

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maja AMBROŽIČ

**VPLIV BIOLOŠKEGA RAZKISA NA NASTANEK
HLAPNIH KOMPONENT VINA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maja Ambrožič

**VPLIV BIOLOŠKEGA RAZKISA NA NASTANEK Hlapnih
KOMPONENT VINA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF MALOLACTIC FERMENTATION ON
FORMATION OF VOLATILE WINE COMPONENTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je potekalo v laboratoriju Katedre za vinarstvo na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Mojmirja Wondro in za recenzenta doc. dr. Rajka Vidriha.

Mentor: doc. dr. Mojmir Wondra

Recenzent: doc. dr. Rajko Vidrih

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maja Ambrožič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 663.252.35 : 663.256 : 543.61 : 543.9 (043) = 863
- KG vino/modra frankinja/biološki razkis/mlečnokislinske bakterije/hlapne komponente/višji alkoholi/estri/senzorične lastnosti
- AV AMBROŽIČ, Maja
- SA WONDRA, Mojmir (mentor) / VIDRIH, Rajko (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2006
- IN VPLIV BIOLOŠKEGA RAZKISA NA NASTANEK HLAJNIH KOMPONENT VINA
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 68 str., 2 pregl., 40 sl., 7 pril., 38 vir.
- IJ Sl
- Jl sl/en
- AI V diplomski nalogi smo preučevali vpliv biološkega razkisa na nastanek hlapnih komponent vina in s tem na samo kakovost in specifičnost arome vina. Opravili smo biološki razkis v vinu modra frankinja in sicer z dvema različnima sevoma mlečnokislinskih bakterij vrste *Oenococcus oeni* pri dveh različnih temperaturah. Vzorce smo primerjali z vzorci s spontanim biološkim razkisom in z vzorci brez opravljenega biološkega razkisa. Pred nastavitvijo poskusa smo opravili osnovne kemijske analize vina: vrednost pH, vsebnost skupnih titrabilnih kislin, vsebnost alkohola in skupnega žvepla, vsebnost skupnega ekstrakta in skupnih fenolov, vsebnost reducirajočih sladkorjev in hlapnih kislin, meritve barvnih parametrov ter vsebnost organskih kislin in sladkorjev in vsebnost hlapnih komponent. Potek biološkega razkisa smo spremljali s tedenskim merjenjem vrednosti pH, vsebnosti skupnih titrabilnih kislin in z merjenjem vsebnosti organskih kislin in sladkorjev s HPLC. Vsebnost jabolčne, mlečne in vinske kisline smo spremljali s papirno kromatografijo. Po zaključenem biološkem razkisu smo opravili nadaljnje kemijske analize, kjer so se opazile razlike med vzorci pred in po biološkem razkisu. Opravili smo tudi senzorično analizo v poskus zajetih vzorcev vin. Ugotovili smo pozitiven vpliv biološkega razkisa na specifičnost in kompleksnost arome vina in s tem na samo kakovost vina. Vina z opravljenim biološkim razkisom so vsebovala več hlapnih komponent, kot so višji alkoholi, estri in hlapne kisline. Bila so tudi alkoholno nekoliko bogatejša, z manjšo vsebnostjo skupnih titrabilnih kislin. Vzorci pri nižji temperaturi so bili ocenjeni bolje, saj so bili sortno prepoznavni, harmonični in zaokroženi. Biološki razkis je prispeval k sadnemu karakterju vina, zmanjšali so se rastlinski vonji, aroma pa je postala bolj kompleksna zaradi tvorbe novih spojin, kot je diacetil, etil laktat in drugih višjih alkoholov in estrov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 663.252.35 : 663.256 : 543.61 : 543.9 (043) = 863

CX wines/winemaking/modra frankinja/malolactic fermentation/lactic acid bacteria/volatile compounds/higher alcohols/esters/sensory properties

AU AMBROŽIČ, Maja

AA WONDRA, Mojmir (supervisor)/ VIDRIH, Rajko (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2006

TI INFLUENCE OF MALOLACTIC FERMENTATION ON FORMATION OF VOLATILE WINE COMPONENTS

DT Graduation thesis (University studies)

NO XI, 68 p., 2 tab., 40 fig., 7 ann., 38 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The influence of malolactic fermentation on formation of volatile wine components, quality and specificity of wine aroma was examined. Malolactic fermentation was carried out in wine modra frankinja with two different strains of species *Oenococcus oeni* at two different temperatures. Samples were compared with the samples with spontaneous malolactic fermentation and with the samples without malolactic fermentation. Basic chemical analyses were made before experiment started: pH value, total acidity, concentration of alcohol and total sulphur, concentration of total phenols and total extract, concentration of reducing sugars, volatile acidity, colour parameters, concentration of sugars and organic acids and concentration of wine volatile components. The malolactic fermentation was monitored by measuring pH value, total acidity and concentration of sugars and organic acids. Concentrations of malic, lactic and tartaric acid were determined by paper chromatography. After malolactic fermentation was finished the chemical and sensorial analyses were made to make a comparison between the samples before and after malolactic fermentation. Malolactic fermentation showed positive influence on specificity and complexity of wine aroma and also on quality of wine. Wines with malolactic fermentation contained more volatile components such as higher alcohols, esters and volatile acidity. These samples also had higher levels of alcohol but lower total acidity. Lower temperature gave better sensorial evaluation because of a greater harmony, noble of a sort and fullness of taste. Malolactic fermentation contributed to fruity aroma with less herbical and grassy aroma. Wine aroma became more complex because of formation of some new compounds such as diacetyl, etil lactate and other higher alcohols and esters.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 KULTIVAR MODRA FRANKINJA.....	2
2.2 KEMIJSKA SESTAVA MOŠTA IN VINA	3
2.2.1 VODA	3
2.2.2 OGLJIKOVI HIDRATI	4
2.2.3 KISLINE	5
2.2.4 ALKOHOL	6
2.2.5 FENOLNE SNOVI	7
2.2.6 MINERALNE SNOVI.....	9
2.2.7 DUŠIKOVE SPOJINE	9
2.2.8 AROMATIČNE SNOVI	10
2.3 BIOLOŠKI RAZKIS	14
2.4 NAMEN NALOGE	19
2.5 DELOVNE HIPOTEZE	19
3 MATERIAL IN METODE	20
3.1 ZASNOVA POSKUSA.....	20
3.2 METODE DELA	22
3.2.1 KEMIJSKE ANALIZE VINA.....	23
3.2.2 SENZORIČNA ANALIZA VINA.....	32
4 REZULTATI.....	34
4.1 REZULTATI KEMIJSKIH ANALIZ VINA	34
4.1.1 VREDNOST pH.....	34
4.1.2 TITRABILNE KISLINE DO pH=7.....	35
4.1.3 SKUPNE KISLINE DO pH=8,2.....	35

4.1.4 GLUKOZA.....	36
4.1.5 FRUKTOZA	36
4.1.6 GLICEROL.....	37
4.1.7 CITRONSKA KISLINA	37
4.1.8 VINSKA KISLINA.....	38
4.1.9 JABOLČNA KISLINA	38
4.1.10 MLEČNA KISLINA	39
4.1.11 Hlapne kisline.....	39
4.1.12 ETANOL	40
4.1.13 SKUPNI EKSTRAKT	40
4.1.14 SKUPNI FENOLI.....	41
4.1.15 BARVA VINA.....	41
4.1.16 ACETALDEHID	42
4.1.17 ETILACETAT	43
4.1.18 METANOL	43
4.1.19 DIACETIL	44
4.1.20 ACETOIN	44
4.1.21 1-PROPANOL	45
4.1.22 IZOBUTANOL	45
4.1.23 IZOAMILACETAT	46
4.1.24 IZOAMILNI ALKOHOL.....	46
4.1.25 METIL LAKTAT	47
4.1.26 ETIL LAKTAT.....	47
4.1.27 FENILETIL ACETAT.....	48
4.1.28 2-FENIL ETANOL.....	48
4.2 REZULTATI SPREMLJANJA BIOLOŠKEGA RAZKISA S PAPIRNO KROMATOGRFIJO.....	49
4.3 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE VINA	51
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	52
5.1 RAZPRAVA.....	52
5.1.1 KEMIJSKE ANALIZE VINA.....	52
5.1.2 SENZORIČNA ANALIZA VINA.....	62
5.2 SKLEPI.....	63
6 POVZETEK.....	64
7 VIRI	65

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Koncentracije organskih kislin v pripravljenih standardih.....	30
Preglednica 2: Koncentracije sladkorjev in glicerola v pripravljenih standardih.....	30

KAZALO SLIK

Slika 1: Sorta Modra frankinja (Hrček in Korošec-Koruza, 1996)	3
Slika 2: Splošni prikaz tvorbe višjih alkoholov iz aminokislin in α -keto kislin (Fugelsang, 1997).....	11
Slika 3: Prikaz poteka poskusa	21
Slika 4: Primer umeritvene krivulje za določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin ..	26
Slika 5: HPLC aparatura (Štancar, 1996)	28
Slika 6: Primer kromatograma za HPLC	29
Slika 7: Primer umeritvene krivulje za določanje koncentracije acetaldehida.....	31
Slika 8: Vrednost pH v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	34
Slika 9: Vsebnost titrabilnih kislin do pH=7 (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja.....	35
Slika 10: Vsebnost skupnih kislin do pH=8,2 (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja.....	35
Slika 11: Vsebnost glukoze (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	36
Slika 12: Vsebnost fruktoze (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	36
Slika 13: Vsebnost glicerola (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	37
Slika 14: Vsebnost citronske kisline (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	37
Slika 15: Vsebnost vinske kisline (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	38
Slika 16: Vsebnost jabolčne kisline (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	38
Slika 17: Vsebnost mlečne kisline (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	39
Slika 18: Vsebnost hlapnih kislin (g/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	39
Slika 19: Vsebnost alkohola (vol. %) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	40
Slika 20: Vsebnost skupnega ekstrakta (g/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	40
Slika 21: Vsebnost skupnih fenolov (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	41
Slika 22: Vrednost intenzitete barve v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	41

Slika 23: Vrednost tona barve v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	42
Slika 24: Vsebnost acetaldehida (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	42
Slika 25: Vsebnost etilacetata (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	43
Slika 26: Vsebnost metanola (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	43
Slika 27: Vsebnost diacetila (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	44
Slika 28: Vsebnost acetoina (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	44
Slika 29: Vsebnost 1-propanola (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	45
Slika 30: Vsebnost izobutanola (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	45
Slika 31: Vsebnost izoamilacetata (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	46
Slika 32: Vsebnost izoamilnega alkohola (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	46
Slika 33: Vsebnost metil laktata (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	47
Slika 34: Vsebnost etil laktata (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	47
Slika 35: Vsebnost feniletil acetata (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	48
Slika 36: Vsebnost 2-fenil etanola (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja	48
Slika 37: Kromatogram organskih kislin po prvem tednu spremljanja biološkega razkisa v vinu modra frankinja	49
Slika 38: Kromatogram organskih kislin po drugem tednu spremljanja biološkega razkisa v vinu modra frankinja	49
Slika 39: Kromatogram organskih kislin po tretjem tednu spremljanja biološkega razkisa v vinu modra frankinja	50
Slika 40: Senzorična ocena vzorcev vin sorte modra frankinja po končanem biološkem razkisu, vodenem pri dveh različnih temperaturah.....	51

KAZALO PRILOG

Priloga A: Podatki meritev vsebnosti titrabilnih kislin do pH=7 in skupnih kislin do pH=8,2 ter meritev vrednosti pH v vzorcih vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah pred, med in po biološkem razkisu (MLF)

Priloga B: Podatki meritev vsebnosti hlapnih kislin, etanola, skupnega ekstrakta in skupnih fenolov v vzorcih vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah pred in po biološkem razkisu (MLF)

Priloga C: Podatki meritev absorbance pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm ter izračuni intenzitete barve in tona barve v vzorcih vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah pred in po biološkem razkisu (MLF)

Priloga D: Podatki meritev vsebnosti sladkorjev in organskih kislin v vzorcih vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah pred, med in po biološkem razkisu (MLF)

Priloga E: Podatki meritev vsebnosti acetaldehida, etilacetata, metanola, diacetila, 1-propanola in izobutanola v vzorcih vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah pred in po biološkem razkisu (MLF)

Priloga F: Podatki meritev vsebnosti izoamil acetata, izoamil alkohola, acetoina, metil laktata, etil laktata, 2-fenil etilacetata in 2-fenil etanola v vzorcih vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah pred in po biološkem razkisu (MLF)

Priloga G: Rezultati senzorične ocene vzorcev vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah po končanem biološkem razkisu

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CFU	Colony forming units (Kolonijska enota)
EMP	Embden-Meyerhof-Parnasova pot
GC	Gas chromatography (Plinska kromatografija)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (tekočinska kromatografija visoke ločljivosti)
LAB	Lactic acid bacteria (Mlečnokislinske bakterije)
MLF	Malolactic fermentation (Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija)
O.I.V.	Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (Mednarodna organizacija za trto in vino)
The Official Methods of Analysis of the AOAC	Association of Official Analytical Chemists (Uradne analitične metode združenja kemikov)

1 UVOD

Večina vin, še zlasti v slabših letnikih, vsebuje večje koncentracije kislin in premalo aromatičnih komponent. V vinorodnih območjih in letnikih, ko je razmerje kislin neugodno in prevladuje jabolčna kislina, je lahko biološki razkis vina nepogrešljiv način zmanjšanja oz. uravnavanja skupne kisline. Biološki razkis, ki običajno sledi alkoholni fermentaciji, lahko poteče spontano, z endogenimi mlečnokislinskimi bakterijami, ki se nahajajo na grozdju in kletarski opremi ali pa ga sprožimo sami z uporabo komercialnih starter kultur mlečnokislinskih bakterij. Biološki razkis vina večkrat poteče tudi spomladi, ko se kleti primerno segrejejo in se vrednost pH dvigne zaradi izločanja vinskega kamna ter se tako ustvarijo ugodni pogoji za delovanje mlečnokislinskih bakterij.

Pretvorba jabolčne kisline v milejšo mlečno kislino ima za posledico več sprememb: deacidifikacijo ali znižanje skupnih kislin, mikrobiološko stabilnost in spremembo arome. Predvsem slednja je pomemben dejavnik, ki vpliva na zelene senzorične parametre. Raziskave kažejo, da ima biološki razkis vina pozitiven vpliv na senzorično kakovost vina. Glavni dejavniki, ki prispevajo k temu so polnejši in zaokrožen okus, večja kompleksnost arome in večja harmoničnost. Poveča se sadni karakter vina, medtem ko se vegetativni, rastlinski ali zeleni vonji izgubijo in prekrijejo. Na polnejši okus vina vpliva predvsem tvorba etil laktata. Tvorijo pa se tudi druge aromatične snovi kot je diacetil, ki v manjših koncentracijah prispeva k polnejši aromi vina. Povečajo se tudi vsebnosti nekaterih estrov in višjih alkoholov ter vsebnost hlapnih kislin.

S poskusom vodenega biološkega razkisa oz. uporabo starter kultur različnih mlečnokislinskih bakterij smo želeli ugotoviti vpliv le tega na nastanek hlapnih komponent in s tem na samo kakovost in specifičnost arome vina. Želeli smo doseči boljše aromatičnost vina in se tako približati trendu vin, ki so tržno bolj zanimiva; se pravi vina z manjšo vsebnostjo kislin in večjim spektrom arom.

Biološki razkis smo spremljali na vinu sorte modra frankinja, katere grozdje je bilo iz belokranjskega vinorodnega okoliša, podokoliša Metlika. Modra frankinja je še posebej primerna za biološki razkis vina zaradi svoje mladostne neharmoničnosti, kot posledica večje kislosti. Tako vino postane po opravljenem biološkem razkisu milejše in bolj mehko z večjo harmoničnostjo in zaokroženostjo okusa. Uporabili smo dva različna seva mlečnokislinskih bakterij in biološki razkis spremljali pri dveh različnih temperaturah, ki sta bolj ali manj optimalno vplivali na potek biološkega razkisa. Naredili smo tudi primerjavo s kontrolnim vzorcem, kjer nismo opravili biološkega razkisa in z vzorcem, kjer je stekel spontan biološki razkis. Razlike so se pokazale na širokem spektru fizikalno-kemijskih in senzoričnih parametrov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KULTIVAR MODRA FRANKINJA

Kultivar Modra frankinja spada v skupino črnomskega bazena – *Proles pontica*. Razširjena je v nekaterih evropskih vinogradniških deželah, pri nas pa največ v posavskem vinorodnem rajonu. Vršiček mladike je rdečkast, gladek in svetlozelen, list pa velik in skoraj cel ali malo narezan in okroglast. Z gornje strani je list mehurjast, temno zelen in jeseni pordeči. Grozd je srednje velik do velik, valjaste oblike in precej nabit. Grozdni pecelj je precej kratek in zelenkaste barve. Jagoda je srednje velika, temno modra, precej oprášena in okroglaste oblike. Jagodna kožica je precej debela, temno rdečkasta, skorja je črtkasta (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

Za tla ni zahtevna in je bujne rasti. V vinogradu je sicer neproblematična in jo imajo vinogradniki radi. Mošt doseže povprečno 75 °Oe. Vino modre frankinje je karminasto rdeče barve. Na trgu se kot sortno vino sorazmerno redko pojavlja, več šele v zadnjih letih. Največkrat namreč sodeluje pri pridelavi zvrsti vina (metliška črnina, cviček...). Jagodna kožica ima bogato fenolno sestavo in s strokovno vodeno maceracijo grozdja lahko pridelamo odlično mlado vino za takojšnjo porabo ali krepka, intenzivno obarvana rdeča vina za daljše zorenje. Sortno značilen vonj je blag, topel, v mladosti sadnega značaja, v zrelosti po usnju, praženi kavi, čokoladi. Modra frankinja je srednje težko rdeče vino, v dobrih letnikih je razmerje med kislino in taninskimi snovmi uravnano v dobro harmonijo. Povprečni letniki kažejo večjo kislost, medtem ko kakovostni letniki omogočijo izredno polna rdeča vina z intenzivno obarvanostjo, sortno značilnimi vonjavami in bogato taninsko osnovo. Idealna zrelost se pokaže približno po petih do šestih letih zorenja (Nemanič, 1996)



Slika 1: Sorta Modra frankinja (Hrček in Korošec-Koruza, 1996)

2.2 KEMIJSKA SESTAVA MOŠTA IN VINA

Po svoji sestavi je vino raztopina vode in mnogoštevilnih organskih in neorganskih spojin, ugotovljenih jih je že več kot tisoč. Sestava vina je spremenljiva, odvisna je predvsem od naravnih danosti ter od vinogradnika in kletarja; torej od klime, tal, sorte, letnika, pridelave in zrelosti grozdja, časa in načina trgatve, predelave grozdja in nege vina (Vodovnik T. in Vodovnik A., 1999).

2.2.1 VODA

Vino vsebuje od 75 do 85 % vode, v kateri so topne mnoge sestavine. Čim nižji je odstotek vode, tem boljša je kakovost vina (Vodovnik T. in Vodovnik A., 1999).

2.2.2 OGLJIKOVI HIDRATI

Med sladkorje, prisotne v vinu, prištevamo monosaharide, disaharide in polisaharide. Prisotne pa so tudi pektinske snovi. Prevladujeta monosaharida grozdni sladkor ali glukoza in sadni sladkor ali fruktoza. Kvasovke dajejo v začetku alkoholnega vrenja prednost glukozi pred fruktozo, zato je predstavnik sladkorjev v vinih z ostankom sladkorja fruktoza. Srednja cona jagode je običajno najbogatejša s sladkorjem. Mlečnokislinske bakterije porabljajo ogljikove hidrate (predvsem glukozo in fruktozo) za svojo rast in izgradnjo lastnih struktur.

2.2.2.1 MONOSAHARIDI

Pentoze

V moštu so slabše zastopane kot heksoze in sicer so običajne koncentracije 1 g/L. Prevladuje arabinoza, v sledovih sta prisotni še ksiloza in riboza. V grozdni jagodi so pentoze v trdnih delih grozda, zlasti v pečkah. Zato kakovost predelave grozdja močno vpliva na količino pentoz v moštu. Kvasovke med alkoholnim vrenjem pentoz ne morejo povreti v alkohol, zato ostanejo v vinu kot sestavina ekstrakta. Mlečnokislinske bakterije razgrajujejo pentoze in tvorijo acetat in laktat (Ribéreau-Gayon, 2000).

Heksoze

Večinska predstavnika sta glukoza in fruktoza, manoza in galaktoza sta prisotni le v sledovih. Glukoza se dobro topi v vodi, slabše v alkoholu in je zato v moštu prisotna v topni obliki. Med dozorevanjem prevladuje glukoza, v fazi polne zrelosti je razmerje glukoze in fruktoze 1:1, v prezrelem grozdju pa prevladuje fruktoza, ki je 2,2 do 2,3 krat slajša od glukoze. V moštu grozdja, okuženega s plesnijo *Botrytis cinerea* in drugimi plesnimi, je večinsko zastopana fruktoza, saj številni mikroorganizmi prej in hitreje porabljajo glukozo. Mlečnokislinske bakterije lažje porabljajo fruktozo kot glukozo. Heksoze fermentirajo do D-mlečne kisline, CO₂, etanola in očetne kisline. Fruktozo lahko reducirajo do manitola iz katerega nastaja acetat.

2.2.2.2 DISAHARIDI

Edini pomemben disaharidni sladkor v tehnologiji vina je saharoza (trsnji ali pesni sladkor). Mošt žlahtnih evropskih trt vsebuje v povprečju 2 do 5 g/L saharoze, ki v moštu s pomočjo encima invertaze, ki ga vsebujejo kvasovke, razpade na glukozo in fruktozo.

2.2.2.3 POLISAHARIDI

Najpomembnejši so araban, galaktoaraban, manan in glukan. Nahajajo se v koloidni obliki, njihova topnost pa se zmanjšuje z višanjem alkohola (Vodovnik T. in Vodovnik A., 1999). V moštih iz gnilega grozdja prevladuje predvsem glukan, ki pa ni zaželen, saj zmanjšuje filtrabilnost vina.

2.2.3 KISLINE

Kislina mošta imajo skupaj s kislinami, ki nastajajo med alkoholnim vrenjem, izredno pomembno vlogo pri oblikovanju okusa vina, soudeležene so v celi vrsti fizikalno-kemičnih in biokemičnih procesov (Šikovec, 1993).

Kislost vina je vedno nižja od kislosti mošta zaradi fizikalno-kemičnih in biokemičnih procesov, kot je alkoholno vrenje, kjer se velik del vinske kisline izloči v obliki vinskega kamna. Kisline lahko razdelimo na organske in anorganske, hlapne in nehlapne ter proste in vezane kisline. Zelo pomembne so tudi njihove soli, ki so prav tako sestavine vina. Koliko kislin bo kakšno vino vsebovalo, je večinoma odvisno od geografskega porekla, sorte, letnika, časa trgatve, načina predelave, kletarjenja itn.

Ustrezna vsebnost kislin je zelo pomembna za samo hranjenje vina, saj so vina z izrazito nizko kislino bolj nagnjena k napakam in boleznim (Vodovnik T. in Vodovnik A., 1999).

Med organskimi kislinami so v vinarstvu najpomembnejše vinska, jabolčna, citronska, mlečna in očetna kislina. Najpomembnejše neorganske kisline pa so fosforjeva, žveplova, kremenčeva in borova kislina; prisotne so v obliki nevtralnih soli.

Vinska kislina

Vinska kislina nastaja v grozdnih jagodah, deloma tudi v listih vinske trte. Največja koncentracija vinske kisline je v osrednji coni jagode. V vseh delih trte jo srečamo kot D-vinsko kislino. Vino vsebuje od 1 do 13 g/L vinske kisline, kar predstavlja 20 do 70 % celotne koncentracije skupnih kislin. V vinu se izloča kot kalijev tartrat v obliki vinskega kamna.

Jabolčna kislina

Kot proizvod nepopolne oksidacije sladkorja v listju prehaja v jagodo, kjer tudi sama delno oksidira naprej do vode in ogljikovega dioksida. V grozdnih jagodah jo celice najpogosteje porabljajo za respiracijske procese. V grozdju je prisotna kot L-jabolčna kislina, pri mlečnokislinskem vrenju lahko iz nje tvorijo mlečnokislinske bakterije samo L-mlečno kislino. V vinu je jabolčna kislina neobstoja in se pretvarja v mlečno kislino pod vplivom raznih mikroorganizmov.

Med dozorevanjem grozdja se povečuje vsebnost vinske kisline in zmanjšuje vsebnost jabolčne kisline, zato lahko njuno razmerje uporabimo za spremljanje dozorevanja in kot indikator kakovosti letnika (Šikovec, 1993).

Medtem ko ima vinska kislina kisel okus, daje jabolčna kislina v ustih občutek nezrelosti.

Mlečna kislina

V moštu iz zdravega grozdja mlečna kislina praviloma ni prisotna. Nastane lahko z dekarboksilacijo jabolčne kisline v procesu biološkega razkisa ali pa nastaja med alkoholno fermentacijo kot posledica razgradnje ogljikovih hidratov. Majhna vsebnost je v rdečem vinu lahko celo zaželena, saj postane vino bolj mehko, zaokroženo, bolj polnega okusa z daljšo zaznavo. To dosežemo z vodenim biološkim razkiso. Pri neustreznih pogojih (pH manjši od 3,1 in temperatura nižja od 17 °C) lahko biološki razkis poteka v napačni smeri in pride do nastanka nezaželenih hlapnih snovi, ki vodijo v bolezen vina, imenovano mlečni cik.

Citronska kislina

Je redna spremljevalka jabolčne kisline v grozdni jagodi, čeprav je fiksirana na celične opne in zato pri predelavi grozdja težje prehaja v mošt. Tako je v moštu do 0,7 g/L citronske kisline, vendar pa ni obstojna v vinu, saj jo mlečnokislinske bakterije razgradijo do diacetila, acetoina in 2,3-butandiola. Produkt metabolizma citronske kisline pa je tudi acetat.

Hlapne kisline

Ko govorimo o hlapnih kislinah mislimo predvsem na očetno kislino, poleg nje pa med hlapne kisline prištevamo še mravljično, masleno in propionsko kislino. Vsebnost hlapnih kislin v vinu je pokazatelj zdravstvenega stanja vina. V vinu so vedno prisotne v manjših količinah, prekoračitev mejnih vrednosti pa kaže na očetni cik, ki je najnevarnejša bolezen vina (Vodovnik T. in Vodovnik A., 1999). Med potekom biološkega razkisa se vsebnost hlapnih kislin poveča kot posledica metabolizma citronske kisline.

2.2.4 ALKOHOL

Alkohol v vinu predstavlja etanol, ki je glavni proizvod alkoholnega vrenja. Višji alkoholi so v vinu prisotni le v manjši količini. Z alkoholom bogatejša vina so obstojnejša, vendar pa se z zorenjem (staranjem) vina količina alkohola zmanjšuje. Del alkohola izhaja, del se oksidira v aldehide, del pa esterificira.

Pravilnik o označevanju vina in drugih proizvodov iz grozdja in vina predpisuje:

”Vino mora vsebovati najmanj 8,5 % dejanskega alkohola, razen vina cviček, ki mora vsebovati najmanj 7,5 % dejanskega alkohola in največ 15 vol.% skupnega alkohola.” (Vodovnik T. in Vodovnik A., 1999).

Po vsebnosti alkohola razdelimo vina v :

- lahka: 60 do 80 g/L (7,5 do 10 vol.%),
- srednje težka: 80 do 100 g/L (10 do 12,5 vol.%),
- težka: nad 100 g/L (več kot 12,5 vol.%).

Od ostalih nižjih alifatskih alkoholov je v vinu prisoten v minimalni količini metanol, ki nastane iz pektinov pri nepravilni predelavi grozdja, 3-metilbutanol-1, katerega estri so pomembni nosilci cvetice vina in kot pokazatelji bolnega vina še propanol-1 in 2 ter butanol-1 in 2.

Od višjih alifatskih alkoholov je najbolj pomemben glicerol, ki daje vinu telo in poln okus. Pri alkoholnem vrenju nastaja iz sladkorja. V večji količini pa ga pred vrenjem že v sami grozdni jagodi tvori glivica *Botrytis cinerea* in takrat te vrednosti presegajo 15 g/L (Vodovnik T. in Vodovnik A., 1999).

Mlečnokislinske bakterije tvorijo med biološkim razkisom manjše količine etanola in višjih alkoholov.

2.2.5 FENOLNE SNOVI

Sestavljajo veliko skupino spojin v vinu, ki jih delimo na štiri glavne skupine:

- neflavonoidne fenole,
- flavonoidne fenole,
- taninske fenole,
- netaninske fenole (antociane).

Polifenolne snovi igrajo izredno pomembno vlogo pri stabilizaciji rdečih vin, s svojo prisotnostjo pa negativno vplivajo na kakovost belih vin (Šikovec, 1993).

V povprečju je 38 % fenolnih spojin v pečkih, 36 % v kožici, 20 % v peclju in 6 % v jagodnem mesu. Značilno za fenolne spojine, ki so vedno v moštu ali vinu je, da dajejo grenak-trpek okus (Šikovec, 1993).

Rdeča vina vsebujejo v nasprotju z belimi vini antociane, ki se akumulirajo v jagodni kožici. Fenoli imajo tudi sposobnost, da sprožijo koagulacijo beljakovin in s tem spontano bistrenje vina.

Flavonoidni fenoli

Sem spadajo katehini, levkoantociani in antociani. Nahajajo se v trdnih delih grozda, njihova vsebnost je močno odvisna od tehnologije predelave grozdja. Katehin in epikatehin kot predhodnika čreslovin predstavljata barvne snovi belih vinskih sort. Te se lahko ob prisotnosti kisika oksidirajo v kinone, kar vodi k porjavitvi vina, spremembi okusa in vonja vina.

Levkoantociani se nahajajo v pečkih, kožici in pecljevini in so v vinu prisotni v slabo ali močno kondenzirani obliki. Rdeča vina vsebujejo od 1 do 3 g/L levkoantocianov, medtem ko je v belih vinih ob pravilni predelavi vsebnost le nekaj 10 mg. Čim bolj je kondenzirana oblika, tem bolj trpek okus imajo. Zato imajo mlada rdeča vina trpek in

surov okus, ki se šele s staranjem in zorenjem vina zaokroži in zmehča zaradi manjše kondenzacije.

Antociani so barvne snovi rdečih vinskih trt in odločajo o intenzivnosti in barvnem odtenku rdečih vin (Šikovec, 1993). Ker so zaprti v posebnih celicah v jagodni kožici jih je treba pri predelavi rdečih sort najprej sprostiti (macerirati), da preidejo v sok. Barvni odtenek se spreminja s vrednost pHjo, staranjem vina (polimerizacija antocianov) in dodatkom žvepla, kjer vino posvetli, vendar je intenzivnost barve reverzibilna. Količinska zastopanost posameznih barvil oziroma vrsta barvil je sortna lastnost, saj večina kakovostnih rdečih sort vsebuje dovolj barvnih snovi, medtem ko sorte za cviček in rdeči bizeljčan vsebujejo premalo barvnih snovi.

Topnost antocianov se močno poveča s porastom alkohola. Zato je treba pri maceriranju drozge doseči čim hitrejši začetek alkoholnega vrenja in s tem hitrejšo difuzijo barvila iz kožice v mošt (Šikovec, 1993).

Neflavonoidni fenoli (fenolkarbonske kisline)

V skupino neflavonoidnih fenolov spadajo:

- derivati benzojeve skupine (*p*-hidroksi benzojeva, vanilinska, galna, siringinska, salicilna kislina) in
- derivati cimetine kisline (*p*-kumarna, kavna, ferulična, kina kislina).

Fenol-karbonske kisline se v grozdju nahajajo v obliki estrov v celičnih vakuolah v grozdni jagodi. Med predelavo grozdja in med staranjem vina poteče delna hidroliza teh estrov, zato so fenol-karbonske kisline v vinu tako v prosti kot v vezani obliki (Jackson, 1993).

Taninski fenoli

To so tiste fenolne spojine, ki dajejo vinu grenak in trpek okus. So polimeri flavonoidnih in neflavonoidnih fenolov, njihova molekulska masa je večja od 500 Da. Delijo se na hidrolizirane in kondenzirane tanine.

- hidrolizirani tanini so produkti galne in elagove kisline s sladkorji, predvsem glukozo in so poznani kot galotanini in elagotanini.
- kondenzirani tanini: sem spadajo derivati flavana, to so katehini in levkoantociani. V procesu polimerizacije se lahko pojavijo kot polimeri enega ali drugega flavana in kot proantocianidini, ki so produkt medsebojne polimerizacije molekule katehina in molekule levkoantociana. Zanje je značilna izrazita trpkost in grenkoba (Jackson, 1993).

Rdeča vina vsebujejo dosti taninov, saj se izločijo skupaj z barvnimi snovmi med procesom maceracije, medtem ko jih pri belem vinu ni.

2.2.6 MINERALNE SNOVI

Vinska trta črpa mineralne snovi iz tal in jih razporeja v posamezne organe, kjer so potrebne. V skupnem ekstraktu vina mineralne snovi predstavljajo negorljiv ostanek po izparevanju ali žarjenju mošta oz. vina.; njihov delež mora biti vsaj 10 %. Kar je manj kaže na potvorbo vina oziroma dodatek vode. V pepelu mošta in vina prevladujejo med kationi (520-1064 mg/L) kalij, kalcij, magnezij, natrij in železo, med anioni (802-1838 mg/L) pa sulfati, karbonati, fosfati in kloridi.

Od mikroelementov pa v vinu zasledimo še aluminij, argon, svinec, brom, fluor, jod, kobalt, baker, litij, mangan, nikelj, zlato, stroncij, vanadij, cink itd. Vrednosti mineralnih snovi se v vinu gibljejo od 1,8 do 4 g/L.

Količina pepela oz. mineralnih snovi je odvisna od geografskega porekla, sorte, letnika, vrste tal, obremenitve in oskrbe vinske trte, od stopnje zrelosti in celotne vinifikacije (Vodovnik T. in Vodovnik A.,1999).

Med alkoholnim vrenjem in pri stabilizaciji vina se nekaj mineralnih snovi izloči, predvsem kot kalijev in kalcijev tartrat. Mineralne snovi pomembno pripevajo k polnosti okusa vina in posledično višjo senzorično oceno. Njihova prisotnost v moštu pa je še posebej pomembna za kvasovke in izgradnjo lastne strukture.

2.2.7 DUŠIKOVE SPOJINE

Razdelimo jih na:

- organske spojine: aminokislina, polipeptidi, beljakovine, amidi in amini,
- anorganske spojine: amoniak in nitrat v koncentraciji do 200 mg/L.

Vsebnost anorganskega dušika se v začetku alkoholnega vrenja zmanjša, saj ga porabijo kvasovke za svoje razmnoževanje in razvoj. Šestdeset do osemdeset odstotkov skupnega dušika pa predstavljajo beljakovine. Najbolj zastopani so termolabilni albumini, ki jih je potrebno pred stekleničenjem vina odstraniti zaradi njihovega koloidnega značaja. Termostabilni globulini pa se izločijo že med hlajenjem pri stabilizaciji vina na vinski kamen.

Aminokislina predstavljajo od 10 do 25 % skupnega dušika in so nosilci buketnih in aromatičnih snovi in so zato odločilne pri končni kakovosti vina. Najbolj zastopane naslednje aminokislina: prolin, arginin, alanin, treonin in glutaminska kislina.

Amini nastajajo z dekarboksilacijo ustreznih aminokislina, med katerimi je najbolj problematičen histamin, ki se lahko tvori pri biološkem razkisu.

Vsebnost dušikove snovi v moštu se giblje med 0,3 do 1,4 g/L in je odvisna od sorte in letnika. Vina dobrih letnikov z veliko sonca v fazi rasti so siromašnejša na dušikove snoveh v primerjavi z letniki z malo sonca. Med alkoholnim vrenjem pride

vedno do zmanjšanja dušikovih snovi, po končanem alkoholnem vrenju pa se količina skupnega dušika poveča zaradi avtolize kvasovk. Dušikove snovi se zmanjšajo tudi med potekom biološkega razkisa, ker jih mlečnokislinske bakterije porabijo za svojo celično izgradnjo.

2.2.8 AROMATIČNE SNOVI

S stališča sensorike je aroma olfaktorno-degustatorski skupni vtis, ki ga izzovejo naša čutila. Lahko hlapne sestavine zaznamo neposredno z vonjem, ko zavrtimo vino v kozarcu, označimo jih kot cvetico ali buket vina. Manj hlapne sestavine pa se sprostijo šele v ustni votlini zaradi višje temperature in med kroženjem vina po ustih zaradi mehničnega učinka. Te sestavine se spojijo s hlapnimi, ki smo jih zaznali neposredno z vonjem ter jih označujemo s pojmom celotne arome. Pri klasifikaciji aromatičnih komponent vina razlikujemo med:

- primarno ali grozdno aromo: spojine, ki so v nepoškodovani grozdni jagodi,
- sekundarno aromo: spojine, ki se oblikujejo med predelavo grozdja, kjer potekajo kemijske in encimske reakcije,
- terciarno ali fermentacijsko aromo: spojine, ki se oblikujejo med alkoholno fermentacijo,
- zorično aromo: nastane zaradi kemijskih reakcij med zorenjem vina v steklenici.

Najpomembnejše aromatične snovi v vinu so poleg aldehydov, estrov in višjih alkoholov še hlapne kisline, žveplove spojine, terpenske spojine, fenolne spojine, dušikove spojine, laktoni itd.

2.2.8.1 ALDEHIDI

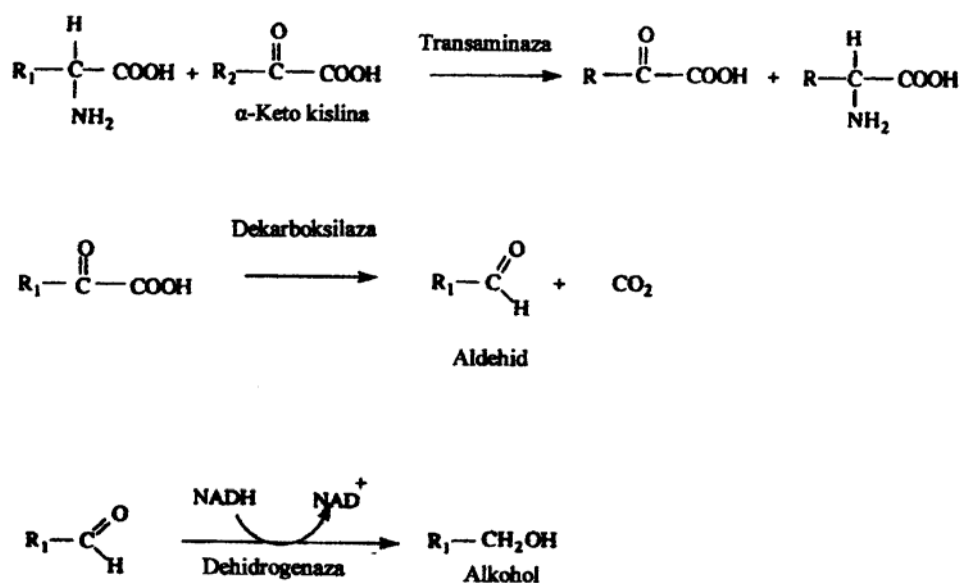
Večina aldehydov nastane v začetni fazi alkoholne fermentacije, verjetno z oksidacijo alkoholov. Najbolj zastopan v vinu je **acetaldehid**, ki se tvori v organizmu kvasovke iz piruvata in se izloči v vino, če kvasovke nimajo dovolj encima alkohol dehidrogenaze, ki reducira acetaldehid do etanola. Lahko pa nastaja tudi po končani alkoholni fermentaciji s kemično in mikrobiološko oksidacijo etanola. Večje koncentracije acetaldehida so lahko posledica slabe predelave grozdja, slabe zaščite vina pred oksidacijo in slabše kakovosti grozdja. Večje koncentracije nastajajo tudi pri višjih temperaturah fermentacije. Acetaldehid je visoko hlapna spojina z značilno "sherry" aromo in ima pomembno vlogo pri razvijanju barve vina zaradi tvorbe polimernih pigmentov skupaj z antocianini in tanini.

Nekateri sevi mlečnokislinskih bakterij *Oenococcus oeni* in *Lactobacillus* lahko pretvarjajo acetaldehid v očetno kislino in etanol, kar ima lahko za posledico zmanjšanje intenzitete barve vina in zmanjšanje vonja po zelenem. V vinu se nahajajo še furfurool, ki daje vonj po praženem kruhu, metilfurfurool in oksimetilfurfurool.

2.2.8.2 VIŠJI ALKOHOLI

Višji alkoholi, estri in maščobne kisline nastajajo predvsem z delovanjem kvasovk med alkoholno fermentacijo in zato predstavljajo fermentacijsko aromo. Količinsko prevladujejo višji alkoholi, številčno pa estri. Višji alkoholi so alkoholi z večjo molsko maso kot jo ima etanol (Fugelsang, 1997).

Višji alkoholi nastanejo z dekarboksilacijo in redukcijo ustreznih α -ketokislin, ki so produkt preoblikovanja aminokislin po Erlichovi poti ali razgradnje ogljikovih hidratov. Erlichova pot biosinteze višjih alkoholov vključuje tvorbo ketokislin, dekarboksilacijo in redukcijo aldehydov do višjih alkoholov.



Slika 2: Splošni prikaz tvorbe višjih alkoholov iz aminokislin in α -keto kislin (Fugelsang, 1997)

Lee (1983) je ugotovil, da so najpomembnejši višji alkoholi, ki tvorijo 95 % skupnih višjih alkoholov:

- n-propanol,
- n-butanol,
- izobutanol,
- amilni alkohol,
- izoamilni alkohol.

Ostalih 5 % pa predstavljajo naslednji višji alkoholi:

- 1-pentanol,
- heksanol,
- izopropanol.

Višji alkoholi se v vinu nahajajo v koncentracijah med 80 in 540 mg/L; koncentracije do 300 mg/L prispevajo k prijetni aromi vina, medtem ko koncentracije nad 400 mg/L dajo nezaželjeno aromo (Rapp in Mandrey, 1986). Med staranjem vina se nadaljnje tvorijo estri, ki prispevajo k večji sadnosti in polnosti vina.

Mlečnokislinske bakterije med potekom MLF (malolactic fermentation oz. jabolčno-mlečnokislinska fermentacija) pomembno vplivajo na senzorične lastnosti. Iz 2,3-butandiola tvorijo izobutanol, sintetizirajo pa tudi nekatere hlapne metabolite kot so izoamilni alkohol, n-heksanol, 3-n-propanol in 2-feniletanol (Edwards in Peterson, 1994). Vsebnost nekaterih višjih alkoholov se med MLF poveča, to pa je močno odvisno od seva mlečnokislinskih bakterij.

Metanol

Vsebnost metanola v vinu je odvisna od aktivnosti encima pektin metil esteraze, ki odcepi zaestrene metilne skupine na poligalakturonskih verigah pektina. Encimska aktivnost je največja med zorenjem grozdja in pri podaljšani maceraciji. Rdeča vina zato vsebujejo večje koncentracije metanola in sicer od 115-338 mg/L, medtem ko bela vina vsebujejo od 41-72 mg/L metanola. V vinu ni zaželen zaradi toksičnosti (Radovanović, 1986)

1-propanol

Obstaja pozitivna korelacija med koncentracijo 1-propanola in koncentracijo amino kislin. V vinih, katerih grozdje vsebuje več amino kislin so našli tudi večje koncentracije 1-propanola. Tvori se iz produktov metabolizma sladkorjev s kondenzacijo piruvata in acetil CoA, kot tudi po običajni Erlichovi poti, vendar ne iz prekursorja 2-amino butanojske kisline. Koncentracija 1-propanola z naraščajočo temperaturo alkoholne fermentacije pada (Ough in sod., 1966).

Izobutanol

Z naraščajočo temperaturo alkoholne fermentacije narašča tvorba izobutanola. Mlečnokislinske bakterije tvorijo izobutanol iz 2,3-butandiola.

Izoamilni alkohol

Izoamilni alkohol v večjih koncentracijah negativno vpliva na aromo vina. V manjših koncentracijah pa daje vinu posebno sadno in cvetno noto (Selli in sod., 2004). Nastaja med alkoholno fermentacijo vina, je pa tudi produkt metabolizma mlečnokislinskih bakterij.

2-feniletanol

Je še posebej aromatičen alkohol, ki diši po vrtnicah in je nosilec vinske arome. Nastaja iz aminokisline fenilalanin med alkoholnim vrenjem mošta in med biološkim razkisom vina.

2.2.8.3 ESTRI

Estri, kot je etil acetat in etilni estri maščobnih kislin so v veliki meri odgovorni za sadno noto vina. Znano je, da so kvasovke med alkoholno fermentacijo sposobne tvorbe estrov z encimom esteraza in alkohol acetyltransferaza. Nekateri avtorji poročajo o povečanju vsebnosti estrov po končanem biološkem razkisu in posledično večji sadnosti, medtem ko Davis in sod. (1988) poročajo o razgradnji estrov med MLF zaradi esterazne aktivnosti mlečnokislinskih bakterij.

Najbolj pomemben je **etil laktat**, ki nastaja med potekom MLF, in doseže vrednosti do 50 mg/L v rdečih vinih. Vsebnost le tega je močno odvisna od aktivnosti mlečnokislinskih bakterij. Etil laktat daje vinu polnejši okus. Vsebnosti **etil acetata** se povečajo med MLF, vendar vsebnosti večje od 200 mg/L negativno vplivajo na aromo vina. K večji sadnosti prispeva tudi večja vsebnost **izoamil acetatnega estra** po končani MLF.

2.2.8.4 DIACETIL

Diacetil je diketon in izhaja iz metabolizma citronske kisline do katerega pride šele po pretvorbi jabolčne kisline v mlečno, kar se zgodi pri biološkem razkisu. Citronska kislina se razgradi na molekulo oksalacetata in molekulo acetata z encimom liaza. Aktivnost tega encima je povečana v mediju z majhno koncentracijo sladkorjev. Oksalacetat se dekarboksilira v piruvat, iz katerega lahko nastanejo diacetil, acetoin in 2,3-butandiol ali pa laktat, etanol in nadalje sinteza maščobnih kislin. V okolju z limitirajočo koncentracijo sladkorjev, nizkim pH in prisotnostjo rastnih inhibitorjev je metabolizem citronske kisline usmerjen v tvorbo diacetila in acetoina. To pot mlečnokislinske bakterije uporabljajo kot proces detoksifikacije. Nasprotno se pri hitri rasti katabolizem citronske kisline usmerja v tvorbo maščobnih kislin (Ribéreau-Gayon, 2000).

Med potekom MLF se tvori diacetil v obsegu od 1 do 4 mg/L, ki pomembno prispeva k večji polnosti in kompleksnosti arome vina. Večje vsebnosti diacetila (5-7 mg/L) nastajajo med MLF s pediokoki in povzročajo tipično masleno noto (Fleet, 1993).

Z redukcijo diacetila nastajata **acetoin** in **butilen glikol**, ki pa nimata pomembnega vpliva na aromo vina.

2.2.8.5 ŽVEPLOVE SPOJINE

Nastajajo med alkoholno fermentacijo in so drugotnega pomena za cvetico vina, ker nastajajo v majhnih koncentracijah. Imajo pa negativen vpliv na kakovost vina. Najpomembnejša žveplova spojina je vodikov sulfid, ki v večjih koncentracijah povzroča vonj po gnilih jajcih.

Druge pomembne žveplove spojine pa so tioetri (dimetildulfid, dietilsulfid), tioli (etanoltiol, 4-metiltio-1-butanol, 3-metiltio-propanol), tiolani (2-metil-3-tiolanon, 3-metil-3-tiolanol) in estri žveplo vsebujočih kislin (Wondra, 1996).

Vsebnosti metionola lahko narastejo med MLF, vendar ne presežejo mejnih vrednosti 500 µg/L (Ugliano in Moio, 2005).

2.2.8.6 TERPENSKE SPOJINE

Pripadajo sekundarni rastlinski sestavi in imajo pomembno vlogo pri tvorbi sortne arome, njihova biosinteza se začne z acetyl-CoA. Monoterpenke spojine sestavljajo primarno aromo vina in so zato primerne pri sortni karakterizaciji vin (Wondra, 1996). Mlečnokislinske bakterije lahko razgradijo komplekse monoterpenov s sladkorji in sicer z encimom β -glukozidaza.

2.2.8.7 FENOLNE SPOJINE

Tvorijo jih kvasovke, bakterije ali pa nastajajo s hidrolizo višjih fenolov. Hlapna fenola 4-vinil gvajakol in 4-vinil fenol nastajata iz dveh hidroksicimetnih kislin, *p*-kumarne in ferulne kisline z encimsko ali termično dekarboksilacijo. Hlapni fenoli pomembno vplivajo na aromo vina (Rapp, 1988).

Vsebnosti gvajakola, etil fenola, evgenola in vanilina se lahko povečajo po končani MLF zaradi dekarboksilacijske sposobnosti LAB (Selli in sod., 2004).

2.2.8.8 LAKTONI

V vinu nastajajo po različnih metabolnih poteh in imajo v glavnem γ - in δ -mlekulsko strukturo. V večjih količinah nastajajo med staranjem vina in avtolizijo kvasovk. Med potekom MLF se lahko vsebnosti nekaterih laktonov malo povečajo npr. γ -butirolakton, stranski produkt metabolizma α -ketoglutarata, in pantolakton. Vinu dajejo prijetno karamelno noto (Selli in sod., 2004).

2.3 BIOLOŠKI RAZKIS

Biološki razkis vina ali jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo povzročajo mlečnokislinske bakterije (LAB, lactic acid bacteria), ki razgrajujejo jabolčno kislino v milejšo mlečno kislino in ogljikov dioksid. Iz 1 grama L-jabolčne kisline nastane 0,67 grama L-mlečne kisline in 0,33 grama ogljikovega dioksida (Muhar in Košmerl, 2005).

Mlečnokislinske bakterije razvrščamo po karakterju med homofermentativne in heterofermentativne. Med homofermentativne LAB uvrščamo rod *Pediococcus*, ki izkorišča heksoze po EMP poti (Embden-Meyerhof-Parnasova pot), kjer se D-mlečna kislina tvori z redukcijo piruvata, medtem, ko med heterofermentativne LAB uvrščamo rodova *Lactobacillus* in *Oenococcus*, ki poleg D-mlečne kisline in CO₂ tvorita tudi različne koncentracije etanola in očetne kisline (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

MLF, ki običajno sledi alkoholni fermentaciji, lahko poteče spontano z mlečnokislinskimi bakterijami, katerih izvor predstavljajo grozdje in kletarska oprema, ali pa inducirano z dodatkom starter kultur. Spontana MLF je seveda iz zornega kota kletarja bistveno težja in nepredvidljiva, tako potek kot samo vodenje in dokončanje MLF. Rezultati spontane MLF se pogosto odražajo v visokih vrednostih vzporednih produktov kot so povišane hlapne kisline, reduktivne arome v povezavi z večjimi koncentracijami rodu *Pediococcus* in v tvorbi biogenih aminov (Krieger, 2002). Kompleksnost arome, polnost in zaokroženost okusa ter kislinsko ravnotežje so najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na željene senzorične parametre.

Mlečnokislinske bakterije, prisotne na grozdju, moštu ali vinu pripadajo rodovom *Lactobacillus*, *Pediococcus* in *Oenococcus*. Najbolj prilagojena na neugodne pogoje pa je vrsta *Oenococcus oeni*, saj prenese nizke vrednosti pH, nizke vsebnosti hranilnih snovi in visoko vsebnost alkohola v vinu (Bartowsky in sod., 2002a). Pretvorba dikarboksilne jabolčne kisline v monokarboksilno mlečno kislino je pomembna predvsem v severnih vinogradniških področjih, kjer je vsebnost skupnih kislin večja in pH nizek. Vinarji uporabljajo MLF predvsem za doseg željene senzorične kakovosti vina, zaradi tvorbe "novih" aromatičnih snovi, bistveno manj pa zaradi njenega vpliva na zmanjšanje kislosti ali povečanja stabilnosti. Znano je tudi, da nekateri sevi LAB tvorijo neželjene arome, ki spominjajo na surovo maslo, aceton, znoj, vonj po kvasovkah ali po lesu, ki lahko v celoti prekrijejo sadni karakter vina (Košmerl, 2003a).

Zaradi zelo selektivnega okolja različnih moštov in vin, lahko samo nekaj mlečnokislinskih bakterij raste v vinu. Najbolj selektivno delujejo vrednost pH, vsebnost SO₂ in etanola, pomembne pa so tudi interakcije med kvasovkami in bakterijami, prisotnost bakteriofagov, temperatura in dostopnost hranil, rastni inhibitorji in ostanki fungicidov. Interakcije med kvasovkami in bakterijami se izrazijo predvsem pri koinokulaciji, ko dodamo starter kulture mlečnokislinskih bakterij v mošt skupaj s selekcioniranimi kvasovkami. Na koncu alkoholne fermentacije, ko poteče avtoliza kvasovk in se začno sproščati vitamini, dušikove spojine, peptidi in proste aminokislinske, le-te pripomorejo kot rastni faktorji za mlečnokislinske bakterije.

Raziskave kažejo, da imajo takšna vina bolj saden karakter, večjo kompleksnost arome in manjši mlečnokislinski značaj kot pa vina, kjer poteče MLF po končani alkoholni fermentaciji (Bartowsky in sod., 2002a).

Na rast vplivata pomembno tudi temperatura in etanol. Visoka temperatura zmanjša njihovo toleranco na alkohol, medtem ko pri prenizki temperaturi rastejo zelo počasi in v omejenem obsegu. Optimalna rast v prisotnosti 10 do 14 % alkohola je med 18 in 20 °C. Temperature nad 25 °C lahko popolnoma ustavijo rast (Košmerl, 2004).

Vrsta *Oenococcus oeni* potrebuje za svojo rast tudi aminokislino arginin, cistin, glutaminsko kislino, izoleucin, tirozin in valin (Tracey in Britz, 1989).

Prosti SO₂ v koncentraciji 10 mg/L lahko ubije večino celic vrste *Oenococcus oeni*, medtem ko vezani SO₂ z več kot 30 mg/L zavira njihovo rast in omeji končno gostoto celic. Več kot 50 mg/L skupnega SO₂ pa popolnoma inhibira rast in njihovo aktivnost. Pri končni koncentraciji mlečne kisline nad 3 g/L je nenazadnje tudi rast zelo upočasnjena ali popolnoma onemogočena.

Zaradi večje tolerantnosti prevlada v vinu s pH pod 3,5 vrsta *Oenococcus oeni*, medtem ko sta v vinu s pH nad 3,5 prisotna predvsem *Lactobacillus* in *Pediococcus*. *Oenococcus oeni* lahko tolerira do 14 % alkohola, medtem ko se rast *Lactobacillus plantarum* zaustavi že pri 5-6 % alkohola. Močnejša rast pediokokov ni zaželjena saj vodi v oljno konsistenco vina (vlečljivost ali sluzavost).

Starter kulture mlečnokislinskih bakterij

S primerno pripravo starter kultur vino cepimo minimalno z 10⁶ do 10⁷ CFU/ml. Običajno uporabljamo vrsto *Oenococcus oeni* zaradi njene vsesplošne odpornosti. Z uporabo starter kultur pospešimo MLF ter zmanjšamo potencial kvara z drugimi naravno prisotnimi bakterijami. Tako si zagotovimo kontrolo nad sevom in boljšo kakovost vina s stališča tvorbe neželenih stranskih produktov, zlasti diacetila, acetoina in očetne kisline. Najustreznejši čas za inokulacijo z mlečnokislinskimi bakterijami je takoj po končani alkoholni fermentaciji, da se izognemo neželenim interakcijam med bakterijami in kvasovkami. Bakterijska rast lahko namreč tudi inhibira rast kvasovk, kar vodi v zaustavitev alkoholne fermentacije in kvar vina.

Metabolizem

Vrsta *Oenococcus oeni* uspešneje raste pod strogimi anaerobnimi pogoji. Znano pa je tudi, da večina sevov vrste *Oenococcus oeni* in rodu *Pediococcus* ne izkorišča glicerola za svojo rast, zato med MLF ne pride do zmanjšanja skupnega ekstrakta. Nekateri sevi mlečnokislinskih bakterij pa pretvarjajo glicerol v akrolein, ki je odgovoren za grenkobo nekaterih vin po končani MLF. Katabolizem glicerola se zgodi predvsem pri nizki koncentraciji fermentabilnih sladkorjev v mediju.

V prisotnosti glukoze in glicerola v mediju pa LAB tvorijo majhne količine glicerola- 0,8 g/L na mesec (Ribéreau-Gayon, 2000).

Vse vrste rodu *Oenococcus* potrebujejo za svojo rast nikotinsko kislino, tiamin, biotin in pantotensko kislino. Rast nekaterih mlečnokislinskih bakterij se v vinu pospeši v prisotnosti polisaharidov plesni *Botrytis cinerea*, ki delujejo kot zaščita pred nekaterimi toksičnimi maščobnimi kislinami.

Mlečnokislinske bakterije porabljajo za svojo rast heksoze in pentoze. *Oenococcus oeni* pretvarja heksoze v fosfoketolazni poti, po kateri metabolizirajo pentoze tudi ostale vrste mlečnokislinskih bakterij. Produkta metabolizma pentoz sta laktat in acetat, z metabolizmom heksoz pa nastajajo laktat, etanol in CO₂. Mlečnokislinske bakterije porabljajo glukozo in fruktozo za rast in izgradnjo lastnih struktur (0,3-2 g/L). Pokazatelj metabolizma sladkorjev je nastanek D-mlečne kisline, kar pa lahko vodi tudi v bolezen vina, t.i. mlečnokislinski cik (Fleet, 1993).

Nekateri avtorji navajajo tudi porast vsebnosti glukoze in fruktoze med potekom MLF, kar pripisujejo hidrolizi glikoziliranih komponent ali polisaharidov. Dokazano je namreč, da imajo LAB encim β -glukanazo za razgradnjo polisaharidov, kot je na primer glukan.

LAB so sposobne razgraditi tudi nekatere aldehide. Acetaldehid, kot najbolj pomemben aldehyd v vinu, daje vinu neprijeten vonj po zelenem. Dokazano je bilo, da so nekatere LAB sposobne razgraditi acetaldehyd v etanol in acetat, kar pomembno prispeva k boljši aromi in manjši porabi SO₂ v vinu (Liu, 2002).

Dokazana je tudi β -glukozidazna aktivnost mlečnokislinskih bakterij, s katero se sprostijo monoterpeni in antocianini, vezani na sladkorje z glikozidazno vezjo. Tako vezani monoterpeni so nehlapni in tudi nearomatični. S hidrolizo vezi dobimo hlapne in aromatične monoterpene, sladkorje in antocianine, kar vodi v redukcijo barve (Liu, 2002).

Znano je, da so LAB poleg kvasovk sposobne dekarboksilirati fenolne spojine, kot sta ferulna in p-kumarna kislina, v hlapne fenole (npr. 4-etilgvajakol in 4-etilfenol). Ti hlapni fenoli imajo lahko pozitiven ali negativen vpliv na aromo vina, kar je odvisno od njihove koncentracije. Sposobnost katabolizma fenolnih spojin imajo predvsem laktobacili in pediokoki, medtem ko za druge mlečnokislinske bakterije to še ni dokazano (Liu, 2002).

Estri, kot je etil acetat in etilni estri maščobnih kislin so v veliki meri odgovorni za sadno noto vina. Znano je, da so kvasovke med alkoholno fermentacijo sposobne tvorbe estrov z encimom esteraza in alkohol acetyltransferaza. Za LAB prisotnost tega encima še ni potrjena, kljub temu, da raziskave kažejo povečanje vsebnosti nekaterih

estrov tekom MLF. Povečajo se predvsem vsebnosti naslednjih estrov: etil acetat, etil laktat, etil heksanoat in etil oktanoat. Zanimivo pa je, da se vsebnosti nekaterih estrov tekom MLF povečajo, medtem ko se vsebnosti drugih estrov zmanjšajo med potekom MLF, kar se pripisuje hidrolizi maščobnih kislin in kemijski esterifikaciji (Liu, 2002).

Raziskave kažejo, da imajo nekatere LAB sposobnost razgradnje maščobnih kislin z lipazami. To v veliki meri negativno vpliva na aromo vina, saj so sproščene maščobne kisline zaznavne že v zelo majhnih koncentracijah (Liu, 2002).

Proteolitična aktivnost LAB ni močno razširjena med oenokoki, je pa odvisna od seva LAB. Ni še povsem pojasnjen vpliv proteolize na aromo vina, vendar pa je znan negativen vpliv na stabilnost takega vina (Liu, 2002).

Osnovne reakcije mikrobnega katabolizma aminokislin vključujejo dekarboksilacijo, transaminacijo, deaminacijo in odstranitev žvepla. Produkti katabolizma aminokislin z mlečnokislinskimi bakterijami so aldehidi, alkoholi, kisline in amini, ki imajo značilen vpliv na aromo vina. Vsebnost nekaterih višjih alkoholov se tako močno poveča med MLF, medtem ko se vsebnost drugih ali zmanjša ali ne spremeni bistveno (Liu, 2002).

Dejstvo je, da nekateri sevi *Oenococcus oeni* lahko tvorijo tudi biogene amine, ki so lahko toksični za človeka v odvisnosti od koncentracije in človekove občutljivosti. Najbolj toksičen biogen amin je gotovo histamin, katerega toksičnost je še potencirana v prisotnosti ostalih biogenih aminov kot je putrescin. Le-ta nastaja z dekarboksilacijo ornitina, ta pa nastane z degradacijo arginina, ene izmed najbolj zastopanih aminokislin v vinu in moštu. Razpad arginina poteka preko arginin-deaminazne poti, kjer sodeluje kompleks treh encimov. Pri nekaterih sevih je bila ta aktivnost inhibirana pri vrednost pH-ih nižjih od 3,6, medtem ko je pri drugih sevih razgradnja arginina in tvorba ornitina potekala še pri vrednost pH-ja 3,3 (Mangani in sod., 2005).

Oenococcus oeni metabolizira citronsko kislino do diacetila, acetoina in 2,3-butandiola. Pomemben je predvsem diacetil zaradi svoje značilne maslene note. Višje koncentracije diacetila (5 do 7 mg/L) niso zaželjene v vinu, medtem ko v manjših koncentracijah pripomore k boljši kakovosti vina (Krieger, 2002).

V anaerobnih pogojih se pretvarjajo piruvat, acetaldehid in α -ketoglutarat ob tvorbi etanola in očetne kisline. Omenjene spojine so znani porabniki žvepla, zato vina po končani MLF potrebujejo manjše količine SO₂ za zaščito.

Vpliv MLF na senzorične lastnosti vina

Raziskave kažejo pozitiven vpliv MLF na kompleksnost arome vina. Vina z opravljenim biološkim razkiso imajo večjo sadnost in polnost z zmanjšanim priokusom po zelenem, verjetno zaradi razgradnje aldehydov. Večja sadnost izvira iz tvorbe estrov, medtem ko maslena nota izvira iz tvorbe diacetila, ki v manjših koncentracijah pripomore k večji polnosti in boljšemu telesu vina. Vpliv MLF na aromo vina je odvisen od seva LAB, sorte vina in pogojev MLF (Liu, 2002).

2.4 NAMEN NALOGE

Namen diplomske naloge je ugotoviti vpliv biološkega razkisa na nastanek hlapnih komponent in s tem na samo kakovost in specifičnost arome vina. Biološki razkis smo spremljali v 5 do 10 litrnih fermentacijskih posodah na sorti Modra frankinja in nato opravili ustrezne kemijske analize. Biološki razkis smo vodili pri dveh različnih temperaturah (24 in 16° C), z dvema sevoma mlečnokislinskih bakterij (α mlečnokislinske bakterije UVAFERM in mlečnokislinske bakterije L31 LALVIN), rezultate smo primerjali z vinom brez biološkega razkisa in z vinom, kjer je stekel spontani biološki razkis. S poskusom smo želeli doseči optimalen proces biološkega razkisa in dosego boljše kakovosti vina z bolj polnim okusom, harmonijo in ustrezno sestavo hlapnih komponent.

2.5 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo razlike pri fizikalno-kemijskih in senzoričnih parametrih med vzorci z opravljenim biološkim razkiso pri različnih pogojih in z različnimi sevi mlečnokislinskih bakterij v primerjavi z vzorci vin brez biološkega razkisa in vzorci s spontanim biološkim razkiso. Predvidevamo tudi, da bo biološki razkis lažje in hitreje potekal pri ustrežnejši, tj. višji temperaturi.

3 MATERIAL IN METODE

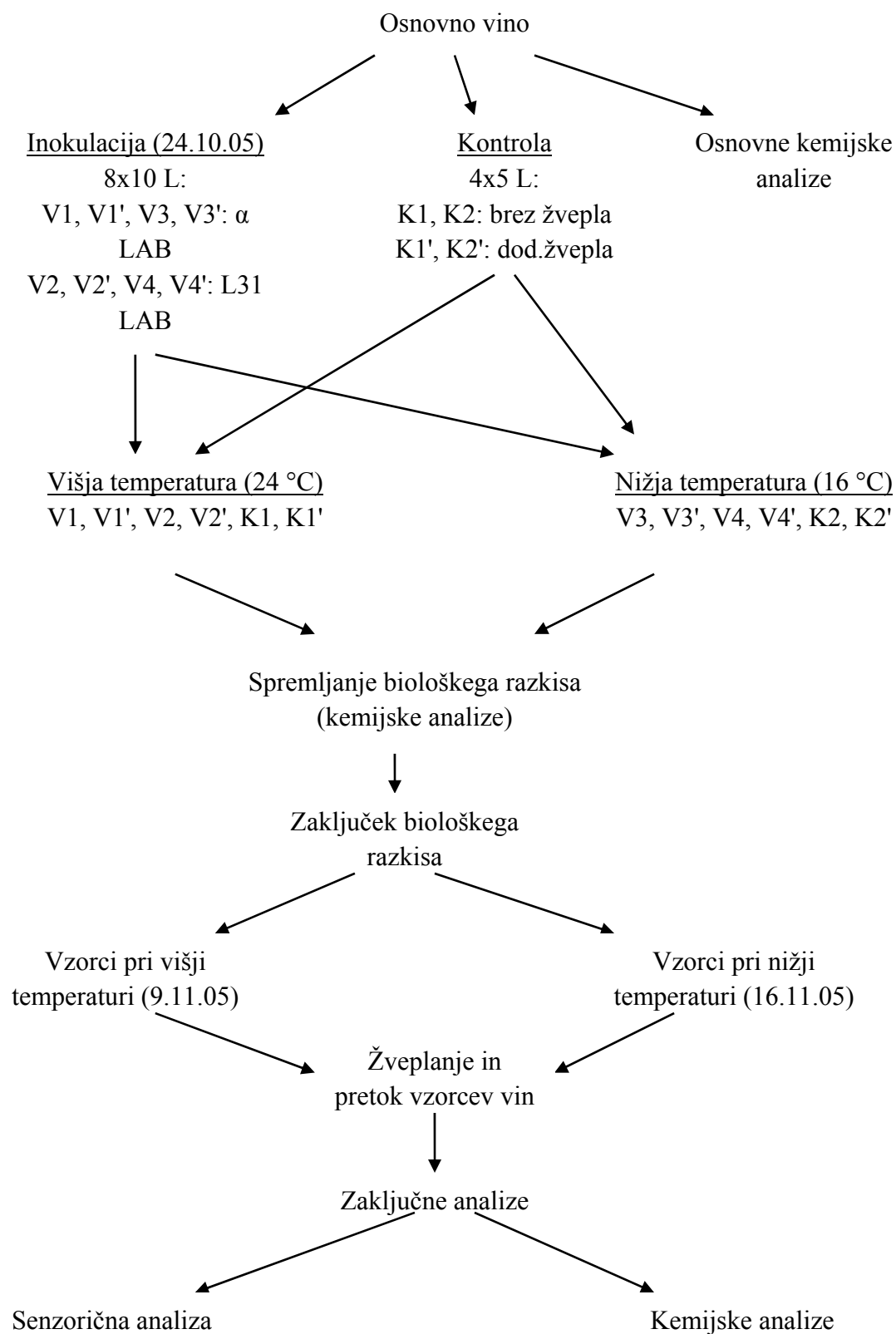
3.1 ZASNOVA POSKUSA

Poskus biološkega razkisa smo izvedli na vinu sorte modra frankinja, pridelanem v belokranjskem vinorodnem okolišu in sicer v KZ Metlika, Vinska klet Metlika. Poskus smo izvedli po končani alkoholni fermentaciji, ko vino še ni bilo žveplano in pretočeno. Potek poskusa biološkega razkisa je prikazan na sliki 3.

V vzorce smo dodali različne seve mlečnokislinskih bakterij vrste *Oenococcus oeni*. V vzorce V1, V1', V3 in V3' smo tako dodali α LAB (mlečnokislinske bakterije) UVAFERM in v vzorce V2, V2', V4 in V4' L31 LAB LALVIN. Vzorca K1' in K2' predstavljata kontrolo poskusa zaradi dodatka žvepla, da smo preprečili morebiten potek biološkega razkisa. V vzorca K1 in K2 pa nismo dodali žvepla, ker smo želeli, da poteče spontan biološki razkis, kar se je kasneje tudi potrdilo.

V poskusu smo želeli ugotoviti tudi vpliv temperature na potek biološkega razkisa, zato smo vzorce razdelili v dva prostora. V prostor z višjo temperaturo (24 °C) smo dali vzorce V1, V1', V2, V2', K1 in K1'. V prostor z nižjo temperaturo (16 °C) pa vzorce V3, V3', V4, V4', K2 in K2'. Tako smo imeli v vsakem prostoru vzorca z α LAB, vzorca z L31 LAB, kontrolo in vzorec brez žvepla. Vzorca z oznako ' predstavljajo paralelko.

Pri poskusu nas je zanimal predvsem vpliv temperature na potek biološkega razkisa in pa vpliv različnih sevov mlečnokislinskih bakterij na senzorično kvaliteto vina. Pred inokulacijo smo naredili osnovne kemijske analize vina. Biološki razkis smo spremljali tedensko s kemijskimi analizami vrednosti pH in titrabilnih kislin ter s papirno kromatografijo, kjer smo zasledovali nastanek mlečne kisline. Vmes pa smo tudi vzeli vzorce za analizo organskih kislin, sladkorjev in glicerola s HPLC. V vzorcih, ki so bili izpostavljeni višji temperaturi, je bil biološki razkis praktično zaključen v 16 dneh, medtem ko so vzorci, izpostavljeni nižji temperaturi, zaostajali 7 dni in je bil tam biološki razkis zaključen po 23 dneh. Po zaključku biološkega razkisa smo vzorce vin žveplali in pretočili, nato pa opravili še zaključne kemijske analize in senzorično analizo vzorcev vin.



Slika 3: Prikaz poteka poskusa

3.2 METODE DE LA

Analize smo opravili na Katedri za vinarstvo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Kemijske analize smo opravili v vinu pred začetkom poskusa (brez biološkega razkisa), med samim spremljanjem biološkega razkisa in po končanem biološkem razkisu. V vinu pred začetkom poskusa smo opravili naslednje analize:

- vrednost pH,
- vsebnost skupnih (titrabilnih) kislin,
- vsebnost alkohola,
- vsebnost skupnega žvepla,
- vsebnost skupnih fenolov,
- analize barvnih parametrov,
- analize organskih kislin, sladkorjev in glicerola s HPLC,
- analize višjih alkoholov in estrov s plinsko kromatografijo,
- vsebnost hlapnih kislin,
- ostanek sladkorja.

Biološki razkis smo spremljali tedensko z analizami vrednosti pH, skupnih titrabilnih kislin, analizami s HPLC in s papirno kromatografijo. Po končanem biološkem razkisu smo v vzorcih opravili naslednje analize:

- vrednost pH,
- vsebnost skupnih (titrabilnih) kislin,
- analize organskih kislin, sladkorjev in glicerola s HPLC,
- analize višjih alkoholov in estrov s plinsko kromatografijo,
- vsebnost alkohola,
- vsebnost skupnih fenolov,
- analize barvnih parametrov,
- vsebnost hlapnih kislin,
- senzorična analiza.

3.2.1 KEMIJSKE ANALIZE VINA

3.2.1.1 DOLOČANJE VREDNOSTI pH (Košmerl in Kač, 2003)

Merjenje vrednosti pH temelji na merjenju razlike v potencialu med dvema elektrodama, ki sta potopljeni v vzorec mošta ali vina. Referenčna elektroda ima stalen potencial, druga, steklena elektroda pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H_3O^+ ionov v raztopini. Uporabljali smo kombinirano stekleno elektrodo. Uporabili smo pH meter znamke Mettler Toledo DL 50 graphix, ki smo ga predhodno umerili z dvema pufnima raztopinama in nato izmerili vzorcu vrednost pH.

3.2.1.2 DOLOČANJE SKUPNIH (TITRABILNIH) KISLIN (Košmerl in Kač, 2003)

Metoda temelji na potenciometrični titraciji skupnih kislin z močno bazo do končne točke pH 7,00 kot jo definira Mednarodni urad za trto in vino (O.I.V.) oziroma do končne točke pH 8,20 kot jo definira AOAC (The Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists). Uporabili smo pH meter znamke Mettler Toledo DL 50 graphix, kjer smo izvedli dvotočkovno titracijo do pH=7 in pH=8,2.

Masno koncentracijo skupnih titrabilnih kislin, izraženo v g vinske kisline/L, izračunamo po naslednji formuli:

$$TK(g/L) = \frac{a \cdot c \cdot M}{v \cdot 2} \quad \dots(1)$$

a...poraba titranta

c...koncentracija baze (0,1 M)

M...molska masa vinske kisline (150,09 g/mol)

v...volumen vzorca (25 ml)

2...molsko razmerje kemijske reakcije med NaOH in vinsko kislino

3.2.1.3 DOLOČANJE RELATIVNE GOSTOTE, SKUPNEGA EKSTRAKTA IN ALKOHOLA (Košmerl in Kač, 2003)

Relativna gostota je razmerje med gostoto vina pri 20 °C in gostoto vode pri enaki temperaturi. Skupni ekstrakt vina sestavljajo po definiciji O.I.V. pri 100 °C nehlapne komponente vina (sladkorji, fiksne kisline, organske soli, idr.). Ekstrakt brez sladkorja je po definiciji razlika med ekstraktom in reducirajočimi sladkorji.

Alkohol v vinu je etanol, ki nastane kot glavni produkt alkoholnega vrenja s kvasovkami iz glukoze in fruktoze v moštu.

Meritve smo opravili na aparaturi znamke Mettler Toledo DE 45 Density meter, kjer smo odčitali relativno gostoto vzorca in alkoholnega destilata ter vsebnost alkohola.

Relativno gostoto skupnega ekstrakta izračunamo po AOAC s pomočjo Tabariéjevega obrazca:

$$d_{SE} = d_V - d_A + 1,0000 \quad \dots(2)$$

d_V ...relativna gostota vzorca vina

d_A ...relativna gostota alkoholnega destilata

Na podlagi znane relativne gostote d_{SE} iz tabele odčitamo masno koncentracijo skupnega ekstrakta v vinu (g skupnega ekstrakta/L vina).

3.2.1.4 DOLOČANJE REDUCIRAJOČIH SLADKORJEV PO REBELEINU (Košmerl in Kač, 2003)

Prevladujoča sladkorja v grozdju, moštu in vinu sta glukoza in fruktoza. Popolnoma suha vina vsebujejo približno 1 g/L reducirajočih sladkorjev.

Fehlingov reagent kvantitativno oksidira reducirajoče sladkorje v karboksilne kisline. S segrevanjem do vrenja poteče v reakcijski zmesi oksidacija reducirajočih sladkorjev v kisline, dvovalentni bakrov ion iz reakcijske zmesi pa se reducira do enovalentnega bakrovega oksida, ki se izloči iz raztopine kot oborina. Preostali Cu^{2+} ioni se v raztopini kalijevega jodida v kislem reducirajo, nastali jod pa titrimetrično določimo z raztopino natrijevega tiosulfata v prisotnosti škrobovice kot indikatorja. Koncentracijo reducirajočih sladkorjev (g/L) odčitamo direktno iz birete ob upoštevanju slepega vzorca (to vrednost odštejemo od rezultata)

3.2.1.5 DOLOČANJE ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA V VINU PO RIPPERJU (Košmerl in Kač, 2003)

Določanje prostega in skupnega žveplovega dioksida po Ripperjevi metodi temelji na oksidacijsko-redukcijski reakciji z raztopino joda. Za določitev prostega SO_2 vzorec vina najprej nakisamo z dodatkom žveplove(VI) kisline in s tem zmanjšamo oksidativni vpliv vina pri titraciji z raztopino joda. Jod oksidira žveplove(IV) kislino v žveplove(VI) kislino in v končni točki titracije prebitna količina joda obarva raztopino modro. Za določitev koncentracije skupnega SO_2 pa vzorcu vina najprej dodamo 1 M raztopino NaOH, da dosežemo hidrolizo vezanega SO_2 . Nato sledi dodatek ostalih reagentov in jodometrična titracija kot pri določanju prostega SO_2 .

Koncentracijo prostega SO₂ izračunamo po naslednji formuli:

$$C_{SO_2}(\text{mg/l}) = \frac{a \cdot c \cdot M \cdot 1000}{v \cdot n} \quad \dots(3)$$

a...volumen standardizirane raztopine joda (ml)

c...koncentracija joda (0,01 M)

M...molska masa SO₂ (64 g/mol)

n...molsko razmerje kemijske reakcije med jodom in žveplovim dioksidom (n=1)

v...volumen vzorca (25 ml)

Koncentracijo skupnega SO₂ (mg/l) izračunamo na enak način kot koncentracijo prostega SO₂.

3.2.1.6 DOLOČANJE HLAJNIH KISLIN (Košmerl in Kač, 2003)

Hlapne kisline v vinu so predvsem mravljična, očetna in butanojska kislina. Te določimo titrimetrično s standardizirano vodno raztopino NaOH v destilatu vina po destilaciji z vodno paro (destilacijska naprava D.E.E. Gibertini). Rezultat izrazimo kot očetno kislino (g/L). V destilat ne preidejo mlečna, jantarna ali sorbinska kislina, niti ogljikov dioksid ali žveplova(IV) kislina. Manjše količine hlapnih kislin nastajajo kot stranski produkt med alkoholnim vrenjem vina in pa pri biološkem razkisu, kjer nastaja predvsem očetna kislina kot posledica razgradnje citronske kisline. Napaka in bolezen vina (očetnokislinski ton in cik) sta senzorično zaznavna v vonju že pri koncentraciji okrog 0,6-0,9 g očetne kisline /L, kar je manj kot zakonsko dovoljena maksimalna koncentracija.

Koncentracijo hlapnih kislin, izraženo kot masno koncentracijo očetne kisline (g/L), izračunamo po naslednji formuli:

$$HK(\text{g/L}) = a \cdot c \cdot M \cdot \left(\frac{50}{1000} \right) \quad \dots(4)$$

HK...koncentracija hlapnih kislin, izražena kot očetna kislina (g/L)

a...poraba titranta (ml)

c...koncentracija NaOH (0,1 mol/L)

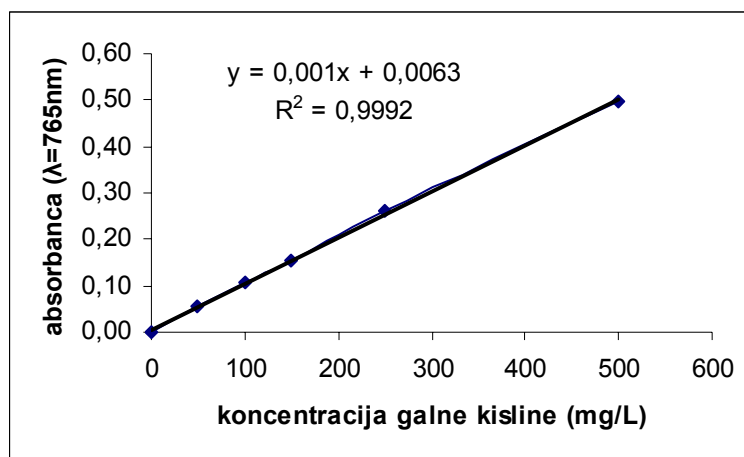
50...razredčitveni faktor

M...molska masa očetne kisline (60,05 g/mol)

3.2.1.7 DOLOČANJE FENOLNIH SPOJIN V VINU PO SINGLETONU IN ROSSIJU (Košmerl in Kač, 2003)

Metoda je spektrofotometrična na podlagi dejstva, da fenolne spojine absorbirajo predvsem svetlobo UV spektra in vidnega spektra. Z merjenjem absorbance pri primerni valovni dolžini lahko ocenimo koncentracijo skupnih fenolov (spektrofotometer Shimadzu, UV-160A).

V vzorec dodamo Folin-Ciocalteujev reagent, ki v alkalni raztopini (dodatek natrijevega karbonata) reducira fenolne spojine. Ob prisotnosti fenolatnega aniona poteče redukcija volframata(VI) in molibdata(VI) (reagenta Folin-Ciocalteuja) in raztopina se obarva modro. Raztopina nereducirane oblike je rumene barve. Absorbanco reakcijske mešanice izmerimo pri valovni dolžini 765 nm. Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin odčitamo iz umeritvene krivulje in rezultat izrazimo kot mg galne kisline/L. Galno kislino uporabimo kot standardno referenčno spojino za določanje skupnih fenolnih spojin.



Slika 4: Primer umeritvene krivulje za določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin

3.2.1.8 DOLOČANJE BARVE VINA (Košmerl in Kač, 2003)

Poleg antocianinov v rdečih vinih vsebujejo bela vina tudi sledove nekaterih barvil: klorofila, karotina in ksantofila. V hladnih klimatskih razmerah vsebuje grozdje bistveno več klorofila, ki obarva vino zaznavno zelenkasto v primerjavi s svetlo rumeno do rumenkastorjavo (jantarno) barvo vina, ki pomeni, da sledovi klorofila niso opazni.

V praksi obarvanost vin merimo direktno s spektrofotometrom in sicer merimo absorbanco vzorca pri valovni dolžini 420 nm. V spektru svetlobe od 400-440 nm

izmerimo tudi odtenke rjave barve belih vin. Za določanje barve rdečih vin pa merimo absorbanco pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm, kjer pa je potrebno vzorce vin predhodno razredčiti s puno raztopino, običajno v razmerju 1:10.

pH pufrne raztopine mora biti čim bolj enak pH analiziranega vzorca. Vsota absorbanec predstavlja intenziteto barve, medtem ko razmerje absorbance pri 420 nm in 520 nm pomeni odtenek barve. Uporabili smo spektrofotometer Shimadzu, UV-160A.

Izračuni osnovnih barvnih parametrov

- intenziteta barve (bela vina)

$$I = A_{420} \quad \dots(5)$$

- intenziteta barve (rdeča vina)

$$I = \sum (A_{420} + A_{520} + A_{620}) \quad \dots(6)$$

- ton barve

$$ton = \frac{A_{420}}{A_{520}} \quad \dots(7)$$

- delež (%) rdeče barve, tj. prostih in vezanih antocianinov v obliki flavilijevega kationa

$$dA_F (\%) = \left(A_{520} - \frac{(A_{420} + A_{620})}{2} \right) \cdot \frac{1}{A_{520}} \cdot 100 \quad \dots(8)$$

- delež (%) rdeče barve pri posamezni valovni dolžini

pri 420 nm: $dA_{420} (\%) = \left(\frac{A_{420}}{I} \right) \cdot 100 \quad \dots(9)$

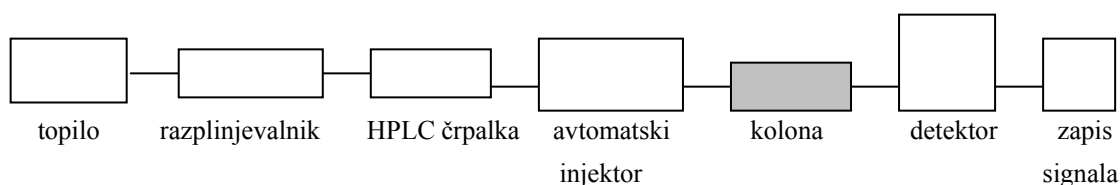
pri 520 nm: $dA_{520} (\%) = \left(\frac{A_{520}}{I} \right) \cdot 100 \quad \dots(10)$

pri 620 nm: $dA_{620} (\%) = \left(\frac{A_{620}}{I} \right) \cdot 100 \quad \dots(11)$

3.2.1.9 DOLOČANJE VSEBNOSTI ORGANSKIH KISLIN, SLADKORJEV IN GLICEROLA S HPLC

Kromatografija je danes najbolj razširjena tehnika ločevanja komponent vzorca, ki omogoča kvalitativno in kvantitativno določanje posameznih snovi v zmesi (Schneider s sod., 1987). Tehnika temelji na porazdelitvi vzorca med mobilno fazo, ki je lahko tekočina ali plin in stacionarno fazo, ki je lahko trdna snov ali tekočina. Razvitih je več kromatografskih metod. Do ločitve komponent pride zaradi različnih fizikalnih ali kemijskih interakcij med vzorcem ter stacionarno in mobilno fazo. Vsebnost organskih kislin smo izmerili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

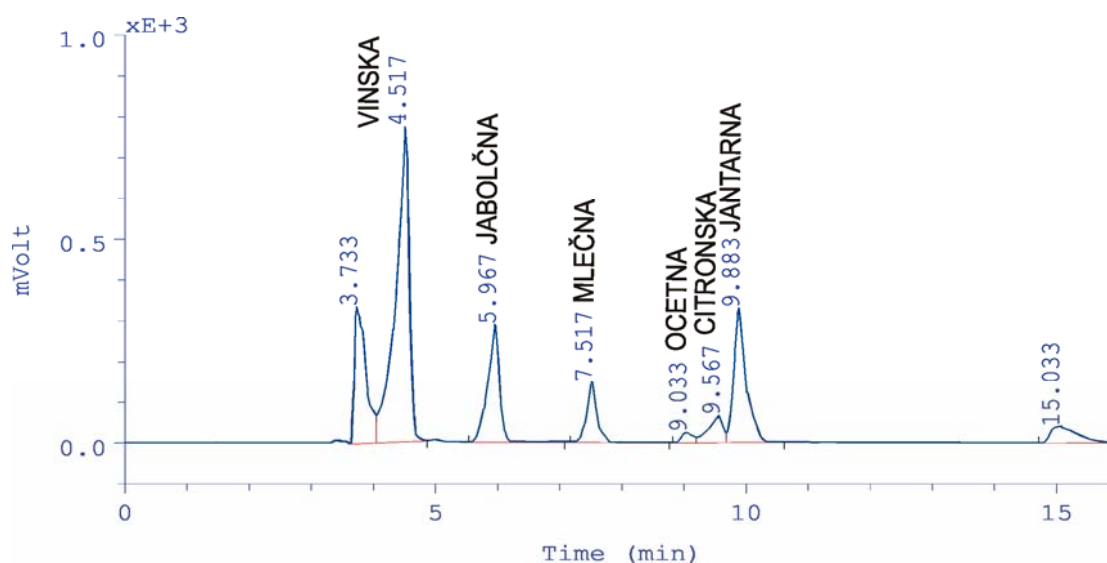
Je izredno hitra zaradi enostavne priprave vzorca (vključuje samo filtracijo), omogoča zadovoljivo ločbo in kvantitativno določitev vinske, jabolčne, citronske, mlečne, očetne, šikimske, piruvične, fumarne in jantarne kisline v moštu in suhem, polsuhem, polsladkem in sladkem vinu. Za določanje sladkorjev (saharoza, glukoza, fruktoza) in glicerola ter etanola je priprava vzorca za bela vina enaka kot pri pripravi vzorca za določanje organskih kislin, medtem ko je za rdeča vina priprava vzorca nekoliko daljša, saj poleg filtracije vključuje še razbarvanje vzorca s pomočjo aktivnega oglja. Opravili smo analize vinske, jabolčne, mlečne in citronske kisline. Določili smo vsebnosti glukoze, fruktoze in glicerola.



Slika 5: HPLC aparatura (Štancar, 1996)

Meritve analiz se avtomatsko shranjujejo v računalniku, ki nam za vzorec izriše kromatogram – to je krivulja, ki opiše odvisnost absorbance (oz. merjene količine) od časa. Nadaljujemo z identifikacijo komponent. Spojine pri znanih kromatografskih pogojih in pri dobri kromatografski ločbi lahko identificiramo z retenzijskim časom (t_r). Retenzijski čas je čas zadrževanja komponente v koloni.

Ko spojine identificiramo, moramo določiti še njihove koncentracije. To storimo z merjenjem površine pod krivuljo oz. merjenjem višine krivulje. S pomočjo teh vrednosti in vrednosti izmerjenih pri standardih (vzorci z znanimi koncentracijami merjenih komponent) lahko izračunamo vsebnosti v vzorcu (Žorž, 1991).



Slika 6: Primer kromatograma za HPLC

Za določanje vsebnosti organskih kislin smo uporabili UV-VIS detektor. Kromatografski pogoji so bili:

- razplinjevalnik: Jour Research, X-Act,
- črpalka: Knauer, Maxi star K-1000,
- kolona: Bio-Rad, Aminex, HPX-87H, dimenzije 300 mm X 7,8 mm,
- mobilna faza: 0,0125 M H₂SO₄,
- pretok mobilne faze: 0,5 mL/min,
- temperatura: 65 °C,
- volumen injiciranja: 20 µL,
- detektor: UV-VIS, Knauer,
- avtomatski podajalec vzorcev: Spark Holland, Marathon-XT,
- zapis signala: programska oprema Eurochrom 2000.

Vsebnost sladkorjev glukoze, fruktoze in poliola glicerola, smo določali z RI detektorjem. Kromatografski pogoji so bili:

- razplinjevalnik: Jour Research, X-Act,
- črpalka: Knauer, Maxi star K-1000,
- kolona: Bio-Rad, Aminex, HPX-87H, dimenzije 300 mm X 7,8 mm,
- mobilna faza: 0,0025 M H₂SO₄,
- pretok mobilne faze: 0,5 mL/min,
- temperatura: 25 °C,
- volumen injiciranja: 20 µL,
- detektor: RI detektor, K-2301, Knauer,
- avtomatski podajalec vzorcev: Spark Holland, Marathon-XT,
- zapis signala: programska oprema Eurochrom 2000.

Pripravimo si pet standardov z različnimi koncentracijami vinske, jabolčne, mlečne, citronske in jantarne kisline ter pet standardov z različnimi koncentracijami saharoze, glukoze, fruktoze in glicerola za pripravo umeritvene krivulje. Zatehte organskih kislin in sladkorjev raztopimo v 10 ml 96 % etanola, ki ga dolijemo v 100 ml bučko in dopolnimo z deionizirano vodo do oznake.

Preglednica 1: Koncentracije organskih kislin v pripravljenih standardih

	S1 (g/100 ml)	S2 (g/100 ml)	S3 (g/100 ml)	S4 (g/100 ml)	S5 (g/100 ml)
Vinska	0,020	0,050	0,100	0,200	0,400
Jabolčna	0,020	0,050	0,100	0,200	0,400
Mlečna	0,020	0,040	0,080	0,150	0,300
Citronska	0,006	0,010	0,020	0,050	0,100
Jantarna	0,006	0,010	0,020	0,050	0,100

Preglednica 2: Koncentracije sladkorjev in glicerola v pripravljenih standardih

	S1 (g/100 ml)	S2 (g/100 ml)	S3 (g/100 ml)	S4 (g/100 ml)	S5 (g/100 ml)
Saharoza	0,012	0,025	0,050	0,100	0,200
Glukoza	0,025	0,050	0,100	0,200	0,400
Fruktoza	0,025	0,050	0,100	0,200	0,400
Glicerol	0,200	0,300	0,400	0,500	0,700

Vzorci, kjer smo določali vsebnost organskih kislin, smo predhodno centrifugirali 10 min na 4000 min^{-1} in jih filtrirali skozi membranski filter velikosti $0,45 \mu\text{m}$. Vzorcem, kjer smo določali vsebnost sladkorjev in glicerola pa smo predhodno dodali aktivno oglje za razbarvanje in šele potem centrifugirali 10 min na 4000 min^{-1} in filtrirali skozi membranski filter velikosti $0,45 \mu\text{m}$. Koncentracije organskih kislin in sladkorjev v vzorcih smo izračunali z merjenjem višine vrhov.

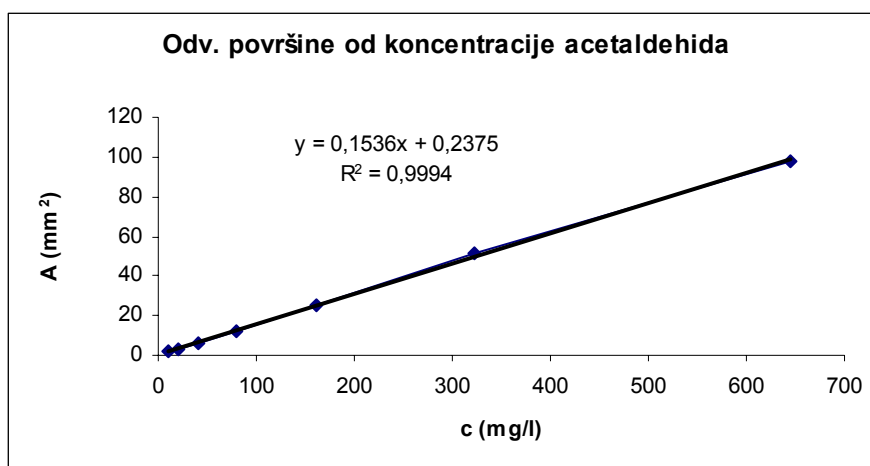
3.2.1.10 DOLOČANJE HLAJNIH KOMPONENT S PLINSKO KROMATOGRAFIJO (GC)

Plinska kromatografija je vrsta kromatografije, kjer mobilno fazo predstavlja inerten nosilni plin (dušik, helij), stacionarno fazo pa ali mikroskopski sloj tekočine ali inerten trden nosilec. Uporablja se za snovi, ki jih lahko uparimo. Osnova plinske kromatografije je različna porazdelitev snovi v plinskem stanju med stacionarno fazo in plinsko mobilno fazo. Vzorce smo predhodno destilirali in nato v destilatu določili vsebnosti hlapnih komponent in višjih alkoholov. Pripravili smo tudi standarde za

umeritveno krivuljo. Koncentracije posameznih komponent v vzorcu smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje ob znanih površinah naših vzorcev.

Kromatografski pogoji so bili:

- kolona: HP FFAP, dimenzije 50 m x 0,2 mm x 0,3 mm,
- začetna temperatura: 40 °C (6 min),
- temperaturni gradient: 25 °C/min,
- končna temperatura: 220 °C (5 min),
- injektor: razdelitev 1:50, 200 °C,
- volumen injiciranja: 1,0 µL,
- tlak 2,18 bar,
- pretok N₂: 45 mL/min,
- detektor: FID, 300 °C,
- pretok H₂: 40 mL/min,
- pretok zraka: 450 mL/min,
- nosilni plin: He, pretok 1mL/min,
- zapis signala in obdelava podatkov: programska oprema GC Chem Station.



Slika 7: Primer umeritvene krivulje za določanje koncentracije acetaldehida

3.2.1.11 DOLOČANJE VSEBNOSTI VINSKE, JABOLČNE IN MLEČNE KISLINE S PAPIRNO KROMATOGRAFIJO

S papirno kromatografijo ločujemo komponente, ki so obarvane ali se dajo obarvati. Topilo potuje navzgor po papirju in s seboj nosi komponente, topne v topilu. Zaradi različne topnosti v topilu in različnih interakcij med papirjem in komponentami, se snovi lahko ločijo. Vidne jih lahko napravimo pod UV svetobo ali z dodatkom ninhidrina. S papirno kromatografijo sem zasledovala jabolčno, mlečno in vinsko kislino v vzorcih, kjer je potekal biološki razkis.

Najprej pripravimo raztopino za razvijanje in sicer tako, da zmešamo 2 dela pripravljene raztopine 1- butanola (500 ml 1-butanola + 0,5 g bromfenol plavi) in 1 del raztopine očetne kisline (1:1). Tako pripravljeno raztopino vlijemo v posodo za razvijanje in pustimo stati vsaj pol ure. Pripravimo tudi standarde in sicer naslednje raztopine kislin:

- vinska kislina (500 mg zatehtamo v 50 ml bučko in dopolnimo do oznake),
- jabolčna kislina (500 mg zatehtamo v 50 ml bučko in dopolnimo do oznake),
- mlečna kislina (odpipetiramo 0,5 ml v 50 ml bučko in dopolnimo do oznake).

Za papirno kromatografijo uporabljamo kromatografski papir višine 13 cm. S stekleno kapilaro nanašamo standarde in vzorce 2 cm od spodnjega roba in z 3 cm presledki, vedno enakega volumna. Standardi si sledijo v zaporedju jabolčna, vinska in mlečna kislina. Po vsakokratnem nanosu kapilaro trikrat izperemo. Ko končamo z nanosi, papir posušimo in ga prenesemo v posodo za razvijanje. Razvijanje je končano, ko topilo doseže nivo 1-1,5 cm pod vrhom. Kromatogram osušimo in odčitamo rezultate.

3.2.2 SENZORIČNA ANALIZA VINA

Senzorično ocenjevanje vina je potekalo po Buxbaumovi 20-točkovni metodi. V ocenjevalni komisiji so bili trije degustatorji, končna senzorična ocena je podana kot povprečna vrednost ocen vseh degustatorjev.

Buxbaumova metoda se odlikuje predvsem v enostavnosti in daje oceno splošnega skupnega vtisa. V Sloveniji je uradno veljavna metoda. Vino lahko dobi od 0 do 20 točk, od tega za:

- bistrost 0 do 2 točk (motno 0 točk, čisto z rahlo opalescenco 1 točka, kristalno bistro 2 točki),
- barvo 0 do 2 točk (vodena, bleda, oksidirana 0 točk, sortno neznačilna 1 točka, sortno značilna 2 točki),
- vonj 0 do 4 točk (z napako 0 točk, neizrazit, nevinski 1 točka, vinski 2 točki, dober vinski 3 točke, z lepo značilno cvetico 4 točke),
- okus 0 do 12 točk (z napako 0 točk, neizrazit ali nečist 1 do 3 točke, tanek, prazen 4 točke, dober vinski 7 do 9 točk, odličen-harmoničen 10 do 12 točk).

Po Pravilniku o postopku in načinu ocenjevanja mošta, vina in drugih proizvodov iz grozdja in vina (2000), poteka senzorično ocenjevanje po dopoljenem 20 točkovnem Buxbaumovem sistemu, kjer ocenjujemo:

- bistrost vina 0-2 točk,
- barva vina 0-2 točk,
- vonj vina 0-4 točk,
- okus vina 0-6 točk,
- harmoničnost vina 0-6 točk.

Po tem Pravilniku lahko vino pridobi naslednje oznake:

- vino, ocenjeno z najmanj 12,1 točke: namizno vino z nekontroliranim geografskim poreklom,
- vino, ocenjeno z najmanj 14,1 točke: namizno vino z geografsko oznako oziroma deželno vino PGO,
- vino, ocenjeno z najmanj 16,1 točke: kakovostno vino z zaščitenim geografskim poreklom oziroma kakovostno vino ZGP ali kakovostno vino,
- vino, ocenjeno z najmanj 18,1 točke: vino, ki ima zaradi ocene v prometu lahko oznako vrhunsko vino ZGP oziroma za uvožena vina ekvivalentno oznako najvišje kakovosti.

Če vino pridobi manj kot 12,1 točke ni primerno za promet.

Pooblaščen organizacija mora zagotoviti, da je prostor, v katerem poteka ocenjevanje, dobro osvetljen, brez hrupa, prezračen, brez vonjav in s temperaturo med 18 in 24 °C.

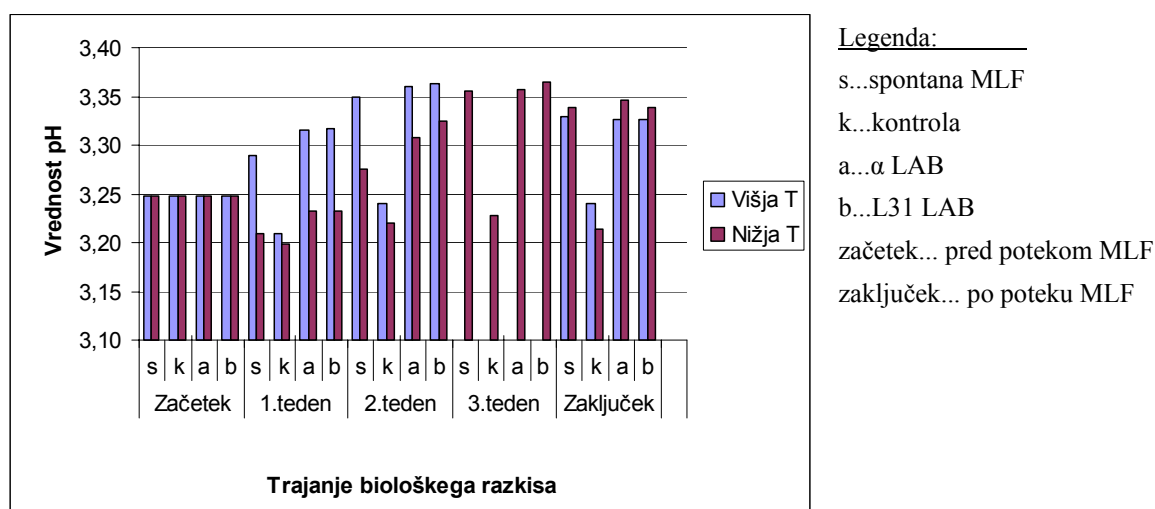
Pokuševalci morajo imeti možnost izplakovanja kozarcev in izpljunjevanja požirkov ter možnost nevtralizacije okusa. Kozarci morajo biti vinski, degustacijski, primerni za posamezno kategorijo vina oziroma žganja. Vzorci rdečih vin morajo biti ocenjeni pri temperaturi 12 do 16 °C.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI KEMIJSKIH ANALIZ VINA

Vino je na začetku, pred potekom biološkega razkisa, vsebovalo 17,4 mg/L skupnega žveplovega dioksida, ostanek sladkorja pa je znašal 2,70 g/L.

4.1.1 VREDNOST pH

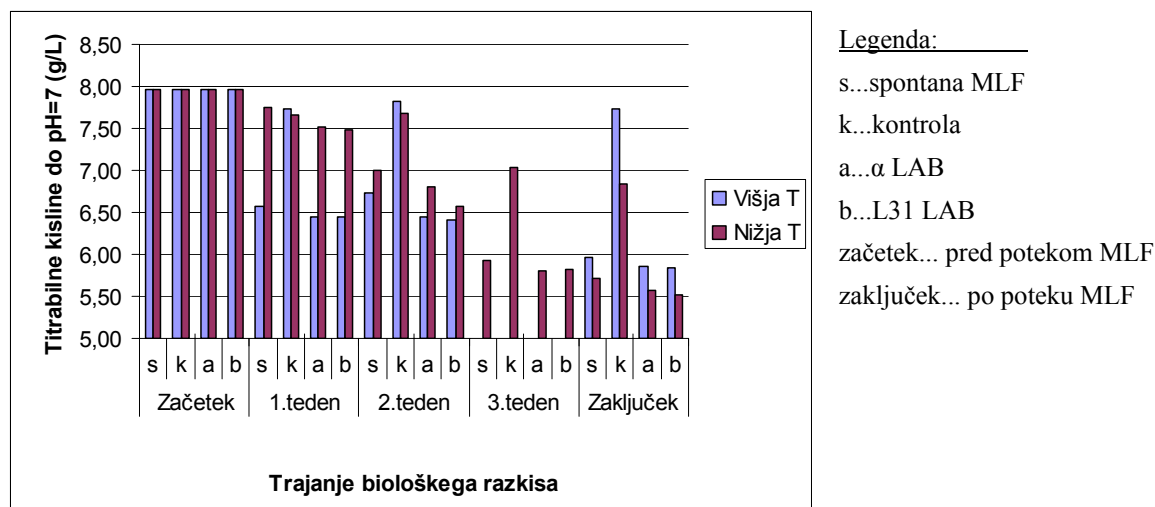


Slika 8: Vrednost pH v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Vzorci pri višji temperaturi smo spremljali dva tedna, vzorce pri nižji temperaturi pa tri tedne, ker je tukaj biološki razkis potekal počasneje (velja tudi v nadaljevanju).

Iz slike 8 lepo vidimo trend naraščanja vrednosti pH v vzorcih, kjer je potekal biološki razkis. To naraščanje je hitrejše v vzorcih, izpostavljenih višji temperaturi.

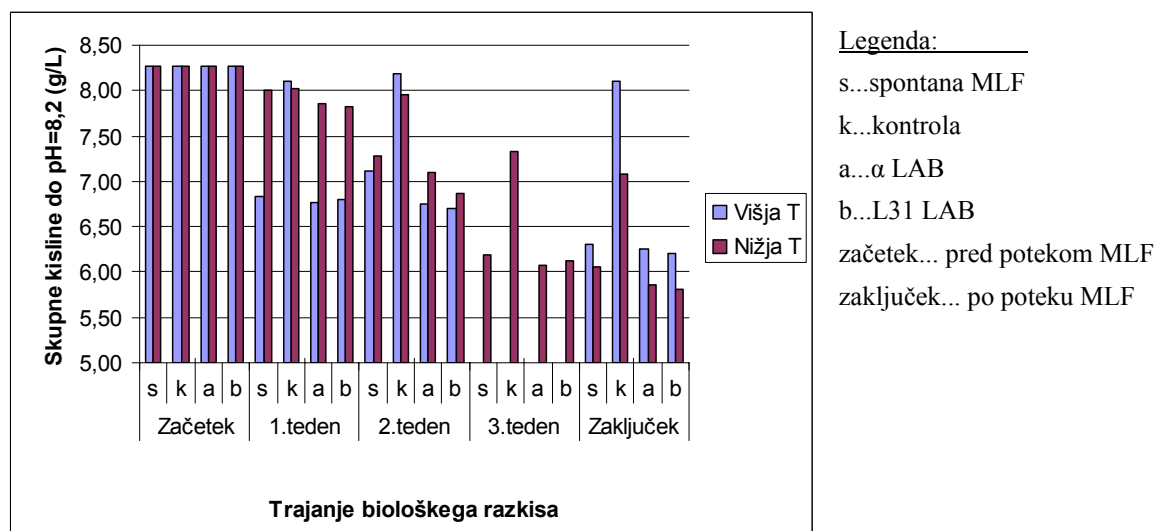
4.1.2 TITRABILNE KISLINE DO pH=7



Slika 9: Vsebnost titrabilnih kislin do pH=7 (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Iz slike 9 lahko razberemo zmanjšanje vsebnosti titrabilnih kislin do pH=7 v vzorcih, kjer je potekal biološki razkis. To zmanjševanje je hitrejše v vzorcih pri višji temperaturi.

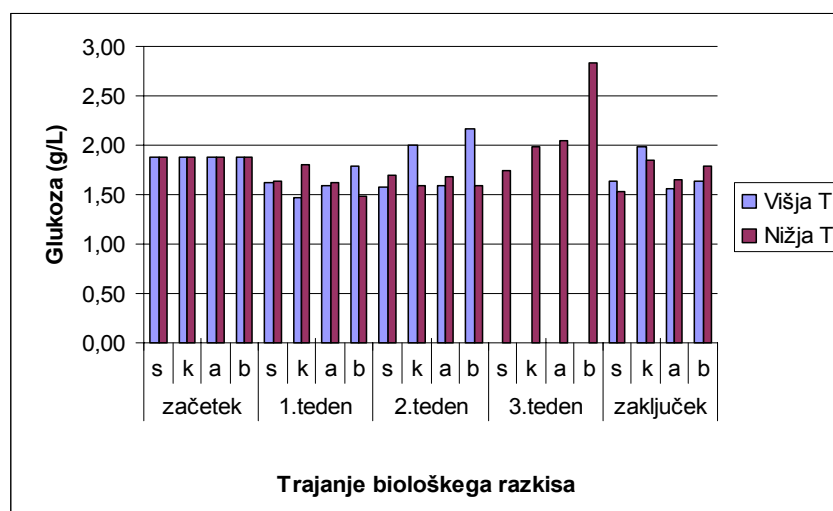
4.1.3 SKUPNE KISLINE DO pH=8,2



Slika 10: Vsebnost skupnih kislin do pH=8,2 (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Iz slike 10 lahko razberemo zmanjšanje vsebnosti skupnih kislin do pH=8,2 v vzorcih, kjer je potekal biološki razkis.

4.1.4 GLUKOZA



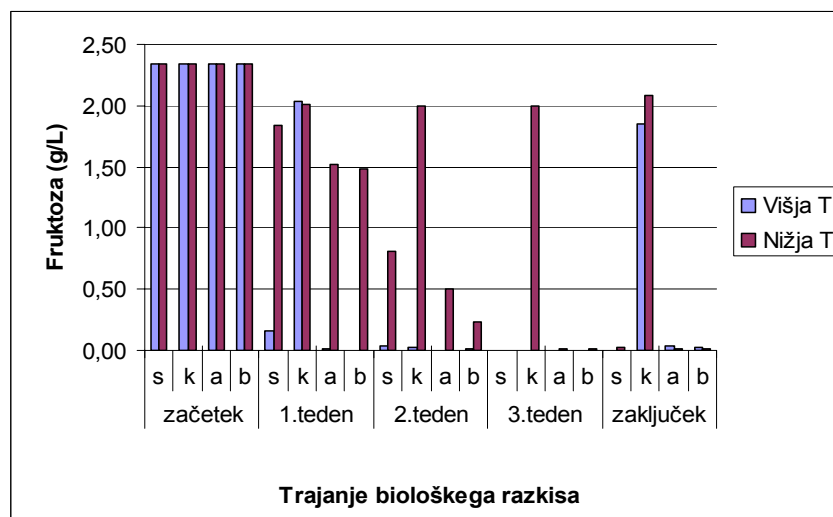
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 11: Vsebnost glukoze (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Vsebnosti glukoze se zmanjšajo tekom trajanja biološkega razkisa, razen v kontrolnih vzorcih, kjer se povečajo oz. ostanejo enake (slika 11).

4.1.5 FRUKTOZA



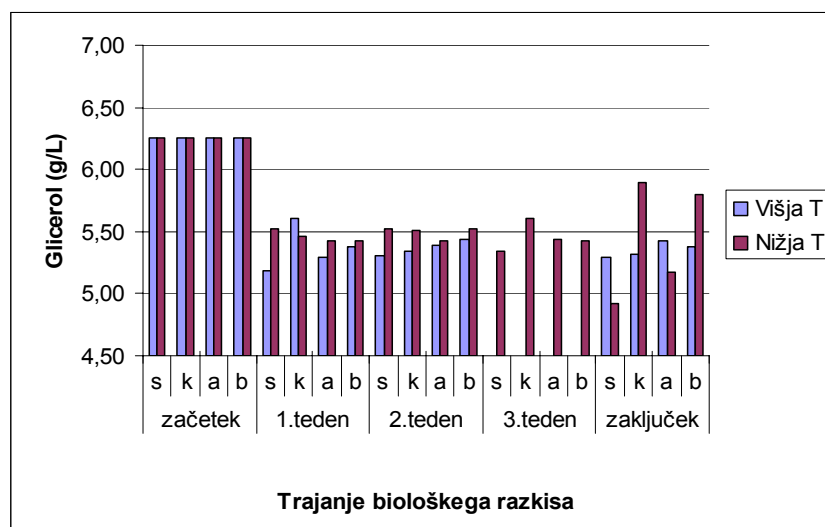
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 12: Vsebnost fruktoze (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Lepo je razvidno zmanjšanje vsebnosti fruktoze v vzorcih z biološkim razkisom v primerjavi z kontrolnima vzorcema. Vsebnosti fruktoze se močno približajo ničli ali jih celo ni več (slika 12).

4.1.6 GLICEROL



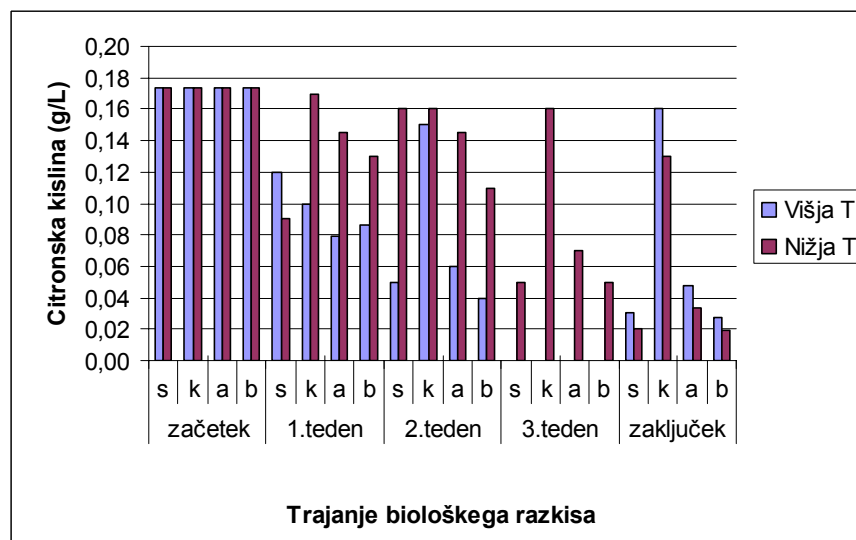
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 13: Vsebnost glicerola (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Vsebnosti glicerola se zmanjšajo tekom trajanja biološkega razkisa, manjše vsebnosti pa so tudi v kontrolnih vzorcih (slika 13).

4.1.7 CITRONSKA KISLINA



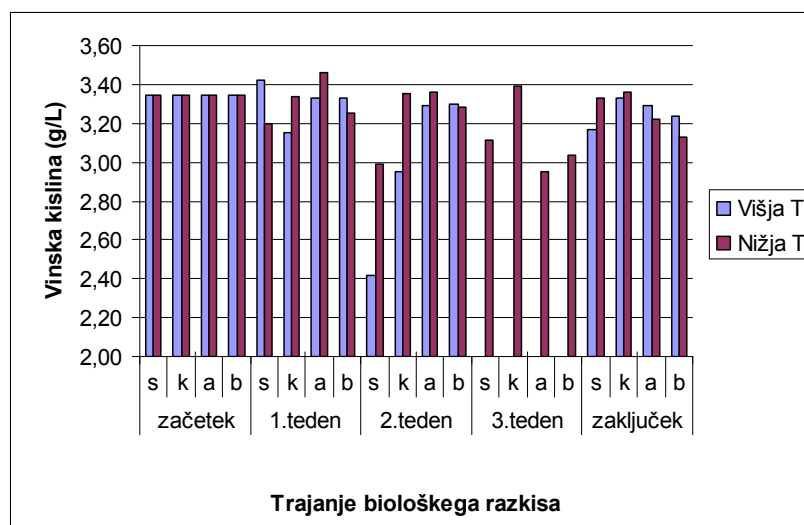
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 14: Vsebnost citronske kisline (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Iz slike 14 vidimo zmanjšanje vsebnosti citronske kisline tekom trajanja biološkega razkisa. V kontrolnih vzorcih ostaja vsebnost citronske kisline približno enaka kot na začetku.

4.1.8 VINSKA KISLINA



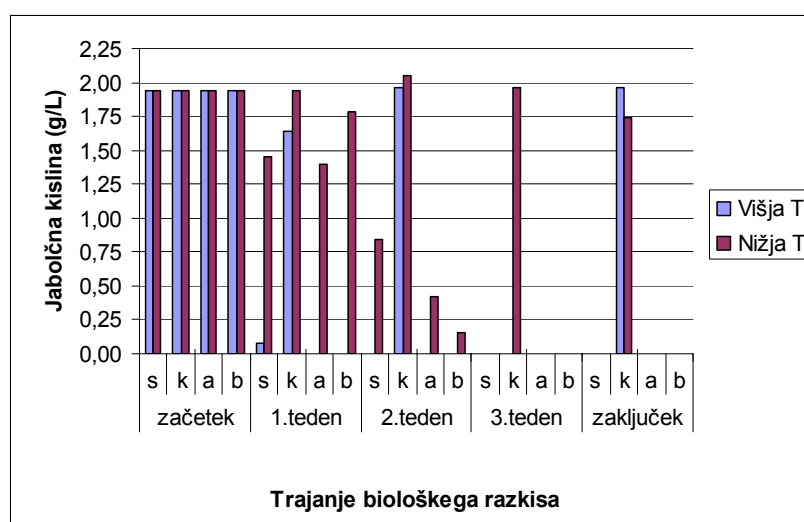
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 15: Vsebnost vinske kisline (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Na sliki 15 opazimo rahlo upadanje vsebnosti vinske kisline z vmesnimi nihanji zaradi izločanja vinskega kamna.

4.1.9 JABOLČNA KISLINA



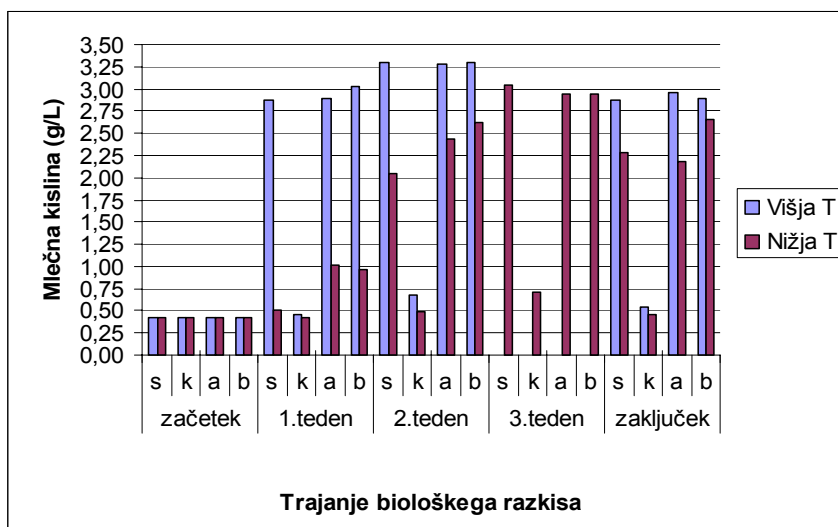
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 16: Vsebnost jabolčne kisline (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Opazi se močno zmanjšanje vsebnosti jabolčne kisline v povezavi z biološkim razkisom; kontrolni vzorci so krasna primerjava (slika 16).

4.1.10 MLEČNA KISLINA



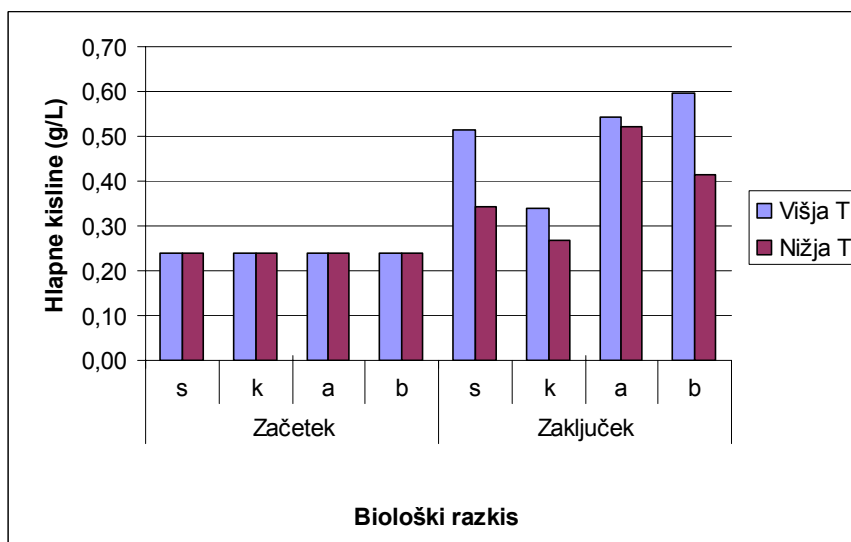
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 17: Vsebnost mlečne kisline (g/L) v odvisnosti od trajanja biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Slika 17 nam prikazuje trend naraščanja mlečne kisline v povezavi z biološkim razkiso. Večje vsebnosti mlečne kisline so dosegli vzorci pri višji temperaturi.

4.1.11 HLAPE KISLINE



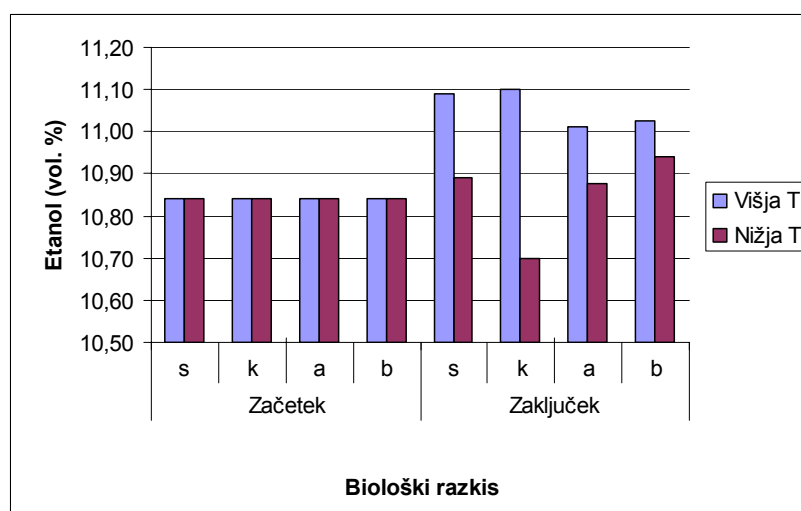
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 18: Vsebnost hlapnih kislin (g/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Iz slike 18 je razvidno povečanje vsebnosti hlapnih kislin po zaključku biološkega razkisa. Vsebnosti se bolj povečajo v vzorcih pri višji temperaturi, vendar so še v mejah senzorične nezaznavnosti.

4.1.12 ETANOL



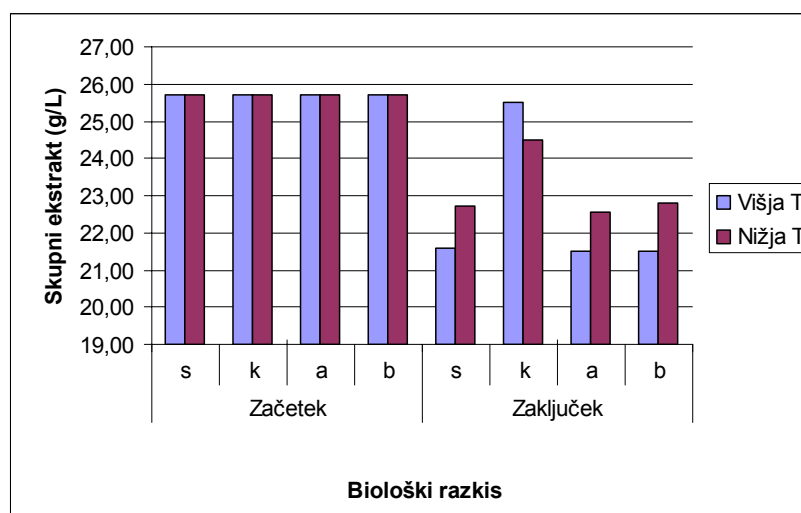
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 19: Vsebnost alkohola (vol. %) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Opazno je povečanje vsebnosti etanola v vseh vzorcih z biološkim razkisom in to bolj pri višji temperaturi (slika 19).

4.1.13 SKUPNI EKSTRAKT



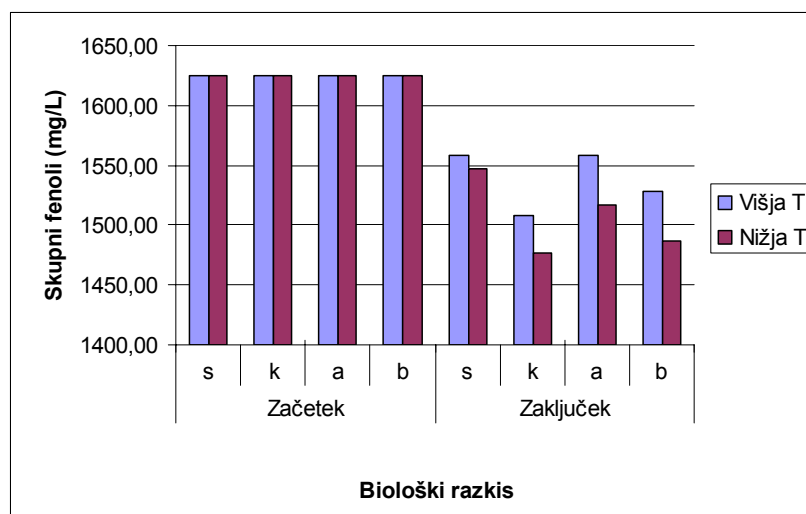
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 20: Vsebnost skupnega ekstrakta (g/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Vsebnost skupnega ekstrakta se zmanjša po zaključenem biološkem razkisu, bolj v vzorcih pri višji temperaturi (slika 20).

4.1.14 SKUPNI FENOLI



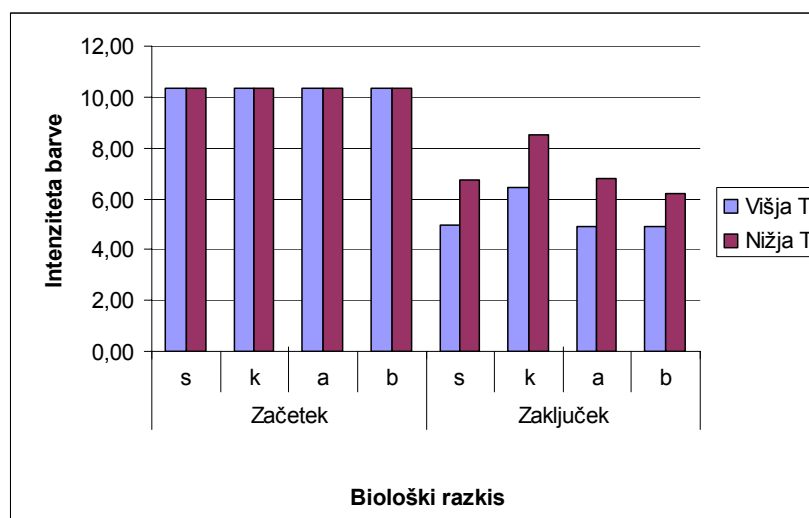
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 21: Vsebnost skupnih fenolov (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Iz slike 21 je razvidno zmanjšanje vsebnosti skupnih fenolov po zaključenem biološkem razkisu in sicer bolj v vzorcih pri nižji temperaturi.

4.1.15 BARVA VINA

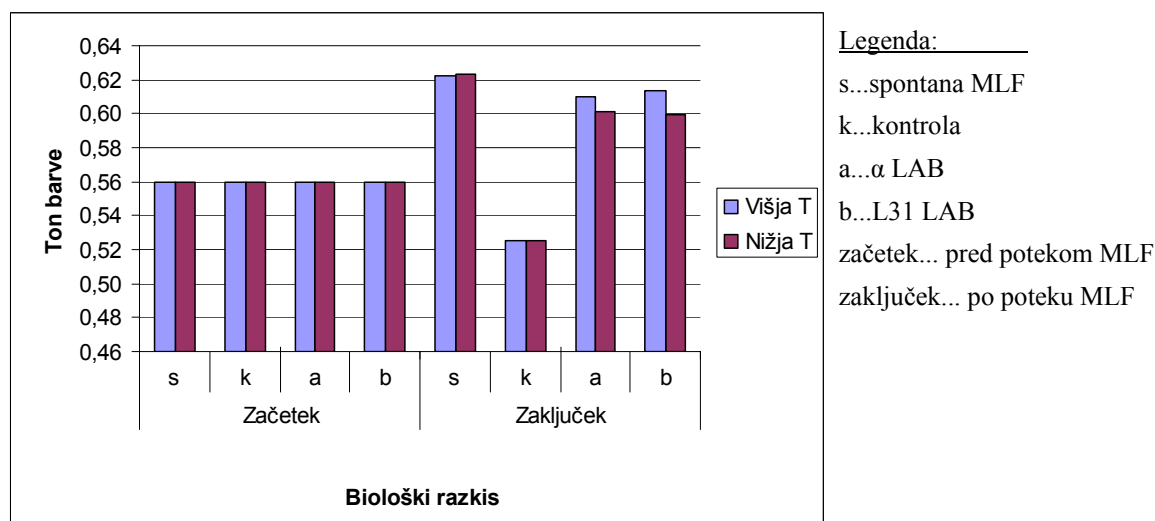


Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 22: Vrednost intenzitete barve v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

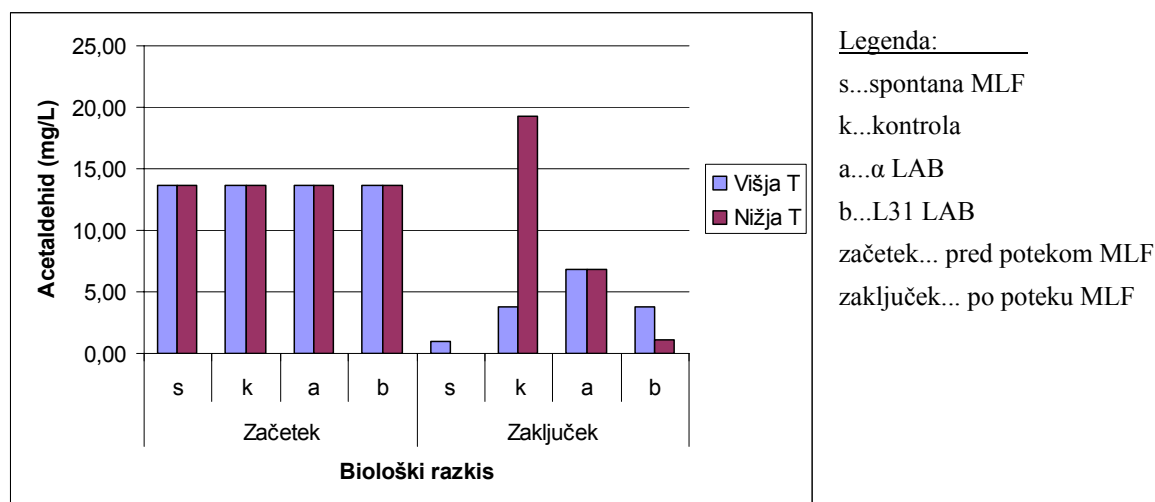
Intenziteta barve (vsota absorbcanc pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm) se zmanjša v vseh vzorcih z biološkim razkiso in to bolj v vzorcih pri višji temperaturi (slika 22).



Slika 23: Vrednost tona barve v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

V vseh vzorcih z biološkim razkisom se ton barve poveša in to bolj pri višji temperaturi. V kontrolnih vzorcih se ton barve zniža (slika 23).

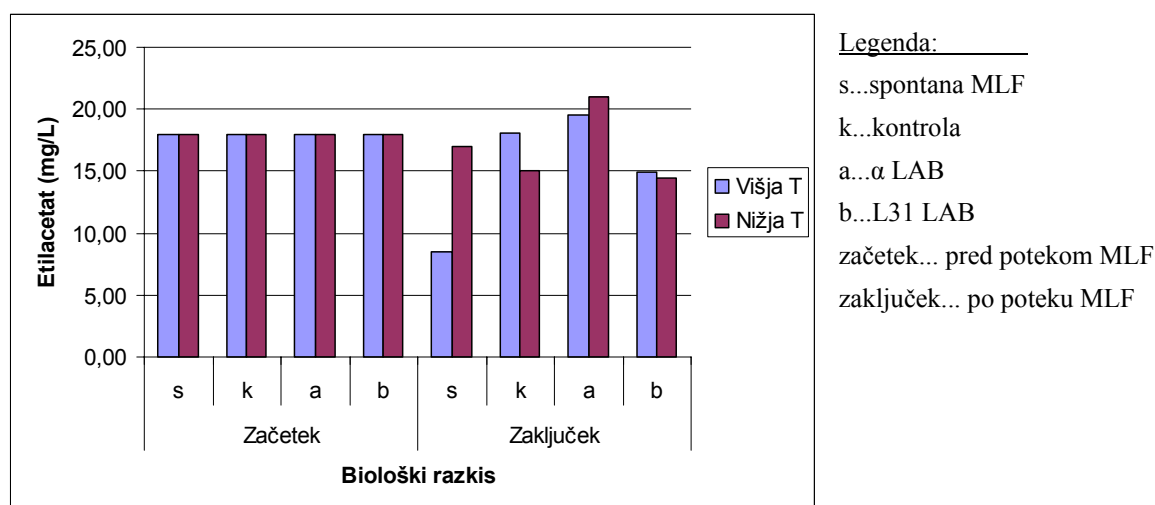
4.1.16 ACETALDEHID



Slika 24: Vsebnost acetaldehida (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Iz slike 24 je razviden močno zmanjšanje vsebnosti acetaldehida po zaključku biološkega razkisa, največje v vzorcih s spontanim biološkim razkisom.

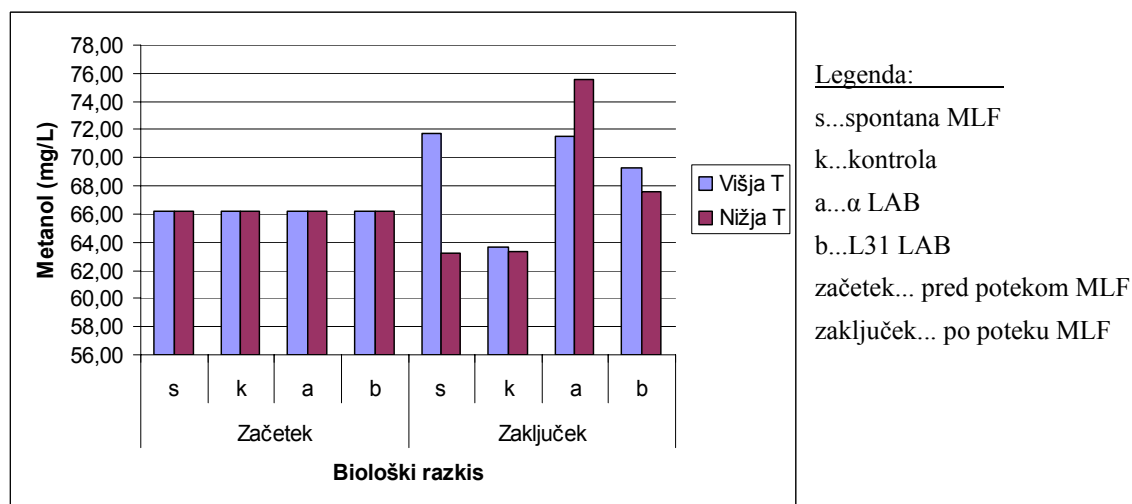
4.1.17 ETILACETAT



Slika 25: Vsebnost etilacetata (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

V vseh vzorcih, razen v vzorcih a, se opazi zmanjšanje vsebnosti etilacetata. V vzorcih, kjer smo inokulirali α LAB (vzorca a) pa je opazno rahlo povečanje vsebnosti etilacetata, vendar senzorično še nezaznavno (slika 25).

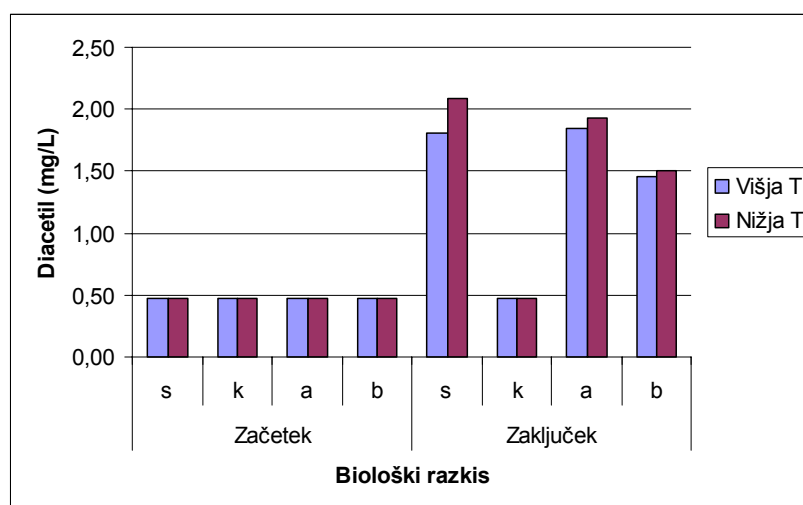
4.1.18 METANOL



Slika 26: Vsebnost metanola (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Največji porast vsebnosti metanola je v vzorcu a pri nižji temperaturi; v vzorcu vina, kjer je potekel spontani biološki razkis ter v vzorcih a in b pri višji temperaturi so vsebnosti približno enake, najmanjše vsebnosti metanola pa so v kontrolah pri obeh temperaturah. Biološki razkis sproži nadaljno razgradnjo pektina in s tem povečanje vsebnosti metanola v vinu.

4.1.19 DIACETIL



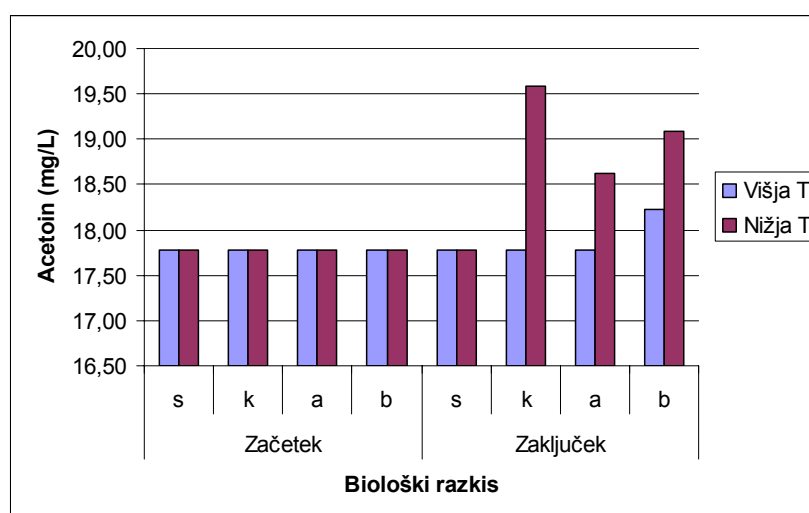
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a... α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 27: Vsebnost diacetila (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Razvidno je močno povečanje vsebnosti diacetila v vzorcih in sicer najbolj v vzorcu s spontanim biološkim razkisom. Več se ga tvori v vzorcih pri nižji temperaturi (slika 27).

4.1.20 ACETOIN



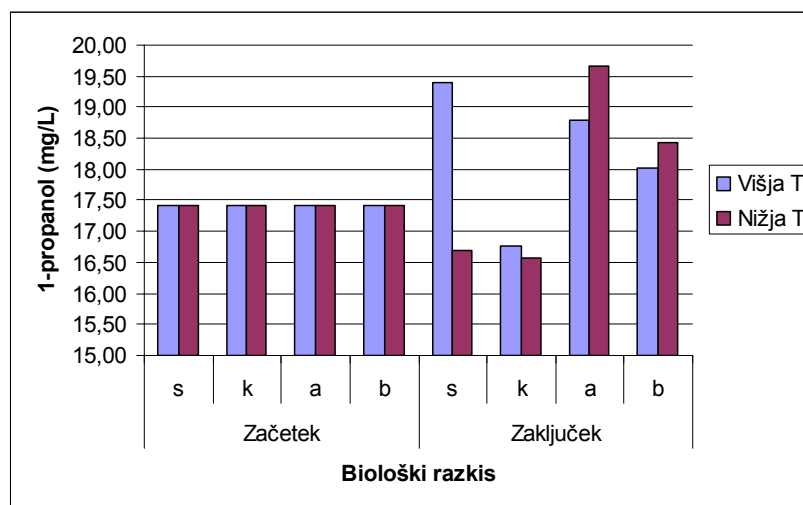
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a... α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 28: Vsebnost acetoina (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Vsebnosti acetoina se povečajo v vseh vzorcih z biološkim razkisom pri nižji temperaturi, v vzorcu b pa tudi pri višji temperaturi. V ostalih vzorcih ostajajo vsebnosti acetoina enake (slika 28).

4.1.21 1-PROPANOL



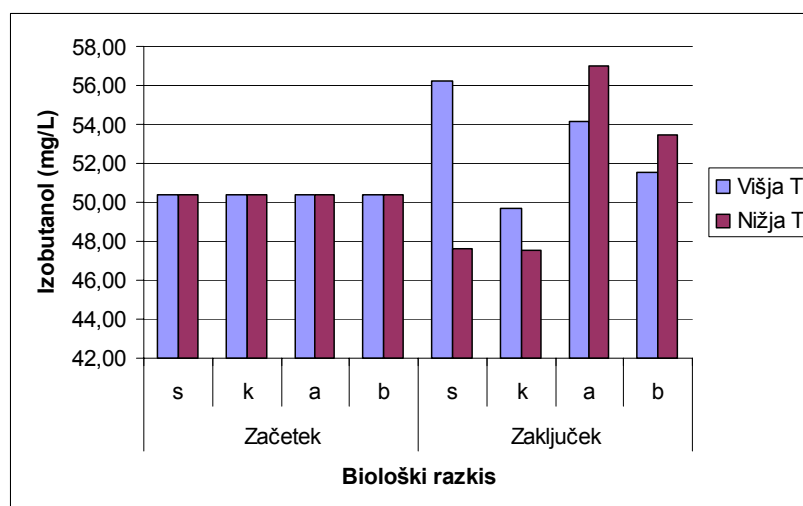
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 29: Vsebnost 1-propanola (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Iz slike 29 opazimo povečanje vsebnosti 1-propanola, razen v kontrolnih vzorcih. V vzorcu s spontanem biološkim razkिसom se vsebnost 1-propanola poveča bolj pri višji temperaturi, medtem ko se vsebnost 1-propanola v vzorcih a in b bolj poveča pri nižji temperaturi.

4.1.22 IZOBUTANOL



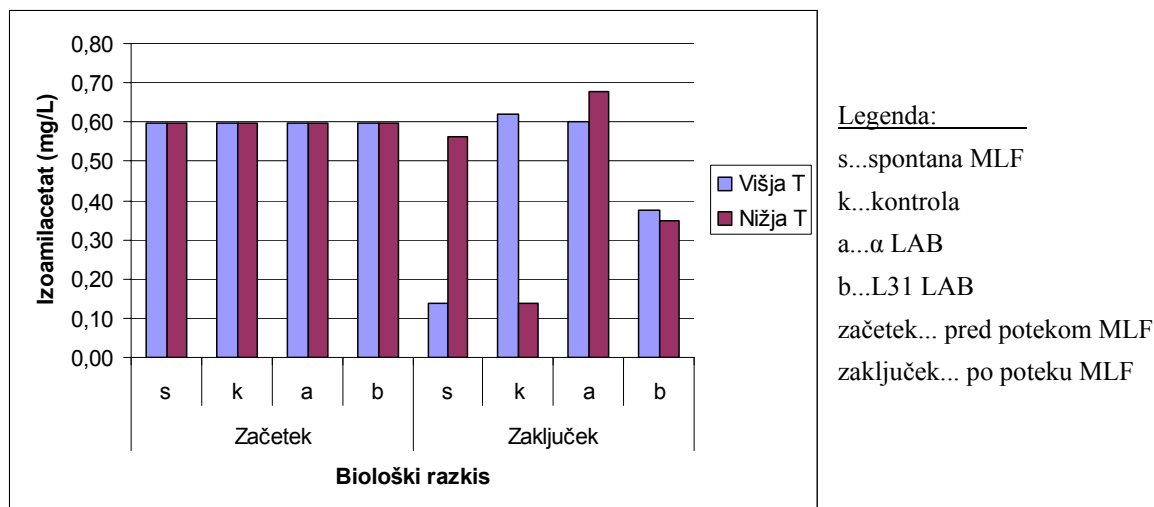
Legenda:

- s...spontana MLF
- k...kontrola
- a...α LAB
- b...L31 LAB
- začetek... pred potekom MLF
- zaključek... po poteku MLF

Slika 30: Vsebnost izobutanola (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Vsebnosti izobutanola se prav tako povečajo po zaključenem biološkem razkisu, bolj v vzorcih pri nižji temperaturi. V kontrolnih vzorcih se vsebnost izobutanola celo zmanjša, bolj v vzorcu pri nižji temperaturi (slika 30).

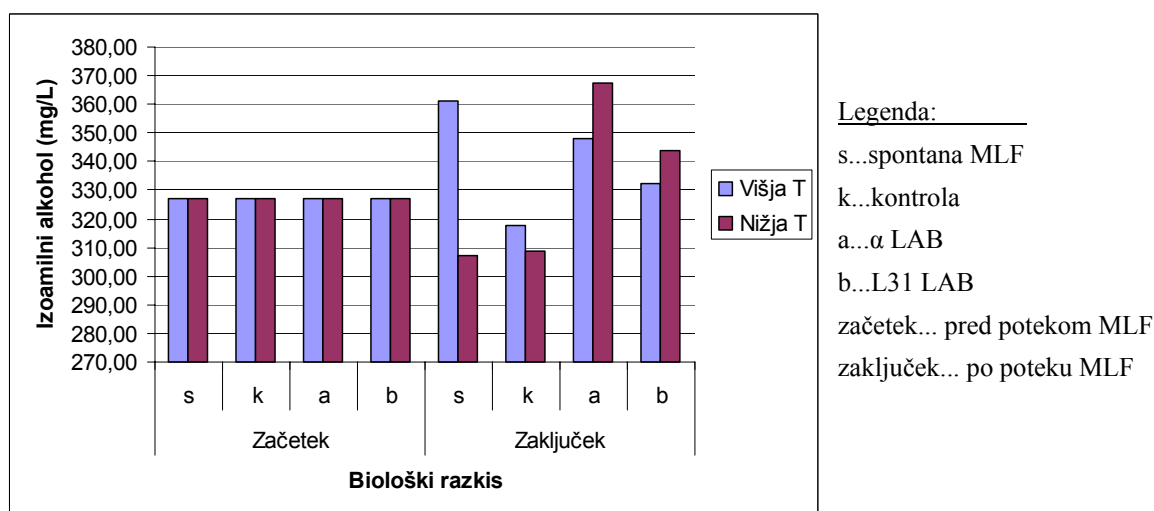
4.1.23 IZOAMILACETAT



Slika 31: Vsebnost izoamilacetata (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Vsebnost izoamilacetata se močno zmanjša v vzorcu s spontanim biološkim razkisom pri višji temperaturi in v kontrolnem vzorcu pri nižji temperaturi. Vsebnost se zmanjša tudi v vzorcu b pri obeh temperaturah. V vzorcu a pri višji temperaturi ostaja enaka oziroma se najbolj poveča v vzorcu a pri nižji temperaturi (slika 31).

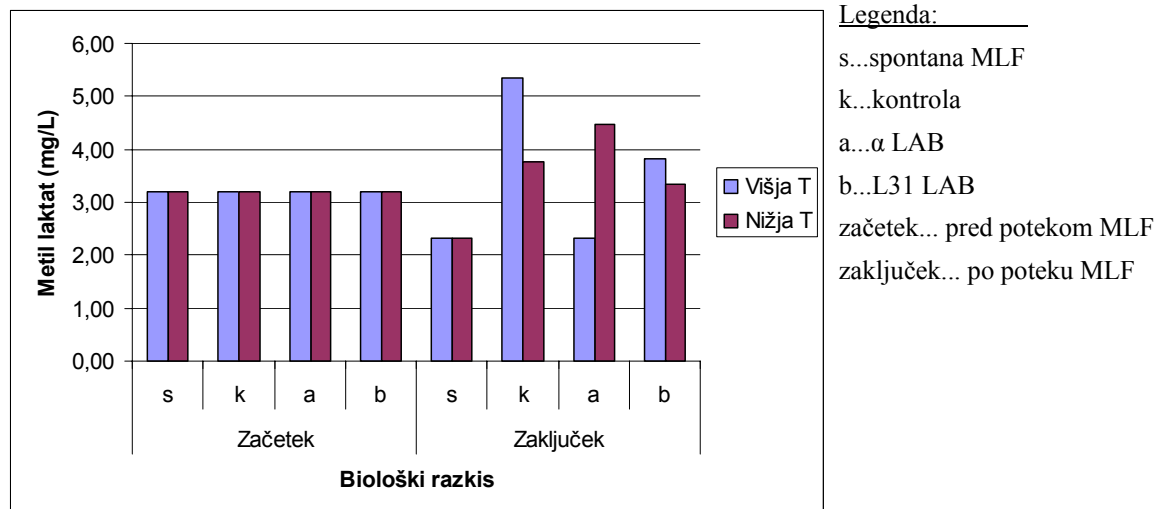
4.1.24 IZOAMILNI ALKOHOL



Slika 32: Vsebnost izoamilnega alkohola (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Iz slike 32 je razvidno povečanje vsebnosti izoamilnega alkohola po zaključku biološkega razkisa, razen v kontrolnih vzorcih, kjer pride do zmanjšanja vsebnosti in v vzorcu s spontanim biološkim razkisom pri nižji temperaturi, kjer je opazno rahlo zmanjšanje vsebnosti izoamilnega alkohola.

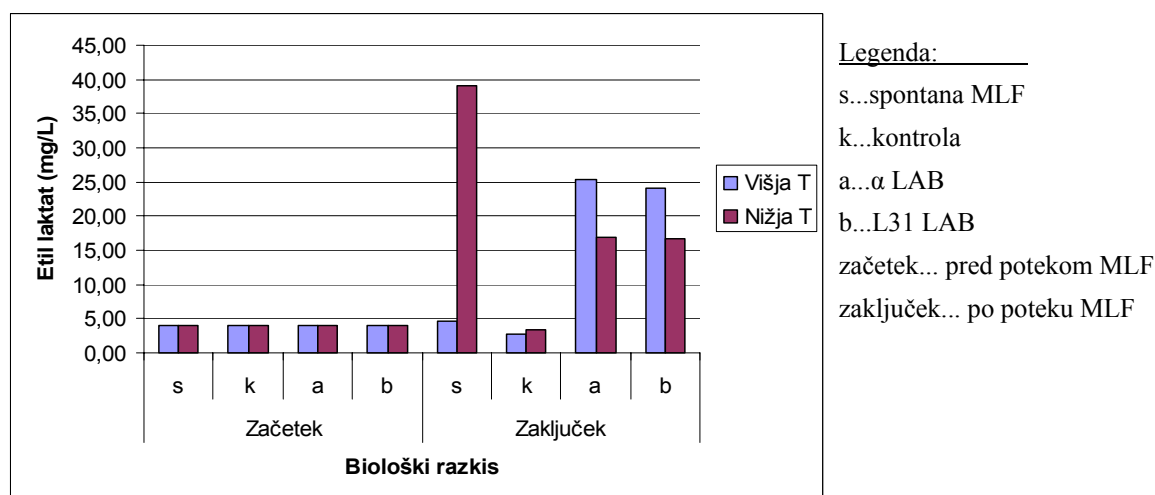
4.1.25 METIL LAKTAT



Slika 33: Vsebnost metil laktata (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Iz slike 33 je razvidno povečanje vsebnosti metil laktata v vzorcih b in v vzorcu a pri nižji temperaturi. Povečanje se opazi tudi pri kontrolnih vzorcih, predvsem v vzorcu pri višji temperaturi. Pri spontanem biološkem razkisu pa se vsebnosti metil laktata zmanjšajo.

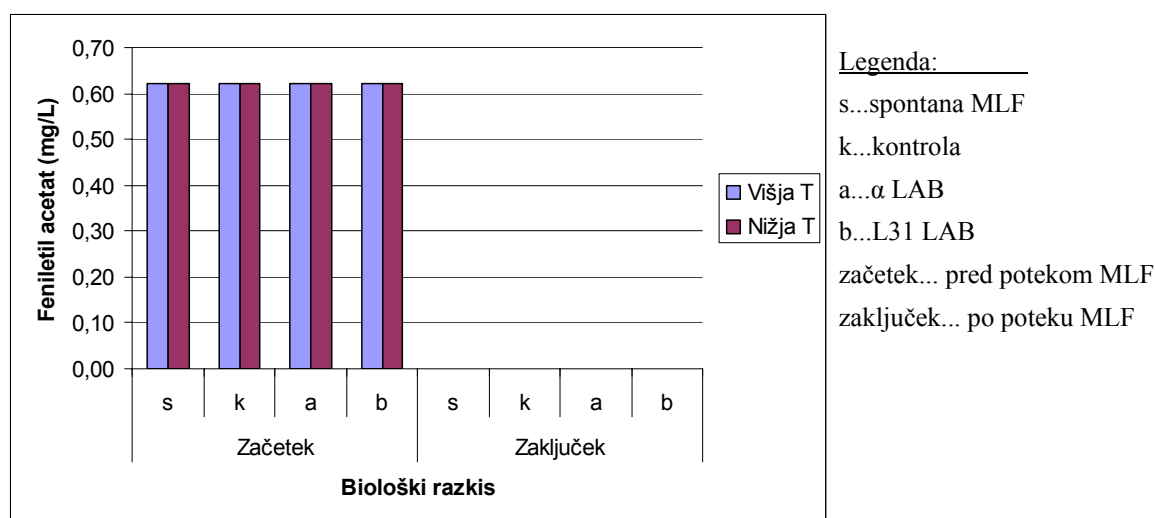
4.1.26 ETIL LAKTAT



Slika 34: Vsebnost etil laktata (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Vsebnost etil laktata se najbolj poveča v vzorcu s spontanem biološkim razkisu pri nižji temperaturi. V vzorcih a in b je prav tako opazno povečanje vendar bolj pri višji temperaturi (slika 34).

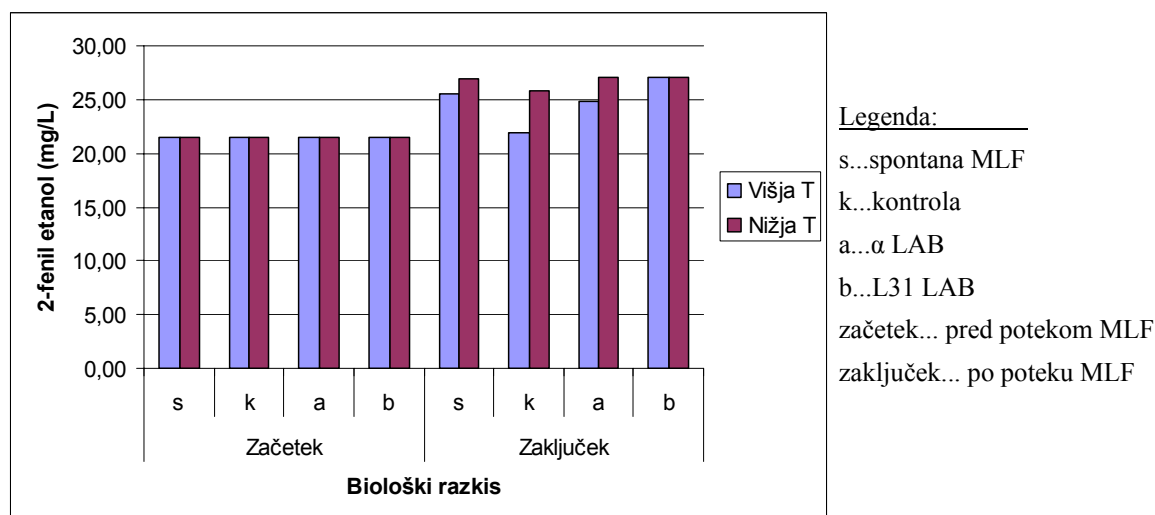
4.1.27 FENILETIL ACETAT



Slika 35: Vsebnost feniletil acetata (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

Vsebnosti feniletil acetata so zelo majhne na začetku, po končanem biološkem razkisu pa ni več prisoten v vzorcih oziroma je pod mejo detekcije (slika 35).

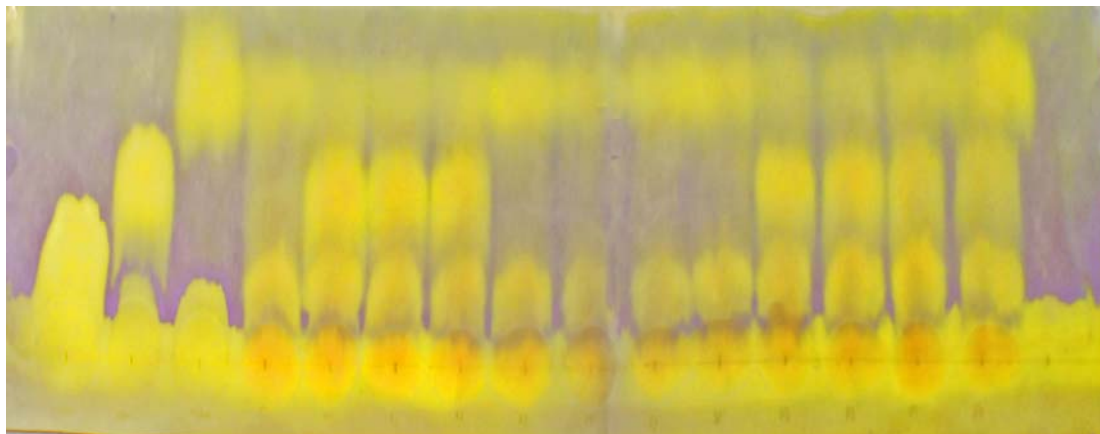
4.1.28 2-FENIL ETANOL



Slika 36: Vsebnost 2-fenil etanola (mg/L) v odvisnosti od faze biološkega razkisa pri dveh različnih temperaturah v vinu modra frankinja

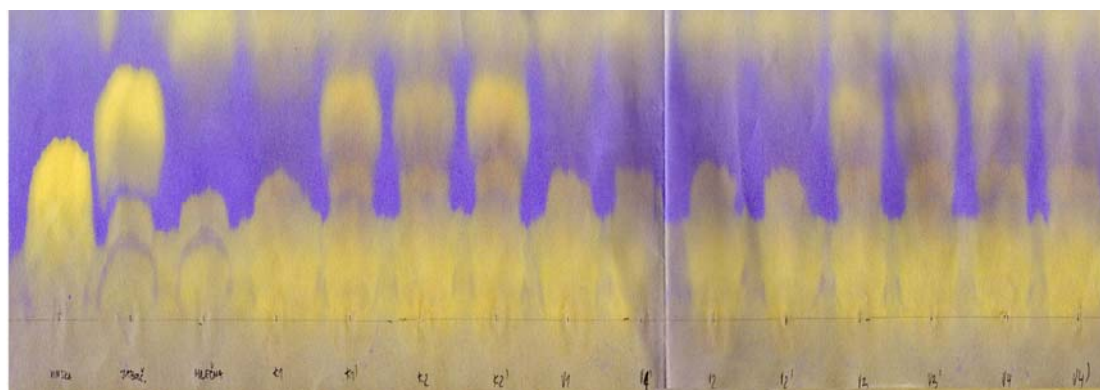
Vsebnosti 2-fenil etanola se rahlo povečajo v vseh vzorcih, bolj v vzorcih pri nižji temperaturi. V kontrolnem vzorcu pri višji temperaturi se vsebnost ne poveča (slika 36).

4.2 REZULTATI SPREMLJANJA BIOLOŠKEGA RAZKISA S PAPIRNO KROMATOGRAFIJO



Slika 37: Kromatogram organskih kislin po prvem tednu spremljanja biološkega razkisa v vinu modra frankinja

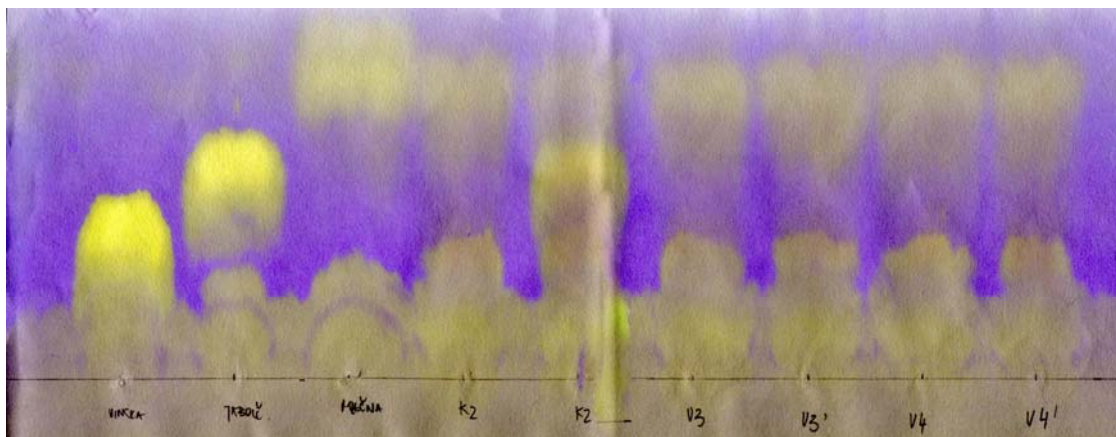
Slika 37 prikazuje rezultate po prvem tednu spremljanja biološkega razkisa v vzorcih vin. Prvi trije vzorci predstavljajo standarde vinske, jabolčne in mlečne kisline, nato pa si sledijo vzorci v naslednjem vrstnem redu: K1 (spontana MLF, višja T), K1' (kontrola, višja T), K2 (spontana MLF, nižja T), K2' (kontrola, nižja T), V1, V1', V2, V2' (vzorci pri višji temperaturi) in V3, V3', V4, V4' (vzorci pri nižji temperaturi). Lepo se vidi nastajanje mlečne kisline in zmanjševanje vsebnosti jabolčne kisline v vzorcih pri višji temperaturi (slika 37).



Slika 38: Kromatogram organskih kislin po drugem tednu spremljanja biološkega razkisa v vinu modra frankinja

Slika 38 prikazuje rezultate merjenja po drugem tednu spremljanja biološkega razkisa. Zaporedje vzorcev je enako kot na sliki 37. Iz slike 38 lahko vidimo, da so vzorci pri

višji temperaturi praktično končali biološki razkis, saj je vsebnost jabolčne kisline zelo majhna, vzorci pri nižji temperaturi pa še vsebujejo nekaj jabolčne kisline.

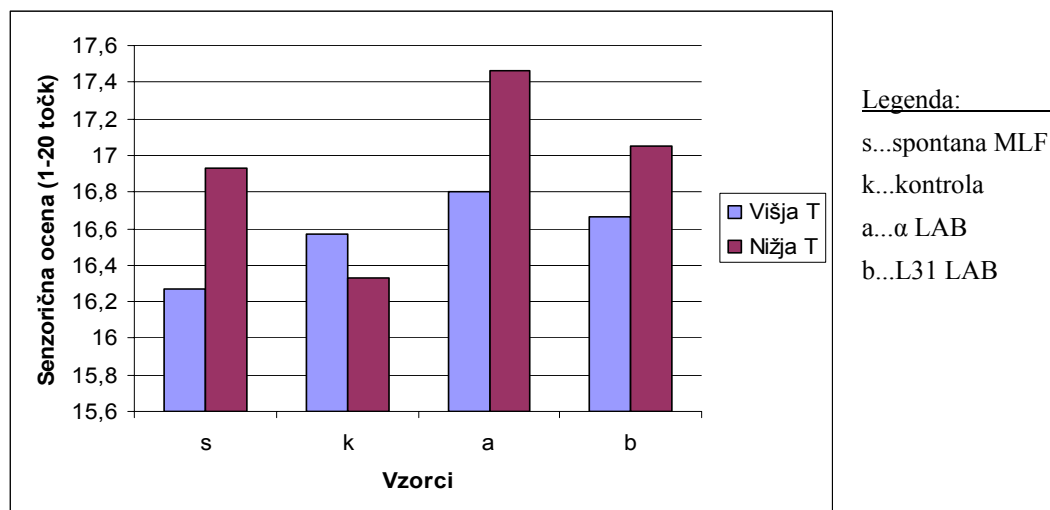


Slika 39: Kromatogram organskih kislin po tretjem tednu spremljanja biološkega razkisa v vinu modra frankinja

Na sliki 39 so rezultati merjenja po tretjem tednu spremljanja biološkega razkisa, kjer smo spremljali samo vzorce pri nižji temperaturi. Iz slike razberemo, da se je vsa jabolčna kislina pretvorila v mlečno v vzorcih, kjer je potekal biološki razkis. Pri kontrolnem vzorcu se to ne zgodi.

4. 3 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE VINA

Vzorci vina modra frankinja so bili senzorično ocenjeni po končanem biološkem razkisu po Buxbaumovi 20-točkovni metodi.



Slika 40: Senzorična ocena vzorcev vin sorte modra frankinja po končanem biološkem razkisu, vodenem pri dveh različnih temperaturah

Najbolj je s senzorično oceno odstopal vzorec a, kjer je biološki razkis potekal pri nižji temperaturi. Nasplošno so bili boljše senzorično ocenjeni vzorci z biološkim razkisom pri nižji temperaturi. Kontrolni vzorci so bili slabše ocenjeni (slika 40).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 KEMIJSKE ANALIZE VINA

5.1.1.1 VREDNOST pH

Vrednost pH se med potekom biološkega razkisa povečuje pri obeh temperaturah, razen v vzorcih pri nižji temperaturi se prvi teden zmanjša. Na koncu biološkega razkisa je v vseh vzorcih nekoliko manjša, kar pa je verjetno posledica žveplanja. Razlike med začetno in končno vrednostjo tako znašajo do 0,08 enote za vzorce pri višji temperaturi in do 0,1 enote za vzorce pri nižji temperaturi. V vzorcu s spontano MLF se vrednost pH povečuje v manjši meri kot v vzorcih a in b pri obeh temperaturah. Po zaključenem biološkem razkisu so vrednosti pH vzorcev a in b pri obeh temperaturah ter vzorca s spontano MLF pri obeh temperaturah primerljive. Kontrolni vzorci ostajajo na približno enaki ravni tekom poskusa.

Naraščanje vrednost pH tekom biološkega razkisa navajata tudi avtorja Ugliano in Moio (2005); dvig vrednost pH je posledica znižanja titrabilnih kislin.

5.1.1.2 TITRABILNE KISLINE DO pH=7

Opazno zmanjšanje koncentracije titrabilnih kislin do pH=7 (približno 1,4-1,5 g/L) je razvidno takoj prvi teden merjenja v vzorcih pri višji temperaturi, medtem ko je v vzorcih pri nižji temperaturi opaznejše zmanjšanje koncentracije titrabilnih kislin do pH=7 razvidno šele drugi teden merjenja, kar je posledica počasnejšega pričetka biološkega razkisa.

Začetna koncentracija se tako zmanjša v povprečju za 2 g/L v vzorcih pri višji temperaturi in za 2,35 g/L v vzorcih pri nižji temperaturi. Podobno zmanjšanje koncentracije titrabilnih kislin navajata tudi avtorja Ugliano in Moio (2005).

Tudi v kontrolnih vzorcih je opaziti rahlo zmanjšanje koncentracije titrabilnih kislin (za 0,22 g/L v vzorcu pri višji temperaturi in za 1,13 g/L v vzorcu pri nižji temperaturi), kar je verjetno posledica izločanja vinskega kamna. Izločanje vinskega kamna pa vpliva tudi na vrednosti koncentracij titrabilnih kislin vzorcev, ki so posledično manjše.

Bistvenih razlik med posameznimi sevi LAB ni, so pa razlike med spontanim in induciranim biološkim razkisolom. Pri spontanem biološkem razkisu je zmanjšanje koncentracije titrabilnih kislin manjše kot v ostalih vzorcih z biološkim razkisolom in sicer za 1,99 g/L v vzorcu pri višji temperaturi in za 2,24 g/L v vzorcu pri nižji temperaturi.

5.1.1.3 SKUPNE KISLINE DO pH=8,2

Za skupne kisline do pH=8,2 velja enako kot za titrabilne kisline do pH=7. Začetne koncentracije se tako zmanjšajo v povprečju za 2,01 g/L v vzorcih pri višji temperaturi in za 2,36 g/L v vzorcih pri nižji temperaturi.

5.1.1.4 GLUKOZA

Koncentracija glukoze se po poteku biološkega razkisa zmanjša za 0,10 do 0,35 g/L. Do zmanjšanja koncentracije glukoze privede dejstvo, da mlečnokislinske bakterije med rastjo in potekom MLF porabijo od 0,2 do 0,3 g/L sladkorjev (Košmerl, 2004). Nato koncentracija glukoze narašča. To je verjetno posledica β -glukanazne aktivnosti LAB. Naraščanje koncentracije glukoze opazimo pri obeh sevih inducirane MLF (vzorca a in b) ter pri spontani MLF.

Najmanj se koncentracija zmanjša v vzorcu b pri nižji temperaturi in najbolj v vzorcu s spontano MLF pri nižji temperaturi. Opazi se razlike med sevi, saj so končne koncentracije glukoze nižje v vzorcu a kot v vzorcu b; to velja za vzorce pri obeh temperaturah.

V vzorcu s spontano MLF se koncentracija glukoze zmanjša bolj pri nižji temperaturi. V vzorcih a in b pa se koncentracija glukoze bolj zmanjša pri višji temperaturi. Končne koncentracije glukoze v vzorcu s spontano MLF so primerljive s končnimi koncentracijami glukoze v vzorcu a, medtem ko so končne koncentracije glukoze v vzorcu b nekoliko višje od ostalih.

5.1.1.5 FRUKTOZA

Začetna koncentracija fruktoze je 2,35 g/L in se zmanjšuje med potekom MLF; po končani MLF je pod mejo detekcije ali pa je komaj zaznavna. V vzorcih pri višji temperaturi se koncentracija fruktoze že prvi teden merjenja zmanjša pod mejo detekcije, razen v vzorcu s spontano MLF je vsebnost še zaznavna. V vzorcih pri nižji temperaturi se koncentracija fruktoze počasi zmanjšuje, mejo detekcije doseže tretji teden. V kontrolnih vzorcih se koncentracija fruktoze rahlo zmanjša, vendar ostaja prisotna.

Mlečnokislinske bakterije katabolizirajo fruktozo in glukozo do D-mlečne kisline, etanola in CO₂. Koncentracija fruktoze se zmanjša v večji meri kot pa koncentracija glukoze, ker *Oenococcus oeni* lažje porablja fruktozo kot glukozo (Ribéreau-Gayon, 2000).

5.1.1.6 GLICEROL

Med potekom biološkega razkisa se koncentracija glicerola zmanjša za 0,6 do 1,1 g/L, končne vrednosti se tako od začetnih razlikujejo za 0,4 do 1,3 g/L. Med potekom biološkega razkisa je vsebnost glicerola manjša v vzorcih pri višji temperaturi, kar je v okviru pričakovanj, medtem ko je na koncu v vzorcih s spontano MLF in v vzorcu a pri višji temperaturi vsebnost glicerola večja kot v istih vzorcih pri nižji temperaturi. Do tega verjetno pride zaradi časovno daljšega poteka biološkega razkisa v vzorcih pri nižji temperaturi, kjer se je vsebnost glicerola še zmanjševala.

Največjo vsebnost glicerola ima po zaključenem biološkem razkisu kontrolni vzorec pri nižji temperaturi in najmanjšo vzorec s spontanim MLF pri nižji temperaturi.

Ribéreau-Gayon (2000) navaja, da lahko nekateri sevi mlečnokislinskih bakterij razgrajujejo glicerol z encimom glicerol dehidrataza v končni produkt akrolein, ki daje vinu značilno grenkobo; ali pa razgrajujejo glicerol v piruvat, ki se naprej pretvarja v očetno kislino in acetoin. V naših vzorcih je prišlo do razgradnje glicerola, vendar končni produkti senzorično niso bili zaznavni.

5.1.1.7 CITRONSKA KISLINA

Vsebnost citronske kisline se med potekom biološkega razkisa zmanjšuje. Zmanjševanje vsebnosti je intenzivnejše v vzorcih pri višji temperaturi zaradi hitrejšega poteka biološkega razkisa in posledično večje aktivnosti mlečnokislinskih bakterij. Vsebnosti citronske kisline v vzorcih pri višji temperaturi drugi teden merjenja so primerljive z vsebnostmi v vzorcih pri nižji temperaturi tretji teden merjenja. Tako so vsebnosti citronske kisline po zaključenem biološkem razkisu nekoliko večje v vzorcih pri višji temperaturi (0,03 g/L v vzorcih s spontano MLF in v vzorcu b ter 0,05 g/L v vzorcu a) in manjše v vzorcih pri nižji temperaturi (0,02 g/L v vzorcu s spontano MLF in v vzorcu b ter 0,03 g/L v vzorcu a).

V kontrolnih vzorcih se vsebnost citronske kisline rahlo zmanjša vendar le za 0,01 g/L v vzorcu pri višji temperaturi in za 0,04 g/L v vzorcu pri nižji temperaturi.

Mlečnokislinske bakterije porabljajo citronsko kislino za tvorbo drugih produktov kot je diacetil, acetoin in 2,3-butandiol. Naši rezultati to dejstvo potrjujejo in se skladajo z raziskavami avtorjev Bartowsky in sod. (2002b).

5.1.1.8 VINSKA KISLINA

Koncentracija vinske kisline se večinoma zmanjšuje zaradi izločanja vinskega kamna, vendar pa njena koncentracija po zaključenem biološkem razkisu ne pade več kot za 0,21 g/L. Koncentracija vinske kisline se najbolj zmanjša v vzorcih s spontano MLF in sicer pri obeh temperaturah, najmanj pa v vzorcih a in b pri obeh temperaturah.

Tudi v obeh kontrolnih vzorcih se opazi zmanjšanje vsebnosti vinske kisline. Po zaključenem biološkem razkisu jo tako največ vsebujeta kontrolna vzorca. V vzorcih s spontano MLF jo več vsebuje vzorec pri nižji temperaturi. V vzorcih a in b je vsebnost vinske kisline večja v vzorcih pri višji temperaturi in sicer ima vzorec a večjo vsebnost vinske kisline kot vzorec b pri obeh temperaturah.

Razgradnja vinske kisline v večji meri bi pomenila kvar vina, ki bi se odražal v povišanih hlapnih kislinah, kar pa za naše vzorce ne moremo trditi. Do zmanjšanje vinske kisline pride v naših vzorcih zaradi izločanja vinskega kamna.

5.1.1.9 JABOLČNA KISLINA

Po pričakovanjih se vsebnost jabolčne kisline v vzorcih z biološkim razkiso močno zmanjša zaradi pretvorbe v mlečno kislino, katere vsebnost se poveča. Tako jo prvi teden merjenja zasledimo še v vzorcih pri nižji temperaturi, medtem ko je v vzorcih pri višji temperaturi prisotna samo še v vzorcu s spontano MLF. Tretji teden merjenja jo tudi v vzorcih pri nižji temperaturi ni več, po zaključenem biološkem razkisu je prisotna le v obeh kontrolnih vzorcih. Povečanje vsebnosti mlečne kisline in zmanjšanje vsebnosti jabolčne kisline je razvidno tudi iz kromatogramov, ki smo jih razvili s papirno kromatografijo.

5.1.1.10 MLEČNA KISLINA

Vsebnosti mlečne kisline se prvi teden merjenja povečajo za v povprečju 2,5 g/L v vzorcih pri višji temperaturi, medtem ko se v vzorcih pri nižji temperaturi povečajo le za 0,6 g/L. Vsebnost mlečne kisline se nato povečuje tekom biološkega razkisa v vseh vzorcih in doseže največjo vrednost 2,96 g/L v vzorcu a pri višji temperaturi in 2,65 g/L v vzorcu b pri nižji temperaturi.

Vzorci pri višji temperaturi vsebujejo po zaključenem biološkem razkisu v povprečju 0,34 g /L več mlečne kisline kot vzorci pri nižji temperaturi. Posebnih razlik med vzorcema a in b pri višji temperaturi ni, pri nižji temperaturi pa vzorec b vsebuje nekaj več mlečne kisline (2,65 g/L) kot pa vzorec a, ki jo vsebuje 2,19 g/L. Vzorca s spontanim biološkim razkiso ne zaostajata v tvorbi mlečne kisline za drugimi vzorci.

5.1.1.11 Hlapne kisline

Vsebnost hlapnih kislin se po končani MLF poviša po pričakovanjih. Začetno vrednost 0,24 g/L prekoračijo vsi vzorci, vendar bolj vzorci pri višji temperaturi. Tako doseže največjo vsebnost hlapnih kislin vzorec b pri višji temperaturi in sicer 0,60 g/L, sledita mu vzorec a pri višji temperaturi (0,54 g/L) in vzorec s spontano MLF pri višji temperaturi (0,51 g/L).

Vsebnosti vzorcev pri nižji temperaturi so občutno nižje, vzorec s spontano MLF vsebuje 0,34 g/L hlapnih kislin, vzorec b 0,41 g/L hlapnih kislin, medtem ko se vsebnost hlapnih kislin v vzorcu a pri obeh temperaturah bistveno ne razlikuje. Vsebnost hlapnih kislin se nekoliko poveča tudi v kontrolnih vzorcih, vendar pa to pripisujemo možnosti rahle oksidacije vzorca.

Avtorja Ugliano in Moio (2005) navajata nekoliko manjše vsebnosti hlapnih kislin po končani MLF (cca 0,42 g/L), vendar pa naši vzorci ne presegajo mejnih vrednosti, ki znašajo 1,0 g/L za kakovostna in vrhunska vina z geografskim poreklom.

Mlečnokislinske bakterije proizvajajo večje količine očetne kisline z metabolizmom sladkorjev in citronske kisline.

5.1.1.12 ETANOL

Vsebnosti etanola se povečajo po končani MLF, vendar bolj v vzorcih pri višji temperaturi. Vino je pred potekom MLF vsebovalo 10,84 vol. % etanola (alkohola). Po končani MLF ga največ vsebuje kontrolni vzorec pri višji temperaturi (11,10 vol. %), kar pripisujemo možnosti alkoholnega povretja fruktoze zaradi nezadostne zaščite z žveplom.

Vzorec s spontano MLF pri višji temperaturi vsebuje 11,09 vol. % etanola, vzorec a pri višji temperaturi 11,01 vol. % etanola in vzorec b pri višji temperaturi 11,03 vol. % etanola. Vsebnosti etanola v vzorcih pri nižji temperaturi so nekoliko manjše in se gibljejo med 10,88 vol. % v vzorcu a in 10,94 vol. % v vzorcu b. Vsebnost etanola se v kontrolnem vzorcu pri nižji temperaturi zmanjša za 0,16 % zaradi oksidacije etanola v acetaldehid, ker je bilo vino nezadostno zaščiteno z žveplom.

Večje vsebnosti etanola oz. alkohola po končani MLF so pričakovane zaradi etanola, kot stranskega produkta metabolizma sladkorjev pri mlečnokislinskih bakterijah (Ribéreau-Gayon, 2000).

5.1.1.13 SKUPNI EKSTRAKT

Vsebnost skupnega ekstrakta se nekoliko zmanjša po končani MLF, kar pripisujemo tudi zmanjšanju vsebnosti glicerola po končani MLF. Vsebnost skupnega ekstrakta se bolj zmanjša v vzorcih pri višji temperaturi, kjer so vrednosti zelo primerljive (21,50 g/L za vzorca a in b ter 21,60 g/L za vzorec s spontano MLF). Vsebnosti skupnega ekstrakta v vzorcih pri nižji temperaturi so nekoliko večje in sicer 22,55 g/L skupnega ekstrakta vsebuje vzorec a, 22,80 g/L vzorec b in 22,70 vzorec s spontano MLF.

Rahlo zmanjšanje vsebnosti skupnega ekstrakta opazimo tudi pri kontrolnih vzorcih; od 0,2 g/L v vzorcu pri višji temperaturi do 1,2 g/L v vzorcu pri nižji temperaturi.

5.1.1.14 SKUPNI FENOLI

Vsebnost skupnih fenolov se zmanjša v vseh vzorcih po končanem biološkem razkisu, zmanjšanje je opazno tudi v kontrolnih vzorcih. Vsebnosti skupnih fenolov so manjše v vzorcih pri nižji temperaturi in sicer se zmanjšajo za največ 138 mg/L v vzorcu b, sledi mu vzorec a, kjer se vsebnost skupnih fenolov zmanjša za 108 mg/L, najmanj se zmanjša vsebnost skupnih fenolov v vzorcu s spontano MLF in sicer za 78 mg/L.

V vzorcih pri višji temperaturi so vsebnosti skupnih fenolov primerljive med vsemi vzorci, kjer je potekel biološki razkis. V vzorcu a in vzorcu s spontano MLF se zmanjša vsebnost za 67 mg/L, v vzorcu b pa za 97 mg/L.

Najbolj se zmanjša vsebnost skupnih fenolov v kontrolnih vzorcih in sicer za 117 mg/L v vzorcu pri višji temperaturi in za 148 mg/L v vzorcu pri nižji temperaturi.

V vzorcih, kjer je potekel biološki razkis je zmanjšanje vsebnosti skupnih fenolov posledica absorpcije le teh na mlečnokislinske bakterije.

5.1.1.15 BARVA VINA

5.1.1.15.1 INTENZITETA BARVE

Intenziteta barve se zmanjša po končani MLF in sicer v večji meri v vzorcih pri nižji temperaturi. Začetne vrednosti znašajo 10,370. Vzorci pri višji temperaturi pa imajo vrednosti intenzitete barve 4,900 (vzorca a in b) in 4,950 (vzorec s spontano MLF). Vzorec b pri nižji temperaturi doseže najmanjšo vrednost med vzorci pri nižji temperaturi (6,230), sledita mu vzorec s spontano MLF (6,730) in vzorec a (6,775). Opazijo se minimalne razlike med sevi LAB.

Večjo intenziteto barve, čeprav manjšo kot vzorci na začetku, ima kontrolni vzorec pri obeh temperaturah (6,470 pri višji temperaturi in 8,510 pri nižji temperaturi). Zmanjšanje intenzitete barve v kontrolnih vzorcih je verjetno posledica žveplanja vina, medtem ko je zmanjšanje intenzitete barve v vzorcih, kjer je potekla MLF, posledica zmanjšanja vsebnosti acetaldehida, ki je odgovoren za tvorbo stabilnih barvnih kompleksov z antocianini. Zaradi tega pride do izločanja nestabilnih antocianov.

5.1.1.15.2 TON BARVE

Vzorci z opravljenim biološkim razkisolom imajo višji ton barve kot kontrolni vzorci in vzorci pred potekom MLF. Začetne vrednosti 0,560 se povečajo za 0,062-0,063 v vzorcu s spontano MLF, v vzorcih pri nižji temperaturi za 0,039 (vzorec b) in za 0,041 (vzorec a), medtem ko se v vzorcih pri višji temperaturi povečajo v večji meri in sicer za 0,050 (vzorec a) in za 0,053 (vzorec b).

V kontrolnih vzorcih je ton barve nižji kot na začetku. Vrednosti se zmanjšajo za 0,034-0,035. Med sevi LAB ni opaziti večjih razlik v barvnih parametrih.

5.1.1.16 ACETALDEHID

Vsebnost acetaldehida se zmanjša po zaključenem biološkem razkisu. Najbolj se zmanjša v vzorcih s spontano MLF, kjer je vsebnost acetaldehida v vzorcu pri nižji temperaturi pod mejo detekcije. Največje vsebnosti acetaldehida ima vzorec a pri obeh temperaturah, vzorec b ima pri nižji temperaturi manjšo vsebnost acetaldehida. Kontrolni vzorec pri nižji temperaturi ima celo povišano vsebnost acetaldehida ob zaključku poskusa; do tega pa verjetno privede dejstvo, da je bil kontrolni vzorec rahlo oksidiran.

Rezultati se ujemajo z dognanji avtorjev Bartowsky in sod. (2002a), ki navajajo dejstvo, da nekateri sevi vrste *Oenococcus oeni* lahko presnavljajo acetaldehid v očetno kislino in etanol. Do podobnih rezultatov pa so prišli tudi avtorji Pozo-Bayón in sod. (2005), ki opazijo zmanjšanje vsebnosti acetaldehida po končanem biološkem razkisu z vrsto *Oenococcus oeni*.

Zmanjšanje vsebnosti acetaldehida pozitivno prispeva k aromi vina, saj ni priokusa po zelenem, ki ga v večjih koncentracijah povzroča acetaldehid.

5.1.1.17 ETILACETAT

Vsebnost etilacetata se je v vzorcih s spontano MLF zmanjšala, bolj v vzorcu pri višji temperaturi. Prav tako se je vsebnost etilacetata zmanjšala v vzorcu b, bolj pri nižji temperaturi. V vzorcu a se je vsebnost etilacetata povečala in sicer bolj pri nižji temperaturi. Tudi v kontrolnih vzorcih je opaziti rahlo povečanje vsebnosti (vzorec pri višji temperaturi) oz. zmanjšanje vsebnosti etilacetata (vzorec pri nižji temperaturi).

Povečanje vsebnosti etilacetata po zaključenem biološkem razkisu z *Oenococcus oeni* potrjujejo tudi avtorji Pozo-Bayón in sod. (2005). Koncentracije večje kot 200 mg/L bi negativno vplivale na aromo vina.

5.1.1.18 METANOL

Vsebnost metanola se v vzorcih po končanem biološkem razkisu rahlo poveča, in sicer največ za 9,36 mg/L v vzorcu a pri nižji temperaturi in najmanj za 1,41 mg/L v vzorcu b pri nižji temperaturi. Večje vsebnosti metanola so prisotne v vzorcih pri višji temperaturi, le v vzorcu a je vsebnost metanola večja pri nižji temperaturi. V vzorcu s spontano MLF pa opazimo celo zmanjšanje vsebnosti metanola pri nižji temperaturi. Zmanjšanje opazimo tudi v kontrolnih vzorcih. Vzorec a pri obeh temperaturah vsebuje več metanola kot vzorec b pri obeh temperaturah.

Do povečanja vsebnosti metanola v vinu pride zaradi esterazne aktivnosti mlečnokislinskih bakterij, ki odcepljajo zaestrene metilne skupine na poligalakturonskih verigah pektina. Podatki se ujemajo z rezultati avtorjev Pozo-Bayón in sod. (2005). Večje koncentracije metanola v vinu niso zaželenje zaradi toksičnih učinkov na organizem.

5.1.1.19 DIACETIL

Vsebnosti diacetila v vzorcih po končanem biološkem razkisu dosegajo vrednosti od 1,45 do 2,09 mg/L, kar je za 0,98 do 1,62 mg/L več kot pred biološkim razkiso. Večje vsebnosti dosežejo vzorci pri nižji temperaturi, med temi ima največjo vsebnost diacetila vzorec s spontano MLF. Manjše vsebnosti diacetila imata tako vzorec b kot vzorec a pri obeh temperaturah. Vsebnosti diacetila do 4 g/L pomembno prispevajo k večji polnosti vina.

Diacetil je vmesni produkt metabolizma citronske kisline in se lahko dalje pretvori v acetoin in 2,3-butandiol (Bartowsky in sod., 2002a). Naši rezultati potrjujejo to dejstvo, saj se tako vsebnosti diacetila kot vsebnosti acetoina po končanem biološkem razkisu povečajo.

5.1.1.20 ACETOIN

Povečanje vsebnosti acetoina je v večji meri opaziti v tistih vzorcih, kjer so bile vsebnosti diacetila po končanem biološkem razkisu manjše. To izhaja iz dejstva, da se diacetil pretvarja v acetoin in 2,3-butandiol. Povečanje vsebnosti je opaziti v vzorcih pri nižji temperaturi, le v vzorcu b tudi pri višji temperaturi. Največjo vsebnost acetoina ima kontrolni vzorec pri nižji temperaturi (19,58 mg/L), sledita mu vzorca s b in a pri nižji temperaturi. V vzorcu s spontano MLF pri obeh temperaturah se vsebnost acetoina ne poveča.

5.1.1.21 1-PROPANOL

Vsebnosti 1-propanola se povečajo po končanem biološkem razkisu v vseh vzorcih za 0,59 mg/L (vzorec b pri višji temperaturi) do 2,24 mg/L (vzorec a pri nižji temperaturi). Večje vsebnosti dosežejo vzorci pri nižji temperaturi, razen v vzorcu s spontano MLF, ki doseže večje vsebnosti pri višji temperaturi, pri nižji temperaturi se vsebnost 1-propanola celo zmanjša. Zmanjšanje vsebnosti 1-propanola je opaziti tudi v kontrolnih vzorcih.

Vzorci s sevom a vsebujejo več 1-propanola kot vzorci s sevom b. Povečanje vsebnosti je torej odvisno od seva *Oenococcus oeni*, kar potrjujejo tudi avtorji Pozo-Bayón in sod. (2005).

5.1.1.22 IZOBUTANOL

Enak trend povečanja vsebnosti izobutanola opazimo v vzorcih po končanem biološkem razkisu kot pri 1-propanolu. Vsebnosti izobutanola so večje v vzorcih pri nižji temperaturi, razen v vzorcu s spontano MLF, kjer se vsebnost izobutanola pri nižji temperaturi celo zmanjša. Vzorec a vsebuje večje vsebnosti izobutanola kot vzorec b. Izobutanol se tvori iz 2,3-butandiola, ki nastaja pri metabolizmu citronske kisline.

Do podobnih rezultatov so prišli tudi avtorji Pozo-Bayón in sod. (2005).

5.1.1.23 IZOAMILACETAT

Vsebnost izoamilacetata se rahlo poveča le v vzorcu a pri nižji temperaturi in sicer le za 0,08 mg/L. V vzorcu a pri višji temperaturi je vsebnost izoamilacetata enaka, v vseh ostalih vzorcih pa se vsebnost zmanjša, tudi v vzorcu b (za 0,25 do 0,28 mg/L) in v kontrolnem vzorcu pri nižji temperaturi. Znatnejše zmanjšanje vsebnosti izoamilacetata opazimo tudi v vzorcu s spontano MLF pri višji temperaturi (za 0,46 mg/L) in rahlejšje v vzorcu pri nižji temperaturi (za 0,04 mg/L). Povečanje vsebnosti izoamilacetata v vzorcih s sevom a navajata tudi avtorja Ugliano in Moio (2005).

Večje vsebnosti izoamilacetata v vinu so zaželjene, saj prispevajo k večji sadni aromi.

5.1.1.24 IZOAMILNI ALKOHOL

Vsebnosti izoamilnega alkohola se povečajo enako kot pri 1-propanolu in izobutanolu. Večje vsebnosti dosežejo vzorci pri nižji temperaturi kot pri višji, prav tako ima vzorec a večje vsebnosti izoamilnega alkohola kot vzorec b. V vzorcu s spontano MLF se vsebnost izoamilnega alkohola poveča pri višji temperaturi, medtem ko se pri nižji temperaturi vsebnost zmanjša. Zmanjšanje vsebnosti izoamilnega alkohola opazimo tudi pri kontrolnih vzorcih. Največjo vsebnost izoamilnega alkohola tako doseže vzorec a pri nižji temperaturi in sicer 367, 37 mg/L. Avtorja Ugliano in Moio (2005) podajata podobne rezultate povečanja vsebnosti izoamilnega alkohola in sicer bolj v vzorcih, inokuliranih s sevom a kot s sevom b. To se tudi ujema z našimi rezultati. Izoamilni alkohol v manjših koncentracijah pripomore k večji sadnosti vina.

5.1.1.25 METIL LAKTAT

Vsebnosti metil laktata so nekoliko večje po končani MLF, razen v vzorcu s spontano MLF se vsebnost metil laktata zniža za 0,87 mg/L. V vzorcu b se vsebnost metil laktata poveča le za 0,15 mg/L pri nižji temperaturi in za 0,61 mg/L pri višji temperaturi, medtem ko se v vzorcu a poveča za 1,28 mg/L pri nižji temperaturi in zmanjša za 0,87 mg/L pri višji temperaturi.

Vsebnosti metil laktata se povečajo tudi pri kontrolnih vzorcih in sicer za 2,16 mg/L pri višji temperaturi in za 0,56 mg/L pri nižji temperaturi.

5.1.1.26 ETIL LAKTAT

Vsebnosti etil laktata so pred potekom MLF zelo majhne, saj dosegajo vrednosti 4,11 mg/L. Po zaključeni MLF pa se vsebnosti močno povečajo in sicer v največji meri v vzorcu s spontano MLF pri nižji temperaturi; tu je vsebnost etil laktata po zaključeni MLF 39,07 mg/L. V vzorcu s spontano MLF pri višji temperaturi se vsebnost etil laktata poveča le za 0,61 mg/L.

V vzorcih a in b se vsebnosti etil laktata bolj povečajo pri višji temperaturi in sicer za 21,31 mg/L v vzorcu a in za 20,03 mg/L v vzorcu b. Pri nižji temperaturi pa se povečajo vsebnosti za 12,84 mg/L v vzorcu a in za 12,5 mg/L v vzorcu b. V kontrolnih vzorcih se vsebnosti etil laktata rahlo zmanjšajo.

Etil laktat, kot najpomembnejši produkt metabolizma LAB, pomembno pripeva k bolj polnemu okusu in večji harmoničnosti. Vsebnosti do 50 mg/L še pozitivno vplivajo na aromo vina.

5.1.1.27 FENILETIL ACETAT

Feniletil acetat se v vinu nahaja v zelo majhnih količinah. Na začetku je naše vino vsebovala 0,62 mg/L tega estra. Po končani MLF pa feniletil acetat v naših vzorcih ni več prisoten oziroma je pod mejo detekcije.

5.1.1.28 2-FENIL ETANOL

Vsebnosti 2-fenil etanola se povečajo v vseh vzorcih, kjer je potekla MLF in tudi v kontrolnih vzorcih. Zelo podobne vsebnosti so v vzorcih pri nižji temperaturi in sicer; vzorec s spontano MLF vsebuje 27,00 mg/L 2-fenil etanola, vzorec a 27,01 mg/L in vzorec b 27,03 mg/L. Vsebnosti vzorcev pri višji temperaturi so nekoliko nižje od vzorcev pri nižji temperaturi in sicer v vzorcu s spontano MLF je vsebnost 2-fenil etanola 25,58 mg/L, v vzorcu a 24,85 mg/L in v vzorcu b 27,08 mg/L.

O povečanju vsebnosti 2-fenil etanola poročata tudi avtorja Ugliano in Moio (2005). 2-fenil etanol s svojo aromatičnostjo pomembno prispeva k večji kompleksnosti arome vina.

5.1.2 SENZORIČNA ANALIZA VINA

Najslabše ocenjen je bil vzorec s spontano MLF pri višji temperaturi, saj je dosegel 16,27 točk. Vzorec s spontano MLF pri nižji temperaturi se je bil ocenjen nekoliko bolje in sicer 16,93 točk. Vzorec je bil ocenjen kot svež in bolj zaokrožen v okusu.

V obeh vzorcih s spontano MLF se je tekom poskusa pojavil bekser, ki je s svojo reduktivnostjo negativno vplival na končno oceno vzorca.

Kontrolna vzorca sta dobila po pričakovanjih nižje ocene in sicer vzorec pri višji temperaturi 16,57 točk in vzorec pri nižji temperaturi 16,33 točk. Vzorca sta bila sicer ocenjena kot sortno prepoznavna, vendar z izstopajočo kislino in trpkostjo. Bila sta tudi neharmonična in neuravnotežena v okusu zaradi prevlade astringentnega tona in kisline. Z biološkim razkisom se tako vino omehča, postane bolj harmonično in prijetnejše na okus.

Med vzorcema a in b pri višji temperaturi ni posebnih razlik. Vzorec a je dobil 16,80 točk, vzorec b pa 16,67 točk. Vzorcju a je primanjkovalo sadnosti in sortnosti, kljub večji harmoničnosti glede na prejšnje vzorce. Vzorec s sevom b je imel sicer lepšo barvo, vendar pa je v okusu deloval še neharmonično. Vzorec b pri nižji temperaturi je dobil visoko oceno in sicer 17,05 točke. Vzorec je imel večjo sadnost in intenzivnejšo barvo.

Daleč najvišjo oceno je dobil vzorec a pri nižji temperaturi in sicer 17,47 točk. Vzorec je bil sortno prepoznaven z lepo cvetico, v okusu je deloval polno in harmonično in tudi barva je bila nekoliko temnejša.

Iz rezultatov senzorične ocene lahko vidimo, da temperatura, pri kateri poteka biološki razkis, pomembno vpliva na aromo vina. Vsi vzorci pri nižji temperaturi so dobili višje ocene. Vzorci so delovali bolj sadno z večjo harmoničnostjo, medtem ko so vzorci pri višji temperaturi delovali manj sortno in neharmonično. Spontana MLF se ni obnesla najbolje za vino modra frankinja zaradi večje reduktivnosti in možnosti pojava bekserja. Lahko zaključimo, da je za modro frankinjo najbolj primeren vodeni biološki razkis z uporabo α -mlečnokislinskih bakterij (sev a), ki daje zadovoljivo polnost v okusu in izraznejšo cvetico.

5.2 SKLEPI

- Biološki razkis prispeva k zmanjšanju skupnih titrabilnih kislin v vinu v povprečju za 2 g/L in posledično k dvigu vrednosti pH, kar ugodno vpliva na senzorično kakovost vina.
- Za vodenje biološkega razkisa se je s stališča senzorične kakovosti vina kot bolj primerna izkazala nižja temperatura, tj. 16 °C.
- S temperaturo okoli 16 °C dobimo vina z večjo vsebnostjo višjih alkoholov in estrov, ki pomembno prispevajo k večji sadnosti in polnosti vina. Tako dobimo nekoliko večje vsebnosti izoamilnega alkohola, 2-fenil etanola, 1-propanola, izobutanola in diacetila, ki so še vedno v mejah senzorične sprejemljivosti. Tvori pa se nekoliko manj etil laktata, ki je odgovoren za večjo polnost okusa.
- Pri nižji temperaturi biološkega razkisa smo dobili vina z večjo vsebnostjo skupnega ekstrakta in z večjo intenziteto barve, kar posledično pomeni boljšo senzorično kakovost vina.
- Pri višji temperaturi vodenja biološkega razkisa, tj. 24 °C pa so vina vsebovala več acetaldehida, metanola in etilacetata ter imela večjo vsebnost hlapnih kislin in alkohola. Vsi vzorci pri višji temperaturi so bili slabše senzorično ocenjeni kot vzorci pri nižji temperaturi.
- Vzorci pri nižji temperaturi biološkega razkisa so bili opisani kot bolj sortni in harmonični z večjo polnostjo okusa, medtem ko so vzorci pri višji temperaturi bili še vedno trpki, neharmonični in premalo sortni.
- Kot bolj primeren sev so se izkazale α mlečnokislinske bakterije, saj so ti vzorci vsebovali več višjih alkoholov in estrov kot so 1-propanol, izoamilni alkohol, izoamil acetat in izobutanol, imeli pa so tudi nekoliko večje vsebnosti diacetila, ki je kot tak pomembno prispeval k bolj polnemu okusu.
- Kot najboljša kombinacija se je tako pokazala izbira nižje temperature biološkega razkisa in uporaba α mlečnokislinskih bakterij.
- Spontan biološki razkis ni dal dobrih rezultatov, še posebno zaradi pojava žveplovodika, posebej pri vodenju le tega pri višji temperaturi. Tudi diacetilna nota je bila bolj izražena, kar bi lahko v večjih koncentracijah negativno vplivalo na aromo vina.

6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti vpliv biološkega razkisa na sestavo in nastanek hlapnih komponent vina in s tem na samo kakovost in kompleksnost arome vina. Primerjalno smo obravnavali vzorce vin z dvema različnima sevoma mlečnokislinskih bakterij, ki smo jih izpostavili dveh različnim temperaturam z vzorci, kjer je potekel spontan biološki razkis in s kontrolnimi vzorci. Poskus smo opravili na vinu modre frankinje po zaključeni alkoholni fermentaciji.

Opravili smo osnovne fizikalno-kemijske analize vzorcev in senzorično analizo po zaključku poskusa. Ugotovili smo, da biološki razkis vina značilno vpliva na kemijsko sestavo in na samo aromo vina, ki postane bolj kompleksna in specifična. Vzorci z opravljenim biološkim razkisom so vsebovali manj skupnih titrabilnih kislin zaradi razgradnje jabolčne kisline v milejšo mlečno kislino, kar je imelo za posledico boljše senzorične lastnosti. Pozitiven vpliv biološkega razkisa na aromo vina se je pokazal tudi v sestavi hlapnih komponent vina, to so predvsem višji alkoholi in estri ter hlapne kisline.

Vzorci z opravljenim biološkim razkisom so vsebovali večje količine višjih alkoholov in estrov, ki so pomembno vplivali na sadni karakter vina in s tem na izraznejšo cvetico. K polnejšemu okusu vina je pomembno prispevala tvorba etil laktata, v manjših koncentracijah pa tudi tvorba diacetila, ki je dal pečat specifični aromi biološko razkisanega vina. Večje vsebnosti hlapnih kislin niso bile senzorično zaznavne. Kot primernejša se je izkazala nižja temperatura, to je 16 °C, saj so bili ti vzorci senzorično kakovostnejši zaradi poudarjene sortnosti, ki se je pri višji temperaturi izgubila. Nižja temperatura je prispevala tudi k večji harmoničnosti in zaokroženosti okusa. Rezultati so pokazali, da ima vodeni biološki razkis z uporabo komercialnih starter kultur mlečnokislinskih bakterij kar nekaj prednosti pred spontanim biološkim razkisom. Te prednosti so predvsem v možnosti kontroliranega poteka in v večji gotovosti nastanka željenih komponent vina, ki kot take prispevajo k specifičnosti arome vina. Spontan biološki razkis lahko vodi v nastanek neželjenih spojin, kot so biogeni amini in v tvorbo spojin, ki imajo za posledico neprijetne napake vina, kot je žveplovodik. Razlike so se pokazale tudi med sevi mlečnokislinskih bakterij in sicer predvsem v tvorbi hlapnih sestavin. Večje količine višjih alkoholov in estrov so tvorile α mlečnokislinske bakterije, medtem ko vzorci s sevom L 31 vsebovali nekoliko več alkohola in glicerola.

Večja harmoničnost in uravnoteženost okusa, polnost in večja kompleksnost arome so tisti dejavniki, ki poglavitno vplivajo na željene senzorične parametre in prepričajo marsikaterega ljubitelja dobrega vina. Z biološkim razkisom dobimo vina z večjo sadnostjo in manjšo vsebnostjo rastlinskih ali zelenih vonjev, večji spekter arom pa nam ponudi večje užitke pri degustaciji žlahtne kapljice.

7 VIRI

Bartowsky E.J., Costello P., Henschke P. 2002a. Management of malolactic fermentation-wine flavour manipulation. *Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 7, 461a: 7-12

Bartowsky E.J., Francis I.L., Bellon J.R., Henschke P.A. 2002b. Is buttery aroma perception in wines predictable from the diacetyl concentration? *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 8, 3: 180-185

Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, The Chapman & Hall Enology Library: 604 str.

Davis C.R., Wibowo D., Fleet G.H., Lee T.H. 1988. Properties of wine lactic acid bacteria: their potential oenological significance. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 2: 137-142

Edwards C.G., Peterson J.C. 1994. Sorbent extraction and analysis of volatile metabolites synthesized by lactic acid bacteria in a synthetic medium. *Journal of Food Science and Technology*, 59, 1: 192-196

Fleet G.H. 1993. Wine microbiology and biotechnology. London, Taylor & Francis: 507 str.

Fugelsang K.C. 1997. Wine microbiology. New York, The Chapman & Hall Enology Library, 241 str.

Hrček L., Korošec-Koruza Z. 1996. Sorte in podlage vinske trte. Ptuj, Slovenska vinska akademija VERITAS: 96-98

Jackson R. S. 1993. Wine science. London, Academic Press: 178-219.

Košmerl T., Kač M. 2003. Osnovne kemijske analize mošta in vina: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 87 str.

Košmerl T. 2004. Biološki razkis (MLF). *Brstika: Priloga tednika Kmečki glas za sadjarje in vinogradnike*, 3, 1: 20-22

Košmerl T. 2003a. Pomen hranilnih snovi za optimalen potek alkoholne in jabolčno-mlečnokislinske fermentacije. V: Vinarski dan, Ljubljana, 12. junij 2003. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 13-35

Košmerl T. 2003b. Fermentacija: Študijsko gradivo za predavanja iz predmeta Tehnologija vina, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.

Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 609-632

Krieger S. 2002. Management of malolactic fermentation (MLF)- new strains. V: 2. slovenski vinogradniško-vinarski kongres z mednarodno udeležbo, Otočec, 31. 1.-2. 2002. Ljubljana, Strokovno društvo vinogradnikov in vinarjev Slovenije, Zveza društev vinogradnikov in vinarjev Slovenije, Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 392-401

Lee. C.Y., Cooley H.J. 1981. Higher alcohol contents in New York wine. American Journal of Enology and Viticulture, 32, 3: 244-246

Liu S.Q. 2002. Malolactic fermentation in wine-beyond deacidification. A review. Journal of Applied Microbiology, 92, 4: 589-601

Mangani S., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M. 2005. Putrescine accumulation in wine: Role of *Oenococcus oeni*. Current Microbiology, 51, 1: 6-10

Muhar U.S., Košmerl T. 2005. Izboljšanje kakovosti vina malvazija in teran. V: Vinarski dan, Ljubljana, 14. april 2005. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 25-49

Nemanič J. 1996. Spoznajmo vino. Ljubljana, Kmečki glas: 165 str.

Ough C.S., Guymon J.F., Crowell E.A. 1966. Formation of higher alcohols during grape juice fermentation at various temperatures. Journal of Food Science, 31: 620-625

Pozo-Bayón M.A., G-Alegria E., Polo M.C., Tenorio C., Martin-Alvarez P.J., Calvo de la Banda M.T., Ruiz-Larrea F., Moreno-Arribas M.V. 2005. Wine volatile and amino acid composition after malolactic fermentation: Effect of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 22: 8729-8735

Pravilnik o postopku in načinu ocenjevanja mošta, vina in drugih proizvodov iz grozdja in vina. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 32: 3857-3857

- Radovanović V. 1986. Tehnologija vina. Beograd, IRO Građevinska knjiga: 686 str.
- Rapp A. 1988. Wine aroma substances from gas chromatographic analysis. V: Wine analysis. Linskens H.F. (ed.). Berlin, Springer: 29-66
- Rapp A., Mandrey H. 1986. New progress in wine and wine research. *Experientia*, 8: 857-966
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A., Glories Y., Maujean A. 2000. Handbook of enology. Vol. 1: The microbiology of wine and vinifications. Chichester, John Wiley & Sons: 439 str.
- Selli S., Cabaroglu T., Canbas A., Erten H., Nurgel C., Lepoutre J.P., Gunata Z. 2004. Volatile composition of red wine from cv. Kalecik Karasu grown in central Anatolia. *Food Chemistry*, 85, 2: 207-213
- Schneider A., Gerbi V., Redoglia M. 1987. A rapid HPLC method for separation and determination of major organic acids in grape must and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 2: 151-155.
- Šikovec S. 1993. Vinarstvo – od grozdja do vina. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 284 str.
- Štancar A. 1996. Osnove tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC). V: Tečaj osnove HPLC tehnik. Ljubljana, BIA d.o.o.: 1-15.
- Tracey R.P., Britz T.J. 1989. The effect of amino acids on malolactic fermentation by *Leuconostoc oenos*. *Journal of Applied Bacteriology*, 67: 589-595
- Ugliano M., Moio L. 2005. Changes in the concentration of yeast-derived volatile compounds of red wine during malolactic fermentation with four commercial starter cultures od *Oenococcus oeni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 26: 10134-10139
- Vodovnik T., Vodovnik A. 1999. Nasveti za vinarje. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 265 str.
- Vivas N., Augustin M., Lonvaud-Funel A. 2000. Influence of oak wood and grape tannins on the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 11: 1675-1678

Wondra M. 2004. Zapiski s predavanj pri predmetu Tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.

Wondra M. 1996. Odvisnost aromatičnih snovi vina od različnih sevov *Saccharomyces cerevisiae*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 98 str.

Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 151 str.

ZAHVALA

Najlepša hvala mentorju doc. dr. Mojmirju Wondri za čas, ki si ga je vzela za pregledovanje tega diplomskega dela in za vso potrpežljivost ter strokovne nasvete. Zahvaljujem se tudi recenzentu doc. dr. Rajku Vidrihu za strokoven pregled in nasvete.

Hvala mag. Tatjani-Vrščaj Vodošek za nesebično pomoč in nasvete pri izdelavi tega diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi Zdenki Zupančič za pomoč in prijetno vzdušje v laboratoriju. Hvala tudi doc. dr. Tatjani Košmerl za priporočeno literaturo in nasvete.

Hvaležna sem tudi Barbari Slemenik za veliko mero potrpežljivosti in dragocen čas pri iskanju literature. Za pomoč pri iskanju literature in pregledovanju diplomskega dela hvala tudi Ivici Hočevar.

Nenazadnje pa posebna zahvala Denisu Imširoviću za vso moralno podporo, znanje in razumevanje skozi vsa leta študija in staršem, ki so mi to omogočili in me podpirali.

PRILOGE

Priloga A:

Podatki meritev vsebnosti titrabilnih kislin do pH=7 in skupnih kislin do pH=8,2 ter meritev vrednosti pH v vzorcih vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah pred, med in po biološkem razkisu (MLF)

Čas	Vzorec		Titrab.ksl. pH=7	Skup.ksl. pH=8,2	Vrednost	
			(g/L)	(g/L)	pH	
pred MLF			7,96	8,27	3,25	
trajanje MLF	1.teden	Višja T	s	6,57	6,84	3,29
			k	7,74	8,10	3,21
			a	6,45	6,77	3,32
			b	6,45	6,80	3,32
	Nižja T	s	7,75	8,01	3,21	
		k	7,67	8,03	3,20	
		a	7,52	7,86	3,23	
		b	7,47	7,82	3,23	
	2.teden	Višja T	s	6,73	7,11	3,35
			k	7,82	8,18	3,24
			a	6,44	6,76	3,36
			b	6,41	6,71	3,36
Nižja T	s	6,99	7,28	3,28		
	k	7,69	7,96	3,22		
	a	6,81	7,10	3,31		
	b	6,58	6,86	3,33		
3.teden	Nižja T	s	5,93	6,20	3,36	
		k	7,04	7,33	3,23	
		a	5,80	6,08	3,36	
		b	5,82	6,12	3,36	
po MLF	Višja T	s	5,97	6,31	3,33	
		k	7,74	8,10	3,24	
		a	5,86	6,26	3,33	
		b	5,83	6,20	3,33	
	Nižja T	s	5,72	6,06	3,34	
		k	6,83	7,08	3,21	
		a	5,58	5,86	3,35	
		b	5,52	5,80	3,34	

Legenda:

s...spontana MLF

k...kontrola

a... α LAB

b...L31 LAB

T...temperatura

Priloga B:

Podatki meritev vsebnosti hlapnih kislin, etanola, skupnega ekstrakta in skupnih fenolov v vzorcih vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah pred in po biološkem razkisu (MLF)

Čas	Vzorec	Hlap.kisl (g/L)	Etanol (vol. %)	Sk.eks. (g/L)	Sk.fenoli (mg/L)	
pred MLF		0,24	10,84	25,7	1625	
po MLF	Višja T	s	0,51	11,09	21,60	1558
		k	0,34	11,10	25,50	1508
		a	0,54	11,01	21,50	1558
		b	0,60	11,03	21,50	1528
	Nižja T	s	0,34	10,89	22,70	1547
		k	0,27	10,70	24,50	1477
		a	0,52	10,88	22,55	1517
		b	0,41	10,94	22,80	1487

Legenda:

s...spontana MLF

k...kontrola

a... α LAB

b...L31 LAB

T...temperatura

Priloga C:

Podatki meritev absorbance pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm ter izračuni intenzitete barve in tona barve v vzorcih vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah pred in po biološkem razkisu (MLF)

Čas	Vzorec		A _{420 nm}	A _{520 nm}	A _{620 nm}	Inte.barve	Ton barve
pred MLF			0,329	0,587	0,121	10,370	0,560
po MLF	Višja T	s	0,173	0,278	0,044	4,950	0,622
		k	0,206	0,392	0,049	6,470	0,526
		a	0,169	0,277	0,044	4,900	0,610
		b	0,169	0,276	0,046	4,900	0,613
	Nižja T	s	0,233	0,374	0,066	6,730	0,623
		k	0,070	0,512	0,269	8,510	0,525
		a	0,230	0,382	0,067	6,775	0,601
		b	0,211	0,352	0,060	6,230	0,599

Legenda:

s...spontana MLF

k...kontrola

a...α LAB

b...L31 LAB

T...temperatura

Priloga D:

Podatki meritev vsebnosti sladkorjev in organskih kislin v vzorcih vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah pred, med in po biološkem razkisu (MLF)

Čas	Vzorec	Sladkorji			Organske kisline					
		Glukoza (g/L)	Fruktoza (g/L)	Glicerol (g/L)	Citronska (g/L)	Vinska (g/L)	Jabolčna (g/L)	Mlečna (g/L)		
pred MLF		1,88	2,35	6,26	0,17	3,34	1,94	0,42		
trajanje MLF	1. teden	Višja T	s	1,62	0,17	5,19	0,12	3,42	0,08	2,88
			k	1,47	2,04	5,60	0,10	3,15	1,64	0,46
		Nižja T	a	1,59	0,01	5,30	0,08	3,33	0,00	2,90
			b	1,79	0,00	5,37	0,09	3,33	0,00	3,02
	2. teden	Višja T	s	1,63	1,84	5,52	0,09	3,20	1,45	0,50
			k	1,80	2,01	5,46	0,17	3,34	1,94	0,42
		Nižja T	a	1,61	1,52	5,43	0,15	3,46	1,39	1,02
			b	1,49	1,49	5,42	0,13	3,25	1,79	0,97
	3. teden	Višja T	s	1,57	0,03	5,30	0,05	2,42	0,00	3,30
			k	2,00	0,02	5,34	0,15	2,95	1,96	0,68
		Nižja T	a	1,59	0,00	5,39	0,06	3,29	0,00	3,28
			b	2,17	0,01	5,44	0,04	3,30	0,00	3,29
po MLF	1. teden	Višja T	s	1,70	0,80	5,52	0,16	2,99	0,84	2,05
			k	1,59	2,00	5,51	0,16	3,35	2,05	0,50
		Nižja T	a	1,68	0,50	5,43	0,15	3,36	0,42	2,43
			b	1,59	0,24	5,52	0,11	3,28	0,15	2,62
	2. teden	Višja T	s	1,74	0,01	5,34	0,05	3,11	0,00	3,04
			k	1,98	2,00	5,60	0,16	3,39	1,96	0,72
		Nižja T	a	2,05	0,01	5,44	0,07	2,95	0,00	2,94
			b	2,83	0,01	5,42	0,05	3,04	0,00	2,94
	3. teden	Višja T	s	1,63	0,01	5,29	0,03	3,17	0,00	2,88
			k	1,98	1,85	5,32	0,16	3,33	1,96	0,55
		Nižja T	a	1,56	0,03	5,43	0,05	3,29	0,00	2,96
			b	1,63	0,02	5,37	0,03	3,23	0,00	2,89
4. teden	Višja T	s	1,53	0,02	4,92	0,02	3,33	0,00	2,28	
		k	1,85	2,08	5,89	0,13	3,36	1,74	0,46	
	Nižja T	a	1,65	0,01	5,18	0,03	3,22	0,00	2,19	
		b	1,79	0,01	5,80	0,02	3,13	0,00	2,65	

Legenda:

s...spontana MLF

k...kontrola

a...α LAB

b...L31 LAB

T...temperatura

Priloga E:

Podatki meritev vsebnosti acetaldehida, etilacetata, metanola, diacetila, 1-propanola in izobutanola v vzorcih vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah pred in po biološkem razkisu (MLF)

Čas	Vzorec	AA (mg/L)	etilacetat (mg/L)	metanol (mg/L)	diacetil (mg/L)	1- propanol (mg/L)	izobutanol (mg/L)	
pred MLF		13,70	17,93	66,21	0,47	17,43	50,42	
po MLF	Višja T	s	0,97	8,44	71,77	1,81	19,38	56,20
		k	3,81	18,10	63,68	0,47	16,77	49,66
		a	6,80	19,57	71,47	1,84	18,79	54,19
		b	3,83	14,92	69,31	1,45	18,02	51,57
	Nižja T	s	0,00	16,95	63,24	2,09	16,69	47,64
		k	19,24	15,05	63,32	0,47	16,58	47,57
		a	6,78	21,04	75,57	1,93	19,67	57,01
		b	1,15	14,44	67,62	1,51	18,43	53,45

Legenda:

s...spontana MLF

k...kontrola

a... α LAB

b...L31 LAB

T...temperatura

Priloga F:

Podatki meritev vsebnosti izoamil acetata, izoamil alkohola, acetoina, metil laktata, etil laktata, 2-fenil etilacetata in 2-fenil etanola v vzorcih vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah pred in po biološkem razkisu (MLF)

Čas	Vzorec	izoamil acetat (mg/L)	izoamilni alk. (mg/L)	acetoin (mg/L)	metil laktat (mg/L)	etil laktat (mg/L)	2-fenil etilacetat (mg/L)	2-fenil etanol (mg/L)	
pred MLF		0,60	327,16	17,78	3,20	4,11	0,62	21,44	
po MLF	Višja T	s	0,14	361,18	17,78	2,33	4,72	0,00	25,58
		k	0,62	317,86	17,78	5,36	2,78	0,00	21,92
		a	0,60	348,11	17,78	2,33	25,42	0,00	24,85
		b	0,38	332,13	18,23	3,81	24,14	0,00	27,08
	Nižja T	s	0,56	307,28	17,78	2,33	39,07	0,00	27,00
		k	0,14	308,54	19,58	3,76	3,34	0,00	25,88
		a	0,68	367,37	18,62	4,48	16,95	0,00	27,01
		b	0,35	344,11	19,08	3,35	16,61	0,00	27,03

Legenda:

s...spontana MLF

k...kontrola

a... α LAB

b...L31 LAB

T...temperatura

Priloga G:

Rezultati senzorične ocene vzorcev vin modra frankinja pri dveh različnih temperaturah po končanem biološkem razkisu

	vzorec	Skupna senzorična ocena (1-20 točk)
Višja T	s	16,27
	k	16,57
	a	16,80
	b	16,67
Nižja T	s	16,93
	k	16,33
	a	17,47
	b	17,05

Legenda:

s...spontana MLF

k...kontrola

a... α LAB

b...L31 LAB

T...temperatura