vodi s temperaturo 33 do 34 °C. Glede nato, da smo za fermentacijo uporabili 7 L vzorca smo zatehtali 20 g/hL kvasovk ter 13 g/hL sladkorja. Kvasovke in sladkor smo pustili 20 min v mlačni vodi, da so se kvasovke rehidrirale, nato pa smo jih dodali v pripravljene jabolčne raztopine.

3.2.2 Potek fermentacije

Vzorce smo dobro premešali, da so se kvasovke in hrana (Enovit) enakomerno razporedile po steklenici. Fermentacijske steklenice (7 L), ki smo jim namestili vrelna vehe smo nato pustili v kleti, kjer je potekala alkoholna fermentacija pri 17 °C. Po zaključeni alkoholni fermentaciji smo vzorce prenesli v acetator, kjer je potekala še očetnokislinska fermentacija do jabolčnega kisa. V acetator smo prenesli 6 L jabolčnega vina, ki smo mu dodali 100 mL domačega kisa. Ob menjavi vzorcev jabolčnih vin v acetatorju pa smo vedno dodali novih 100 mL sveže nastalega kisa iz predhodnega vzorca v acetatorju in hkrati s tem prenesli očetnokislinske bakterije. Očetnokislinska fermentacija je potekala pri 28 °C.

Preglednica 4: Legenda okrajšav vzorcev jabolčnega kisa in vina

Okrajšava	Vzorec
Vzorec 1	Jabolčni kis iz jabolčnega koncentrata s 13,5 % SS
Vzorec 2	Jabolčni kis iz jabolčnega koncentrata s 16,5 % SS
Vzorec 3	Jabolčni kis iz jabolčnega koncentrata s 19,5 % SS
Vzorec 4	Jabolčni kis z dodatkom saharoze s 16,5 % SS
Vzorec 5	Jabolčni kis z dodatkom saharoze s 19,5 % SS
Vzorec 6	Jabolčno vino iz jabolčnega koncentrata s 13,5 % SS
Vzorec 7	Jabolčno vino iz jabolčnega koncentrata s 16,5 % SS
Vzorec 8	Jabolčno vino iz jabolčnega koncentrata s 19,5 % SS
Vzorec 9	Jabolčno vino z dodatkom saharoze s 16,5 % SS
Vzorec 10	Jabolčno vino z dodatkom saharoze s 19,5 % SS

3.2.3 Fizikalno-kemijske analize WineScanTM Foss

WineScan je FTIR instrument (ang. Fourier Transform Infrared Spectroscopy). Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo, omogoča predvsem hitre, natančne in točne meritve vzorcev (Moreira in Santos, 2004). Ena glavnih prednosti aparata WineScan so nizki obratovalni stroški ter skoraj zanemarljivi stroški reagentov, ki se uporabljajo pri analizi, zato je lahko dobra rešitev za velike kleti. Gre za robustne in zanesljive aparate, ki omogočajo nadzor kakovosti v vseh fazah proizvodnje (Frost, 2016).

WineScan je kalibriran za suha vina s klasičnimi metodami, kalibracijske krivulje pa se redno potrjujejo z medlaboratorijsko primerjavo. Akreditirani parametri za vino so: relativna teža, vsebnost alkohola, vsebnost ekstrakta ter vsebnost skupnih in hlapnih kislin. Potrjeni parametri za vino pa so: reducirajoči sladkorji, vrednosti pH, jabolčna kislina mlečna kislina, citronska kislina, vinska kislina, glicerol, CO₂ in FC indeks. Natančnost FTIR metode je neposredno odvisna od kakovosti uporabljenih kalibracij. Običajno je čas analize med 6-30 sekund, zahtevana točnost ne sme odstopati za več kot 1 %, natančnost pa ne sme odstopati za več kot 0,5 % (Soriano in sod., 2007).

WineScan analiza deluje na principu infrardeče spektroskopije, saj imajo fotoni infrardeče svetlobe (valovna dolžina 2,5-50 μm), energijo, primerno za vzbujanje nihanj vezi med atomi v posameznih molekulah. Ti nihajo na različne načine, ki so značilni za posamezen tip vezi, zato jih lahko uporabimo za kvalitativno in kvantitativno določitev komponent v vzorcu. Posamezni spektri molekul so zelo kompleksni in velja, da večja kot je molekula, večje je število nihanj. Lega absorpcijskega vrha določene vezi je odvisna od okolice, v kateri se vez nahaja. Za ugotavljanje prisotnosti posameznih funkcionalnih skupin infrardeče spektre navadno snemamo v območju 400 cm^{-1} - 1600 cm^{-1} (Škvarč, 2007).

Po končani alkoholni in očetnokislinski fermentaciji smo vzorce pretočili v 50 mL cetrifugirke za analize, ki so bile opravljene na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica (KGZ NG). S pomočjo aparature WineScanTM Foss smo opravili hitre analize jabolčnega vina (relativna gostota pri 20 °C, volumski delež alkohola, skupni ekstrakt in sladkorja prosti ekstrakt, reducirajoči sladkorji, skupne in hlapne kisline, pH vrednost ter

vsebnost jabolčne, citronske, mlečne in vinske kisline). Pri vzorcih kisa smo poleg naštetih podatkov pridobili še vrednosti za vsebnost glukonske in sorbične kisline, glicerola, metanola in CO₂.

3.2.4 Senzorična analiza

Senzorična analiza je bila izvedena v senzoričnem laboratoriju v prostorih oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti. V prostoru je bila zagotovljena ustrezna naravna svetloba, temperatura in enakovredna ocenjevalna mesta. Temperatura v času senzorične analize je bila 21 °C.

Vzorci jabolčnega vina in kisa so senzorični preskuševalci ocenjevali v standardnih kozarcih za senzorično analizo vina. Na ocenjevanju so bili prisotni štirje preskuševalci, vsak pa je dobil po približno 50 mL vzorca vina ali kisa. Kot nevtralizacijsko tekočino smo uporabili vodo. Najprej se je ocenjevalo 4 vzorce vina (vzorec 9; vino s 16,5 % SS iz saharoze je bil izločen), temu pa je sledilo 5 vzorcev kisa. Vzorci so bili razvrščeni po vrstnem redu glede na stopnjo suhe snovi, tako smo pričeli z vzorci s 13,5 % SS in nadaljevali z vzorci s 16,5 %, in 19,5 % SS.

Preglednica 5: Vrstni red vzorcev pri senzorični analizi

Vrstni red ocenjevanja	Vzorec
1.	Vzorec 6
2.	Vzorec 7
3.	Vzorec 8
4.	Vzorec 10
5.	Vzorec 1
6.	Vzorec 4
7.	Vzorec 2
8.	Vzorec 3
9.	Vzorec 5

Pri senzoričnem ocenjevanju vin poznamo dve osnovni metodi: primerjalno in kvantitativno. S primerjalnimi metodami poleg absolutne kakovosti merimo tudi razlike med posameznimi »enakimi« vini.

Za ocenjevanje jabolčnega vina smo uporabili kvantitativno Buxbaumovo 20-točkovno metodo, ki velja tudi za uradno metodo za ocenjevanje vin na državnem ocenjevanju vin (Pravilnik o postopku in načinu ocenjevanja, 2000). Pri tem pomeni vrednost 0, da lastnost ni izražena ali pa je nespremenljiva. Vrednosti na zgornji meji 2, 4 ali 6 pa pomenijo, da je lastnost močno ali odlično izražena.

Buxbaumanovo metodo se uporablja za popoln opis vseh zaznav v izdelku (od začetnih vizualnih ocen do pookusa) ali pa za ocenjevanje neke določene senzorične lastnosti, kot je npr. aroma. Pri kvantitativni metodi se podatki ne združijo v soglasni diskusiji, ampak se upoštevajo posamezno, za opis intenzivnosti ocenjene lastnosti se uporablja nestrukturirana lestvica, običajno linearna grafična lestvica. Člani panela pripravijo referenčne vzorce, izberejo opisnike in določijo vrstni red ocenjevanja posameznih senzoričnih lastnosti.

Vodja panela s pomočjo statistične analize preveri skladnost posameznega preskuševalca in celotnega panela. Vodja panela pri analizi ni aktiven, ampak jo le nadzoruje, prav tako ne sodeluje pri oblikovanju deskriptorjev in končnem ocenjevanju. Vodja panela je odgovoren za pripravo vzorcev in komunikacijo med člani panela. V analizi podatkov uporabljamo individualne ocene, zato ni možno, da prevlada ocena posameznika (Piggott, 1988). Rezultate senzorične analize smo statistično obdelali z General Linear Model (GLM) proceduro.

Dobljene rezultate smo prenesli in uredili s programom Microsoft Excel, nato pa smo osnovne statistične parametre izračunali s postopkom MEANS, normalnost porazdelitve pa smo testirali s postopkom UNIVARIANTE (SAS Software, 1990). Rezultati so bili obdelani po postopku GLM (General Linear Models), po metodi najmanjših kvadratov. Za analizo vpliva eksperimentalne skupine na instrumentalne, senzorične in kemijske parametre kisov, smo uporabili statistični model, v katerega smo vključili fiksni vpliv skupine (S, vzorec 1, vzorec 2, vzorec 3, vzorec 4, vzorec 5) in paralelke (P, dve paralelke oz. štirje preskuševalci):

$$y_{ijk} = \mu + S_i + P_j + e_{ijk} \quad \dots(3)$$

Z Duncanovim testom smo izračunali povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine, ki so bile primerjane pri 5 % tveganju. Pearsonovi korelacijski koeficienti med parametri kisov so bili izračunani s postopkom CORR (SAS Software, 1990). Linearni statistični modeli so bili prvi v vrsti modelov, ki so bili natančno raziskani in veljajo kot zelo pomemben del sedanje statistične obdelave (Tian in Zhang, 2016). Sistem točkovanja senzorične analize je prikazan v spodnji tabeli.

Preglednica 6: Preglednica za ocenjevanje vin z Buxbaumovo 20-točkovno metodo (Košmerl in Kač, 2009)

Vzorec	Bistrost (0-2 točki)	Barva (0-2 točki)	Vonj (0-4 točke)	Okus (0-6 točk)	Harm- Onija (0-6 točk)	Skupaj (0-20 točk)	Opom- be
vzorec 6							
vzorec 7							
vzorec 8							
vzorec 10							

Senzorično ocenjevanje kisa je potekalo s pomočjo 20-točkovne metode, ki se delno razlikuje glede na ocenjevanje vin. Spodnja tabela prikazuje sistem točkovanja pri vzorcih kisa.

Preglednica 7: Preglednica za ocenjevanje kisa z 20-točkovno metodo

Vzorec	Okus (0-8 točke)	Vonj (0-4 točke)	Barva (0-4 točke)	Bistrost (0-4 točke)	Skupaj (0-20 točk)	Opombe
vzorec 1						
vzorec 4						
vzorec 2						
vzorec 3						
vzorec 5						

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

S kemijskimi in senzoričnimi analizami smo želeli prikazati razlike med posameznimi vzorci. Rezultati so pokazali določene razlike med vzorci, ki bodo prikazane v nadaljevanju naloge.

Čas fermentacije vzorcev z različnimi deleži suhe snovi je bil različen. Spodnja preglednica prikazuje čas trajanja alkoholne in očetnokislinske fermentacije.

Preglednica 8: Čas alkoholne in očetnokislinske fermentacije

Vzorec	Čas alkoholne fermentacije	Čas očetnokislinske fermentacije
Vzorec 1	67 dni	7 dni
Vzorec 2	94 dni	15 dni
Vzorec 3	108 dni	19 dni
Vzorec 4	49 dni	18 dni
Vzorec 5	72 dni	23 dni

Iz preglednice 9 lahko razberemo, da je bil čas alkoholne in očetnokislinske fermentacije daljši pri vzorcih z večjim deležem suhe snovi. Alkoholna fermentacija je pri vzorcih iz jabolčnega koncentrata potekala dlje časa v primerjavi z vzorci, ki smo jim dodali saharozo. Nasprotno je bilo pri očetnokislinski fermentaciji, ki je bila pri enakem deležu suhe snovi daljša pri vzorcih z dodatno saharozo.

Preglednica 9: Vsebnost alkohola v vzorcih jabolčnega vina po alkoholni fermentaciji

Parameter	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Vzorec 5
alkohol (vol.%)	7,48±0,01	9,03±0,00	10,81±0,01	9,55±0,00	11,59±0,01

Iz preglednice 10 lahko razberemo, da je vsebnost alkohola v vzorcih jabolčnih vin uporabljenih v našem poskusu naraščala z večjim deležem suhe snovi, kar je v skladu z našimi pričakovanji. Največ alkohola sta vsebovala vzorca z 19,5 % delež suhe snovi. Če primerjamo jabolčna vina iz jabolčnega koncentrata s tistimi, ki jim je bila dodana saharoza, lahko opazimo, da je nastalo več alkohola pri vzorcih s saharozo, vzorca sta pri enakem deležu suhe snovi vsebovala 5,76 – 7,22 % več alkohola. Iz tega lahko sklepamo, da je za povečevanje deleža alkohola v jabolčnih vinih bolj primeren dodatek saharoze. Do zelo podobnih rezultatov in ugotovitev je prišla tudi Somrak (2014), ki je pri svojem delu uporabila prav tako tudi kvasovke Fermol Associées in hrano Enovit. Tudi v njenem primeru je imel vzorec s saharozo z 19,48 % SS največjo vsebnost alkohola (11,76 vol.%). Minimalna odstopanja v deležu alkohola pa so bila tudi pri ostalih vzorcih z različnimi deleži suhe snovi.

Preglednica 10: Vsebnost skupnega ekstrakta, skupnih in hlapnih kislin ter jabolčne kisline v vzorcih kisa

Parameter (g/L)	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Vzorec 5
Skupni ekstrakt	34,55± 0,07 ^D	39,80± 0,00 ^B	46,30± 0,00 ^A	34,20± 0,00 ^E	36,15± 0,01 ^C
Skupne kisline izražene kot očetna	66,48± 0,00 ^D	73,29± 0,00 ^C	80,01± 0,00 ^A	62,11± 0,07 ^E	77,48± 0,00 ^B
Hlapne kisline	53,18± 0,03 ^D	58,63± 0,01 ^C	64,01± 0,01 ^A	49,69± 0,06 ^E	61,98± 0,02 ^B
Jabolčna k.	12,00± 0,00 ^D	14,20± 0,00 ^B	14,70± 0,00 ^A	11,90± 0,00 ^E	13,50± 0,00 ^C

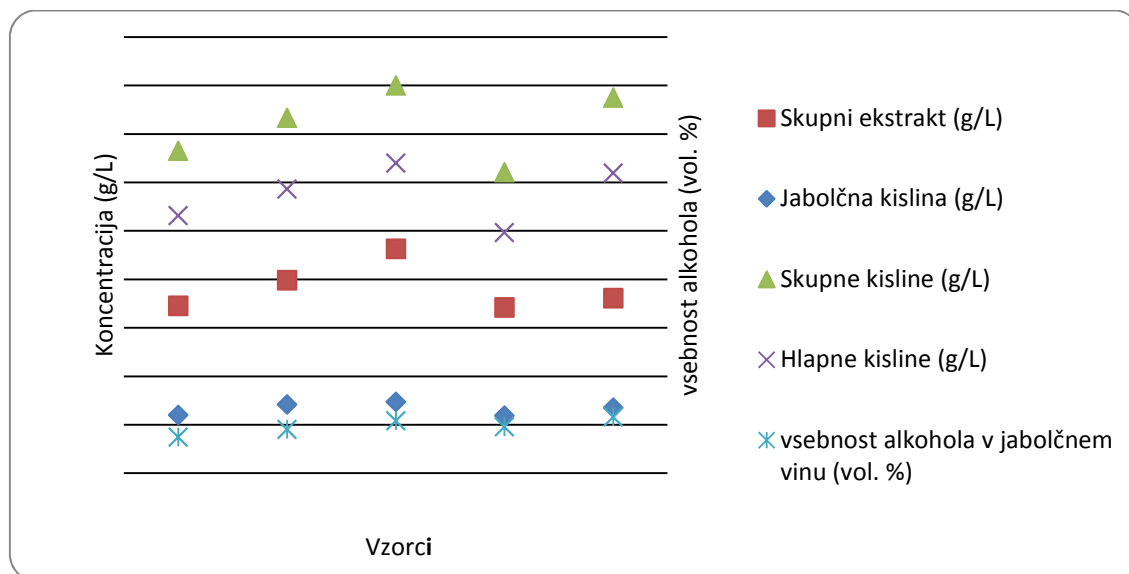
Srednje vrednosti z različnimi velikimi črkami (A, B, C, D, E) v vrsticah so statistično značilne ($P < 0,05$; razlike med uporabljenimi vsebnostmi suhe snovi).

Pri skupnem ekstraktu so bile razlike med vzorci statistično značilne. Pri tem so bile najvišje vrednosti pri vzorcu kisa iz jabolčnega koncentrata z najvišjo stopnjo suhe snovi (46,30 g/L), najnižje pa pri kisu iz saharoze s 16,5 % suhe snovi, kjer smo dobili vrednosti 34,20 g/L. Vrednosti skupnega ekstrakta so po pričakovanju naraščale z večjim deležem suhe snovi. Pri vzorcih kisa iz saharoze smo dobili nižje vrednost v primerjavi s kisom iz jabolčnega koncentrata pri enaki vsebnosti suhe snovi. To je posledica predvsem prisotnih snovi v jabolčnem koncentratu, kot so fenoli, minerali itd. Čista saharoza ne vsebuje primesi, zato je skupni ekstrakt nižji.

Najvišjo vsebnost skupnih kislin je imel kis iz jabolčnega koncentrata (19,5 % SS), kateremu je sledil kis iz saharoze (19,5 % SS), najmanj pa kis z dodatkom saharoze s 16,5 % SS. Razlike med vsemi vzorci so statistično značilne. Hlapne kisline so bile prav tako najbolj izražene pri vzorcu kisa iz jabolčnega koncentrata (19,5 % SS) in sicer je bila izmerjena vrednost 64,01 g/L, najmanj hlapnih kislin pa je vseboval vzorec kisa iz saharoze z začetno vrednostjo suhe snovi 16,5 %. Nižje vrednosti hlapnih kislin izražene kot očetna kislina so dobili Aguiar in sod. (2005), saj so jih izmerili 41 in 42,4 g/L.

Po pravilniku o kakovosti kisa in razredčene očetne kisline (2004), mora biti vsebnost skupnih kislin, ki jih računamo kot očetna kislina, vsaj 50 g/L. Vsi naši vzorci so temu pogoju zadostili, saj je bila najnižja izmerjena vrednost 61,11 g/L pri vzorcu kisa z dodatkom saharoze s 16,5 % stopnjo suhe snovi. Po pričakovanju so vrednosti skupnih in hlapnih kislin naraščale z višjo vsebnostjo suhe snovi, bolj pa so bile izražene pri kisu iz jabolčnega koncentrata. Aguiar in sod. (2005) so pri analizi vzorcev jabolčnega kisa izmerili vrednosti 42,3 in 42,7 g/L, kar so nižje vrednosti od naših, vendar vseeno izpolnjujejo zahteve Brazilske zakonodaje, ki določa najnižjo mejo 40 g/L. Najvišja izmerjena vrednost jabolčne kisline je bila pri vzorcu kisa iz jabolčnega koncentrata z najvišjim deležem suhe snovi in sicer 14,70 g/L, najnižja izmerjena vrednost pa je bila 11,90 g/L pri vzorcu kisa s saharozo z 16,5 % deležem suhe snovi. Tudi v tem primeru so rezultati pokazali kot statistično značilni. Vsebnost jabolčne kisline je naraščala z višjo stopnjo suhe snovi, višja pa je bila pri vzorcih kisa iz jabolčnega koncentrata, kar je bilo

tudi pričakovano. Aguiar in sod. (2005) so izmerili vrednost jabolčne kisline 0,129 g/L pri drugem vzorcu jabolčnega kisa pa ni bila zaznana.



Slika 9: Vrednosti skupnih kislin, hlapnih kislin, jabolčne kisline, skupnega ekstrakta v jabolčnem kisu ter vsebnost alkohola v jabolčnem vinu.

Preglednica 11: Vsebnost alkohola, glicerola in metanola v vzorcih kisa

Parameter	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Vzorec 5
Alkohol (vol.%)	1,88± 0,00 ^B	1,93± 0,00 ^B	1,92± 0,00 ^B	1,81± 0,00 ^C	2,09± 0,00 ^A
Glicerol (g/L)	17,36± 0,04 ^D	18,83± 0,01 ^C	22,03± 0,05 ^A	15,60± 0,01 ^E	21,65± 0,01 ^B
Metanol (g/L)	0,46± 0,01 ^C	0,57± 0,01 ^A	0,55± 0,01 ^B	0,45± 0,01 ^C	0,57± 0,00 ^A

Srednje vrednosti z različnimi velikimi črkami (A, B, C, D, E) v vrsticah so statistično značilne ($P < 0,05$; razlike med uporabljenimi vsebnostmi suhe snovi).

Volumski delež alkohola je bil najvišji (2,09 vol.%) pri vzorcu kisa iz saharoze (19,5 % SS), najnižji pa pri vzorcu kisa iz saharoze (16,5 % SS), in sicer 1,81 vol.%. Pri vzorcih kisa iz jabolčnega koncentrata so bile razlike zelo majhne, saj bila največja razlika le 0,05 vol.%. V vzorcu 5 je razlika statistično značilno največja, v vzorcu 4 pa najmanjša. Po pravilniku o kakovosti kisa iz leta 2004 bi moral biti ostanek vsebnosti alkohola največ 0,5 vol.%, drugače je v primeru vinskega kisa, ki lahko vsebuje do 1,5 vol.%, medtem ko za specialni kis, ki je izdelan na osnovi vinskega kisa velja, da lahko vsebuje do 3 vol.%. Vsi naši vzorci so presegli zgornjo omejitev (0,5 vol.%), saj se je ostanek alkohola gibal med 1,8- 2,1 vol.%, Milek (2000) je v svoji diplomski nalogi analiziral stranske produkte pri očetnokislinski fermentaciji, pri čemer je ugotovil, da se je koncentracija etanola v startni brozgi za proizvodnjo kisa znižala z 2,4 % na 0,1 % po končani očetnokislinski

fermentaciji. Podobno nizke vrednosti alkohola navaja tudi Plessi (2003), ki navaja vrednosti alkohola pri jabolčnem kisu med 0- 0,81 vol.%, medtem ko Joshi in Sharma (2009) navajata vsebnosti alkohola do največ 2,0 g/L ali 0,25 vol.%. Vrednosti naših meritev so v rang 2 vol.%, kar je več od zgoraj citiranih avtorjev, zelo primerljive rezultate z našimi je dobil tudi Aguiar in sod. (2005), saj so izmerili vrednosti etanola 1,42 in 1,82 vol.%.

Kis se lahko pridobiva tudi iz različnih odpadnih surovin. Roda in sod. (2015) so namesto dodatka saharoze uporabili različne postopke za sproščanje sladkorjev iz ananasovih tropin. Obdelava tropin z visokim tlakom in mikrovalovi je sprostila največ sladkorjev.

Vsebnost glicerola, ki nastane med prvo fermentacijo, se je povečevala z večjo vsebnostjo suhe snovi. Prav tako je bilo s glicerolom, ki je nastal med očetnokislinsko fermentacijo. Vrednosti glicerola so se v vseh vzorcih med očetnokislinsko fermentacijo zvišale za približno 5-krat v primerjavi z vrednostmi po alkoholni fermentaciji. Tudi Neish in sod. (1945) navajajo nastajanje glicerola v povezavi z organizmom *Lactobacillus lycopersici* in *Bacillus subtilis*, ki jih lahko najdemo tudi v kisu. Naše končne vrednosti vsebnosti glicerola so prikazane v preglednici 12. Najvišja vsebnost glicerola je bila pri vzorcu kisa iz jabolčnega koncentrata z 19,5 % SS, ki je vseboval 22,03 g/L glicerola, najnižji delež (15,60 g/L), pa je bil izmerjen pri vzorcu kisa iz saharoze s 16,5 % deležem suhe snovi. Delež glicerola je bil višji pri kisih iz jabolčnega koncentrata, v primerjavi s kisi z dodatkom saharoze. Razlike med vzorci so bile statistično značilne. Joshi in Sharma (2009) navajata vsebnost glicerola v območju 2,3- 4,6 g/L, naše vrednosti so znatno višje. Aguiar in sod. (2005) so tudi dobili nižje vrednosti glicerola v jabolčnem kisu, izmerili so vrednosti 1,03 ter 2,04 g/L. Vsebnost glicerola v vinu je odvisna od vrste kvasovk in pogojev fermentacije, predvsem temperature in pH (Wang in sod., 2001).

Podobne rezultate našim, je z minimalnim odstopanjem dobila tudi Somrak (2014), ki je merila vsebnost glicerola pri vzorcih jabolčnega vina, pri enakih koncentracijah suhe snovi (13,5 %, 16,5 % in 19,5 %). Medtem ko so Egan in sod. (1988) pri analizi jabolčnega kisa prišli do vrednosti 2,8 g/L glicerola v vzorcu, kar je bistveno nižja vrednost od naših rezultatov, kjer so se vrednosti gibale med 16 g/L in 22 g/L.

Metanol prehaja v jabolčno vino iz pektina, ki ga najdemo v sadju, v našem primeru so to jabolka. Zaradi opisanega dejstva smo pričakovali najvišje vrednosti v vzorcih kisa iz jabolčnega koncentrata. Glede na naša pričakovanja je prišlo do majhnega odstopanja pri rezultatu vzorca 19,5 % SS iz jabolčnega koncentrata, ki bi moral imeti načeloma najvišjo vrednost, v našem primeru pa se je izkazalo, da je ta nižja, od najvišje izmerjene, kar je lahko posledica merske napake inštrumenta. Najvišji vrednosti (0,57 g/L) sta bili tako izmerjeni pri vzorcih kisa iz jabolčnega koncentrata (16,5 % SS) in saharoze (19,5 % SS), najnižja vrednost (0,45 g/L) pa pri vzorcu kisa iz saharoze (16 % SS). Razlike niso bile statistično značilne. Koncentracija metanola je odvisna od zrelosti in sorte jabolk ter od maceracije, kar sta ugotovila Vidrih in Hribar (1999).

Preglednica 12: Vrednost relativne gostote pri 20 °C in pH v vzorcih kisa

Parameter	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Vzorec 5
Relativna gostota pri 20 °C	1,0150± 0,00 ^D	1,0176± 0,00 ^B	1,0202± 0,00 ^A	1,0147± 0,00 ^E	1,0163± 0,00 ^C
pH	2,57± 0,01 ^A	2,34± 0,00 ^E	2,55± 0,00 ^B	2,53± 0,01 ^C	2,43± 0,00 ^D

Srednje vrednosti z različnimi velikimi črkami (A, B, C, D, E) v vrsticah so statistično značilne ($P < 0,05$; razlike med uporabljenimi vsebnostmi suhe snovi).

Relativna gostota pri 20 °C se je gibala od najnižje 1,0147 pri vzorcu kisa iz saharoze s 16,5% suhe snovi, do 1,0202, ki je bila izmerjena pri vzorcu kisa iz jabolčnega koncentrata z najvišjo stopnjo suhe snovi 19,5%. Rezultati meritev so pričakovani in v predvidenih standardnih vrednostih (1,013- 1,024) za jabolčni kis (Joshi in Sharma, 2009).

Najnižja vrednosti pH je bila izmerjena pri vzorcu kisa iz jabolčnega koncentrata s 16,5 % suhe snovi, medtem ko je imel vzorec kisa iz jabolčnega koncentrata s 13,5 % suhe snovi najvišjo vrednost pH. Pričakovali smo, da bo najnižja pH vrednost pri vzorcih z višjo stopnjo suhe snovi, vendar rezultati tega niso potrdili. Glede na rezultate sklepamo, da je odstopanje pri vzorcu kisa iz jabolčnega koncentrata 16,5 % SS in 19,5 % SS lahko posledica zamenjave vzorcev ali napake meritve. Aguiar in sod. (2005) so dobili pri analizi vzorcev jabolčnega kisa vrednosti 3,19 in 3,28. Na višje pH vrednosti vpliva prisotnost vitaminov, aminokislin, organskih kislin in proteinov v kisih.

Preglednica 13: Rezultati senzorične analize jabolčnih vin

Vzorec	Bistrost (0-2)	Barva (0-2)	Vonj (0-4)	Okus (0-6)	Harmonija (0-6)	Skupaj (0-20)
Vzorec 1	1,55± 0,10 ^A	1,58± 0,39 ^A	3,23± 0,10 ^C	4,65± 0,47 ^A	4,75± 0,29 ^A	15,63± 0,63 ^C
Vzorec 2	1,7± 0,14 ^A	1,65± 0,44 ^A	3,33± 0,13 ^{BC}	4,73± 0,50 ^A	4,88± 0,48 ^A	16,50± 0,58 ^B
Vzorec 3	1,68± 0,24 ^A	1,68± 0,46 ^A	3,45± 0,21 ^{BA}	5,08± 0,29 ^A	5,18± 0,32 ^A	17,03± 0,43 ^{BA}
Vzorec 4	/	/	/	/	/	/
Vzorec 5	1,8± 0,08 ^A	1,88± 0,19 ^A	3,63± 0,10 ^A	5,20± 0,36 ^A	5,25± 0,21 ^A	17,75± 0,38 ^A

Srednje vrednosti z različnimi velikimi črkami (A, B, C, D, E) v stolpcih so statistično značilne ($P < 0,05$; razlike med uporabljenimi vsebnostmi suhe snovi).

Senzorična analiza jabolčnih vin je po pričakovanju potrdila našo hipotezo, saj so vzorci z večjim deležem suhe snovi prejeli višje ocene. Podobne rezultate pri senzorični analizi jabolčnih vin je dobila tudi Somrak (2014). Tudi v njenem primeru so vzorci z večjim deležem suhe snovi prejeli višje ocene. Nepričakovano je v našem primeru najvišjo skupno povprečno oceno (17,75) prejel vzorec jabolčnega vina iz saharoze s 19,5 % SS, saj smo pričakovali, da se bo pri vzorcih iz jabolčnega koncentrata sprostilo več sekundarnih

metabolitov, ki dajejo specifičen okus. Omenjeni vzorec je prejel najvišjo oceno med vzorci v vseh ocenjevanih parametrih, medtem ko je vzorec iz jabolčnega koncentrata z najnižjim deležem suhe snovi, prejel najnižje ocene in skupno povprečno oceno 15,63. Vzorec jabolčnega vina z dodatkom saharoze 16,5 % SS je bil pomotoma odstranjen pred senzorično analizo, zato je bil senzorično ocenjen le vzorec kisa tega vzorca.

Preglednica 14: Rezultati senzorične analize vzorcev kisa

VZOREC	Okus (0- 8)	Vonj (0- 4)	Barva (0- 4)	Bistrost (0- 4)	Skupaj (0- 20)
Vzorec 1	7,15± 0,13 ^B	3,13± 0,15 ^{BA}	3,75± 0,25 ^A	4,00± 0,00 ^A	18,03±0,45 ^B
Vzorec 2	6,95± 0,37 ^B	2,88± 0,15 ^B	3,96± 0,10 ^A	4,00± 0,00 ^A	17,83±0,32 ^B
Vzorec 3	7,55± 0,6 ^A	3,28± 0,26 ^A	3,90± 0,08 ^A	3,98± 0,05 ^A	18,65±0,31 ^A
Vzorec 4	7,10± 0,14 ^B	3,13± 0,19 ^{BA}	3,75± 0,25 ^A	3,95± 0,10 ^A	17,93±0,33 ^B
Vzorec 5	7,20± 0,08 ^B	3,00± 0,81 ^{BA}	3,88± 0,19 ^A	4,00± 0,00 ^A	18,08± 0,29 ^B

Srednje vrednosti z različnimi velikimi črkami (A, B, C, D, E) v stolpcih so statistično značilne ($P < 0,05$; razlike med uporabljenimi vsebnostmi suhe snovi).

V preglednici 15 so zbrani podatki senzorične analize vzorcev kisa. Vsem petim vzorcem smo ocenjevali štiri lastnosti (okus, vonj, barva, bistrost ter skupna ocena). Senzorični preskuševalci so najboljši okus zaznali pri vzorcu kisa iz jabolčnega koncentrata z največjim deležem suhe snovi. Vzorec je dobil 7,55 točk od 8 možnih. Najslabšo oceno je prejel vzorec iz jabolčnega koncentrata s 16,5 % stopnjo suhe snovi. Pri oceni okusa se samo vzorec kisa proizveden iz jabolčnega koncentrata z 19,5 % značilno razlikuje od vseh ostalih vzorcev kisa. Tudi pri vonju sta najvišjo in najnižjo povprečno oceno prejela vzorca kisa iz jabolčnega koncentrata 19,5 % SS (3,28) in 16,5 % SS, ki je prejel 2,88 točke od 4 možnih točk. Za barvo je največ točk (3,96) prejel vzorec iz jabolčnega koncentrata, ki je vseboval 16,5 % SS, najnižjo oceno za barvo pa sta prejela vzorca kisa iz jabolčnega koncentrata s 13,5 % SS in vzorec s 16,5, % SS, ki mu je bila dodana saharoza. Vse možne točke (4 točke) za bistrost so prejeli trije vzorci in sicer vzorca kisa iz jabolčnega koncentrata s 13,5 in 16,5 % deležem suhe snovi ter vzorec kisa s 19,5 % SS iz saharoze. Visoko oceno sta dobila tudi ostala vzorca, med katerima je imel najnižjo (3,95) vzorec s 16,5 % stopnjo suhe snovi iz saharoze.

Pri skupni oceni je po pričakovanju prejel največ točk vzorec kisa iz jabolčnega koncentrata z največjim deležem suhe snovi (19,5 %) in sicer 18,65 od možnih 20 točk. Omenjeni vzorec je glede na prejete točke za skupno oceno odstopal navzgor, medtem ko razlike med ocenami pri ostalih vzorcih niso bile statistično značilne. Drugo najvišjo oceno (18,08) je prejel vzorec kisa iz saharoze s 19,5 % SS. Najmanj točk 17,83 pa prejel vzorec kisa iz jabolčnega koncentrata s 16,5 % deležem suhe snovi. Kljub temu lahko ocenimo, da je višja vsebnost suhe snovi pozitivno vplivala na senzorično oceno, hkrati pa je moč zaslediti boljšo oceno tudi pri vzorcih kisa iz jabolčnega koncentrata, kot pri vzorcih, ki jim je bila dodana saharoza. Podobne rezultate je pri senzorični analizi jabolčnih vin dobila tudi Somrak (2014). Sprejemljivost kisa s strani potrošnikov je po raziskavi Galletto in

Rossetto (2015) odvisna predvsem od zorenja kisa in ali je kis proizveden po načelih organske proizvodnje. Zorenje kisa povezujemo z izboljševanjem senzoričnih lastnosti, način organske proizvodnje pa dojemajo potrošniki kot bolj zdrav.

Med rezultati senzorične analize jabolčnega kisa in vina lahko potegnemo nekatere vzporednice. Vzorci jabolčnega kisa in vina z najvišjim deležem suhe snovi (19,5 %) so prejeli najvišjo skupno oceno. Pri vinu je najvišjo oceno dobil vzorec saharoze s 19,5 % SS, medtem ko je pri kisu najvišjo oceno med vzorci prejel kis iz jabolčnega koncentrata s 19,5% SS. Tako pri vinu kot pri kisu se z zviševanjem deleža suhe snovi kažejo boljše senzorične ocene.

V raziskavi smo analizirali jabolčno vino in jabolčni kis, del vzorcev je bil iz jabolčnega koncentrata, drugim pa je bila dodana saharoza. Ker je take kise težje ločiti s kemijskimi in/ali senzoričnimi testi so Torrecilla in sod., (2015) za identifikacijo uporabili linearni in nelinearni model spektrometrije v UV območju za različne mešanice kisov. Uporaba nelinearnega modela je omogočila hitro razločevanje mešanic kisov.

Senzorična kakovost je odvisna od kemijske sestave kisa, katero pogojujejo vrsta surovine in parametri obeh fermentacij (alkoholne in očetnokislinske).



Slika 10: Vzorci jabolčnega kisa in jabolčnega vina pred senzorično analizo

Na sliki so prikazani vzorci jabolčnega vina in kisa pred senzorično analizo. S slike lahko razberemo, da so vzorci jabolčnega vina temnejše barve. Vzorca kisa so po zaključeni očetnokislinski fermentaciji izgubili intenzivno barvo in dobili svetlejšo, bolj rumenkasto

barvo. Razlike so se pokazale tudi med vzorci iz jabolčnega koncentrata in vzorci, ki jim je bila dodana saharoza, ti so bili namreč svetlejšje rumenkaste barve.



Slika 11: Vzorci kisov iz jabolčnega koncentrata z različnimi deleži suhe snovi (od leve proti desni, vzorec 1, vzorec 2 in vzorec 3)

Na sliki 11 lahko vidimo, da se z večjim deležem suhe snovi povečuje intenziteta barve kisa iz rumenkaste proti rumenkasto rjavi. Vzorec kisa z najnižjim delež suhe snovi je bil tako rumenkaste barve, vzorec z največjim delež suhe snovi pa je bil rumenkasto rjave barve. Opazna je tudi večja motnost pri kisu z najnižjo stopnjo suhe snovi. Kljub naštetim razlikam, moramo upoštevati, da na prikaz slike lahko vplivajo drugi dejavniki kot so osvetlitev, postavitev vzorcev, kakovost fotoaparata itd. Iz naštetih razlogov nam da verodostojno oceno šele senzorična analiza.

5 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov, ki smo jih dobili pri proizvodnji jabolčnega kisa z različnimi stopnjami suhe snovi iz jabolčnega koncentrata in saharoze lahko sklepamo sledeče:

- vsebnost alkohola v jabolčnih vinih je naraščala z večjim deležem suhe snovi. Vzorci jabolčnih vin, ki jim je bila dodana saharoza, so pri enakem deležu suhe snovi vsebovali več alkohola od vzorcev iz jabolčnega koncentrata,
- največ skupnih in hlapnih kislin je bilo prisotnih v vzorcih z največjim deležem suhe snovi, hkrati pa je bilo glede na isti delež suhe snovi več kislin prisotnih v vzorcih kisa, ki smo jim dodali jabolčni koncentrat,
- skupni ekstrakt je višji v jabolčnih kisih v primerjavi s kisi z dodano saharozo in narašča z vsebnostjo suhe snovi,
- vsebnost jabolčne kisline je naraščala z večjim deležem suhe snovi, po pričakovanju pa je bilo več pri vzorcih kisa iz jabolčnega koncentrata,
- kisi z večjim deležem suhe snovi so bili pri senzorični analizi bolj ocenjeni,
- delež suhe snovi je vplival na zniževanje pH vzorcev kisa. Vzorci z večjim deležem suhe snovi so imeli nižji pH. Zaznali pa smo tudi nižji pH pri vzorcih kisa, ki smo jim dodali saharozo,
- večji delež suhe snovi je v pozitivni korelaciji z vsebnostjo glicerola, ki ga je bilo več v vzorcih kisa iz jabolčnega koncentrata,
- vsebnost metanola je bila višja pri vzorcih z večjim deležem suhe snovi,
- višja vsebnost suhe snovi je vplivala na večji delež prisotne sorbične kisline, ki je bila v večji meri prisotna pri vzorcih kisa, ki smo jim dodali jabolčni koncentrat (rezultati prikazani v prilogi),
- relativna gostota pri 20 °C se je z večjim deležem suhe snovi zviševala, večja pa je bila pri vzorcih kisa iz jabolčnega koncentrata.

6 POVZETEK

Kis je ena najbolj uporabljenih začimb v kuhinji, uporablja se tudi za konzerviranje živil, mnogi pa ga še danes uporabljajo za lajšanje različnih zdravstvenih težav. Pri nas so najbolj uporabljeni jabolčni, vinski in alkoholni kis. Kis je produkt dvostopenjske fermentacije, v prvi fazi med alkoholno fermentacijo kvasovke pretvorijo sladkor v alkohol, v drugi fazi pa v aerobnih razmerah očetnokislinske bakterije pretvorijo alkohol v očetno kislino. Med samim postopkom se tvorijo nove spojine, ki oblikujejo značilno končno aromo in okus kisa. Na lastnosti kisa pa vpliva predvsem kakovost izbranih surovin ter sam postopek proizvodnje. Potrošniki kakovost kisa ocenjujejo s senzorično oceno, kakovost pa lahko analiziramo tudi s kemijskimi metodami. Preden gredo kisi v prodajo, morajo ustrezati določenim kriterijem in pravilnikom, ki so zapisani.

S pripravo vzorcev z različnimi deleži suhe snovi iz jabolčnega koncentrata in saharoze, smo želeli ugotoviti najbolj optimalen delež suhe snovi za proizvodnjo kisa. Osnovno surovino jabolčnega koncentrata smo pripravili v treh koncentracijah in sicer v 13,5 %, 16,5 % in 19,5 % SS. V drugem primeru pa smo jabolčni koncentrat s 13,5 % SS dosladkali s saharozo do 16,5 % ter 19,5 % SS. Po dodatku kvasovk Fermol associées in hranila Enovit je sledila alkoholna fermentacija do jabolčnega vina ter nato še očetnokislinska fermentacija do jabolčnega kisa. Vzorce smo analizirali s WineScanom ter jih nato še senzorično ocenili. Rezultati so potrdili našo hipotezo, saj smo pričakovali, da bo večji delež suhe snovi vplival na večji delež alkohola v jabolčnih vinih, ki se nato med očetnokislinsko fermentacijo pretvori v kislino.

Druga primerjava, ki je vključevala medsebojno primerjanje vzorcev iz jabolčnega koncentrata in saharoze je pokazala, da se je pri vzorcih, ki smo jih dosladkali z jabolčnim koncentratom, tvorilo več skupnih in hlapnih kislin, kot pri vzorcih iz saharoze, kar je bilo v skladu s pričakovanji. Vzorci jabolčnega vina in kisa z dodano saharozo (izjema je bil vzorec kisa SAH. 16,5 %) pa so vsebovali več alkohola od vzorcev iz jabolčnega koncentrata pri enakem deležu suhe snovi.

Višjo skupno oceno pri senzorični analizi so prejeli vzorci kisa iz jabolčnega koncentrata ter hkrati vzorci z večjim deležem suhe snovi, odstopal je le vzorec iz jabolčnega koncentrata (16,5 % SS), ki je prejel najnižjo oceno. Na take rezultate je verjetno vplivala tvorba sekundarnih metabolitov, ki so se tvorili med alkoholno in očetnokislinsko fermentacijo. Senzorične ocene kažejo tudi na pozitivno povezavo z rezultati, ki smo jih dobili s kemijsko analizo in se kaže v vplivu večje vsebnosti skupnih kislin izražene kot očetne, skupnega ekstrakta, jabolčne kisline, glicerola in metanola na višjo končno oceno vzorcev. Splošna ugotovitev je torej, da je za boljšo kakovost jabolčnega kisa, bolj priporočljiva uporaba jabolčnega koncentrata in ne saharoze ter hkrati uporaba jabolčnega koncentrata oz. saharoze z večjim deležem suhe snovi.

7 VIRI

- Adams M.R., Flynn G.R. 1982. Fermentation ethanol: an industrial profile. London, Tropical Products Institute: 25 str.
- Adams M.R. 1985. Vinegar. V: Microbiology of fermented foods. Wood, B.J.B. (ed.). London, Elsevier Applied Science Publishers: 1-47
- Adams M.R. 1999. Vinegar. V: Encyclopedia of food microbiology. 1st ed. Robinson R., Batt C. (ed.). London, Academic Press: 2258-2263
- AEB. 2016a. Enovit Power. Brescia, AEB Group: 1 str.
http://www.aeb-group.com/media/catalogs/it/sidro/prodotti/bioregolatori%20e%20nutrienti/enovit%20power/enovit_power_tds_it_0220316_cider_italy.pdf (julij, 2016)
- AEB. 2016b. *Fermol Associatees*. Brescia, AEB Group: 1 str.
http://www.aeb-group.com/media/catalogs/it/enologia/prodotti/lieviti/polivalenti/fermol%20associees/fermol_associees_tds_it_0211215_oeno_italy.pdf (julij, 2016)
- Aguilar A., Nascimento R.A.A., Ferretti L.P., Gonçalves A.R. 2005. Determination of organic acids and ethanol in commercial vinegars. Brazilian Journal of Food Technology, 5: 51-56
- Angerer T. 1997. Vse o kislu: priprava, uporaba in zdravilna moč domačega jabolčnega kisa. Ljubljana, Ara: 105 str.
- Barbosa-Cánovas G.V., Fernández-Molina J.J., Alzamora S.M., Tapia M.S., López-Malo A., Chanes J.W. 2003. General considerations for preservation of fruits and vegetables. V: Handling and preservation of fruits and vegetables by combined methods for rural areas. Roma, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 39-52
- Bertolini L., Castagnetti G.B., Gambini G. 1994. Gli acidi organici dell'aceto: determinazione per HPLC. Industrie delle Bevande, 23: 324-326
- Binsted R., Devey J.D., Dakin J.C. 1962. Pickle and sauce making, 2nd ed. London, Food trade press: 274 str.
- Blanch G.P., Tabera J., Sanz J., Herraiz M.m Reglero G. 1992. Volatile composition of vinegars. Simultaneous distillation-extraction and gas chromatographic- mass spectrometric analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 6: 1046-1049

- Callejón R. M., Torija M.J., Mas A., Morales M.L., Troncoso A.M. 2010. Changes of volatile compounds in wine vinegars during their elaboration in barrels made from different woods. *Food Chemistry*, 120, 2: 561–571
- Chang R.C., Lee H.C., Ou A.S.M. 2005. Investigation of the physicochemical properties of concentrated fruit vinegar. *Journal of Food and Drug Analysis*, 13, 4: 348-356
- Codex standard for vinegar. 1992. Regional European standard. Codex standard 162-1987. V: *Codex alimentarius*. Vol. 11. Sugars, cocoa products and chocolate and miscellaneous products. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations Health Organization: 115-119
- Comes J.E. Beelman R.B. 2002. Addition of fumaric acid and sodium benzoate as an alternative method to achieve a 5-log reduction of *Escherichia coli* O157:H7 populations in apple cider. *Journal of Food Protection*, 65, 3: 476-483
- Conner H.A., Allgeier R.J. 1976. Vinegar: its history and development. V: *Advances in microbiology*. 1st ed. Perlman D. (ed.). Amsterdam, Academic Press: 81-133
- Corran H.S. 1975. A history of brewing. Newton Abbot, David and Charles: 303 str.
- Cortese D. 2001. Naravni kis: vrste, priprava, uporaba. Ljubljana, Kmečki glas: 23 str.
- Couto S.R., Sanroman M.A. 2006. Application of solid-state fermentation to food industry. *Journal of Food Engineering*, 76, 3: 291-302
- Crawford I.M. 1997. New product development. V: *Agricultural and food marketing management*: 2nd ed. Crawford I.M. (ed.). Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: 69-81
- De Ley J. 1959. On the formation of acetoin by *Acetobacter*. *Journal of General Microbiology*, 21: 352–365
- De la R.P., Cordoba G., Martin A., Jordano R., Medina L.M. 2005. Influence of a test preservative on sponge cakes under different storage conditions. *Journal of Food Protection*, 68, 11: 2465-2469
- Derry T.K., Williams T.I. 1960. A short history of technology. London, Oxford University Press: 262 str.
- Desmond K.O., Lee Y.K. 2006. Fermented foods. V: *Microbial biotechnology: principles and Applications*. Lee Y.K. (ed.). 2nd ed. Singapore, World Scientific Publishing Company: 227-239
- Ebner H., Follmann H. 1983. Acetic acid. V: *Biotechnology*. Rehm H.J., Reed G. (ed.). Weinheim, Wiley-VCH: 387–407

- Egan H., Kirk R.S., Sawyer R., Pearson D. 1988. Pearson's Chemical analysis of foods. 8th ed. Harlow, Longman Scientific and Technical: 591 str.
- Fowlds R.W.R., Rycroft R.W. 1998. Production of a Food acid mixture containing fumaric acid. United States Patent WO 98 53705 A1: 21 str.
- Frost A. 2016. Sulphite analysis with WineScan™ SO₂. Hillerød, FOSS. <http://www.foss.dk/industry-solution/products/winescan-so2> (julij, 2016)
- Gacula M.C. 1997. Descriptive sensory analysis methods. V: Descriptive sensory analysis in practice. Gacula M.C. (ed.). Connecticut, Food and Nutrition Press: 5-14
- Galletto L., Rossetto L., 2015. A hedonic analysis of retail Italian vinegars. Wine Economics and Policy, 4, 1: 60-68
- García-Parrilla M.C., Heredia F.J., Troncoso A.M. 1999. Sherry wine vinegars: phenolic composition changes during aging. Food Research International, 32, 6: 433–440
- Giudici P., Gullo M., Solieri L. 2009. Traditional balsamic vinegar. V: Vinegars of the World. Solieri L., Giudici P. (eds.). Milan, Springer- Verlag Italia: 157-175
- Golob T., Jamnik M., Bertoneclj J., Doberšek U. 2005. Senzorična analiza: metode in preskuševalci. Acta agriculturae Slovenica, 85, 1: 55-66
- Gomis D.B. 1992. HPLC analysis of organic acids. V: Food analysis by HPLC. Nollet L.M.L. (ed.). New York, Marcel Dekker: 371-385
- González-Fandos E., Dominguez J.L. 2007. Effect of potassium sorbate washing on the growth of *Listeria monocytogenes* on fresh poultry. Food Control, 18, 7: 842–846
- Hinton A. Jr. 2006. Growth of *Campylobacter* in media supplemented with organic acids. Journal of Food Protection, 69, 1: 34-38
- Joshi V.K., Sharma S. 2009. Cider vinegar: microbiology, technology and quality. V: Vinegar of the world. Solieri L., Giudici P. (eds.). Milan, Springer-Verlag: 197-207
- Joshi V.K., Thakur N.S. 2000. Vinegar: composition and production. V: Post harvest technology of fruits and vegetables. Verma L.R., Joshi V.K. (ed.). New Delhi, Indus Publishing: 1128–1170
- Košmerl T., Kač M. 2009. Osnove kemijske in senzorične analize mošta in vina: laboratorijske vaje pri predmetu Tehnologije predelave rastlinskih živil-vino. Ljubljana: 74 str.
- Lawless H.T., Heymann H. 1999. Descriptive analysis. V: Sensory evaluation of food: principles and practices. Lawless H.T., Heymann H. (eds.). New York, Springer: 341-378

- Lawless H.T., Heymann H. 2010. Descriptive analysis. V: Sensory evaluation of food: principles and practices. 2nd ed. Lawless H.T., Heymann H. (eds.). New York, Springer: 227-257
- Lea A.G.H. 1989. Cider vinegar. V: Processes apple products. Downing D.L. (ed.). New York, Springer: 279-301
- Mas A., Torija M.J., García-Parrilla M.C., Troncoso A.M. 2014. Acetic acid bacteria and the production and quality of wine vinegar. *Scientific World Journal*, 2: 1-6
- Mavsar M. 2016. Priprava jabolčnega soka. Novo mesto, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko Gozdarski zavod Novo mesto: 3 str. <http://www.vborovnici.si/2015/kb.php?a=203&hilit=&sid=af07672cad7770d249ddc8893929e514> (julij, 2016)
- Milek I. 2000. Stranski produkti očetnokislinskega vrenja. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 40 str.
- Morales L.M., González G.A., Casas J.A., Troncoso A.M. 2001. Multivariate analysis of commercial and laboratory produced Sherry wine vinegars: influence of acetification and aging. *European Food Research and Technology*, 212, 6: 676-682
- Moreira J.L., Santos L. 2004. Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis. *Analytica Chimica Acta*, 513: 263-268
- Morrissey W.F., Davenport B., Querol A., Dobson A.D.W. 2004. The role of indigenous yeasts in traditional Irish cider fermentations. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 3: 647-655
- Moskowitz H.R., Porretta S., Silcher M. 2005. Concept research in food product design and development. Ames, Blackwell Publishing: 244 str.
- Mu J., Uehara T., Furuno T. 2003. Effect of bamboo vinegar on regulation of germination and radicle growth of seed plants. *Journal of Wood Science*, 49, 3: 262-270
- Mu J., Yu Z., Wu W., Wu Q. 2006. Preliminary study of application effect of bamboo vinegar on vegetable growth. *Forestry Studies in China*, 8, 3: 43-47
- Nakai S.A., Siebert K.J. 2003. Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 3: 249-255
- Neish A.C., Blackwood A.C., Ledingham G.A. 1945. Dissimilation of glucose by *Bacillus subtilis* (Ford's strain). *Canadian Journal of Research*, 23, 6: 290-296

- Palmer R., Chen J.S., Zidwick M.J. 2006. Organic acid and solvent production: Part I: Acetic, lactic, gluconic, succinic and polyhydroxyalkanoic acids. V: The Prokaryotes. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer: 511-755
- Piggott, J.R. 1988. Sensory analysis of foods. 2nd ed. London, Elsevier Applied Science: 432 str.
- Piper P.E. 1999. Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. Free Radical Biology and Medicine, 27, 11-12: 1219-1227
- Plessi M. 2003. Vinegar. V: Encyclopedia of food science and nutrition. Vol. 9. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Modena, Academic Press: 5996-6003
- Plessi M. 1993. Vinegar. V: Encyclopedia of food science, food technology and nutrition. Vol. 7. 1st ed. Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (eds.). London, Academic Press: 4773-4779
- Plumridge A., Hesse S.J., Watson A.J., Lowe K.C., Stratford M., Archer D.B. 2004. The weak acid preservative sorbic acid inhibits conidial germination and mycelial growth of *Aspergillus niger* through intracellular acidification. Applied Environmental Microbiology, 70, 6: 3506-3511
- Pravilnik o postopku in načinu ocenjevanja mošta, vina in drugih proizvodov iz grozdja in vina. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 32: 3857-3862
- Pravilnik o kakovosti kisa in razredčene očetne kisline. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 2: 257-259
- Puri R., Khamrui K., Khetra Y., Malhotra R., Devraja H.C. 2016. Quantitative descriptive analysis and principal component analysis for sensory characterization of Indian milk product cham-cham. Journal of Food Science and Technology, 52, 2: 1238-1246
- Ramachandran S., Fontanille P., Pandey A., Larroche C. 2006. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. Food Technology and Biotechnology, 44, 2: 185-195
- Ressurreccion A.V.A. 2007. Consumer Sensory Testing for Food Product Development. V: Developing new food products for a changing marketplace. 2nd ed. Brody A.L., Lord J.B. (eds.). Boca Raton, Chemical Rubber Company: 366-405
- Ricke S.C. 2003. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. Poultry Science, 82, 4: 632-639

- Rintze M.Z., Erik de H., Wouter A. van W., Pieter de W., Cor D., Aaron A. W., Jan-Maarten A. G., Johannes P. van D., Jack T.P. Antonius J.A. van M. 2008. Malic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*: engineering of pyruvate carboxylation, oxaloacetate reduction and malate export. *Applied Environmental Microbiology*, 74, 9: 2766–2777
- Roda A., De Faveri D.M., Giacosa S., Dordoni R., Lambri M. 2015. Effect of pretreatments on the saccharification of pineapple waste as a potential source for vinegar production. *Journal of Cleaner Production*, 112, 5: 1-8
- Rodgers P., Chen J.S., Zidwick M. 2006. Organic acid and solvent production. V: *The Prokaryotes*. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (eds.). New York, Springer New York: 511–755
- SAS Software. 1999. Version 8.01. Cary, SAS Institute Inc.: Software
- Sellmer-Wilberg S. 2009. Wine and Grape Vinegars. V: *Vinegar of the World*. 1st ed. Solieri L., Giudici P. (eds.). Milan, Springer-Verlag Italia: 145-156
- Seo J.H., Lee GD, Jeong Y.L. 2001. Optimization of the vinegar fermentation using concentrated apple Juice. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 30, 3: 460–465
- Sharma R.C. Joshi V.K. 2005. Processing V: Apple: improvement, production and post harvest management. Chadha K.L., Awasthi R.P. (eds.). Delhi, Malhotra Publishing House: 445–498
- Şimşek Ö., Çon A.H., Tulumoğlu Ş. 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. *Food Control*, 17, 4: 263–270
- Smulders F.J., Greer G.G. 1998. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 3: 149-169
- Solieri L., Giudici P. 2008. Yeasts associated to traditional balsamic vinegar: ecological and technological features. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 1: 36–45
- Solieri L., Giudici P. 2009. Vinegars of the world. V: *Vinegars of the World*. 1st ed. Solieri L., Giudici P. (eds.). Milan, Springer- Verlag Italia: 1-15
- Somrak E. 2014. Optimizacija proizvodnje jabolčnega vina. Magistrsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek. za živilstvo: 65 str.
- Soriano A., Pérez-Juan P.M., Vicario C., González J.M., Pérez-Coello M.S. 2007. Determination of anthocyanins in red wine using a newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 104, 3: 1295–1303

- Soyer A. 1978. The Pantropheon or history of food and its preparation in ancient times. *Medical History*, 22, 2: 219
- Stone H., Sidel J.L. 2004. *Sensory evaluation practices*. 3rd ed. San Diego, Academic Press: 373 str.
- Škvarč T. 2007. Določanje glavnih sestavin in parametrov kakovosti v vinih. Diplomsko naloga. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 29-32
- Tesfaye W., Morales L.M., Garcia-Parrilla C.M., Troncoso A.M. 2002. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, 13, 1: 12-21
- Tesfaye W., Morales L.M., Garcia-Parrilla C.M., Troncoso A.M. 2009. Jerez Vinegar. V: *Vinegar of the world*. 1st ed. Solieri L., Giudici P. (eds.). Milan, Springer-Verlag Italia: 179-195
- Thacker E. 1997. *Knjiga o kisu*. Ljubljana, Tomark: 96 str.
- Theron M.M., Lues J.F.R. 2007. Organic acids and meat preservation. *Food Reviews International*, 23, 2: 141-158
- Theron M.M., Lues J.F.R. 2011. *Organic acids and food preservation*. 1st ed. New York, Contemporary Research Center Press: 340 str.
- The Vinegar Institute. 2016. Market trends. Atlanta, The Vinegar Institute: 1 str. <http://www.versatilevinegar.org/markettrends.html#2> (julij, 2016)
- Tian Y., Zhang X. 2016. On connections among OLSEs and BLUEs of whole and partial parameters under a general linear model. *Statistics and Probability Letters*, 112: 105-112
- Tormo M., Izco J.M. 2004. Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *Journal of Chromatography A*, 1033, 2: 305–310
- Torrecilla J.S., Aroca-Santos R., Cancilla J.C., Matute G. 2015. Linear and non-linear modeling to identify vinegars in blends through spectroscopic data. *LWT- Food Science and Technology*, 65: 565–571
- Turhan E.Ü., Canbaş A. 2016. Chemical and sensory properties of vinegar from dimrit grape by submerged and surface method. *Journal of Food*, 41, 1: 1-7
- Ugliko M., Henscke P.A. 2009. Yeast and wine flavour. V: *Wine chemistry and biochemistry*. 1st ed. Moreno-Arribas M.V., Polo M.C. (eds.). New Delhi, Springer-Verlag: 313-392

- Vaillant F., Millan A., Dornier M., Decloux M., Reynes M. 2001. Strategy for economical optimisation of the clarification of pulpy fruit juices using crossflow microfiltration. *Journal of Food Engineering*, 48, 1: 83–90
- Vall M., Sauer M., Branduardi P., Borth N., Porro D., Mattanovich D. 2006. Improvement of lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* by cell sorting for high intracellular pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 8: 5492-5499
- Vidrih R., Hribar J. 1999. Synthesis of higher alcohols during cider processing. *Food Chemistry*, 67, 3: 287-294
- Wang Z.X., Zhuge J., Fang H., Prior B.A. 2001. Glycerol production by microbial fermentation. *Biotechnology Advances*, 19, 3: 201-223
- Wilson C.A. 1976. Food and drink in Britain. 1st ed. London, Penguin Books, Harmondsworth: 425 str.
- Zhang Z.Y., Jin B., Kelly J.M. 2007. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 3: 251-26

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Rajku Vidrihu za vso strokovno pomoč, nasvete, trud in prijaznost pri nastajanju magistrske naloge.

Za nasvete, strokovno pomoč in pregled magistrskega dela gre zahvala prof. dr. Tatjani Košmerl.

Hvala recenzentu doc. dr. Tomažu Požrlu za strokoven pregled magistrskega dela.

Kmetijskemu gozdarskemu zavodu v Novi Gorici bi se zahvalil za opravljene kemijske analize vzorcev vin in kisov.

Hvala prof. dr. Lei Demšar za pomoč pri statični obdelavi podatkov.

Zdenki Zupančič se zahvaljujem za pomoč pri laboratorijskem delu.

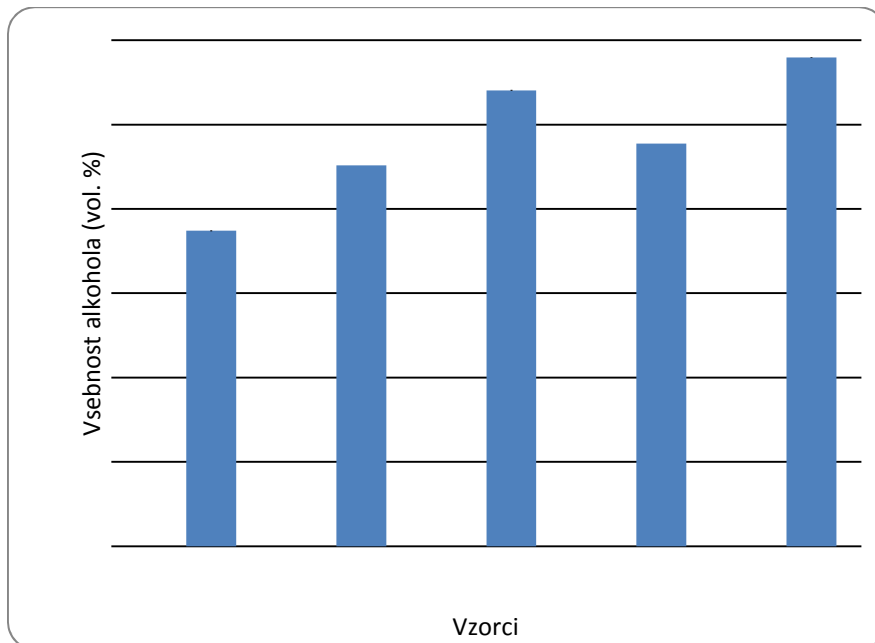
Za pregled referenc ter končni pregled magistrske naloge se zahvaljujem Lini Burkan Makivić.

Najlepše se zahvaljujem tudi partnerki Tadeji Ambrožič za potrpežljivost in nasvete ter staršem, ki so me skozi čas študija podpirali. Vsak je prispeval svoj kamenček v končni mozaik.

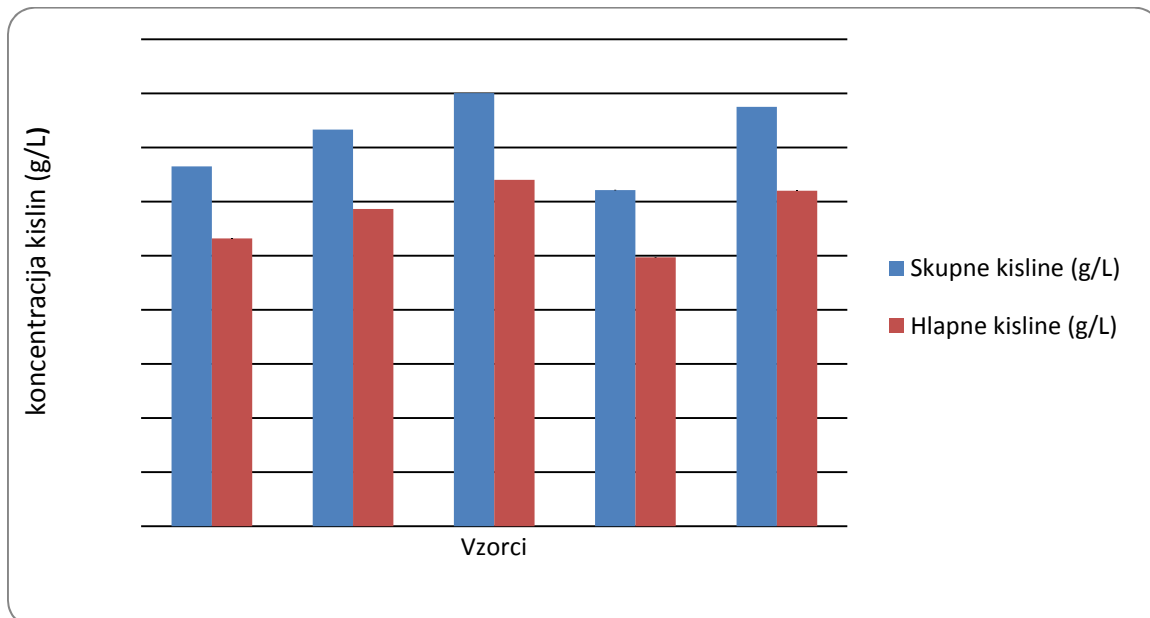
Hvala!

PRILOGE

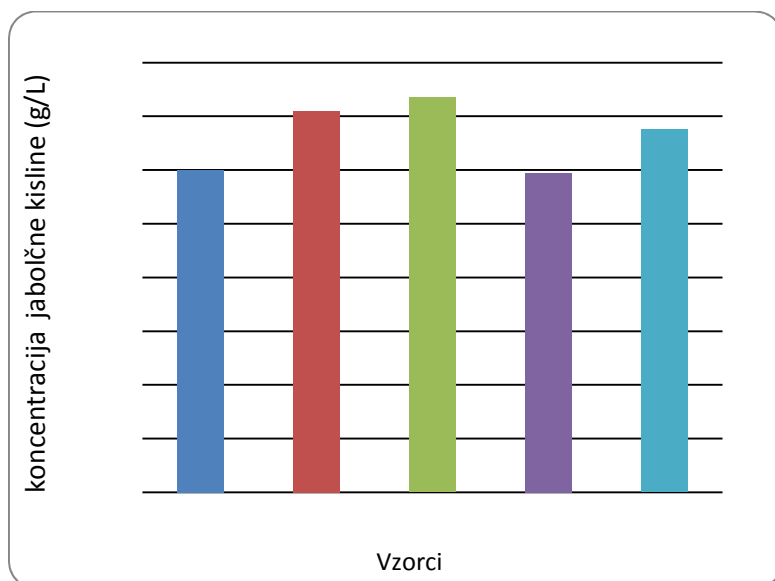
PRILOGA A: Povprečna vsebnost alkohola v vzorcih jabolčnih vin



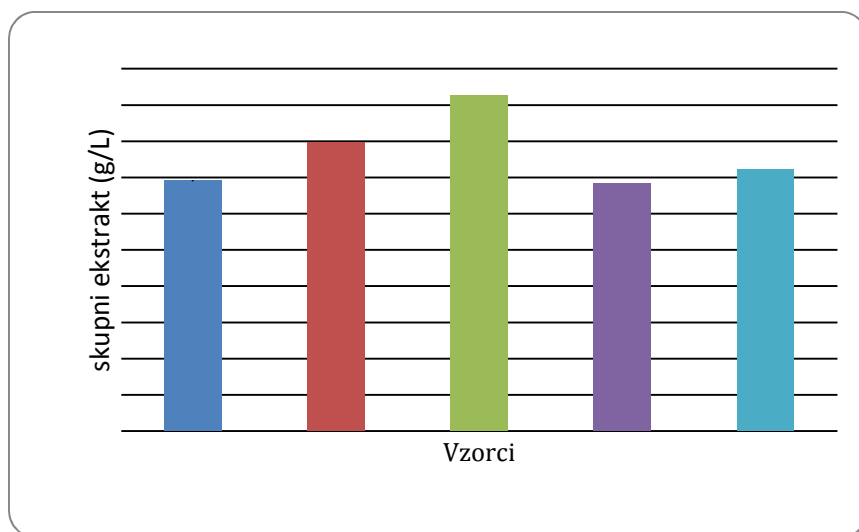
PRILOGA B: Povprečna vsebnost skupnih in hlapnih kislin v vzorcih kisa



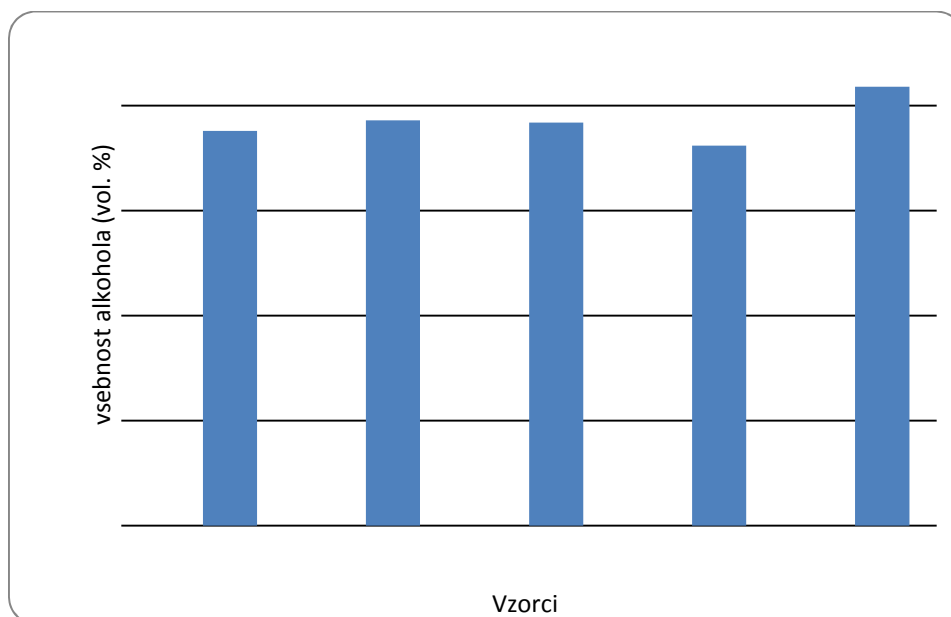
PRILOGA C: Povprečna vsebnost jabolčne kisline v vzorcih kisa



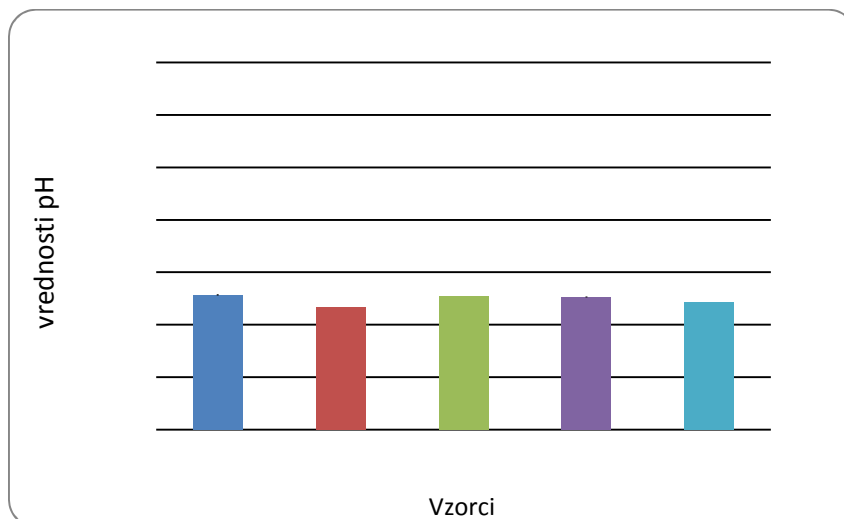
PRILOGA D: Povprečne vrednosti skupnega ekstrakta v vzorcih kisa



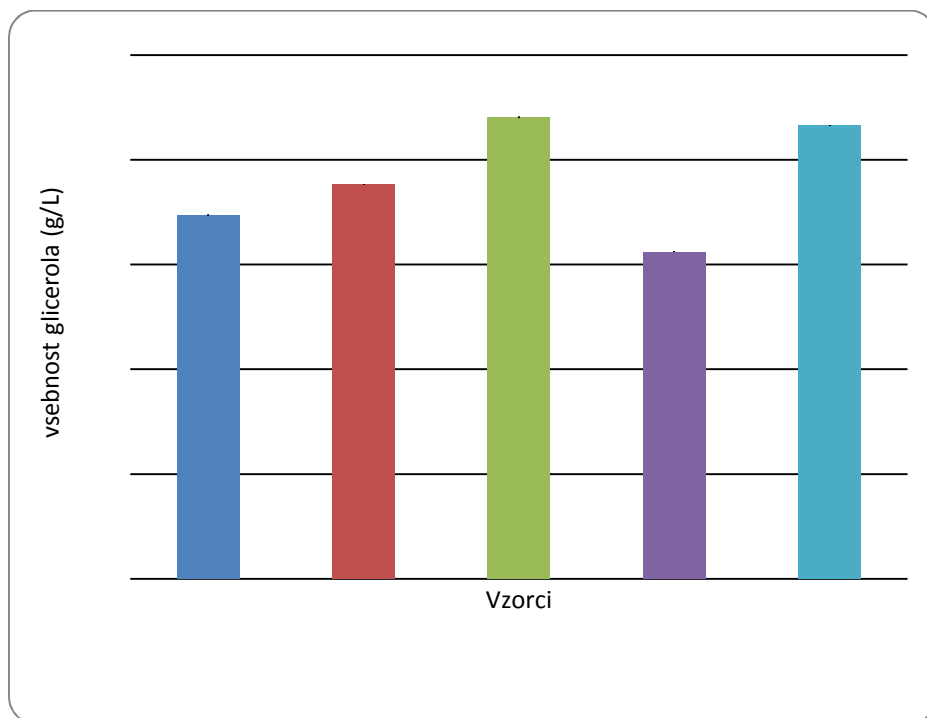
PRILOGA E: Povprečna vsebnost alkohola v vzorcih kisa



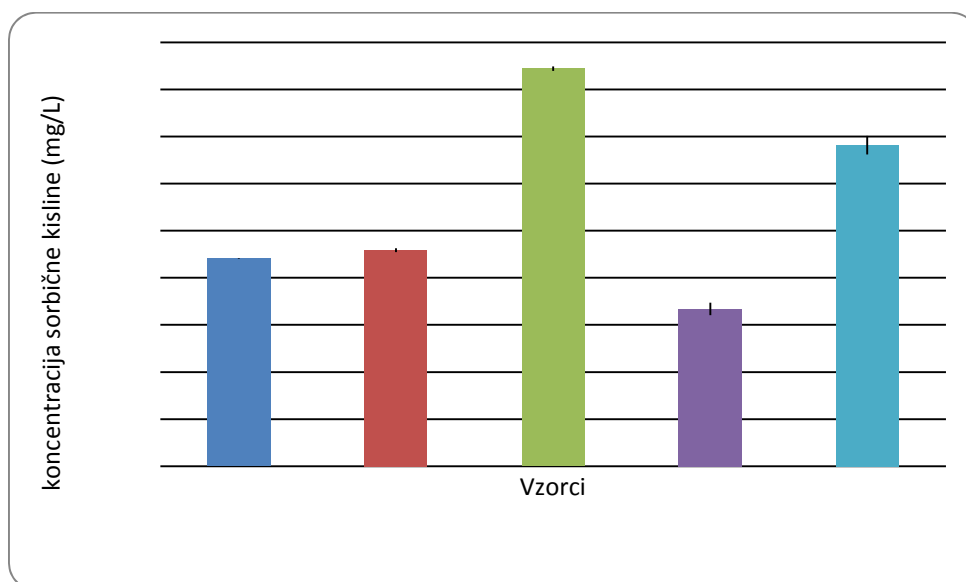
PRILOGA F: Povprečne vrednosti pH v vzorcih kisa



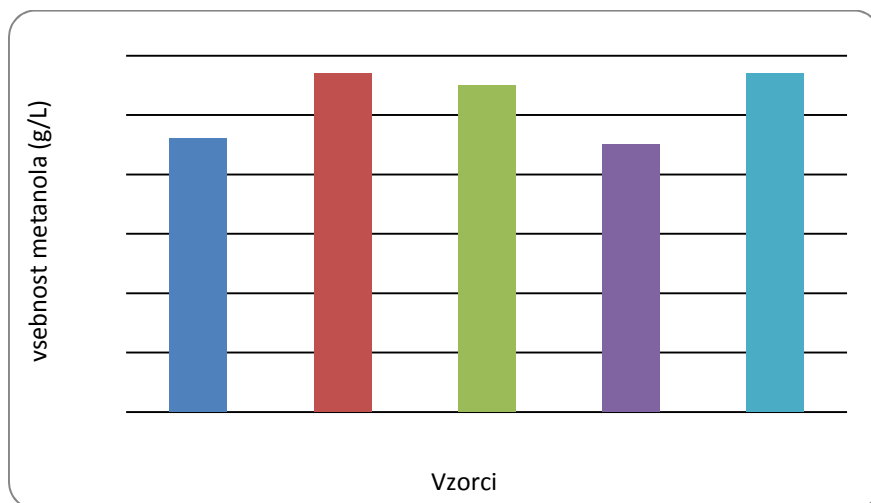
PRILOGA G: Povprečna vsebnost glicerola v vzorcih kisa



PRILOGA H: Povprečna vsebnost sorbične kisline v vzorcih kisa



PRILOGA I: Povprečna vsebnost metanola v vzorcih kisa



PRILOGA J: Povprečne skupne ocene senzorične analize vzorcev kisa

