Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (4), 95-106 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Изолиране, проучване и селекция на щамове винени дрожди за производството на регионални вина от сорта Мавруд

Христо Спасов*, Явор Чобанов, Полина Запрянова,
Жанета Райчевска, Калина Дянкова

Университет по хранителни технологии,
катедра „Технология на виното и пивото", Пловдив, България
**E-mail: spassovh@abv.bg*

Isolation, investigation and selection of wine yeast strains for the production of regional wines of the Mavrud variety

Hristo Spasov*, Yavor Chobanov, Polina Zapryanova,
Zhaneta Raychevska, Kalina Dyankova

University of Food Technology,
Department of Wine and Beer Technology, Plovdiv, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Извършено е изолиране на 120 щама дрожди от спонтанно изферментирали вина от сорта Мавруд от района на Татарево. Изолираните щамове са подложени на двустепенна селекция, на база на ферментационната им активност, ефективността им при използване на субстрата и основните метаболити. Подбрани са 10 щама, проявяващи висока ферментационна активност, подходящ метаболизъм, ефективно усвояващи субстрата. Те са подходящи за по-нататъшна селекция за производство на регионални вина от сорта Мавруд от района на село Татарево.

Ключови думи: регионални вина, дрожди, селекция, грозде, сорт Мавруд

SUMMARY

One hundred and twenty yeast strains were isolated from spontaneously fermented wines of the Mavrud variety from the Tatarevo region. The isolated strains were subjected to two-level selection on the basis of their fermentation activity, their efficiency in the use of the substrate, and the main metabolites. Ten strains which demonstrated high fermentation activity and suitable metabolism and efficiently assimilated the substrate were picked out. They were appropriate for further selection for the production of regional wines of the Mavrud variety from the region of Tatarevovillage.

Key words: regional wines, yeast, selection, grapes, Mavrud variety

УВОД

В настоящият момент във винопроизводството се използват много широко чистите културина селекционирани дрожди. Те имат редица предимства: осигуряват контролирана алкохолна ферментация, завършваща докрай, получените метаболити са в количества и съотношения, влияещи положително върху органолептичния профил на вината (Bambalov and Bambalov, 2003; Martini, 2003, Yoncheva et al., 2011). Към селекционираните дрожди се предявяват редица изисквания в зависимост от типа произвеждано вино (Beltran and Casellas, 2005; Yoncheva et al., 2007). На пазара се предлагат редица промишлени препарати сухи активни дрожди, притежаващи много добри технологични свойства. Тяхното приложение в различни региони обаче води до известно унифициране на вината и в определена степен загуба на специфичност.

Впоследните 10-15 години в световен мащаб се работи усилено по селекция на местни щамове дрожди за производство на регионални вина, за да се запази и подчертае спецификата на района и микрорайона (Heard and Fleet, 1985; Blackburn, 1988; Chobanov et al., 2008; Spasov et al., 2012). В някои случаи, освен за района, се държи сметка и за преработвания сорт, като селектират най-подходящите за даден сорт дрождени щамове (Yoncheva et al., 2003; Spasov et al., 2011).

Целта на настоящото проучване е изолиране, проучване и двустепенна селекция на щамове винени дрожди от района на село Татарево за производство на регионални вина от сорта Мавруд.

INTRODUCTION

Nowadays, pure cultures of selected yeast are widely used in winemaking. They have numerous advantages: they ensure controlled and complete alcoholic fermentation; the metabolites obtained are in amounts and proportions which have a positive effect on the organoleptic profile of wines (Bambalov and Bambalov, 2003; Martini, 2003; Yoncheva et al., 2011). A number of requirements concerning selected yeast are posed with regard to the type of wine produced (Beltran and Casellas, 2005; Yoncheva et al., 2007). Various industrial preparations of dry active yeast having very good technological properties are sold on the market. Their application in different regions, however, results in a loss of specificity.

For the past 10-15 years there has been intensive work worldwide aimed at the selection of local yeast strains for the production of regional wines in order to preserve and emphasise the specific character of the region and microregion (Heard and Fleet, 1985; Blackburn, 1988; Chobanov et al., 2008; Spasov et al., 2012). In some cases, attention is paid not only to the region but also to the variety processed which leads to the selection of the yeast strains most appropriate for a certain variety (Yoncheva et al., 2003; Spasov et al., 2011).

The aim of this study was to isolate, examine and perform two-level selection of wine yeast strains from the region of the village of Tatarevofor further use in the production of regional wines of the Mavrud variety.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експерименталната работа извършихме през 2015-2016 година в лабораторията на УХТ - Пловдив, катедра „Технология на виното и пивото”.

Четири партиди грозде от сорта

MATERIAL AND METHODS

The experimental work was done at the laboratory of the Department of Wine and Beer Technology at the University of Food Technology, Plovdiv, between 2015 and 2016.

Four 7 kg batches of the Mavrud

Мавруд от различни масиви в района на с. Татарево, обозначени съответно с MP, M10, M250 и MS, в количество 7 kg, след ронкане, смачкване, сулфитиране с 6 %-на серниста киселина с доза 50 mg/dm^3, бяха подложени на спонтанна ферментация в съдове от PET при температура 20-23^o C. Концентрацията на захари в партидите грозде варираше от 174 до 232 g/dm^3, титрумите киселини- от 4,89 до 8,44 g/dm^3, а pH – от 3,48 до 3,60.

Ходът на ферментацията се следеше рефрактометрично. След приключването на процеса, спонтанно изферментиралите вина бяха отделени от твърдите части, подложени на физикохимичен и органолептичен анализ по метода на основните характеристики (Prodanova, 2008) и използувани за изолация чисти култури дрожди по метода на Кох (Ivanov et al., 1985). Изолацията се извърши в стерилен гроздов сок и културите се съхраняват при температури 5-6^{o}C.

Новоизолираните 120 щама дрожди бяха подложени на двустепенна селекция. Първото ниво на селекция беше извършено на база на проучване на ферментационната им активност, като се извърши на четири серии по 30 щама. На база на получените резултати бяха селектирани 40 щама дрожди, които бяха подложени на втора степен на селекция.

Второто ниво на селекция се извърши на база на ферментационна активност, определена по тегловен метод (Ivanov et al., 1985) и изследване на основните метаболити. Изследването беше проведено в стъклени бутилки с по 120 cm^{3}стерилен гроздов сок с концентарция на захари 183 g/dm^3. След края на алкохолната ферментация, опитните партиди бяха анализирани по показателите алкохол, редуциращи захари, летливи киселини (Ivanov et al., 1985), бяха изчислени и коефициента на превръщаемост на захарите в алкохол и процентите захари използу-

variety from different vineyards in the region of Tatarevo village, designated by MP, M10, M250 and MS respectively, were destemmed, crushed, and sulphited with 6% sulphurous acid in a 50 mg/dm^3 dose, and then subjected to spontaneous fermentation in PET containers at a temperature of 20-23^o C. The sugar concentration in the grape batches varied between 174 and 232 g/dm^3, the titratable acids between 4.89 and 8.44 g/dm^3, and the pH between 3.48 and 3.60.

The fermentation progress was monitored refractometrically. After the end of the process, the spontaneously fermented wines were separated from the solids, subjected to physicochemical and organoleptic analysis according to the main characteristics method (Prodanova, 2008) and used for the isolation of a pure yeast culture according to Koch's method(Ivanov et al., 1985). The isolation was performed in sterile grape juice and the cultures were stored at a temperature of 5-6^{o}C.

The newly isolated yeast strains underwent two-level selection. At the first level, the selection was applied on the basis of a study of their fermentation activity and ran in four series of 30 strains each. In accordance with the results obtained, 40 yeast strains were selected and then used at the second selection level.

At the second level, selection was performed on the basis of their fermentation activity determined using the weighing method (Ivanov et al., 1985) and a study of the main metabolites. The study was made in glass bottles containing 120 cm^3 sterile grape juice each with sugar concentration of 183 g/dm^3. After the end of the alcoholic fermentation, the experimental batches were analysed for alcohol, reducing sugars, and volatile acids (Ivanov et al., 1985).The coefficient of sugar convertibility into alcohol and the sugar percentages used for ethanol and вани съответно за етанол и за вторични метаболити и биомаса.

След обобщаване на резултатите от ферментационната активност, метаболизма и ефективността на новоизолираните култури,на второ ниво бяха селектирани 10 дрождени щама.

secondary metabolites and biomass respectively were calculated.

After the results on the fermentation activity, metabolism and effectiveness of the newly isolated cultures had been summed up, 10 yeast strains were selected at the second level.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Спонтанната ферментация в опитните партиди грозде от сорта Мавруд протече аналогично, през първите 24 часа ферментационният процес е забавен, което се дължи на сулфитирането, след адаптиране към средата превес над ферментацията взимат сахаромицетните дрожди. Най-динамичен е процесът в опитно вино MS, средна интензивност се установява в пробите M10 и M250, а най-бавно протича ферментацията във вариант MP.

Стойностите на основните параметри в опитните вина са в нормални граници за сухи вина и съответстват на състава на гроздето.

Съществена разлика се наблюдава в количеството на образувания алкохол. Най-голямо количество алкохол 14 об%, е продуцирано в опитно вино MS, което се дължи на по-високите първоначални захари. Количеството на образуваният алкохол е задоволително при опитно вино MP. По-ниският алкохол при M10 и M250 се дължи на по-ниските начални захари.

При органолептичния анализ най-високо е оценено виното от проба MS. Интензитетът на цвета е силен, нюансът – наситено рубинен. Ароматът е чист, доминират нотки на сушени червени плодове. Вкусът е сравнително балансиран. Първоначалната сладост се трансформира в завишена киселинност във финала. При пробата M10 се установяват растително-сухи плодови и растителни нюанси в аромата, в проба MP преобладават растителните нотки, най-ниско е оценено виното от проба M250, основно заради дисбаланс във вкуса

RESULTS AND DISCUSSION

The spontaneous fermentation ran in a similar way in the experimental grape batches of the Mavrud variety. During the first 24 hours, the fermentation process was delayed due to the sulphitation; after adaptation to the medium, saccharomyces yeast started to dominate the fermentation. The most dynamic process occurred in the MS experimental wine; samples M10 and M250 showed medium intensity, and the fermentation was the slowest in the MP sample.

The values of the main parameters in the experimental wines were within the normal dry wine range and corresponded to the grape composition.

A significant difference was observed in the quantity of the alcohol formed. The highest alcohol amount of 14 % vol. was produced in experimental wine MS, which can be attributed to the higher original sugar content. The amount of the alcohol formed was satisfactory in experimental wine MP. The lower alcohol amount in M10 and M250 was due to the lower original sugar content.

The wine that ranked highest in the organoleptic analysis was the one of the MS sample. The colour intensity was strong, and the nuance slight ruby. The aroma was pure, with dominant hints of dry red berries. The taste was relatively balanced. The initial sweetness transformed into increased acidity in the finish. In the M10 sample, dried berry notes were established in the aroma; the vegetal notes were predominant in the MP sample, and the wine of the M250 sample ranked lowest mainly because of its unbalanced taste.

На база на обобщаването на резултатите от физикохимичния състав и сензорния профил на получените спонтанно изферментирали опитни вина беше извършена изолация на щамове дрожди. Източниците, броят и означенията са отразени в Таблица 1.

On the basis of the results on the physicochemical composition and sensory profile of the spontaneously fermented experimental wines obtained, yeast strains were isolated. The sources, number and designations have been presented in Table 1.

Таблица 1. Новоизолирани щамове дрожди
Table 1. Newly isolated yeast strains

Източник/Source	Брой щамове/Number of strains	Изолирани щамове/Isolated strains
MP	20	ZM1-ZM21
M250	20	ZM21-ZM40
M10	30	ZM41-ZM70
MS	50	ZM71-ZM120

Изолираните в стерилен гроздов сок щамове култивирахме при 25°C за 72-96 часа и после съхранихме при хладилни условия при 6°C до следващите етапи на проучването. Периодично презасявахме съхраняваните щамове.

Новоизолираните 120 щама бяха подложени на двустепенна селекция. В първата степен проучихме ферментационната им активност.

Изследването се извърши на четири серии. В първата бяха включени щамове от ZM1 до ZM30. Всички варианти доведоха ферментацията докрай, като според показаната ферментационна активност, дрождените щамове могат да се разделят на три групи:

I група - щамовете имат добър старт на алкохолна ферментация и равномерно усвояване на сухите вещества;

II група - темпът на алкохолната ферментация е забавен;

III група - щамовете добре стартират алкохолната ферментация, но в последствие усвояването на сухите вещества се забавя;

На Фигура 1 е представена динамиката на алкохолна ферментация на представители от трите групи.

The strains isolated in sterile grape juice were cultivated for 72-96 hours at 25°C, then stored in a refrigerator at 6°C until the subsequent levels of the study. The strains stored were reinoculated at intervals.

The newly isolated 120 strains were subjected to two-level selection. At the first level, their fermentation activity was studied.

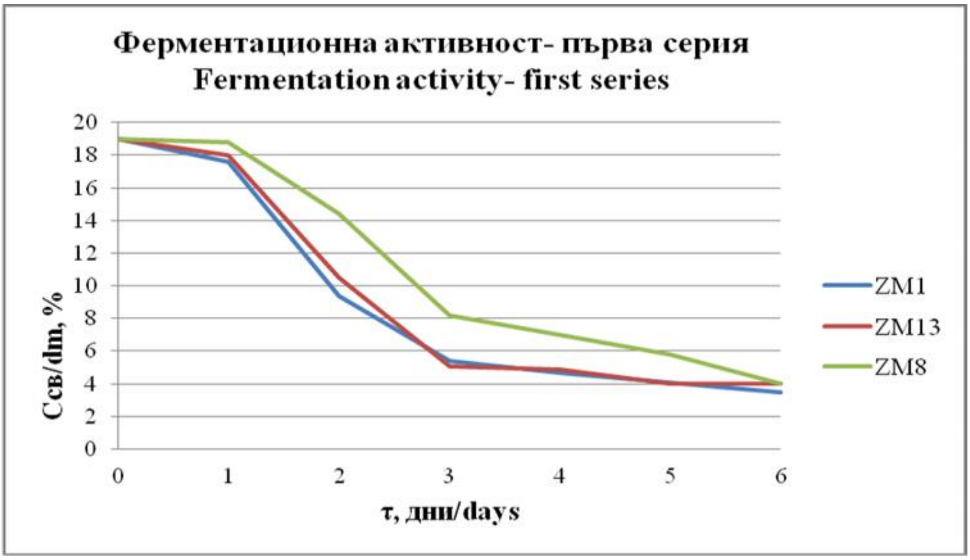
The study was carried out in four series. The first one included strains from ZM1 to ZM30. All samples brought the fermentation to an end and could be divided into three groups according to the fermentation activity they exhibited:

1st group–the strains showed a good start of the alcoholic fermentation and even assimilation of the dry matter;

2nd group – the rate of the alcoholic fermentation was delayed;

3rd group – the strains started the alcoholic fermentation well but later the dry matter assimilation was delayed.

Figure 1 shows the alcoholic fermentation dynamics of representatives of the three groups.



Фиг. 1. Динамика на алкохолна ферментация на новоизолирани щамове дрожди
Fig. 1. Dynamics of the alcoholic fermentation of newly isolated yeast strains

При реализирането на експеримента в осталати три групи щамове, от ZM31 до ZM120, установихме аналогично поведение и групиране, като в четвърта серия се забеляза леко забавяне на старта при всички култури.

При селекцията на първо ниво от основен критерий беше проявената ферментационна активност и способността на щамовете да завършват до край ферментационния процес. Съобразихме се и отново с органолептичния профил на изходните спонтанно изферментирали опитни вина и селектирахме по-голям брой щамове от партидата MS. В Таблица 2 са представени селектираните на първо ниво 40 щама, както и източниците на изолация.

When the experiment was conducted with the other three strain groups from ZM31 to ZM120, similar behaviour and grouping was established, the fourth series showing a slight delay of the start with all cultures.

During the first-level selection, the main criterion was the fermentation activity shown and the ability of the strains to bring the fermentation process to the end. The organoleptic profile of the initial spontaneously fermented experimental wines was also taken into account, and a larger number of strains of the MS batch were selected. Table 2 presents the 40 strains selected at the first level, as well as the isolation sources.

Таблица 2. Селектирани на първо ниво дрождени щамове
Table 2. Yeast strains selected at the first level

№	Източник Source	Селектирани на първо ниво щамове Strains selected at the first level
1.	**MP**	ZM1, ZM10, ZM11, ZM17, ZM18
2.	**M250**	ZM24, ZM27, ZM29, ZM33, ZM40,
3.	**M10**	ZM41, ZM46, ZM47, ZM54, ZM59, ZM60, ZM62, ZM63, ZM65, ZM66
4.	**MS**	ZM75, ZM76, ZM77, ZM80, ZM83, ZM84, ZM85, ZM86, ZM89, ZM90, ZM92, ZM95, ZM99, ZM103, ZM112, ZM113, ZM114, ZM118, ZM119, ZM120

За извършване на втората степен на селекция се извърши проучване на ферментационната активност по тегловния метод и изследване на основните метаболити и ефективността на процеса.

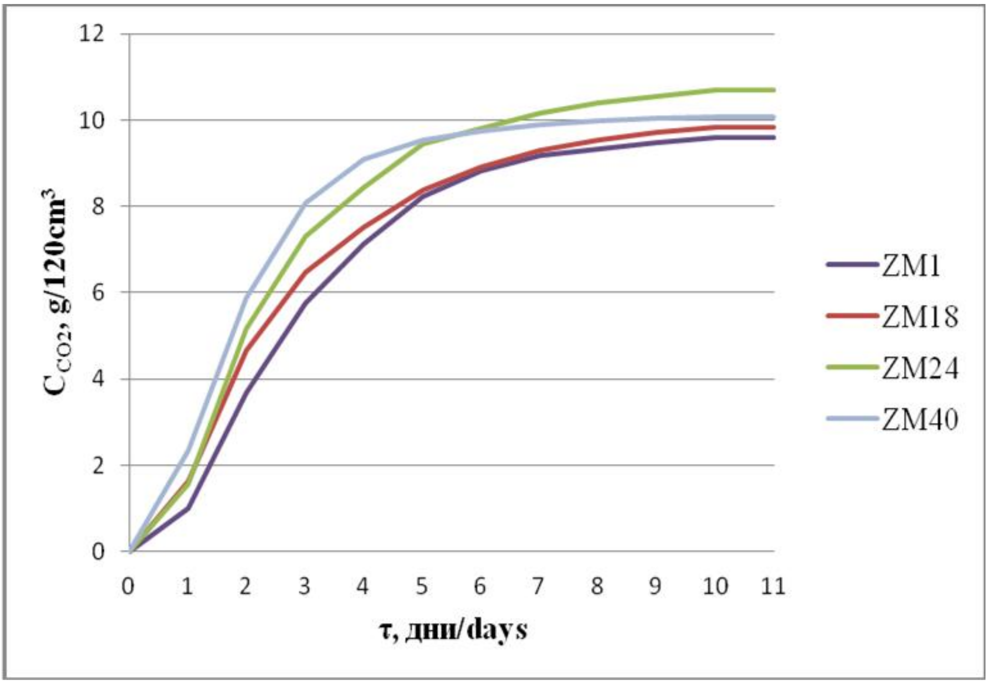
Селектираните на първо ниво 40 щама бяха разделени на две серии по 20 щама за извършване на анализите.

В първата серия са включени щамовете от опитни вина MP, M250 и M10. Резултатите за част от тях са представени на Фигура 2.

In order to perform the second selection step, the fermentation activity was studied according to the weighing method, and the main metabolites and the process efficiency were studied.

The 40 strains selected at the first level were divided into two series of 20 strains each for the purpose of the analyses.

The first series included the strains of experimental wines MP, M250 and M10. The results referring to part of them have been presented in Figure 2.



Фиг. 2. Ферментационна активност на опитни щамове
Fig. 2. Fermentation activity of the experimental strains

Ферментационните криви на графиката изразяват отделеното количество CO_2 за периода на ферментацията - 11 дни. Щамовете, които имат по-висока крива образуват повече CO_2, за единица време. На това съответства повече изферментирали захари и повече образуван алкохол. Тези щамове са по-ефективни.

При всички щамове ферментацията започва още през първите 24 часа след засяването. ZM 40, ZM 46,

The fermentation curves in the diagram show the CO_2 amount released during the fermentation period of 11 days. The strains having a higher curve formed more CO_2 per time unit. This corresponded to more fermented sugars and more alcohol formed. These strains were more efficient.

With all strains, the fermentation started during the first 24 hours after inoculation. ZM 40, ZM 46, ZM 63 and

ZM 63 и ZM 64 са по-активни т.к. количеството на отделения въглероден диоксид е завишено.

Забелязва се намаляване на активността след четвъртия ден при щамове ZM 11, ZM18 и ZM27. Най-голямо количество въглероден диоксид е отделено от щамове ZM 24 и ZM 40.

Във втората опитна серия са включени щамовете, изолирани от партидата грозде MS. Активността на щамовете е по-слаба в сравнение с първата серия. За първите 24 часа се отделя под 1 грам, само щам ZM 86 отделя 1,02 грама. Най- висока активност по време на ферментацията се наблюдава при щам ZM 92, а най-слаба при щам ZM 89.

Образуваният алкохол във всички варианти от двете серии варира в граници 10,4 – 11,1 об.%. Количеството на остатъчните захари за повечето варианти съответствува на завършена ферментация. При щамове ZM76, ZM89, ZM90 и ZM120 от втората серия има неизферментирали захари в граници 4,9 до 10,9 g/dm^3. Вероятна причина е анаеробиозата във ферментационните обеми. При тези варианти и количествата на получения алкохол логично са по-ниски. В анаеробните условия летливата киселинност се завишава, но остава в нормални за опитни вина стойности в граници от 0,4 g/dm^3 до 0,69 g/dm^3. Най-малко летливи киселини продуцират щамове ZM40 и ZM54, а най-високи такива щамът ZM29. Коефициентът на превръщаемост при всички варианти е в граници 0,58-0,60.

Относително най-големи различия се установяват в количеството захари, използвани за образуване на алкохол и тези за натрупване на биомаса и вторични метаболити. На Фигури 3 и 4 са представени данните за двете серии, като хистограмите показват какъв процент от наличните захари, дрождите са използвали за образуване на алкохол и каква част за натрупване на биомаса и вторични метаболити.

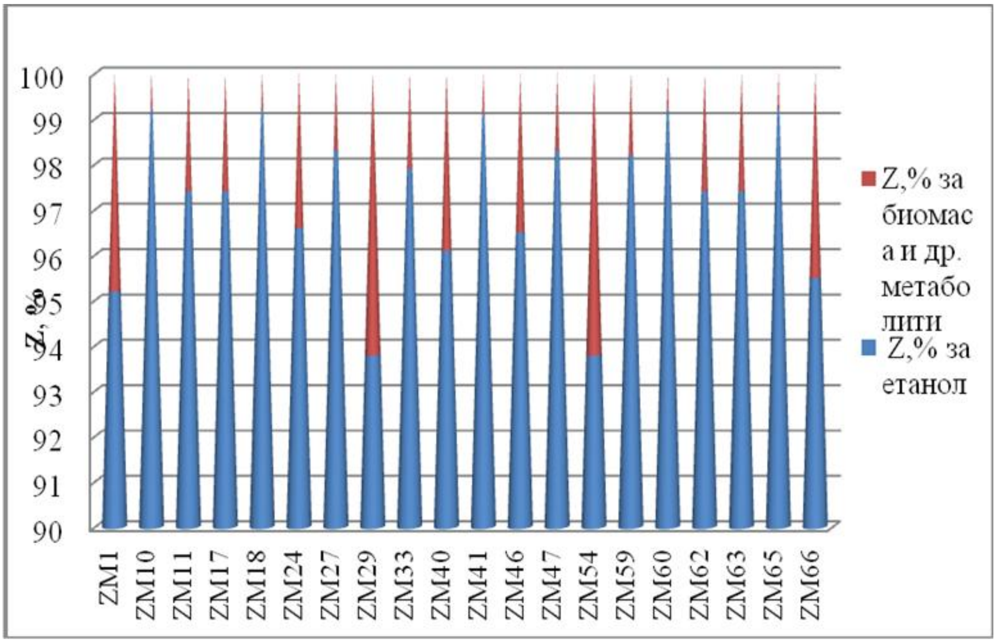
ZM 64 were more active since the amount of the carbon dioxide released was higher.

Reduced activity was observed after the fourth day with strains ZM 11, ZM18 and ZM27. The highest carbon dioxide amount was released by strains ZM24 and ZM40.

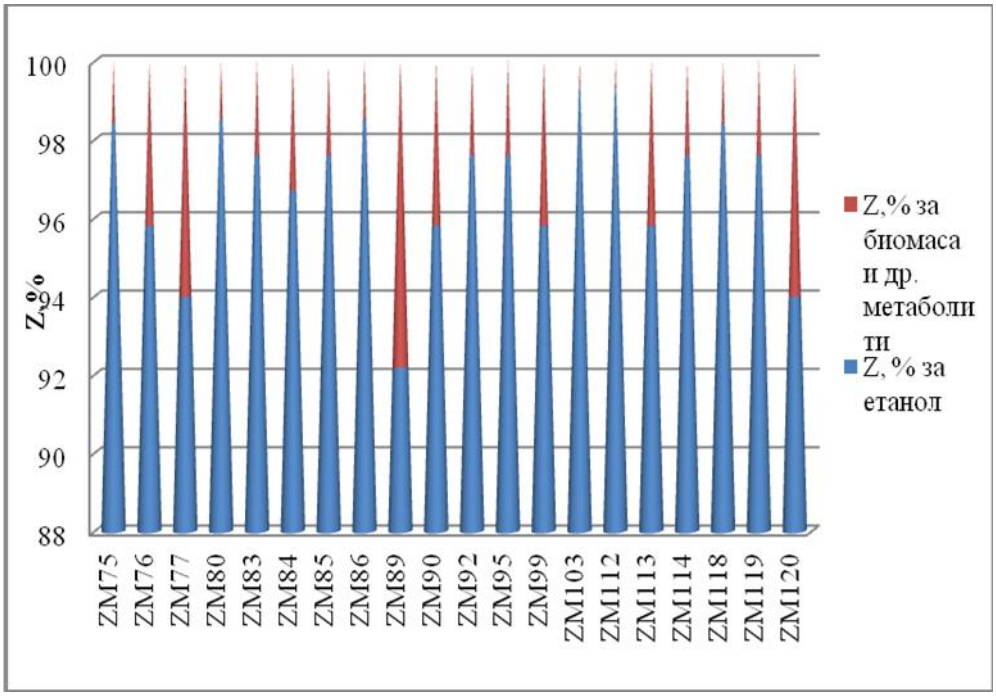
The second experimental series included the strains isolated from the MS grape batch The strain activity was weaker compared to the first series. Less than 1 gram was released for the first 24 hours; only the ZM86 strain released 1.02 grams. The highest activity during fermentation was observed with strain ZM92, and the lowest with strain ZM89.

The alcohol formed in all samples of both series varied within the 10.4 – 11.1 % vol. range. The residual sugar amount for most samples corresponded to complete fermentation. There were 4.9 to 10.9 g/dm^3 of unfermented sugars with strains ZM76, ZM89, ZM90 and ZM120 of the second series. A possible reason is the anaerobiosisin the fermentation volumes. The amounts of the alcohol formed were logically lower in these samples. Under anaerobic conditions, the volatile acidity increased but remained within the range of 0.4g/dm^3 to 0.69 g/dm^3, which was normal for experimental wines. The lowest volatile acid amounts were produced by strains ZM40 and ZM54, and the highest by the ZM29 strain. The convertibility coefficient for all samples ranged between 0.58 and 0.60.

In a relative aspect, the most differences were observed in the sugar amounts used for alcohol production and for the accumulation of biomass and secondary metabolites. Figures 3 and 4 present the data on the two series, and the histograms show the percentage of the available sugars used by the yeast for alcohol production, and the percentage used for the accumulation of biomass and secondary metabolites.



Фиг. 3. Ефективностнаопитнищамоведрожди – първа серия
Fig. 3. Efficiency of the experimental yeast strains: first series



Фиг. 4. Ефективностнаопитнищамоведрожди – втора серия
Fig. 4. Efficiency of the experimental yeast strains: second series

Най-голямо количество захари за алкохол са използвали щамовете ZM10, ZM18, ZM27, ZM41, ZM60, ZM65, ZM103 и ZM112. Процентът на захарите, използувани за етанол при тях е в граници 97-99 %. Тези щамове използуват най-ефективно субстрата в средата. С най-ниска ефективност се представят щамове ZM1, ZM40, ZM54, ZM66, ZM89, ZM77 и ZM120. При тях процентът на захарите, използувани за етанол е в граници 92-94 %, което съответства на по-ниското алкохолно съдържание, установено в тези проби.

На база на проучване на ферментационната активност на 40 щама, селектирани на първо ниво, образуваните от тях основни метаболити и ефективността им, на второ ниво бяха селектирани 10 щама, показали най-добрите резултати (Таблица 3). Те провеждат интензивна алкохолна ферментация, образуват основни метаболити в подходящи граници, ефективно използуват субстрата. Селектираните на второ ниво 10 щама ще бъдат включени в следващи етапи на селекция за получаване на регионални вина от сорта Мавруд.

The highest sugar amount was used for alcohol production by strainsZM10, ZM18, ZM27, ZM41, ZM60, ZM65, ZM103 and ZM112. The percentage of the sugars used by them for ethanol was 97-99 %. These strains made the most efficient use of the substrate in the medium. Strains ZM1, ZM40, ZM54, ZM66, ZM89, ZM77 and ZM120 had the lowest efficiency. The percentage of sugars used by them for ethanol was 92-94 %, which corresponded to the lower alcohol content established in these samples.

On the basis of the study of the fermentation activity of 40 strains selected at the first step, the main metabolites formed by them and their efficiency, 10 strains which had shown the best results were selected at the second level (Table 3). They carried out intensive alcoholic fermentation, formed the main metabolites within a suitable range, and made efficient use of the substrate. The 10 strains selected in the second step will be included in the subsequent selection stages for the production of regional wines of the Mavrud variety.

Таблица 3. Селектиранинавторониводрожденищамове
Table 3. Yeast strains selected at the second level

№	Източник/Source	Селектиранищамове/Selected strains
1.	**MP**	ZM-10, ZM-18
2.	**M250**	ZM-24, ZM-40
3.	**M10**	ZM-59, ZM-60, ZM-65
4.	**MS**	ZM-86, ZM-92, ZM-112

ИЗВОДИ

На базата на получените резултати при условията на проведения от нас експеримент, могат да се формулират следните обобщени изводи:

1. Изолирани са 120 нови щамове дрожди от спонтанно изферментирали вина от сорта Мавруд от района на с. Татарево, с което е обогатен биофонда на стартерни култури за получаване на регионални вина.

CONCLUSIONS

On the basis of the results obtained under the conditions of the experiment, the following generalised conclusions could be drawn:

5. One hundred and twenty new yeast strains were isolated from spontaneously fermented wines of the Mavrud variety and were used to enrich the starter culture biofund for the production of regional wines.

2. Проведена е двустепенна селекция на новоизолирани щамове дрожди на база ферментационната им активност и ефективността на провеждания от тях процес.

3. Установено е, че селектираните на второ ниво новоизолирани дрождени щамове притежават висока ферментационна активност и подходящ метаболизъм за производство на вина.

4. Предложени са 10 новоизолирани и селектирани дрождени щамове за полупромишлени и промишлени експерименти за получаване на регионални вина от сорта Мавруд.

6. Two-level selection was made of newly isolated yeast strains on the basis of their fermentation activity and the efficiency of the process they carried out.

7. The newly isolated yeast strains selected at the second level had high fermentation activity and suitable metabolism for wine production.

8. Ten newly isolated and selected yeast strains were suggested for semi-industrial and industrial experiments for the production of regional wines of the Mavrud variety.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bambalov, K. and V. Bambalov**, 2003. Influence of yeast strain on the phenolic composition of must in the production of white wines. *Lozarstvo i vinarstvo*, 5, 9-14 (Bg).

2. **Beltran and G. Casellas**, 2005. Effect of Low Temperature Fermentation and Nitrogen Content on Wine Yeast Metabolism. Dissertation submitted by Universitat Rovira i Virgili, Facultat d'Enologia, department de Bioquimica i Biotechnologia, Tarragona, Spain, pp. 248.

3. **Blackburn, D.**, 1988. Yeast strain: Is it important? *Wines & Vines*, March, 36-39.

4. **Chobanov, Y., G. Bambalov, H. Spasov, V. David, M. Giyu-Benatie and E. Aleksander,** 2008. Selection of wine yeast and determination of clonal diversity. *Lozarstvo i vinarstvo*, 1, 24-32 (Bg).

5. **Heard, G. and G. Fleet**, 1985. Growth of Natural Yeast Flora during Fermentation of Inoculated Wines, *Applied and Environmental Microbiology*, 50(3), 727-728.

6. **Ivanov, Tr., St. Gerov, A. Yankov, G. Bambalov, T.Tonchev, D Natchkov and M. Marinov**, 1985. Practicum on Wine Technology. *Izdatelstvo "Hristo G. Danov", Plovdiv* (Bg).

7. **Martini, A.**, 2003. Biotechnology of Natural and Winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Microbiology*, 6, 207-209.

8. **Prodanova, N.**, 2008. Tasting or how to get to know the wine. *"Ikonomedia",* Sofia, pp. 115-118 (Bg).

9. **Rodina, T.**, 2004. Sensory analysis of food products, Moscow, 3.1.2 (Ru).

10. **Spasov, H., D. Hristev, N. Blagoeva, N. Stoyanov, P. Mitev, Y. Chobanov and P. Stefanova**, 2012. Comparative study of newly isolated yeast strains from different regions of Bulgaria, Scientific Conference with International Participation "Nutrition Science, Techniques and Technologies 2012", Scientific Works of UFT, 19-20 October, Plovdiv, vol. LIX, 397-402 (Bg).

11. **Spasov, H., P. Mitev, N. Stoyanov, N. Blagoeva and P Zapryanova**, 2011. Selection of wine yeast for the production of red wines from the Pomorie region. Scientific papers Donetsk National University of Economics and Trade, Ukraine, vol. 26, 459-466 (Ru).

12. **Yoncheva, T., Spasov, C., Gotcheva and V., Angelov, A.**, 2011. Effect of grape variety and temperature on the synthesis of 2-phenylethanol by Bulgarian wine

yeast. BIOFLAVOR 2nd European Yeast Flavour Workshop [Cost action FA0907], 26-27 May 2011, Delft, The Netherlands, 15.
13. **Yoncheva, T., Zh. Popova and H. Spasov**, 2003. Study of the Propagative Capacity and Fermentation Activity of Strains of Wine Yeast for Red Wine Production. I Balkan and III Macedonian symposium for vine growing and winemaking, Skopje, Makedonia, 26-28.11.2003. In: Symposium proceedings, pp. 210-214.
14. **Yoncheva, T., Zh. Popova, H. Spasov, A. Koleva and S. Michailova-Mikova**, 2007. Study of β-glycosidic activity of wine yeast and influence on the color of red wine. Scientific conference with international participation "Sustainable development of viticulture and wine-based knowledge". Institute of Viticulture and Wine Production, Pleven, 29-30.08.2007 Collection of reports, pp. 272-278 (Bg).

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (4), 107-121 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Селекция на новоизолирани щамове дрожди за производство на регионални вина от сорта Регент

Христо Спасов*, Явор Чобанов, Надежда Благоева, Полина Запрянова, Жанета Райчевска, Антония Мосенгова

Университет по хранителни технологии,
катедра „Технология на виното и пивото", Пловдив, България
**E-mail: spassovh@abv.bg*

Selection of newly isolated yeast strains for the production of regional wines of the Regent variety

Hristo Spasov*, Yavor Chobanov, Nadezhda Blagoeva, Polina Zapryanova, Zhaneta Raychevska, Antoniya Mosengova

University of Food Technology,
Department of Wine and Beer Technology, Plovdiv, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Извършени са селекционни изследвания на 10 подбрани щамове винени дрожди измежду общо 150 новоизолирани култури. Дрождите са изолирани от грозде от сорта Регент от района на Пловдив. Проучени са морфологичните, културални и физиологични свойства на дрождите. С тях при полупромишлени условия са произведени вина от сорта Регент. Вината са анализирани по основните физикохимични показатели, направена е и органолептична характеристика. Всички проучвани щамове дрожди се отнасят към вида Saccharomyces cerevisiae. Щам Р-2 и Р-17 са силни антагонисти спрямо млечно-киселите бактерии и в получаваните с тях вина ЯМКФ не протича. При условията на проведения от нас експеримент най-високо оценен е органолептичния профил на опитните вина, получени с щам Р-113 , следвани от Р-114. Те запазват и подчертават в най-висока степен спецификата на сорта и региона и могат да се

SUMMARY

Selection studies were made of 10 wine yeast strains selected out of 150 newly isolated cultures. The yeast strains were isolated from the Regent grape variety grown in the Plovdiv region. The morphological, cultural and physiological properties of the yeast were studied. On this basis, wines of the Regent variety were produced in semi-industrial conditions. The wines were analysed according to the basic physicochemical indices and their organoleptic profiles were made. All yeast strains studied belonged to the *Saccharomyces cerevisiae* species. The P-2 and P-17 strains were powerful antagonists of lactic acid bacteria and no malolactic fermentation occurred in the wines obtained with them. Under the conditions of the experiment conducted, the top-rated organoleptic profile was that of the experimental wines obtained using strain P-113, followed by those made using P-114. They preserved and emphasised to the highest degree the specificity of the

препоръчат за приложение за производство на червени вина от сорта Регент от района на Пловдив

Ключови думи: регионални вина, дрожди, селекция, грозде, сорт Регент

variety and region, and could be recommended for the production of red wines of the Regent variety from the Plovdiv region.

Key words: regional wines, yeast, selection, grapes, Regent variety

УВОД

В днешно време, когато съвременната наука е позволила на винопроизводителите да познават и управляват ефективно процеса на ферментация, значението на използваните щамове дрожди става все по-важно. *S. cerevisiae* се вписва най-добре в условията на ферментация, затова и понастоящем това е вида, основно използван като чиста култура от производителите на вино (Cönig et al., 2009). Провеждат се редица проучвания, за изолиране и селекция на сахаромицетни дрождени щамове от спонтанно изферментирали вина (Efstratios et al., 2006; Csoma et al., 2010), като се използват различни критерии при селекцията (Bambalov et al., 1996; Yoncheva et al., 2005; Monagas, 2007; Yoncheva et al., 2007; Chobanov et al., 2008; Yoncheva, 2010). Същевременно се отбелязва все повече тенденцията за унифициране на произвежданите вина, загуба на тероарност и специфика поради използването на еднакви комерсиални дрождени препарати в различни региони (Callejon et al., 2010).

Селекцията на местни щамове дрожди за ферментация и влагането им като чисти култури е от фундаментално значение за съвременното винопроизводство. Това е целесъобразно с оглед по-добрия контрол на ферментацията и запазването на тероарния и регионален специфичен характер на произвежданото вино, което стана особено актуално в последните години (Martini and Vaughan-Martini, 1990; Regordon et al., 2006). Използването на местни щамове дрожди, освен че подържат биоразнообразието, е често за предпочитане, тъй като те са по-

INTRODUCTION

At a time when modern science has made it possible for wine makers to be familiar with and effectively manage the fermentation process, the yeast strains used are becoming more and more important. *S. cerevisiae* fits best into the fermentation conditions, therefore this is the species predominantly used as a pure culture by winemakers (Cönig et al., 2009).

Numerous studies have been focused on the isolation and selection of *Saccharomyces* yeast strains from spontaneously fermented wines (Efstratios et al., 2006; Csoma et al., 2010) using different criteria for the selection (Bambalov et al., 1996; Yoncheva et al., 2005; Monagas, 2007; Yoncheva et al., 2007; Chobanov et al., 2008; Yoncheva, 2010). At the same time, there is a marked tendency towards unification of the wines made and loss of terroir character and specificity caused by the use of identical commercial yeast preparations in different regions (Callejon et al., 2010).

The selection of local yeast strains for fermentation and their use as pure cultures is fundamentally important for modern winemaking. It contributes to the better fermentation control and the preservation of the terroir and regionally specific character of the wine made, which has become particularly significant in recent years (Martini and Vaughan-Martini, 1990; Regordon et al., 2006). Apart from maintaining biodiversity, local yeast strains are often preferred since they are better adapted to the environment and its condition, and allow wines from a specific region to добре аклиматизирани към средата и условията й и осигуряват проявяване на типичните сензорни характеристики на вината от даден регион (Spasov et al., 2012). Търси се и връзката между сорта, от който е изолиран даден щам и запазване и подчертаване на сортовия характер на вината, получени с него. Голям е интереса към селекция на нови щамове дрожди от даден сорт грозде от даден район (Spasov et al., 2012; Spasov et al., 2012; Ilieva et al., 2016)

Целта на настоящото изследване е да се направи сравнително проучване на десет новоизолирани щама винени дрожди от района на Пловдив и да проучи възможността да се прилагат при производство на регионални червени вина от сорта Регент.

demonstrate their typical sensory characteristics (Spasov et al., 2012). The relation between the variety from which a certain strain is isolated and the preservation and accentuation of the varietal characteristics of the wines made with it has also been studied. There is pronounced interest in the selection of new yeast strains of a particular grape variety from a specific region (Spasov et al., 2012; Spasov et al., 2012; Ilieva et al., 2016).

The aim of this paper was to present a comparative study of ten newly isolated wine yeast strains from the Plovdiv region and examine the possibility for their application to the production of regional red wines of the Regent variety.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експерименталната работа е извършена в периода 2015-2016 година в УХТ - Пловдив и във винарска изба Съединение, в рамките на ВП-Брандс Интернешънъл.

В проучването са включени 10 подбрани щамове винени дрожди измежду общо 150 новоизолирани култури : Р-2, Р-17, Р-55 , Р-60, Р-85, Р-88, Р-111, Р-113, Р-114, Р-117. Дрождите са изолирани от грозде от сорта Регент от района на Пловдив. В стерилен гроздов сок със съдържание на захари 200g/ dm^3, титруеми киселини 6,4 g/dm^3 и pH 3,32 са проучени морфологичните, културални и физиологични свойства на 72-часови култури от дрождите. С тях и с два контролни щама, *Saccharomyces cerevisiae A-30* и *Saccharomyces cerevisiae MVO-3001*, са произведени при полупромишлени условия вина от сорта Регент.

Партида грозде от сорта Регент от района на Найден Герово, набрано в технологична зрялост, със захарно съдържание 24,7 %, титруеми киселини 3,82 g/dm^3 и pH 3,87, след изравняване беше отделено от чепките, претеглено

MATERIAL AND METHODS

The experimental work was performed at the University of Food Technology in Plovdiv and Saedinenie Wine Cellar within VP-Brands International between 2015 and 2016.

The study included 10 wine yeast strains selected out of 150 newly isolated cultures: P-2, P-17, P-55, P-60, P-85, P-88, P-111, P-113, P-114, and P-117. The strains were isolated from the Regent grape variety grown in the Plovdiv region. The morphological, cultural and physiological properties of 72-hour yeast cultures were examined in sterile grape juice containing 200g/ dm^3 of sugars and 6.4 g/dm^3 of titratable acids at pH 3.32. Together with two control strains, i.e. *Saccharomyces cerevisiae A-30* and *Saccharomyces cerevisiae MVO-3001*, wines of the Regent variety were made in semi-industrial conditions.

A homogeneous Regent grape variety batch from the Nayden Gerovo region harvested at technological ripeness and having sugar content of 24.7 %, 3.82 g/dm^3 of titratable acids and pH 3.87 was destemmed, weighed and crushed. After и смачкано. След смачкването, 12 партиди от по 7 килограма гроздова каша бяха поставена в бутилки от PET с обем 10 dm^3 и сулфитирана с разтвор на серниста киселина в доза 50 mg\dm^3 SO_2. Така сулфитираната гроздова каша след два часа беше засята с предварително култивирана в стерилен гроздов сок течна култура винени дрожди от проучваните щамове. Бяха добавени танини – TANIN VR SUPRA с доза 50 g/hl и азотни добавки- Nutristart Org с доза 10 g/hl.

Алкохолната ферментация на опитните варианти протече при температура 23-25^{o}C. Ежедневно се извършваше разбъркване. Ходът на алкохолната ферментация следихме рефрактометрично с рефрактометър на Аббе.

Бурната и тихата ферментация протекоха в един и същи съд, след което джибрите бяха отделени, а полученото вино се прехвърли в други съдове от PET. Пробите се засяха с чиста култура млечнокисели бактерия Viniflora CH16-*Oenococcus oeni* с цел протичане на ябълчено-млечнокисела ферментация (ЯМКФ). Ходът й следяхме чрез хартиена хроматография. След установяване на края на ЯМКФ при част от пробите те се отделиха от утайката и се досулфитираха с по 30 mg/dm^3 серен диоксид и бяха изпратени за съхрание. При пробите P-2; P-17 не беше отчетено начало на ЯМКФ. Пробите с непротекла ЯМКФ бяха засяти повторно с други млечно-кисели бактерии *Lalvin-VP41*, като следихме за хода на процеса в продължение на 20 дни. В готовите вина направихме анализ по общоприетите в енологичната практика методи (Ivanov et al., 1985) на следните показатели: алкохолното съдържание, редуциращи захари, титруеми и летливи киселини, общи феноли, антоциани, цветови характеристики. Беше направена и органолептична оценка по метода на основните характеристики и по метода на балните скали (Rodina, 2004; Prodanova, 2008). Изготвени бяха спайдер-диаграми.

crushing, 12 batches of 7 kg of grape mash each were placed in 10 dm^3 PET bottles and sulphited with sulphurous acid in a 50 mg\dm^3 SO_2 dose.

After two hours, the sulphited grape mash was inoculated with a liquid wine yeast culture of the strains studied cultivated in sterile grape juice. Tannins (TANIN VR SUPRA) in a 50 g/hl dose and nitrogen additives (Nutristart Org) in a 10 g/hl dose were added.

The alcoholic fermentation of the experimental samples ran at a temperature of 23-25^{o}C. Stirring was applied on a daily basis. The alcoholic fermentation progress was monitored using an Abbe refractometer.

The tumultuous and the quiet fermentation occurred in the same vessel, then the pomace was removed and the wine obtained was transferred into other PET containers. The samples were inoculated with a pure culture of *Viniflora CH16-Oenococcus oeni* lactic acid bacteria to induce malolactic fermentation. Its progress was monitored using paper chromatography. After the end of the malolactic fermentation, some of the samples were separated from the lees and further sulphited with 30 mg/dm^3 of sulphur dioxide each, then placed in storage. No start of malolactic fermentation was reported in samples P-2 and P-17. These samples were reinoculated with other lactic acid bacteria, i.e. *Lalvin-VP41*, and the process was monitored for 20 days. Using the common methods in oenological practice (Ivanov et al., 1979), an analysis was made in the ready wines according to the following indices: alcohol content, reducing sugars, titratable and volatile acids, total phenols, anthocyans, and colour characteristics. An organoleptic evaluation was also made in accordance with the main characteristics method and the rating scales method (Rodina, 2004; Prodanova, 2008). Spider diagrams were prepared.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Проучени бяха морфологичните, културалните и физиологичните характеристики на опитните щамове дрожди.

При микроскопирането се установи, че повечето щамове имат сходна морфология, клетките са еднородни овални до леко елипсовидни при всички щамове. Големината им, определена с електронен окуляр, варира в граници 3-5 ÷ 6-9 µm. В повечето случаи клетките са разположени в средата поединично и на малки групи. Всички щамове се размножават вегетативно чрез едностранно полярно пъпкуване, рядко се наблюдава и двустранно пъпкуване. В течна хранителна среда (гроздов сок) дрождите се развиват еднотипно, причинявайки активна ферментация с размътване на средата, отделяне на газ и образуване на пяна. В края на процеса някои щамове образуват лек пръстен по повърхността, а на дъното - сравнително уплътнени утайки.

Върху твърда хранителна среда образуват еднотипни колонии- целокрайни, гладки, куполовидно-изпъкнали, полублестящи, кремави до светло бежови, пастообразни.

Беше проучена способността на дрождите да ферментатират 5 (пет) основни въглехидрата-фруктоза, галактоза, захароза, малтоза и рафиноза. Всички щамове ферментират глюкоза, галактоза, захароза, фруктоза, малтоза и 1/3 рафиноза.

При микроскопиране на биомаса престояла 10 (десет) дни въху гладния агар,клетките бяха със сравнително удебелена клетъчна стена, протоплазмата зърнеста. При всички щамове се наблюдава спорообразуване, около 50-60% от клетките споролират без предварително копулиране, като образуват от 2 (две) до 3 (три) аскоспори в аскус.

На база на получените резултати от проучването на морфологични, културални и физиологични характеристики на изследваните новоизолирани щамове, се извърши частична идентификация. Сравнявайки получените резултати с информацията в различни определители, всички култури с висока степен на

RESULTS AND DISCUSSION

The morphological, cultural and physiological characteristics of the experimental yeast strains were studied.

The microscopic examination showed that most strains had similar morphology; the cells were uniform, oval to slightly elliptic, in all strains. Their size determined by means of an electronic eyepiece varied within the 3-5 ÷ 6-9 µm range. In most cases, the cells were located in the middle alone or in small groups. All strains propagated vegetatively by unilateral polar budding. In a liquid medium (grape juice), the yeast developed uniformly causing active fermentation with turbidity of the medium, gas release and foam formation.

At the end of the process, some of the strains formed a slight ring on the surface and relatively compacted lees on the bottom.

Uniform colonies formed upon the solid culture medium: entire, smooth, convex, semi-glistening, cream-coloured to light beige, and pasty.

The ability of yeast to ferment 5 main carbohydrates, i.e. fructose, galactose, sucrose, maltose and raffinose, was studied. All strains fermented glucose, galactose, sucrose, fructose, maltose and 1/3 raffinose.

During the microscopic investigation of biomass which had been left for 10 days upon the hungry agar, the cells had a relatively thickened cell wall and grainy protoplasm. In all strains, spores were formed; around 50-60% of the cells formed spores without any preliminary copulation, producing two to three ascospores within an ascus.

In view of the results obtained from the study of the morphological, cultural and physiological characteristics of the newly isolated strains studied, partial identification was performed. On the basis of the comparison of the results to the information in the different classifications, all cultures could be attributed, with a high вероятност могат да бъдат отнесени към род *Saccharomyces cerevisiae* по Barnett (1990) и *Saccharomyces cerevisiae* (*ellipsoideus*) по Lodder (1974). Това са типични винени дрожди, което дава основание да предполага, че те ще проявяват висока активност при ферментация на гроздова каша, ще провеждат интензивна, сигурна и протичаща до край алкохолна ферментация.

Беше проведена алкохолна ферментация в гроздови каши от сорта Регент реколта 2015 година с 10 щама новоизолирани дрожди от района на Найден Герово и два контролни комерсиални щама.

Алкохолната ферментация във всички проби протече сходно - интензивно намаление на концентрацията на сухи вещества и практически завършване на процеса в границите на 9 дни. В Таблица 1 и на Фигура 1 е представена динамиката на сухите вещества. Имаме плавно започване на ферментацията, а след това интензифициране към 3-тия ден. Най-бавно ферментиране имаме при щам Р-111 ,а най-бързо при контролния щам А-30. Най-плавно ферментацията протича при щам Р-17.

В хода на ферментацията е правен органолептичен анализ, като не са открити редуктивни нотки.

degree of probability, to the *Saccharomyces cerevisiae* species according to Barnett (1990) and *Saccharomyces cerevisiae* (*ellipsoideus*) according to Lodder (1974). These are typical wine yeasts, therefore the conclusion could be drawn that they would be highly active in grape mash fermentation and would carry out intensive, secure and complete fermentation.

Alcoholic fermentation was conducted in grape mash of the Regent variety, 2015 vintage, with 10 newly isolated yeast strains from the Naiden Gerovo region, and two control commercial strains.

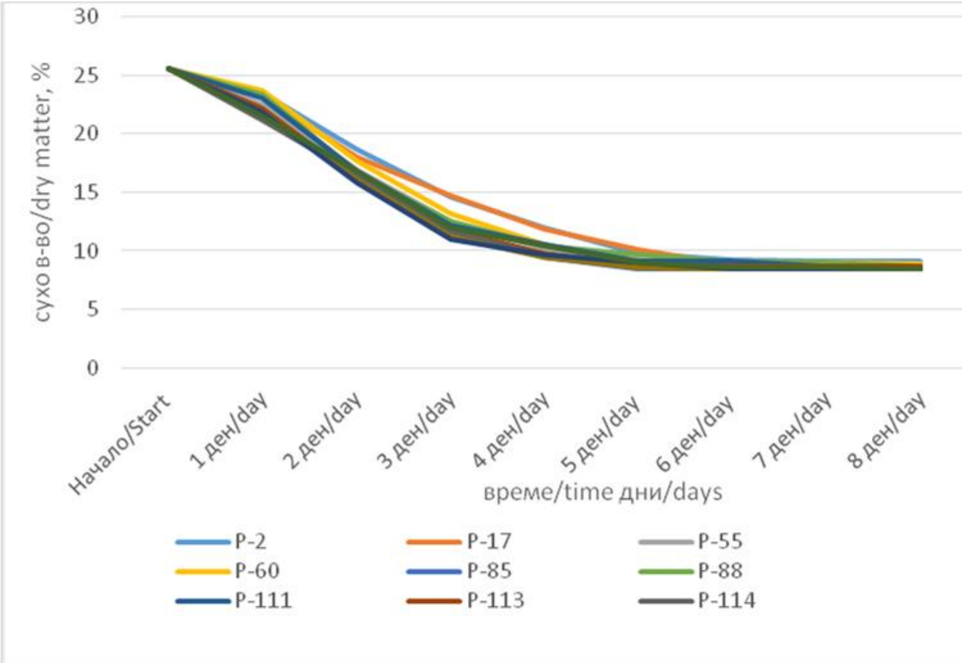
The alcoholic fermentation ran in a similar way in all samples: intensive reduction in dry matter concentration and practical completion of the process within 9 days. The dry matter dynamics has been presented in Table 1 and Figure 1. There was a smooth start of the fermentation, then intensification around the 3rd day. The slowest fermentation was observed with strain P-111, and the fastest with control strain A-30. The fermentation was the smoothest with strain P-17.

Organoleptic analysis was made in the course of fermentation, and no reduced notes were found.

Таблица 1. Динамика на алкохолна ферментация на опитни вина от сорта Регент

Table 1. Dynamics of the alcoholic fermentation of experimental wines from the Regent variety

Strain	Dry matter concentration, (%), after days								
	Start	1 day	2 day	3 day	4 day	5 day	6 day	7 day	8 day
P-2	25.6	23.5	18.6	14.6	12.0	9.8	9.2	9.1	9.1
P-17	25.6	23.2	18.0	14.7	11.9	10.1	8.8	8.7	8.7
P-55	25.6	22.5	16.9	12.5	10.2	9.2	8.8	8.6	8.6
P-60	25.6	23.7	17.7	13.2	10.5	9.1	9.0	9.0	8.9
P-85	25.6	21.9	16.3	11.7	9.4	8.5	8.5	8.5	8.5
P-88	25.6	23.4	16.7	12.5	10.4	9.7	9.1	9.0	8.7
P-111	25.6	23.0	16.8	12.2	10.5	9.1	9.1	8.7	8.7
P-113	25.6	22.2	16.1	11.8	9.8	8.8	8.7	8.7	8.7
P-114	25.6	21.2	16.5	11.6	9.6	8.6	8.5	8.5	8.5
P-117	25.6	21.8	16	11.2	9.5	8.6	8.5	8.5	8.5
A-30	25.6	21.8	15.8	11	9.7	9	8.5	8.5	8.5
MVO 3001	25.6	21.5	16.8	12.0	10.4	9.0	8.6	8.6	8.5



Фиг. 1. Динамика на алкохолна ферментация на опитни вина от сорта Регент
Fig. 1. Dynamics of the alcoholic fermentation of experimental wines from the Regent variety

Във всички вина, засяти с бактерии Vinflora CH16- *Oenococcus oeni* ябълчената киселина беше разградена за около 19 дена, единствено при щамове Р-2 и Р-17 процесът не протече. Вариантите бяха засяти повторно с друг препарат млечнокисели бактерии Lalvin–VP 41 *Oenococcus oeni*, но ЯМКФ отново не протече в рамките на 20 дни. Това дава основание да се твърди ,че щамове Р-2 и Р-17 са силни антагонисти спрямо млечнокиселите бактерии. Тези щамове дрожди могат да бъдат използвани за производство на вина за бърза реализация, в които не се провежда ЯМКФ.

В Таблица 2 са представени резултатите от физикохимичния анализ на опитните вина от сорта Регент.

In all wines inoculated with *Vinflora CH16- Oenococcus oeni* bacteria, the malic acid was degraded for around 19 days; the process failed to occur with strains P-2 and P-17 only. The samples were reinoculated with another Lalvin–VP 41 *Oenococcus oeni* lactic bacteria preparation but still the malolactic fermentation did not occur within 20 days. Hence it could be assumed that strains P-2 and P-17 were powerful antagonists of lactic acid bacteria. These yeast strains could be used for the production of quick selling wines in which no malolactic fermentation occurs.

Table 2 presents the results of the physicochemical analysis of the experimental wines of the Regent variety.

Таблица 2. Физикохимичен състав на опитните вина от сорта Регент, р. 2015
Table 2. Physicochemical composition of the experimental wines from the Regent variety, 2015 vintage

№	Strain	Reducing sugars (g/dm^3)	Alcohol (% vol.)	Titratable acids (g/ dm^3)	Volatile acids (g/ dm^3)	Sugar-free extract (g/ dm^3)	pH
1	P-2	2.14	13.90	6.77	0.42	25.56	3.86
2	P-17	2.08	13.80	6.13	0.30	23.52	3.87
3	P-55	1.54	14.60	4.77	0.45	24.06	3.97
4	P-60	1.54	14.30	4.35	0.57	23.46	4.25
5	P-85	1.48	14.20	4.56	0.56	18.61	4.11
6	P-88	1.68	14.85	5.05	0.72	21.32	3.98
7	P-111	1.68	14.85	4.64	0.67	22.02	3.95
8	P-113	1.42	14.19	4.36	0.52	20.28	4.19
9	P-114	1.14	14.40	4.55	0.52	21.26	4.12
10	P-117	1.42	14.40	4.47	0.56	22.78	4.19
11	MVO 3001	1.94	14.85	4.72	0.48	21.66	4.01
12	A-30	2.66	13.90	5.09	0.52	23.64	4.09

Стойностите на редуциращите захари при всички варианти са в граници на сухи вина – под 3 g/dm^3. Това показва, че всички проучвани щамове довеждат алкохолната ферментация до край. Най-високо съдържание на редуциращи захари имаме при контролния щам А-30 , а най-ниско при щам Р-114. Отчита се висока алкохологенност на опитните щамове. Стойностите на етанола варират от 13,8 % об. при щам Р-17 до 14, 85 % об. при щамове Р-88, Р-111 и MVO. Титруемите киселини са в нормални граници, единствено при щамове Р-2 и Р-17 те са по-високи, което се дължи на непротеклата при тях малолактична ферментация.

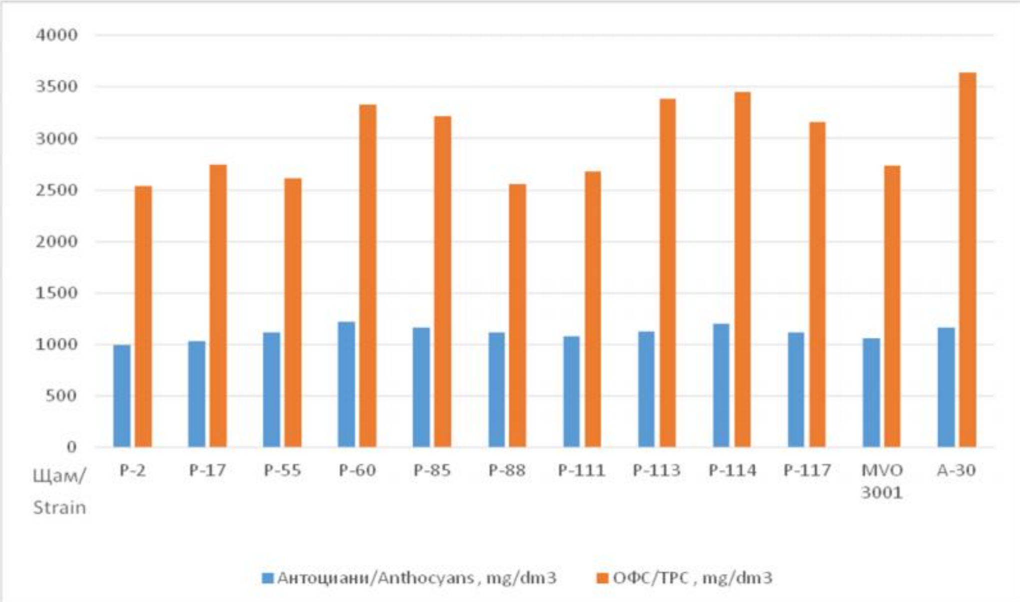
Летливите киселини в отделните варианти варират в сравнително тесни граници и остават в нормални за полупромишлени вина стойности. Най-високи са при щам Р-88 – 0,72 g/dm^3 , а най-ниски при щам Р-17 – 0,3 g/dm^3. Стойностите на рН са високи, варират от 3,86 при щам Р-2 до 4,25 при щам Р-60, но са типични за сорта Регент.

Съдържанието на общи фенолни съединения (ОФС) и антоциани е представено на Фигура 2, а интензитетът и нюансът на оцветяване са представени съответно на Фигура 3 и Фигура 4.

The reducing sugar values in all samples were within dry matter range of below 3 g/dm^3. This showed that all strains studied brought the alcoholic fermentation to an end. The highest reducing sugar content was observed with control strain A-30, and the lowest with strain P-114. High alcohol generation capacity was reported with the experimental strains. The ethanol values ranged from 13.8 % vol. in strain P-17 to 14, 85 % vol. in strains P-88, P-111 and MVO. The titratable acids were within normal ranges, being higher with strains P-2 and P-17 only, which was due to the non-occurrence of the malolactic fermentation.

The volatile acids in the individual samples varied within relatively narrow ranges and had values normal for semi-industrial wines. The highest values were observed in strain P-88: 0.72 g/dm^3, and the lowest for strain P-17: 0.3 g/dm^3. The pH values were high, varying between 3.86 for strain P-2 and 4.25 for strain P-60, but were still typical of the Regent variety.

The total phenolic content (TPC) and the anthocyan content have been presented in Figure 2, and the intensity and nuance in Figure 3 and Figure 4 respectively.



Фиг. 2. Антоциани и ОФС в опитни вина
Fig. 2. Anthocyans and TPC in experimental wines

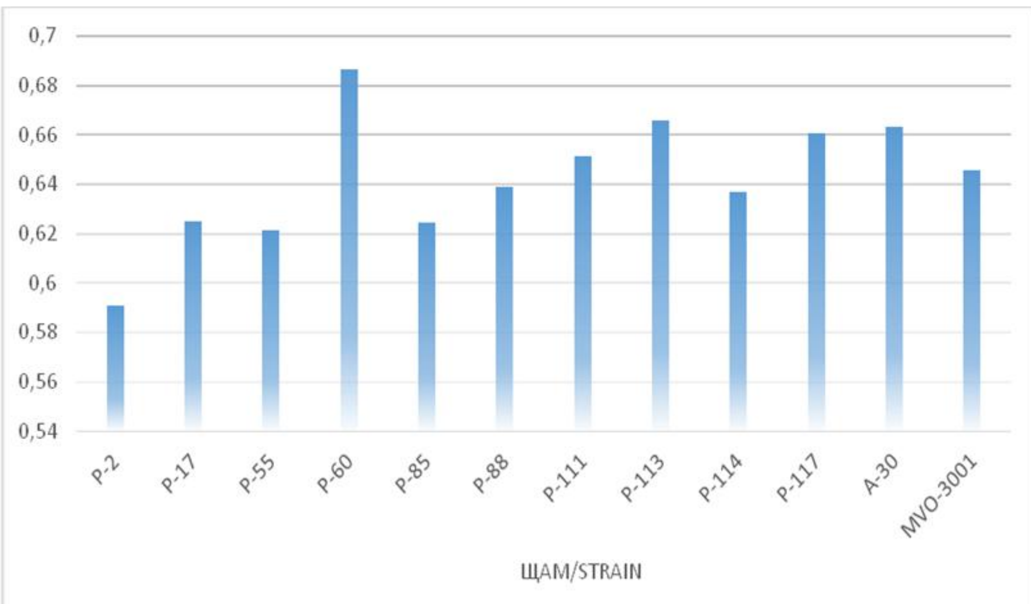
ОФС варират в граници от 2536 mg/dm^3 при щам Р-2 до 3636 mg/dm^3 при контролния щам А-30. Стойностите съответстват на плътни, с натоварена структура вина, като разликите отдаваме както на различното въздействие на отделните щамове върху фенолния комплекс, така и на слаби колебания във фенолната запасеност на суровината. Много високи са стойностите на антоцианите в опитните вина - от 1223 mg/dm^3 при щам Р-2 до 1510 mg/dm^3 при щам А-30. Това представлява между 40 и 50 % от количеството на ОФС. Тази специфика на висок дял на антоциани от ОФС е сортова специфика за сорта Регент и е свързана с много яркия и искрящ червен цвят на вината. Стойностите на цветния интензитет са в нормални за млади червени вина стойности и варират между 15,64 абс. ед. при Р-88 до 19,86 абс.ед. при Р-2. Стойностите на нюанса Т варират между 0,59 при щам Р-2 и 0,68 при щам Р-60, което е в рамките на нормалното за млади

TPC ranged between 2536 mg/dm^3 for strain P-2 and 3636 mg/dm^3 for control strain A-30. The values corresponded to wines with a full, strong body, and the differences could be attributed to the different effect of individual strains on the phenolic complex as well as to slight fluctuations in the phenolic supply of the raw material. The anthocyan values in the experimental wines were very high: from 1223 mg/dm^3 for strain P-2 to 1510 mg/dm^3 for strain A-30. This made up between 40 and 50 % of the TPC amount. The specific high share of anthocyans in the TPC is typical of the Regent variety and is related to the very bright and glistening red colour of the wines. The colour intensity values were within a range normal for young red wines and varied between 15.64 a.u. for P-88 to 19.86 for P-2.

The T-nuance values ranged between 0.59 for strain P-2 and 0.68 for strain P-60, which was normal for young red червени вина. По-ниските стойности съответстват на синкаво-червен цвят, а при по-високите цвета е ярко рубинен.

wines. The lower values corresponded to bluish-red colour, and the higher values to bright ruby.

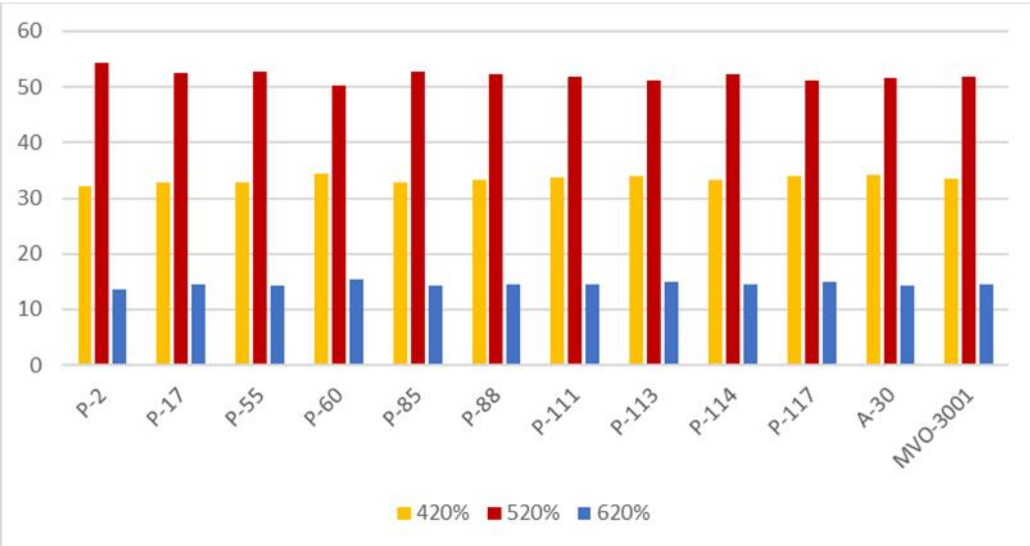
Фиг. 3. Интензитет на цвета в опитни вина
Fig. 3. Colour intensity in experimental wines



Фиг. 4. Нюанс на цвета в опитни вина
Fig. 4. Colour nuance in experimental wines

Процентните участия на жълтия /$\%_{420}$/, червения /$\%_{520}$/ и синия /$\%_{620}$/ цветове (Фигура 5) в общия цвят на вината варират сравнително слабо и остават в нормални за млади , неокислени червени вина граници. Стойностите на $\%_{420}$ се изменят между 32 и 34 %, на $\%_{520}$ – 50 и 54 %, а на $\%_{620}$ между 13 и 15 %. Синята съставка на всички вина е малко по-висока от нормалното, което вероятно е сортова специфика и се дължи на по-високите стойности на pH.

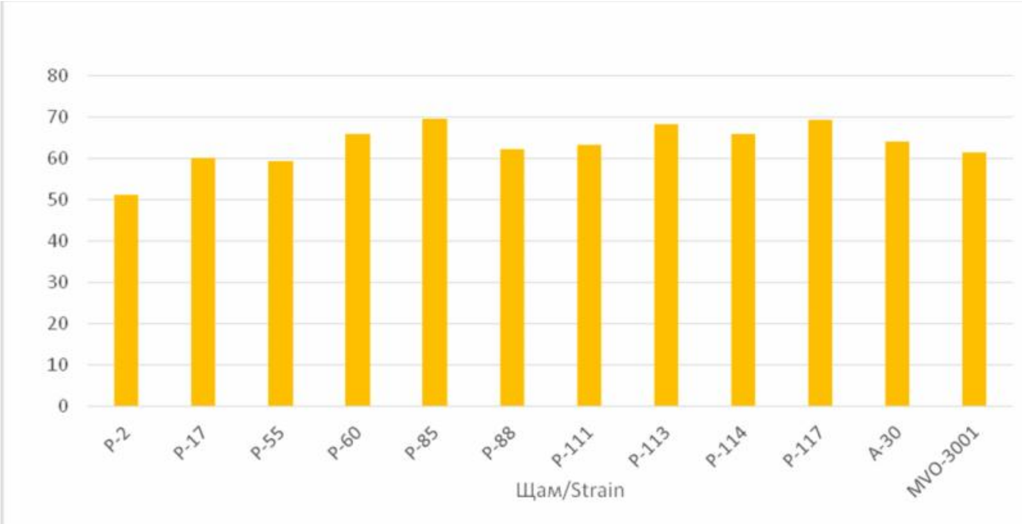
The percentages of the yellow /$\%_{420}$/, red /$\%_{520}$/ and blue /$\%_{620}$/ colours (Figure 5) in the overall wine colour varied slightly and remained within the range normal for young unoxidised red wines. The values of $\%_{420}$ changed between 32 and 34 %, of $\%_{520}$ between 50 and 54 %, and of $\%_{620}$ between 13 and 15 %. The blue component of all wines was a litttle higher than normal, which was probably some varietal specificity due to the higher pH values.



Фиг. 5. Процентни участия на отделните цветове в общия цвят на опитни вина
Fig. 5. Percentages of individual colours in the overall colour of experimental wines

На Фигура 6 са представени стойностите на показателя dA%, изразяващ процентното участие на флавилиевите форми на антоцианите в общия цвят на виното и отговорен за живостта на червения му цвят. Показателя варира от 51,05 % при щам P-2 до 69,52 % при щам P-85. Високите му стойности характеризират цвета на всички опитни вина като искрящ и жив.

Figure 6 presents the values of the dA% index expressing the percentage of the flavylium anthocyan forms in the overall wine colour and imparting the liveliness of its red colour. The index varied from 51.05 % for strain P-2 to 69.52 % for strain P-85. Its high values characterised the colour of all experimental wines as glistening and lively.



Фиг. 6. Стойности на показателя dA% на опитни вина
Fig. 6. Values of the dA% index of experimental wines

Определящ критерий при селекцията на дрождени щамове за производство на регионални вина със специфичен характер е сензорният профил на опитните вина. Според сензорния си профил, опитните вината са разпределени в три групи, като на Фигура 7 е представена спайдър-диаграмата на най-високо оценената група.

Към първата група са отнесени щамове Р-2, Р-17, Р-111и контролния MVO. Произведените вина носят характеристиките на сорта Регент, но се изявяват малко дразнещи първични нотки. При контролната проба MVO и щам Р-111 получаваме къси вина със слаб аромат, леко суховати, което променя характера на сорта Регент.

Към втората група са отнесени щамове Р-55, Р-60, Р-88 и Р-117. Щам Р-60 придава на виното растително – плодов аромат , облагороден, но жив и игрив вкус. Виното е добре балансирано ,но късовато и с неубедителен послевкус. При щам Р-55 се получава добре структурирано вино, меко и хармонично ,с мек и заоблен послевкус, но със слаб аромат. Вината , получени с щам Р-117 притежават по-строг аромат на черен, горчив горски плод, с елементи на

The decisive criterion in the selection of yeast strains for the production of regional wines with a specific character was the sensory profile of experimental wines. According to their sensory profile, the experimental wines were divided into three groups. Figure 7 presents the spider diagram of the top-rated group.

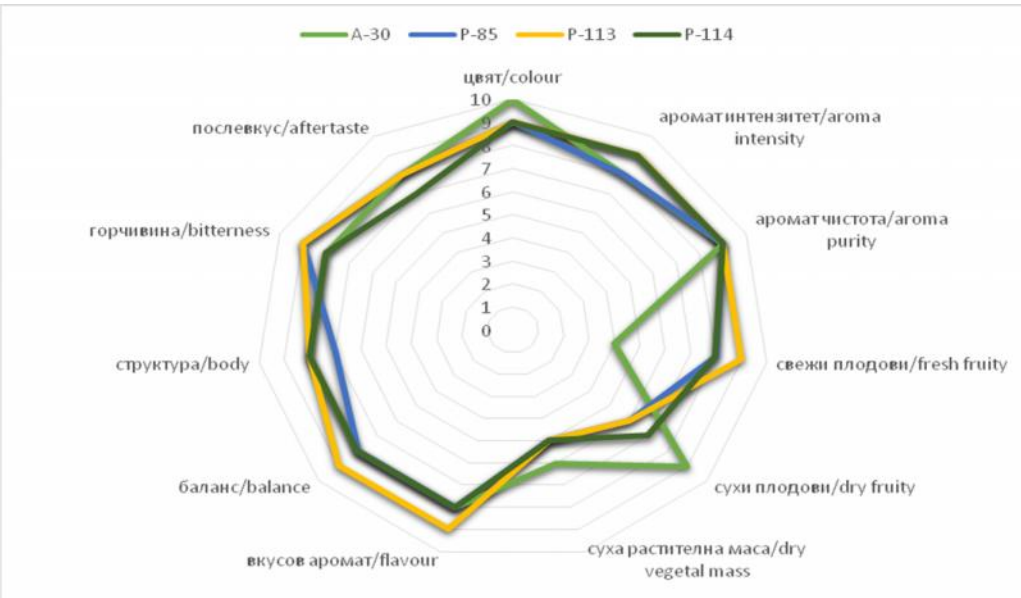
The first group included strains P-2, P-17, P-111 and the control MVO. The wines made demonstrated the characteristics of the Regent variety but some disagreeable primary notes were felt. With control sample MVO and strain P-111, the wines obtained were short, with weak aroma, and a little dry, which changed the character of the Regent variety.

The second group included strains P-55, P-60, P-88 and P-117. Strain P-60 imparted vegetal-fruity aroma to the wine, and a refined but lively and playful taste. The wine was well-balanced but somewhat short, with unconvincing aftertaste. With strain P-55, a well-structured wine was obtained, soft and harmonious, with mild and rounded aftertaste but weak aroma. The wines made with the P-117 strain had a more austere aroma of a bitter black forest fruit, растителност и суха маса. Вкусово виното е заоблено, с балансирана киселинност и потенциален финал. Пробата, получена с щам Р-88 е добре структурирана и балансирана, но с подчертана и дразнеща сладост и безличен послевкус.

В най-високо оценената група опитни вина са включени Р-85, Р-113, Р-114 и контролния щам А-30 (Фигура 7). И четирите щама придават на виното наситен червен цвят, отлична плътна, но мека структура. Щам А-30 променя сортовостта на сорта Регент, като леко го унифицира. Свежите плодови нотки почти не се усещат. При щам Р-113 имаме комплексен, хармоничен аромат на черен зрял горски плод, растителна нотка, касис. Вкусово отлично структурирано вино, с известна суховатост във финала. Пробата, получена с щам Р-114, се доближава до тази на щам Р-113, ароматът и също подчертава сортовостта, съчетана със суха маса, по-малко плодови нюанси. Вкусово виното притежава балансирана киселинност и лека агресия във финала.

with elements of vegetality and dry mass. The wine had a rounded taste, balanced acidity and potential finish. The sample obtained with the P-88 strain was well structured and balanced but exhibited a marked and annoying sweetness and bland aftertaste.

The most highly rated group of experimental wines included P-85, P-113, P-114 and control strain A-30 (Figure 7). All four strains imparted an intense red colour and an excellent full but soft body to the wine. Strain A-30 changed the varietal character of the Regent variety, slightly levelling it. The crisp fruity notes were hardly felt. With strain P-113, there was a complex harmonious aroma of a ripe black forest fruit, a vegetal note, and blackcurrant. The wine had an excellently structured taste, with some dryness in the finish. The sample obtained using the P-114 strain was similar to that made with the P-113 strain; its aroma also emphasised the varietal character in combination with dry mass and fewer fruity notes. With regard to taste, the wine had balanced acidity and slight aggression in the finish.



Фиг. 7. Сензорен профил на опитни вина – трета група
Fig. 7. Sensory profile of experimental wines: third group

ИЗВОДИ

При условията на провеждения от нас експеримент, могат да се направят следните обобщени изводи:

1. Всички проучвани щамове дрожди са типични винени дрожди от вида Saccharomyces cerevisiae, което дава основание да се предполага, че те ще провеждат интензивна, сигурна и протичаща докрай алкохолна ферментация.
2. Всички проучвани щамове провеждат интензивна алкохолна ферментация, завършват я докрай, получаваните варианти са с нормален за млади червени вина състав.
3. Щам P-2 и P-17 са силни антагонисти спрямо млечно-киселите бактерии и в получаваните с тях вина ЯМКФ не протича.
4. Установено е, че щамове P-60, P-114 и P-85 атакуват най-малко багрилната материя и вината, получени с тях имат най-наситен и ярък червен цвят.
5. При условията на провеждения от нас експеримент най-високо оценен е органолептичния профил на опитните вина, получени с щам P-113 , следвани от P-114.Те могат да се препоръчат за приложение за производство на червени вина от сорта Регент от района на Найден Герово.

CONCLUSIONS

Under the conditions of the experiment conducted, the following generalised conclusions could be drawn:

1. All yeast strains studied were typical wine yeasts of the *Saccharomyces cerevisiae* species, therefore it could be assumed that they would carry out intensive, secure and complete alcoholic fermentation.
2. All strains studied carried out intensive alcoholic fermentation, brought it to the end, and the composition of the wines obtained was normal for young red wines.
3. Strains P-2 and P-17 were powerful antagonists of lactic acid bacteria and no malolactic fermentation occurred in the samples obtained using them.
4. It was established that strains P-60, P-114 and P-85 attacked the colouring matter least, and the wines obtained when they were used had the most intense and bright red colour.
5. Under the conditions of the experiment conducted, the top-rated organoleptic profile was that of the experimental wines obtained using strain P-113, followed by P-114. They could be recommended for use in the production of red wines of the Regent variety from the Naiden Gerovo region.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Bambalov, G., H. Spasov, O. Zvetanov and K. Bambalov**, 1996. New strains of yeast for the production of red wines, *Lozarstvo i vinarstvo*, 5, 22-26 (Bg).
2. **Callejon, Clavijo, Ortigueira et al.**, 2010. “Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthous and commercial S. cerevisiae strains”, *Analitica chimica acta,* 660, 68-75.
3. **Chobanov, Y., G. Bambalov, H. Spasov, V. David, M. Giyu-Benatie and E. Aleksander**, 2008. Selection of wine yeast and determination of clonal diversity. *Lozarstvo i vinarstvo*, 1, 24-32 (Bg).
4. **Csoma, Zakany and Romano Sipiczk**i, 2010. “Biological diversity od Saccharomyces yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis”, *I.J.F.M.,* 140, 239-248.
5. **Efstratios, Nikolau et al.**, 2006. “Selection of indigenous S. cerevisiae strains according to their oenological characteristics and vinification results”, *Food microbiology,* 23, 205-211.

6. **Helmut, Cönig, Gottfried Unden and Jürgen Frohlich**, 2009. “Biology of microorganisms on grape, in must and in wine”, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*
7. **Ilieva, F., S. Kostadinovic Velickovska, V. Dimovska, H. Mithosseini and H. Spasov**, 2016. Selection of 80 newly isolated autochthous yeast strains from the Tikves region of Makedonia and their impact the quality of red wines produced from Vranec and Cabernet Sauvignon grape varieties*, Food Chemistry,* 216, 309-315.
8. **Ivanov, Tr., St. Gerov, A. Yankov, G. Bambalov, T.Tonchev, D Natchkov and M. Marinov**, 1985. Practicum on Wine Technology. Izdatelstvo “Hristo G. Danov”, Plovdiv (Bg).
9. **Martini, A. and Vaughan-Martini**, 1990. Grape must fermentation: past and present. In: J.F.T. Spencer, D.M., *Yeast technology. Springer, Berlin*, 105-123.
10. **Monagas, M., C. Gomez-Cordoves and B. Bartolome**, 2007. Evaluation of different S. cerevisiae strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyroantocyanin and non-antocyanin phenolic content and colour characteristics of wines. *Food chemistry,* 104, 814-823.
11. **Prodanova, N.**, 2008. Tasting or how to get to know the wine. *“Ikonomedia”,* Sofia, 115-118 (Bg).
12. **Regordon, M., Perez-Nevado and R. Fernandez**, 2006. Influence of S. cerevisiae yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme and microbial Technology,* 40, 151-157.
13. **Rodina, T.**, 2004. Sensory analysis of food products, Moskow,3.1.2 (Ru).
14. **Spasov, H., D. Hristev, N. Blagoeva, N. Stoyanov, P. Mitev, Y. Chobanov and P. Stefanova**, 2012. Comparative study of newly isolated yeast strains from different regions of Bulgaria, Scientific Conference with International Participation "Nutrition Science, Techniques and Technologies 2012", Scientific Works of UFT, 19-20 October, Plovdiv, vol. LIX, 397-402 (Bg).
15. **Spasov, H., F. Ilieva, E. Gargova, H N. Blagoeva, N. Stoyanov, P. Mitev and Y. Chobanov,** 2012. Study of newly isolated yeast strains for the production of wines from Demir Kapia region, Macedonia, Scientific Conference with International Participation "Nutrition Science, Techniques and Technologies 2012", Scientific Works of UFT, 19-20 October, Plovdiv, vol. LIX, 403-408 (Bg).
16. **Spasov, H., I. Simeonov, N. Stoyanov, N. Blagoeva, P. Mitev and Y. Chobanov**, 2012. Organoleptic profile of wines from branches of the Dimyat variety, Jubilee scientific conference with international participation "Scientific achievements - contribution to efficient viticulture and wine production", 4-5.09.2012, Pleven, 244-249(Bg).
17. **Yoncheva, T.**, 2010. Selection of yeast strains for the production of red wines of different varieties of grapes, Dissertation assignment for awarding of PhD, UFT – Plovdiv (Bg).
18. **Yoncheva, T., H. Spasov and Zh. Popova**, 2005. Exploring the influence of the yeast strain on the quality of wine obtained from the Pinot Noir variety, *Hranitelna promishlenost,* 10, 10-12 (Bg).
19. **Yoncheva, T., Zh. Popova, H. Spasov, A. Koleva and S. Michailova-Mikova**, 2007. Study of β-glycosidic activity of wine yeast and influence on the color of red wine, Scientific conference with international participation "Sustainable development of viticulture and wine-based knowledge". Institute of Viticulture and Wine Production, Pleven, 29-30.08.2007 Collection of reports, 272-278 (Bg).

Journal of Mountain Agriculture on the Balkans, 2017, 20 (4), 122-136 ISSN 1311-0489 (Print)
Research Institute of Mountain Stockbreeding and Agriculture, Troyan ISSN 2367-8364 (Online)

Изследване влиянието на дефлегмацията и скоростта на периодична дестилация върху дестилатните криви на някои летливи примеси

Мирослав Гинев, Панко Митев, Николай Стоянов,
Силвия Тагарева, Кристина Мичева

Университет по хранителни технологии, Пловдив, България
E-mail: pankratbg@gmail.com

Influence of the reflux and the speed of the batch distillation on distillate curves of some volatile components

Miroslav Ginev, Panko Mitev, Nikolay Stoyanov,
Sylvia Tagareva, Kristina Micheva

University of Food Technologies, Plovdiv, Bulgaria

РЕЗЮМЕ

Съдържанието на летливи примеси (естери, висши алкохоли, алдехиди и мастни киселини) в дестилатните напитки е определящо за техните органолептични свойства и физико-химична стабилност. Концентрацията им в напитките зависи освен от изходното им съдържание в дестилирания продукт, но и от условията и режима на дестилация, които са обект на изследване в настоящата работа. Установено е поведението на група летливи примеси (естери, алдехиди и висши алкохоли) при двукратната дестилация (обезалкохоляваща и фракционна) както и при еднократна фракционна дестилация. Проследено е влиянието на скоростта на дестилация, както и вида на дефлегмацията (еднократна и трикратна) върху поведението на тази група летливи примеси.

Ключови думи: периодична дестилация, дефлефмация, летливи примеси, скорост на дестилация

SUMMARY

The content of volatile impurities (esters, higher alcohols, aldehydes and volatile fatty acids) in the distillated drinks is essential for their organoleptic properties and also physical and chemical stability. The concentration of these volatile compounds in the beverages depends apart from their content in the distilled product, but also from the conditions of batch distillation which are subject of study in this work. The behavior of some volatile compounds (esters, aldehydes and higher alcohols) during batch and double batch distillation is established.

The influence of the distillation speed and type of reflux (single or triple) on the rate of distillation on mentioned groups volatile compounds also is studied.

Key words: batch distillation, reflux ratio, volatile compounds, distillation speed

УВОД

Летливите компоненти играят важна роля в състава на напитките. Поголямата чат от вкусовите компоненти са образувани от дрождите при ферментацията (Nykanen, 1986), докато друга част се образуват по време на дестилацията.

Дестилацията е процес, при който се разделя смес от два или повече течни компоненти чрез загряване до кипене, като се използва разликата в летливостта им (Marinov, 2005). При дестилация на реални алкохолсъдържащи течни смеси – на дестилация се подлагат многокомпонентни системи – виноматериали и други ферментирали течности и каши. В хода на дестилацията на тези течни смеси, заедно с етанола и водата се дестилират и представителите на основните групи летливи примеси – естери, алдехиди, висши алкохоли, летливи мастни киселини (Fundira et al., 2002). Те преминават в дестилатите за високоалкохолни напитки в количества, зависещи от концентрациите им в реалните течни смеси, от концентрациите на етанол, от температурата им на кипене и от коефициентите им на изпарение. Дестилирането на виноматериалите е процес, при който протичат сложни процеси с компонентите на виноматериала. Продължителното загряване на виноматериалите в хода на дестилация създава благоприятни условия за протичане на процеси, в резултата на които се образуват нови вещества. В тези процеси участват както летливите, така и нелетливите съединения на виноматериалите (въглехидрати, азотни и фенолни вещества, нелетливи киселини). В резултат на тези реакции във виноматериалите нарастват количествата на някои летливи компоненти за сметка на новообразувани вещества , понижава се съдържанието на други в резултат на химични преобразувания и се образуват нови вещества, несъдържащи се

INTRODUCTION

Volatile compounds have an important role in the composition of beverages. Most of the palate compounds are produced during alcoholic fermentation (Nykanen, 1986), while others during distillation.

The distillation is process, where mixture from two or more liquid components is separated by heating to boiling, using the difference in their volatility (Marinov, 2005). Realizing distillation of real alcohol containing liquid mixtures, we distill multi-component systems – wine materials and other fermented liquids and pomace. During the process of distillation of this liquid mixtures, together with the ethanol and water are distilled the representatives of the main group of volatile compounds – esters, aldehydes, higher alcohols, volatile fatty acids (Fundira et al., 2002). These compounds passes in the distillates of highly alcoholic beverages in amounts depending of their concentration in real liquid mixtures, the concentration of ethanol, the temperature of boiling of the compounds and their coefficient of evaporation. The distillation of wine materials is operation, where occur complex processes with its compounds. The continuous heating of the wine materials during distillation creates favorable conditions for occurring processes, which contribute for forming of new substances. In these processes take part the volatile and nonvolatile compounds of the wine materials (carbohydrates, nitrogen and phenolic compounds, nonvolatile acids). As a result of these reactions in the wine materials, it can be observed, that because of the chemical transformation some of the volatile compounds increase, others decrease and there are also new occurred compounds that do not contain in the initial wine materials.

в изходните виноматериали. За да се повиши степента на разделяне, понякога простата дестилация се провежда при допълнително обогатяване на дестилата чрез дефлегмация. За целта непосредствено над дестилационния резервоар се поставя охладител (дефлегматор), в който се поддържа определена температура, по-ниска от тази на кипене на висококипящия компонент. Преминавайки през него парната смес частично се втечнява (предимно по-малко летливия компонент) и кондензата се връща като флегма обратно в резервоара. В резултат на това преминалите пари, без да се втечнят, остават с по-високо съдържание на летлив компонент.

Съдържанието на летливи примеси (естери, висши алкохоли, алдехиди и мастни киселини) в дестилатните напитки е определящо за техните органолептични свойства и физико-химична стабилност. Концентрацията им в напитките зависи освен от изходното им съдържания в дестилирания продукт, но и от условията и режима на дестилация, които са обект на изследване в настоящата работа.

Целта на изследването е да се установи влиянието на условията и режима на периодична дестилация върху съдържанието на някои летливи примеси в дестилатните напитки.

За постигане на поставената цел ще бъдат решени следните задачи:

- Да се установи влиянието на видът на дестилация (еднократна и двукратна) върху поведението на група летливи примеси.

- Да се установи влиянието на скоростта на дестилация върху поведението на група летливи примеси.

- Да се установи влиянието на дефлегмацията (еднократна и трикратна) върху поведението на група летливи примеси.

To increase the degree of separation, sometimes the simple distillation is conducted by additional enrichment of the distillate via reflux. For this purpose immediately above the distillation vessel is put cooler (reflux condenser), where the temperature is constant and lower than the boiling temperature of the high boiling component. Going through the reflux column, the vaporous mixture is partially condensed (mainly the low volatile component) and the condensate goes back in the distillation vessel as a reflux. As a result of this the vapor, that passes through the reflux column, without condensing, is richer of high volatile component.

The content of volatile compounds (esters, higher alcohols, aldehydes and fatty acids) in the distilled beverages is determinative for their organoleptic features and physic-chemical stability. The concentration of the volatile compounds in the beverages is function not only of their quantity in the initial wine material but also of the conditions and regime of distillation and that is object of our research in the current work.

The purpose of the examination is to determine the influence of the conditions and regime of batch distillation over the content of some volatile compounds in distilled beverages.

To achieve the defined goal, it will be solved the following tasks:

- To determine the influence of the type of distillation (single and double) over the behavior of group of volatile compounds.

- To determine the influence of the speed of distillation over the behavior of group of volatile compounds.

- To determine the influence of the reflux (single and triple) over the behavior of group of volatile compounds.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1.Материали

За всички експерименти е използван виноматериал с алкохолно съдържание 12,8 об. %, получен при ферментация на мъст от сорта Мускат отонел.

2. Методи за анализ:

2.1. Определяне концентрацията на етанол, об. %

- за всяка фракция дестилат, както и за виноматериала, алкохолното съдържание е определяно, пикнометрично измерване относителната плътност на дестилата (стр. 6÷7, Stoyanov, 2012)

2.2. Определяне съдържанието на летливи примеси, mg/dm^3

- Концентрация на естери – чрез неутрализиране с NaOH (стр.17, Stoyanov, 2012)

- Концентрация на алдехиди – бисулфитен метод (стр. 21÷22, Stoyanov, 2012)

- Концентрация на висши алкохоли – модифициран метод на Комаровски-Феленберг (стр. 11÷12, Stoyanov, 2012)

3. Схема на опитите

Експерименталната работа е проведена при лабораторни условия в катедра „Технология на виното и пивото" към УХТ - Пловдив. Използваната опитна установка е реализирана в три варианта. При първия вариант, показан на Фигура 1, основните елементи на инсталацията са дестилационен резервоар (поз.1), електрически нагревател (поз.2), охладител (поз.3), барета (поз.4) и въздушен дефлегматор (поз.5). При вторият вариант на инсталацията (Фигура 2) вместо въздушен дефлегматор се използват три водни дефлегматора (поз.6), докато при третият вариант (Фигура 3) се използва само един воден дефлегматор.

MATERIAL AND METHODS

1. Materials

For all of the experiments is used wine material with alcohol content 12,8 vol.%, received at fermentation of Muscat Otonel must.

2. Methods of analyses

2.1. Measurement of ethanol level, vol.%

- for the wine material and for each fraction of distillate, the alcohol level is determined, picnometric measurement of relative density of the distillate (page 6-7, Stoyanov, 2012)

2.2. Determination of concentration of volatile compounds, mg/dm^3

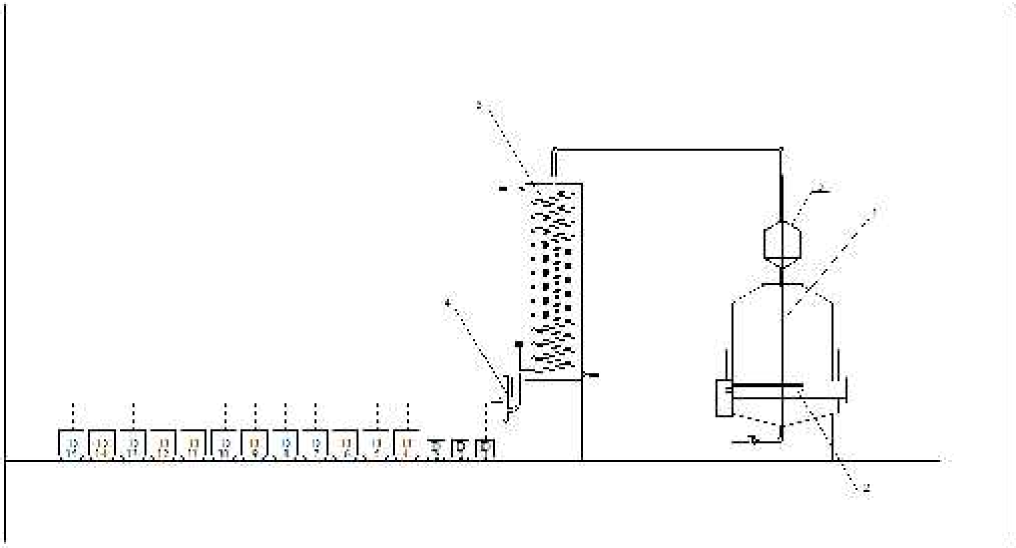
- Concentration of esters – by neutralization with NAOH (page 17, Stoyanov, 2012)

- Concentration of aldehydes – bisulfite method (page 21-22, Stoyanov, 2012)

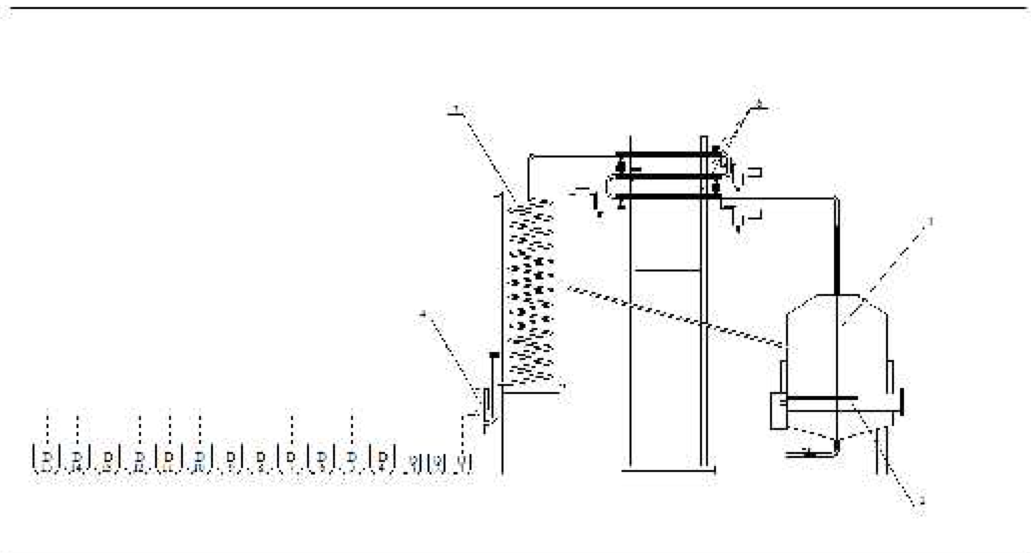
- Concentration of higher alcohols – modified method of Komarovski - Felenberg (page 11-12, Stoyanov, 2012)

3. Scheme of the experiments

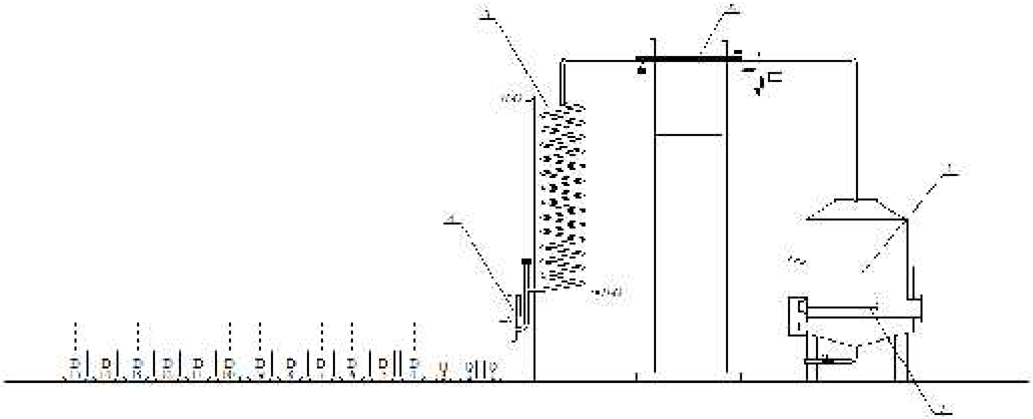
The experimental work is held in laboratory condition in department '' Technology of wine and beer" UFT – Plovdiv. The equipment for the trials is realized in three options. The first option is shown on Figure 1 and the main elements of the installation are distillation vessel (pos.1), electric heater (pos.2), cooler (pos.3), barrett (pos.4) and air reflux condenser (pos.5). In the second option of the installation (Figure 2) instead of air reflux condenser are used three water reflux condensers (pos.6) and in the third option (Figure 3) is used only one water reflux condenser.



Фиг. 1. Периодична дестилационна система с въздушен дефлегматор (1-дестилационен апарат; 2-електрически нагревател; 3-охладител; 4-барета; 5- въздушен дефлегматор)
Fig. 1. Batch distillation installation with air reflux condenser (1- distillation vessel; 2-electric heater; 3-cooler; 4-barrett; 5- air reflux condenser)



Фиг. 2. Периодична дестилационна система с три водни дефлегматора (1-дестилационен апарат; 2-електрически нагревател; 3-охладител; 4-барета; 6- водни дефлегматори)
Fig. 2. Batch distillation installation with three water reflux condensers (1-distillation vessel; 2-electric heater; 3-cooler; 4-barrett; 6- water reflux condensers)



Фиг. 3. Периодична дестилационна система с един воден дефлегматор (1-дестилационен апарат; 2-електрически нагревател; 3-охладител; 4-барета; 6 воден дефлегматор)
Fig. 3. Batch distillation installation with one water reflux condenser (1-distillation vessel; 2-electric heater; 3-cooler; 4-barrett; 6- water reflux condenser)

В лабораторни условия са проведени 5 броя дестилации на виноматериал от сорта грозде Мускат с алкохолно съдържание 12,8 % об. Виноматериалът е получен след настойване и алкохолна ферментация на отделената мъст. Обемът на виноматериала, вкаран в системата за дестилация е 10 литра. Събирани са по 15 проби (от D1 до D15) от всяка дестилация, като първите 3 са по 100мл, а останалите събрани проби са по 200мл, които след това биват подлагани на различни анализи: за съдържание на алкохол и летливи примеси.. Вариантите на дестилации са представени в Таблица 1.

In laboratory conditions are realized five distillations of wine material from grape variety ‘’Muscat Otonel’’ with alcohol content 12.8 v/v%. The wine material is received via maceration, draining and alcoholic fermentation of the must. The wine material that is used for each trial is with volume 10l. From each distillation are gathered 15 samples (from D1 to D15), first three samples with volume 100ml and the rest with volume 200ml. These samples are determined for different analyzes: alcohol concentration and volatile compounds. The options of distillation are presented in Table 1.

Таблица 1. Варианти на дестилация
Table 1. Options for distillation

Вариант Option №	Вид дестилация Type of distillation	Мощност на загряване Power of heating	Брой дефлегматори Amount of reflux condensers	Вид дефлегма-тори Type of reflux condensers
1	първа (обезалкохоляваща) first (simple)	3kW	1	въздушен air
2	втора (редестилация) second (redestillation)	3kW	1	въздушен air
3	еднократна one time	3kW	3	водни water
4	еднократна one time	1,5kW	3	водни water
5	еднократна one time	3kW	1	воден water

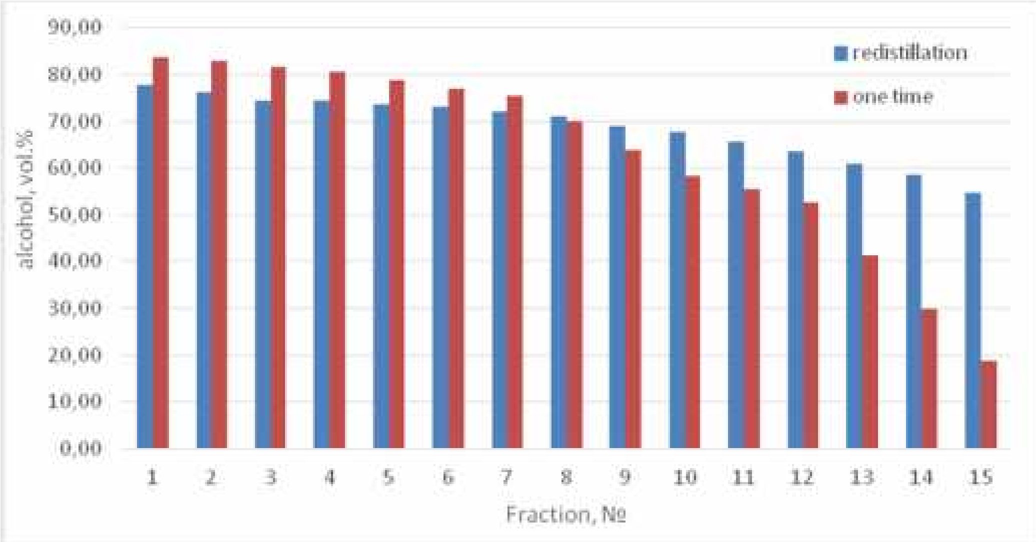
РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

За да се установи влиянието на вида на периодичната дестилация се разглеждат варианти 2 и 4 - двукратна и еднократна дестилация (Таблица 1). При сравнение на резултатите (показани на Фигура 4) се наблюдава, че при еднократната дестилация има малко по-високо концентриране на алкохолното съдържание в първите фракции за сметка на последните. При естерите (Фигура 5) се наблюдава значително по-голямо съдържание при еднократна дестилация, което не кореспондира с убеждението, че при двукратна дестилация ще имаме доста по-голямо естерообразуване. Това най-вероятно се дължи на дефлегмацията при този вариант. При алдехидите (Фигура 6) се наблюдава същата тенденция както при естерите, като положителното е, че те са концентрирани основно в първоточните фракции. При висшите алкохоли (Фигура 7) се наблюдава малко по-високо съдържание при двукратната дестилация.

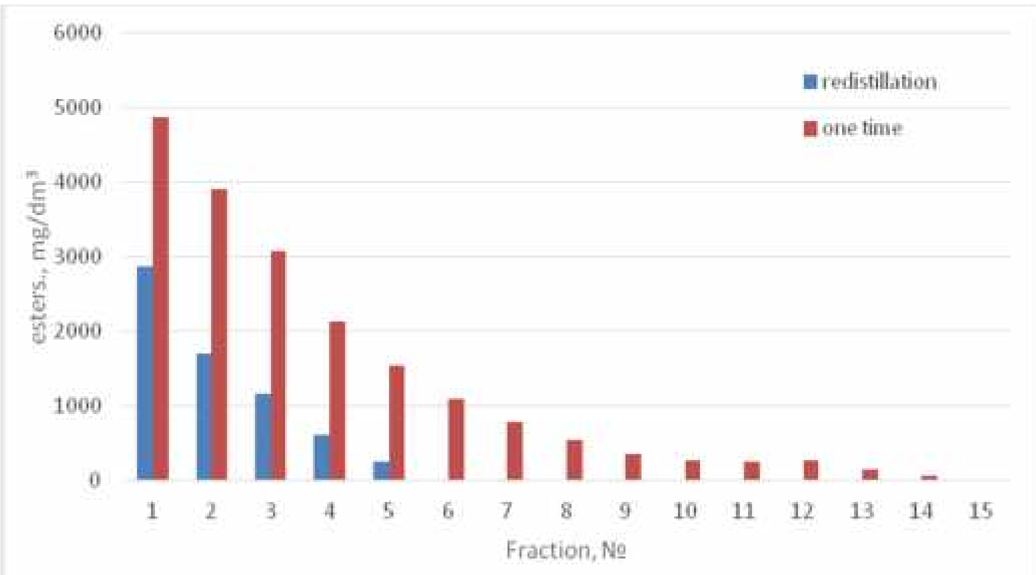
RESULTS AND DISCUSSION

To determine the influence of the type of batch distillation, we observe trial 2 and 4 - double batch and one time batch distillation (Table 1). When comparing the results (shown on Figure 4) it is observed that at one time batch distillation there is a little bit higher concentration of the alcohol content in the first fractions rather than the last fractions. Observing the esters (Figure 5) is concluded that their concentration is much higher at one time batch distillation which is opposite with the belief that at the double batch distillation will occur much higher ester formation.

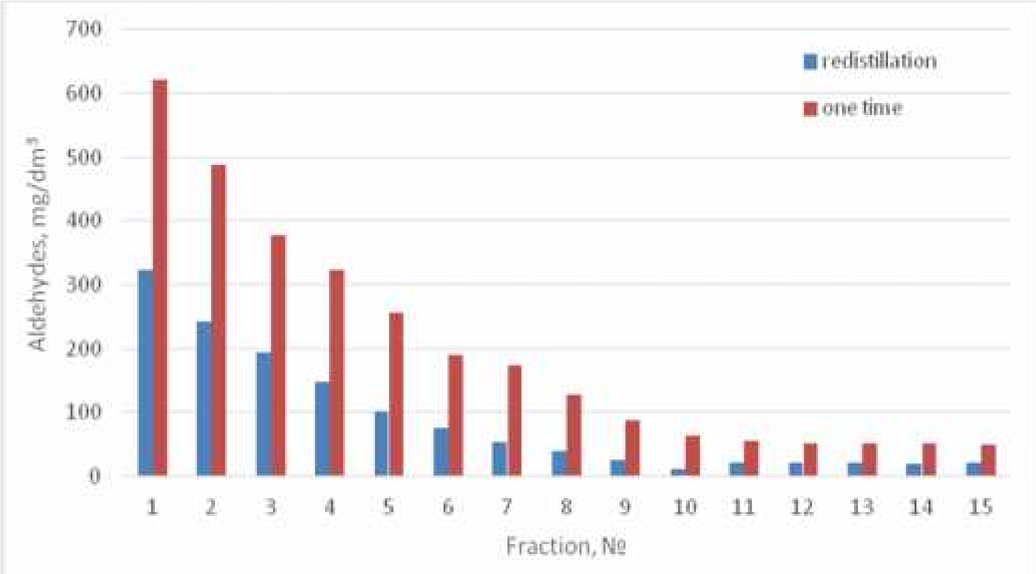
This probably happens because of the reflux at this trial. Observing the aldehydes (Figure 6) we can establish the same tendency as the esters and the positive is that they are concentrated mainly in the first fractions. The higher alcohols (Figure 7) have a little bit higher concentration at double batch distillation.



Фиг. 4. Алкохолно съдържание на фракциите след редестилация и еднократна дестилация
Fig. 4. Alcohol content in the fractions after second distillation and one time distillation

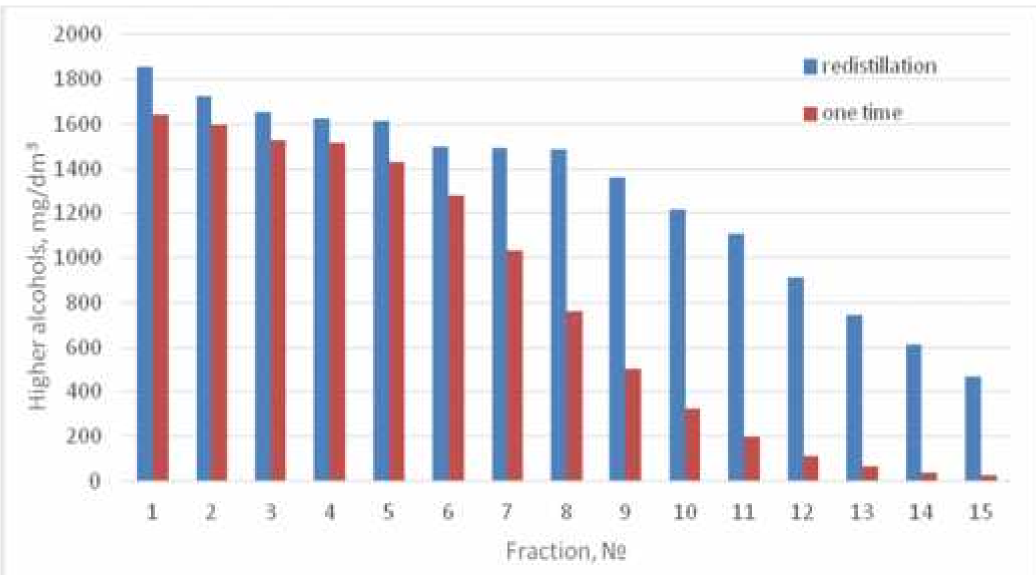


Фиг. 5. Съдържание на естери във фракциите след редестилация и еднократна дестилация
Fig. 5. Content of esters in the fractions after second distillation and one time distillation



Фиг. 6. Съдържание на алдехиди във фракциите след редестилация и еднократна дестилация

Fig. 6. Content of aldehydes in the fractions after second distillation and one time distillation

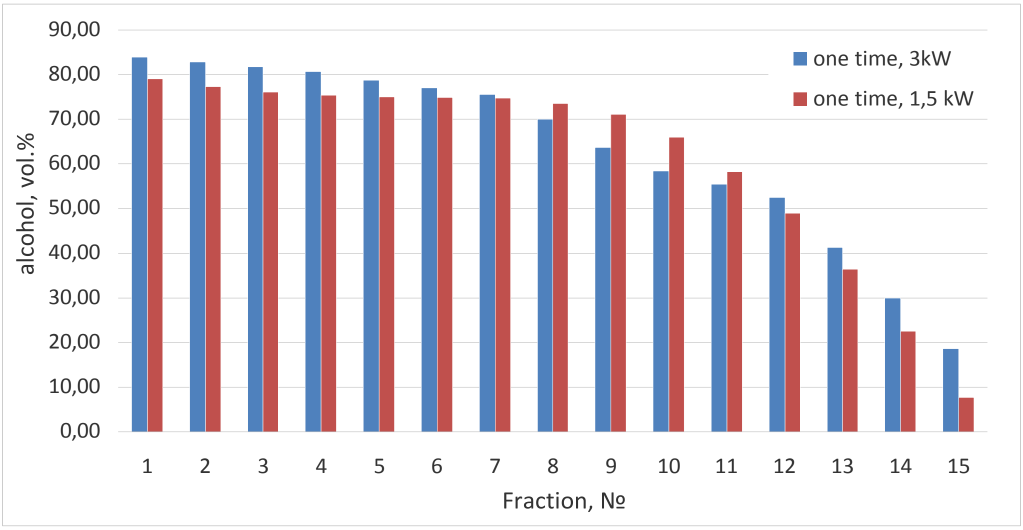


Фиг. 7. Съдържание на висши алкохоли във фракциите след редестилация и еднократна дестилация

Fig. 7. Content of higher alcohols in the fractions after second distillation and one time distillation

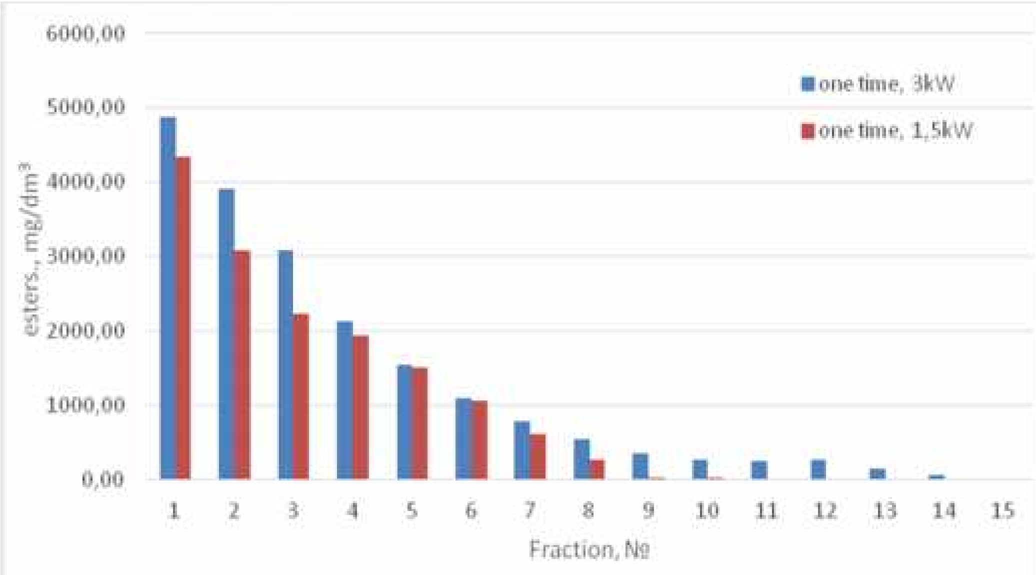
Влиянието на скоростта на дестилация ще се установи при сравнение на резултатите от анализа на пробите, получени при дестилация с 1,5 kW и 3 kW мощност на нагряващата серпентина (вариант 3 и 4). Тук разликата във времето на дестилация основно се дължи на промяна на времето за достигане на точката на кипене. Сравнявайки резултатите (Фигура 8, 9, 10 и 11) се наблюдава доста сходно изменение, като може би по-високата скорост на дестилация води до съвсем леко завишаване на алдехиди и висши алкохоли в първите фракции.

The influence of the speed of distillation will be concluded via comparison between the results of the analysis of the samples, received at distillation with power of the heating serpentine 1.5KW and 3KW (trial 3 and 4). The difference here in the time of distillation is due mainly to the time of reaching the boiling point. When comparing the results (Figure 8, 9, 10, 11) it is observed similar variation of the compounds of the distillate and maybe the higher speed of distillation leads to a very light increasing of aldehydes and higher alcohols in the first fractions.



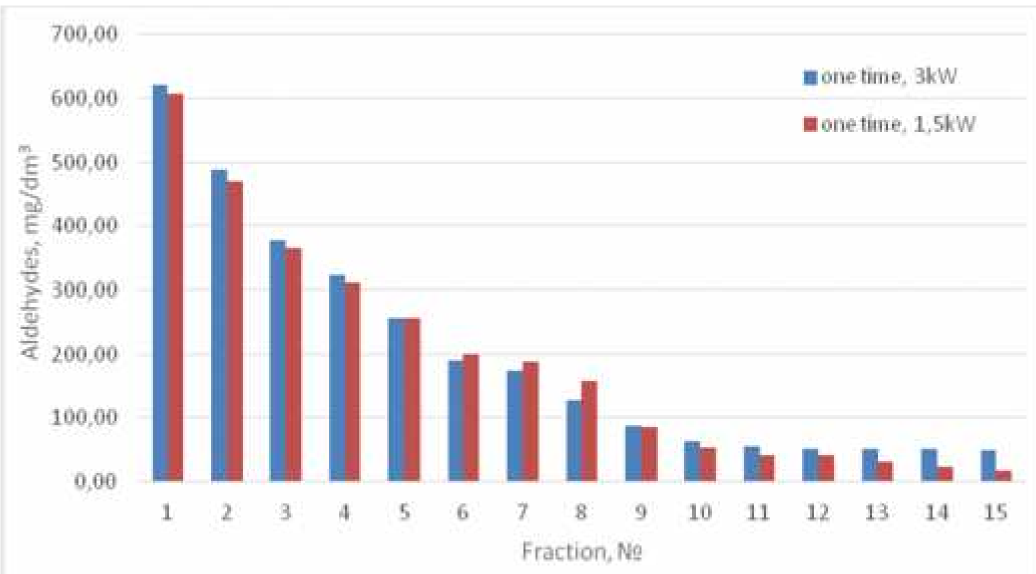
Фиг. 8. Алкохолно съдържание на фракциите при еднократна дестилация с мощност на загряване 3kW и 1,5kW

Fig. 8. Alcohol content in the fractions after one time distillation at power of heating 3kW and 1,5kW



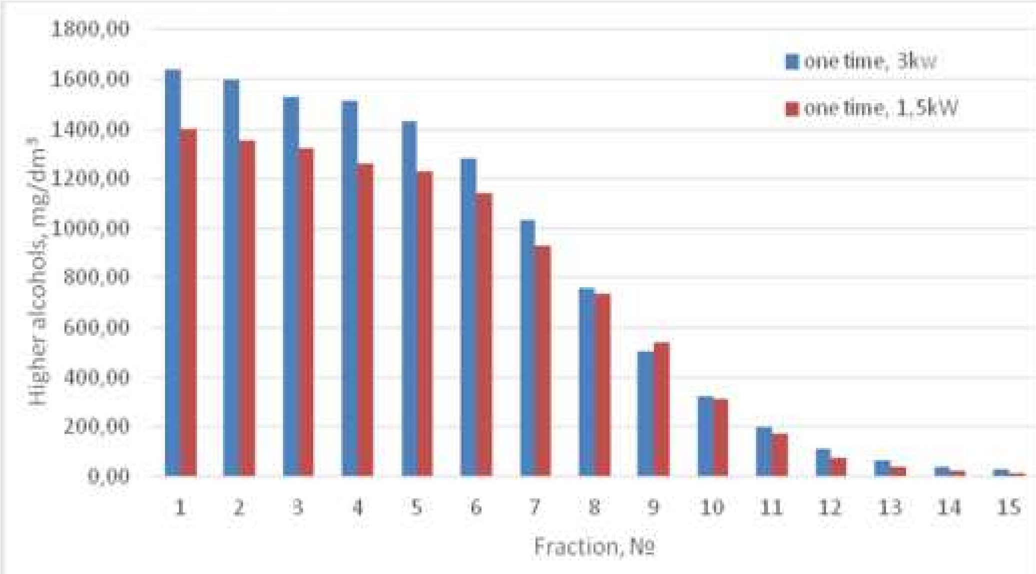
Фиг .9. Съдържание на естери във фракциите при еднократна дестилация с мощност на загряване 3kW и 1,5kW

Fig. 9. Content of esters in the fractions after one time distillation at power of heating 3kW and 1,5kW



Фиг. 10. Съдържание на алдехиди във фракциите при еднократна дестилация с мощност на загряване 3kW и 1,5kW

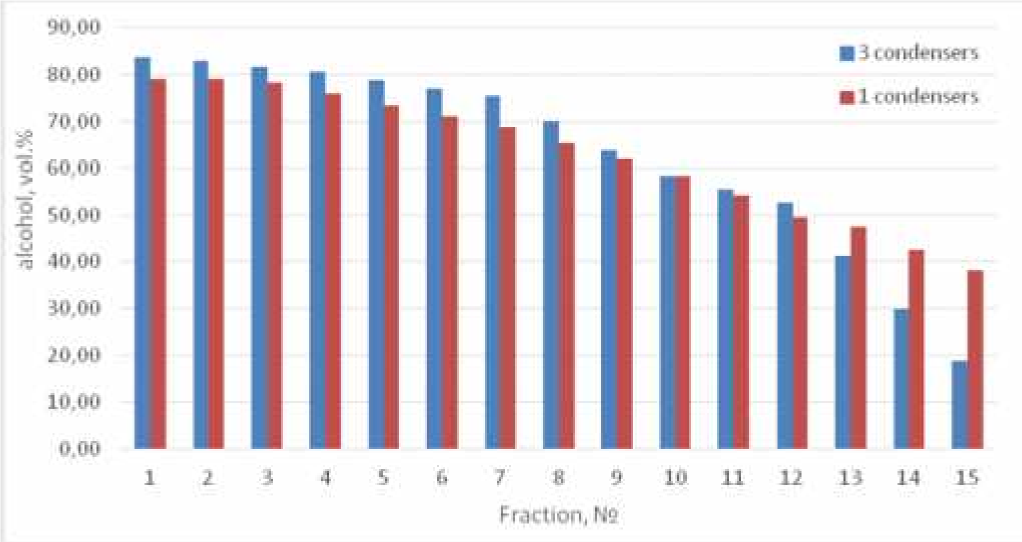
Fig. 10. Content of aldehydes in the fractions after one time distillation at power of heating 3kW and 1,5kW



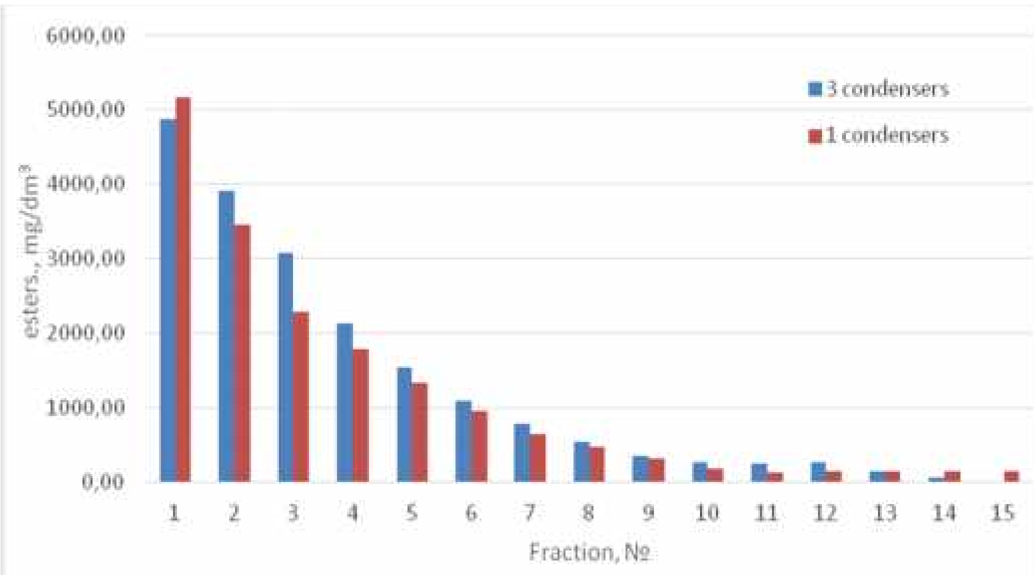
Фиг. 11. Съдържание на висши алкохоли във фракциите при еднократна дестилация с мощност на загряване 3kW и 1,5kW
Fig. 11. Content of higher alcohols in the fractions after one time distillation at power of heating 3kW and 1,5kW

Разглеждайки варианти 3 и 5, може да се установи влиянието на броя на дефлегматорите (при едно и също общо флегмово число, съответно с три и един дефлегматор. От графиката за алкохолното съдържание на отделните фракции (Фигура 12) се вижда, че при едно и също общо алкохолно съдържание, при 3 дефлегматора алкохолното съдържание започва от по-високо ниво и пада малко по-стръмно, отколкото при 1 дефлегматор. При естерите (Фигура 13) броят на дефлегматорите на практика не оказва влияние върху разпределението им по фракции. При алдехидите (Фигура 14) наличието на 3 дефлегматора води до по-осезаемото им концентриране в първите фракции в сравнение с разпределението при апарата с 1 дефлегматор. При висшите алкохоли (Фигура 15) тенденцията, която се наблюдава при алдехидите (концентриране в първите фракции) е доста по-слабо изразена и може да се каже, че е незначителна.

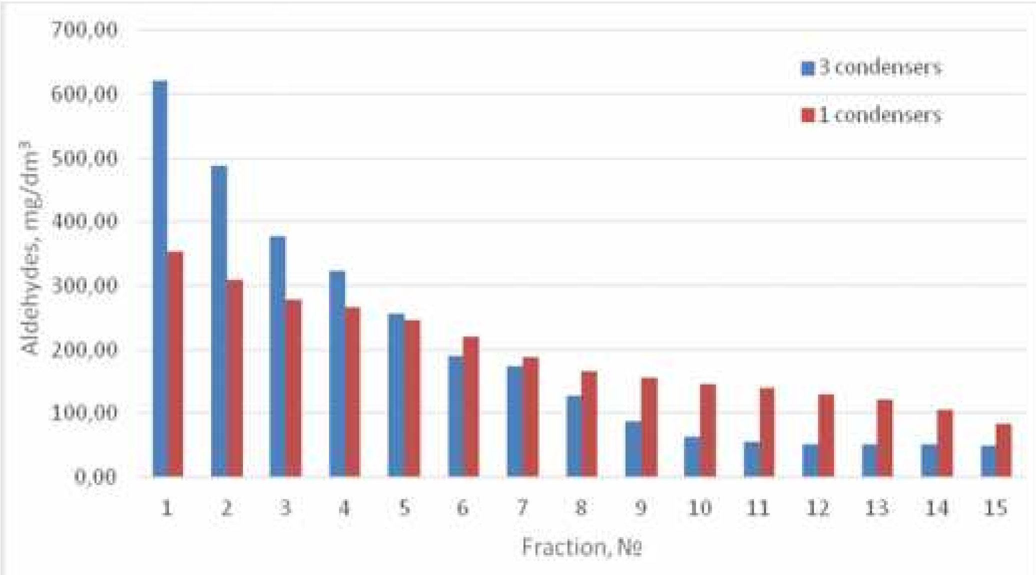
Observing trials 3 and 5, it can be concluded the influence of the count of reflux condensers (the reflux ratio is the same, but the reflux condensers are different 3 condensers and 1 condenser). From the graphic (Figure 12) with the content of alcohol level of the fractions, it can be concluded that despite the total alcohol content between the trials is the same, the alcohol content of the trial with tree reflux condensers starts higher and falls more rapidly rather than the trial with one reflux condenser. The amount of the reflux condensers does not affect practically to the distribution of esters (Figure 13) in the different fractions. Observing the aldehydes (Figure 14), the trial with three reflux condensers leads to a perceptible increase in the first fractions in comparison with the trial with one reflux condenser. The tendency of the variation of higher alcohols (Figure 15) is the same like aldehydes (concentration in the first fractions) but in lower grade, so we can say it is insignificant.



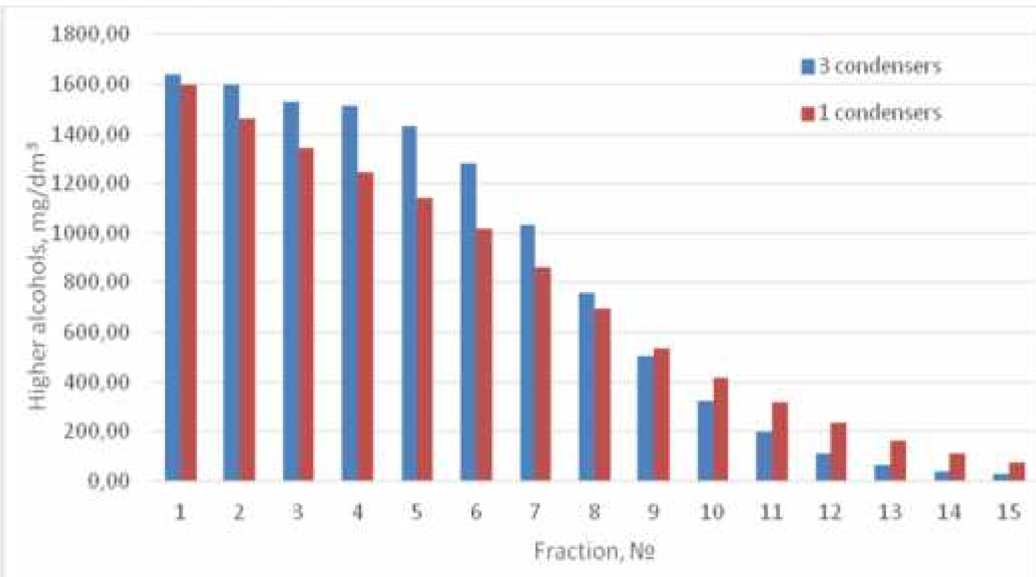
Фиг.12. Алкохолно съдържание на фракциите при еднократна дестилация с 3 дефлегматора и 1 дефлегматор
Fig. 12. Alcohol content in the fractions after one time distillation with three and one reflux condensers



Фиг. 13. Съдържание на естери във фракциите при еднократна дестилация с 3 дефлегматора и 1 дефлегматор
Fig. 13. Content of esters in the fractions after one time distillation with three and one reflux condensers



Фиг. 14. Съдържание на алдехиди във фракциите при еднократна дестилация с 3 дефлегматора и 1 дефлегматор
Fig. 14. Content of aldehydes in the fractions after one time distillation with three and one reflux condensers



Фиг. 15. Съдържание на висши алкохоли във фракциите при еднократна дестилация с 3 дефлегматора и 1 дефлегматор
Fig. 15. Content of higher alcohols in the fractions after one time distillation with three and one reflux condensers

ИЗВОДИ

Еднократната дестилация с подходяща дефлегмация може да замени двукратната дестилация. При еднократната дестилация се наблюдава значително по-високи концентрации на естери и алдехиди и малко по-ниски на висши алкохоли в сравнение с двукратната. Това не дава основание да се направи предпочитание за една от двете дестилации (еднократна и двукратна).

По-високата скорост на дестилация води до леки завишения в количеството на естери, алдехиди и висши алкохоли. Тези завишения обаче са незначителни и може да се твърди, че скоростта не оказва особено влияние върху концентрацията на летливите примеси.

Наличието на по-голям брой дефлегматори не оказва съществено въздействие върху количеството на естерите и висшите алкохоли, докато алдехидите се концентрират основно в първите фракции и по този начин ще бъдат отделени с първоточната фракция. По-големият брой дефлегматори освен чисто конструктивните облекчения води и до положително влияние при отделянето на алдехидите.

CONCLUSIONS

One time batch distillation with appropriate reflux can replace the double batch distillation. At one time batch distillation is observed significantly higher concentrations of esters and aldehydes and lower of higher alcohols in comparison with the double batch distillation. This cannot give us an answer which distillation is appropriate (one time or double batch distillation).

The higher speed of the distillation leads to a slightly increase of the amount of esters, aldehydes and higher alcohols. This increase is too insignificant and it can be concluded that the speed of distillation does not have a big influence of the concentration of volatile compounds.

The presence of bigger amount of reflux condensers does not affect significantly at the concentration of esters and high alcohols, but affects at the content of aldehydes and concentrates them mainly in the first fractions where they can be removed. The bigger amount of reflux condensers has not only constructive advantages but has great influence at concentration of aldehydes and their separation with the first fraction.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Boulton, R. B., V. L. Singleton, L. F. Bisson, R. E. Kunkee**, 1999. Principles and practices of winemaking, New York: Chapman & Hall.
2. **Fundira, M., M. Blom., I.S. Pretorius., P. van Rensburg**, 2002. Selection for yeast starter culture strains for the production of marula fruit wines and distillates. *J. Agric. Food. Chem.,* 50(6), 1535-1542.
3. **Marinov, M.G.**, 2005. Technology of spirits beverages. Academic publishing UFT, Plovdiv (Bg).
4. **Nykanen, L.H.**, 1986. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled beverages. *Am. J. Enol. Vitic.,* 37: 84-96.
5. **Piggott, J.R.**, 1983. Flavour of distilled beverages: Origin and development. Ellis Horwood Ltd, Chichester.
6. **Stoyanov, N.S., N.B. Blagoeva**, 2012. Manual for laboratory exercises for Spirits Technology. Academic publishing UFT, Plovdiv ISBN 978-954-24-0186-5 (Bg).