

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mojca GROBLER

**VPLIV IZBRANIH ČISTILNIH SREDSTEV NA  
KEMIJSKO SESTAVO IN SENZORIČNO  
KAKOVOST BELIH VIN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mojca GROBLER

**VPLIV IZBRANIH ČISTILNIH SREDSTEV NA KEMIJSKO  
SESTAVO IN SENZORIČNO KAKOVOST BELIH VIN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF SELECTED OENOLOGICAL AGENTS ON  
CHEMICAL COMPOSITION AND SENSORY QUALITY OF  
WHITE WINES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Diplomsko delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za tehnologije, prehrano in vino na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan doc. dr. Mojmir WONDRA in za recenzentko prof. dr. Tatjana KOŠMERL.

Mentor: doc. dr. Mojmir WONDRA

Recenzentka: prof. dr. Tatjana KOŠMERL

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Članica:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mojca GROBLER

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 663.251/.257:663.221:543.61:543.92 (043)= 163.6
- KG vino/bela vina/sorta rebula/enološka sredstva/čiščenje vina/bentonit/kombinirana čistilna sredstva/fizikalno-kemijske lastnosti/senzorična analiza
- AV GROBLER, Mojca
- SA WONDRA, Mojmir (mentor)/KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)
- KZ SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2011
- IN VPLIV IZBRANIH ČISTILNIH SREDSTEV NA KEMIJSKO SESTAVO IN SENZORIČNO KAKOVOST BELIH VIN
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 53 str., 5 pregl., 15 sl., 3 pril., 36 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen naloge je bil ugotoviti vpliv enoloških sredstev ali njihovih kombinacij na barvo, vonj in okus belih vin. Predpostavili smo, da uporabljena enološka sredstva ne vplivajo bistveno na kemijsko sestavo vina. Kombinacija enoloških sredstev naj bi bila primernejša za doseg želenih fizikalno-kemijskih in senzoričnih lastnosti belih vin. Analizirali smo vzorce mladega vina sorte rebula, pridelanega s spontano in vodeno alkoholno fermentacijo grozdja treh datumov trgateg. Vse vzorce smo žveplali s kalijevim metabisulfitom. Kot samostojno čistilno sredstvo smo uporabili Na-bentonit. Kombinirano čistilno sredstvo je bilo sestavljeno iz želatine, ribjega mehurja, kazeina in silicijevega dioksida. Po dodatku čistilnih sredstev smo po treh dneh določili pH, koncentracije hlapnih kislin, skupnih fenolov, alkohola, skupnega in sladkorja prostega ekstrakta, reducirajočih sladkorjev, prostega in skupnega žveplovega dioksida, intenziteto barve in motnost. Dobljene rezultate kemijskih analiz smo primerjali s kontrolnimi vzorci in jih statistično obdelali, ter senzorično ocenili po 20-točkovni Buxbaumovi metodi. Ugotovili smo, da dodana čistilna sredstva ne vplivajo bistveno na kemijsko sestavo vzorcev vina, kar so potrdili tudi rezultati statistične analize podatkov. Senzorična ocena vzorcev je pokazala, da dodatek posameznega ali kombinacije čistilnih sredstev v vsakem primeru vpliva na izboljšanje senzoričnih lastnosti in povečanje ocene vina.

**KEY WORDS DOCUMENTATION**

- DN Dn
- DC UDC 663.251/.257:663.221:543.61:543.92(043)= 163.6
- CX wines/white wines/cv. Ribolla/clarification/oenological agent/fining/bentonite/combination of oenological agents/physico-chemical characteristics/sensory evaluation
- AU GROBLER, Mojca
- AA WONDRA, Mojmir (supervisor)/KOŠMERL, Tatjana (reviewer)
- PP SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2011
- TI THE INFLUENCE OF SELECTED OENOLOGICAL AGENTS ON CHEMICAL COMPOSITION AND SENSORY QUALITY OF WHITE WINES
- DT Graduation thesis (university studies)
- NO XI, 53 p., 5 tab., 15 fig., 3 ann., 36 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The purpose of the research was to determine the influence of oenological agents or their combinations on the colour, smell and taste of white wines. We have assumed that the applied oenological agents do not affect the chemical composition of the wine significantly. The combination of oenological agents is supposedly more appropriate to achieve the desired physico-chemical and sensory characteristics of white wines. We have analysed samples of young wine (cv. Ribolla), produced by spontaneous (autochthones yeast) and guided fermentation (active dry yeast starter culture) from grapes harvested three times consecutively, at the same location in the same season. All the samples were treated with potassium metabisulfite. Na-bentonite was used as an independent fining agent. The combination of fining agents was composed of gelatine, fish bladder, casein and silica dioxide. Three days after the fining agent had been added we determined the pH value, concentrations of total acids, volatile acids, total phenolic compounds, alcohol, total dry and sugar-free extract, reducing sugars, free and total sulphur dioxide, as well as colour intensity and turbidity. The obtained results were compared to control samples, they were statistically analysed and sensory evaluated by the Buxbaum 20-point method. Our findings show that the added fining agents do not affect chemical composition of the wine samples significantly. That was also confirmed by the results of statistical data analysis. The sensory evaluation, however, indicated that the addition of a single or a combination of fining agents improves the sensory characteristics and increases the marks obtained for all wine evaluated.

**KAZALO VSEBINE**

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJ DELA .....	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 STABILIZACIJA .....	3
2.1.1 Stabilizacija na beljakovine .....	3
2.1.2 Stabilizacija na vinski kamen .....	3
2.1.3 Stabilizacija na prosti SO <sub>2</sub> .....	3
2.1.4 Stabilizacija na kovine.....	3
2.1.5 Mikrobiološka stabilizacija.....	4
2.2 ŽVEPLOV DIOKSID .....	4
2.2.1 Protimikrobno delovanje .....	4
2.2.2 Antioksidativno delovanje in preprečevanje reakcij porjavenja .....	5
2.2.3 Vezava s porabniki žvepla .....	6
2.2.4 Druge reakcije.....	7
2.2.5 Izgube skupnega žvepla v stekleničnem vinu .....	7
2.2.6 Topnost.....	7
2.2.7 Oblike žvepla.....	8
2.2.7.1 Molekularna oblika .....	9

2.2.7.2	Bisulfitna oblika.....	9
2.2.7.3	Sulfitna oblika.....	10
<b>2.2.8</b>	<b>Hlapnost.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.9</b>	<b>Pripravki žvepla.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.10</b>	<b>Fiziološki učinki žveplovega dioksida.....</b>	<b>11</b>
<b>2.3</b>	<b>ČIŠČENJE OZIROMA LEPSANJE VINA.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Mehanizem delovanja.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Razdelitev glede na izvor.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Beljakovinska čistilna sredstva.....</b>	<b>13</b>
2.3.3.1	Želatina.....	14
2.3.3.2	Kazein.....	15
2.3.3.3	Ribji mehur.....	16
<b>2.3.4</b>	<b>Kremenčevo čistilo.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.5</b>	<b>Bentonit.....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIAL IN NAČRT DELA.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Določanje pH.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Določanje skupnih (titrabilnih) kislin v vinu.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Določanje vsebnosti reducirajočih sladkorjev v vinu.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Določanje relativne gostote, ekstrakta in alkohola v vinu.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Določane hlapnih kislin v vinu.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Določanje fenolnih snovi.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Določanje žveplovega dioksida v vinu.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Določanje intenzitete barve in motnosti vina.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.9</b>	<b>Senzorična analiza.....</b>	<b>28</b>

---

<b>3.2.10 Statistična analiza</b> .....	28
<b>4 REZULTATI</b> .....	<b>30</b>
4.1 REZULTATI DOLOČANJA VREDNOSTI pH.....	30
4.2 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE TITRABILNIH IN SKUPNIH KISLIN.....	31
4.3 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE HLAPNIH KISLIN.....	33
4.4 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE ALKOHOLA.....	34
4.5 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE SLADKORJA PROSTEGA EKSTRAKTA .....	35
4.6 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE PROSTEGA ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA.....	36
4.7 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE SKUPNEGA ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA.....	37
4.8 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE SKUPNIH FENOLOV.....	38
4.9 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE REDUCIRAJOČIH SLADKORJEV .....	39
4.10 REZULTATI DOLOČANJA INTENZITETE BARVE BELEGA VINA.....	40
4.11 REZULTATI ABSORBANCE PRI 600 nm (MOTNOST).....	41
4.12 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE.....	42
4.13 REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE .....	44
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>46</b>
5.1 RAZPRAVA .....	46
5.2 SKLEPI.....	48
<b>6 POVZETEK</b> .....	<b>49</b>
<b>7 VIRI</b> .....	<b>51</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Gostota vodne raztopine žveplovega dioksida pri temperaturi 20 °C (Košmerl, 2000).....	11
Preglednica 2: Količine dodanega K-metabisulfita (g/hL) v mlada vina sorte rebula.....	22
Preglednica 3: Senzorični opis vzorcev mladih vin sorte rebula .....	43
Preglednica 4: Rezultati analize vin sorte rebula z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	44
Preglednica 5: Vpliv skupin na fizikalno-kemijske parametre vin sorte rebula, pridelanih iz grozdja vseh treh trgatav.....	45

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Porazdelitev oblik žveplovega dioksida glede na pH (Margalit, 2004).....	8
Slika 2: Koncentracija prostega žveplovega dioksida, ki je potrebna za vzdrževanje 0,8 mg/L in 0,5 mg/L molekularnega žveplovega dioksida v odvisnosti od pH vina (Margalit, 2004).....	9
Slika 3: Vrednosti pH mladih vin sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano alkoholno fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo.....	30
Slika 4: Koncentracija titrabilnih kislin (g/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo.....	31
Slika 5: Koncentracija skupnih kislin (g/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo.....	31
Slika 6: Koncentracija hlapnih kislin (g/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo.....	33
Slika 7: Koncentracija alkohola (vol.%) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo.....	34
Slika 8: Koncentracija sladkorja prostega ekstrakta (g/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo.....	35
Slika 9: Koncentracija prostega žveplovega dioksida (mg/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo.....	36
Slika 10: Koncentracija skupnega žveplovega dioksida (mg/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo.....	37
Slika 11: Koncentracija skupnih fenolov (mg/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo.....	38
Slika 12: Koncentracija reducirajočih sladkorjev (g/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo.....	39
Slika 13: Intenziteta barve ( $A_{420}$ ) belih mladih vin sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo.....	40

Slika 14: Absorbanca pri 600 nm mladih vin sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo.....	41
Slika 15: Senzorična ocena (točke) mladih vin sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene pred in po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi .....	42

## KAZALO PRILOG

- Priloga A: Rezultati določanja pH vrednosti, titrabilnih in skupnih kislin ter hlapnih kislin mladih vin sorte rebula
- Priloga B: Rezultati določanja koncentracij alkohola, sladkorja prostega ekstrakta, prostega in skupnega žveplovega dioksida mladih vin sorte rebula
- Priloga C: Rezultati določanja skupnih fenolov, reducirajočih sladkorjev, intenzitete barve vina in motnost mladih vin sorte rebula

## 1 UVOD

Pridelava kakovostnega, bistrega ter kemijsko in mikrobiološko stabilnega vina predstavlja za vinarje vse večji izziv. Potrošnik pričakuje primerno kakovost vina in je vse bolj osveščen in zahteven. Predpisi v zvezi s pridelavo vina in vsebnostjo nezaželenih snovi se zaostrujejo, dovoljena vsebnost skupnega žvepla v vinu se zmanjšuje.

Vino mora biti v steklenici dalj časa (odvisno od vrste in kakovosti) stabilno, primernege videza, vonja in okusa. Prav zato je potrebno vino pred stekleničenjem dobro pripraviti, da se bo ohranilo v različnih skladiščnih okoliščinah. Vino moramo torej stabilizirati, kar pomeni, da ga pripravimo tako, da bo obstojno v vseh razmerah, ki jih mora prenesti na poti od kleti do porabnika. Ob pripravi pa vino primerno »olepšamo«, če je potrebno, kar ugotovimo s pokušnjo in primernim testiranjem (Vodovnik A. in Vodovnik T., 1999).

Vina, zlasti tista, ki jih mislimo sami ustekleničiti, se morajo poleg dobre kakovosti odlikovati z obstojnostjo do trenutka porabe. To pomeni, da ne sme nastopiti motnost ali sprememba v barvi, vonju in okusu (Šikovec, 1975).

Vinarji zaradi zmanjšanja stroškov težijo k čim krajšem pridelovalnem procesu vse do stekleničenja. Uporaba čistilnih sredstev spada med najcenejše postopke v pridelavi vina, obenem pa skrajša tehnološki proces in ima velik vpliv na kakovost vina.

V letih, ko je na grozdju prisotne več gnilobe, poteka bistrenje vina počasneje in težavnejše kot običajno. Tako se številna vina ne zbistrijo niti po prvem pretoku. Vzrok je prisotnost najrazličnejših zaščitnih koloidnih delcev, ki lebdijo v vinu in preprečujejo bistrenje. Teh problemov ne bo ali pa jih bo manj, če bomo primerna enološka sredstva uporabili že v moštu (ob razsluzenju ali med fermentacijo). V vinarstvu je tako že dolgo znan ukrep dodatka primernege bistrila (Vodovnik A. in Vodovnik T., 1999).

V vinarstvu poznamo dosti čistil, ki pa se razlikujejo po načinu uporabe, čistilnem učinku, izvoru, vplivu na kakovost vina in ceni.

Čistilna sredstva se morajo uporabljati v najmanjših, še zadostnih količinah za doseganje zelenega cilja. Količino in vrsto čistila vinar izbere s pomočjo poskusov na manjši količini vina. Če s čistilom pričakovani cilj ni dosežen, lahko za doseganje istega cilja uporabi drugo čistilo, saj je na trgu mnogo čistil različnih proizvajalcev, ki služijo istemu namenu.

Priprava čistila je bistvenega pomena, saj se ob nepravilni pripravi učinkovitost čiščenja lahko zmanjša za polovico. Čistilo ni dodatek vinu, ampak le tehnološki pripomoček, zato ga je treba po čiščenju odstraniti. Ker večina čistilnih sredstev reagira že v nekaj sekundah, mora biti stik med čistilom in vinom čim krajši. Čisto nasprotje pa predstavljajo beljakovinska čistila, pri katerih kosmiči nastajajo nekaj dni in se usedajo še teden ali dva.

Vina moramo pred stekleničenjem primerno pripraviti oziroma stabilizirati. Pravilno izvedena stabilizacija je nujna, saj kupec oceni vino samo na osnovi trenutne kakovosti in izgleda v steklenici. Motnost, usedlina, oksidacija in aktivnost mikroorganizmov v

steklenici so posledica nepravilno izvedene stabilizacije. Takšne pomanjkljivosti in napake odvrnejo kupca in so najslabša možna reklama za pridelovalca (Bavčar, 2009).

## 1.1 CILJ DELA

Namen naloge je bil ugotoviti, katera enološka sredstva oziroma njihove kombinacije so najprimernejša za zagotovitev optimalne barve, bistrosti, vonja in okusa belih vin, ob predpostavki, da uporabljena enološka sredstva bistveno ne vplivajo na kemijsko sestavo vina.

## 1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predpostavljamo, da je kombinacija enoloških sredstev primernejša za doseg fizikalno-kemijskih in senzoričnih lastnosti belih vin, kot uporaba posameznih enoloških sredstev. Dodatek enoloških sredstev bistveno ne vpliva na kemijsko sestavo vina. To bomo potrdili tudi na realnih vzorcih mladih belih vin, katerim bomo dodali enološka sredstva. Kot samostojno čistilno sredstvo bomo uporabili Na-bentonit. Kombinirano čistilno sredstvo pa bo sestavljeno iz želatine, ribjega mehurja, kazeina in silicijevega dioksida. Določili bomo vrednost pH, vsebnosti skupnih kislin, hlapnih kislin, skupnih fenolov, alkohola, skupnega in sladkorja prostega ekstrakta, reducirajočih sladkorjev, skupnega in prostega žveplovega dioksida, intenziteto barve in motnost. Dobljene rezultate kemijskih analiz bomo statistično obdelali, vina pa tudi senzorično ocenili.

## **2 PREGLED OBJAV**

### **2.1 STABILIZACIJA**

Priprava vina na stekleničenje zahteva (Vodovnik A. in Vodovnik T., 1999):

- stabilizacijo na termolabilne beljakovine,
- stabilizacijo na vinski kamen,
- stabilizacijo na vsebnost prostega SO<sub>2</sub>,
- stabilizacijo na kovine,
- mikrobiološko stabilnost vina.

#### **2.1.1 Stabilizacija na beljakovine**

Vino mora biti obstojno na za toploto občutljive beljakovine, ki lahko koagulirajo, če vino ni primerno pripravljeno. Govorimo o beljakovinski motnosti, ki lahko nastane šele po stekleničenju (Vodovnik A. in Vodovnik T., 1999). Vina vsebujejo različne količine nestabilnih beljakovin, ki zlasti pri izpostavljenosti vina višjim temperaturam, denaturirajo ali aglomerirajo, tvorijo t.im. beljakovinsko motnost (meglico, pajčolan) in/ali usedlino. Beljakovinsko nestabilnost ugotavljamo s toplotnimi testi, kot enološko sredstvo za čiščenje uporabimo bentonit ali silicijev dioksid (Košmerl, 2007).

#### **2.1.2 Stabilizacija na vinski kamen**

Izločanje vinskega kamna je naravni postopek med zorenjem vina, največ med fermentacijo in takoj po njej. Nestabilnost vina se lahko pojavi zaradi izločanja kristalov kalijevega hidrogentartrata ali kalcijevega tartrata. Stabilizacijo na vinski kamen lahko dosežemo s predhodno pospešeno kristalizacijo ali odstranitvijo kristalov pred stekleničenjem. Nizke temperature pospešijo kristalizacijo (Vodovnik A. in Vodovnik T., 1999).

#### **2.1.3 Stabilizacija na prosti SO<sub>2</sub>**

Za obstojnost vina v steklenicah je zelo pomembna stabilnost vina na vsebnost prostega SO<sub>2</sub>. V praksi to pomeni, da vino pred stekleničenjem ohrani prosti SO<sub>2</sub> vsaj tri tedne na želeni ravni. To nam pokaže, da so porabniki žvepla nasičeni oz. nevtralizirani. Želimo, da ima vino ob stekleničenju prostega SO<sub>2</sub> 35 mg/L (Vodovnik A. in Vodovnik T., 1999). Glavno antioksidativno in protimikrobno delovanje ima prosta oblika SO<sub>2</sub>.

#### **2.1.4 Stabilizacija na kovine**

Odkar smo v predelavo grozdja in nego vina uvedli odporne materiale (jeklo, plastiko), so problemi s težkimi kovinami v vinu (predvsem ioni železa, bakra, cinka, mangana) skoraj odpadli (Vodovnik A. in Vodovnik T., 1999). Težke kovine so v vinu nezaželene, ker ne povzročajo le motnosti (sivi lom, bakreni lom), ampak katalitično vplivajo na oksidacijske procese. Za odstranitev težkih kovin uporabljamo čiščenje s kalijevim ferocianidom (Šikovec, 1975).

### 2.1.5 Mikrobiološka stabilizacija

Mikrobiološka stabilizacija vina je določena s prisotnostjo mikroorganizmov in njihovo sposobnostjo razmnoževanja. Vino v steklenici naj vsebuje čim manjše število drobnoživk (predvsem kvasovk), ki bi kvarno vplivale na vino, da bo ostalo obstojno v steklenicah. Prav zato je potrebno pri stekleničenju vina delati skrbno in neoporečno. Osnovni pogoji, ki jih je potrebno izpolniti so predvsem: sterilnost steklenic, sterilnost zamaškov, filtracija (primerna velikost por filtrnega sloja, saj moramo poleg kvasovk upoštevati tudi prisotnost mlečno- in oetnokislinskih bakterij ter plesni), sterilnost polnilne linije. Delovanje mikroorganizmov zavremo z nizkim pH oziroma veliko vsebnostjo titrabilnih kislin in alkohola ter majhno koncentracijo reducirajočih sladkorjev in dovolj veliko vsebnostjo proste oblike žveplove(IV) kisline (Bavčar, 2009).

## 2.2 ŽVEPLOV DIOKSID

Žveplov dioksid je v tehnologiji vina nepogrešljivo sredstvo. Poznan je že stoletja, njegova uporaba sega v egipčanske in romanske čase, prvič pa je bil v literaturi omenjen leta 1912. Uporabljali so ga še preden so popolnoma razumeli njegovo delovanje. Njegova vloga še danes ni pojasnjena v celoti, saj je vključen v mnoge reakcije, njegovo delovanje pa ima številne učinke (Šikovec, 1991).

Glavni namen dodatka žveplovega dioksida v mošt ali vino je (Bavčar, 2009):

- preprečevanje aktivnosti oksidacijskih encimov, predvsem polifenoloksidaz,
- vezava s porabniki kot so acetaldehid, piruvat, ketoglutarat, antociani, sladkorji, ...,
- preprečevanje in zadrževanje reakcij porjavenja,
- preprečevanje rasti nezaželenih mikroorganizmov, predvsem bakterij in ne-*Saccharomyces* kvasovk.

### 2.2.1 Protimikrobno delovanje

Žveplov dioksid se v vinu nahaja zaradi prisotnosti kvasovk in dodatkov kletarja med različnimi enološkimi postopki. Že same kvasovke tvorijo žveplov dioksid v koncentracijah več kot 15 mg/L. Koncentracija je odvisna od seva kvasovk, fermentacijskih razmer in koncentracije žvepla na grozdju. Kot posebno aktivna se izkaže kvasovka vrste *Saccharomyces bayanus* (Bavčar, 2009).

Protimikrobno delovanje žveplovega dioksida v moštu in vinu je posledica prisotnosti molekularne oblike (na kvasovke in oetnokislinske bakterije), v minimalnem obsegu pa tudi vezane oblike z acetaldehidom (na mlečnokislinske bakterije) (Košmerl, 2000). Vezani žveplov dioksid ima poznan vpliv samo na mlečnokislinske bakterije, predvsem vrsto *Oenoccus oeni* (*Leuconostoc oenos*). Te sproščajo acetaldehid iz njihove vezane oblike hidroksi sulfonatov in tako nastali prosti žveplov dioksid zaustavi njihovo delovanje. Zato je le manjša koncentracija skupnega žveplovega dioksida, manj kot 60 mg/L, priporočljiva za uspešno izvedeno jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo ali biološki razkis (Bavčar, 2009).



Protimikrobno delovanje se kaže v upočasneni rasti in razmnoževanju ali celo smrti določenih mikroorganizmov, tako zelenih pred začetkom alkoholne fermentacije kot nezaželenih po končani alkoholni fermentaciji (Košmerl, 2000). Bolj deluje na bakterije kot na kvasovke (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

Kvasovke rodu *Saccharomyces* so relativno neobčutljive na žveplov dioksid. To je posledica tvorbe acetaldehida pri nizkem pH in njegove vezave v celicah kvasovk ter posebnih prilagoditvenih transportnih poti sulfita v celici kvasovk. Splošno velja, da dodatek žveplovega dioksida bolj toksično deluje na neaktivne ali dormantne (odmrle) celice kvasovk, kot na aktivne ali delujoče. To je prednost pri dodatku vitalnega kvasnega nastavka kvasovk rodu *Saccharomyces* v primerjavi z divjimi kvasovkami iz grozdja in vinarske opreme (Bavčar, 2009).

S kletarskega stališča nas zanima predvsem koncentracija molekularne oblike žveplovega dioksida, ki je potrebna za preprečitev rasti tistih mikroorganizmov (oksidativnih kvasovk in mlečnokislinskih bakterij), ki povzročajo kvar vina. Poleg vrednosti pH je preživelost omenjenih mikroorganizmov odvisna tudi od alkoholne stopnje (Košmerl, 2000).

Med shranjevanjem vina žveplov dioksid zavira razvoj vseh mikroorganizmov (kvasovke, mlečno-in očetnokislinske bakterije). Na ta način se izognemo bakterijskemu kvaru in nastanku meglic, ki bi jih oblikovale kvasovke (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

### 2.2.2 Antioksidativno delovanje in preprečevanje reakcij porjavenja

Žveplov dioksid deluje kot odličen antioksidant. S tem prepreči oksidacijo drugih snovi v moštu in vinu. Kot antioksidant deluje sulfitna oblika. V vinu se ta oblika nahaja v zelo majhnih koncentracijah (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

V prisotnosti katalizatorja se žveplov dioksid veže z raztopljenim kisikom (Ribéreau-Gayon in sod., 2000):



Ta reakcija je počasna. Ščiti vino pred kemijsko oksidacijo, vendar nima nobenega vpliva na encimske oksidacije, ki pa so zelo hitre (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). Kisik in žveplov dioksid lahko obstajata posamezno v vinu pred potekom omenjene reakcije. Tako lahko nevezani kisik kvari vino, zato je bolje zagotoviti, da kisik ne pride v stik z vinom. To dosežemo samo s previdnim rokovanjem z vinom in popolno izključitvijo zraka (Bird, 2010).

Žveplov dioksid preprečuje neencimsko oksidacijo fenolov, sladkorjev in aminokislin (Margalit, 2004). Na primer preprečuje redukcijo oksidiranih produktov, npr. kinonov nazaj v fenole ali tvorbo brezbarvnih produktov s kinoni, pa tudi Maillardovo reakcijo porjavenja med sladkorji in aminokislinami ter omeji aktivnost kinonov v nadaljnjih oksidacijskih reakcijah (Bavčar, 2009).

Drugi tip oksidacije, ki se pojavi v vinu, je povzročen z encimi poznanimi kot oksidaze, ki drastično pospešijo hitrost oksidacije. Ti encimi so prisotni v poškodovanem ali gnilem grozdju, zato moramo v takih primerih uporabiti dovolj žveplovega dioksida. Vinarji, bi zato morali uporabljati le zdravo grozdje z minimalnimi glivičnimi poškodbami (Goode, 2005).

Relativno malo je znano o upočasnitvi oksidacijske aktivnosti tirozinaz (polifenoloksidaz) in preprečevanju porjavenja v grozdnem soku (bistveno več na sadju in zelenjavi). Kljub temu je bilo večkrat potrjeno, da je koncentracija 35-50 mg/L dodanega žveplovega dioksida v mošt zadostna in ustrezna, da se zmanjša oksidacijska aktivnost encimov za 90 % ali več (Košmerl, 2000). Žveplov dioksid inhibira porjavenje vina tako, da se ireverzibilno veže s fenolnimi kinoni. Nastanejo brezbarvni dodatni produkti, ki so istočasno neugodni substrati za fenoloksidaze (Romano in Suzzi, 1992).

V moštu so encimske oksidacije pomembnejše od kemijskih, ker potekajo hitreje. V vinu pa najpomembnejšo vlogo igra kemijska oksidacija, ker oksidacijskih encimov ni več. V tem primeru žveplov dioksid reagira s kisikom in tako ščiti vino (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

### 2.2.3 Vezava s porabniki žvepla

Bisulfitna oblika žveplovega dioksida se veže z različnimi »porabniki žvepla«, kot so acetaldehid, piruvat, ketoglutarat, antociani, sladkorji. Od vseh porabnikov je najpomembnejši prav acetaldehid. Nastaja tudi kot stranski produkt alkoholne fermentacije, v večji meri pa pri mikrobiološki oksidaciji etanola v prisotnosti kisika pri tvorbi očetne kisline zaradi okužbe z očetnokislinskimi bakterijami (Bavčar, 2009).

Acetaldehid kot glavni »porabnik žvepla« v vinu je odvisen predvsem od količine dodanega žveplovega dioksida v mošt, seva kvasovk in vitamina B1 (tiamina) (Košmerl, 2000). Največje koncentracije pa se tvorijo, ko so v prisotnosti žveplovega dioksida prisotne aktivne kvasovke (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

Acetaldehid zmanjšuje kakovost vina. Če v moštu ali vinu ni na voljo proste oblike žveplove(IV) kisline, se acetaldehid oksidira in kvari okus vina. Napako zaznamo kot ton po zraku (Šikovec, 1985). V vinu je nezaželen v večjih koncentracijah. Z žveplovim dioksidom se zelo hitro tvori stabilen acetaldehid-bisulfitni kompleks, oziroma hidroksi sulfonat, ki je senzorično nezaznaven. Vezava bisulfitna z ostalimi porabniki, kot so piruvat, ketoglutarat in sladkorji, je z izjemo antocianov v rdečih vinih manj močna, zato so nastali kompleksi tudi manj stabilni. Te reakcije potekajo počasneje. Splošno trdimo, da so hidroksi sulfonati kemijsko in mikrobiološko stabilni (Bavčar, 2009).

V bistveno manjših količinah kot acetaldehid so porabniki žvepla keto kisline (piruvat,  $\alpha$ -ketoglutarat), ki nastanejo v večjih koncentracijah zaradi pomanjkanja hranilnih snovi (zlasti vitaminov) in okužbe grozdja s plesnijo. V praktično zanemarljivih količinah prištevamo k porabnikom žvepla tudi oksidacijske produkte fenolnih spojin (kinone), askorbinsko kislino ter sladkorje (glukozo). Ne glede na porabnika je značilno, da z vezavo

na žveplov dioksid pride do tvorbe senzorično nevtralnega produkta, kar še posebno velja za acetaldehid (Košmerl, 2000).

#### 2.2.4 Druge reakcije

Z neencimsko oksidacijo nekaterih fenolnih snovi v vinu nastaja vodikov peroksid. Če ni prisoten žveplov dioksid, lahko nastali vodikov peroksid pospeši tvorbo acetaldehida iz etanola. Tako lahko dodatek žveplovega dioksida prepreči dodatno tvorbo acetaldehida. Nasprotno pa dodani žveplov dioksid v mošt pred fermentacijo pospeši tvorbo acetaldehida s strani kvasovk. Po dodatku z nastankom acetaldehid-bisulfitnega kompleksa se prekine ravnotežje oziroma razmerje med acetaldehidom v moštu in v celicah kvasovk. Zato začnejo kvasovke tvoriti večje količine acetaldehida, ki ga izločajo v mošt. Tako žveplov dioksid med alkoholno fermentacijo praktično poveča koncentracijo acetaldehida (Bavčar, 2009).

Ne glede na številne kemijske reakcije žveplovega dioksida (bodisi molekularne ali sulfitne oblike) v vinu, na splošno velja, da je z vidika dodatne tvorbe acetaldehida v vinu, potrebno vzdrževanje koncentracije prostega  $\text{SO}_2$  med 5-25 mg/L (Košmerl, 2000).

Tiamin je pomemben vitamin za rast številnih mikroorganizmov. V moštu in vinu se nahaja v koncentracijah od 100-1200 mg/L. Že dolgo je znano, da v prisotnosti bisulfitne oblike  $\text{SO}_2$  pride do razgradnje tiamina, šele 1976 pa so dokazali, da nekateri kvarljivci kot npr. kvasovke rodu *Brettanomyces* in mlečno-kislinske bakterije rodu *Lactobacillus* nujno potrebujejo za svojo rast minimalne količine tiamina. Torej tudi na ta način žveplov dioksid vpliva na preprečitev njihove rasti in posledično možnost nastanka miševine (Košmerl, 2000).

#### 2.2.5 Izgube skupnega žvepla v stekleničenem vinu

Izgube skupnega žveplovega dioksida v stekleničenem vinu so posledica fizikalno-kemijskih reakcij, ki so v glavni meri vezane na prosti žveplov dioksid (Košmerl, 2000):

- izhlapevanje in izmenjava plinov (kisika) skozi zamašek: med 20-30 % zmanjšanje v petih letih skladiščenja belega vina pri 12 °C;
- oksidacije sulfita s kisikom v stekleničenem vinu: predvideva se, da je v steklenici vina približno 5 mL zraka (1 ml ali 1,4 mg kisika), za njegovo nevtralizacijo torej potrebujemo 5-6 mg prostega  $\text{SO}_2$ ;
- tvorba močnih vezi med žveplom in porabniki (kinoni);
- počasna oksidacija sulfita s predhodno oksidiranimi fenolnimi spojinami ob tvorbi sulfata.

#### 2.2.6 Topnost

Žveplov dioksid je pri normalnih pogojih brezbarven plin z zelo močnim zadušljivim in dražečim vonjem (Margalit, 2004). Nastane z gorenjem žvepla, kjer žveplo (32 g) reagira s kisikom (32 g) ter nastane 64 g žveplovega dioksida. Plin  $\text{SO}_2$  je topen v vodi, njegova

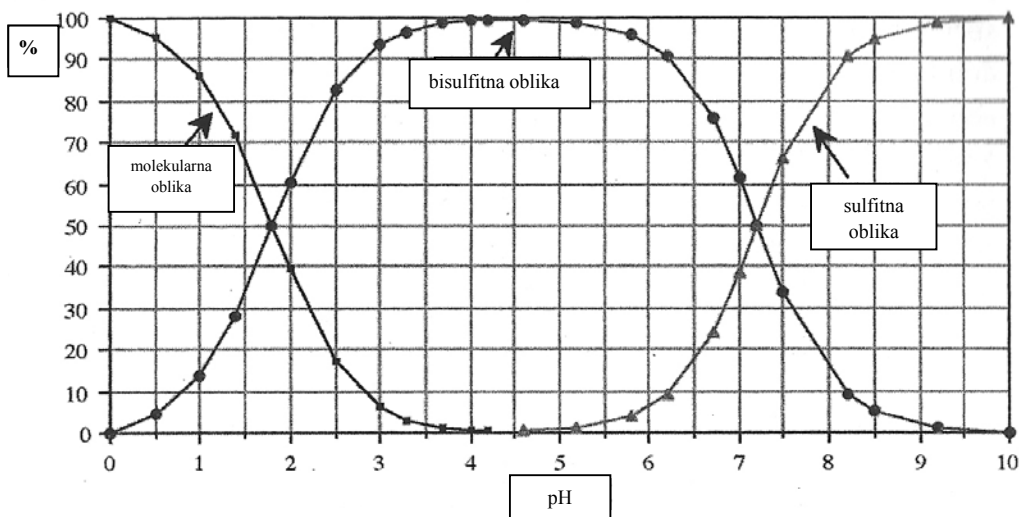
topnost pa je odvisna od temperature: 17,7 % pri 0 °C, 11,9 % pri 15 °C, 8,5 % pri 25 °C, 6,4 % pri 35 °C in 25 % v etanolu (Romano in Suzzi, 1992).

Temperaturna odvisnost topnosti žvepla je predvsem praktičnega pomena, kot npr. hitra priprava vodne raztopine žvepla ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) iz jeklenke pri nizkih temperaturah. Pri tem se moramo zavedati, da je raztopina nasičena z žveplovim dioksidom pri 10 °C, s segretjem raztopine na običajno delovno temperaturo 20 °C pa izgubimo približno 15 volumnov plina na enoto volumna raztopine (Košmerl, 2000).

### 2.2.7 Oblike žvepla

Žveplov dioksid, raztopljen v moštu ali vinu se obnaša kot kislina, kar se posledično kaže v 3 različnih oblikah, ki pa so funkcija vrednosti pH (Košmerl, 2000):

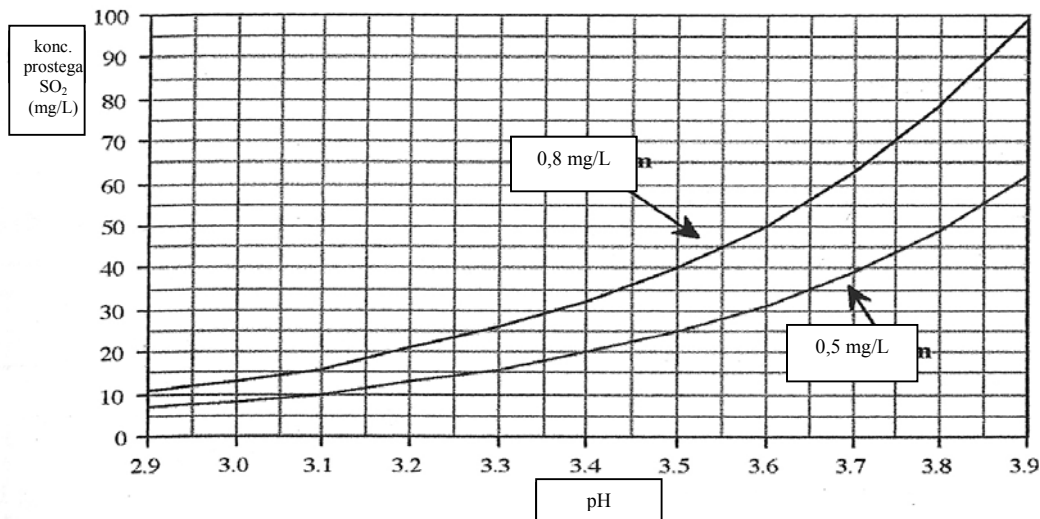
- molekularna oblika ( $\text{SO}_2$ ): je glavna oblika pri vrednosti pH pod 1,86
- bisulfitna oblika (monohidrogen sulfitni ion;  $\text{HSO}_3^-$ ) je glavna oblika pri vrednostih pH od 1,86-7,18
- sulfitna oblika (sulfitni ion;  $\text{SO}_3^{2-}$ ): je glavna oblika pri vrednostih pH nad 7,18



Slika 1: Porazdelitev oblik žveplovega dioksida glede na pH (Margalit, 2004)

Slika 1 prikazuje porazdelitev oblik žveplovega dioksida glede na pH.

Iz kletarskega stališča je za nas najpomembnejši podatek o prostem žveplu, zlasti njegov delež, ki je potreben za vzdrževanje koncentracije molekularnega  $\text{SO}_2$  0,825 mg/L (Košmerl, 2000).



**Slika 2:** Koncentracija prostega žveplovega dioksida, ki je potrebna za vzdrževanje 0,8 mg/L in 0,5 mg/L molekularnega žveplovega dioksida v odvisnosti od pH vina (Margalit, 2004)

Del žveplovega dioksida, dodanega v vino, se bo vezal s spojinami vina. Ta del je vezani del žveplovega dioksida. Ostanek je prosti žveplov dioksid. Skupni žveplov dioksid pa je vsota prostega in vezanega žveplovega dioksida (Rotter, 2001b).

#### 2.2.7.1 Molekularna oblika

Molekularni žveplov dioksid obstaja v vinu ali moštu kot plin ali pa kot posamezne molekule (Rotter, 2001b). Od prostih oblik je molekularna najbolj toksična za mikroorganizme in tudi senzorično zaznavna z vohanjem (Bavčar, 2009). Molekularna oblika žvepla izredno hitro reagira z vodikovim peroksidom, ki nastane pri oksidaciji fenolnih spojin (Košmerl, 2000). Mikrobicidni učinek je razmeroma majhen, saj je v moštu pri pH 3 od prostega žveplovega dioksida le 6 % tega v aktivni obliki in pri pH 3,5 le 2 %. Zato moramo v vinarstvu uporabljati druge postopke za selektivno delovanje žlahtnih oz. zadrževanje šibkovrelnih kvasovk, to je centrifugiranja mošta ali kratka pasterizacija in nežveplanje mošta (Šikovec, 1991)

#### 2.2.7.2 Bisulfitna oblika

Bisulfit je prevladujoča oblika prostega žveplovega dioksida v vinu in moštu (Rotter, 2001b). V okviru žvepla odpade na bisulfitno obliko največji delež (94 % pri pH 3,0 do 99 % pri pH 4,0). Bisulfitna oblika je s kletarskega vidika najbolj pomembna zaradi reakcij vezave žvepla s porabniki, ki nastanejo med alkoholno fermentacijo: acetaldehidom, ketokislinami, oksidiranimi fenolnimi spojinami, antociani in glukozo. Vsi omenjeni produkti (hidroksi-sulfonati) so odgovorni za vezano obliko žvepla. Njihova lastnost je, da so mikrobiološko in kemijsko stabilni (Košmerl, 2000). Tako se koncentracija prostega žvepla zmanjšuje, dokler se niso vezali vsi porabniki žvepla (Bavčar, 2009)

Bisulfit povzroča inaktivacijo polifenoloksidaz in vezavo in/ali redukcijo rjavih kinonov v moštu. Polifenoloksidaze so encimski katalizatorji, ki povzročajo oksidativno porjavenje mošta. Bisulfit je brez vonja, vendar je slan in grenek po okusu (Rotter, 2001b). Največ žvepla v tehnološki verigi lahko prihranimo s tem, da zmanjšamo nastanek glavnih porabnikov prostega žveplovega dioksida, to je zlasti acetaldehida (Šikovec, 1991).

### 2.2.7.3 Sulfitna oblika

Žveplov dioksid deluje kot odličen antioksidant. S tem prepreči oksidacijo drugih snovi v moštu in vinu. Kot antioksidant deluje sulfitna oblika žvepla, kjer 4 mg  $\text{SO}_2$  vežejo 1 mg  $\text{O}_2$ . V vinu se ta oblika nahaja v zelo majhnih koncentracijah, od 0,006 % pri pH 3 do 0,06 % pri pH 4. Reakcija s kisikom je zelo počasna (Rotter, 2001b). Nesporno je dejstvo, da ta reakcija s kisikom upočasni oksidacijo fenolnih spojin ob tvorbi kinonov, tvorbo acetaldehida in rjavih pigmentov (Košmerl, 2000). Pri normalnih koncentracijah je brez vonja in okusa (Rotter, 2001b).

### 2.2.8 Hlapnost

S senzoričnega stališča je prispevek prostega žvepla odvisen od vrednosti pH in temperature. V parni fazi je prag zaznave 10 mg/L v zraku, oziroma 15-40 mg/L v vinu (poleg pH igra pomembno vlogo pri tem tudi posameznik). Vpliv temperature vina predstavlja osnovo pri serviranju: npr. vina z nizkim pH in veliko koncentracijo prostega žvepla postrežemo pri nižjih temperaturah (Košmerl, 2000).

### 2.2.9 Pripravki žvepla

Glavne oblike žveplovega dioksida, ki ga uporabljamo v vinarstvu so (Bavčar, 2009):

- plinski  $\text{SO}_2$  (90 % aktivnost),
- 5-6 % raztopina žveplove(IV) kisline  $\text{H}_2\text{SO}_3$  (žveplasta kislina),
- kalijev bisulfit  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (v obliki prahu).

Žveplanje je najbolj natančno s plinastim  $\text{SO}_2$ , če imamo na razpolago dozator. Natančno je tudi doziranje z  $\text{H}_2\text{SO}_3$ , pod pogojem, da je iz neodprte steklenice in da je njena koncentracija pravilno določena. V kalijevem bisulfitu je teoretično razpoložljivega žveplovega dioksida 57,6 %. Kalijev bisulfit v kislem okolju mošta ali vina hitro ionizira v plinasti žveplov dioksid in ima svež izkoristek približno 50 %. S hranjenjem izkoristek upada zaradi hitre oksidacije sulfita v sulfat v prisotnost vlage in kisika (Bavčar, 2009).

Kalijev metabisulfit se priporoča zlasti za žveplanje drozge, mošta in mladih vin. Sproščeni kalij pospeši izločanje vinskega kamna. Kalijev metabisulfit razpade na kalijev oksid in žveplov dioksid le v kislem okolju- v moštu ali vinu (Šikovec, 1985).

Izogibamo se dodatkom žveplovega dioksida iz odprtih embalaž s pretečenimi roki uporabe. Natančno koncentracijo žveplove(IV) kisline se lahko preveri z merjenjem gostote. V preglednici 1 so podane koncentracije žveplove(IV) kisline in pripadajoče gostote pri 20 °C (Košmerl, 2000).

**Preglednica 1:** Gostota vodne raztopine žveplovega dioksida pri temperaturi 20 °C (Košmerl, 2000)

koncentracija SO <sub>2</sub> (utežni %)	gostota raztopine	Brix
0,5	1,001	0,30
1,0	1,003	0,92
1,5	1,006	1,53
2,0	1,008	2,15
2,5	1,011	2,76
3,0	1,013	3,36
3,5	1,016	3,96
4,0	1,018	4,56
4,5	1,020	5,16
5,0	1,023	5,76
5,5	1,025	6,35
6,0	1,028	6,94
6,5	1,030	7,53
7,0	1,032	8,11
7,5	1,035	8,69
8,0	1,037	9,27
8,5	1,039	9,84
9,0	1,042	10,42
9,5	1,044	10,99
10,0	1,047	11,56

### 2.2.10 Fiziološki učinki žveplovega dioksida

Dodatek žveplovega dioksida v vino sproža vprašanja povezana z zdravjem. Njegova uporaba je bila vedno regulirana in enološki postopki so vedno težili k manjšanju njegove koncentracije (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

Fiziološko delovanje žveplovega dioksida na človeški organizem je zelo različno; so ljudje, ki lahko prenesejo večje količine žveplanega in preveč žveplanega vina, ne da bi jih bolela glava. Večina ljudi pa se boji žveplanih vin, ker jih taka vina živčno uničujejo, boli jih glava in podobno (Judež, 1955).

SO<sub>2</sub> štejemo v enologiji za nujno zlo. Njegova uporaba v količinah, ki jih sicer zakonski predpisi dovoljujejo, je deležna kritike s strani strokovnjakov s področja higijene in toksikologije. Znanost nam je postregla že s podatki, ki omogočajo močno tehnološko zmanjšanje tega aditiva tako, da lahko kljub temu pridelamo obstojno in sortno značilno vino. Po predpisih mednarodne zdravstvene organizacije bi lahko odrasla 70 kg težka oseba zaužila na dan brez škode za organizem 50 mg SO<sub>2</sub> na dan. Svetovna zdravstvena organizacija je postavila zgornjo mejo škodljivosti SO<sub>2</sub> za organizem v višini 0,7 mg SO<sub>2</sub>/kg/24ur. To je količina, ki bi jo lahko človeški organizem brez škode oksidiral in izločil v obliki sulfatov (Šikovec, 1991).

Opravljenе študije glede toksičnosti žveplovega dioksida so pokazale pojav simptomov zastrupitve kot so: slabost, bruhanje, draženje želodca pri zelo velikih absorbiranih koncentracijah (4 g natrijevega sulfita v enkratnem odmerku) (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

Žveplov dioksid lahko najdemo v suhem sadju, sadnih sokovih, svežih sadnih solatah, klobasah itd. (Bird, 2010).

Človeški organizem dobi brez pitja vina, ki je lahko glavni dobavitelj SO<sub>2</sub>, že 14-18 mg SO<sub>2</sub> na dan. Zato je razumljiva zahteva zdravstvene organizacije in strokovne komisije evropske skupnosti, da morajo vinarji vrednost SO<sub>2</sub> v vinu močno znižati (Šikovec, 1991).

Žveplov dioksid lahko sproži astmatične napade pri občutljivih ljudeh oziroma alergične reakcije pri tistih posameznikih, ki ne morejo pretvoriti sulfidov v sulfate. To bolezen imenujemo sulfiturija (Bavčar, 2009). Leta 1973 so že obstajali dokazi o alergijskih reakcijah na sulfite. Alergijske reakcije se pri astmatikih (4-6 % človeške populacije) pojavijo že pri zelo majhnih količinah (okoli 1 mg). Zato se astmatikom priporoča, da se odpovejo uživanju vina (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

S 1.1.2006 je za slovenska vina obvezna oznaka na steklenici, da vino vsebuje žveplov dioksid (Bavčar, 2009).

## 2.3 ČIŠČENJE OZIROMA LEPŠANJE VINA

Že takoj po zaključku alkoholne fermentacije oziroma biološkega razkisa se začne mlado vino bistriti. Proces sedimentacije traja različno dolgo, pospeši pa se ga z dodatkom enoloških čistilnih (bistilnih) sredstev (Bavčar, 2009). Postopka bistrenja in čiščenja (imenovana tudi lepšanje) služita kot pomoč, ne pa kot nadomestilo za spontano bistrenje mošta ali vina ter stabilizacijo vina. Zato ju uporabljamo samo za dosego potrebne stopnje bistrosti in stabilnosti s fizikalno-kemijskega stališča, z najmanjšimi spremembami kemijskega in fizikalnega ravnotežja v vinu (Košmerl, 2007).

Čistilna sredstva se uporabljajo v enologiji za odstranjevanje določenih snovi v vinu, kar vodi v modifikacijo bistrosti, barve, okusa in stabilnosti vina. Odstranjuje se tiste snovi, ki povzročajo motnost, pretirano grenkobo oziroma trpkost, neželene barvne odtenke in napake v vonju in okusu. Primarna vloga enoloških čistilnih sredstev je bistrenje vina (Rotter, 2001a).

Po definiciji je čiščenje dodatek reaktivnih (nasprotno delujočih) ali adsorptivnih sredstev za odstranitev ali zmanjšanje koncentracije ene ali več neželenih komponent. Čistilna sredstva dodajamo v mošte, vina ali osnovna vina (cuveé) za pridelavo penečih vin z namenom izboljšanja predvsem senzoričnih lastnosti: bistrosti (čistosti), barve, vonja in okusa, arome in/ali fizikalno-kemijske stabilnosti (Košmerl, 2007).

### 2.3.1 Mehanizem delovanja

V osnovi lahko govorimo, da se v vinu nahajajo delci s pozitivnim in negativnim električnim nabojem. Za njihovo sesedanje moramo dodati čistilo z nasprotnim nabojem. Tako nastanejo večji delci, ki se lažje usedejo. V primeru absorpcije ali adsorpcije pride do tvorbe vodikovih vezi med karboksilnimi skupinami beljakovin in hidroksilnimi skupinami fenolov ali taninov (Bavčar, 2009).



V praksi najpogosteje uporabimo izbrano čistilno sredstvo z ozirom na električni naboj delcev, ki jih želimo odstraniti (Košmerl, 2007):

- pozitivno naelektrene so beljakovine ali proteini, ki jih iz vina odstranimo z negativno naelektrenimi čistilnimi sredstvi kot so tanini, kvasovke, bentonit in silicijev dioksid,
- negativno naelektrene delce v vinu pa predstavljajo tanini, fenoli, antociani, kvasovke in bakterije, ki jih odstranimo z želatino, albuminom, kazeinom ali kalijevim kazeinatom, jajčnim beljakom in zaščitnim koloidom (mešanica polisaharidov in diatomejske zemlje).

### **2.3.2 Razdelitev glede na izvor**

Na osnovi njihovih glavnih (čistilnih) značilnih lastnosti jih razdelimo na osem podskupin (Zoecklein in sod., 1995):

- zemlje: bentonit, kaolin,
- proteini: želatina, ribji mehur, kazein, kalijev kazeinat, pasterizirano mleko, albumini, kvasovke,
- polisaharidi: alginati, gumiarabika,
- aktivno oglje,
- sintetični polimeri: PVPP, najlon,
- silicijev dioksid (silika gel ali kremenčevo čistilo),
- tanini,
- ostala čistilna sredstva: čistila za odstranjevanje težkih kovin, modro čiščenje (kalijev ferocianid) in encimi.

### **2.3.3 Beljakovinska čistilna sredstva**

Beljakovinske pripravke dodajamo v vino, da izboljšamo njegovo pitkost, okus in gladkost, oziroma da zmanjšamo njegovo trpkost in barvo z adsorpcijo in sesedanjem polimernih fenolov in taninov (Kocjančič, 2002).

Beljakovinska čistilna sredstva imajo afiniteto s polifenoli in reagirajo z oblikovanjem vodikove vezi med hidroksilno skupino fenola in peptidno verigo beljakovinske komponente (Morris in Main, 1995).

Vodikove vezi so precej šibke, zato je zmogljivost beljakovinskih čistilnih sredstev delno funkcija števila potencialnih mest vezave na enoto teže beljakovinskega čistilnega sredstva. Tehnike, ki se uporabljajo za rehidracijo, dodajanje in mešanje čistilnega sredstva, so zato pomembne za doseganje zelenih učinkov beljakovinskih čistilnih sredstev. Selektivnost beljakovinskih čistil delno temelji na moči vezave (število potencialnih mest vezave) med čistilnim sredstvom in fenoli.

Beljakovinska sredstva zato prednostno reagirajo z velikimi polifenoli, kot so tanini, polimerizirani antocianini, ki imajo več hidroksilnih skupin in zato več potencialnih mest vezave (Zoecklein in sod., 1995).

Glavna razlika med beljakovinskimi čistilnimi sredstvi je v njihovi molekularni masi in sestavi aminokislin. Večina beljakovinskih čistilnih sredstev je toplotno občutljivih, le želatina (in mogoče ribji mehur) je toplotno stabilna (Boulton in sod., 1996).

Pri beljakovinah upoštevamo dva vidika, glede topnosti v raztopinah snovi, to sta električni naboj in hidratacija. Vse beljakovine pri določenem pH v raztopini nimajo naboja, to imenujemo izoelektrična točka. Čeprav je večina beljakovin netopnih pri njihovi izoelektrični točki, so nekatere beljakovine, kot sta želatina in jajčni beljak pri izoelektrični točki še vedno raztopljeni. To je v nasprotju z nekaterimi topnimi beljakovinami, kot je na primer kazein, ki se popolnoma sesede (Kocjančič, 2002).

### 2.3.3.1 Želatina

Želatina se pridobiva iz kolagena, ki je glavni strukturni protein v koži in kosteh (Zoecklein, 2002a). Je pravzaprav beljaku podobna beljakovina s peptidnimi verigami od 15000 do 140000 Da in veliko glicina, prolina ter hidroksiprolina (Bavčar, 2009).

Izoelektrična točka želatine je pri pH 4,7, torej se pojavlja v vinu kot pozitivno naelektreno čistilno sredstvo (Zoecklein, 2002a). Vezava z negativno naelektrenimi delci vina poteka preko vodikovih vezi, zato je tudi prednostna vezava želatine z večjimi molekulami fenolnih spojin, ki imajo več hidroksilnih (-OH) skupin in tako več mest vezave. Zaradi večje vsebnosti polimernih fenolov v starejših vinih, je tudi vpliv želatine na barvo in zmanjšanje taninov večji v starejših vinih v primerjavi z mlajšimi (Košmerl, 2007).

Želatina je primerna predvsem za vina, tako bela kot rdeča, z veliko vsebnostjo skupnega ekstrakta in fenolov. Uporablja se za izboljšanje bistrosti in za zmanjšanje fenolnega karakterja (Rotter, 2001a). Prav tako se uporablja pred fermentacijo mošta z namenom zmanjšanja trpkosti in izboljšanja bistrosti (Collings, 2002).

Običajni odmerek želatine je 20-100 mg/L za bistrenje vin in 30-150 mg/L za mlada rdeča vina. Za odstranjevanje grenkobe je priporočena količina 30-240 mg/L, za odstranjevanje taninov pa 70-530 mg/L želatine. Čiščenje mošta zahteva večje količine želatine (480 mg/L) z namenom zmanjšanja trpkosti in oksidirane barve. Zlasti v teh primerih se bolj priporoča kombinirano čiščenje vina z želatino v kombinaciji s silicijevim dioksidom ali bentonitom (Rotter, 2001a).

Dobimo jo v obliki prahu, lističev ali tekočine, pomembno pa je, da v vinu ne oddaja nobenega tujega vonja ali okusa (Bavčar, 2009). Tekoča želatina (30-46 % raztopina) ima majhno molekularno maso, nizko razmerje usedanja, vendar omogoča boljšo bistrost in kompaktnost droži (Rotter, 2001a). Tekočo želatino vlijemo neposredno v vino. Odmerki tekoče želatine so 9 do 27 mL 30 % želatine na 100 L. Želatino v prahu ali lističih pa namakamo v hladni vodi (razmerje 1:100) pet do šest ur. Nato jo segrejemo na 35 do 40 °C in ob stalnem mešanju vlijemo v vino. Načeloma se želatina veže v nekaj urah (Bavčar, 2009).

Želatino uporabljamo običajno za rdeča, trpka in zelo motna mlada vina. Neprijetno trpka vina postanejo po čiščenju z želatino milejša, bolj uglajena in harmonična. Vina, ki imajo

okus po lesu, intenzivnejšo barvo in trpkost zaradi novega sode, uspešno čistimo z želatino. Želatina lahko popravi razne napake v vinu. Močno obarvana vina postanejo z dodatkom želatine svetlejša. Na dno sode se seseda želatina z organskimi nečistočami v obliki drobnega prahu (Judež, 1955).

Količina želatine, ki je potrebna za doseg bistrosti, lahko zmanjša grenkobo na nezaželeno nizko raven. Večina belih ima tako majhno vsebnost fenolnih spojin, da je potreben dodatek tanina ali silicijevega dioksida za reakcijo s presežkom želatine (Zoecklein in sod., 1995). Vsekakor pa večina vinarjev pogosteje uporablja kombinirano čiščenje s silicijevim dioksidom. Prevelik dodatek želatine povzroči prečiščenje (sirkolaža), ki se odraža v toplotni in biološki nestabilnosti vina (Košmerl, 2007).

Nepravilna količina želatine lahko zmanjša sortnost vina, zato je potrebno opraviti laboratorijske predpokusne pred glavnim čiščenjem. Komercialna želatina je na voljo v različnih oblikah. Običajno je ocenjena glede na čistost in sposobnost nabrekanja ("bloom"). Sposobnost nabrekanja se nanaša na želatinino sposobnost absorbiranja vode; običajno 6- do 10-krat njene mase. Iz tega sledi, da večja kot je sposobnost nabrekanja, večja je adsorpcijska sposobnost želatine. Želatina, priporočena za obdelavo vin, se giblje med 80-150 "bloom". Uporaba želatine z večjim "bloom" v povezavi s silicijevim dioksidom lahko povzroči, da nezreagirana želatina ostane v raztopini. Velikost želatinine molekule je pomemben dejavnik, ker število potencialnih mest vezave določa njeno učinkovitost (Zoecklein in sod., 1995).

Kljub minimalnem tveganju, se želatina omenja kot možen vir kontaminacije s prioni v povezavi z BSE (»bolezen norih krav«). Vino, čiščeno z želatino, pridobljeno iz inficiranega živalskega tkiva, bi lahko vsebovalo aktivne prionske beljakovine (Jackson, 2008). Tistim, ki ne želijo uporabljati proizvodov, pridobljenih iz živalskih tkiv, je sedaj na voljo nadomestek želatine, pridobljen iz rastlin (Bird, 2010).

### 2.3.3.2 Kazein

Kazein je heteroprotein, ki vsebuje fosfor. Pridobiva se ga s koagulacijo posnetega mleka (Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Kazein je mešanica glavnih proteinov mleka, predvsem  $\alpha$ - in  $\beta$ -kazein, manj pa  $\epsilon$ - in  $\tau$ -kazeinat. Z natrijevimi in kalijevimi ioni tvori soli, ki so v vinu topne, saj se sprosti netopni kazeinat (Bavčar, 2009).

Kazein se pojavlja v raztopini kot pozitivno naelektrena molekula z molekulsko maso približno 370.000 Da. Na voljo je v suhi obliki kot (1) prečiščen mlečni kazein, ki je netopen v kislini in topen v alkalni raztopini, in (2) natrijev ali kalijev kazeinat, ki je topen v vodi (Zoecklein in sod., 1995). Natrijev kazeinat se običajno ne uporablja, ker poveča koncentracijo natrija v vinu (Marchal in Jeandet, 2009).

Natrijev ali kalijev kazeinat se običajno raztopi direktno v vodi. Mlečni kazein je težko topen v kislem, zato ga je potrebno zmešati z vodo, ki ima pH nad 8. Vse tri oblike so manj učinkovite, kadar se jih meša direktno v vino. Pomembno je počasno in temeljito mešanje (Rotter, 2001a).

Kazein je pozitivno naelektren protein, ki flokulira v kislem mediju, kot je vino. Ko se ga doda v vino, kazein adsorbira in mehanično odstrani suspendiran material z usedanjem (Marchal in Jeandet, 2009).

Najpogosteje se kazein uporablja za izboljšanje barve oksidiranih vin, dodatno pa poleg barve odstrani tudi oksidativni ton. Vpliva na izboljšanje bistrosti, porjavenja in zmanjšanja grenkobe (zlasti dalj časa maceriranih ali starejših vin) (Košmerl, 2007). Uspešno tudi prepreči rožnato obarvanje (angleško: pinking) občutljivih belih sort (Bavčar, 2009).

Uporablja se ga kot nadomestek oglju, čeprav je manj učinkovit. Kazein vpliva tudi na zmanjšanje koncentracije bakra (do 45 %) in železa (do 60 %) (Zoecklein in sod., 1995).

Podobno kot pri uporabi želatine, je uporaba kazeina pogosto kombinirana z dodatkom tanina ali kremenčevega čistila (Bavčar, 2009). Ti dodatki se ponavadi dodajajo približno 24 ur pred dodatkom kazeina (Zoecklein in sod., 1995).

Uporablja naj se samo najčistejši razpoložljiv kazein, saj je pomembno, da v vinu ne oddaja nezaželenih okusov in ne spremeni karakterja vina (Zoecklein in sod., 1995).

Običajni odmerek kazeina je od 1,25 do 24 g/hL, kar je odvisno od namena uporabe in uporabljene oblike. V laboratorijskih poskusih se kazein pogosto odpipetira na dno čistilnega sode, nato pa se ga zmeša s stresanjem. To prepreči nastanek kepice na površini vina (Zoecklein in sod., 1995).

Preveliki dodatki čistil beljakovinskega izvora, kot so želatina, kazein, jajčni beljak in ribji mehur, zaradi svoje sposobnosti vezave polimeriziranih fenolov lahko osiromašijo vina. To je še posebno kritično pri starih belih vinih (Bavčar, 2009).

### 2.3.3.3 Ribji mehur

Ribji mehur je kolagen, po izvoru iz zračnih mehurjev morskih rib (jesetrov, morskega zmaja) (Košmerl, 2007).

Na voljo je v dveh oblikah: v pred-hidrolizirani obliki ali v obliki vlaken. Pred-hidrolizirano obliko je potrebno raztapljati v hladni vodi (15 °C) 20-30 minut; če je pripravljena v topli vodi, je podvržena delni hidrolizi, kar se odraža v nastanku manjših molekul. Zmanjšanje molekulske mase iz 140.000 do 15.000-58.000 Da ima za posledico spremembo čistilnih karakteristik ribjega mehurja. Nastane bolj želatini podoben produkt v smislu čistilne aktivnosti (Zoecklein, 2002b). Vlakanasto obliko pripravimo za uporabo tako, da natehemo 6 g ribjega mehurja v 1 liter hladne vode s temperaturo 15 °C in uravnavamo pH na 2,4 do 2,9, kar dosežemo z dodatkom citronske ali vinske kisline. V roku 24 ur raztopino večkrat premešamo, dokler se mehur ne raztopi popolnoma. Dodatek 0,1 mL tako pripravljene raztopine v 80 mL vina odgovarja koncentraciji 0,75 g/hL (7,5 mg/L). Vezava z ribjim mehurjem je zelo hitra, saj zadostuje že 15 do 30 minut. Usedlino lahko odstranimo že po 4 dneh (Bavčar, 2009).

Uporablja se za odstranjevanje taninov, fenolov, barvnih snovi in kvasovk, predvsem v mladih belih vinih. Kondenzirani tanini, ki so predvsem odgovorni za trpkost vina, se v bistveno manjši meri odstranijo z ribjim mehurjem, kot z želatino ali kazeinom (Košmerl, 2007). Nastali delci se radi prilepijo na stene sodov in nerjavnih posod. Uporablja se za fino čiščenje kakovostnih belih vin, saj poudari sadnost vina, ne potrebuje dodatka drugih čistil in učinkuje v manjših odmerkih kot na primer želatina (Bavčar, 2009).

Običajno se ga dodaja v količinah od 10-50 mg/L (Rotter, 2001a).

Njegovo delovanje je malo odvisno od temperature in pravilno uporabljen daje zelo sijoča in bistra vina (Bavčar, 2009). Ribji mehur se lahko s časom razgradi, zlasti če ga hranimo pri višjih temperaturah (Zoecklein in sod., 1995).

Ribji mehur ima v primerjavi z želatino pri čiščenju belih vin več prednosti. Je aktiven pri manjših koncentracijah, povzroči povečano bistrost in bolj briljantna vina ter je precej manj temperaturno odvisen kot želatina, kar se kaže v povečanih sposobnostih pri nizki temperaturi (Zoecklein, 2002b). Ribji mehur je bolj občutljiv na višje temperature vina med čiščenjem kot želatina, zato se priporoča temperatura do 10 °C. Ni nevarnosti prečiščenja, za koagulacijo pa je potrebna bistveno manjša količina taninov v primerjavi z želatino (Košmerl, 2007). Ribji mehur ima kljub temu več pomembnih pomanjkljivosti. Po dodatku ribjega mehurja v vino se tvorijo kosmiči nizke gostote, ki lahko povzročijo velik volumen usedline (več kot 2 %) in lepljenje na stene posode (Zoecklein in sod., 1995). Zaradi tega je potreben dvojni pretok vina po končanem čiščenju z ribjim mehurjem. Filtriranje naj se opravi šele, ko je ribji mehur odstranjen, saj lahko v nasprotnem primeru pride do zamašitve filtra (Rotter, 2001a).

#### **2.3.4 Kremenčevo čistilo**

Kremenčevo čistilo (kieselsool, silicijev dioksid ali silikagel) je vodna koloidna suspenzija silicijevega oksida, pripravljena iz natrijevega silikata ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), ki z dodajanjem močne kisline tvori silicijevo kislino (Margalit, 2004).

Silicijev dioksid je bil prvič uporabljen v Nemčiji kot nadomestek taninu pri čiščenju z želatino. Tanini se tako kot silicijev dioksid elektrostatsko vežejo s pozitivno naelektrenimi proteini (kot je želatina) in sprožijo izkosmičenje in usedanje. Silicijev dioksid elektrostatsko veže in adsorbira komponente na površino svojih delcev. Obseg te interakcije je odvisen od velikosti delcev, oblike in narave površine (najpomembnejši parameter), velikosti porazdelitve v suspenziji in gostote naboja delcev. Gostota naboja določa število hidroksilnih skupin, ki so na voljo za vezavo na površini delca, kar je delno določeno s pH suspenzije gela (Zoecklein in sod., 1995). Na voljo je tako v pozitivno kot negativno naelektrenih oblikah (Jackson, 2008).

Na voljo je več oblik silicijevega dioksida z različnimi vrednostmi pH. Potrebno je uporabiti tisti silicijev dioksid, ki je priporočen za uporabo v vinih (Marchal in Jeandet, 2009).

Silicijev dioksid nima nobenega vpliva na aromo/okus vina, prav tako pa je verjetnost prečiščenja izredno majhna (Rotter, 2001a).

V prodaji ga najdemo kot 15 ali 30 % raztopino, katere dodatek kombiniramo z dodatkom želatine. Pri uporabi 15 % raztopine se doda 1 volumski delež želatine na 12 do 15 delov kremenčevega čistila oziroma 5 do 10 delov kremenčevega čistila na 1 del želatine ob uporabi 30 % raztopine. Pri odstranjevanju taninov je pomemben vrstni red, najprej dodamo želatino (Bavčar, 2009).

Običajno se ga uporablja v količini od 0,1-0,3 mL/L (tekoči silikagel). Reakcija in usedanje navadno trajata 7-10 dni (Rotter, 2001a).

Najpogosteje se silicijev dioksid uporablja kot nadomestek taninu za bistrenje pri proteinskem čiščenju (Zoecklein in sod., 1995).

V primerjavi z uporabo taninov ima prednosti zaradi manjše količine usedline in njenega hitrejšega usedanja, manjše izgube sortnosti vina in boljše končne bistrosti. Kmalu so dokazali tudi druge učinke, kot so izločanje fenolnih spojin, šibko izločanje beljakovin, ugoden vpliv na bistrenje, v kombinaciji z želatino izboljša okus vina in možnost kombinacij tudi z drugimi čistili, na primer bentonitom. Najpogosteje se uporablja za čiščenje belih vin z manj tanina. Tvori kompaktno in zbito usedlino (Bavčar, 2009).

Praktična razmišljanja glede silicijevega dioksida (Zoecklein in sod., 1995):

- pomembno je narediti predposkus pred glavnim čiščenjem, tako kot pri ostalih čistilnih sredstvih,
- silicijev dioksid ima omejen rok uporabe (manj kot 2 leti). Treba se je izogniti zmrzovanju, saj lahko škodljivo vpliva na delce v suspenziji,
- vrstni red dodajanja čistila je lahko pomemben. Običajno ja priporočljivo, da se želatina doda prva. Nekateri proizvajalci pa vseeno priporočajo, da se njihov silicijev dioksid doda pred drugimi beljakovinskimi čistilnimi sredstvi. V teh primerih je potrebno paziti, da ne pride do prečiščenja.

### 2.3.5 Bentonit

Bentoniti so hidrirani aluminijevi silikati, v glavnem sestavljeni iz montmorilonitov s poenostavljeno formulo, npr.  $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 4\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ . Poleg tega bentoniti vsebujejo izmenljive katione ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ), ki igrajo pomembno vlogo pri njihovih fizikalno-kemijskih lastnostih. Te variirajo glede na geografsko poreklo. Bentoniti iz Nemčije ali severne Afrike vsebujejo predvsem kalcij, medtem ko tisti iz Amerike (Wyoming) vsebujejo natrij. Slednji se najbolj pogosto uporabljajo, saj naj bi bili najbolj učinkoviti pri čiščenju vin (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Kislinski bentonit je kislinsko izpran bentonit, ki je čist, toda manj učinkovit. Kalcijev bentonit ima slabo sposobnostjo nabrekanja. Prednosti kalcijevega bentonita so: hitro čiščenje, majhna količina usedline in dobra filtracija. Pomanjkljivosti pa so: slabša adsorpcijska sposobnost, slabši čistilni učinek in večja poraba čistilnega sredstva (Šikovec, 1985).

Po rehidraciji je značilno, da kalcijevi bentoniti niso tako ločeni med seboj, ampak po nabrekanju težijo k tvorbi skupkov, zato je posledično tudi manjša aktivna površina za vezavo z beljakovinami. Uveljavljeni so predvsem v Evropi (zaradi omejitve vsebnosti natrija v vinu), zlasti pri pridelavi penečih vin po klasični metodi (pri sesedanju usedline v vrat steklenice) zaradi dobre lastnosti, tj. kompaktnjše usedline, ki se lažje odstrani. V ZDA so se uveljavili natrijevi bentoniti. Ocenjena vsebnost natrija je 1,7-3,5 g Na/100 g natrijevega bentonita (Košmerl, 2007). Njegove prednosti so: velika učinkovitost vezave beljakovin, dober čistilni učinek in sorazmerno majhna uporaba. Pomanjkljivosti pa so: tvori se veliko usedline, ki se počasi useda (Šikovec, 1985). Natrijevi bentoniti so najbolj učinkoviti pri odstranjevanju beljakovin zaradi močnejšega nabrekanja (ker je na voljo več negativno naelektrenih mest za vezavo z beljakovinami v vinu) (Leske in sod., 1995).

Bentonit izkopavajo iz različnih globin. Na voljo so v različnih stopnjah čistosti, velikosti delcev, adsorpcije, zmogljivosti in sposobnosti nabrekanja. Na odstranjevanje beljakovin vplivata vrsta in izvor bentonita. To je na splošno posledica razlik v sposobnosti nabrekanja in zmogljivosti izmenjave kationov bentonita s kationi vina. V bentonitu iz ene in druge pošiljke lahko obstajajo manjše razlike, zato je potrebno uporabiti enak bentonit za laboratorijske predposkuse kot tudi pri glavnem čiščenju (Zoecklein, 1988).

Uporablja se v moštu in vinu predvsem za odstranjevanje termolabilnih beljakovin, omeji pa tudi nastanek bakrenega loma. Čiščenje z bentonitom je posredno povezano tudi s preprečevanjem motnosti zaradi tvorbe kompleksov z bakrom in verjetno tudi železom. V primeru bakrene motnosti ta vpliv povezujejo z zmanjšanjem ali odstranitvijo tistih beljakovin in peptidov, ki so vključeni v tvorbo motnosti in sedimentacije (Bavčar, 2009).

Številne druge gline, kot sta kaolin in španska zemlja, veljajo za alternativo bentonitu. Praviloma imajo manjšo adsorpcijsko sposobnost, zato niso zaželeni v pridelavi vina (Boulton in sod., 1996).

Učinkovitost bentonita je odvisna od časa kontakta, metode rehidracije in narave (sestave) uporabljenega bentonita. Zato je pri njegovi uporabi potrebno pozornost, poleg ustrezne količine dodatka, usmeriti tudi na fizikalno-kemijske lastnosti bentonita samega in pridobiti ustrezne izkušnje (Bavčar, 2009).

Bentonit se nahaja v obliki majhnih ploščic, katere se pri rehidraciji ločijo in tvorijo koloidno suspenzijo z ogromno površino. Bentonit se posledično v raztopini obnaša kot večploščna, linearna, dolgoverižna in v osnovi negativno naelektrena molekula. Med rehidracijo se naelektrene plošče odbijajo in se oddaljijo ena od druge. Ko se to zgodi, se začne nabrekanje. Mehanizmi odstranjevanja beljakovin so absorpcijske interakcije med pozitivno naelektrenimi beljakovinami vina in negativno naelektrenimi površinami plošč. Zgodi se tudi, da pride do absorpcije nenaelektrenih (nevtralnih) molekul. Poleg tega lahko

v manjši meri, zaradi dejstva, da so robovi ploščic pozitivno naelektreni, pride do vezave z negativno naelektrenimi beljakovinami (Zoecklein, 1988).

Vse skupine beljakovin, ki so toplotno nestabilne, prispevajo k tvorbi beljakovinske motnosti in sedimenta, ki se razlikuje v odvisnosti od njihove izoelektrične točke. Pri visoki izoelektrični točki beljakovin (7,0) se tvori kompaktna usedlina v primerjavi s srednjo (4,65-5,94) in nizko izoelektrično točko (manj kot 4,65), ko se razvije kosmičasta ali suspendirana motnost. Različne beljakovinske frakcije tako prispevajo različne količine in stopnje beljakovinske motnosti, sorazmerno s koncentracijo. Tako samo ocena vsebnosti skupnih beljakovin v vinu ni realen podatek s stališča napovedi beljakovinske (ne)stabilnosti, kajti beljakovinsko motnost povzročajo kompleksi beljakovin, polisaharidov, polifenolov in kovin (Košmerl, 2007).

Pozitivni in negativni naboji vsake proteinske frakcije se pri določenem pH izenačijo, protein je manj topen. Ta pH imenujemo izoelektrična točka proteina. Manjša kot je razlika med pH soka ali vina in pH, pri katerem ima beljakovinska frakcija izoelektrično točko, manjši je naboj proteinske frakcije in manjša je njena topnost. Kadar se pH soka ali vina bistveno razlikuje od beljakovinske izoelektrične točke, je naboj proteina visok, kar poveča sposobnost tega proteina, da se elektrostatsko poveže s čistilnim sredstvom. Zato izoelektrične lastnosti proteinov vplivajo ne le na njihovo naravno težnjo k usedanju, ampak tudi na težnjo, da se izločijo z različnimi čistili. Beljakovinska motnost belih vin je problematična predvsem pri vinih, ki imajo pH blizu izoelektrični točki proteinskih frakcij zato, ker bo bentonit prednostno odstranil proteine z močnejšim pozitivnim nabojem. Elektrostatični naboj različnih proteinskih frakcij pojasnjuje opazovani fenomen, da nekaterih vin ni mogoče stabilizirati samo z uporabo bentonita, ali samo z uporabo prevelikih količin le-tega, ker lahko osiromaši karakter vina. Vendar pa izoelektrična točka proteinov le delno pojasni nastanek motnosti. Pomembno je poudariti, da na nastanek motnosti lahko vplivajo tudi drugi, še ne popolnoma znani dejavniki (Marchal in Jeandet, 2009).

Pri uporabi starejših bentonitov v primerjavi z novejšimi, ni bilo opaziti nobene pomembne razlike v motnosti in koncentraciji beljakovin (Weiss in sod., 2001).

Čiščenje z bentonitom lahko posredno vpliva na vezavo s fenolnimi spojinami oziroma kompleksi fenoli-beljakovine (Bavčar, 2009) Kljub temu pa količina odstranjenih fenolov ni velika (Zoecklein, 1988).

Na adsorpcijo beljakovin z bentonitom temperatura ni imela bistvenega vpliva. Majhen učinek na koncentracijo beljakovin pa imata pH in koncentracija etanola (Blade in Boulton, 1988).

Pri večjih dodatkih bentonita tvegamo izgubo aromatičnih snovi, zlasti če čistimo večkrat zaporedoma (Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Učinek bentonita na aromatske substance v belih vinih je odvisen od kemijske sestave in začetne koncentracije hlapnih spojin, kakor tudi od števila in strukture beljakovin v vinu. Le malo aromatičnih snovi se direktno adsorbira na bentonit. Majhna adsorpcijska koncentracija bentonita (20 g/hL), ki se



običajno uporablja za stabilizacijo vina, bistveno ne vpliva na koncentracijo večine aromatičnih spojin (Lambri in sod., 2010).

Narejeno je bilo že veliko poskusov o količini dodanega bentonita. Ugotovili so, da se dodatek bentonita 50 g/hL odstrani 50 % celotne vsebnosti beljakovin. S povečanjem količine na 100 g/hL pa se je odstranilo 85 % beljakovin (Sauvage in sod., 2010).

Način priprave bentonita pomembno vpliva na njegovo sposobnost odstranjevanja beljakovin (Zoecklein, 1988). Večina vinarjev rehidrira bentonit s počasnim dodajanjem v vodo, kar preprečuje zlepljenje. Tak pripravek se pusti stati dan ali dva pred uporabo. Ko je bentonit pravilno razpršen, vzpostavi mrežo, splošno znano kot »hiša iz kart«. Ta mreža obdaja kapljice vode, kar ščiti bentonit pred združitvijo ali kosmičenjem samega s sabo. Da bi bil bentonit učinkovit pri vezavi s proteini morajo biti ploščice bentonita ločene v homogeno suspenzijo (Marchal in Jeandet, 2009).

Uporablja naj se voda, ki ima malo mineralov, saj naj bi pomagala zmanjšati volumen usedline. Raztopljeni minerali (kationi) v vodnem pripravku bentonita bodo prednostno zamenjali natrijeve ione, nakopičene na površini bentonita in negativno vplivali na rehidracijo, viskoznost in sposobnost vezanja. Bentonit lahko rehidriramo tudi v vinu (namesto v vodi), čeprav se s tem postopkom zmanjša aktivna površina in sposobnost vezave zaradi prezgodnje flokulacije, imamo pa po končanem čiščenju približno polovico manj usedline v primerjavi z običajnim postopkom rehidracije (Zoecklein in sod., 1995).

Študija je pokazala, da imajo fizikalne in kemijske lastnosti bentonitov ključno vlogo pri prehajanju elementov v vino (Catarino in sod., 2008). Čiščenje z njim močno vpliva na končno vsebnost elementov v vinu (Nicolini in sod., 2004).

Vezava z bentonitom je hitra, saj je že nekaj minut dovolj za adsorpcijo proteinov, ki povzročajo motnost (Nordestgaard in sod., 2007). Že v prvi minuti kontakta se odstrani 75 % beljakovin, ki se lahko adsorbirajo. Podaljšan stik z vinom ni priporočljiv zaradi tvorbe blata že adsorbiranih beljakovin, zato se za odstranitev bolj priporoča filtracija oziroma centrifugiranje, kot čakanje na spontano bistrenje. Njegove negativne lastnosti so predvsem zelo voluminozna usedlina (5 do 10 % celotne prostornine), odstranitev aminokislin in ostalih hranil ter delna izguba barve (Bavčar, 2009).

V sodobnih enoloških sredstvih najdemo bentonit največkrat v kombinaciji z drugimi čistili, kot so kalijev kazeinat, jajčni beljak, PVPP in želatina. Predvsem ga uspešno kombiniramo z želatino in taninom, kar pripomore h kompaktnjši usedlini in hitrejšem usedanju (Bavčar, 2009).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL IN NAČRT DELA

Mlado vino je bilo po klasični tehnologiji pridelano iz grozdja sorte Rebula iz vinograda v kraju Snežatno v Goriških Brdih. Trgatev grozdja je bila opravljena v treh delih 26.9.2005, 4.10.2005 in 10.10.2005, to je teden pred, ob in šest dni po prognozi Kmetijsko-veterinarskega zavoda Nova Gorica o datumu trgatve grozdja sorte 'Rebula'.

Mošt, pridobljen iz grozdja prve trgatve, je bil razdeljen na tri enake dele. En del je fermentiral spontano, druga dva pa sta bila inokulirana z 30 g/hL liofiliziranih kvasovk UVAFERM SLO (Lallemand). Fermentacija je potekala tri tedne pri temperaturi 16-18 °C. Po končani fermentaciji smo vsa tri mlada vina pretočili in žveplali s količinami, ki so prikazane v preglednici 2. Vsakega od teh treh vzorcev mladih vin smo razdelili na tri enake dele. Prvega od teh treh delov smo čistili z bentonitom (60 g/hL), drugega s kombiniranim čistilom (želatina, ribji mehur in kazeinat) in silicijevim dioksidom (SiO<sub>2</sub>) v razmerju 25 mL/hL kombiniranega čistila : 75 mL/hL SiO<sub>2</sub>), tretji pa je predstavljal kontrolni vzorec, v katerega nismo dodali nobenih čistil. Enak postopek je bil opravljen pri mladih vinih preostalih dveh trgatav.

Količine dodanega K-metabisulfita (g/hL) so podane v naslednji preglednici.

**Preglednica 2:** Količine dodanega K-metabisulfita (g/hL) v mlada vina sorte rebula

Fermentacija (AF) Čistilo	Trgatev 1	Številka vzorca	Trgatev 2	Številka vzorca	Trgatev 3	Številka vzorca
spontana AF kontrola	12	1	13	10	15	19
spontana AF kombinirano čistilo	12	2	13	11	15	20
spontana AF bentonit	12	3	13	12	15	21
1. vodena AF kontrola	10	4	9	13	10	22
2. vodena AF kontrola	10	5	9	14	10	23
1. vodena AF kombinirano čistilo	10	6	9	15	10	24
2. vodena AF kombinirano čistilo	10	7	10	16	12	25
1. vodena AF bentonit	10	8	10	17	12	26
2. vodena AF bentonit	10	9	10	18	12	27

Legenda: AF-alkoholna fermentacija

Po končanih analizah smo združili rezultata vzorcev 4 in 5, 6 in 7, 8 in 9, 13 in 14, 15 in 16, 17 in 18, 22 in 23, 24 in 25, 26 in 27, saj so predstavljali paralelke.

Po pretoku mladih vin, ki smo ga opravili po treh dneh delovanja enoloških sredstev pri sobni temperaturi 20 °C, smo opravili sledeče analize: pH, intenziteto barve, motnost vina, koncentracijo skupnih (titrabilnih) kislin, hlapnih kislin, fenolnih snovi, sladkorja prostega ekstrakta, skupnega in prostega žveplovega dioksida, alkohola in vina senzorično ocenili.

Za eksperiment smo uporabili tri čistilna sredstva. Opis s strani proizvajalca je podan v nadaljevanju:

- 30 SIL, Enologica Vason Srl, Italija

30 % silicijev dioksid. Učinkovito čistilo, ki v kombinaciji z želatino daje dobre rezultate. Priporoča se pri čiščenju belih in sladkih vin. Zaradi kemičnih in fizičnih lastnosti njegovih delcev in veliki specifični površini ter majhnemu volumnu, je bistrenje hitro in učinkovito. Doda se ga direktno k masi, ki jo tretiramo in ga dobro porazdelimo z mešanjem. Hraniti pri temperaturi višji kot 10 °C, v zračnem prostoru. Varovati pred zmrzaljo. Načeto pakiranje dobro zapreti z originalnim zamaškom. Doziranje: 25-100 g/100 L, priporoča se laboratorijski test.

- BENTOLIT SUPER, Essec SPA, Italija

Aktiven Natrijev bentonit v prahu. Uporaba: pri moštih za bistrenje ter odstranjevanje plavajočih delcev in odstranjevanje oksidacijskih encimov. Fermentacija: za bistrenje in optimalni potek vrenja. Doziranje: mošti in vina: 40-120 g/100 L. Fermentacija: 20-40 g/100 L. Priprava: med stalnim mešanjem dodajamo bentonit v 10- kratno količino vode. Pustimo nabrekati 8-10 ur. Med stalnim mešanjem ali prečrpavanjem dodamo k masi. Skladiščenje: zaprto embalažo skladiščimo na hladnem, suhem in zračnem prostoru. Odprto pakiranje dobro zaprite in skladiščite, kot je opisano zgoraj. Pazite: bentonit absorbira vonje in vlago!

- COMBIGEL, Erbslöh, Nemčija

Tekoče beljakovinsko bistrilno sredstvo. Uporaba: predvsem pri mladih vinih za bistrenje, izboljšanje okusa in filtrabilnosti. Vsebuje želatino, kazeinat in ribji mehur. Doziranje: potreben je predposkus za določitev natančne doze. Dozira se direktno v vino s stalnim mešanjem.

- Predhodno čiščena vina 25-30 mL/100 L
- Mlada, motna vina 50-150 mL/100 L
- Mlada vina bogata z tanini 100-200 mL/100 L

## 3.2 METODE DELA

### 3.2.1 Določanje pH

Vrednost pH in koncentracijo skupnih (titrabilnih) kislin smo določali s potenciometrično metodo, ki temelji na merjenju razlike v potencialu med obema elektrodama, ki sta potopljene direktno v vzorec vina. Ena elektroda (referenčna) ima stalen (znan) potencial, druga, steklena elektroda (merilna) pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti  $\text{H}_3\text{O}^+$  ionov v raztopini. Uporabili smo pH meter (Mettler Toledo DL50 Graphix) s kombinirano stekleno elektrodo (Mettler Toledo DGi 113-SC). Točnost meritev aparata mora biti najmanj  $\pm 0,05$  pH enot. Pred merjenjem pH vzorcev umerimo pH meter pri delovni temperaturi (idealno pri  $20\text{ }^\circ\text{C}$ ) s pufrnima raztopinama s pH 4,00 in 7,02 (dvotočkovna kalibracija). Po umerjanju aparata preverimo pH standardne raztopine, ki je pri  $20\text{ }^\circ\text{C}$  točno 3,57 (Košmerl in Kač, 2007).

### 3.2.2 Določanje skupnih (titrabilnih) kislin v vinu

Pri kislinsko-bazni potenciometrični titraciji smo merili smo razliko v potencialu med dvema elektrodama, ki sta potopljene direktno v vzorec vina. Ena elektroda (referenčna) ima stalen (znan) potencial, druga, steklena elektroda (merilna) pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti  $\text{H}_3\text{O}^+$  ionov v raztopini. Uporabili smo pH meter (Mettler Toledo DL50 Graphix) s kombinirano stekleno elektrodo (Mettler Toledo DGi 113-SC). Točnost meritev aparata mora biti najmanj  $\pm 0,05$  pH enot. Titracija z 0,1 M raztopino NaOH je potekala na avtomatskem titratorju do končne točke titracije  $\text{pH} = 7,0$  oziroma  $\text{pH} = 8,2$ . Iz uporabljenega volumna NaOH lahko preračunamo porabo v g vinske kisline/L vina (Košmerl in Kač, 2004).

Pri dodajanju baze poteka naslednja reakcija (Košmerl in Kač, 2004):



### 3.2.3 Določanje vsebnosti reducirajočih sladkorjev v vinu

Za določanje reducirajočih sladkorjev v vinu smo uporabili titracijsko metodo po Rebeleinu. Številni reagenti (Luffov, Soxhletov, Fehlingov) kvantitativno oksidirajo reducirajoče sladkorje v karboksilne kisline. Oksidacija je odvisna od uporabljenega reagenta in pogojev oksidacije. S segrevanjem do vrenja poteče v reakcijski zmesi oksidacija reducirajočih sladkorjev v kisline, dvovalentni bakrov ion iz reakcijske zmesi pa se reducira do bakrovega(I) oksida. Iz raztopine se izloči oborina netopnega bakrovega(I) oksida ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ). Preostali  $\text{Cu}^{2+}$  ioni se v raztopini kalijevega jodida v kislem (dodatek žveplove(VI) kisline) reducirajo, nastali jod ( $\text{I}_2$ ) pa titrimetrično določimo z raztopino natrijevega tiosulfata ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) v prisotnosti škrobovice kot indikatorja. Koncentracijo reducirajočih sladkorjev (g/L) smo odčitali direktno z birete ob upoštevanju slepega vzorca (to vrednost smo odšteli od rezultata) (Košmerl in Kač, 2004).

### 3.2.4 Določanje relativne gostote, ekstrakta in alkohola v vinu

Merjenje relativne gostote vina: Relativna gostota je razmerje med gostoto vina in gostoto vode pri isti temperaturi (ponavadi je to 20 °C). Na gostoto vina vplivajo vse raztopljene snovi. Te so bodisi specifično težje (sladkorji, kisline, glicerol) ali specifično lažje od vode (alkohol). Suha vina imajo relativno gostoto blizu 1; izjema so le suha in hkrati alkoholno zelo bogata vina, ki imajo relativno gostoto občutno manjšo od 1. Mošt in vina s preostankom sladkorja imajo praviloma relativno gostoto večjo od 1 (Košmerl in Kač, 2004).

Relativno gostoto vina smo merili z denzimetrom (Mettler Toledo DE45 Density Meter). S prefiltriranim vzorcem vina smo 2- do 3-krat sprali resonančno U-cevko v denzimetru. Nato smo previdno in počasi (brez zračnih mehurčkov) ponovno napolnili cevko z vzorcem vina. Aparat nato sam izmeri relativno gostoto vina.

#### Določanje skupnega ekstrakta in alkohola v vinu

Skupni suhi ekstrakt vina (oz. krajše skupni ekstrakt) sestavljajo po definiciji O.I.V. pri 100 °C nehlapne komponente vina (sladkorji, fiksne kisline, organske soli, idr.). Sladkorja prosti ekstrakt je po definiciji razlika med (skupnim) ekstraktom in reducirajočimi sladkorji (Košmerl in Kač, 2004).

Vzorec vina smo dali v 100 mL bučko (nad oznako) in ga postavili v vodno kopel ter ga termostatirali 20 min pri 20 °C. Nato smo s kapalko odvzeli toliko vina, da je bila vsebina točno do oznake (spodnji menisk). Vsebino točno 100 mL vina iz merilne bučke smo kvantitativno prenesli v destilacijsko posodo. Dodali smo 5 mL 12 % raztopine kalcijevega oksida (boljša električna prevodnost), 2-3 kapljice protipenilca in sprali stene destilacijske posode z deionizirano vodo. Vzorec smo nato destilirali v 100 mL bučko do volumna 75-80 mL, dopolnili pod oznako z deionizirano vodo in ga ponovno termostatirali še 20 min pri 20 °C in nato dopolnili z deionizirano vodo do meniska ter izmerili relativno gostoto alkoholnega destilata in koncentracijo alkohola v vol. % z denzimetrom.

Izračun relativne gostote in vsebnost skupnega ekstrakta: po AOAC relativno gostoto skupnega ekstrakta vina ( $d_{SE}$ ) izračunamo s pomočjo Tabariéjevega obrazca:

$$d_{SE} = d_V - d_A + 1,0000 \quad \dots(3)$$

kjer pomeni  $d_V$  relativno gostoto vzorca vina in  $d_A$  relativno gostoto alkoholnega ekstrakta. Na podlagi znane relativne gostote skupnega ekstrakta vina smo iz preglednice odčitali masno koncentracijo skupnega ekstrakta v vinu (g skupnega ekstrakta/L vina).

Mednarodna organizacija za trto in vino (O.I.V.) predpisuje korekcijo relativne gostote skupnega ekstrakta vina zaradi očetne kisline (hlapnih kislin) in skupnega žveplovega dioksida:

$$d_{SE} = d_{SE} - HK \cdot 0,0086 / 1000 - SO_2 \cdot 0,6 / 1000 \quad \dots(4)$$

kjer pomeni  $d_{SE}$  korigirano relativno gostoto skupnega ekstrakta vina,  $d_{SE}$  izračunano relativno gostoto skupnega ekstrakta vina po Tabariéjevem obrazcu, HK koncentracijo hlapnih kislin (mmol CH<sub>3</sub>COOH/L vina = mekv CH<sub>3</sub>COOH/L vina) in SO<sub>2</sub> koncentracijo

skupnega žveplovega dioksida (g SO<sub>2</sub>/L vina). Iz tabele smo ponovno odčitali korigirano koncentracijo skupnega ekstrakta (g/L).

### 3.2.5 Določane hlapnih kislin v vinu

Hlapne kisline v vinu so predvsem mravljinčna, očetna in butanojska. Te (in nekatere druge manj pomembne hlapne kisline) določimo titrimetrično v destilatu vina (po destilaciji z vodno paro). Uporabili smo destilator Gibertini Vade 3 distillatore elettronico enochimico (Košmerl in Kač, 2004).

V destilacijsko bučko smo odpipetirali 20 mL vzorca vina in dodali 1 mL 50 % raztopine vinske kisline in 2-3 kapljice protipenilca. Stene destilacijske bučke smo sprali z deionizirano vodo in destilirali vzorec z vodno paro v 250 mL elermajerico do končnega volumna destilata 150 mL. Destilatu smo dodali 2-3 kapljice raztopine fenolftaleina in takoj titrirali s standardizirano 0,1 M raztopino natrijevega hidroksida do prehoda brezbarvne raztopine v svetlorožnato. Iz porabe titranta (mL) izračunamo koncentracijo hlapnih kislin; izrazimo jo kot masno koncentracijo očetne kisline (g/L):

$$HK_1 = a_1 \cdot c \cdot M \text{ (g/mol)} \cdot 50/1000 \cong a_1 \cdot 0,3 \quad \dots(5)$$

v kateri pomeni HK<sub>1</sub> koncentracijo hlapnih kislin, izraženih kot očetna kislina (g/L), a<sub>1</sub> poraba titranta (mL), c koncentracijo NaOH (0,1 mol/L), 50 razredčitveni faktor in M molsko maso očetne kisline (60,05 g/mol).

Korekcija na prosti žveplov dioksid: takoj po končani prvi titraciji hlapnih kislin z bazo smo dodali v erlenmajerico 1 mL žveplove(VI) kisline (1+3), 1 mL raztopine škrobovice in titrirali z 0,01 M raztopino joda do prehoda v modro-zeleno barvo raztopine; korekcijo na prosto žveplove(IV) kislino izrazimo kot masno koncentracijo očetne kisline (g/L):

$$HK_2 = a_2 \cdot 0,06 \quad \dots(6)$$

v kateri pomeni HK<sub>2</sub> korekcijo koncentracije hlapnih kislin zaradi prostega SO<sub>2</sub> v destilatu, izraženo kot očetna kislina (g/L), a<sub>2</sub> poraba titranta (raztopina joda, mL) in 0,06 empirični stehiometrični faktor.

Korekcija na preostali (kombinirani) žveplov dioksid: takoj po končani drugi titraciji smo dodali v raztopino 10 mL 1 M raztopine NaOH in segrevali do vrenja (2-3 minute) in nato ohladili na sobno temperaturo. Nato smo dodali 5 mL žveplove(VI) kisline (1+3), 1 mL škrobovice in titrirali z 0,01 M raztopino joda do prehoda v modro-zeleno barvo; korekcijo izrazimo kot masno koncentracijo očetne kisline (g/L):

$$HK_3 = a_3 \cdot 0,03 \quad \dots(7)$$

v kateri pomeni HK<sub>3</sub> korekcijo koncentracije hlapnih kislin zaradi preostalega (kombiniranega) SO<sub>2</sub> v destilatu, izraženo kot očetna kislina (g/L), a<sub>3</sub> porabo titranta (raztopina joda, mL) in 0,03 empirični stehiometrični faktor.

Ob upoštevanju korekcije za prosti in kombinirani SO<sub>2</sub> je dejanska koncentracija hlapnih kislin v vzorcu vina:

$$HK = HK_1 - (HK_2 + HK_3) \quad \dots(8)$$

Natančnost rezultata je  $\pm 0,05$  g očetne kisline/L.

### 3.2.6 Določanje fenolnih snovi

Fenolne spojine so lahko relativno enostavne fenolne spojine, ki izvirajo iz grozdja, kakor tudi zelo kompleksne fenolne spojine (tanini), ki se ekstrahirajo iz lesene vinske posode med procesom zorenja vina.

Fenolne spojine so pomembne, saj prispevajo k barvi in stabilnosti vina, v večjih koncentracijah pa so odgovorne za trpkost (astringentnost) ter grenkobo; v prisotnosti kisika se hitro oksidirajo in povzročajo porjavitev vina.

Fenolne spojine absorbirajo predvsem svetlobo UV spektra in vidnega spektra. Uporabili smo spektrofotometer UV-160A Shimadzu. Za določanje koncentracije skupnih fenolnih snovi dodajamo v vino Folin-Ciocalteujev reagent, ki v alkalni raztopini (dodatek natrijevega karbonata) oksidira fenolne snovi. Reagent Folin- Ciocalteu (F.C.) je vodna raztopina natrijevega volframata(VI), natrijevega molibdata(VI) in litijevega sulfata(VI); slednji prepreči obarvanje F.C. reagenta. Dodatek natrijevega karbonata je potreben za alkalnost reakcijske zmesi. Redukcija volframata(VI) in molibdata(VI) poteče le v prisotnosti fenolatnega aniona. Raztopina, ki vsebuje reducirani volframat(VI) in/ali molibdat(VI), je modro obarvana, medtem ko je raztopina nereducirane oblike 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) (Košmerl in Kač, 2004).

### 3.2.7 Določanje žveplovega dioksida v vinu

Žveplov dioksid smo določili s titracijsko metodo po Ripperju, ki temelji na oksidacijsko-redukcijski reakciji z raztopino joda (I<sub>2</sub>) (Košmerl in Kač, 2004).

Za določitev prostega SO<sub>2</sub> vzorec vina najprej nakisamo z dodatkom žveplove(VI) kisline, s tem zmanjšamo oksidativni vpliv vina (predvsem polifenolnih snovi). Pred titracijo s standardizirano raztopino joda, dodamo indikator (škrobovico). Jod oksidira žveplovo(IV) kislino v žveplovo(VI) kislino in v končni točki titracije (tj. tik po ekvivalentni točki) prebitna količina joda obarva raztopino modro.

Skupni SO<sub>2</sub> je definiran kot vsota vseh zvrsti žveplovega dioksida v vinu (molekularna, bisulfitna in sulfitna), bodisi v prosti ali vezani obliki.

Za določitev koncentracije skupnega SO<sub>2</sub> pa vzorcu vina najprej dodamo 1 M raztopino NaOH, da dosežemo hidrolizo vezanega SO<sub>2</sub>, tj. acetaldehid- $\alpha$ -hidroksisulfonata in drugih

bisulfitnih kompleksov. Nato sledi po 10 min. dodatek ostalih reagentov in jodometrična titracija, kot pri določanju prostega  $\text{SO}_2$ .

Ripperjeva metoda za določanje koncentracije prostega in skupnega  $\text{SO}_2$  ni točna v primeru prisotnosti večjih koncentracij ne-žveplovih reducentov, tj. taninov in barvnih spojin (rdeča vina), ki se pri jodometrični titraciji prav tako oksidirajo. Nastane več jodidnega iona, torej zreagira več jodovice, določimo preveliko vsebnost  $\text{SO}_2$ .

### 3.2.8 Določanje intenzitete barve in motnosti vina

Spektrofotometrična metoda (Košmerl in Kač, 2007)

V praksi obarvanost belih vin merimo direktno (brez razredčitve) s spektrofotometrom (UV-160A Shimadzu) merimo absorbanco vzorca pri valovni dolžini 420 nm. V širšem spektru svetlobe od 400-440 nm lahko izmerimo tudi odtenke rjave barve belih vin. Poleg intenzivnosti barve belih vin pri 420 nm, smo izmerili tudi motnost pri 600 nm.

### 3.2.9 Senzorična analiza

Senzorična analiza je bila opravljena z metodo po Buxbaumu (Nemanič, 1999). Po tej metodi je vino lahko ocenjeno največ z dvajsetimi točkami. Senzorična analiza je bila opravljena na Katedri za tehnologije, prehrano in vino na Oddelku za živilstvo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Senzorična ocena predstavlja povprečno vrednost petih ocenjevalcev.

Po Buxbaumovi metodi se za vsak parameter upošteva naslednje število točk:

- bistrost: 0 do 2 točki;
- barva: 0 do 2 točki;
- vonj: 0 do 4 točk;
- okus: 0 do 6 točk;
- harmonija: 0 do 6 točk.

### 3.2.10 Statistična analiza

V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Tako urejene podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS (SAS Software. Version 8.01, 1999) z multiplo analizo variance – postopkom GLM (General Linear Models).

Statistični model za fizikalnokemijske parametre vina je vključeval vpliv različnih skupin (S) (model 1).

$$y_{ijk} = \mu + S_i + T_j + e_{ijk} \quad (\text{model 1}) \quad \dots(9)$$

kjer je  $y_{ij}$  = ij-to opazovanje,  $\mu$  = povprečna vrednost,  $S_i$  = vpliv skupine (spontana fermentacija brez dodatka čistilnih sredstev, spontana fermentacija z dodatkom bentonita, spontana fermentacija z dodatkom kombiniranega čistila, vodena fermentacija brez

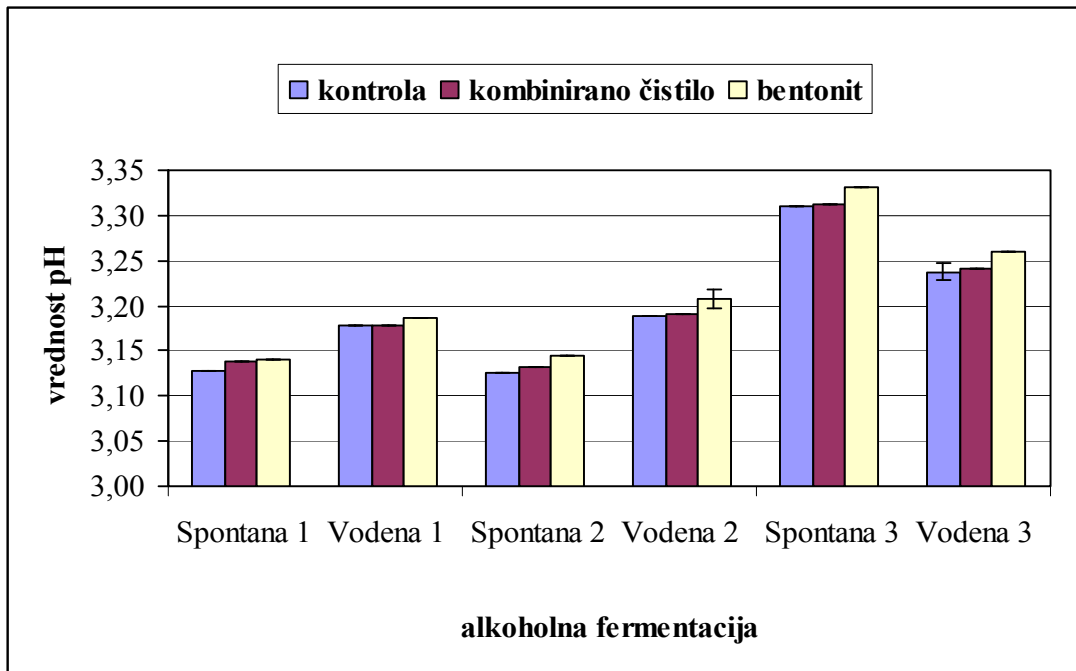


dodatka čistilnih sredstev, vodena fermentacija z dodatkom bentonita in vodena fermentacija z dodatkom kombiniranega čistila),  $T_j$  = vpliv trgate (1-3) in  $e_{ij}$  = ostanek.

Pričakovane povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in so primerjane pri 5 % tveganju.

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI DOLOČANJA VREDNOSTI pH



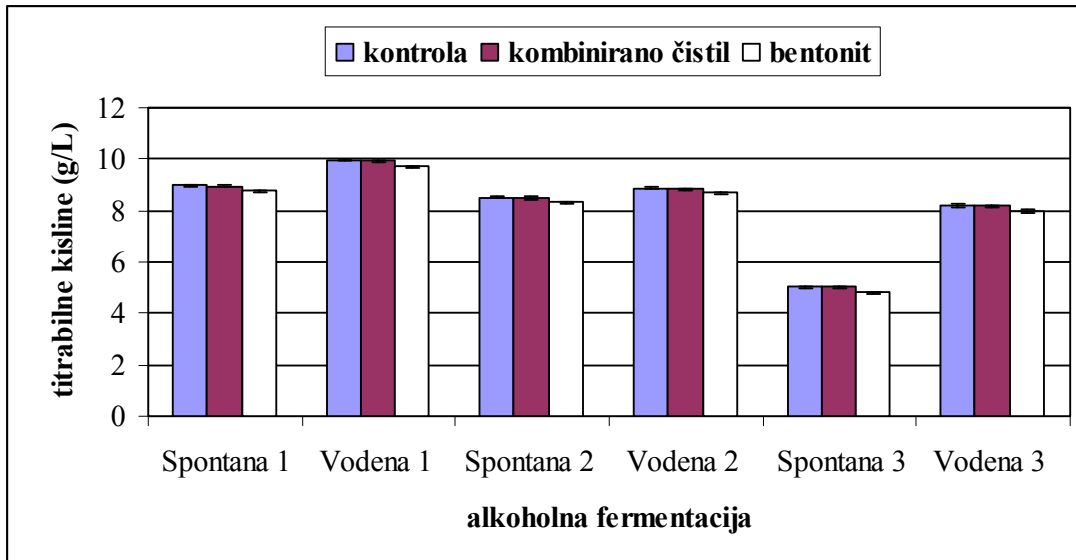
**Slika 3:** Vrednosti pH mladih vin sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano alkoholno fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo

Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

Slika 3 prikazuje pH mladih vin sorte rebula, pridelanih s spontano in vodeno fermentacijo, čiščena z dodatkom kombiniranega čistila (želatina, ribji mehur, kazeinat in silicijev dioksid) in z dodatkom bentonita.

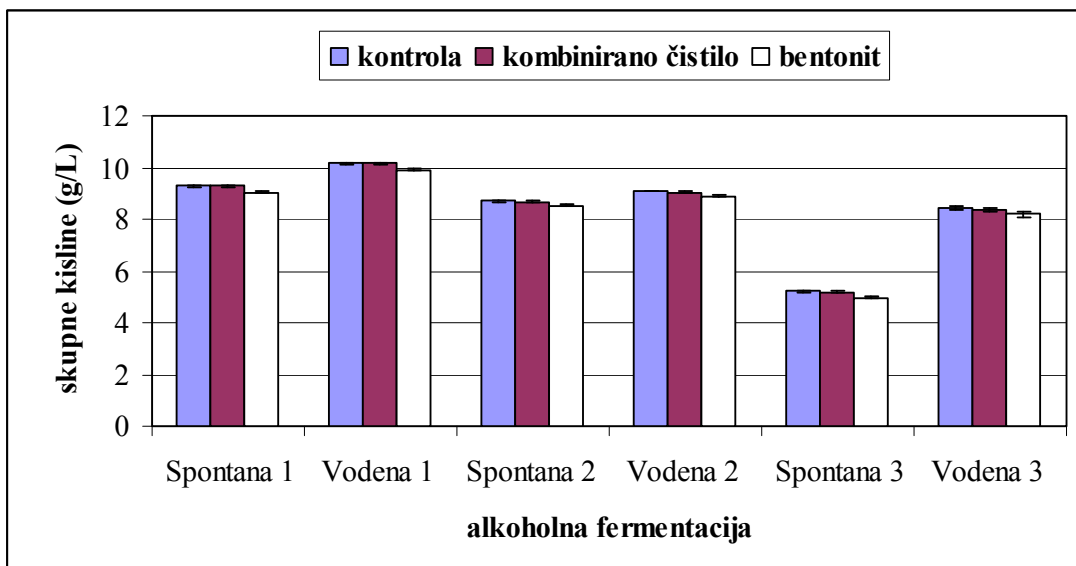
Dodana čistilna sredstva niso imela posebnega učinka na pH, saj so se vrednosti spremenile le v mejah napake meritve ( $\pm 0,05$  pH enote). Ne glede na merilno napako smo v vseh vzorcih izmerili najvišji pH v vzorcih, čiščenih z bentonitom. V povprečju so imeli vzorci spontane fermentacije 3 najvišji pH, katerim sledijo vzorci spontane fermentacije 2 in 1, z najnižjim pH. V obratnem vrstnem redu (1, 2 in 3) si sledijo vzorci vodene fermentacije, ki imajo v okviru pH večje vrednosti v primerjavi s spontano fermentacijo.

#### 4.2 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE TITRABILNIH IN SKUPNIH KISLIN



**Slika 4:** Koncentracija titrabilnih kislin (g/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo

Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)



**Slika 5:** Koncentracija skupnih kislin (g/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo

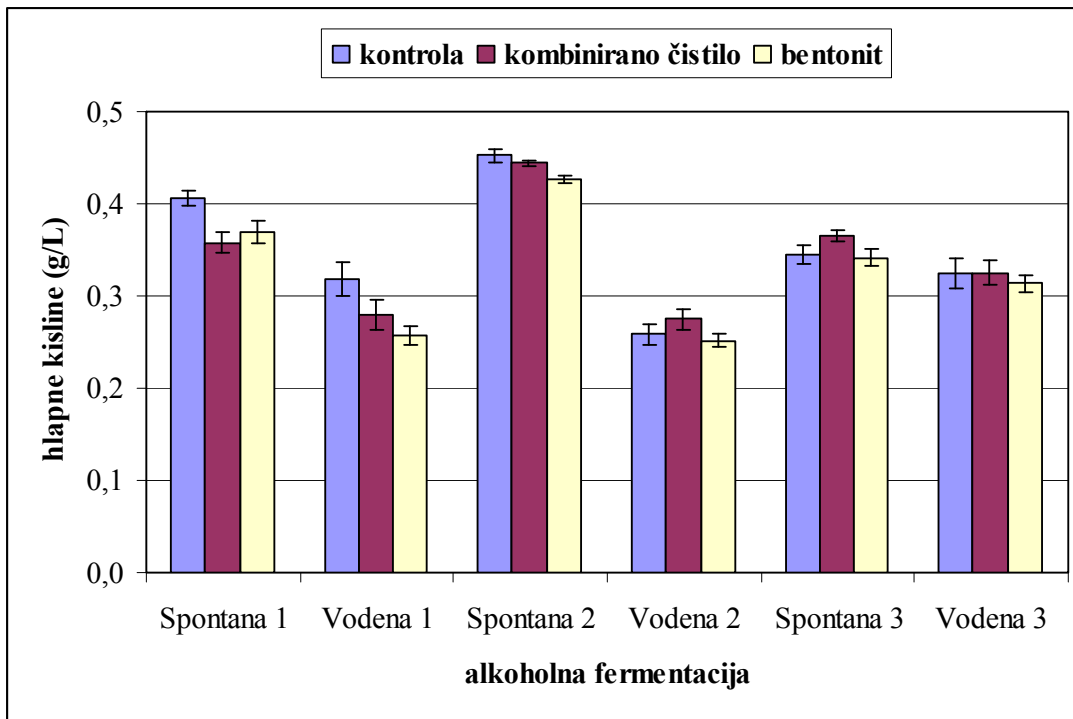
Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

Sliki 4 in 5 prikazujeta koncentracije titrabilnih (titracija do  $\text{pH}=7,0$ ) in skupnih kislin (titracija do  $\text{pH}=8,2$ ) mladih vin sorte rebula, pridelanih s spontano in vodeno fermentacijo, čiščena z dodatkom kombiniranega čistila (želatina, ribji mehur, kazeinat in silicijev dioksid) in z dodatkom bentonita.

Že na sliki 3 smo pri vseh vzorcih vin, čiščenih z bentonitom, lahko opazili največje vrednosti  $\text{pH}$ , kar se ujema z najmanjšimi vsebnostmi titrabilnih in skupnih kislin. Vsebnosti titrabilnih in skupnih kislin so največje pri kontrolnih vzorcih, kar se ujema z najmanjšimi  $\text{pH}$  vrednostmi.

Vsi vzorci vin, pridelani z vodeno alkoholno fermentacijo, so imeli večjo vsebnost titrabilnih in skupnih kislin kot vzorci vin, pridelani s spontano alkoholno fermentacijo. V povprečju so imeli vzorci vin, pridelani z vodeno alkoholno fermentacijo 1 največje vsebnosti skupnih in titrabilnih kislin, sledijo jim vzorci vin vodene fermentacije 2 in 3. V istem vrstnem redu si sledijo vzorci spontane alkoholne fermentacije (1, 2 in 3).

## 4.3 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE HlapNIH KISLIN



**Slika 6:** Koncentracija hlapnih kislin (g/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo

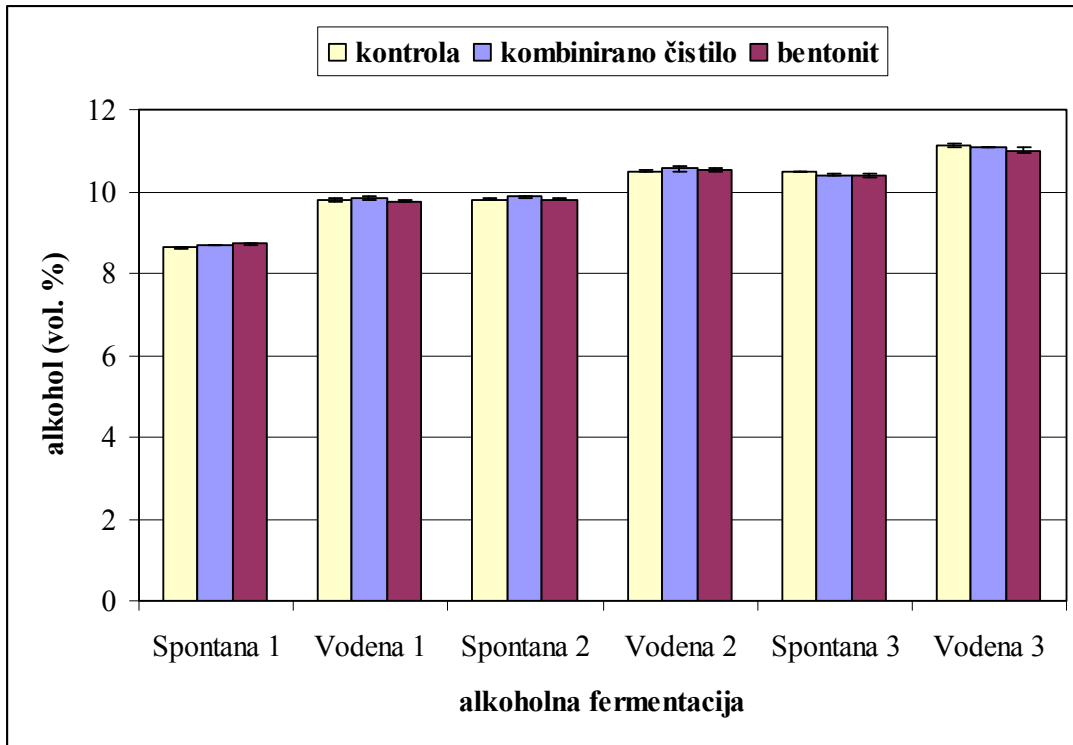
Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

Slika 6 prikazuje koncentracijo hlapnih kislin (g/L), izraženih kot očetna kislina, v mladih vinih sorte rebula, pridelanih s spontano in vodeno alkoholno fermentacijo, čiščena z dodatkom kombiniranega čistila (želatina, ribji mehur, kazeinat in silicijev dioksid) in z dodatkom bentonita.

Dodana čistilna sredstva niso imela posebnega učinka na koncentracijo hlapnih kislin, saj se vrednosti po čiščenju v primerjavi s kontrolnimi vzorci niso bistveno spremenile oziroma so se spremenile le v mejah napake meritve ( $\pm 0,05$  g/L) (Košmerl in Kač, 2007).

V povprečju so imeli vsi vzorci vin, pridelani s spontano alkoholno fermentacijo večjo vsebnost hlapnih kislin kot vzorci vin, pridelani z vodeno alkoholno fermentacijo. Največ hlapnih kislin so vsebovala vina spontane fermentacije druge trgatve, najmanj pa vodene fermentacije enako druge trgatve. V vinih prve trgatve je najbolj očitno, da kontrolna vzorca vsebujeta več hlapnih kislin v primerjavi s čiščenimi vzorci.

## 4.4 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE ALKOHOLA



**Slika 7:** Koncentracija alkohola (vol.%) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo

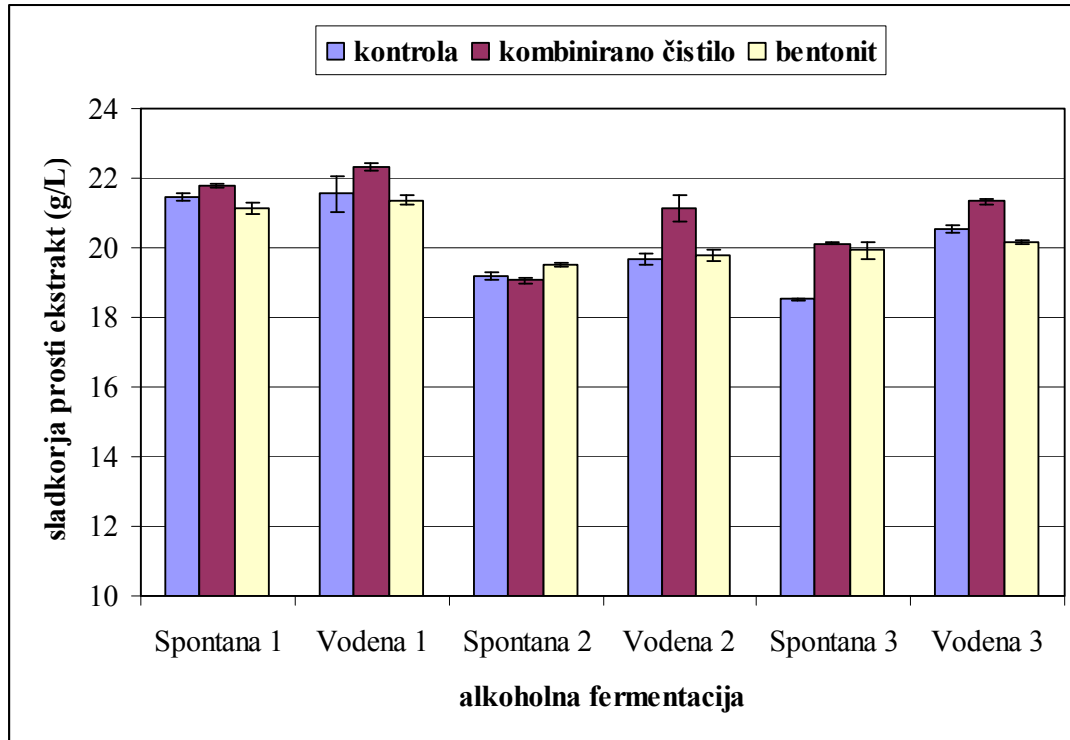
Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

Slika 7 prikazuje koncentracijo alkohola mladih vin sorte rebula, pridelanih s spontano in vodeno alkoholno fermentacijo, čiščena z dodatkom kombiniranega čistila (želatina, ribji mehur, kazeinat in silicijev dioksid) in z dodatkom bentonita.

Največjo koncentracijo alkohola so imeli vzorci vin, pridelani z vodeno fermentacijo 3, najmanjšo pa vzorci vin, pridelani s spontano fermentacijo 1.

Dodana čistilna sredstva niso imela posebnega učinka na koncentracijo alkohola, saj so vrednosti pred in po čiščenju v primerjavi s kontrolnimi vzorci približno enake.

#### 4.5 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE SLADKORJA PROSTEGA EKSTRAKTA



**Slika 8:** Koncentracija sladkorja prostega ekstrakta (g/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo

Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

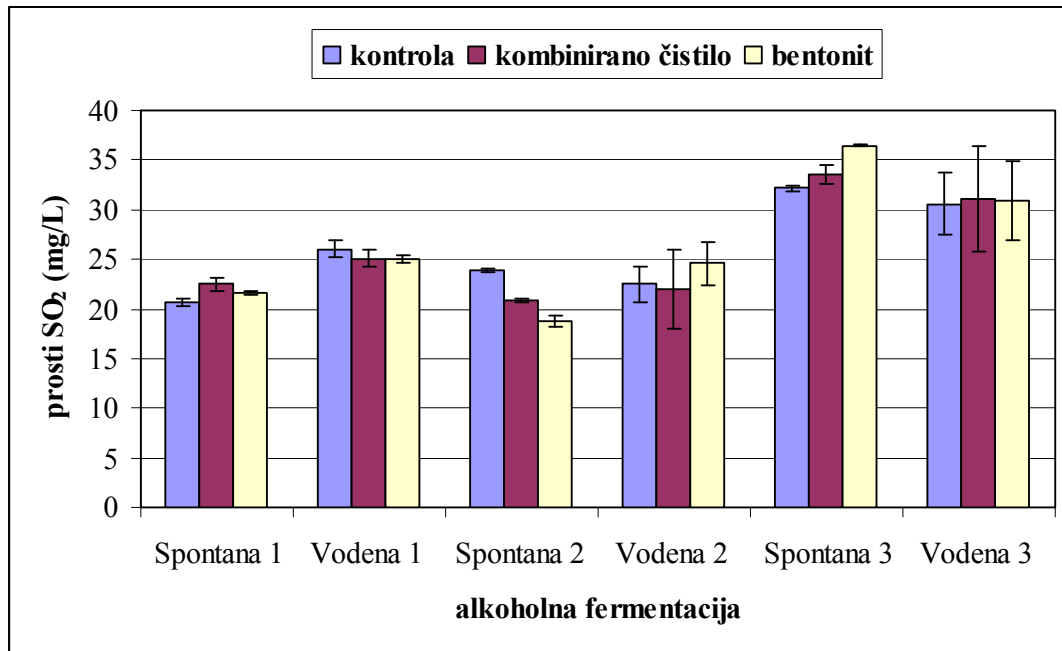
Slika 8 prikazuje koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta vin sorte rebula, pridelanih s spontano in vodeno alkoholno fermentacijo, čiščena z dodatkom kombiniranega čistila (želatina, ribji mehur, kazeinat in silicijev dioksid) in z dodatkom bentonita.

V povprečju so imeli vsi vzorci vin, pridelani z vodeno alkoholno fermentacijo večjo vsebnost sladkorja prostega ekstrakta kot vzorci vin, pridelani s spontano alkoholno fermentacijo istega datuma trgatve. Največjo koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta so vsebovali vzorci vin, pridelani z vodeno fermentacijo 1, najmanjšo koncentracijo pa v povprečju vzorci vin, pridelani s spontano fermentacijo 2.

Vsi vzorci vin, čiščeni s kombiniranim čistilom, so imeli večjo koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta od kontrolnih vzorcev in vzorcev čiščenih z bentonitom. Izjema je bil vzorec vina, pridelan s spontano fermentacijo 2, ki je imel manjšo koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta od kontrolnega vzorca in vzorca čiščenega z bentonitom. Vzorci vin pridelani z vodeno fermentacijo 1 in 3 in spontano fermentacijo 1, čiščeni z bentonitom, so

imeli manjšo koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta kot kontrolni vzorci. Vzorci vin pridelani s spontano fermentacijo 2 in 3 in vodeno fermentacijo 2, čiščeni z bentonitom, so imeli večjo koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta kot kontrolni vzorci.

#### 4.6 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE PROSTEGA ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA



**Slika 9:** Koncentracija prostega žveplovega dioksida (mg/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo

Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

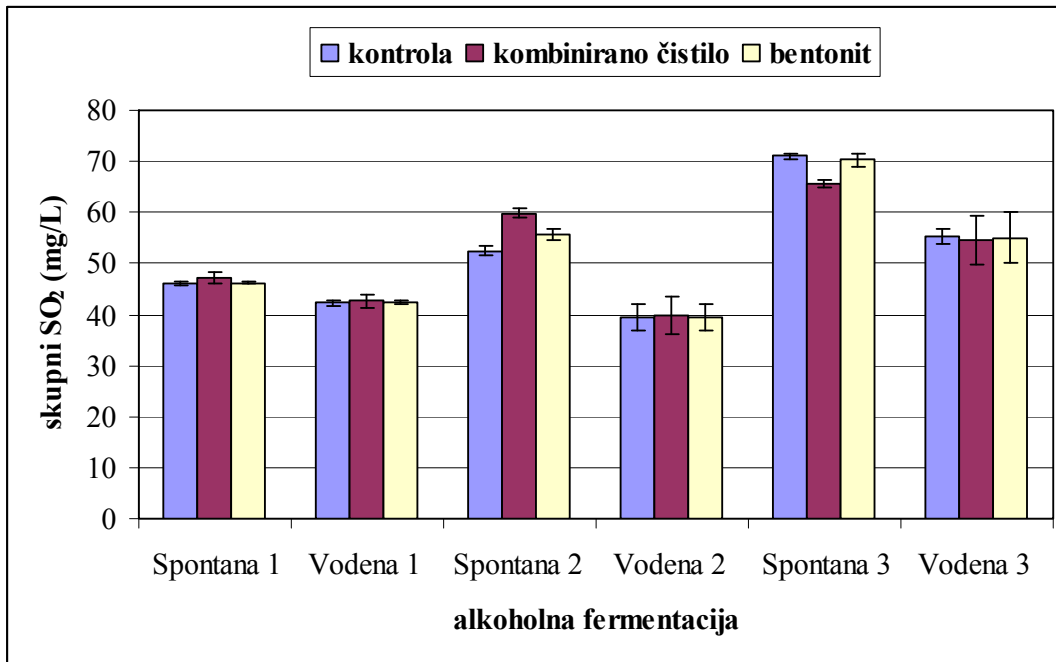
Slika 9 prikazuje koncentracijo prostega žveplovega dioksida mladih vin sorte rebula, pridelanih s spontano in vodeno alkoholno fermentacijo, čiščena z dodatkom kombiniranega čistila (želatina, ribji mehur, kazeinat in silicijev dioksid) in z dodatkom bentonita.

Dodana čistilna sredstva niso imela posebnega učinka na koncentracijo prostega žveplovega dioksida, saj so vrednosti pred in po čiščenju v primerjavi s kontrolnimi vzorci približno enake.

Vina pridelana s spontano fermentacijo 3, so imela največjo koncentracijo prostega  $\text{SO}_2$ . Najmanjšo koncentracijo prostega  $\text{SO}_2$  je vseboval vzorec vina pridelan s spontano fermentacijo 2, čiščen z bentonitom. Največjo koncentracijo prostega  $\text{SO}_2$  pa je vseboval vzorec vina, pridelan s spontano fermentacijo 3, čiščen z bentonitom.



#### 4.7 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE SKUPNEGA ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA



**Slika 10:** Koncentracija skupnega žveplovega dioksida (mg/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo

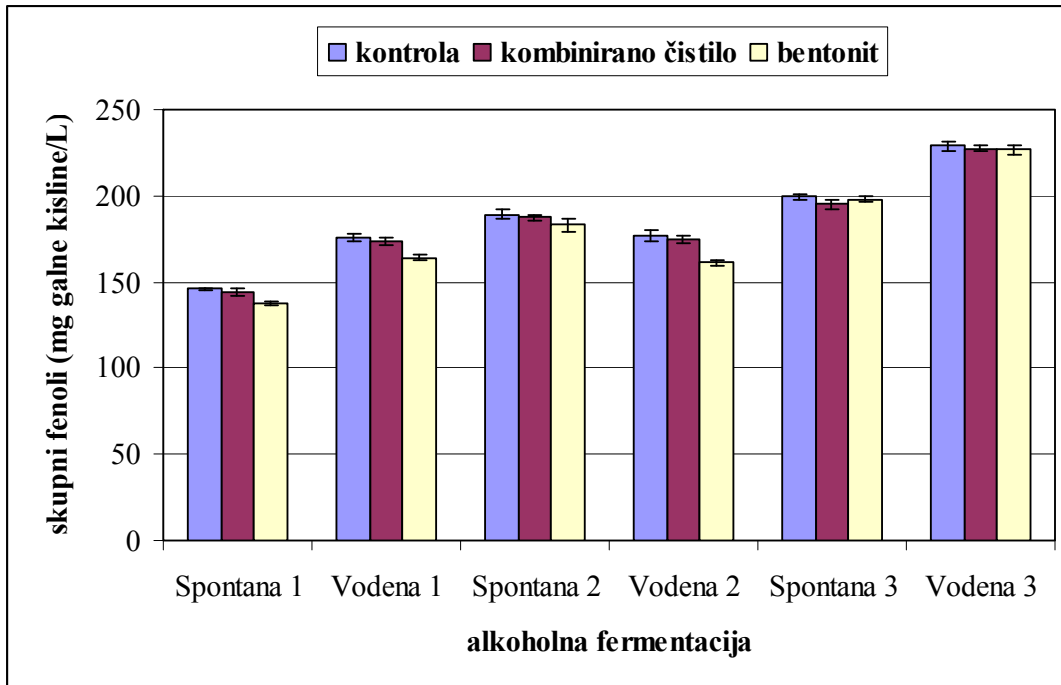
Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

Slika 10 prikazuje koncentracijo skupnega žveplovega dioksida mladih vin sorte rebula, ki so bila pridelana s spontano in vodeno alkoholno fermentacijo, čiščena z dodatkom kombiniranega čistila (želatina, ribji mehur, kazeinat in silicijev dioksid) in z dodatkom bentonita.

Dodana čistilna sredstva niso imela posebnega učinka na koncentracijo skupnega žveplovega dioksida, saj so vrednosti pred in po čiščenju v primerjavi s kontrolnimi vzorci približno enake.

Največjo koncentracijo skupnega  $\text{SO}_2$  so vsebovala vina, pridelana s spontano fermentacijo 3, najmanjšo pa tista, pridelana z vodeno fermentacijo 2.

## 4.8 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE SKUPNIH FENOLOV



**Slika 11:** Koncentracija skupnih fenolov (mg/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo

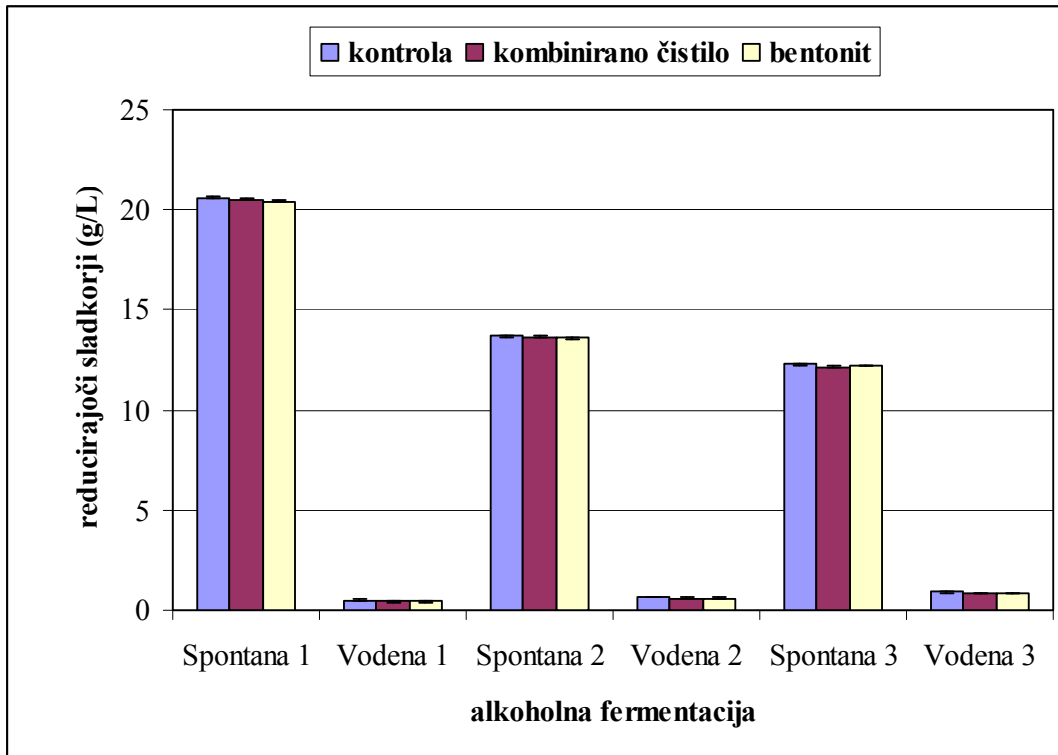
Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

Slika 11 prikazuje koncentracijo skupnih fenolov, izraženih kot mg galne kisline/L, vin sorte rebula, pridelanih s spontano in vodeno alkoholno fermentacijo, čiščena z dodatkom kombiniranega čistila (želatina, ribji mehur, kazeinat in silicijev dioksid) in z dodatkom bentonita.

V povprečju so imeli vzorci vin pridelani z vodeno fermentacijo 3, največ skupnih fenolov, katerim sledijo vzorci vodene fermentacije 1 in 2. Največ skupnih fenolov so vsebovala vina, pridelana z vodeno fermentacijo 3, najmanj pa vina, pridelana s spontano fermentacijo 1. Vinom pridobljenim s spontano fermentacijo se vsebnost skupnih fenolov povečuje pri vsaki naslednji trgatvi (1, 2 in 3).

Povzamemo lahko, da je bilo čiščenje z bentonitom učinkovitejše pri zmanjšanju vsebnosti skupnih fenolov v primerjavi s kombiniranim čistilom. V vseh primerih jih je kontrolni vzorec vseboval največ.

#### 4.9 REZULTATI DOLOČANJA KONCENTRACIJE REDUCIRAJOČIH SLADKORJEV



**Slika 12:** Koncentracija reducirajočih sladkorjev (g/L) v mladih vinih sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo

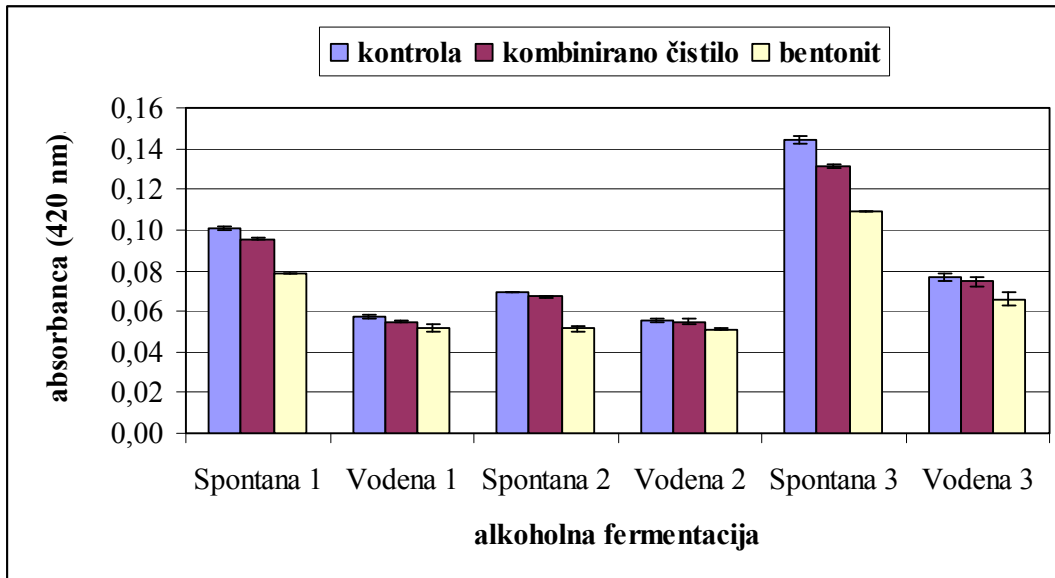
Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

Slika 12 prikazuje koncentracijo reducirajočih sladkorjev vin sorte rebula, ki so bila pridelana s spontano in vodeno alkoholno fermentacijo, čiščena z dodatkom kombiniranega čistila (želatina, ribji mehur, kazeinat in silicijev dioksid) in z dodatkom bentonita.

Uporaba čistilnih sredstev v primerjavi s kontrolnimi vzorci ni imela vpliva na koncentracijo reducirajočih sladkorjev pri vinih vseh trgatav, ki so bila pridelana s spontano fermentacijo. Pri vseh teh vinih se je koncentracija reducirajočih sladkorjev spremenila v mejah napake meritve (1 %) (Košmerl in Kač, 2007).

Glede na dobljene rezultate čiščenja lahko ne glede na merilno napako določanja reducirajočih sladkorjev zaključimo, da so imela čiščena vina z bentonitom najmanjšo koncentracijo, kontrolna vina pa največjo.

## 4.10 REZULTATI DOLOČANJA INTENZITETE BARVE BELEGA VINA



**Slika 13:** Intenziteta barve ( $A_{420}$ ) belih mladih vin sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo

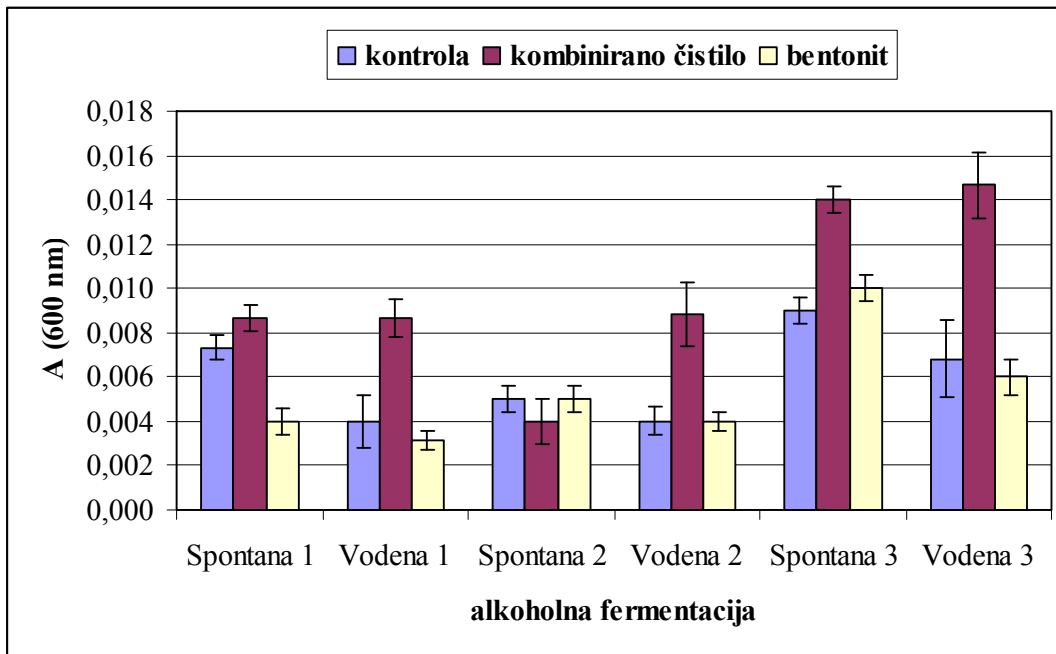
Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

Slika 13 prikazuje intenziteto barve mladih vin sorte rebula, oziroma njihovo absorbanco pri 420 nm, ki so bila pridelana s spontano in vodeno alkoholno fermentacijo, čiščena z dodatkom kombiniranega čistila (želatina, ribji mehur, kazeinat in silicijev dioksid) in z dodatkom bentonita.

Iz slike 13 je razvidno, da so imela vina, pridelana s spontano fermentacijo večjo intenziteto barve kot vina, pridelana z vodeno fermentacijo iste trgatve.

Na osnovi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da se je intenzivnost barve pridelanih mladih vin zmanjševala od prvega do drugega datuma trgatve in je bila največja v času tretje trgatve. Nadalje je iz slike 13 razvidno, da so bili ne glede na način fermentacije in čas trgatve vzorci vina, čiščeni z bentonitom najmanj intenzivne barve, najbolj pa kontrolni vzorci. Največji vpliv dodanih čistil na barvo vina se je pokazal pri spontani fermentaciji vzorcev 1 in 3.

## 4.11 REZULTATI ABSORBANCE PRI 600 nm (MOTNOST)



**Slika 14:** Absorbanca pri 600 nm mladih vin sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi v primerjavi s kontrolo

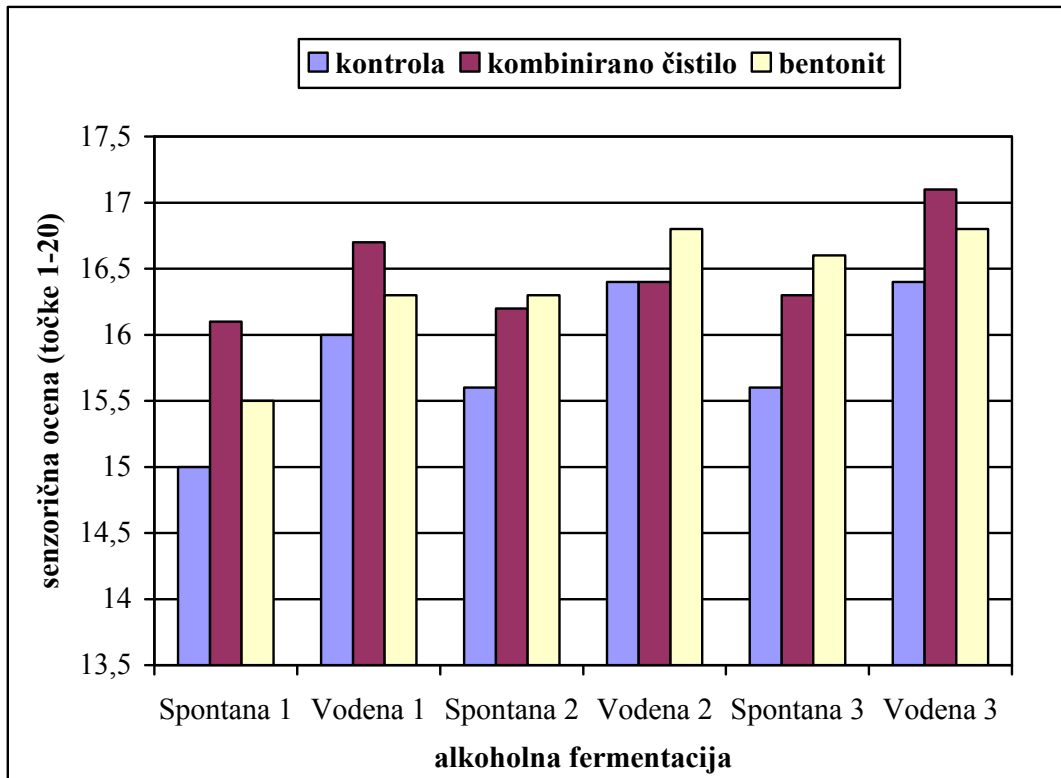
Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

Slika 14 prikazuje vrednost absorbanco pri 600 nm mladih vin sorte rebula, ki so bila pridelana s spontano in vodeno alkoholno fermentacijo, čiščena z dodatkom kombiniranega čistila (želatina, ribji mehur, kazeinat in silicijev dioksid) in z dodatkom bentonita.

Največjo motnost smo opazili pri vzorcu vina, pridelanega z vodeno fermentacijo 3, čiščenega s kombiniranim čistilom. Najmanjša motnost je bila ugotovljena pri vzorcu vina, pridelanega z vodeno fermentacijo 1, čiščenim z bentonitom.

Na podlagi rezultatov motnosti, izraženih kot vrednosti absorbanco pri 600 nm, lahko zaključimo značilno povečanje motnosti čiščenih vin s kombiniranim čistilom (izjema je le vzorec spontana 2). Najbolj bistri so bili trije vzorci, čiščeni z bentonitom (spontana 1 in vodena 1 ter vodena 3), medtem ko ni bistvenih razlik v primerjavi s kontrolo pri obeh vzorcih druge trgatve.

## 4.12 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE



**Slika 15:** Senzorična ocena (točke) mladih vin sorte rebula, pridelanih z vodeno in spontano fermentacijo, izmerjene pred in po čiščenju z različnimi čistilnimi sredstvi

Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

Slika 15 prikazuje senzorično oceno (točke) mladih vin sorte rebula, ki so bila pridelana s spontano in vodeno alkoholno fermentacijo, čiščena z dodatkom kombiniranega čistila (želatina, ribji mehur, kazeinat in silicijev dioksid) in z dodatkom bentonita.

Najbolje je bil ocenjen vzorec vina, pridelan z vodeno fermentacijo 3, čiščen s kombiniranim čistilom. Od vseh čiščenih vin je bilo najslabše ocenjeno vino, pridelano s spontano fermentacijo 1, čiščeno z bentonitom.

Na podlagi senzorične ocene, lahko zaključimo, da so vsi čiščeni vzorci, ne glede na vrsto čistila, prejeli boljšo senzorično oceno kot kontrolni vzorci.

**Preglednica 3:** Senzorični opis vzorcev mladih vin sorte rebula

<b>vzorci mladih vin čistilo</b>	<b>senzorični opis</b>
spontana 1 kontrola	moten, rahlo oksidiran vonj, izstopajoča kislina in grenkoba
spontana 1 kombinirano čistilo	opalescenten, čist, nevtralen, svež in dokaj harmoničen vonj
spontana 1 bentonit	nekoliko moten, rahlo zaznavna oksidacija, izstopajoča kislina
vodena 1 kontrola	rahlo opalescenten, izstopajoča kislina, trpek, čista sadna cvetlica
vodena 1 kombinirano čistilo	bister, svetlo rumene barve, dokaj harmoničen okus, slabše izražen vonj
vodena 1 bentonit	bister, dokaj intenzivna rumena barva, slabše izražena cvetlica, nekoliko izstopajoča kislina
spontana 2 kontrola	rahlo oksidiran vonj, rožnati odtenek barve, izstopajoč sladkor.
spontana 2 kombinirano čistilo	dokaj bister z manj oksidirano barvo, na okus dokaj polno
spontana 2 bentonit	dokaj visoka barva, dober vonj in okus
vodena 2 kontrola	rahlo opalescenten, sortni vonj, neharmoničen in z izstopajočo kislino
vodena 2 kombinirano čistilo	bister, svetlo rumene barve, rahel vonj po želatini, nekoliko manj izražen vonj, nekoliko izstopajoča kislina, dokaj pitek in svež.
vodena 2 bentonit	dokaj bister, izražena rumena barva, dokaj saden vonj, poln okus.
spontana 3 kontrola	nekoliko moten, rahlo oksidiran vonj in okus, rahlo je bil zaznaven mlečni ton
spontana 3 kombinirano čistilo	opalescenten, vonj, nekoliko zaprt vendar še izražen in dokaj harmoničen okus.
spontana 3 bentonit	dokaj bister, čist vonj, svež, piten in dokaj harmoničen
vodena 3 kontrola	dokaj intenzivna barva, prijetna sortna cvetlica in dokaj poln.
vodena 3 kombinirano čistilo	intenzivno rumene barve, sortno izražena cvetlica, svež in harmoničen
vodena 3 bentonit	rumene barve, z nekoliko manj izraženo cvetlico, rahlo grenek in dokaj poln.

Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

Preglednica 3 prikazuje senzorični opis vzorcev mladih vin sorte rebula.

## 4.13 REZULTATI STATISTIČNE ANALIZE

**Preglednica 4:** Rezultati analize vin sorte rebula z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

parameter (enota)	n	$\mu$	min	max	so	KV (%)
pH (/)	81	3,204	3,121	3,334	0,056	1,76
Titribilne kisline (pH=7,0) (g/L)	81	8,43	4,78	9,98	1,38	16,36
Skupne kisline (pH=8,2) (g/L)	81	8,65	4,92	10,21	1,40	16,15
Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	81	0,32	0,241	0,460	0,06	18,37
Alkohol (vol.%)	81	10,19	8,62	11,19	0,72	7,05
Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	81	20,61	18,5	22,45	1,03	5,00
Prosti SO <sub>2</sub> (mg/L)	81	26	17,9	36,5	5	19,40
Skupni SO <sub>2</sub> (mg/L)	81	49	36,3	71,7	10	19,70
Skupni fenoli (mg galne kisline/L)	81	185	136,66	232,23	27	14,69
Reducirajoči sladkorji (g/L)	81	5,6	0,40	20,65	7,3	131,26
Intenzitete barve A420nm	81	0,072	0,050	0,146	0,024	34,13
Motnost A600nm	81	0,007	0,003	0,016	0,003	49,52

n-število obravnavanj;  $\mu$ -povprečna vrednost; min-minimalna vrednost; max-maksimalna vrednost; so-standardni odklon; KV (%)-koeficient variabilnosti

Preglednica 4 prikazuje rezultate analiz vin, sorte rebula, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.



**Preglednica 5:** Vpliv skupin na fizikalno-kemijske parametre vin sorte rebula, pridelanih iz grozdja vseh treh trgatev

parameter (enota)	skupina						značilnost
	spontana kontrola	spontana kombinirano čistilo	spontana bentonit	vodena kontrola	vodena kombinirano čistilo	vodena bentonit	
pH (/)	3,19±0,09b	3,20±0,09ab	3,20±0,09ab	3,20±0,03ab	3,20±0,03ab	3,22±0,03a	nz
Titribilne kisline (pH=7,0) (g/L)	7,51±1,86b	7,48±1,86b	7,30±1,87b	9,01±0,74a	8,97±0,75a	8,80±0,73a	***
Skupne kisline (pH=8,2) (g/L)	7,74±1,91b	7,72±1,91b	7,51±1,92b	9,23±0,74a	9,19±0,75a	9,01±0,73a	***
Hlapne kisline (g očetne kisline /L)	0,40±0,05a	0,39±0,04a	0,38±0,04a	0,30±0,03b	0,29±0,03b	0,27±0,03b	***
Alkohol (vol.%)	9,64±0,81b	9,66±0,77b	9,63±0,74b	10,48±0,56a	10,49±0,52a	10,44±0,53a	***
Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	19,7±1,3d	20,3±1,2bc	20,2±0,8c	20,6±0,8b	21,6±0,6a	20,4±0,7bc	***
Prosti SO <sub>2</sub> (mg/L)	25,5±5,2	25,6±6,0	25,6±8,2	26,4±4,0	26,1±5,3	26,8±3,9	nz
Skupni SO <sub>2</sub> (mg/L)	56,5±11,3a	57,5±8,2a	57,4±10,5a	45,7±7,2b	45,7±7,4b	45,7±7,6b	***
Skupni fenoli (mg galne kisline/L)	178±25cd	176±24cd	173±27d	194±26a	192±26ab	184±31cb	***
Reducirajoči sladkorji (g/L)	15,5±3,9a	15,4±3,8a	15,4±3,8a	0,7±0,2b	0,6±0,2b	0,6±0,2b	***
Intenziteta barve A420nm	0,105±0,03a	0,098±0,03a	0,080±0,02b	0,063±0,01c	0,061±0,01c	0,056±0,01c	***
Motnost A600nm	0,007±0,00c	0,009±0,00b	0,006±0,00cd	0,005±0,00ef	0,011±0,00a	0,004±0,00e	***

Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo \*\*\*  $p \leq 0,001$  statistično zelo visoko značilen vpliv; nz –  $p > 0,05$  statistično neznačilen vpliv; skupini z enako črko se med seboj statistično značilno ne razlikujeta.

Preglednica 5 prikazuje vpliv čistilnih sredstev pri spontanih in vodeni fermentaciji na parametre vin, pridelanih iz grozdja vseh treh trgatev. Nadalje je iz preglednice 5 razviden statistično neznačilen vpliv pri vrednosti pH in vsebnosti prostega SO<sub>2</sub>. Vsi ostali parametri kažejo visoko značilen statističen vpliv. Statistično visoko značilen vpliv je posledica razlik med vzorci vin, ki so pridelani s spontano fermentacijo in tistimi, ki so pridelani z vodeno fermentacijo.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V diplomskem delu smo ugotavljali vpliv čistilnih sredstev oziroma njihovih kombinacij na senzorične lastnosti in kemijsko sestavo vin. Uporabili smo mlada vina, pridelana iz grozdja sorte Rebula iz vinograda v kraju Snežatno. Trgatev je bila opravljena trikrat in sicer teden pred, ob in šest dni po prognozi Kmetijsko-veterinarskega zavoda Nova Gorica o datumu trgatve za sorto Rebula. V vina smo dodajali različna čistilna sredstva: kombinirano enološko sredstvo (želatina, kalijev kazeinat in ribji mehur v kombinaciji s silicijevim dioksidom) in natrijev bentonit. Po natančnem doziranju teh sredstev v vina smo po treh dneh ugotavljali razlike v koncentracijah skupnih kislin, hlapnih kislin, fenolnih snovi, sladkorja prostega ekstrakta, skupnega in prostega žveplovega dioksida, razlike v barvi in motnosti vin ter senzorični oceni in jih primerjali s kontrolnimi vzorci vin.

Dodatek čistilnih sredstev nima bistvenega vpliva na osnovne komponente vina (barvne snovi, alkohol, reducirajoče sladkorje, pH in kislost), razlika se pokaže v vsebnosti dušikovih spojin, fenolnih spojin ter aromatičnih snovi (Košmerl, 2007).

Iz preglednice 5 je razviden statistično neznačilen vpliv pri vrednosti pH in vsebnosti prostega SO<sub>2</sub>. Vsi ostali parametri kažejo visoko značilen statističen vpliv. Statistično visok značilen vpliv je posledica razlik med vzorci vin, ki so pridelani s spontano fermentacijo in tistimi, ki so pridelani z vodeno fermentacijo.

Rezultati analiz koncentracij hlapnih kislin, alkohola, skupnega in prostega žveplovega dioksida ter pH vin, pridelanih iz grozdja vseh treh trgatev s spontano ali vodeno fermentacijo se pred in po čiščenju, ne glede na vrsto čistila ne razlikujejo bistveno od rezultatov vin svoje kontrolne skupine. Nastale minimalne razlike so posledica analitskih napak meritev. Statistična obdelava podatkov je naše ugotovitve potrdila. Dodatki čistilnih sredstev, ne glede na vrsto čistila, niso imeli vpliva na prej omenjene parametre, saj se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

Rezultati statistične analize so pokazali, da se koncentracije reducirajočih sladkorjev, skupnih in titrabilnih kislin vzorcev vin, pridelanih s spontano ali vodeno fermentacijo, statistično značilno ne razlikujejo od svojih kontrolnih vzorcev.

Pričakovali smo, da se bodo po čiščenju koncentracije sladkorja prostega ekstrakta v primerjavi s kontrolnimi vzorci zmanjšale, saj naj bi se čistilna sredstva vezala s komponentami v vinu, kar vodi v nastanek večjih delcev, ki se nato usedejo na dno. Pri vseh vzorcih mladih vin, čiščenih s kombiniranim čistilom, je prišlo do povečanja koncentracij sladkorja prostega ekstrakta glede na kontrolne vzorce. Izjema je bil le vzorec mladega vina, pridelan s spontano fermentacijo grozdja druge trgatve, kjer je prišlo do zmanjšanja koncentracije sladkorja prostega ekstrakta. Pri vse prej omenjeni vzorcih s povečano koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta je bila povečana tudi motnost. Do povečanja koncentracije sladkorja prostega ekstrakta glede na kontrolne vzorce je prišlo tudi pri dveh vzorcih mladih vin, čiščenih z bentonitom, pridelanih s spontanima

fermentacijama grozdja druge in tretje trgateve. Prav tako smo opazili tudi povečanje koncentracije sladkorja prostega ekstrakta glede na kontrolni vzorec pri vinu, čiščenim z bentonitom, pridelanim z vodeno fermentacijo grozdja druge trgateve in sicer za 0,2 g/L. Statistična analiza, ki je zajela vse tri trgateve, pa je pokazala, da se vina, pridelana s spontano fermentacijo, ne glede na vrsto čistila, statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev. To pomeni, da so v tem primeru uporabljena čistilna sredstva vplivala na koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta. Vina, pridelana z vodenimi fermentacijami, čiščena z bentonitom se glede na kontrolne vzorce statistično značilno ne razlikujejo. Vina čiščena s kombiniranim čistilom pa se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev. Po ustaljenem postopku določitve bistrega vzorca, smo vzorce filtrirali skozi grob filter papir. Domnevamo, da je do povečanja sladkorja prostega ekstrakta prišlo zaradi prevelikega premera por grobega filter papirja.

Pričakovali smo, da se bo motnost vin zmanjšala, saj naj bi se delci, ki povzročajo motnost, vezali s čistilnim sredstvom in se oborili. V nasprotju s pričakovanji se je po čiščenju s kombiniranim čistilom pri vinih, pridelanih s spontano in vodeno fermentacijo grozdja vseh treh trgatev, motnost v primerjavi s kontrolnimi vzorci povečala. Izjema je bilo le vino, pridelano s spontano fermentacijo grozdja druge trgateve, pri katerem se je po dodatku kombiniranega čistila motnost v primerjavi s kontrolnimi vzorci zmanjšala za 0,001. Statistična analiza motnosti je pokazala, da se vzorci vin, pridelani s spontano ali vodeno fermentacijo, čiščeni s kombiniranim čistilom, statistično značilno razlikujejo od svojih kontrolnih vzorcev. Predvidevamo, da se je motnost vin povečala zaradi ustaljenega postopka določitve bistrega vzorca skozi grob filter papir.

Pričakovali smo, da se bo intenziteta barve po dodatku čistilnih sredstev zmanjšala. Čistilna sredstva bi morala vplivati na intenziteto barve tako, da bi vino postalo svetlejša in bolj rumeno-zelena barve. Intenziteta barve se je pri vseh vzorcih vin, pridelanih s spontano ali vodeno fermentacijo grozdja vseh treh trgatev, po dodatku čistil zmanjšala v primerjavi s kontrolnimi vzorci. Zmanjšanja intenzitete barve so opaznejša pri uporabi bentonita, kot pri uporabi kombiniranega čistila. Statistično značilna razlika v intenziteti barve pa je opazna le pri vinih, pridelanih s spontano fermentacijo, čiščenih z bentonitom. Čiščenje s kombiniranim čistilom v nobenem primeru ni povzročilo statistično značilnih sprememb intenzitete barve v primerjavi s kontrolnimi vzorci.

Pričakovali smo, da se bo koncentracija skupnih fenolov po uporabi čistilnih sredstev zmanjšala. Čistilna sredstva s pozitivnim električnim nabojem se vežejo s negativno naelektrenimi fenoli, kar vodi v nastanek večjih delcev, ki se nato oborijo. Fenoli, ki so negativno naelektreni delci v vinu, lahko odstranimo z želatino, albuminom, kazeinom ali kalijevim kazeinatom, jajčnim beljakom in zaščitnim koloidom (Košmerl, 2007). Količina skupnih fenolov se je v vzorcih vin, pridelanih s spontano ali vodeno fermentacijo grozdja vseh treh trgatev, po dodatku čistilnih sredstev zmanjšala v primerjavi s kontrolnimi vzorci. Zmanjšanje je opaznejše pri uporabi bentonita kot pri uporabi kombiniranega čistila. Do tega pojava bi lahko prišlo, saj bi lahko bentonit indirektno vezal fenole, ki so v kompleksu z beljakovinami, vendar pa je aktivnost bentonita pri vezavi teh fenolov relativno nizka (Zoecklein in sod., 1995). Poleg tega lahko v manjši meri, zaradi dejstva, da so robovi ploščic bentonita pozitivno naelektreni, prišlo do vezave z negativno naelektrenimi beljakovinami (Zoecklein, 1988). Statistično značilna razlika v koncentraciji skupnih

fenolov, glede na kontrolne vzorce, pa je opazna le pri vinih, pridelanih z vodeno fermentacijo, čiščenih z bentonitom. Čiščenje s kombiniranim čistilom v nobenem primeru ni povzročilo statistično značilnega zmanjšanja skupnih fenolov v primerjavi s kontrolnimi vzorci. Silicijev dioksid je negativno naelektreno čistilo, ki reagira s pozitivno naelektrenimi delci (Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Beljakovinska čistilna sredstva prednostno reagirajo z velikimi polifenoli, kot so tanini, ki imajo več hidroksilnih skupin in zato več potencialnih mest vezave (Zoecklein in sod., 1995). Predvidevamo, da je bila vsebnost velikih polifenolov (tanini) majhna, kar bi lahko pojasnilo slabšo učinkovitost beljakovinskega čistila. Poleg tega so beljakovinska čistila bolj učinkovita pri odstranjevanju fenolnih spojin pri nižji temperaturi (10 °C) v primerjavi z višjimi temperaturami (20-25 °C) (Košmerl, 2007). Ker smo čiščenje izvajali pri sobni temperaturi, je bila učinkovitost čiščenja s kombiniranim čistilom manjša.

Pričakovali smo, da bodo vina, čiščena s čistilnimi sredstvi, dobila boljšo senzorično oceno kot kontrolni vzorci. Rezultati senzorične analize so to potrdili. Vsi vzorci imajo po čiščenju, ne glede na uporabljeno čistilno sredstvo, boljšo oceno. Izjema je bil le vzorec vina, pridelanega z vodeno fermentacijo grozdja druge trgateve, čiščen s kombiniranim čistilom, katerega ocena je enaka oceni kontrolnega vzorca.

## 5.2 SKLEPI

- uporaba čistilnih sredstev ni imela bistvenega vpliva na kemijsko sestavo vin,
- statistična analiza je pokazala, da se koncentracije reducirajočih sladkorjev, skupnih kislin, hlapnih kislin, prostega in skupnega žveplovega dioksida, alkohola in pH statistično značilno ne razlikujejo od kontrolnih vzorcev. To pomeni, da uporabljena čistilna sredstva niso vplivala na prej omenjene parametre,
- intenziteta barve se je po dodatku čistilnih sredstev zmanjšala. Statistična analiza pa je pokazala, da se statistično značilno razlikujejo od kontrolnega vzorca le vina, pridelana s spontano fermentacijo, čiščena z bentonitom,
- motnost vina se je po dodatku kombiniranega čistila statistično značilno razlikovala od kontrolnih vzorcev. Predvidevamo, da je to posledica uporabe filtracije, skozi prevelike pore grobega filter papirja,
- statistična analiza sladkorja prostega ekstrakta je pokazala, da se vsi vzorci, ne glede na vrsto fermentacije in uporabljeno čistilo statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev. Izjema so bila vina čiščena z bentonitom, pridelana z vodeno fermentacijo. Verjetno je do tega prišlo zaradi uporabe grobega filter papirja,
- koncentracija skupnih fenolov se je po dodatku čistilnih sredstev zmanjšala glede na kontrolne vzorce. Statistična analiza pa je pokazala, da se statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev le vina, pridelana z vodeno fermentacijo, čiščena z bentonitom. Pri uporabljenih količinah in pogojih se je bentonit pokazal za učinkovitejše sredstvo za odstranjevanje fenolnih spojin,
- senzorična analiza je pokazala, da z uporabo čistilnih sredstev izboljšamo senzorično oceno vin, kar kaže na boljšo bistrost, čistost vonja in okusa pri teh vinih.

## 6 POVZETEK

V diplomskem delu smo raziskali vpliv natrijevega bentonita in kombiniranega čistila (želatina, ribji mehur, kalijev kazeinat in silicijev dioksid) na kemijsko sestavo in senzorične lastnosti mladega vina sorte rebula.

Mlado vino je bilo pridelano s spontano in vodeno fermentacijo iz grozdja treh trgatev. Po dodatku čistilnih sredstev smo po treh dneh ugotavljali razlike v koncentracijah skupnih kislin, hlapnih kislin, fenolnih snovi, sladkorja prostega ekstrakta ter skupnega in prostega žveplovega dioksida, ki smo jih primerjali s kontrolnimi vzorci. Ugotavljali smo tudi razliko v intenziteti barve in motnosti v primerjavi s kontrolnimi vzorci. Vzorci vin, v katere smo dodali čistilna sredstva, kakor tudi kontrolni vzorci, so bili senzorično ocenjeni po Buxbaumovi metodi.

Iz preglednice 5 je razviden statistično neznačilen vpliv pri vrednosti pH in vsebnosti prostega SO<sub>2</sub>. Vsi ostali parametri kažejo visoko značilen statističen vpliv. Statistično visok značilen vpliv je posledica razlik med vzorci vin, ki so pridelani s spontano fermentacijo in tistimi, ki so pridelani z vodeno fermentacijo.

Pri vzorcih vin, pridelanih iz grozdja vseh treh trgatev s spontano ali vodeno fermentacijo, se rezultati analiz koncentracij hlapnih kislin, alkohola, skupnega in prostega žveplovega dioksida ter pH vin po dodatku čistilnih sredstev ne razlikujejo od rezultatov vin kontrolne skupine. Minimalne razlike so v mejah napake posameznih meritev. Statistična analiza je naše rezultate potrdila. Rezultati so bili pričakovani.

Koncentracije reducirajočih sladkorjev in skupnih (titrabilnih) kislin, so se po dodatku čistilnih sredstev pri vseh vzorcih zmanjšale v primerjavi s kontrolnimi vzorci. Zmanjšanje je minimalno, vzorci čiščenih vin se statistično značilno ne razlikujejo od kontrolnih vzorcev.

Po dodatku čistilnih sredstev se je v primerjavi s kontrolnimi vzorci zmanjšala tudi intenziteta barve pri vseh vzorcih čiščenih vin, zmanjšanje pa ne kaže statistično značilnih razlik, razen pri vzorcih, pridelanih s spontano fermentacijo, čiščenih z bentonitom.

Motnost se po dodatku bentonita statistično značilno ne razlikuje od kontrolnih vzorcev. Po dodatku kombiniranega čistila se je motnost vin v primerjavi s kontrolnimi vzorci povečala, razlike so statistično značilne. Predvidevamo, da je to posledica uporabe grobega filter papirja.

Koncentracija skupnih fenolov se je pri vseh vzorcih vin po dodatku čistilnih sredstev zmanjšala v primerjavi s kontrolnimi vzorci, statistično značilna razlika od kontrolnega vzorca pa je opazna le pri vzorcih vin pridobljenih z vodeno fermentacijo, čiščenih z bentonitom. Predvidevamo, da je do tega prišlo, zaradi majhne vsebnosti velikih polifenolov (tanini) v naših vzorcih mladih vin, saj beljakovinska čistilna sredstva prednostno reagirajo z velikimi polifenoli. Beljakovinska čistilna sredstva učinkovitejše odstranjujejo fenolne spojine pri nižji temperaturi (10 °C), mi pa smo čiščenje izvajali pri sobni temperaturi.

Pričakovali smo, da se bodo po čiščenju koncentracije sladkorja prostega ekstrakta v primerjavi s kontrolnimi vzorci zmanjšale. Čistilna sredstva se lahko vežejo s komponentami v vinu, kar vodi v nastanek večjih delcev, ki se nato usedejo na dno. Koncentracija sladkorja prostega ekstrakta se pri vzorcih vin, pridelanih s spontano fermentacijo, statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev, ne glede na uporabljeno čistilo. Vzorci vin, pridelani z vodeno fermentacijo, čiščeni z bentonitom se statistično značilno ne razlikujejo od kontrolnih vzorcev, medtem ko se tisti, čiščeni s kombiniranim čistilom, statistično značilno razlikujejo od kontrolnih vzorcev. Pri vseh vzorcih mladih vin, čiščenih z dodatkom kombiniranega čistila je prišlo do povečanja koncentracij sladkorja prostega ekstrakta glede na kontrolne vzorce. Izjema je bil le vzorec mladega vina, pridelanega s spontano fermentacijo grozdja druge trgatve, pri katerem je prišlo v primerjavi s kontrolnim vzorcem do zmanjšanja sladkorja prostega ekstrakta. Sklepamo, da je pri vzorcih s povečano koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta glede na kontrolne vzorce, prišlo zaradi uporabe grobega filter papirja.

Vsi vzorci vin so bili senzorično ocenjeni po Buxbaumovi metodi. Analiza je pokazala, da se je z uporabo čistilnih sredstev izboljšala senzorična ocena vin.

## 7 VIRI

- Bavčar D. 2009. Kletarjenje danes. 2. izd. Ljubljana, Kmečki glas: 295 str.
- Bird D. 2010. Understanding wine technology. 3<sup>rd</sup> ed. Newark, DBQA Publishing: 149-174
- Blade W. H., Boulton R. 1988. Adsorption of protein by bentonite in a model wine solution. American Journal of Enology and Viticulture, 39, 3: 193-199
- Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F., Kunkel R. E. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, Chapman & Hall: 284-284
- Catarino S., Madeira M., Monteiro F., Rocha F., Curvelo-Garcia A. S., De Sousa R. B. 2008. Effect of bentonite characteristics on the elemental composition of wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56: 158-165
- Collings B. 2002. Fining and fining agents. Vancouver (Canada), Vancouver Amateur Winemakers Association: 1 str.  
<http://www.vawa.net/winemaking-articles/finingagents.html> (julij 2010)
- Goode J. 2005. The science of wine. Berkeley, University of California Press:115-120
- Jackson R. S. 2008. Wine science: principles, practice and applications. 3<sup>rd</sup> ed. Amsterdam, Academic Press: 437-437
- Judež M. 1955. Kletarstvo. Ljubljana, Kmečka knjiga: 203-204, 238-238
- Kocjančič M. 2002. Enološka sredstva v praksi, pospeševanje ali omejevanje ter preverjanje kakovosti v smislu mednarodnega enološkega kodeksa. V: Vinogradi in vina za tretje tisočletje? 2. slovenski vinogradniško-vinarski kongres z mednarodno udeležbo, Otočec, 31. 1. do 2. 2. 2002. Puconja M. (ur.). Ljubljana, Strokovno društvo vinogradnikov in vinarjev Slovenije; Ljutomer, Zveza društev vinogradnikov in vinarjev Slovenije; Celje, Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 432-440
- Košmerl T. 2000. Žveplo v kletarstvu. V: Vinski letnik 1999: vinorodna dežela Posavje, Novo mesto-Otočec, maj-junij 2000. Merlin K. (ur.). Novo mesto, Kmetijski zavod Ljubljana, Oddelek za kmetijsko svetovanje: 22-29
- Košmerl T., Kač M. 2004. Osnove kemijske analize mošta in vina: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 106 str.
- Košmerl T. 2007. Bistrenje, čiščenje in stabilizacija vina pred stekleničenjem: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 67 str.

- Lambri M., Dordoni R., Silva A., De Faveri D. M. 2010. Effect of bentonite fining on odor-active compounds in two different white wine styles. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 2: 225-233
- Leske P. A., Bruer N. G. C., Capdeboscq V. 1995. An evaluation of some characteristics of commercial bentonites. *Wine Industry Journal*, 10, 1: 73-77
- Marchal R., Jeandet P. 2009. Use of enological additives for colloid and tartrate salt stabilization in white wines and for improvement of sparkling wine foaming properties. V: *Wine chemistry and biochemistry*. Moreno-Arribas M. V., Polo M. C. (eds.). New York, Springer: 127-158
- Margalit Y. 2004. Concepts in wine technology. San Francisco, Wine Appreciation Guild, Ltd: 101-108, 179-190
- Morris J. R., Main G. L. 1995. Fining agents for wine. Arkansas, University of Arkansas, Enology and Viticulture, Institute of Food Science and Engineering: 3 str.  
<http://www.uark.edu/depts/ifse/grapeprog/articles/nmc14wg.pdf> (junij 2010)
- Nemanič J. 1999. Spoznajmo vino. Ljubljana, Kmečki glas: 63-63, 102-104
- Nicolini G., Larcher R., Pangrazzi P., Bontempo L. 2004. Changes in the contents of micro- and trace-elements in wine due to winemaking treatments. *Vitis*, 43,1: 41-45
- Nordestgaard S., Chuan Y. P., O'Neill B., Waters E., Deans L., Policki P., Colby C. 2007. In-line dosing of white wine for bentonite fining with centrifugal clarification. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 2: 283-285
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdiou D., Donèche B., Lonvaud A. 2000. Handbook of enology. Vol. 1. The microbiology of wine and vinifications. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd: 179-203
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdiou D. 2006. Handbook of enology. Vol. 2. The chemistry of wine stabilization and treatments. 2<sup>nd</sup> ed. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd: 132-332
- Romano P., Suzzi G. 1992. Sulfur dioxide and wine microorganisms. V: *Wine microbiology and biotechnology*. Fleet G. H. (ed.). Camberwell, Harwood Academic Publishers: 373-393
- Rotter B. 2001a. Fining. Vancouver (Canada), Vancouver Amateur Winemakers Association: 14 str.  
<http://www.brsquared.org/wine/Articles/fining.htm> (junij 2010)
- Rotter B. 2001b. Sulphur dioxide. Vancouver (Canada), Vancouver Amateur Winemakers Association: 52 str.  
<http://www.brsquared.org/wine/Articles/SO2/SO2.htm> (junij 2010)



- Sauvage F.-X., Bach B., Moutounet M., Vernhet A. 2010. Proteins in white wines: Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chemistry*, 118: 26-34
- Skaza A. 1988. Kletarjenje je užitek. Ljubljana, Kmečki glas: 92-92
- Šikovec S. 1975. Malo kletarstvo. Ljubljana, Kmečki glas: 91-96
- Šikovec S. 1985. Sodobno kletarjenje. 2. izd. Ljubljana, Kmečki glas: 70-80
- Šikovec S. 1991. Redukcija aditivov, zlasti SO<sub>2</sub> v vinu. V: IV. slovenski enološki dnevi, Ljubljana, 12. in 13. december 1991. Rečnik M., Terčelj D. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 67-76
- Vodovnik A., Vodovnik T. 1999. Nasveti za vinarje. Ljubljana, Kmečki glas: 95-96, 177-183
- Zoecklein B. W. 1988. Bentonite fining of juice and wine. Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute & State University, Department of Horticulture: 8 str. <http://www.fst.vt.edu/extension/enology/downloads/bentonite01.pdf> (julij 2010)
- Zoecklein B. W. 2002a. Enology notes 45: Gelatin. Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute & State University, Department of Food Science and Technology: 1 str. <http://www.fst.vt.edu/extension/enology/EN/45.html> (junij 2010)
- Zoecklein B. W. 2002b. Enology notes 43, Fining agents, isinglass and structural balance and summary of fining agent use. Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute & State University, Department of Food Science and Technology: 1 str. <http://www.fst.vt.edu/extension/enology/EN/43.html> (junij 2010)
- Zoecklein B. W., Fugelsang K.C., Gump B.H., Nury F.S. 1995. Wine analysis and production. New York, Chapman & Hall: 242-260.
- Weiss K. C., Lange L. W., Bisson L. F. 2001. Small-scale fining trials: Effect of method of addition on efficiency of bentonite fining. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 3: 275-279

## **ZAHVALA**

Mentorju doc. dr. Mojmirju Wondri se iskreno zahvaljujem za vso strokovno pomoč, vodstvo in koristne nasvete pri izdelavi diplomskega dela ter obilico dobre volje, ki ga je pri tem spremljala ves čas.

Recenzentki prof. dr. Tatjani Košmerl se prav tako iskreno zahvaljujem za temeljit pregled diplomske naloge, strokovne nasvete in za potrpežljivost pri izdelavi diplomskega dela.

Zahvaljujem se doc. dr. Lei Gašperlin za statistično obdelavo podatkov, Lili Anamariji No za pomoč pri prevodih, Lini Burkan Makivić za podroben pregled diplomske naloge in Zdenki Zupančič za pomoč in prijetno vzdušje pri delu v laboratoriju.

Za tehnično pomoč pri izdelavi diplomske naloge in za dobro družbo se zahvaljujem Katji Černe, ki mi je v času celotnega študija vedno neizmerno pomagala.

Posebna zahvala gre moji družini za vso podporo in razumevanje ter za neomejeno vsestransko pomoč, tako pri diplomski nalogi, kot tudi tekom celotnega študija.

Najlepša hvala!

## PRILOGE

### Priloga A: Rezultati določanja pH vrednosti, titrabilnih in skupnih kislin ter hlapnih kislin mladih vin sorte rebula

parameter Vzorci vin Čistilo	številka vzorca	ph	Titrabilne kisline (pH=7,0) (g/L)	Skupne kisline (pH=8,2) (g/L)	Hlapne kisline (g očetne kisline /L)
spontana 1 kontrola	1	3,13±0,00	8,97±0,04	9,29±0,04	0,41±0,01
spontana 1 kombinirano čistilo	2	3,14±0,00	8,95±0,04	9,28±0,02	0,36±0,01
spontana 1 bentonit	3	3,14±0,00	8,75±0,04	9,05±0,04	0,37±0,01
vodena 1 kontrola	4	3,18±0,01	9,95±0,04	10,18±0,03	0,33±0,01
vodena 1* kontrola	5	3,18±0,00	9,94±0,02	10,15±0,05	0,31±0,02
vodena 1 kombinirano čistilo	6	3,18±0,01	9,93±0,04	10,18±0,03	0,27±0,00
vodena 1* kombinirano čistilo	7	3,18±0,00	9,90±0,04	10,11±0,03	0,29±0,01
vodena 1 bentonit	8	3,18±0,00	9,69±0,04	9,90±0,04	0,25±0,01
vodena 1* bentonit	9	3,19±0,01	9,72±0,03	9,92±0,04	0,27±0,00
spontana 2 kontrola	10	3,13±0,00	8,52±0,04	8,71±0,04	0,45±0,01
spontana 2 kombinirano čistilo	11	3,13±0,00	8,48±0,05	8,68±0,04	0,44±0,00
spontana 2 bentonit	12	3,14±0,00	8,33±0,04	8,51±0,04	0,43±0,00
vodena 2 kontrola	13	3,19±0,00	8,90±0,05	9,09±0,03	0,27±0,01
vodena 2* kontrola	14	3,19±0,00	8,88±0,04	9,09±0,02	0,25±0,01
vodena 2 kombinirano čistilo	15	3,19±0,00	8,82±0,03	9,05±0,04	0,28±0,00
vodena 2* kombinirano čistilo	16	3,19±0,01	8,84±0,03	9,04±0,04	0,27±0,01
vodena 2 bentonit	17	3,21±0,00	8,72±0,04	8,93±0,04	0,25±0,01
vodena 2* bentonit	18	3,21±0,01	8,68±0,05	8,88±0,06	0,26±0,01
spontana 3 kontrola	19	3,31±0,00	5,04±0,04	5,21±0,04	0,35±0,01
spontana 3 kombinirano čistilo	20	3,31±0,00	5,02±0,04	5,20±0,04	0,37±0,01
spontana 3 bentonit	21	3,33±0,00	4,82±0,04	4,98±0,06	0,34±0,01
vodena 3 kontrola	22	3,24±0,01	8,15±0,04	8,37±0,02	0,34±0,01
vodena 3* kontrola	23	3,24±0,01	8,26±0,04	8,49±0,04	0,31±0,01
vodena 3 kombinirano čistilo	24	3,24±0,00	8,12±0,03	8,33±0,05	0,34±0,01
vodena 3* kombinirano čistilo	25	3,24±0,00	8,20±0,02	8,41±0,04	0,32±0,01
vodena 3 bentonit	26	3,26±0,00	7,93±0,02	8,11±0,07	0,32±0,01
vodena 3* bentonit	27	3,26±0,00	8,05±0,03	8,29±0,03	0,31±0,00

Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

**Priloga B:** Rezultati določanja koncentracij alkohola, sladkorja prostega ekstrakta, prostega in skupnega žveplovega dioksida mladih vin sorte rebula

parameter Vzorci vin Čistilo	številka vzorca	Alkohol (vol %)	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	Prosti SO <sub>2</sub> (mg/L)	Skupni SO <sub>2</sub> (mg/L)
spontana 1 kontrola	1	8,63±0,01	21,47±0,10	21±0,4	46±0,4
spontana 1 kombinirano čistilo	2	8,68±0,01	21,80±0,05	23±0,7	47±1,0
spontana 1 bentonit	3	8,71±0,02	21,16±0,16	22±0,2	46±0,3
vodena 1 kontrola	4	9,76±0,02	21,95±0,43	25±0,5	42±0,5
vodena 1* kontrola	5	9,85±0,02	21,17±0,16	27±0,3	43±0,8
vodena 1 kombinirano čistilo	6	9,84±0,03	22,36±0,09	26±0,2	41±0,7
vodena 1* kombinirano čistilo	7	9,84±0,04	22,31±0,12	24±0,7	44±0,6
vodena 1 bentonit	8	9,74±0,03	21,48±0,03	25±0,4	43±0,2
vodena 1* bentonit	9	9,80±0,03	21,27±0,03	25±0,2	43±0,6
spontana 2 kontrola	10	9,81±0,02	19,18±0,11	24±0,2	53±0,9
spontana 2 kombinirano čistilo	11	9,88±0,02	19,06±0,07	21±0,2	60±1,0
spontana 2 bentonit	12	9,80±0,02	19,50±0,05	19±0,6	56±1,2
vodena 2 kontrola	13	10,49±0,04	19,65±0,13	21±0,5	37±0,3
vodena 2* kontrola	14	10,52±0,03	19,68±0,20	24±0,6	42±0,6
vodena 2 kombinirano čistilo	15	10,61±0,04	21,38±0,38	18±0,5	37±0,3
vodena 2* kombinirano čistilo	16	10,51±0,01	20,90±0,17	26±0,7	43±0,4
vodena 2 bentonit	17	10,50±0,02	19,75±0,09	23±0,2	37±0,4
vodena 2* bentonit	18	10,56±0,01	19,80±0,22	27±0,5	42±0,4
spontana 3 kontrola	19	10,48±0,01	18,52±0,03	32±0,3	71±0,6
spontana 3 kombinirano čistilo	20	10,41±0,01	20,12±0,03	34±1,0	66±0,7
spontana 3 bentonit	21	10,39±0,03	19,94±0,25	36±0,1	70±1,4
vodena 3 kontrola	22	11,09±0,04	20,48±0,06	28±0,2	54±0,9
vodena 3* kontrola	23	11,17±0,02	20,59±0,08	33±1,3	56±0,9
vodena 3 kombinirano čistilo	24	11,08±0,01	21,28±0,03	26±0,6	50±1,7
vodena 3* kombinirano čistilo	25	11,07±0,02	21,40±0,05	36±0,8	59±1,3
vodena 3 bentonit	26	10,97±0,05	20,18±0,03	27±0,1	51±0,7
vodena 3* bentonit	27	11,05±0,04	20,10±0,05	35±0,5	60±0,8

Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)

**Priloga C:** Rezultati določanja skupnih fenolov, reducirajočih sladkorjev, intenzitete barve vina in motnost mladih vin sorte rebula

parameter Vzorci vin Čistilo	številka vzorca	Skupni fenoli (mg galne kisline/L)	Reducirajoči sladkorji (g/L)	Intenziteta barve A420nm	Motnost A600nm
spontana 1 kontrola	1	146±1	20,60±0,05	0,101±0,001	0,007±0,001
spontana 1 kombinirano čistilo	2	144±2	20,50±0,05	0,096±0,001	0,009±0,001
spontana 1 bentonit	3	138±1	20,40±0,05	0,079±0,000	0,004±0,001
vodena 1 kontrola	4	176±3	0,50±0,05	0,058±0,001	0,003±0,001
vodena 1* kontrola	5	176±2	0,53±0,03	0,057±0,001	0,005±0,001
vodena 1 kombinirano čistilo	6	174±2	0,43±0,03	0,055±0,001	0,008±0,001
vodena 1* kombinirano čistilo	7	173±2	0,48±0,03	0,055±0,001	0,009±0,001
vodena 1 bentonit	8	164±2	0,42±0,03	0,050±0,001	0,003±0,000
vodena 1* bentonit	9	165±2	0,43±0,03	0,053±0,001	0,003±0,001
spontana 2 kontrola	10	189±3	13,70±0,05	0,069±0,000	0,005±0,001
spontana 2 kombinirano čistilo	11	187±2	13,65±0,05	0,067±0,001	0,004±0,001
spontana 2 bentonit	12	183±3	13,60±0,05	0,051±0,002	0,005±0,001
vodena 2 kontrola	13	174±2	0,67±0,03	0,055±0,001	0,004±0,001
vodena 2* kontrola	14	180±2	0,63±0,03	0,056±0,001	0,004±0,000
vodena 2 kombinirano čistilo	15	174±2	0,63±0,03	0,054±0,001	0,008±0,001
vodena 2* kombinirano čistilo	16	176±2	0,58±0,03	0,056±0,000	0,010±0,001
vodena 2 bentonit	17	160±2	0,58±0,03	0,051±0,001	0,004±0,000
vodena 2* bentonit	18	162±1	0,60±0,05	0,051±0,001	0,004±0,001
spontana 3 kontrola	19	200±2	12,28±0,03	0,144±0,002	0,009±0,001
spontana 3 kombinirano čistilo	20	195±3	12,17±0,03	0,131±0,001	0,014±0,001
spontana 3 bentonit	21	198±2	12,22±0,03	0,109±0,000	0,010±0,001
vodena 3 kontrola	22	227±2	0,93±0,03	0,079±0,001	0,005±0,001
vodena 3* kontrola	23	230±2	0,88±0,03	0,075±0,001	0,008±0,001
vodena 3 kombinirano čistilo	24	226±2	0,87±0,03	0,076±0,001	0,016±0,001
vodena 3* kombinirano čistilo	25	229±2	0,83±0,03	0,073±0,001	0,014±0,002
vodena 3 bentonit	26	224±2	0,85±0,00	0,069±0,001	0,005±0,001
vodena 3* bentonit	27	229±1	0,83±0,03	0,063±0,001	0,006±0,001

Spontana=vino, pridelano s spontano alkoholno fermentacijo, Vodena=vino, pridelano z vodeno alkoholno fermentacijo, 1=vino, pridelano iz grozdja prve trgatve (26.09.05), 2=vino, pridelano iz grozdja druge trgatve (04.10.05), 3=vino, pridelano iz grozdja tretje trgatve (10.10.05)