

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Mojca JENKO

**VPLIV SEVOV KVASOVK VRSTE *Saccharomyces cerevisiae* NA SESTAVO IN
SENZORIČNO KAKOVOST VINA LAŠKI RIZLING**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF *Saccharomyces cerevisiae* YEAST STRAINS ON
COMPOSITION AND SENSORY QUALITY OF LAŠKI RIZLING**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za tehnologijo, prehrano in vino na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Odbor za študijske zadeve Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenoval prof. dr. Tatjano Košmerl in za recenzentko prof. dr. Terezijo Golob.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Košmerl

Recenzentka: prof. dr. Terezija Golob

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca Jenko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 663.221:663.252/.253:582.282.3:544.01:543.61:543.9(043)=163.6
KG	vino/mlado vino/ mošt/ alkoholna fermentacija/ vinske kvasovke/ starterske kulture/ laški rizling/ fizikalnokemijske lastnosti/ kemijska sestava/ senzorična kakovost
AV	JENKO, Mojca
SA	KOŠMERL, Tatjana (mentorica)/ GOLOB, Terezija (recenzentka)
KZ	SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2009
IN	VPLIV SEVOV KVASOVK VRSTE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NA SESTAVO IN SENZORIČNO KAKOVOST VINA LAŠKI RIZLING
TD	Diplomska delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 79 str., 6 pregl., 37 slik, 13 pril., 46 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Kvasovke vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i> so askomicetne glive, ki pretvarjajo sladkorje v moštu v etanol, pri tem pa tvorijo tudi druge spojine, ki odločilno vplivajo na končno kakovost pridelanega vina, predvsem na fizikalnokemijsko sestavo in senzorične lastnosti vina. S fermentacijskim poskusom smo preverili vpliv štirih različnih sevov kvasovk na potek in dokončanje alkoholne fermentacije, fizikalnokemijske parametre in na končno izoblikovanje senzoričnih lastnosti mladega vina. Alkoholno fermentacijo smo vodili pri 15 °C ter spremljali kinetiko izločanja CO ₂ , po končani alkoholni fermentaciji pa smo v mladem vinu določali koncentracije reducirajočih sladkorjev, hlapnih kislin, relativno gostoto, koncentraciji skupnega suhega in sladkorja prostega ekstrakta, vrednost pH, skupno (titrabilno) kislost, koncentracije alkohola, organskih kislin, hlapnih spojin in višjih alkoholov ter spektrofotometrično določali barvo in ocenili bistrost vina. Prav tako smo opravili mikrobiološko analizo mladih vin z določanjem skupnega števila kvasovk ter mikroskopiranjem kvasnih droži in usedline vina. Po končani fermentaciji in nadaljnjem petmesečnem zorenju smo vina še senzorično ocenili. Ugotovili smo, da so vsi sevi kvasovk, razen enega, normalno zaključili alkoholno fermentacijo s povretjem praktično vseh reducirajočih sladkorjev. Posamezni sevi niso bistveno vplivali na relativno gostoto, skupni ekstrakt, pH in skupno ter titrabilno kislost. Večje razlike so se pokazale v koncentracijah alkohola, organskih kislin in hlapnih spojin, s tem pa tudi v senzoričnih lastnostih posameznih vzorcev mladega vina.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn
 DC UDC 663.221:663.252/.253:582.282.3:544.01:543.61:543.9(043)=163.6
 CX wines/young wines/ grape musts/ alcoholic fermentation/ yeasts wine / starters
 cultures/ laški rizling/ physicochemical properties/ chemical composition/ sensory
 quality
 AU JENKO, Mojca
 AA KOŠMERL, Tatjana (supervisor)/ GOLOB, Terezija (reviewer)
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
 Technology
 PY 2009
 TI THE INFLUENCE OF *Saccharomyces cerevisiae* YEAST STRAINS ON
 COMPOSITION AND SENSORY QUALITY OF WELSCH RIESLING
 DT Graduation thesis (University studies)
 NO XI, 79 p., 6 tab., 37 fig., 13 ann., 46 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB *Saccharomyces cerevisiae* yeasts are ascomycetic fungus. They convert must sugars to ethanol and produce various byproducts that determine final quality of produced wine, especially physicochemical properties and sensory properties of wine. The influence of four different yeast strains on course and conclusion of alcoholic fermentation, physicochemical parameters and the formation of final sensory properties of young wine was tested. During alcoholic fermentation (at 15 °C) the emission of CO₂ was measured. At the end of alcoholic fermentation the following parameters were measured: concentration of reducing sugars, volatile acids, relative density, total dry extract and sugar-free extract, total (titrable) acidity, pH, concentration of alcohol, organic acids, volatile compounds and higher alcohols. The color of wine was measured spectrophotometrically and the clarity of wine was determined visually. Total number of yeasts in young wine was determined by plate count. Additionaly microscopic analysis of yeast lees and sediment was performed. Sensory evaluation of wine was made after five months of aging. The results showed that three of four tested yeast strains finished alcoholic fermentation as expected – almost all reducing sugars were used up. There were no major differences in relative density, total dry extract, sugar-free extract, total (titrable) acidity and pH between samples with inoculated tested yeast strains. There were however differences in concentrations of alcohol, organic acids, volatile compounds and higher alcohols. Consequently sensory properties of wine were different, depending on the used strain of *Saccharomyces cerevisiae*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2. DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 AMPELOGRAFSKI OPIS SORTE LAŠKI RIZLING	3
2.1.1 Sinonimi (Nemanič, 1996).....	3
2.1.2 Poreklo in razširjenost	3
2.1.3 Agrobiološke značilnosti	3
2.2. FIZIKALNOKEMIJSKA SESTAVA MOŠTA	4
2.2.1. Voda.....	4
2.2.2 Ogljikovi hidrati (sladkorji)	4
2.2.3. Organske kisline	5
2.2.4 Mineralne snovi	6
2.2.5 Dušikove spojine	6
2.2.6 Pektinske snovi	7
2.2.7 Fenolne spojine	7
2.3 ALKOHOLNA FERMENTACIJA	8
2.4 VLOGA VINSKIH KVASOVK MED ALKOHOLNO FERMENTACIJO MOŠTA ...	9
2.4.1 Splošne značilnosti vinskih kvasovk	9
2.4.2 Dodatek starterske kulture vinskih kvasovk	11
2.4.3 Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk.....	12
2.5 STARTERSKE KULTURE VINSKIH KVASOVK.....	13
2.5.1 Osnovne lastnosti starterskih kultur vinskih kvasovk.....	13
2.5.2 Zahteve za industrijske starterske kulture	14
2.6 AROMATIČNE SNOVI V VINU	14
2.6.1 Primarna aroma vina.....	15
2.6.2 Fermentacijska aroma	16
3 MATERIAL IN METODE DE LA.....	20
3.1 MATERIAL	20
3.1.1 Mošt	20
3.1.2 Kvasovke	20

3.1.3 Hrana za kvasovke	21
3.2 ZASNOVA POSKUSA	22
3.3 METODE DELA	23
3.3.1 Nastavitev fermentacijskega poskusa	23
3.3.2 Fizikalno kemijske analize mošta in vina	24
3.3.3 Mikrobiološke analize vina	29
3.3.4 Senzorične analize vina	31
4.1 REZULTATI ANALIZ MOŠTA	32
4.1.1 Vrednost pH	32
4.1.2 Koncentracija skupnih (titrabilnih) kislin	32
4.1.3 Sladkorna stopnja	33
4.1.4 Pufrna kapaciteta	33
4.2 FERMENTACIJSKE KRIVULJE	34
4.3.1 Koncentracija reducirajočih sladkorjev	38
4.3.2 Koncentracija hlapnih kislin	39
4.3.3 Relativna gostota vina	40
4.3.4 Koncentracija skupnega in sladkorja prostega ekstrakta	41
4.3.5 Koncentracija alkohola	43
4.3.6 Vrednost pH	46
4.3.7 Koncentracija skupnih (titrabilnih) kislin	47
4.3.8 Koncentracija organskih kislin	48
4.3.9 Koncentracija hlapnih spojin in višjih alkoholov	51
4.3.10 Določanje barve vina	56
4.4.1 Skupno število kvasovk	58
4.4.2 Mikroskopiranje kvasnih celic droži	59
4.4.3 Mikroskopiranje usedline vina	61
4.5 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE	62
4.5.1 Opis bistrosti	62
4.5.2 Ocenjevanje vina z deskriptivno metodo po lastni presoji	63
5 SKLEPI	65
6 POVZETEK	67
7 VIRI	69
ZAHVALA	73
PRILOGE	73

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Osnovni selekcijski kriteriji vinskih kvasovk in cilji selekcije	11
Preglednica 2: Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk.....	12
Preglednica 3: Senzorične lastnosti monoterpenov in njihov senzorični prag zaznave (Košmerl, 2007a).....	16
Preglednica 4: Tvorba nekaterih višjih alkoholov iz odgovarjajočih aminokislin in njihove koncentracije v vinu (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).....	18
Preglednica 5: Oznaka vzorcev, njihovo komercialno ime in količina dodatka	21
Preglednica 6: Rezultati analize mošta.....	32

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz poteka poskusa	1
Slika 2: Fermentacijske steklenice 24 ur po inokulaciji.....	23
Slika 3: Fermentacijske steklenice po 150 urah alkoholne fermentacije	23
Slika 4: Postopek priprave razredčitev vzorca in nacepitve določenih razredčitev na petrijeve plošče.....	29
Slika 5: Sprememba mase vrelnih steklenic (g) v odvisnosti od trajanja fermentacije.....	34
Slika 6: Odvisnost oddanega CO ₂ (g/500 mL) od trajanja alkoholne fermentacije	35
Slika 7: Kinetika oddanega CO ₂ (g/L/h) v odvisnosti od trajanja fermentacije.....	36
Slika 8: Nihanje temperature (°C) med alkoholno fermentacijo.....	37
Slika 9: Vsebnost reducirajočih sladkorjev (g/L) v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk.....	39
Slika 10: Vsebnost hlapnih kislin (g/L) v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk.	40
Slika 11: Primerjava relativne gostote v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk (dec 08) in po petmesečnem zorenju vina (maj 09).....	41
Slika 12: Vsebnost skupnega in sladkorja prostega ekstrakta (g/L) v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk	42
Slika 13: Primerjava skupnega ekstrakta v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk (dec 08) in po petmesečnem zorenju vina (maj 09).....	43
Slika 14: Vsebnost alkohola v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk	44
Slika 15: Primerjava dejanskega in skupnega alkohola v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk.....	45
Slika 16: Vrednost pH v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk	46
Slika 17: Vsebnost skupnih (titrabilnih) kislin (g/L) v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk.....	47
Slika 18: Primer kromatograma organskih kislin v vinu.....	49
Slika 19: Vsebnosti organskih kislin v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk	50
Slika 20: Primer kromatograma hlapnih spojin in višjih alkoholov v vinu	52
Slika 21: Vsebnost acetaldehida, etilacetata, metanola in 2-fenil etil acetata v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi	53
Slika 22: Vsebnost metil laktata in etil laktata v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk.....	54
Slika 23: Vsebnosti 1-propanola, izobutanola, 1-butanola, izoamil alkohola in 2-fenil etanola v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk.....	55
Slika 24: Absorbanca pri 420 nm v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk pred in po filtraciji.....	56

Slika 25: Absorpcijski spekter vzorcev mladega vina v območju valovne dolžine 400-440 nm po filtraciji. Vzorci 1, 2 in 3 so prikazani na sliki levo, vzorca 4 in 5 pa na sliki desno.	57
Slika 26: Skupno število kvasovk v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk.	59
Slika 27: : Mikroskopski posnetek droži vzorca 1 pri 400-kratni povečavi..	Error! Bookmark not defined.
Slika 28: Mikroskopski posnetek droži vzorca 2 pri 400-kratni povečavi.....	Error! Bookmark not defined.
Slika 29: Mikroskopski posnetek droži vzorca 3 pri 400-kratni povečavi.....	60
Slika 30: Mikroskopski posnetek droži vzorca 4 pri 400-kratni povečavi.....	60
Slika 31: Mikroskopski posnetek droži.....	61
Slika 32: Mikroskopski posnetek usedline vzorca 1 pri 400-kratni povečavi.....	61
Slika 33: Mikroskopski posnetek usedline.....	61
Slika 34: Mikroskopski posnetek usedline vzorca 3 pri 400-kratni povečavi.....	62
Slika 35: Mikroskopski posnetek usedline.....	62
Slika 36: Mikroskopski posnetek usedline vzorca 5 pri 400-kratni povečavi.....	62
Slika 37: Mikroskopski posnetek vinskega kamna vzorca 1 pri 400-kratni povečavi	62

KAZALO PRILOG

Priloga A: Vsebnosti reducirajočih sladkorjev v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk.....	73
Priloga B: Vsebnosti hlapnih kislin v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk	74
Priloga C: Vrednosti relativne gostote v mladih vinih in po zaključeni alkoholni fermentaciji (dec. 08) in in štiri mesece kasneje (maj 09) s štirimi različnimi sevi kvasovk.....	75
Priloga D: Vsebnosti skupnega in sladkorja prostega ekstrakta v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji (dec. 08) in in štiri mesece kasneje (maj 09) s štirimi različnimi sevi kvasovk.....	75
Priloga E: Vsebnosti alkohola v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk (dec 08) in 4 mesece kasneje (maj (09).....	75
Priloga F: Vrednosti pH v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk.....	75
Priloga G: Vsebnosti skupnih (TK ₂) in titracijskih (TK ₁) kislin v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk	76
Priloga H: Vsebnosti organskih kislin v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk	76
Priloga I: Vsebnosti hlapnih spojin in višjih alkoholov v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk.....	76
Priloga J: Absorbanca pri 420 nm v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk pred in po filtraciji.....	78
Priloga K: Skupno število kvasovk v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk	78
Priloga L: Suha usedlina posameznih vzorcev po petmesečnem zorenju vina	78
Priloga M: Kolonije kvasnih celic vzorca 5 na plošči s hranilnim gojiščem YPD	79

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A ₄₂₀	absorbanca pri 420 nm
CFU	kolonijska enota (ang. Colony Forming Unit)
CK	citronska kislina
JanK	jantarna kislina
JK	jabolčna kislina
MK	mlečna kislina
Oe	stopinje Oechsleja
O.I.V.	International Organisation of Vine and Wine
PK	pufna kapaciteta
RS	reducirajoči sladkorji
SE	skupni ekstrakt
SPE	sladkorja prosti ekstrakt
TCA-cikel	cikel trikarboksilnih kislin
VA	višji alkohol
VK	vinska kislina
YPD	Yeast Pepton dekstroze (medij za kultivacijo kvasovk)
σ	standardni odklon

1 UVOD

Alkoholna fermentacija je pretvorba grozdnega sladkorja v alkohol in ogljikov dioksid. Spontana alkoholna fermentacija je okarakterizirana s časovnim zaporedjem prisotnosti različnih vrst in sevov kvasovk. V optimalnih razmerah je rezultat mešane avtohtone populacije lahko zelo kompleksno vino z izrazito sadnim značajem, polnim, zaokroženim in harmoničnim okusom. Ker se v večini primerov na žalost pojavljajo problemi med spontano fermentacijo (povečana koncentracija očetne kisline, etilnih estrov očetne kisline, priokusi, prekinitev in/ali zaustavitev fermentacije), se močno priporoča dodatek čiste kulture kvasovk. Velika večina vinarjev uporablja za fermentacijo belih in rdečih moštov komercialne starterske kulture, ki so selekcionirane glede na štiri osnovne kriterije: fermentacijske lastnosti, senzorične oz. aromatične značilnosti, tehnološke lastnosti in metabolne lastnosti z zdravstvenega stališča.

Aromatične snovi zaradi svojega vpliva na naše čutilne organe igrajo pomembno vlogo v kakovosti živil. Kot pri večini živil je tudi za aromo vina odgovornih več kot 800 različnih hlapnih snovi, ki vplivajo na naše senzorične organe. Koncentracija vseh aromatičnih snovi v vinu je približno 0,8-1,2 g/L, kar je enako približno 1 % koncentracije etanola. Višji alkoholi, ki nastajajo med alkoholno fermentacijo, predstavljajo 50 % te vrednosti. Ostale aromatične komponente so zastopane v koncentracijah med 10^{-4} in 10^{-9} g/L.

Pomemben del vinske arome se oblikuje med alkoholno fermentacijo. Poleg etanola, glicerola, diolov in višjih alkoholov, se pod vplivom kvasovk tvorijo še druge spojine, predvsem kisline, estri, aldehidi, ketoni in žveplove spojine (Košmerl, 2007).

Predvsem zaradi pomembnosti izbire kvasovk glede na želen končni produkt z ozirom na sam potek fermentacije in aromatiko smo opravili raziskavo na alkoholni fermentaciji bele vinske sorte laški rizling, ki velja za eno od najbolj zastopanih vin vinorodne dežele Podravje. Poznavanje vpliva posameznega seva kvasovk na potek fermentacije in na izoblikovanje specifičnih lastnosti vina je ključnega pomena pri pridelavi kakovostnega vina.

1.1 NAMEN DELA

Vinske kvasovke, ki so najpomembnejše od mikroorganizmov, prisotnih pri alkoholni fermentaciji, vodijo in zaključijo proces fermentacije ter tako pomembno vplivajo na specifične lastnosti vina. Igrajo pomembno vlogo tudi pri oblikovanju aromatičnih lastnosti vina, zato je za želeno kakovost vina izbor primerne seve kvasovk izrednega pomena.

Z inokulacijo različnih sevov komercialnih vinskih kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* v mošt sorte laški rizling smo želeli ugotoviti, kako bo posamezen sev vplival na potek, trajanje in dokončanje alkoholne fermentacije z ozirom na kinetiko rasti kulture. Prav tako pa smo želeli preveriti tudi vpliv posameznega seva kvasovk na končno izoblikovanje sortne in fermentacijske arome vina. Te ugotovitve pa smo skušali podkrepiti tudi s kvantitativnimi fizikalnokemijskimi, mikrobiološkimi in senzoričnimi analizami.

1.2. DELOVNE HIPOTEZE

V okviru uporabljenih štirih različnih sevov kvasovk pričakujemo razlike v kinetiki alkoholne fermentacije in sicer v začetku, trajanju faze prilagajanja kvasovk ter v poteku in dokončanju alkoholne fermentacije. Pričakujemo tudi razlike v fizikalnokemijskih parametrih in senzorični kakovosti pridelanih vin ter predvidevamo, da se bodo uporabljeni sevi kvasovk najbolj značilno razlikovali v tvorbi hlapnih aromatičnih snovi, kot pomembnih predstavnikov fermentacijske arome mladih vin, ki se dopolnjuje s sortno aromatiko.

2 PREGLED OBJAV

2.1 AMPELOGRAFSKI OPIS SORTE LAŠKI RIZLING

2.1.1 Sinonimi (Nemanič, 1996)

Laški rizling:

- Welschriesling (Nemčija)
- Olasz Riesling (Madžarska)
- Graševina (Hrvaška)
- Riesling Italico (Italija)

2.1.2 Poreklo in razširjenost

Po Goetheju je laški rizling francoski kultivar, po vsej verjetnosti izvira iz Šampanje. Od tam so ga zanesli v Heidelberg, kjer so ga zaradi podobnosti z renskim rizlingom imenovali Welschriesling. Širil se je od Rena proti Avstriji in Madžarski. Razni avtorji iz nemško govorečih dežel navajajo, da daje ta sorta srednje kakovostna, nevtralna vina, ki naj bi bila primerna za rezanja z močnejšimi vini. Slovenske izkušnje z laškim rizlingom so dobre, zato vidimo v tej sorti več kot prijetno nevtrarno vino.

Mogoče so naše talne podnebne razmere za laški rizling ugodnejše kot v drugih vinorodnih deželah. V Sloveniji je ta kultivar sposoben izraziti sortnost z razpoznavnimi in enkratnimi značilnostmi (Nemanič, 1996).

2.1.3 Agrobiološke značilnosti

Laški rizling je pozno dozorevajoči kultivar, ki obilno rodi, ne prenese vlažnih tal niti suše. Mošt ima, odvisno od letnika, 16-22 % sladkorja in 6-12 g/L skupnih kislin. Je odlična sorta, ki daje pri manjši obremenitvi v zrelosti odlična vina posebnih lastnosti.

Zaradi velike rodnosti in poznega dozorevanja v slabih letnikih v severnih pridelovalnih območjih, daje kultivar mošte s prenizkimi vsebnostmi sladkorjev in previsoko vsebnostjo kislin. Vina so prijetno pitna, s poudarjeno cvetico in aromo. Na najboljših legah pri rezi na manjšo rodnost daje ta kultivar prav v severnih pridelovalnih območjih prečudovita, srednje težka vina, polna po okusu, z izredno lepo vkomponirano kislino in svojevrstno elegantno cvetico (Šikovec, 1996).

Pri mladih kakovostnih vinih so barve od rumenkasto-zelenkaste do zlato rumene in zlate pri vinih posebne kakovosti, pridelanih iz zrelega grozdja (Nemanič, 1996).

2.2. FIZIKALNOKEMIJSKA SESTAVA MOŠTA

Grozdni mošt je tekoč pridelek, katerega volumenski delež dejanskega alkohola je največ 1 % in je pridobljen iz grozdja brez ali s pomočjo fizikalnih postopkov (Pravilnik o pogojih..., 2004).

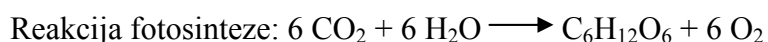
Sestava grozdnega mošta je eden izmed najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na rast in metabolizem kvasovk, s tem pa tudi na hitrost (zmanjšanje koncentracije sladkorja) alkoholne fermentacije (Košmerl, 2007a).

2.2.1. Voda

Količina vode je sortna lastnost (rodnejše sorte vsebujejo več vode) in je v moštu zastopana med 60 in 90 % (Wondra, 2007). Deluje kot topilo in kot reagent v kemijskih reakcijah v celotnem procesu pridelave od grozdja do zorenja vina (Bavčar, 2006).

2.2.2 Ogljikovi hidrati (sladkorji)

Sladkorji so produkt fotosinteze, ki poteka v vseh zelenih delih vinske trte.



So hidrofilni in zato dobro topni v vodi. Sestavljeni so iz polifunkcionalnih molekul, ki sodelujejo pri mnogih kemijskih, biokemijskih in metabolnih reakcijah ter so prekurzorske molekule nekaterih organskih kislin, fenolov in aromatskih aminokislin (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a)

Heksoze oziroma glukoza in fruktoza sta količinsko najbolj zastopana sladkorja v moštu, in sicer v koncentracijah 150-250 g/L (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a). Njuna koncentracija je odvisna predvsem od sorte, stopnje zrelosti grozdja, klime, vrste tal, zaščite pred boleznimi itd. Za dinamiko tvorbe sladkorjev v fazi dozorevanja je značilno, da na začetku prevladuje glukoza nad fruktozo v razmerju 3:1, šele proti koncu polne zrelosti se njun odnos izenači. Kvasovke hitreje razgrajujejo glukozo v primerjavi s fruktozo, zato po končani alkoholni fermentaciji ostane v mladem vinu več fruktoze (Wondra, 2007).

Pentoze (arabinoza, ksiloza, riboza) so količinsko manj zastopane v primerjavi s heksozami. Njihova vsebnost v moštu je 0,3-2 g/L (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a). Izvirajo iz trdih delov grozda, predvsem iz pečk, in jih pri predelavi grozdja precej ostane na tropinah. Njihova značilnost je, da jih kvasovke ne morejo povreti, zato tiste pentoze, ki pri predelavi preidejo v mošt, najdemo tudi v vinu. Količina pentoz v moštu je predvsem odvisna od načina predelave grozdja, saj pri višjih tlakih predelave preide v mošt večja količina pentoz (Wondra, 2007).

Eden od najpomembnejših disaharidov v moštu je saharoza, ki je sestavljena iz glukoze in fruktoze. Vsebnosti saharoze v moštu so običajno nizke (2-5 g/L), čeprav so lahko občasno lahko tudi višje. Saharoza nastaja v procesu fotosinteze v listih vinske trte in se med transportom v grozdno jagodo hidrolizira v glukozo in fruktozo, lahko pa izvira tudi iz hidrolizabilnih ogljikohidratnih rezerv iz vej vinske trte v obliki celuloze in škroba. Kvasovke jo lahko povrejo šele po hidrolizi v glukozo in fruktozo s pomočjo kvasnega encima invertaze (Ribéreau-Gayon, 2006a).

2. 2.3. Organske kisline

Med kislinami v moštu prevladujejo organske kisline, predvsem vinska in jabolčna kislina, v manjših koncentracijah pa tudi citronska kislina in aminokisline. V odvisnosti od zdravstvenega stanja grozdja so prisotne še druge kisline (galakturonska, glukonska), ki nastanejo zaradi delovanja različnih plesni, predvsem *Botrytis cinerea* (Wondra, 2007).

Vinska kislina je ena najbolj zastopanih kislin v moštu. V odvisnosti od sorte in porekla njena koncentracija niha v intervalu od 1-8 g/L. Pri okužbi grozdja s plesnijo *Botrytis cinerea* je zmanjšanje koncentracije vinske kisline dva- do 3-krat večje kot jabolčne. Med razvojem in dozorevanjem grozdne jagode prehaja vinska kislina z dotokom mineralnih snovi delno v soli vinske kisline, tako da se v polni zrelosti grozdja nahaja v prosti obliki le neznamen del vinske kisline. Najbolj zastopane soli vinske kisline so primarni kalijev tartrat in sekundarni kalcijev tartrat (Wondra, 2007).

Jabolčna kislina se v grozdju nahaja kot L-jabolčna kislina in je v fenofazi dozorevanja grozdja podvržena največjim oksidacijskim spremembam (Wondra, 2007). Grozdni sok vsebuje povprečno od 1 do 8 g/L jabolčne kisline, s tem da grozdje, pridelano v hladnih klimatskih področjih, vsebuje več jabolčne kisline kot grozdje iz toplejših področij (manj kot 2 g/L) (Fleet, 2002). V grozdju in moštu nastopa predvsem v obliki soli, predvsem kot kalijev, kalcijev in magnezijev malat. Pri normalno dozorelem grozdju je razmerje med jabolčno in vinsko kislino 1:1, v nezrelem je večji delež jabolčne, v prezrelem pa večji delež vinske kisline. V vinu je neobstoja in se pod vplivom bakterij pretvori v milejšo mlečno kislino in ogljikov dioksid, nekoliko pa zmanjšajo njeno koncentracijo tudi kvasovke (Blaškovič, 1978).

Mlečna kislina praviloma ni prisotna v moštih nepoškodovanega grozdja, lahko pa je prisotna v manjših koncentracijah kot D in L-laktat. D oblika nastane pri razgradnji ogljikovih hidratov, L oblika pa nastane pri jabolčno-mlečnokislinski fermentaciji v vinu (Blaškovič, 1978). Grozdni sok lahko vsebuje tudi do 1 g/L mlečne kisline (Fleet, 2002).

Citronska kislina je v moštu vedno prisotna, čeprav pri predelavi težko prehaja v mošt, ker je močno vezana na celično opno. V moštu je količina citronske kisline navadno 0,5-1 g/L (Ribéreau-Gayon, 2006a), pri okužbi grozdja s plesnijo *Botrytis cinerea* pa je le-ta bistveno

večja. Značilno je, da s kalijem in kalcijem tvori soli-citrate. Kemijsko je precej neobstojna, saj jo mlečnokislinske bakterije lahko razgradijo (Wondra, 2007).

Ostale kisline v moštu in vinu so še jantarna kislina, ki je produkt kvasovk in je v vinu prisotna v vsebnostih 0,2-2 g/L, piruvična kislina, ki jo vino lahko vsebuje do 0,3 g/L in fumarna kislina, ki se v vinih nahaja v zelo majhnih količinah. Glukonska kislina je produkt plesni in oetnokislinskih bakterij ter je v vinu prisotna do 1,1 g/L (Fleet, 2002). V vinu lahko najdemo še pirogrozdno, α -ketoglutarjevo in oetno kislino (Wondra, 2007).

2.2.4 Mineralne snovi

Mineralne snovi izvirajo iz zemlje in so tiste sestavine mošta ali vina, ki ostanejo po izparevanju in žarjenju v obliki pepela. V pepelu vina in mošta prevladujejo kationi nad anioni (Wondra, 2007). Kation, ki prevladuje, je kalij (0,5-2 g/L). Njegova koncentracija se poveča pri sušenem grozdju in grozdju okuženem s plesnijo *Botrytis cinerea*. Koncentracija kalija vpliva na kislinsko stabilnost in pH mošta, na njegovo barvo in na potek alkoholne fermentacije. Pomembni kationi so še kalcijevi, magnezijevi in natrijevi. Med anioni so pomembni fosfati, sulfati, kloridi, acetati, malati, laktati, tartrati, v sledovih pa še brom, jod, fluor, silicijeva in borova kislina (Batič, 2005). Koncentracija mineralov mošta je odvisna od vremenskih razmer, sorte, stopnje dozorelosti, sestave tal, gnojenja tal in načina predelave. V moštu je koncentracija mineralov 3-4 g/L, v vinu pa 1,8-2,5 g/L (Wondra, 2007). Z zakonom določena spodnja meja koncentracije mineralnih snovi v belih vinih je 1,2 g/L (Pravilnik o pogojih..., 2004).

2.2.5 Dušikove spojine

V moštu in vinu se dušikove spojine pojavljajo v obliki amonijevih (anorganskih) in organskih spojin. Amonijeve spojine (amoniak in nitrati) so potrebne za nemoteno razmnoževanje kvasovk, normalen potek alkoholne fermentacije ter za tvorbo biomase in funkcijskih encimov, ki omogočajo biokemijske spremembe med alkoholno fermentacijo (Milek, 2001). V moštu jih najdemo v koncentracijah do 300 mg/L (Bavčar, 2006). Organske dušikove spojine pa v 60-80 % zastopajo beljakovine, ki jih delimo na termolabilne albumine in termostabilne globuline. Kvasovke jih lahko uporabijo kot vir dušika le, če te razpadejo na aminokisline (Wondra, 2007). V moštu so zastopane bolj ali manj vse aminokisline. 75-85 % aminokislin v moštu predstavljajo glutamin, arginin, prolin, serin, glutaminska kislina, treonin in alanin (Taks, 2000). V fazi polne zrelosti grozdja je arginin pogosto prevladujoča aminokislina in predstavlja 6-44 % skupnega dušika grozdnega soka (Košmerl, 2007a). V hladnejših območjih je koncentracija prostih aminokislin večja, saj je zaradi nizkih temperatur zmanjšana sinteza beljakovin. Koncentracija posameznih aminokislin (aminokislinska sestava mošta) je odvisna od sorte, klime, stopnje dozorelosti grozdja, gnojenja, tehnologije predelave

in okuženosti s plesnijo *Botrytis cinerea*. Aminokislinska sestava mošta pa vpliva na rast kvasovk, potek fermentacije in tvorbo aromatičnih snovi vina (Taks, 2000).

2.2.6 Pektinske snovi

Pektinske snovi so polimeri galakturonske kisline. Posamezne molekule so med seboj povezane z α -1,4-glikozidno vezjo in so delno zaestrene z metanolom. Stopnja zaestrenosti grozdnih pektinov je precej visoka (70-80 %) (Ribéreau-Gayon, 2006b). Pektini, v katerih so molekule povsem ali delno zaestrene z metanolom, so topni, tisti v katerih so molekule povsem proste, pa so netopni. Delujejo kot zaščitni koloidi v moštu in preprečujejo samobistrenje vin. Med alkoholno fermentacijo se hidrolizirajo (odcepi se metoksilna skupina), pri čemer se poveča koncentracija metanola in število netopnih molekul pektina. V samotoku je zelo malo pektinov, katerih vsebnost pa je precej večja pri uporabi visokih tlakov za stiskanje ali zaradi slabega pecljalnika. Prevelika količina pektinov v moštu onemogoča samobistrenje (Šikovec, 1993).

2.2.7 Fenolne spojine

Fenoli so ciklične benzenove spojine z eno ali več hidroksilnimi skupinami. Izhajajo predvsem iz grozdja, v manjši meri se med pridelavo ekstrahirajo tudi iz lesene posode (Bavčar, 2006). Imajo sposobnost koagulacije beljakovin in so zato soudeleženi pri spontanem bistrenju vina. Zanje je značilno, da se hitro oksidirajo, povzročijo trpkost vina, porjavitev in motnost ter močno prizadanejo kakovost predvsem belih vin (Wondra, 2007). Delimo jih na dve osnovni skupini, flavonoide in neflavonoide (Bavčar, 2006).

Flavonoidi

Flavonoidi so tipične spojine rdečih vin in zavzemajo do 85 % vseh prisotnih fenolov, v belih pa le 20 %. Najbolj pogosti flavonoidi so:

- antociani, ki so monoglukozidi malvidina, cianidina, delfinidina, petunidina in peonidina ter njihovi pripadajoči estri, kjer je glukoza zaestrena z ocetno ali *p*-kumarno kislino,
- flavonoli, kot so kvercetin, miricetin in kamferol,
- flavan-3-oli oziroma flavanoli, kot so katehin, epikatehin in proantocianidini oziroma kondenzirani tanini

Antociani se nahajajo v kožici grozdne jagode in so predvsem odgovorni za barvo (odtenek in intenziteto) rdečih vin. V belem grozdju niso prisotni (Bavčar, 2006). Flavonoli prav tako izvirajo iz kožice grozdne jagode tako belega kot rdečega grozdja in so rumena barvila (Ribéreau-Gayon, 2006b). Flavanola, katehin in epikatehin, ki izvirata predvsem iz pečk in

pecljevine, pa se hidrolizirata v tako imenovane proantocianidine oziroma kondenzirane tanine, ki dajejo vinu grenek oziroma trpek okus (Bavčar, 2006).

Neflavonoidi

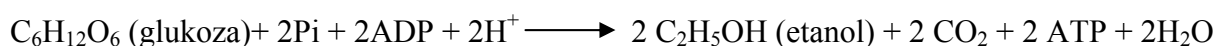
Neflavonoidi iz grozdja so derivati hidroksicimetnih in hidroksibenzojevih kislin ter stilbenov (resveratrol). Predstavljajo večino fenolnih snovi v belih vinih. Nahajajo se predvsem v celičnih vakuolah kože grozdne jagode. Najbolj zastopani so derivati hidroksicimetnih kislin, ki so vezani oziroma esterificirani na sladkorje, alkohole in kisline. Med njimi je največ estrov vinske kisline s kavno, *p*-kumarno in ferulno kislino, to so kaftarna, kutarna in fertarna kislina. Najbolj je zastopana kaftarna kislina kot ester kavne in vinske (približno 75 %). Koncentracija kaftarne kisline zelo niha, vendar je povprečno okrog 150 mg/L mošta.

Fenolne spojine so pomembne kot potencialne aromatične spojine. Nastanejo med fermentacijo pod vplivom nekaterih bakterij in kvasovk s pretvorbo estrov hidroksicimetnih kislin, predvsem estrov kumarne in ferulne kisline. Nastale aromatične spojine so vinil fenoli, to sta 4-vinil gvajakol in 4-vinil fenol, ter etil fenoli, to sta 4-etil gvajakol in 4-etil fenol. Vinu dajejo vonj po začimbah, zdravilih, dimu, fenolih, hlevu ali konjih. V večjih koncentracijah imajo negativen vpliv na kakovost vina. Čeprav tvorijo vinil fenole tudi druge kvasovke in bakterije, imajo predvsem kvasovke *Brettanomyces* sposobnost njihove redukcije v etil fenole in s tem kvarijo vino. V rdečih vinih je več etil fenolov v primerjavi z vinil fenoli, v belih pa ravno obratno.

Fenolne spojine so lahko tudi del sortne arome, na primer 2-feniletanol, vonj po cvetju, vrtnicah, ali pa izhajajo iz lesa, na primer aldehidi kot so benzaldehid, vanilin, siringaldehid (Bavčar, 2006).

2.3 ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Alkoholna fermentacija je biokemijski proces, pri katerem kvasovke razgrajujejo glukozo in fruktozo, osnovna sladkorja v grozdnem soku, po Embden-Meyerhof-Parnasovi poti glikolize, do piruvata (Graeme, 2004). Vzporedno nastaja energija v obliki ATP in se tvorijo različni intermediati (Košmerl, 2007a). V anaerobnih razmerah kvasovke dekarboksilirajo piruvat v reakciji, katalizirani z encimom piruvat dekarboksilaza, do acetaldehida in CO₂. V reakciji, katalizirani z encimom alkohol dehidrogenaza in ob uporabi reducirane koencima NADH, se acetaldehid reducira v etanol. Pretvorbo glukoze v etanol pri kvasovkah lahko ponazorimo z enačbo (Graeme, 2004):



Energijski učinek je komaj 2 molekuli ATP na molekulo glukoze. Kljub temu, da je vrsta *S. cerevisiae* sposobna energijsko učinkovitega respiratornega metabolizma, v medijih z veliko koncentracijo sladkorjev fermentira, saj je podvržena represiji z glukozo (Crabtree efekt). V alkoholni fermentaciji se pretvori v energijsko bogat ATP le 6 do 8 % energije, medtem ko mnogo le-te ostane vezane v etanolu (Povhe-Jemec, 1997).

Količina nastalega etanola, proizvedenega na enoto porabljenega sladkorja med fermentacijo, predstavlja po teoretičnih izračunih 51,1 %. Teoretično se 180 g/L sladkorja pretvori v 88 g CO₂ in 92 g etanola. Praktični izkoristek pa je le 47 %, saj se 95 % sladkorja pretvori v etanol, 1 % sladkorja se porabi za izgradnjo celičnega materiala, 4 % sladkorja pa se pretvori v druge končne oblike (metabolite). Običajne vrednosti alkohola v vinu so od 8,5-14 vol.% (Košmerl, 2007a).

Čeprav je etanol glavni produkt alkoholne fermentacije mošta, deluje inhibitorno na celice, ki ga proizvajajo in predstavlja zanje velik stresni faktor med fermentacijo. Etanol lahko prosto prehaja plazemsko membrano kvasovk in poškoduje membranske proteine, fosfolipidni dvosloj, intracelularne encime in celične strukture, posledica tega pa je povečana permeabilnost membrane in pasivni prehod protonov v celico (Berthels in sod., 2004).

Ker ima etanol nizek oksidacijsko-redukcijski potencial omejuje zlasti rast plesni in oacetnokislinskih bakterij (Košmerl, 2007).

V odvisnosti od seva kvasovk rodu *Saccharomyces* obstajajo velike razlike v kinetiki porabe sladkorja (glukoze ali fruktoze) zlasti proti koncu fermentacije, ko so celice v pozni stacionarni fazi. Poznani so tudi vplivi sorte, letnika in stopnje zrelosti grozdja na kinetiko alkoholne fermentacije in maksimalno tvorbo ogljikovega dioksida (Košmerl, 2007). Proti koncu alkoholne fermentacije je razgradnja sladkorjev inhibirana zaradi velike koncentracije nastalega etanola in sicer je razgradnja fruktoze bolj inhibirana v primerjavi z razgradnjo glukoze, predvsem zaradi prisotnih višjih alkoholov (Berthels in sod., 2004).

Tvorba glavnih hlapnih komponent med alkoholno fermentacijo je odvisna predvsem od sestave mošta, fermentacijskih razmer in inokuliranega seva kvasovk, kar potrjujejo številne raziskave (Thorhgate, 1998; Patel in Shibamoto, 2002). Pri inokulaciji istega seva kvasovk v mošče z različno sestavo (različnih sort) se tvorijo različne hlapne komponente. Čeprav številne aromatične komponente izvirajo iz grozdja, se glavne komponente, ki prispevajo k aromi belega vina, tvorijo med alkoholno fermentacijo. To so predvsem višji alkoholi, maščobne kisline, acetati, etilni estri, ketoni in aldehidi (Romano in sod., 2003).

2.4 VLOGA VINSKIH KVASOVK MED ALKOHOLNO FERMENTACIJO MOŠTA

2.4.1 Splošne značilnosti vinskih kvasovk

Kvasovke so evkariontski mikroorganizmi, netaksonomska skupina gliv, definirana z ozirom na morfološke in fiziološke značilnosti (Raspor, 1996). So drobne enocelične glive, zaradi česar imajo veliko stično površino z okoljem in zato intenzivnejšo izmenjavo snovi, se zelo hitro razmnožujejo, imajo veliko razširjenost v naravi in intenzivno presnovo, v primerjavi z istimi pojavi pri vseh drugih glivah. Celice so obdane z rigidno celično steno, ki je sestavljena

iz glukanov, mananov in proteinov, kar omogoča celicam, da preživijo v okolju s spremenjenim osmotskim tlakom. Pod celično steno je periplazemski prostor, kjer so locirani sekretorni proteini. Celična citoplazma je obdana s periplazemsko membrano, ki služi kot glavna bariera permeabilnosti. Kvasovke imajo tudi subcelularne organele, ki so značilni za višje evkariontske organizme. Prisotno je membransko jedro, endoplazmatski retikulum, golgijska telesca, mitohondriji in sekretorni vezikli. Vsebujejo tudi vakuole, ki služijo kot mesto za hidrolizo makromolekul in shranjevanje pomembnih vodotopnih snovi (Bubić, 2000).

Kvasovka vrste *Saccharomyces cerevisiae* spada v skupino *Acsomycetes*. Ta skupina ima več kot 2000 rodov. Nekateri rodovi živijo v zelo vlažnem oziroma vodnem okolju, drugi pa parazitirajo na rastlinah. Razmnožuje se s sporami (askosporami), ki so v askusih (1-4, ovalne oblike), vendar je ta način razmnoževanja industrijsko nezanimiv. Pomembnejše so vegetativne vrste razmnoževanja. Največ se razmnožujejo z brstenjem, za *Saccharomyces cerevisiae* je značilno multipolarno. V idealnih pogojih ciklus traja dve uri. *Saccharomyces cerevisiae* so ovalne oblike, na trdih gojiščih so kolonije krem barve s hrapavo površino in narezljanim robom. Asimilirajo dušikove spojine v obliki amoniaka. Rastni pogoji niso zahtevni, saj rastejo do a_w vrednosti 0,90, optimalni pH za rast je med 6 in 7, optimalna temperatura za rast pa je 28 °C oziroma za fermentacijo med 32 in 35 °C. Kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* so Crabtree pozitivne (Bizaj, 2004).

Vrsta *Saccharomyces cerevisiae* je znana kot »vinska kvasovka«. Znano je tudi, da z različnimi sevi kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* pridelamo po kakovosti zelo različna vina. Čeprav je ta vrsta prevladujoča na koncu sleherne alkoholne fermentacije, pa je na površini grozdne jagode in v moštu prisotna le v zelo majhnem številu. Prevladujejo namreč avtohtoni ali endogeni rodovi ne-*Saccharomyces* nesporogenih kvasovk, zlasti vrste *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida stellata*, *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* in *Saccharomycodes ludwigii*, ki so prisotne v začetnih fazah fermentacije in dosežejo končno koncentracijo celo 10^6 - 10^8 CFU/mL (prve tri vrste), preden odmrejo. Delež kvasovk rodov *Kloeckera* in *Torulopsis* je lahko relativno velik v primerjavi s kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae* tudi v mladem vinu po končani fermentaciji (Košmerl, 2007a).

V modernih vinskih kletih se večinoma uporablja selekcionirane seve *Saccharomyces cerevisiae*, ki so jamstvo za hitro, učinkovito in predvidljivo fermentacijo. Te dajejo skladnost okusa in vonja po zaključeni fermentaciji. Inokulum se dodaja v mošt po bistrenju in/ali žveplanju, da se zmanjša ali zavre delovanje avtohtone mikroflore. Selekcioniran sev omogoča hitro in popolno pretvorbo sladkorjev v etanol v veliko krajšem času. Opaziti je manj razlik med vini različnih letnikov in večjo skladnost v senzoričnih lastnostih določenega vina v okviru geografskega področja. Potrebno je poudariti, da uporaba inokuluma ni vedno porok za preprečitev rasti in metabolne aktivnosti endogeno prisotnih ne-*Saccharomyces* kvasovk in sevov *Saccharomyces cerevisiae*, ki so vezani na klet. Naravno prisotna mikroba

združba vinograda in vinske kleti vpliva tako na spontano kot na vodeno alkoholno fermentacijo (Pretorius, 2002).

2.4.2 Dodatek starterske kulture vinskih kvasovk

V preglednici 1 so prikazani najpomembnejši cilji selekcije vinskih kvasovk. Spontana alkoholna fermentacija je okarakterizirana s časovnim zaporedjem prisotnosti različnih vrst in sevov kvasovk. V optimalnih razmerah je rezultat mešane avtohtone populacije lahko zelo kompleksno vino z izrazito sadnim značajem, polnostjo, zaokroženostjo in harmoničnostjo v okusu. Ker se v večini primerov na žalost pojavljajo problemi med spontano fermentacijo (povečana koncentracija očetne kisline, etilnih estrov očetne kisline, priokusi, prekinitve in/ali zaustavitve fermentacije), se močno priporoča dodatek čiste kulture kvasovk (Košmerl, 2007a). Senzorične lastnosti vin, ki so pridelana z dodatkom starterskih kultur *Saccharomyces cerevisiae*, se močno razlikujejo od tistih, ki nastanejo pri alkoholni fermentaciji z avtohtono populacijo kvasovk. Različni sevi kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* lahko izoblikujejo različne aromatične lastnosti vina pri fermentaciji istega mošta. Razlog za to so različne sposobnosti sevov kvasovk pri sproščanju sortnih hlapnih komponent iz prekursorjev v grozdju in pri tvorbi novih hlapnih komponent (Fleet, 2003).

Izbira primerne seva kvasovk je torej lahko odločilnega pomena pri razvoju zelenega karakterja vina. Danes je tržno dostopnih mnogo različnih sevov starterskih kultur kvasovk, kar omogoča pridelovalcem vina večji izbor in s tem izbiro primerne seva za pridelavo vina z zelenimi senzoričnimi lastnostmi (Molina in sod., 2009).

Preglednica 1: Osnovni selekcijski kriteriji vinskih kvasovk in cilji selekcije

selekcijski kriteriji	cilji selekcije
fermentacijska sposobnost	majhna tvorba sulfida in sulfid vezujočih substanc
osmotoleranca	čim manjša tvorba hlapnih kislin in H ₂ S
odpornost na alkohol	majhna sposobnost penjenja
odpornost na sulfit	sposobnost tvorbe filma (sherry)

Preparati suhih aktivnih kvasovk vsebujejo veliko število živih celic od $1,2$ do $2,7 \cdot 10^{10}$ CFU/g, medtem ko je njihova preživelost med 40-64 %. Ni zanemarljivo dejstvo, da so prisotne tudi mlečnokislinske bakterije od $9 \cdot 10^3$ - $7,6 \cdot 10^6$ CFU/g in kvasovke rodov ne-*Saccharomyces* do $0,1 \cdot 10^6$ CFU/g. Med rehidracijo se preživelost kvasovk rodu *Saccharomyces* ne spremeni, zmanjša pa se število kvasovk rodov ne-*Saccharomyces* in bakterij; zlasti slednje nimajo nobene možnosti preživetja med fermentacijo in običajno odmrejo po štirih dneh, medtem ko kvasovke odmrejo po šestih dneh (Košmerl, 2007a).

2.4.3 Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk

Najbolj osnovne želene in neželene lastnosti vinskih kvasovk, bodisi avtohtonih bodisi selekcioniranih sevov, so prikazane v preglednici 2. Verjetno je jasno, da je vse te številne želene lastnosti skoraj nemogoče popolnoma zagotoviti. Zato se je že pred leti porodila ideja uporabe mešane kulture različnih sevov kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*, od katerih ima posamezni sev zelo različno razmerje končnih sekundarnih produktov. Tako pridelano vino je vsekakor bistveno bolj kompleksno s stališča hlapnih aromatičnih sestavin; predvsem 3-metil-butilacetata (Košmerl, 2007a). Raziskava v Avstralskem raziskovalnem inštitutu za vino (AWRI) je pokazala, da se je fermentacija z inokuliranimi mešanimi kulturami kvasovk (VIN 7/QA 23, VIN 7/VIN 13 in VIN 7/VL 3) v primerjavi s fermentacijo z inokuliranimi posameznimi sevi teh kvasovk, hitreje zaključila, tvorilo se je manj negativnih arom (hlapnih kislin), tako pridelana vina so imela večjo koncentracijo estrov (predvsem etil izovalerata in heksil acetata) in večjo kompleksnost (King in sod., 2007).

Kvasovke vplivajo na aromo vina predvsem s tvorbo različnih količin hlapnih snovi (Košmerl, 2007a). Raziskave so pokazale, da komercialni sev kvasovk VIN 13 pri fermentaciji tvori hlapne komponente z vonjem po vrtnicah, banani, ananasu in jabolku, v največjih koncentracijah pa so bili zastopani etil heksonat, etil oktanat, 3-metil butilacetat, 2-metil propanoat in 2-metilbutanoat, ki so prispevali k cvetnim in sadnim končnim aromam vina (Molina in sod., 2009). Sev kvasovk VIN 13 ima sposobnost sproščanja prekursorjev tiolov iz grozdja in ima tako povečuje obseg tvorbe arome (Swiegers in sod., 2006).

Nesmiselna je delitev sevov kvasovk na aromatične in nevtralne, kajti »aromatični« značaj kvasovk je odvisen predvsem od gojišča (mošt s svojo začetno fizikalnokemijsko sestavo) in razmer med alkoholno fermentacijo. Na aromo vina vplivajo fermentacijske lastnosti kvasovk, vendar je »aromatična kakovost« pri določenih kultivarjih vezana v glavnem na različno količino etilnih estrov, acetatnih estrov maščobnih kislin in višjih alkoholov, pri drugih kultivarjih pa predstavljajo specifične primarne aromatične snovi metoksipirazini, terpeni ali C₁₃-norizoprenoidi (Košmerl, 2007a).

Preglednica 2: Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk

želene lastnosti	neželene lastnosti
visoka odpornost na etanol	tvorba žveplovega dioksida
poraba sladkorja v celoti	tvorba vodikovega sulfida
odpornost na žveplov dioksid	tvorba hlapnih kislin
fermentacija pri nizkih temperaturah	tvorba acetaldehida in piruvata
minimalna faza prilagajanja	sposobnost penjenja
razgradnja jabolčne kisline	tvorba prekursorjev etilkarbamata
tvorba glicerola	tvorba polifenoloksidaze

2.5 STARTERSKE KULTURE VINSKIH KVASOVK

2.5.1 Osnovne lastnosti starterskih kultur vinskih kvasovk

Velika večina vinarjev uporablja za fermentacijo belih in rdečih moštov komercialne starterske kulture, ki so selekcionirane glede na štiri osnovne kriterije: fermentacijske lastnosti, tehnološke lastnosti, metabolne lastnosti ter senzorične oziroma aromatične značilnosti, kot so majhna tvorba sulfidov/DMS/tiolov, majhna tvorba hlapnih kislin, majhna tvorba višjih alkoholov, sprostitvev prekurzorjev aromatičnih snovi, velika tvorba glicerola, hidrolitska aktivnost, povečana avtoliza, prilagojena esterazna aktivnost, idr. V okviru teh kriterijev se v praksi, odvisno predvsem od fizikalno-kemijske sestave mošta, srečamo vsaj z enim od naštetih fenomenov:

- nezadostna pretvorba sladkorjev v etanol (slabši izkoristek substrata) in tvorba večjih količin sekundarnih metabolitov;
- ovirana asimilacija dušikovih spojin ali njihovo pomanjkanje;
- slabša odpornost na etanol;
- slabša odpornost na protimikrobne komponente (poleg očetne kisline in maščobnih kislin): killer toksin, SO₂, ostanki sredstev za zaščito vinske trte-zlasti baker;
- tvorba pene v začetni fazi fermentacije.

Vemo, da je alkoholna fermentacija dinamičen proces, v katerem se dogajajo številne spremembe zaradi zunanjih fizikalnih dejavnikov in biološke aktivnosti fermentirajočih organizmov. Med spreminjanjem zunanjega okolja morajo organizmi s številnimi mehanizmi vzdrževati intracelularne fizikalnokemijske parametre znotraj določenih meja, z namenom doseči optimalne razmere za svojo metabolno aktivnost in ohraneno integriteto celic. V nasprotnem primeru (ekstremne razmere ali neuspešna adaptacija) se to odraža v upočasneni rasti ali smrti celic.

Za zagotovitev celotne pretvorbe sladkorja, brez vzporedne tvorbe neželenih aromatičnih spojin (defekt), moramo zagotoviti rast in prevlado kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* (Košmerl, 2007a):

- zagotovitev anaerobnih razmer;
- uporaba SO₂ v koncentraciji 30-50 mg/L; včasih tudi pasterizacija ali po končani alkoholni fermentaciji in jabolčno-mlečnokislinski fermentaciji uporaba lizozima;
- fermentacijska temperatura med 16-20 °C; pod 14 °C je rast kvasovk rodov ne-*Saccharomyces* hitrejša, zlasti kvasovk rodu *Kloeckera* (*Hanseniaspora*), ki v primeru prevlade tvorijo velike količine očetne kisline in etilacetata;
- dodatek starterske kulture, katerih gostota naj bo 1-5·10⁶ CFU/mL;
- pretok, bistrenje in uporaba SO₂ po končani alkoholni fermentaciji;
- sterilna filtracija, protimikrobna in antioksidativna sredstva pred stekleničenjem.

2.5.2 Zahteve za industrijske starterske kulture

Osnovne zahteve, ki jih morajo izpolnjevati industrijske starterske kulture, so dokončanje fermentacije (toleranca na alkohol), toleranca na visoke sladkorne stopnje mošta, na SO₂, na visoke in nizke temperature ter na visok tlak (pri penečih vinih), tvorba majhnih količin očetne kisline, acetaldehida, H₂S, merkaptanov, diacetila, SO₂ in omejena tvorba višjih alkoholov, majhno penjenje, flokulativnost po končani alkoholni fermentaciji (izboljšanje bistrjenja) in sposobnost sušenja.

Dodatne zahteve pa so tvorba zelenih sortnih arom, razgradnja jabolčne kisline, tvorba glicerola, β-glukozidazna aktivnost, zimocidna (killer) aktivnost, majhno izločanje uree, aglomeracija, tvorba estrov, proteazna aktivnost in tvorba inhibitornih snovi za druge kvarljive mikroorganizme.

Sestava rodov ali vrst kvasovk v starterski kulturi:

Danes vsebuje starterska kultura en sam sev vrste *Saccharomyces cerevisiae*, v bližnji prihodnosti pa jo bo sestavljala kombinacija različnih sevov iste vrste *Saccharomyces cerevisiae* ali kombinacija vrst *Saccharomyces cerevisiae* in rodov ne-*Saccharomyces*.

Priprava zdrave starterske kulture:

Pri pripravi zdrave starterske kulture moramo slediti navodilom proizvajalca za rehidracijo kvasovk. V inokulumu mora biti vsaj 2-5 milijonov aktivnih kvasnih celic v 1 mL, kar odgovarja 1-3 vol.% inokuluma. V odvisnosti od mošta je potreben dodatek 15-40 g/hL suhih kvasovk. V primeru slabšega zdravstvenega stanja grozdja (gniloba) potrebujemo večji inokulum med 20-40 g/hL. V belih moštih iz zdravega grozdja in opravljenem bistenju je običajni dodatek inokuluma med 15-25 g/hL.

Faza rehidracije:

Temperatura vode, v kateri rehidriramo startersko kulturo kvasovk, mora biti med 35 in 40 °C in ne sme biti klorirana. V prvi fazi rehidracije ne dodajamo v vodo niti sladkorja niti mošta, saj osmotski stres povzroči le manjšo živost kvasne populacije. Zmes previdno premešamo in pustimo nabrekati 20-30 minut (Košmerl, 2007a).

2.6 AROMATIČNE SNOVI V VINU

Aroma je zelo pomembna komponenta senzorične kakovosti vina. Koncentracija vseh aromatičnih snovi v vinu je približno 0,8-1,2 g/L, kar je enako približno 1 % koncentracije etanola. Večina teh komponent nastane med alkoholno fermentacijo mošta in odločilno vplivajo na aromo mladih vin. Več kot polovico hlapnih komponent predstavljajo očetna kislina, acetaldehid, etil acetat, propanol, izobutanol, izoamilalkohol in n-amilalkohol, drugo polovico pa predstavlja 600-800 drugih hlapnih komponent, ki so prisotne v zelo majhnih koncentracijah - med 10⁻⁴ in 10⁻⁹ g/L (acetali, organske kisline, alkoholi, fenoli, heterociklične

komponente, estri, laktoni, terpeni in dušik-vsebujoče komponente) (Košmerl, 2007b; Regodón Mateos in sod., 2006).

Prag zaznavanja določene aromatične spojine je tista najmanjša koncentracija, pri kateri je prišlo do odziva čutilnega organa. Le-ta se zelo razlikuje med posameznimi spojinami in niha med 10^{-4} in 10^{-12} g/L.

Med alkoholno fermentacijo nastajajo poleg zelenih tudi neželene aromatične snovi: aldehidi, hlapne organske žveplove spojine, vodikov disulfid, tioalkoholi, tioetri in tiolani, vendar v izredno majhnih koncentracijah, manj kot 1 mg/L.

Pri klasifikaciji aromatičnih komponent vina razlikujemo med:

- *primarno* ali *grozdno aromo*: spojine, kot jih najdemo v nepoškodovani grozdni jagodi;
- *sekundarno aromo*: aromatične spojine, ki se oblikujejo med predelavo grozdja (pecljanje, drozganje, maceracija, stiskanje), kjer potekajo kemijske in encimske reakcije;
- *fermentacijsko aromo*: aromatične spojine, ki se oblikujejo med alkoholno fermentacijo;
- *zorilno aromo*: nastala zaradi kemijskih reakcij med zorenjem vina v steklenici.

Koncentracija aromatičnih snovi v vinu je odvisna od večih dejavnikov, ki so: okolje (klima in zemlja), sorta grozdja, stopnja zrelosti, fermentacijske razmere (pH, temperatura, raznovrstnost kvasovk), postopki predelave grozdja (enološke metode) in zorenje ter staranje vina (zorenje v steklenici).

Aromatične snovi vina zaznamo na dva načina (Košmerl, 2007b):

- *neposredno* z vohanjem, kar imenujemo vinsko cvetico ali »buket«;
- *posredno* z okušanjem, ko se zaradi višje temperature in mehničnega učinka v ustih sprostito manj hlapne snovi vina in prehajajo retronazalno v nos do rumene pege v možganih, receptorja z veliko občutljivostjo na vonj. Skupek obeh vtisov imenujemo aromo vina.

2.6.1 Primarna aroma vina

Nosilci primarne sortne arome so lipidne terpenske snovi, ki so pri večini sort porazdeljene v jagodni kožici in oprhu ter se oblikujejo v zadnji fazi dozorevanja grozdja. Znanih je že preko 50 teh snovi. Naj omenim le nekatere: terpenol, ki diši po bezgu, nerol, geraniol, linelool, citronelol po muškatu, n-heksilacetat in ester oktanojske kisline, ki daje značilen vonj pinota, terpendiol in hortinelol sta značilna za renski rizling ipd.. Koncentracija teh snovi v grozdju je odvisna od geoklimatskih pogojev, zrelosti grozdja in agrotehničnih ukrepov v vinogradu.

Kvasovke rodu *Saccharomyces* ne razgrajujejo terpenskih snovi, tako, da se med pravilno vodenim alkoholnim vrenjem te ne izgubljajo.

Kakovostno vino mora imeti poudarjeno sortno aromo, ki ni odvisna samo od porekla, sorte, stopnje zrelosti in zdravstvenega stanja grozdja, ampak tudi v veliki meri od vrelnofizioloških lastnosti kvasovk, ki opravljajo alkoholno vrenje (Wondra, 1998).

Preglednica 3: Senzorične lastnosti monoterpenov in njihov senzorični prag zaznave (Košmerl, 2007a)

monoterpen	aroma	senzorični prag (µg/L)
geraniol	cvetlična, po vrtnici, po citrusih	132
citronelol	prijetno dišeča, po vrtnicah, po citrusih	100
linalool	cvetlična, sveža, po koriandru	100
nerol	cvetlična, sveža, po zelenem	400
α -terpineol	po španskem bezgu	460

2.6.2 Fermentacijska aroma

Pomemben del vinske arome se oblikuje med alkoholno fermentacijo. Poleg etanola, glicerola, diolov in višjih alkoholov, se pod vplivom kvasovk tvorijo še druge spojine, predvsem kisline, estri, aldehydi, ketoni in žveplove spojine.

Na aromo, ki nastaja med alkoholno fermentacijo, vpliva več dejavnikov. Ob vrsti kvasovk, ki je sicer zelo pomembna pri nastanku spojin med fermentacijo, so pomembne tudi fermentacijske razmere: temperatura, koncentracija kisika oziroma vrednost rH, koncentracija ogljikovega dioksida ter sestava mošta (pH, koncentracija skupnega dušika in sestava aminokislin). Selekcijo kvasovk so razvijali v smeri nastanka čim manjših koncentracij hlapnih kislin, predvsem očetne kisline, aldehydov in vodikovega sulfida, torej za kakovost vina čim manj negativnih snovi ter hlapnih kislinskih estrov, ki zmanjšujejo kakovost vina. Sevi kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* na splošno dajejo boljšo kakovost vina kot kvasovke vrste *S. uvarum*, *S. bayanus* in *S. chevalieri*. Pomemben vpliv na fermentacijo ima tudi aminokislinska sestava mošta. Aminokisline imajo pomemben delež pri direktni asimilaciji dušika, so pa tudi prekursorji pri sintezi nekaterih hlapnih snovi, predvsem višjih alkoholov pri alkoholni fermentaciji. Aminokisline predstavljajo od 60 do 90 % vsega dušika v grozdnem soku. Najbolj zastopane aminokisline v grozdnem soku so: prolin, arginin, glutamin, alanin, glutaminska kislina, treonin, serin in α -aminobutanojska kislina, ki predstavljajo okrog 80-90 % vseh aminokislin v grozdju. Različnost sestave aminokislin je odvisna od sorte (kultivarja), letnika, intenzivnosti pridelka, načina gnojenja, sestave in obdelave tal, dozorelosti in zdravstvenega stanja grozdja ter mikroklimatskih razmer. Koncentracija aminokislin narašča z dozorevanjem (Košmerl, 2007a).

2.6.2.1 Aldehidi

Večina aldehydov nastane v začetni fazi alkoholne fermentacije, verjetno z oksidacijo alkoholov, zaradi neugodnih razmer, dolgega čakanja na začetek fermentacije oziroma pri slabi tehnologiji zaradi dostopa zraka ali kot posledica delovanja oksidativnih kvasovk (Košmerl, 2007a).

Acetaldehyd je glavni aldehyd v vinu. V organizmu kvasovke se tvori iz piruvata, ki nastaja v glikolizi in se izloči v vino, če v začetni fazi alkoholne fermentacije kvasovke še nimajo na voljo dovolj encima alkohol dehidrogenaze, ki reducira acetaldehyd do etanola in jim ta uide skozi celično steno. Nastaja pa lahko tudi po končani fermentaciji s kemično in mikrobiološko oksidacijo etanola v acetaldehyd, med zorenjem in skladiščenjem vina. Večje koncentracije acetaldehyda so lahko posledica slabše kakovosti grozdja, slabše zaščite vina pred oksidacijo med postopkom predelave grozdja, pridelave vina in med zorenjem vina. Čim krajša je predfermentacijska faza in pravočasno prvo pretakanje vina, manjši je nastanek stranskih produktov alkoholne fermentacije, zlasti acetaldehyda, saj s tem preprečimo oksidacijo etanola v acetaldehyd. Na tvorbo acetaldehyda vpliva tudi temperatura fermentacije, višja je, burnejša je fermentacija in s tem več molekul acetaldehyda uide skozi celično steno kvasovk, preden se uspejo reducirati v etanol. Pri sekundarni fermentaciji se koncentracija acetaldehyda še poveča (Košmerl, 2007a). Velike koncentracije acetaldehyda negativno vplivajo na kakovost vina (Regodón Mateos in sod., 2006). Večje koncentracije acetaldehyda kažejo na večje potrebe po žveplovem dioksidu, da lahko vino ohrani sortno značilnost. Za nevtralizacijo 1 mg acetaldehyda v vinu je potrebno 1,45 mg žveplovega dioksida (Košmerl, 2007a).

2.6.2.2 Višji alkoholi

Višji alkoholi, maščobne kisline in estri so najpomembnejše spojine, ki nastanejo z delovanjem kvasovk med alkoholno fermentacijo in zato predstavljajo fermentacijsko aromo. Količinsko prevladujejo višji alkoholi, številčno pa estri. Tvorba n-propanola, 2-metil-1-propanola, 3-metil-1-butanola in 2-metil-1-butanola je podobna tvorbi etanola. Nastanek višjih alkoholov je rezultat dekarboksilacije in redukcije ustreznih α -keto kislin, ki so produkt preoblikovanja aminokislin po Ehrlichovi poti ali razgradnje ogljikovih hidratov. Manj jih nastane po Ehrlichovi poti kot iz ogljikovih hidratov. Količina nastalega metanola v vinu je konstantna med celotno alkoholno fermentacijo, saj je vsebnost metanola odvisna od aktivnosti encima pektinmetilesteraze, ki odcepi zaestrene metilne skupine na poligalakturonskih verigah pektina in tako doseže maksimalno količino že pred začetkom alkoholne fermentacije. Encimska aktivnost je največja med zorenjem grozdja in se nadaljuje pri podaljšani maceraciji (Košmerl, 2007a).

Preglednica 4: Tvorba nekaterih višjih alkoholov iz odgovarjajočih aminokislin in njihove koncentracije v vinu (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a)

višji alkohol	aminokislina	koncentracija (mg/L)
3-metil-1-butanol (izoamilalkohol)	levcin	80-300
2-metil-1-butanol (n-amilalkohol)	izolevcin	30-100
2-metil-1-propanol (izobutanol)	valin	50-150
2-feniletanol	fenilalanin	10-100
tirozol	tirozin	20-50
γ -butirolakton	glutaminska kislina	0-5
metionol	metionin	0-5

Skupna koncentracija višjih aljkoholov v vinu se giblje v povprečju v mejah od 140 do 420 mg/L (Košmerl, 2007a).

2.6.2.3 Hlapne kisline

Hlapne kisline so predvsem očetna, propanojska, butanojska in mlečna. V vinu jih je relativno malo, da bi prispevale k vonju vina. Z izjemo očetne kisline dosežejo druge hlapne kisline navadno komaj prag zaznave. Po pravilniku o kakovosti vina (Pravilnik o pogojih..., 2004) sme grozdni mošt vsebovati do 1 g/L hlapnih kislin, izraženih kot očetna kislina. Višje maščobne kisline so heksanojska, oktanojska in dekanoska kislina, njihova koncentracija med alkoholno fermentacijo narašča, medtem ko se koncentracija heksadekanojske in oktadekanojske kisline med fermentacijo zmanjšuje (Košmerl, 2007a).

2.6.2.4 Estri

Etilni estri maščobnih kislin in acetati višjih alkoholov so prevladujoči estri v vinu in jih tvorijo kvasovke med alkoholno fermentacijo v encimsko vodeni reakciji med alkoholi in kislinami (Swiegers in sod., 2005). Kvasovke tvorijo acetate na enak način kot maščobne kisline. Maščobne kisline se v večjih količinah tvorijo med alkoholno fermentacijo, pred tvorbo ustreznih etilnih estrov. Etilni estri maščobnih kislin narastejo šele pri dovolj visoki koncentraciji etanola. Končna količina maščobnih kislin je dosežena pred koncem tvorbe etanola. Tvorba acetatov prav tako narašča med fermentacijo (Košmerl, 2007a). Etilni in acetatni estri prispevajo k sadnim in cvetnim aromam vina, z vonjem po banani, zelenih jabolkih, rožah in parfumu (Swiegers in sod., 2005). Na senzorično kakovost vin pomembno vpliva tudi razmerje med estri in višjimi alkoholi (Mateo in sod., 2001).

2.6.2.5 Žveplove spojine

Hlapne organske žveplove spojine, ki nastajajo med alkoholno fermentacijo, so drugotnega pomena za cvetico vina, ker nastajajo v majhnih koncentracijah. Imele bi negativen vpliv na

kakovost (Košmerl, 2007a). Ena najbolj znanih hlapnih spojin z žveplom je vodikov sulfid ali žveplovodik (bekser). V koncentracijah nad zaznavo, ki je relativno nizka, 50-80 µg/L, je njegov vonj neprijeten in spominja na gnilo jajce (Bavčar, 2006). Zraven tioetrov kot sta dimetil sulfid in dietil sulfid so v nekaterih vinih našli tudi manj hlapne žveplove spojine. Najvišjo koncentracijo teh komponent je imel tioeter-alkohol 3-(metiltio)-1-propanol (metionol). Glavno vlogo pri tvorbi teh spojin ima prav tako metabolizem kvasovk. Nastanek številnih drugih žveplovih spojin med alkoholno fermentacijo je podoben nastanku etanola. Med drugimi so te spojine poleg metionola, še N-[3-(metiltio)-propil]-acetamid in 2-metil-tiolan-3-ol (Košmerl, 2007a).

2.6.2.6 Fenolne spojine

Fenolne spojine, kot hlapne spojine v vinu, niso prisotne v grozdju, razen acetovanilina. Tvorijo jih kvasovke, bakterije ali pa nastajajo s hidrolizo višjih fenolov. Npr. hlapna fenola: 4-vinilgvajakol in 4-vinilfenol nastajata iz dveh hidroksicimetnih kislin, *p*-kumarne ali ferulne kisline z encimsko ali termično dekarboksilacijo. Hlapni fenoli zelo vplivajo na aromo vina (Košmerl, 2007a).

2.6.2.7 Dušikove spojine

Hlapne dušikove spojine so tudi proizvod metabolizma kvasovk. V rdečih muškatnih vinih so jih določili v naslednjih mejah: 1-23 mg N-2-feniletal-acetamida/L in 15-72 mg N-3-metil-butal-acetamida/L (Košmerl, 2007a).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

3.1.1 Mošt

V poskusu smo uporabili mošt bele sorte laški rizling, letnik 2008, iz vinorodnega okoliša Podravje, pridelovalca Brumec.

3.1.2 Kvasovke

V poskusu smo za inokulacijo mošta uporabili štiri seve komercialnih kvasovk za bela vina: UVAFERM CS-2, proizvajalca DANSTAR FERMENT AG, in LALVIN QA 23, proizvajalca Lalvin, ki sta selekcionirani kvasovki ter VIN 7 in VIN 13, proizvajalca Anchor Bio-technologies, ki sta naravna hibrida.

- UVAFERM CS-2 (Lallemand, 2008), selekcionirana na inštitutu Alzas INRA Colmar, Francija,
 - intenzivira svežino pri belih vinih s tem, da jim daje živahnost,
 - umirjeno vrenje, pri temperaturi 13 °C,
 - za ta sev so zelo značilne citrus arome,
 - tipičen sev za sauvignon, tipična aroma sorte sauvignon (merkaptopentanon),
 - odlična za sorti laški rizling, malvazija.
- LALVIN QA 23 (Lallemand, 2008), selekcionirana na inštitutu UTAD, Portugalska,
 - ena od najbolj popularnih kvasovk za bela vina,
 - daje izrazito sadna, odprta, sveža vina,
 - zelo zanesljiva, ni zahtevna pri hrani, lahko vre pri nizkih temperaturah, odporna na alkohol do 16 vol.%,
 - za vse bele sorte grozdja.
- VIN 7 (Lallemand, 2008), naravni hibrid, selekcionirana na inštitutu ARC, Nietvoorbij, Stellenbosch, Južna Afrika,
 - idealna za pridelavo belih aromatičnih vin, še posebej za sorti sauvignon, malvazija,
 - zelo močno vre, tudi pri nizkih temperaturah, ne potrebuje hrane,
 - možnost nastajanja hlapnih kislin, ki se na organoleptiki ne poznajo.
- VIN 13 (Lallemand, 2008), hibrid, selekcionirana na inštitutu Stellenbosch, Južna Afrika,
 - tvori tiole in estre: sadno-cvetne arome,
 - odlična v pridelavi vseh visoko kakovostnih belih vin.

Preglednica 5 prikazuje oznake vzorcev, v katere smo inokulirali posamezne starterske kulture kvasovk oziroma kombinacije le-teh ter količino njihovega dodatka.

Preglednica 5: Oznaka vzorcev, njihovo komercialno ime in količina dodatka

oznaka vzorca	komercialno ime starterke kulture kvasovk	količina dodatka (g/hL)
1	LALVIN QA 23	20
2	VIN 7	20
3	LALVIN QA 23 + VIN 7	10 + 10
4	VIN 13	20
5	UVAFERM CS-2	20

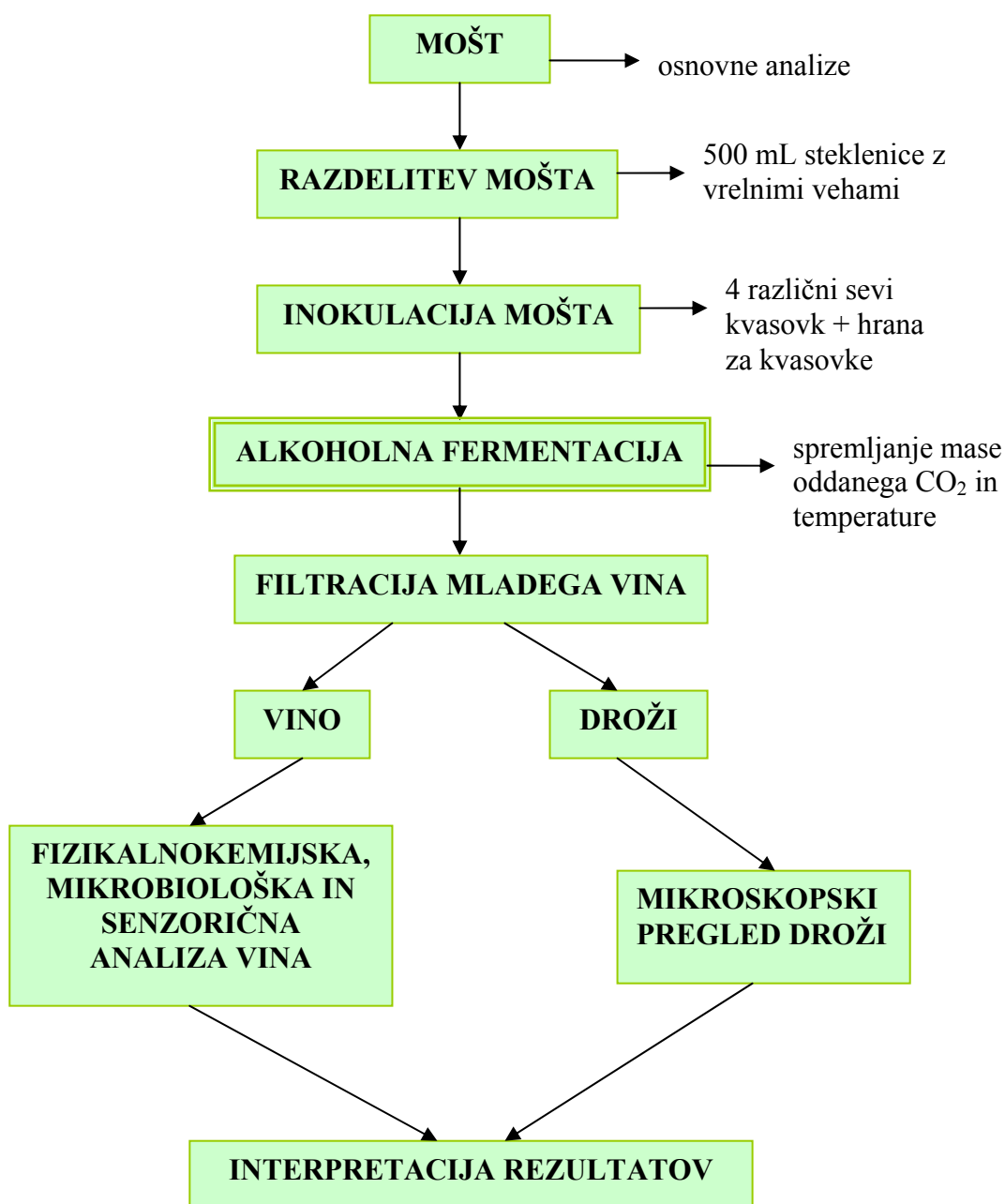
3.1.3 Hrana za kvasovke

V času alkoholne fermentacije je potrebno kvasovke prehraniti z vsemi potrebnimi hranilnimi snovmi, ki so kvasovkam potrebne za njihovo normalno presnovo (Lallemand, 2008), zato smo v poskusu uporabili naslednjo hrano za kvasovke proizvajalca DANSTAR FERMENT AG:

GO-FERM (Lallemand, 2008)

- inaktivirane kvasovke, obogatene s steroli, nenasičenimi maščobnimi kislinami, mikroelementi in vitamini,
- poveča odpornost kvasovk na vse neugodne razmere v moštu - osmotski tlak, odpornost na alkohol, na hitro spremembo temperature,
- boljše preživetje kvasovk, boljše sposobnosti vrenja,
- manj nezaželenih spojin, manjša aktivnost divje mikroflore,
- doziranje: dodamo v vodo temperature 40-45 °C pred kvasovkami, 1,25-1,5 kg Go-ferma na 1 kg kvasovk, dobro premešamo, da se popolnoma raztopi, nato dodamo kvasovke.

3.2 ZASNOVA POSKUSA



Slika 1: Shematski prikaz poteka poskusa

3.3 METODE DELA

3.3.1 Nastavitev fermentacijskega poskusa

Mošt smo razdelili v 500 mL vrelni steklenice in jim dodali starterske kulture kvasovk s hrano (GO-FERM), ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalca (DANSTAR FERMENT AG). Na ta način smo vsak vzorec pripravili v dveh ponovitvah, ki smo ju označili z A in B. Vrelni steklenice smo zatesnili s pomočjo gumijastih zamaškov z vrelni veho, jih pustili 24 ur na sobni temperaturi (24 °C), nato pa jih prenesli v fermentacijsko sobo, v kateri smo uravnavali temperaturo (14-15 °C) in jih dnevno tehtali do zaključka alkoholne fermentacije, ki je trajala 22 dni oziroma 29 dni pri vzorcu 5.



Slika 2: Fermentacijske steklenice 24 ur po inokulaciji



Slika 3: Fermentacijske steklenice po 150 urah alkoholne fermentacije

3.3.2 Fizikalno kemijske analize mošta in vina

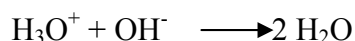
3.3.2.1 Določanje pH mošta in vina

Za določanje pH vina smo uporabili pH meter znamke METTLER TOLEDO, DL 50, Graphix, s skalo v pH enotah. Merili smo razliko v potencialu med dvema elektrodama, ki sta potopljene direktno v vzorec mošta ali vina. Ena elektroda (referenčna) ima stalen (znan) potencial, druga, steklena elektroda (merilna) pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H_3O^+ ionov v raztopini. Za merjenje smo uporabili kombinirano stekleno elektrodo znamke METTLER TOLEDO, DG 114-SC, 0-14 pH, 0-70 °C, 3M KCl (AgCl sat.) (Košmerl in Kač, 2007).

3.3.2.2 Določanje skupnih (titrabilnih) kislin v moštu in vinu

Za določanje skupnih (titrabilnih) kislin v moštu in vinu smo uporabili potenciometrično metodo (Košmerl in Kač, 2007). Pri kislinsko-bazni potenciometrični titraciji smo merili razliko v potencialu med dvema elektrodama, ki sta potopljene direktno v vzorec mošta ali vina. Ena elektroda (referenčna) ima stalen (znan) potencial, druga, steklena elektroda (merilna) pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H_3O^+ ionov v raztopini. Za merjenje smo uporabili kombinirano stekleno elektrodo (merilna in referenčna elektroda v enem kosu).

Na avtomatskem titratorju je potekla titracija z 0,10110 M raztopino NaOH do končne točke titracije pH = 7,0 oziroma pH = 8,2. Pri dodajanju baze je potekla reakcija:



Masno koncentracijo skupnih (titrabilnih) kislin (g vinske kisline/L) izračunamo po naslednjih formulah:

$$TK_1(g/L) = \frac{a_1(mL) \cdot c \cdot M(g/mol)}{v(mL) \cdot n} \quad \dots(1)$$

oziroma

$$TK_2(g/L) = \frac{a_3(mL) \cdot c \cdot M(g/mol)}{v(mL) \cdot n} \quad \dots(2)$$

$$a_3 = a_1 + a_2 \quad \dots(3)$$

Koncentracijo kislodelujočih soli pa smo izračunali po formuli:

$$\text{Kislodelujoče soli (mg/L)} = (TK_2(g/L) - TK_1(g/L)) \cdot 1000 \quad \dots(4)$$

Legenda: a_1 - volumen porabljene baze pri titraciji do pH 7,00 (mL)
 a_2 - volumen porabljene baze od pH 7,00 do pH 8,20 (mL)
 a_3 - celokupna poraba baze pri titraciji do pH 8,20 (mL)
 c - koncentracija baze (0,10110 M)
 M - molska masa vinske kisline (150,09 g/mol)
 v - volumen vzorca (25 mL)
 n - molsko razmerje kemijske reakcije med NaOH in vinsko kislino ($n = 2$)

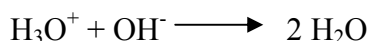
3.3.2.3 Določanje sladkorne stopnje mošta

Sladkorno stopnjo mošta smo določili z digitalnim refraktometrom znamke REF 520, 4 skale (0-35 % Brix, AP 0-22, °Oe 0-150, *KMW 0-25), proizvajalca Silverado Trading Company, Kitajska. Točnost meritve aparata je bila ± 1 °Oe (Košmerl in Kač, 2007).

3.3.2.4 Določanje pufrne kapacitete mošta

Za določanje pufrne kapacitete mošta smo uporabili potenciometrično metodo (Košmerl in Kač, 2007). Merili smo razliko v potencialu med dvema elektrodama, ki sta potopljeni direktno v vzorec mošta ali vina. Ena elektroda (referenčna) ima stalen (znan) potencial, druga, steklena elektroda (merilna) pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H_3O^+ ionov v raztopini. Uporabljali smo pH meter s skalo v pH enotah. Za merjenje smo uporabili kombinirano stekleno elektrodo (merilna in referenčna elektroda v enem kosu).

Pri dodajanju baze oziroma kisline je potekla reakcija:



Po vsakokratnem dodatku titranta smo potenciometrično določili pH.

Iz podatkov o pH in točnem volumnu dodanega titranta (kisline in baze), ki smo ga preračunali v molarno koncentracijo v mešanici, smo narisali krivuljo pufrne kapacitete, to je odvisnost pH od spremembe koncentracije baze. Nato smo izračunali enačbo premice, s katero smo določili dejansko pufrno kapaciteto vzorca, to je množino kisline oziroma baze, ki jo moramo dodati 1 L vzorca, da se njegova pH vrednost skupno spremeni za 1 pH enoto.

Iz obeh enačb premice smo določili dejansko pufrno kapaciteto vzorca:

$$\text{Dejanska PK vzorca} = \text{PK ob dodajanju kisline} + \text{PK ob dodajanju baze} \quad \dots(5)$$

$$\text{PK ob dodajanju kisline} = pH_Z - 0,5 \quad \dots(6)$$

$$PK \text{ ob dodajanju baze} = pH_Z + 0,5 \quad \dots(7)$$

Legenda: PK – pufrna kapaciteta
pH_Z – začetna pH vrednost

3.3.2.5 Določanje reducirajočih sladkorjev

Koncentracijo sladkorjev v moštu in vinu smo določili po Rebeleinu. Reducirajoči sladkorji reducirajo divalentni bakrov ion iz sulfatne raztopine v bakrov(I) oksid. Iz raztopine se izloči oborina netopnega bakrovega(I) oksida. Preostali Cu²⁺ ioni se v raztopini kalijevega jodida v kislem (dodatek žveplove(VI) kisline) reducirajo, nastali jod pa titrimetrično določimo z raztopino natrijevega tiosulfata v prisotnosti škrobovice kot indikatorja. Koncentracijo reducirajočih sladkorjev smo odčitali direktno z birete ob upoštevanju slepega vzorca (to vrednost smo odšteli od rezultata) (Košmerl in Kač, 2007).

3.3.2.6 Določanje hlapnih kislin

Hlapne kisline v vinu smo določili z destilacijsko metodo (Košmerl in Kač, 2007). Po destilaciji vzorca z vodno paro sledi titracija destilata s standardizirano vodno raztopino natrijevega hidroksida. Rezultat smo izrazili kot masno koncentracijo očetne kisline (g/L):

$$HK = a \cdot c \cdot M(g/mol) \cdot \left(\frac{50}{1000}\right) \quad \dots(8)$$

Legenda: HK - koncentracija hlapnih kislin, izraženih kot očetna kislina (g/L)
a - poraba titranta (mL)
c - koncentracija NaOH (0,099009 mol/L)
50 - razredčitveni faktor
M - molska masa očetne kisline (60,05 g/mol)

3.3.2.7 Določanje relativne gostote, ekstrakta in alkohola v vinu

Termostatiranim vzorcem vina (20 °C) smo izmerili relativno gostoto z denzimetrom znamke METTLER TOLEDO, DE 45, Density Meter. Nato smo točno določen volumen (100 mL) ponovno termostatiranega vzorca predestilirali z destilacijsko napravo znamke GIBERTINI VADE 3 v 100 mL merilno bučko. Po destilaciji smo dobljeni alkoholni destilat termostatirali in izmerili njegovo relativno gostoto z denzimetrom. Poleg relativne gostote smo odčitali tudi koncentracijo (volumski delež) alkohola.

Relativno gostoto skupnega ekstrakta vina smo izračunali s pomočjo Tabariéjevega obrazca:

$$d_{SE} = d_V - d_A + 1,0000$$

...(9)

Legenda: d_{SE} - relativna gostota skupnega ekstrakta vina
 d_V - relativna gostota vzorca vina
 d_A - relativna gostota alkoholnega destilata

Na podlagi znane relativne gostote skupnega ekstrakta vina (d_{SE}) smo iz preglednice za izračun masne koncentracije skupnega suhega ekstrakta (g/L) iz relativne gostote d_{SE} pri 20 °C odčitali masno koncentracijo skupnega ekstrakta v vinu (g skupnega ekstrakta/L vina) (Košmerl in Kač, 2007).

3.3.2.8 Določanje koncentracije organskih kislin

Koncentracijo vinske, jabolčne, citronske, mlečne in jantarne kisline smo določili z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC) (Kordiš-Krapež, 1996).

Vzorci vina smo pred analizo filtrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,2 µm in jih injicirali na kolono. Ločitev organskih kislin je potekala na ionsko izmenjevalni koloni AMINEX HPX-87 H. Ločene organske kisline smo detektirali na UV detektorju pri valovni dolžini 210 nm.

Kromatografski pogoji:

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

Za pripravo standardov smo uporabili naslednje kemikalije: vinska kislina (Merck 1.00804), jabolčna kislina (Merck 1.00382), citronska kislina (Merck 1.00244), mlečna kislina (Sigma 43H2506), jantarna kislina (Merck 1.00682).

Rezultate smo izrazili kot masno koncentracijo vinske, jabolčne, citronske, mlečne in jantarne kisline v g/L.

3.3.2.9 Določanje hlapnih spojin in višjih alkoholov

Koncentracijo višjih alkoholov v vzorcih smo določili s plinsko kromatografijo (GC) (Amerine in Ough, 1988). Vzorcem smo po destilaciji alkohola na destilacijski napravi D.E.E. Gibertini določili koncentracijo hlapnih spojin na plinskem kromatografu Hewlett Packard 5890 Series II.

Kromatografski pogoji:

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

3.3.2.10 Določanje barve vina

Obarvanost vzorcev vina smo izmerili direktno (brez razredčitve) s spektrofotometrom pred in po filtraciji vzorca skozi 0,45 µm celulozno acetatni filter firme Sartorius (Košmerl in Kač, 2007). Vzorec smo odpipetirali direktno v kvarčno kiveto in merili absorbanco pri valovni dolžini 420 in 600 nm ter absorpcijski spekter v območju valovne dolžine od 400 do 440 nm proti slepemu vzorcu (voda).

- intenziteta barve: $I = A_{420}$... (10)

3.3.3 Mikrobiološke analize vina

3.3.3.1 Določanje skupnega števila kvasovk

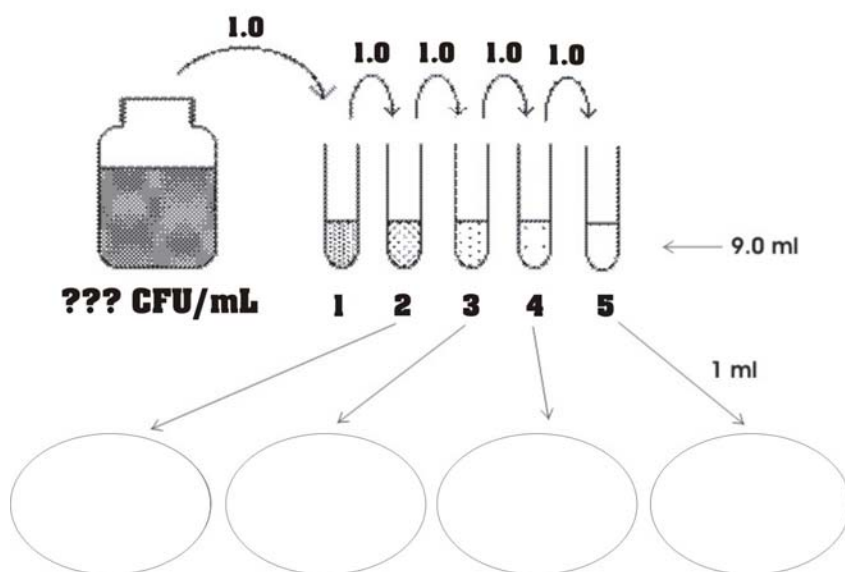
Skupno število kvasovk smo določali z nacepljanjem razredčitev vzorca vina na petrijeve plošče s hranilnim agarjem YPG (Biolife 4018382). Po inkubaciji petrijevih plošč smo prešteli kolonije in izračunali skupno število kvasovk.

- **priprava fiziološke raztopine**

Fiziološko raztopino smo pripravili po recepturi na katedri za mikrobiologijo. Po pripravi smo jo z avtomatskim pipetorjem razdelili v epruvete po 9 mL in jih avtoklavirali 20 min na 121 °C.

- **priprava vzorca**

S fiziološko raztopino smo desetkrat redčili vzorce vina. Pripravili smo razredčitve do razredčevalnega faktorja 10^{-5} , kot je prikazano na sliki 4.



Slika 4: Postopek priprave razredčitev vzorca in nacepitve določenih razredčitev na petrijeve plošče

- **priprava petrijevih plošč s hranilnim agarjem**

Hranilni agar YPG smo pripravili po recepturi ter ga ohlajenega (45 °C) razlili v prazne sterilne petrijeve plošče. Petrijeve plošče s hranilnim agarjem smo nato osušili v brezprašni komori na oddelku za mikrobiologijo.

- **nanos razredčitev vzorcev na petrijeve plošče s hranilnim agarjem**

Na tako pripravljene petrijeve plošče s hranilnim agarjem smo nanесли po 50 μL vzorca (razredčitve 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} in 10^{-5}) in ga razmazali s pomočjo steklene paličke ali hokejke. Stekleno paličko smo pred razmazom potopili v 70 % etanol, jo ožgali nad gorilnikom in ohladili na zraku.

- **inkubacija nacepljenih petrijevih plošč**

Nacepljene petrijeve plošče smo inkubirali v inkubatorju dva dni pri 30 °C.

- **štetje kolonij in določanje skupnega števila kvasovk**

Po inkubaciji smo prešteli kolonije, ki so zrasle na petrijevih ploščah. Skupno število kvasnih celic smo nato določili s pomočjo formule:

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot R} \quad \dots(11)$$

Legenda: N - število kvasnih celic v vzorcu (CFU/mL, CFU/g)
 $\sum c$ - vsota vseh kolonij na števni plošči
 n_1 - število petrijevk-gojišč pri prvi razredčitvi vzorca
 n_2 - število petrijevk-gojišč pri drugi razredčitvi vzorca
 R - prva razredčitev vzorca vina pri kateri smo prešteli kolonije

3.3.3.2 Mikroskopiranje kvasnih celic droži

Po oddelitvi vina od droži smo le-te do analize hranili v hladilniku (4 °C).

Droži smo s kapalko prenesli na objektno stekelce (eno kapljico), prekrili s krovnim stekelcem ter si tako pripravljen preparat ogledali s svetlobnim mikroskopom MOTIC BA 300 pri 400-kratni povečavi. Nato smo s pomočjo računalniškega programa MOTIC IMAGE PLUS 2.0 kvasne celice tudi fotografirali pri enaki povečavi.

3.3.3.3 Mikroskopiranje usedline vina

Po šestih mesecih hrambe vzorcev vina v hladilniku (4 °C) se je na dnu platenk (500 mL) z vzorci tvorila usedlina v obliki kristalov, ki smo si jo v obliki mikroskopskega preparata ogledali pod mikroskopom MOTIC BA 300 in jo s pomočjo računalniškega programa MOTIC IMAGE PLUS 2.0 fotografirali pri 400-kratni povečavi. Vso usedlino iz platenk smo nato prenesli na petrijeve plošče, jim s kapalko odvzeli preostanek tekočega vzorca in jih dva dni sušili na zraku pri sobni temperaturi. Suho usedlino smo fotografirali z digitalnim fotoaparatom.

3.3.4 Senzorične analize vina

3.3.4.1 Opis bistrosti mladega vina

Bistrost mladega vina v vrelnih steklenicah smo opisno ocenili takoj po zaključku alkoholne fermentacije oziroma preden smo oddelili vino od droži. Pri tem smo se osredotočili predvsem na prisotnost oziroma odsotnost motnosti ali meglice, opalescentnosti ter količino in barvo usedline (droži). Opisali smo tudi ton (odtenek ali nianso) in intenzivnost barve, ki smo ju opisali kot temnost, osenčenost, svetlost ali svetlikajočnost.

3.3.4.2 Ocenjevanje vina z deskriptivno metodo po lastni presoji

Vzorci vina smo po končanih analizah senzorično ocenili z deskriptivno metodo po lastni izbiri, pri čemer smo deskriptivno ocenili bistrost, barvo, vonj, okus in harmonijo mladega vina.

Bistrost vina smo ocenili tako, da smo nagnili kozarec proti svetlobi pod kotom 35-40° in jo opisali kot motno, z meglico, medlo, bistro, kristalno bistro in z ali brez usedline. Z nagibanjem kozarca smo ocenili tudi barvo vina, ki smo jo opisali kot rumenkasto, zeleno, slamnato, zlato ali jantarno, in intenzivnost barve z opisnimi izrazi blede, vodena, srednja ali intenzivna. Nato smo ocenili vonj vina tako, da smo vino povohali najprej v mirujočem kozarcu (pred vrtenjem), pri čemer smo bili pozorni predvsem na vrsto (hlapne aromatične sestavine) in intenzivnost (šibka, srednja ali izražena) vonjev. Zatem pa smo zavrteli kozarec, s čimer smo pospešili sproščanje aromatičnih sestavin, in vino povohali z nosom globlje v kozarcu ter primerjali vrsto in intenzivnost vonjav v primerjavi s prvo zaznavo. Sledilo je okušanje vina (zaznave v ustih), pri katerem smo okušali manjše količine (6-10 mL), s katerim smo prekrili celotno ustno votlino – površino jezika, lica in nebo. Pozorni smo bili na časovni pojav zaznav posameznega okusa (sladko, kislo, grenko), trajanje zaznave, obstojnost ali perzistenco ter na spremembe v zaznavi in intenzivnosti okusa. Temu je sledila taktilna ali tipna zaznava trpkosti (astringence), zbadanja ali pikanja (npr. CO₂), polnosti, ekstraktnosti, temperature in toplote vina. V tej fazi se je ponovno pojavila zaznava vonja vina kot posledica višje temperature v ustih, pri čemer smo bili pozorni predvsem na vrsto, razvoj in trajanje intenzivnosti vonjav v primerjavi samo z vohanjem vina. Nato smo opisali še pookus vina – to je vonj, ki ga zaznamo, če po 15-30 sekundah vdihnemo zrak v pljuča (hlape vina), popijemo ali izpljunemo požirek v pljuvalnik ter izdahnemo ogrete hlape skozi nos. Glede na splošni ali končni vtis pa smo vino opisali kot harmonično ali manj harmonično (Košmerl, 2007b).

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 REZULTATI ANALIZ MOŠTA

V spodnji preglednici so prikazani rezultati analize mošta sorte laški rizling, pridelovalca Brumec, letnik 2008, ki je bila opravljena pred pričetkom fermentacijskega poskusa.

Preglednica 6: Rezultati analize mošta

parameter	enota	vrednost
pH		3,28
titrabilne kisline (pH=7,00)	g/L	7,11
skupne kisline (pH=8,2)	g/L	7,39
kislodelujoče soli	mg/L	280
sladkorna stopnja	°Oe	83,0
kislinska PK	mmol/L/0,5 pH	24,11
bazična PK	mmol/L/0,5 pH	27,75
dejanska PK	mmol/L/pH	51,9

4.1.1 Vrednost pH

Z vrednostjo pH označujemo koncentracijo vodikovih ionov v moštu ali vinu, ki so prisotni zaradi disociacije prisotnih kislin in soli. pH mošta se giblje med 3,0 in 3,9 zaradi vsebnosti kislin (5 do 15 g/L), v glavnem jabolčne in vinske kisline in v teh mejah ne vpliva dosti na rast in preživelost kvasovk (Raspor in Šikovec, 1992).

Izmerjena vrednost pH mošta je bila 3,28 in torej ni odstopala od običajnih vrednosti.

4.1.2 Koncentracija skupnih (titrabilnih) kislin

Grozdje vsebuje velike količine različnih šibkih karboksilnih kislin. Med dozorevanjem grozdja se koncentracija kislin zmanjšuje in s tem se posledično pH zviša. Vsebnost karboksilnih kislin izražamo kot množino vinske kisline na liter mošta oziroma vina, glede na določanje (pH končne točke titracije) pa sta v uporabi izraza skupne kisline in titrabilne (titracijske) kisline. Prevladujoče organske kisline grozdnega soka in mošta so: vinska, jabolčna in citronska kislina. Skupna vsebnost karboksilnih kislin v grozdnem soku, moštu in vinu, če jo izrazimo kot g vinske kisline/L vzorca, je med 6 in 9 g/L (Košmerl in Kač, 2007). Za mošt sorte laški rizling je zgornja meja lahko nekoliko višja, v povprečju 6-12 g/L skupnih kislin.

Izmerjena vrednost titrabilnih kislin mošta je bila 7,11 g/L, izmerjena vrednost skupnih kislin mošta pa 7,39 g/L in torej ni odstopala od pričakovanih vrednosti.

4.1.3 Sladkorna stopnja

Relativna gostota je razmerje med gostoto mošta/vina pri 20 °C in gostoto vode pri enaki temperaturi. Na gostoto moštov vplivajo vse raztopljene snovi in imajo praviloma relativno gostoto večjo od 1 (Košmerl in Kač, 2007). Vsebnost sladkorjev (sladkorna stopnja) v moštu sorte laški rizling je 16-22 % (Šikovec, 1996).

Izmerjena sladkorna stopnja mošta je bila 83,0 °Oe.

Relativna gostota mošta = 1,083

Iz podatka o sladkorni stopnji mošta smo izračunali okvirno vsebnost sladkorja v moštu po formuli (Košmerl in Kač, 2007):
$$\% \text{ sladkorja} = \frac{^{\circ}\text{Oe}}{4} - 2 \quad \dots(12)$$

Okvirna vsebnost sladkorja v moštu je bila 18,8 %.

Iz izračunov je razvidno, da je imel vzorec mošta relativno gostoto in sladkorno stopnjo v predvidenih območjih.

4.1.4 Pufrna kapaciteta

Pufrno kapaciteto mošta ali vina opišemo kot lastnost mošta ali vina, da se njegov pH ob dodatku znatnih količin kislin ali baz bistveno ne spremeni. Definirana je kot množina (število molov) H_3O^+ ali OH^- ionov, ki jih moramo dodati 1 L vzorca, da se njegov pH spremeni za eno enoto. Običajno je pufrna kapaciteta od 35 do 50 mmol/L/pH, v širšem območju pa je lahko le 25 mmol/L/pH ali celo do 60 mmol/L/pH (Košmerl in Kač, 2007).

Izmerjena pufrna kapaciteta mošta:

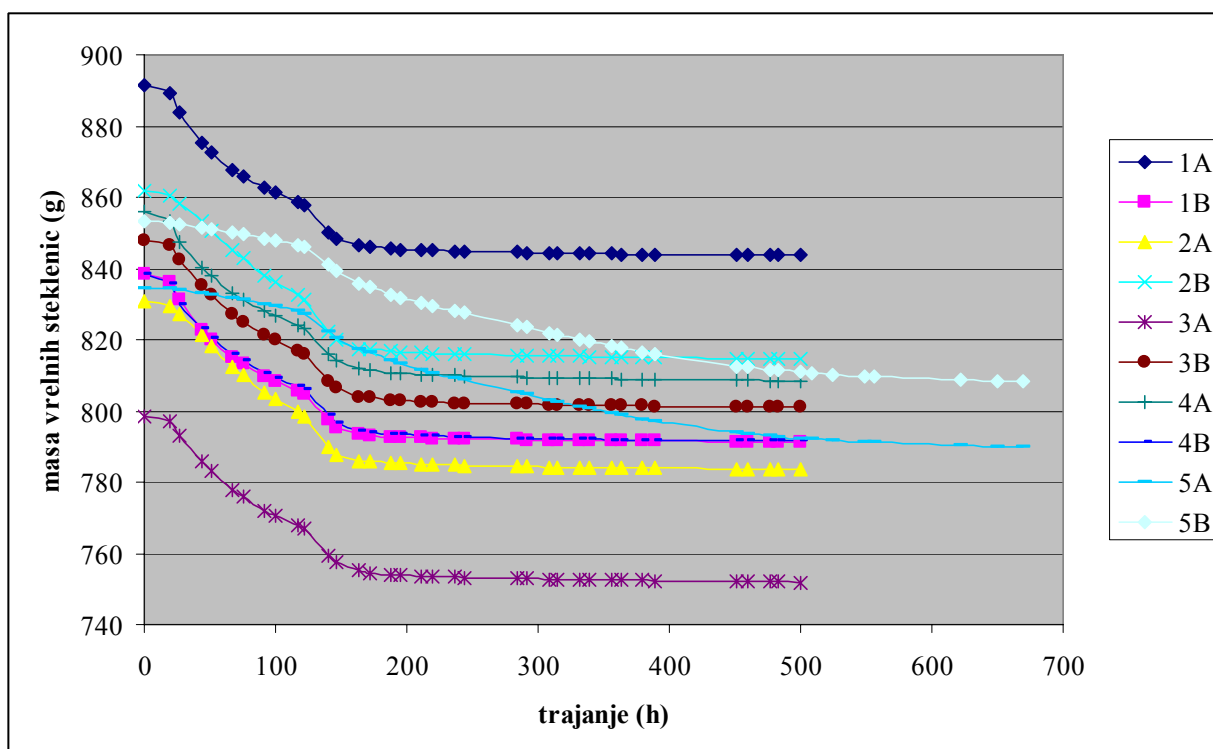
- kislinska pufrna kapaciteta = 24,11 mmol/L/0,5 pH
- bazična pufrna kapaciteta = 27,75 mmol/L/0,5 pH
- dejanska pufrna kapaciteta = 51,9 mmol/L/pH

Iz rezultata, ki je na zgornji meji pričakovanih vrednosti, lahko sklepamo na večjo koncentracijo kislin v vzorcu mošta, najverjetneje pa je tudi delež mineralnih snovi, predvsem kationov, večji.

4.2 FERMENTACIJSKE KRIVULJE

Fermentacijske steklenice so tekom alkoholne fermentacije izgubljale maso na račun oddanega CO₂, ki nastane pri pretvorbi sladkorja v etanol.

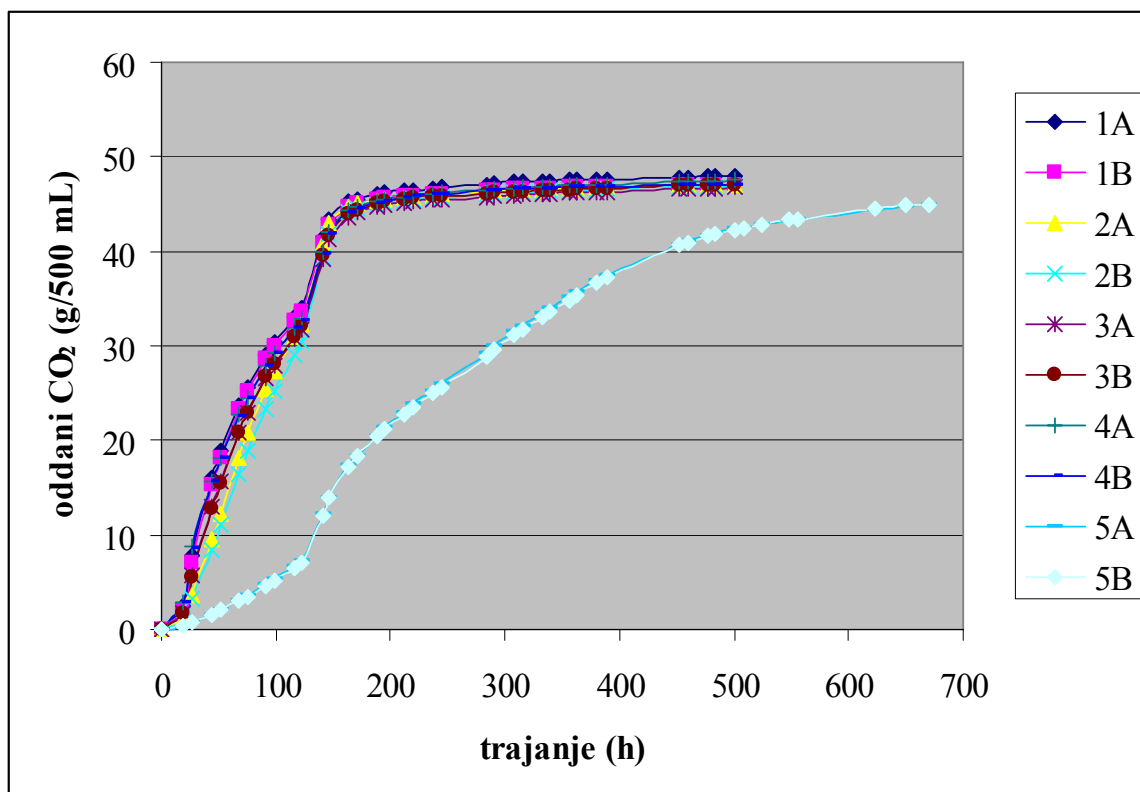
Hitrost alkoholne fermentacije in s tem količina sproščenega CO₂ je odvisna od fizikalno-kemijske sestave mošta, inokuliranega seva kvasovk in temperature, pri kateri poteka alkoholna fermentacija (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).



Slika 5: Sprememba mase vrelnih steklenic z moštom (g) v odvisnosti od trajanja fermentacije

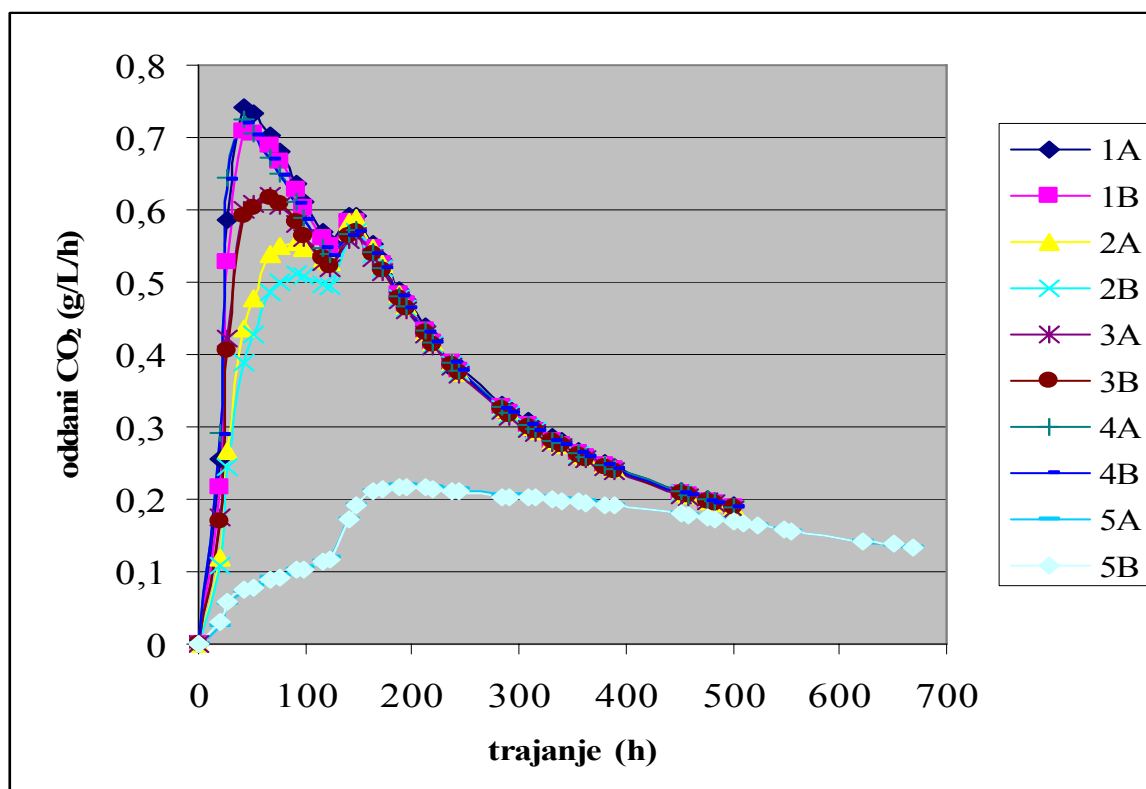
Slika 5 prikazuje izgubo mase posameznih vrelnih steklenic. Vsi vzorci, razen vzorca 5 (5A in 5B), so v prvih 164 urah eksponentno izgubljali maso, nato pa so bile izgube minimalne. Masa vzorca št. 5 se je začela zmanjševati šele po približno 123 urah. Hitrost zniževanja mase je bila veliko počasnejša in je trajala veliko dlje, kot pri ostalih štirih vzorcih, zato smo tudi podaljšali trajanje fermentacije na 670 ur.

Iz tega je razvidno, da so sevi starterskih kultur kvasovk v vzorcih 1, 2, 3 in 4 sposobni bistveno hitrejšega začetka in dokončanja alkoholne fermentacije ter imajo krajšo fazo prilagajanja.



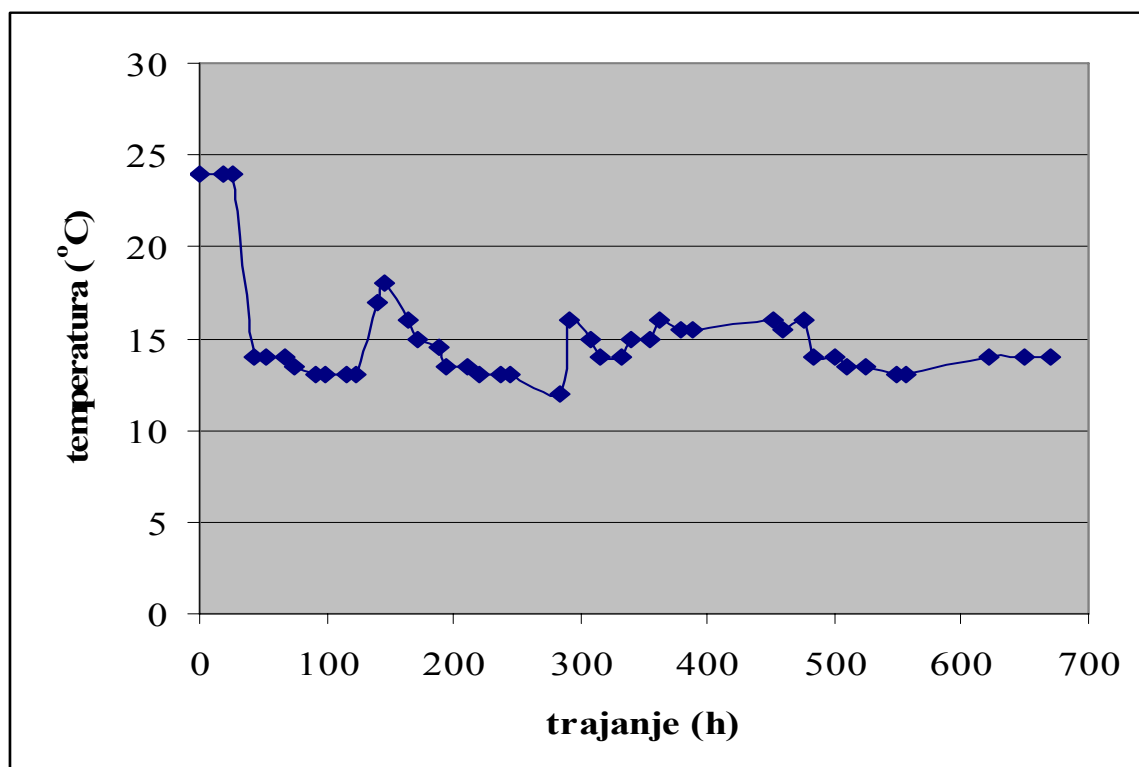
Slika 6: Odvisnost oddanega CO₂ (g/500 mL) od trajanja alkoholne fermentacije

Slika 6 prikazuje oddani CO₂ (g/500 mL) med alkoholno fermentacijo. Rezultati potrjujejo bistveno hitrejši začetek fermentacije (krajša faza prilagajanja) in intenzivnejše sproščanje CO₂ sevov kvasovk vzorcev 1, 2, 3 in 4 v primerjavi s sevom kvasovk vzorca 5.



Slika 7: Kinetika oddanega CO₂ (g/L/h) v odvisnosti od trajanja fermentacije

Slika 7 prikazuje kinetiko oddanega CO₂ (g/L/h) za posamezne vrelnе steklenice med alkoholno fermentacijo. Iz slike je razvidno, da sta vzorca 1 in 4 dosegla maksimalno sproščanje CO₂ (g/L/h) po 44 urah in sta imela v primerjavi z ostalimi vzorci tudi največjo intenzivnost sproščanja CO₂, s tem da se je pri ponovitvi 1A sprostilo nekoliko več CO₂ (0,74 g/L/h) v primerjavi s ponovitvijo 1B (0,71 g/L/h), medtem ko sta si bili ponovitvi vzorca 4 v kinetiki oddanega CO₂ enotni (0,72 g/L/h). Po približno 68 urah je dosegel maksimalno sproščanje CO₂ vzorec 3 (0,62 g/L/h pri obeh ponovitvah), po 92 urah pa vzorec 2, pri katerem pa je prav tako prišlo do manjših odstopanj med ponovitvama (0,55 g/L/h pri 2A in 0,51 g/L/h pri 2B). Veliko kasneje, po 195 urah, in v veliko manjši meri pa je dosegel maksimalno sproščanje CO₂ vzorec 5 (0,22 g/L/h).



Slika 8: Nihanje temperature (°C) med alkoholno fermentacijo

Slika 8 prikazuje nihanje temperature tekom alkoholne fermentacije, kar pojasnjuje naglo povečanje sproščanja CO₂ (kar je razvidno iz slik 5, 6 in 7) predvsem sedmi dan (pri 147 urah) alkoholne fermentacije, ko je temperatura v fermentacijski sobi dosegla 18 °C. Kvasovke pri višjih temperaturah intenzivneje fermentirajo, posledično pa se je sprostilo več CO₂. Tudi kasneje je temperatura rahlo presegla 15 °C (za +1 °C), vendar to ni imelo vpliva na količino sproščenega CO₂. Prav tako na količino sproščenega CO₂ ni vplivala nižja temperatura (12 °C) tekom alkoholne fermentacije.

4.3 REZULTATI ANALIZ MLADEGA VINA

4.3.1 Koncentracija reducirajočih sladkorjev

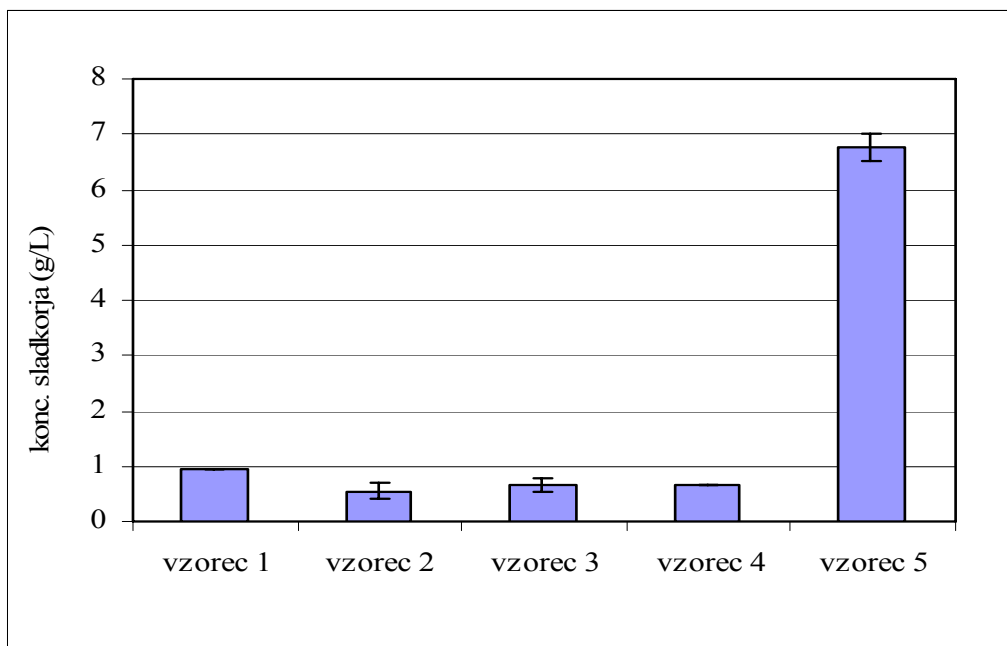
Prevladujoča sladkorja v grozdju, moštu in vinu sta glukoza in fruktoza. Manj je saharoze in ostalih sladkorjev, posebno nefermentabilnih pentoz. Med alkoholno fermentacijo poteče encimska hidroliza saharoze v glukozo in fruktozo, ki ju kvasovke lahko povrejo. Popolnoma suha vina vsebujejo približno 1 g reducirajočih sladkorjev/L. V tej koncentraciji so zajeti zlasti nefermentabilni reducirajoči sladkorji, npr. pentoze (arabinoza, ramnoza in ksiloza), medtem ko je skupna koncentracija nefermentirane glukoze in fruktoze minimalna (0,1-0,2 g/L) (Košmerl in Kač, 2007).

Glede na koncentracijo reducirajočih sladkorjev se mirna vina delijo na naslednje kategorije (Pravilnik o pogojih..., 2004; Pravilnik o spremembah..., 2005):

- suho vino, katerega koncentracija reducirajočih sladkorjev ne presega 9 g/L, pod pogojem, da koncentracija skupnih kislin, izražena v g vinske kisline/L, ni več kot 2 g pod koncentracijo reducirajočih sladkorjev;
- polsuho vino, katerega koncentracija reducirajočih sladkorjev presega največjo dovoljeno koncentracijo, določeno v prejšnji alineji, vendar ne presega 18 g/L, pod pogojem, da koncentracija skupnih kislin, izražena v gramih vinske kisline na liter, ni več kot 10 gramov pod koncentracijo reducirajočih sladkorjev;
- polsladko vino, katerega koncentracija reducirajočih sladkorjev presega največjo dovoljeno koncentracijo, določeno v prejšnji alineji, vendar ne presega 45 g/L;
- sladko vino, katerega koncentracija reducirajočih sladkorjev presega 45 g/L.

Koncentracija reducirajočih sladkorjev lahko v okviru eksperimentalne napake odstopa za $\pm 0,8$ g/L (Navodilo o..., 2001).

Po končani fermentaciji smo izmerili vsebnost reducirajočih sladkorjev v pridelanem mladem vinu. Rezultati posameznih ponovitev vzorcev so prikazani v prilogi A. Na sliki 9 pa je prikazano povprečje obeh ponovitev posameznih vzorcev ter standardni odklon (σ).



Slika 9: Vsebnost reducirajočih sladkorjev (g/L) v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk.

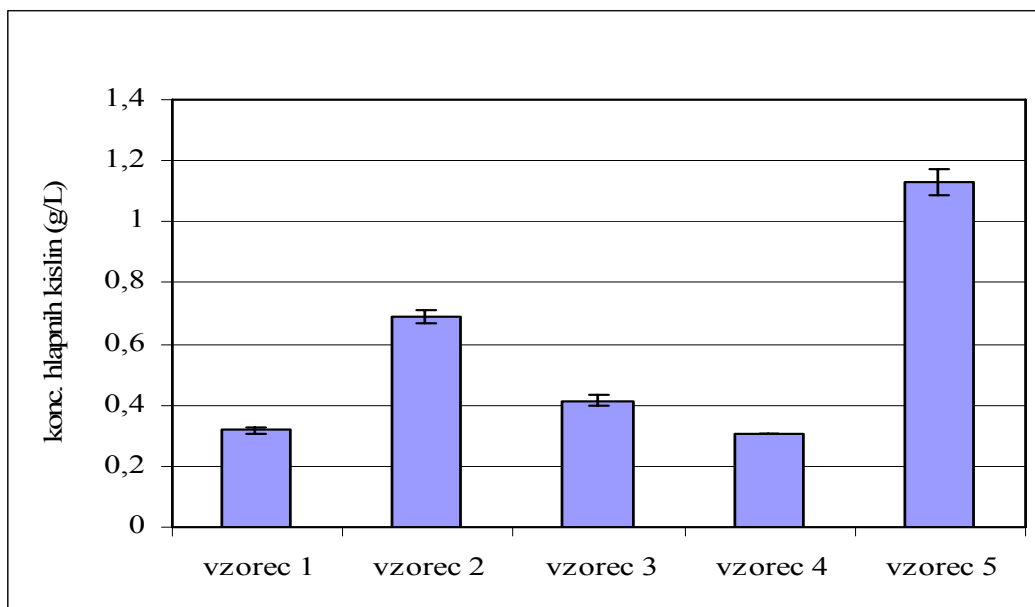
Iz slike 9 je razvidno, da je bila koncentracija reducirajočih sladkorjev daleč največja v vzorcu 5 (6,75 g/L), pri katerem smo med ponovitvama določili tudi največji σ . Pri vzorcih 2 in 3 smo določili manjši σ med ponovitvama, medtem ko med ponovitvama vzorcev 1 in 4 ni bilo σ . Vsi vzorci, razen vzorca 5, so imeli koncentracijo reducirajočih sladkorjev pod 1 g/L, zato jih lahko uvrstimo v popolnoma suha vina, sicer pa smo vse vzorce vina uvrstili v kategorijo suhih vin, saj je bila koncentracija reducirajočih sladkorjev pri vseh pod 9 g/L, obenem pa koncentracija skupnih kislin ni bila več kot 2 g pod koncentracijo reducirajočih sladkorjev. Primerljivo koncentracijo reducirajočih sladkorjev sta imela vzorca 3 in 4 (0,68 in 0,65 g/L); vzorec 2 je imel najnižjo vsebnost reducirajočih sladkorjev (0,55 g/L), vzorec 1 pa nekoliko višjo (0,95 g/L). Povišano vsebnost reducirajočih sladkorjev pri vzorcu 5 (v primerjavi z vzorci 1-4) lahko pripišemo šibkejšim fermentacijskim sposobnostim tega seva kvasovk, kar je razvidno iz fermentacijskih krivulj na slikah 5, 6 in 7, prav tako pa smo pri tem vzorcu posledično določili tudi manjšo koncentracijo alkohola, kar je razvidno iz slike 14.

4.3.2 Koncentracija hlapnih kislin

Prevladujoče hlapne kisline v vinu so mravljinčna, očetna in butanojska kislina. Manjše količine hlapnih kislin (do 0,3 g očetne kisline/L) nastanejo kot stranski produkt med čistim alkoholnim vrenjem vina s kvasovkami (brez bakterij). Pri biološkem razkisu tvorijo mlečnokislinske bakterije tudi manjše količine očetne kisline, predvsem z razgradnjo citronske kisline. Napaka in bolezen vina (očetnokislinski ton in cik) sta lahko senzorično v vonju zaznavna že pri koncentraciji okrog 0,6-0,9 g očetne kisline/L vina (Košmerl in Kač, 2007). Zakonsko dovoljena maksimalna koncentracija hlapnih kislin v belem vinu je 1 g/L

(Pravilnik o pogojih..., 2004). Koncentracija hlapnih kislin lahko v okviru eksperimentalne napake odstopa za $\pm 0,15$ g očetne kisline/L (Navodilo o..., 2001).

Po končani fermentaciji smo izmerili vsebnost hlapnih kislin v pridelanem mlademu vinu. Rezultati posameznih ponovitev vzorcev so prikazani v prilogi B. Na sliki 10 pa je prikazano povprečje obeh ponovitev posameznih vzorcev ter σ .



Slika 10: Vsebnost hlapnih kislin (g/L) v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk.

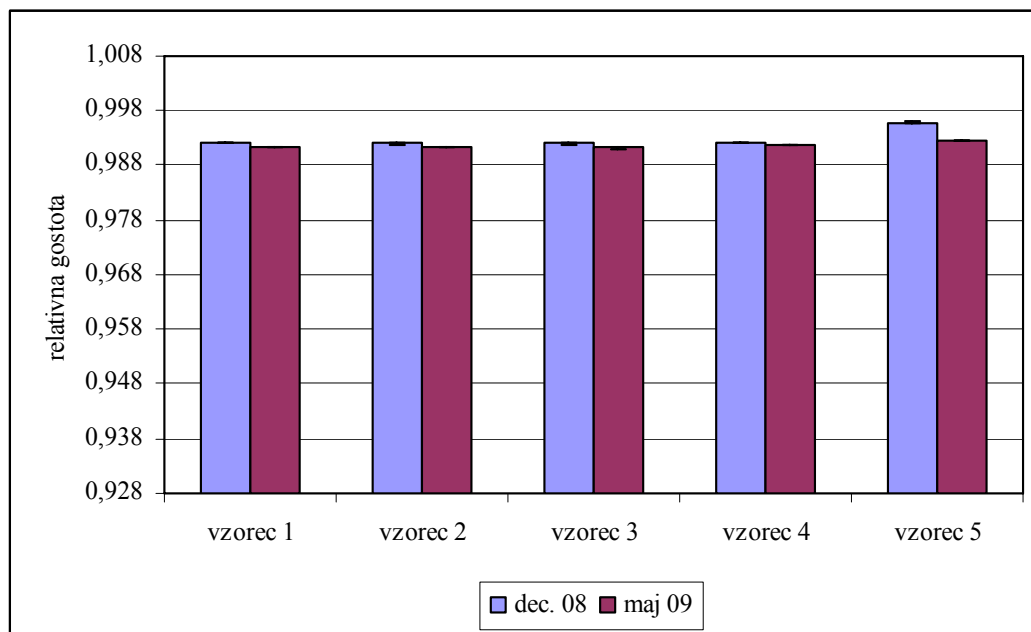
Iz slike 10 je razvidno, da je bila koncentracija hlapnih kislin največja v vzorcu 5 (1,13 g/L) in je tudi presegla največjo dovoljeno koncentracijo (1 g/L), ki jo predpisuje veljavni pravilnik (Pravilnik o pogojih..., 2004). Prav tako je bil pri vzorcu 5 med ponovitvama določen največji σ . Manjši σ med ponovitvama je bil določen pri vzorcih 2 in 3, skoraj zanemarljiv σ pri vzorcu 1, pri vzorcu 4 pa med ponovitvama ni bilo σ . Koncentracija hlapnih kislin je bila primerljiva in tudi najmanjša v primerjavi z ostalimi pri vzorcih 1 in 4 (0,32 in 0,31 g/L), le nekoliko večja koncentracija hlapnih kislin je bila določena pri vzorcu 3 (0,41 g/L), pri vzorcu 2 pa je bila koncentracija hlapnih kislin (0,688 g/L) že v območju, v katerem jo lahko senzorično v vonju zaznamo (0,6-0,9 g/L) (Košmerl in Kač, 2007). Povišana vsebnost hlapnih kislin v vzorcu 5 je lahko posledica neprilagojenosti kvasovk na fermentacijske razmere ali sočasne mlečnokislinske fermentacije zaradi prisotnih mlečnokislinskih bakterij.

4.3.3 Relativna gostota vina

Relativna gostota je razmerje med gostoto vina pri 20 °C in gostoto vode pri isti temperaturi. Na gostoto vzorca 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 (Košmerl in Kač, 2007). Relativna gostota lahko v okviru eksperimentalne napake odstopa za $\pm 0,00050$ (Navodilo o..., 2001).

Po končani fermentaciji in po petmesečnem zorenju vina smo izmerili relativno gostoto v pridelanem mladem vinu. Rezultati posameznih ponovitev vzorcev so prikazani v prilogi C. Na sliki 11 pa je prikazano povprečje obeh ponovitev posameznih vzorcev ter σ .



Slika 11: Primerjava relativne gostote v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk (dec 08) in po petmesečnem zorenju vina (maj 09)

Iz slike 11 je razvidno, da je imel v decembru 2008 največjo relativno gostoto vzorec 5 (0,99581), kar je v skladu z višjo vsebnostjo reducirajočih sladkorjev (slika 9) in kislin (slika 17) pri tem vzorcu, najmanjšo relativno gostoto pa je imel vzorec 2 (0,99200), ki je imel tudi najnižjo vsebnost reducirajočih sladkorjev in kislin (sliki 9 in 17). Po petmesečnem zorenju vina se relativna gostota vzorcev ni bistveno spremenila. Le pri vzorcu 5 je opazno rahlo zmanjšanje relativne gostote po petmesečnem zorenju, kar je verjetno posledica pretvorbe sladkorjev, ki se kaže tudi v povečani koncentraciji alkohola, izmerjeni po petmesečnem zorenju vina (slika 14). σ med ponovitvama vzorcev 3, 4 in 5 so bili zanemarljivo majhni, pri vzorcih 1 in 2 pa σ ni bilo.

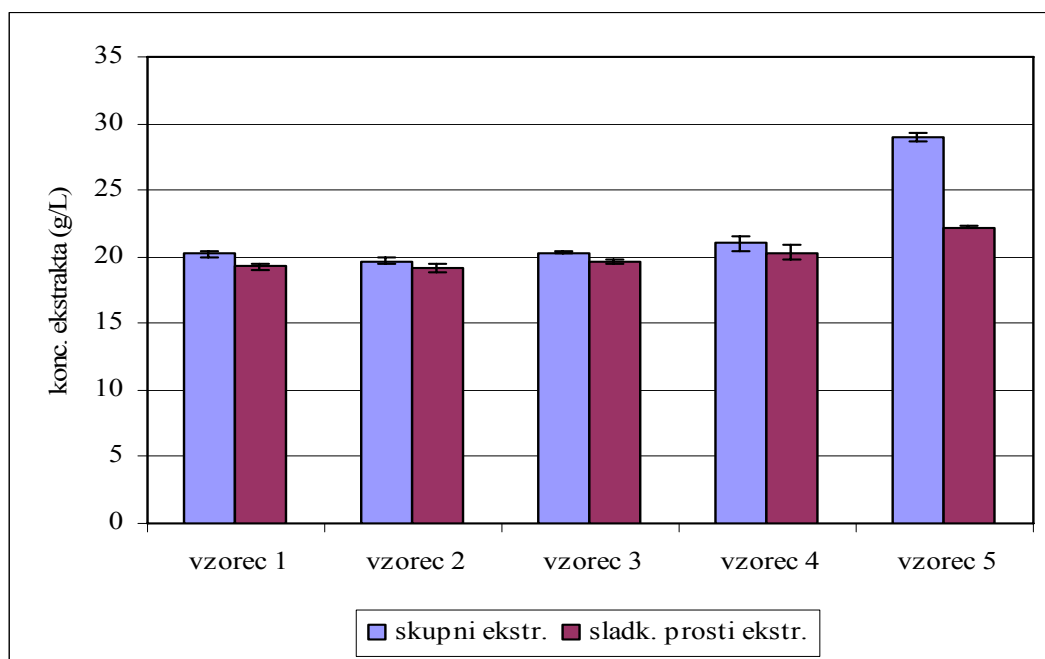
4.3.4 Koncentracija skupnega in sladkorja prostega ekstrakta

Skupni ekstrakt vina sestavljajo po definiciji O.I.V. pri 100 °C nehlapne komponente vina (sladkorji, fiksne kisline, organske soli, idr.). Na osnovi vsebnosti ekstrakta vina lahko sklepamo na začetno vsebnost sladkorja v moštu, iz katerega je bilo vino pridelano. Sladkorja prosti ekstrakt je po definiciji razlika med (skupnim) ekstraktom in reducirajočimi sladkorji. Vsebnost ekstrakta je odvisna od sorte, zrelosti, načina trgatve in pogojev vinifikacije. Vpliv

različnih sevov čiste kulture kvasovk v primerjavi s spontanim vrenjem po literaturnih podatkih ni statistično značilen.

Vsebnost sladkorja prostega ekstrakta je 7-30 g/L (povprečje 20 g/L); minimalne vrednosti so zakonsko predpisane (Pravilnik o pogojih..., 2004, priloga III) (Košmerl in Kač, 2007). Sladkorja prosti ekstrakt lahko v okviru eksperimentalne napake odstopa za $\pm 1,5$ g/L (Navodilo o..., 2001).

Po končani fermentaciji smo izmerili skupni in sladkorja prosti ekstrakt v pridelanem mladem vinu. Rezultati posameznih ponovitev vzorcev so prikazani v prilogi D. Na sliki 12 pa je prikazano povprečje obeh ponovitev posameznih vzorcev ter σ .



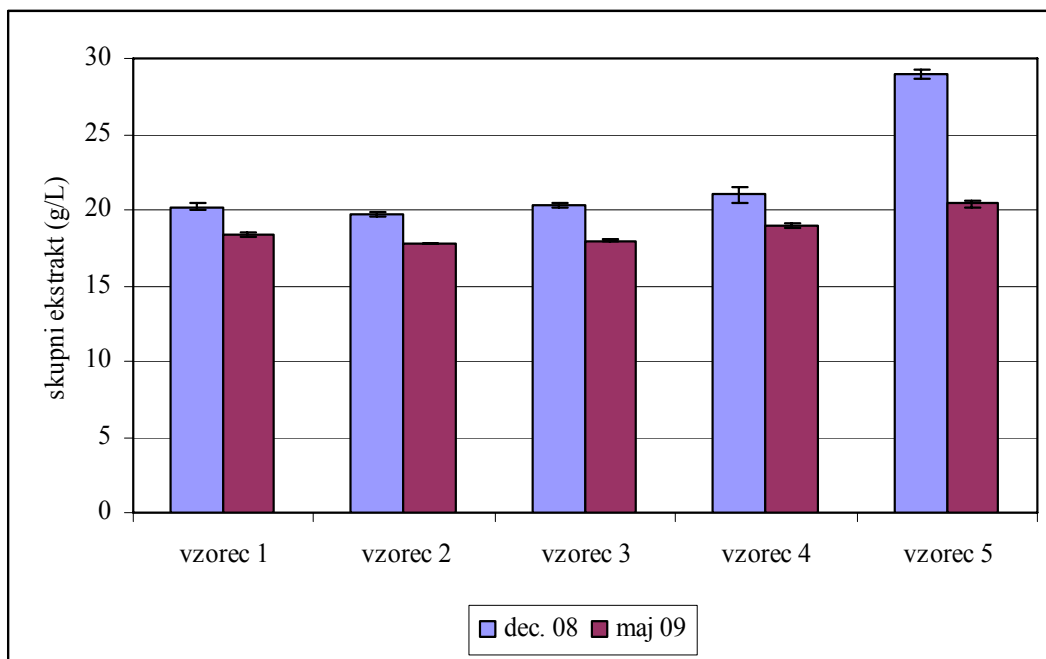
Slika 12: Vsebnost skupnega in sladkorja prostega ekstrakta (g/L) v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

Iz slike 12 je razvidno, da je imel največjo vsebnost skupnega ekstrakta vzorec 5 (28,99 g/L), ki je imel tudi največjo koncentracijo reducirajočih sladkorjev (kar je razvidno iz slike 9), ki vplivajo na vsebnost skupnega ekstrakta v vinu. Vsi ostali vzorci mladega vina so imeli primerljivo vsebnost skupnega ekstrakta, okoli 20 g/L (± 1 g/L). Najnižjo vsebnost skupnega ekstrakta pa je imel vzorec 2 (19,70 g/L), ki je imel tudi najnižjo vsebnost reducirajočih sladkorjev (slika 9). σ med ponovitvama posameznih vzorcev so bili majhni, nekoliko večji σ je bil določen le pri vzorcu 4.

Prav tako je imel vzorec 5 tudi največjo koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta (22,24 g/L), ki je bila zaradi visoke vsebnosti reducirajočih sladkorjev znatno manjša od koncentracije skupnega ekstrakta. σ med ponovitvama posameznih vzorcev so bili zanemarljivo majhni, nekoliko večja σ pa sta bila določena le pri vzorcih 2 in 4. Vsi vzorci so imeli koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta večjo od zakonsko predpisane minimalne

vrednosti, ki za namizna bela vina znaša 15 g/L (Pravilnik o pogojih..., 2004, priloga III) in v pričakovanem območju (7-30 g/L) (Košmerl in Kač, 2007).

Po petmesečnem zorenju vina smo ponovno izmerili skupni ekstrakt v pridelanem mladem vinu ter ga primerjali s prvotno izmerjenim skupnim ekstraktom vzorcev. Rezultati posameznih ponovitev vzorcev so prikazani v prilogi D. Na sliki 13 pa je prikazano povprečje obeh ponovitev posameznih vzorcev ter σ .



Slika 13: Primerjava skupnega ekstrakta v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk (dec 08) in po petmesečnem zorenju vina (maj 09)

Iz slike 13 je razvidno, da so imeli po petmesečnem zorenju vina vsi vzorci vina manjšo koncentracijo skupnega ekstrakta, kar je najverjetneje posledica izločanja kristalov vinskega kamna, pri vzorcih 1 in 5 pa je lahko tudi posledica nadaljnje razgradnje sladkorjev, saj sta imela oba vzorca po petmesečnem zorenju tudi večjo koncentracijo alkohola, kar je razvidno iz slike 14. Predvsem pri vzorcu 5 je prišlo do znatnega zmanjšanja koncentracije skupnega ekstrakta (za približno 29,6 %), medtem ko je bilo pri ostalih vzorcih zmanjšanje koncentracije skupnega ekstrakta manjše (za približno 9,2-11,7 %). σ med ponovitvama posameznih vzorcev so bili zanemarljivo majhni.

4.3.5 Koncentracija alkohola

Ko govorimo o alkoholu v vinu, pomeni to etanol, ki nastane kot glavni produkt alkoholnega vrenja s kvasovkami iz glukoze in fruktoze v moštu. Koncentracija etanola v vinu je odvisna od sorte, načina trgatve (ročna ali mehanska), vsebnosti fermentativnih sladkorjev (zrelost grozdja), seva kvasovk, vrelna temperatura, vsebnosti hranilnih snovi v grozdnem moštu in pogojev alkoholnega vrenja.

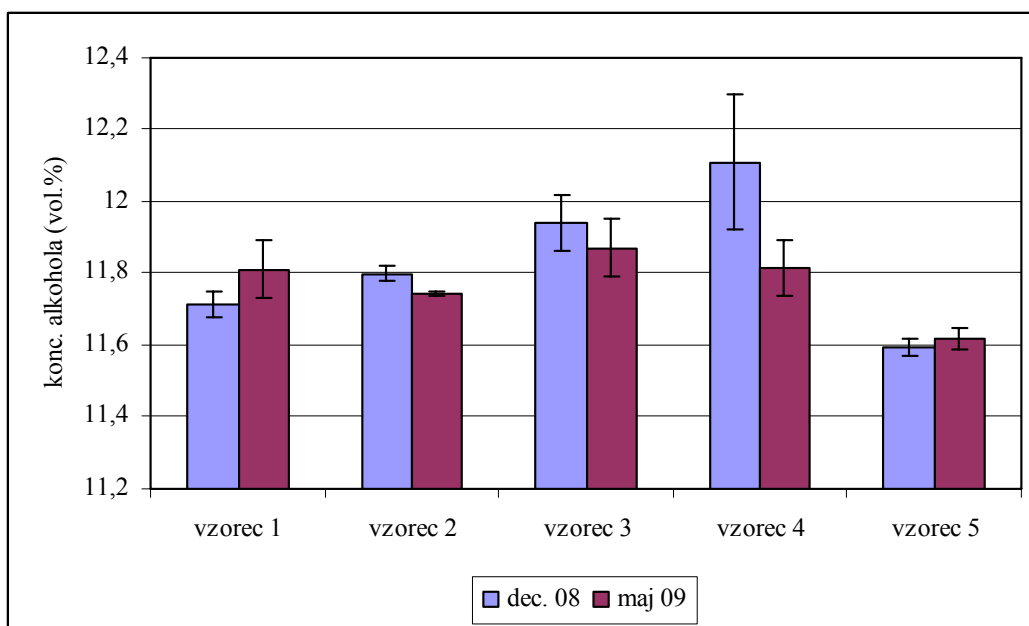
Pojem alkohola v vinu opredeljujejo naravni, dejanski, potencialni in skupni alkohol. Naravni alkohol je količina alkohola, ki je nastala iz sladkorja v grozdju. Dejanski (ali prisotni) alkohol je alkohol, ki ga vsebuje vino in ki je nastal bodisi iz sladkorja v grozdju ali iz sladkorja, ki je bil v okviru dovoljenih predpisov dodan v mošt (dosladkanje). Potencialni alkohol je v alkohol preračunana količina nepovretega sladkorja (vsebnost reducirajočih sladkorjev), ki bi eventuelno lahko povrel v alkohol, pa ni. Skupni alkohol pa je vsota vsebnosti dejanskega in potencialnega alkohola (Košmerl in Kač, 2007).

Po vsebnosti alkohola razdelimo vina na:

- lahka s 60 do 80 g/L (okrog 7,5 do 10 vol.%) etanola,
- srednje težka z 80 do 100 g/L (okrog 10 do 12,5 vol.%) etanola,
- težka z nad 100 g/L (nad 12,5 vol.%) etanola (Šikovec, 1987).

Dejanski alkohol (vol.%) lahko v okviru eksperimentalne napake odstopa za $\pm 0,40$ (Navodilo o..., 2001).

Po končani fermentaciji in po petmesečnem zorenju vina smo izmerili vsebnost alkohola v pridelanem mladem vinu. Rezultati posameznih ponovitev vzorcev so prikazani v prilogi E. Na sliki 14 pa je prikazano povprečje obeh ponovitev posameznih vzorcev ter σ .



Slika 14: Vsebnost alkohola v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

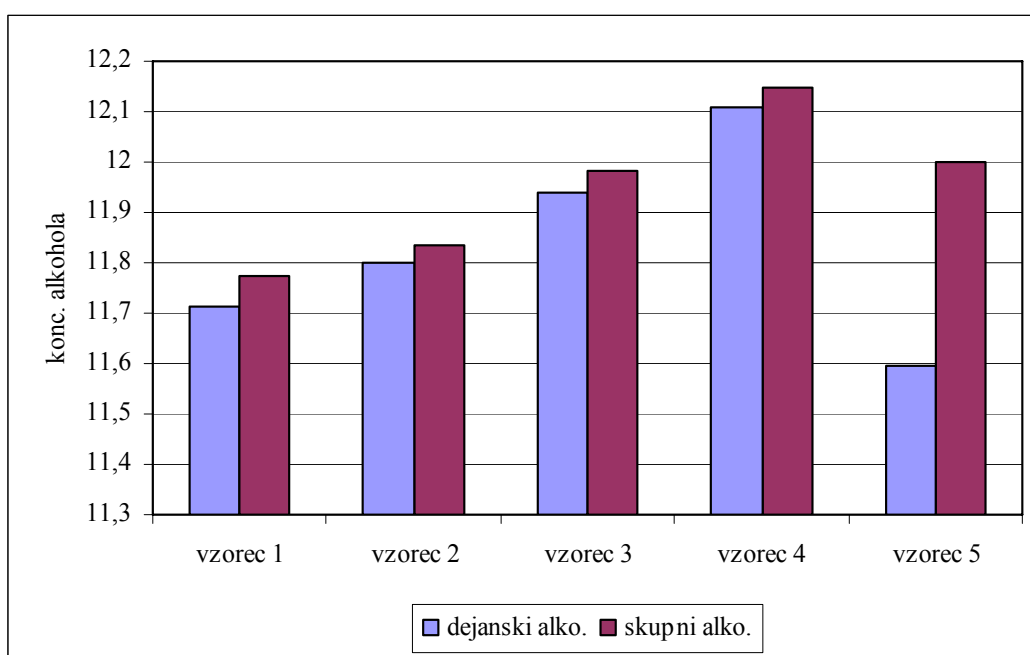
Iz slike 14 je razvidno, da je imel najvišjo vsebnost alkohola v decembru 2008 vzorec 4 (12,11 vol.%), najnižjo pa vzorec 5 (11,6 vol.%), pri katerem je bila fermentacija najbolj počasna, kar je razvidno tudi iz vrelnih krivulj (slike 5, 6 in 7) ter najvišje vsebnosti reducirajočih sladkorjev (slika 9) pri tem vzorcu. Pri vzorcu 4 je prišlo do večjega σ med

ponovitvama, vendar je dovoljeno odstopanje med ponovitvama $\pm 0,4$ vol.%, ki ga vzorec 4 ni presegel. Pri ostalih vzorcih smo določili razmeroma majhne σ med ponovitvama posameznih vzorcev, nekoliko večji je bil le pri vzorcu 3. Po vsebnosti alkohola (upoštevajoč σ vzorca 3) so bili vzorci 1, 2 in 3 dokaj primerljivi z vrednostmi koncentracije alkohola 11,7-11,9 vol.%.

V ponovitvi merjenja vsebnosti alkohola po petmesečnem zorenju vina (maja 2009) pa je bila vsebnost alkohola v vzorcih 1 in 5 višja, kar je verjetno posledica nadaljnje alkoholne fermentacije oziroma razgradnje sladkorja. Pri vseh ostalih vzorcih je bila vsebnost alkohola nižja od decemberskih meritev, kar je lahko posledica izgube etanola zaradi izhlapevanja letega med potekom analiz ali pa zaradi oksidacije etanola v acetaldehid in esterifikacije z ustreznimi kislinami. σ med ponovitvama vzorcev 1, 3 in 4 so bili pri ponovnem merjenju nekoliko večji, kar pa je lahko posledica eksperimentalne napake.

Glede na vsebnost alkohola smo vse vzorce vina uvrstili v kategorijo srednje težkih vin, saj so imeli med 10 in 12 vol.% alkohola.

Spodnja slika prikazuje razliko med dejanskim alkoholom, ki smo ga izmerili v vzorcih mladega vina takoj po zaključeni alkoholni fermentaciji, in skupnim alkoholom, torej alkoholom, ki bi ga vsebovali vzorci mladega vina, če bi se vsi reducirajoči sladkorji pretvorili v alkohol.



Slika 15: Primerjava dejanskega in skupnega alkohola v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

Iz slike 15 je razvidno, da imajo vsi vzorci, razen vzorca 5, dejanski alkohol skoraj enak skupnemu, kar je posledica majhnega preostanka reducirajočih sladkorjev (Slika 9). Zelo velika razlika med dejanskim in skupnim alkoholom pa je vidna pri vzorcu 5, ki je imel za razliko od ostalih vzorcev veliko večji preostanek reducirajočih sladkorjev, ki bi eventuelno

lahko povreli v alkohol. Vzrok za tako veliko razliko pa je seveda tudi nedokončanje alkoholne fermentacije pri tem vzorcu.

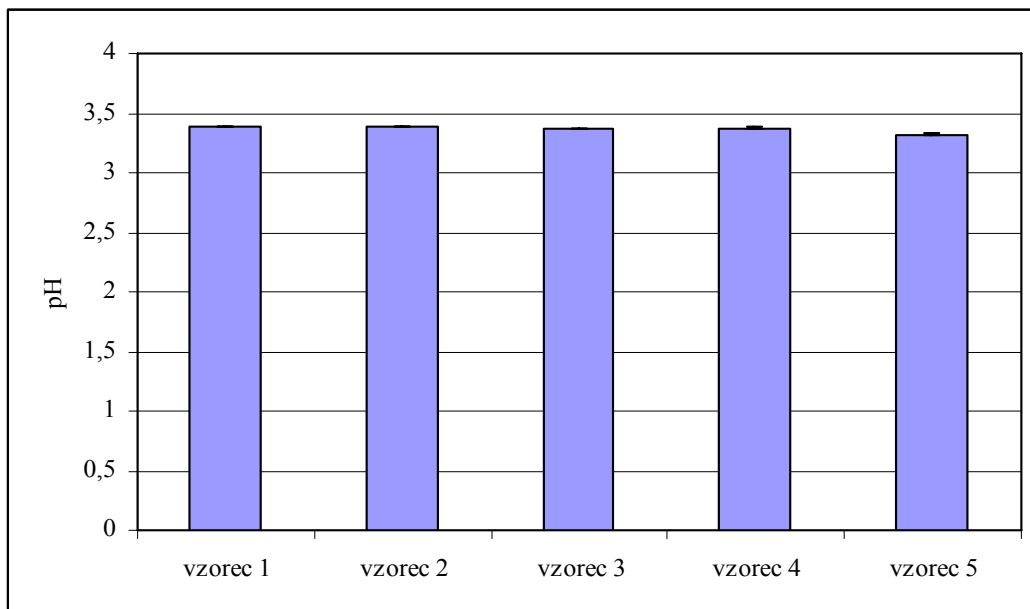
4.3.6 Vrednost pH

Med fermentacijo se pH lahko spreminja zaradi:

- tvorbe etanola,
- izločanja soli vinske kisline,
- porabe aminokislin s strani kvasovk,
- mlečnokislinske fermentacije,
- razgradnje jabolčne in tvorbe jantarne kisline (Bisson in sod., 1996).

Običajno je pH vina manjši od 3,6. Praviloma je pH mladega vina (brez ogljikovega dioksida) višji od pH mošta, iz katerega je vino pridelano (Košmerl in Kač, 2007). Vrednost pH lahko v okviru eksperimentalne napake odstopa za $\pm 0,10$ (Navodilo o..., 2001).

Po končani fermentaciji smo izmerili pH v pridelanem mladem vinu. Rezultati posameznih ponovitev vzorcev so prikazani v prilogi F. Na sliki 16 pa je prikazano povprečje obeh ponovitev posameznih vzorcev ter σ .



Slika 16: Vrednost pH v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

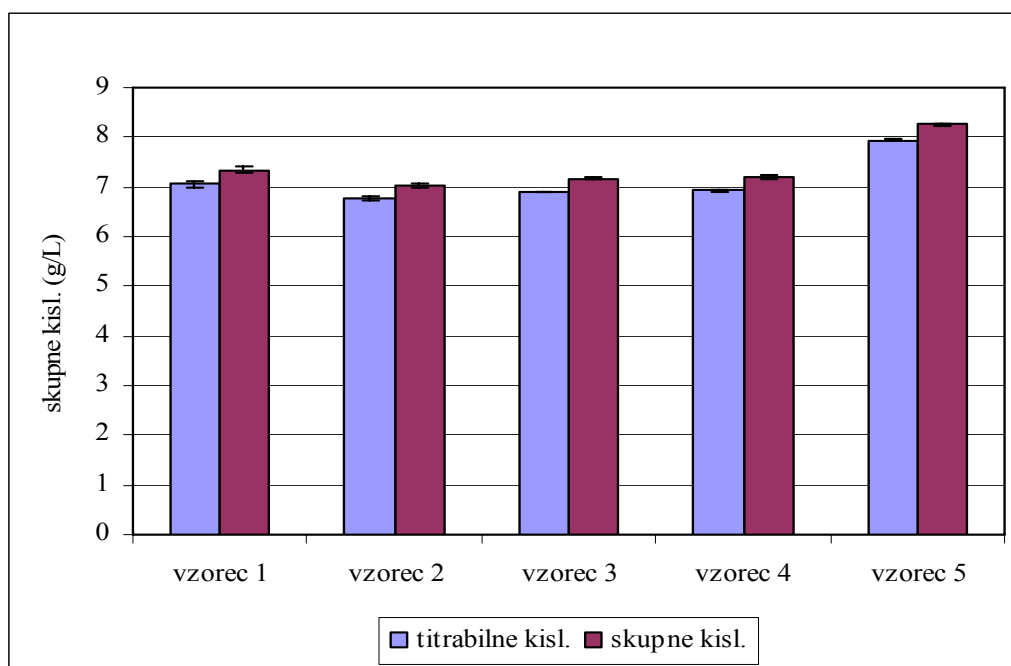
Iz slike 16 je razvidno, da je bil pH v vseh vzorcih vina približno enak. Prav tako je bil pH mladega vina vseh vzorcev večji od pH mošta (3,28), kar je posledica izločanja soli vinske kisline. Največjo vrednost pH je imel vzorec 1 (3,39), najmanjšo pa vzorec 5 (3,32), kar je lahko posledica večje tvorbe kislin v ciklusu trikarboksilnih kislin, zaradi česar je posledično

tudi nekoliko nižja vrednost pH. σ med ponovitvama posameznih vzorcev pa so zanemarljivo majhni.

4.3.7 Koncentracija skupnih (titrabilnih) kislin

Med alkoholno fermentacijo in po njej nastajajo poleg vinske, jabolčne in citronske kisline tudi očetna, propionska, pirogrozdna, mlečna, jantarna, glikolna, galakturonska, glukonska, oksalna in fumarna kislina. Skupna vsebnost karboksilnih kislin v grozdnem soku, moštu in vinu, če jo izrazimo kot g vinske kisline/L vzorca, je med 6 in 9 g/L (Košmerl in Kač, 2007). Najmanjša zahtevana koncentracija skupnih kislin, izraženih kot g vinske kisline na liter vzorca, je 3,5 g/L (Pravilnik o pogojih..., 2004). Koncentracija skupnih kislin lahko v okviru eksperimentalne napake odstopa za $\pm 0,8$ g vinske kisline /L (Navodilo o..., 2001).

Po končani fermentaciji smo izmerili koncentracijo skupnih (titrabilnih) kislin v pridelanem mladem vinu. Rezultati posameznih ponovitev vzorcev so prikazani v prilogi G. Na sliki 17 pa je prikazano povprečje obeh ponovitev posameznih vzorcev ter σ .



Slika 17: Vsebnost skupnih (titrabilnih) kislin (g/L) v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

Iz slike 17 je razvidno, da je bila koncentracija skupnih kislin v vseh vzorcih vina v predvidenem območju (med 6 in 9 g/L) in pri vseh vzorcih, razen pri vzorcu 5, manjša od koncentracije skupnih kislin mošta (7,35 g/L). Vzorec 5 je imel največjo koncentracijo skupnih kislin (7,94 g/L), kar je verjetno posledica neprilagojenosti kvasovk na fermentacijske razmere in s tem tvorbo novih kislin v ciklusu trikarboksilnih kislin (TCA-ciklu), kar potrjuje tudi najnižja vrednost pH (slika 16). Izmerjena koncentracija skupnih

kislin pri ostalih vzorcih je bila razmeroma primerljiva (okrog 7 g/L) kljub manjšemu σ med ponovitvama vzorca 4. Vzorci 1, 2, 3 in 5 pa so imeli σ zanemarljivo majhen.

Prav tako so imeli vsi vzorci mladega vina, razen vzorca 5, manjšo koncentracijo titrabilnih kislin kot je bila v moštu (7,11 g/L) in tudi pričakovano nižjo vsebnost titrabilnih kislin v primerjavi s skupnimi kislinami. Največjo koncentracijo titrabilnih kislin je imel vzorec 5 (7,94 g/L), najmanjšo pa vzorec 2 (6,77 g/L). σ med ponovitvama posameznih vzorcev so bili zanemarljivo majhni.

4.3.8 Koncentracija organskih kislin

Organske kisline v grozdju so produkt nepopolne oksidacije sladkorja. Pomembne so v procesu dihanja celic, kjer nastopajo kot intermediarni proizvodi izmenjave snovi v splošnem metabolizmu rastlinske celice (Blaškovič, 1978).

Vinska kislina nastaja v grozdnih jagodah, deloma tudi v listih vinske trte (Šikovec, 1993). Vino vsebuje 2-10 g/L vinske kisline, kar predstavlja 20-70 % celotne koncentracije skupnih kislin (Košmerl, 1999). Koncentracija vinske kisline je odvisna od sorte in končnega volumna grozdne jagode ob trgatvi. Mikroorganizmi v vinu je ne uporabljajo kot substrat, zato se uporablja tudi za dokisovanje. Ker je slabo topna, se izloča kot sol tartrat (vinski kamen) (Bavčar, 2006). Po pravilniku je najmanjša zahtevana koncentracija vinske kisline v vinu 1 g/L (Pravilnik o pogojih..., 2004).

Jabolčna kislina nastaja v listju trte in prehaja v grozdno jagodo, kjer delno oksidira naprej do vode in ogljikovega dioksida (Šikovec, 1993). Jabolčne kisline je v grozdju od 1 do 4 g/L mošta, v majhnih jagodah v hladnih območjih pa tudi 6 g/L. Koncentracija je odvisna od sorte, temperature v času dozorevanja in končnega volumna jagode. Splošno se njena koncentracija med dozorevanjem grozdja znižuje, če je zunanja temperatura višja. Mikrobiološko je nestabilna, saj jo mlečnokislinske bakterije pretvorijo v mlečno kislino v procesu biološkega razkisa. Delno se izloča tudi kot kalcijeva sol oziroma malat. V ustih daje jabolčna kislina občutek nezrelosti (Šikovec, 1993).

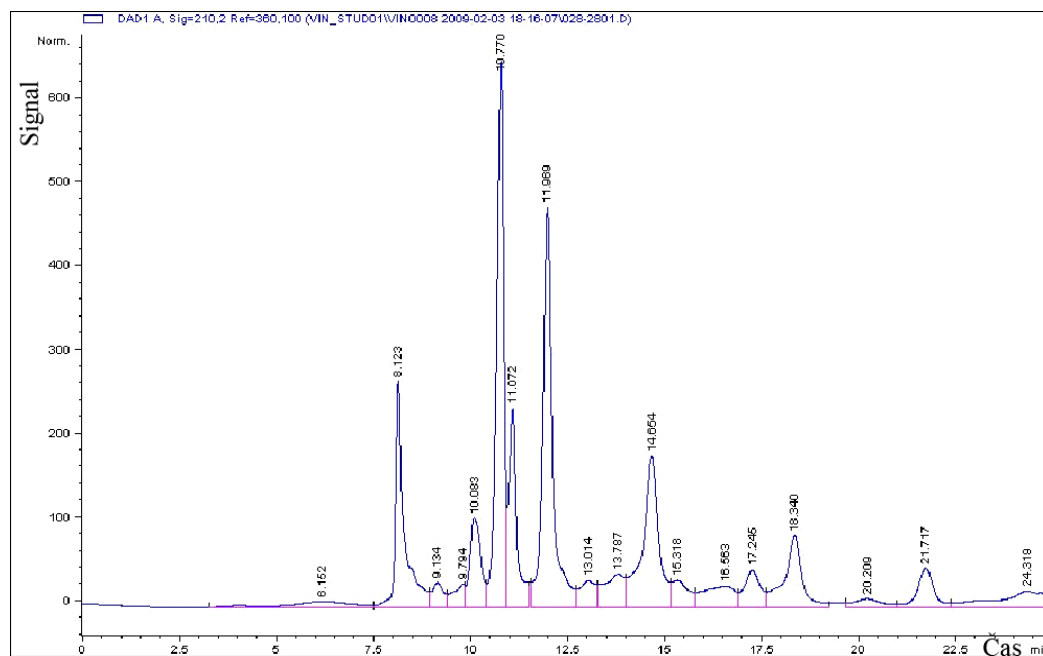
Mlečne kisline je v vinu od 0 do 2,5 g/L, izjemoma pa tudi več, če je potekel biološki razkis (Bavčar, 2006). Lahko nastane z dekarboksilacijo jabolčne kisline v procesu biološkega razkisa ali pa nastaja med alkoholno fermentacijo kot posledica razgradnje ogljikovih hidratov. Njene soli (laktati) so dobro topne in stabilne (Bavčar, 2006). Pri neustreznih pogojih (pH manjši od 3,1 in temperatura nižja od 17 °C) lahko zaradi nepravilnega biološkega razkisa nastanejo neželene hlapne snovi (mlečni cik) (Šikovec, 1993).

Citronska kislina je fiksirana na celičnih opnah grozdnih jagod, zato težje prehaja v mošt. V vinu se nahaja v koncentracijah 0,1-0,7 g/L in je neobstoja, saj jo mlečnokislinske bakterije

razgradijo do diacetila, acetoina in 2,3-butandiola (Šikovec, 1993). Tvori se tudi pod vplivom plesni *Botrytis cinerea* (Bavčar, 2006). Največja dovoljena koncentracija citronske kisline v vinu je 1 g/L (Pravilnik o pogojih..., 2004).

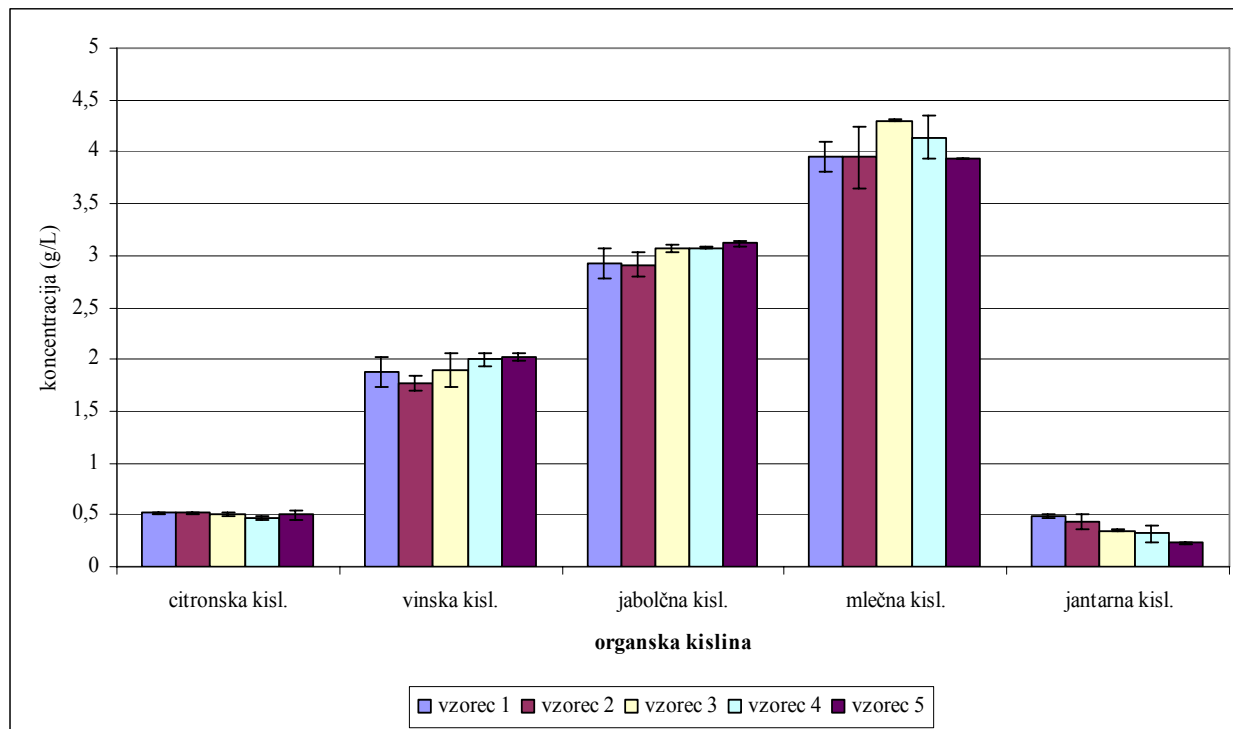
Jantarna kislina je produkt kvasovk in nastaja v ciklu trikarboksilnih kislin med alkoholno fermentacijo (Bavčar, 2006). Deluje inhibitorno na mlečnokislinske bakterije in je v vinu prisotna v koncentracijah 0,2-2 g/L (Košmerl, 1999).

Zgoraj opisane organske kisline smo določali s pomočjo ionsko izmenjevalne kolone AMINEX HPX-87 H in jih detektirali na UV detektorju pri valovni dolžini 210 nm.



Slika 18: Primer kromatograma organskih kislin v vinu

Po končani fermentaciji smo določili koncentracijo citronske, vinske, jabolčne, mlečne in jantarne kisline v pridelanem mlademu vinu. Rezultati posameznih ponovitev vzorcev so prikazani v prilogi H. Na sliki 19 pa je prikazano povprečje obeh ponovitev posameznih vzorcev ter σ .



Slika 19: Vsebnosti organskih kislin v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

Iz slike 19 je razvidno, da so imeli vsi vzorci od preiskovanih organskih kislin največ mlečne kisline, iz česar lahko sklepamo, da je v vzorcih potekel biološki razkis. Še posebej veliko koncentracijo mlečne kisline je vseboval vzorec 3 (4,31 g/L), čeprav v senzorični analizi ta kislina ni bila zaznavna. Veliko koncentracijo mlečne kisline je vseboval tudi vzorec 4 (4,14 g/L), pri katerem pa smo določili nekoliko večji σ med ponovitvama. Vzorci 1, 2 in 5 pa so vsebovali primerljive vrednosti mlečne kisline (3,93-3,95 g/L), vendar je bil pri vzorcih 1 in 2 med ponovitvama prav tako določen večji σ .

Vsi vzorci so prav tako imeli veliko koncentracijo jabolčne kisline, njena koncentracija je bila celo večja od koncentracije vinske kisline. Predvidevali smo, da je to verjetno posledica slabše dozorelega grozdja, iz katerega je bil mošt pridelan. Visoka vsebnost jabolčne kisline v vinih prav tako rezultira s povišano vsebnostjo mlečne kisline, saj le-ta nastaja s pretvorbo jabolčne kisline med biološkim razkislom. Vzorci 3, 4 in 5 so imeli primerljive vsebnosti jabolčne kisline (3,08-3,12 g/L), le malenkost nižjo vsebnost jabolčne kisline pa sta imela vzorca 1 in 2 (2,92 g/L), pri katerih pa smo določili manjši σ med ponovitvama.

Vinska kislina je bila v vzorcih zastopana v razmeroma majhnih koncentracijah. Le vzorca 4 in 5 sta imela koncentracijo vinske kisline na spodnji meji pričakovane koncentracije (2 g/L),

vsi ostali vzorci pa so imeli nižje vrednosti (manj kot 2 g/L, vendar več kot 1 g/L, kot je zahtevana najmanjša koncentracija). Nekoliko večji σ med ponovitvama smo določili pri vzorcih 1 in 3, medtem ko je bil σ pri ostalih vzorcih skoraj zanemarljivo majhen.

Vsi vzorci vina so imeli vsebnost citronske kisline okrog 0,5 g/L (0,48-0,52 g/L), torej v pričakovanem območju (0,1-0,7 g/L). σ med ponovitvama vseh vzorcev so bili zanemarljivo majhni.

Od preiskovanih organskih kislin so imeli vsi vzorci najnižjo vsebnost jantarne kisline, katere vrednosti pa so bile vseeno v pričakovanem območju (0,2-2 g/L). Najnižjo vsebnost jantarne kisline je imel vzorec 5 (0,23 g/L), najvišjo pa vzorec 1 (0,49 g/L).

4.3.9 Koncentracija hlapnih spojin in višjih alkoholov

Višji alkoholi so produkt metabolizma kvasovk. Nastanejo pri razgradnji sladkorja in pri izkoriščanju dušika iz aminokislin. Koncentracija je odvisna od pogojev fermentacije, predvsem pa od seva kvasovk (Jackson, 1994).

Acetaldehid je glavni aldehyd v vinu. Po končani alkoholni fermentaciji ga je v mladem vinu okrog 75 mg/L, prag zaznave v vinu pa je med 100-120 mg/L (aldehidna nota). Višje koncentracije v vinu povzročajo oksidativne arome ter vonj po (pre)zrelem ali zelenem jabolku (Košmerl, 2007b; Bavčar, 2006).

Etilacetat je ester očetne kisline in etanola (Bavčar, 2006) in se v vinu nahaja običajno v koncentracijah 30-60 mg/L, prag zaznave pa je bistveno nižji (12,3 mg/L). V večjih koncentracijah negativno vpliva na senzorično kakovost vina, in sicer z vonji po lepilu, laku za nohte in acetonu (Košmerl, 2007b).

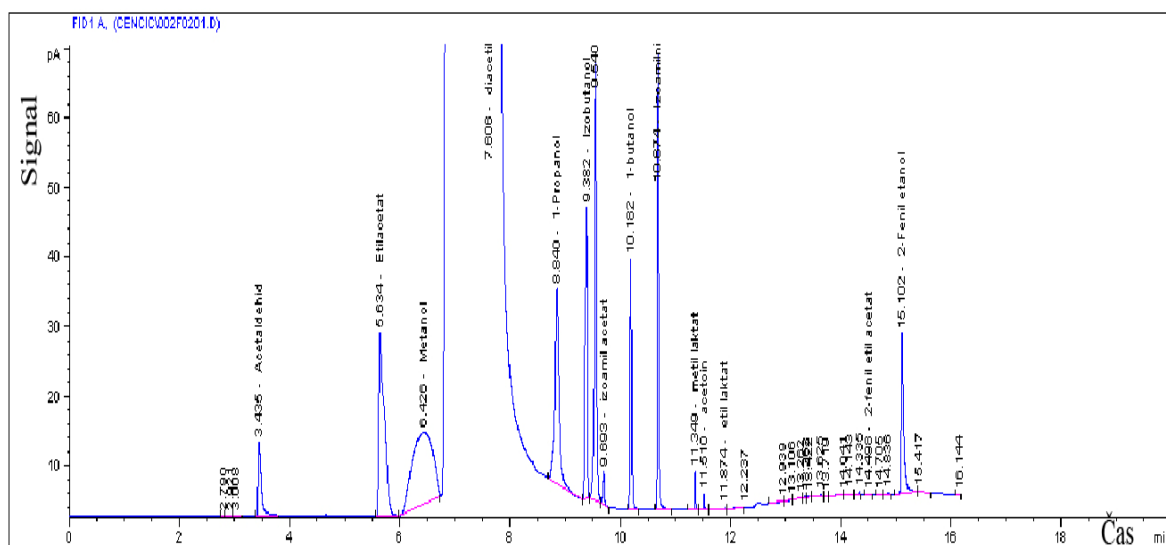
Metanol se v belih vinih nahaja v koncentracijah 40-120 mg/L in med normalnim procesom vinifikacije nikoli ne doseže škodljive koncentracije. Slovenska zakonodaja dovoljuje v belih in rose vinih do 150 mg/L metanola. Metanol ne vpliva na senzorične lastnosti vina in minimalno reagira z drugimi spojinami v vinu (Bavčar, 2006).

2-fenil etil acetat je fenolni ester, ki ga najpogosteje povezujemo s sadno cvetlično aromo po španskem bezgu (Košmerl, 2007b; Bavčar, 2006). Čeprav so v vinu zastopani v manjših koncentracijah, imajo močen vpliv na aromo (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b).

Metil- in etil laktat sta estra, ki nastaneta kot posledica biološkega razkisa in z vonji po mleku in surovem maslu negativno vplivata na aromo vina. Normalna koncentracija v vinu je okrog 15 mg/L, prag zaznave pa je nekoliko višji (25 mg/L) (Košmerl, 2007b).

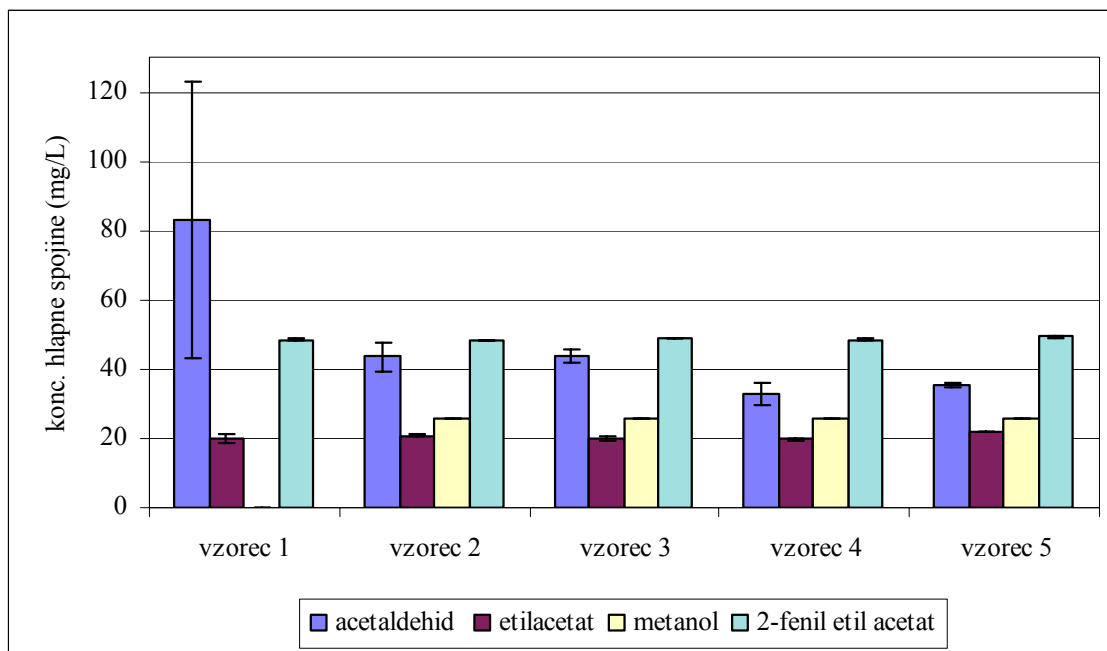
1-propanol, izobutanol, 1-butanol, izoamilni alkohol in 2-fenil etanol so višji alkoholi. 1-propanol se v vinu nahaja v koncentracijah 10-50 mg/L, izobutanol v koncentracijah 50-150 mg/L in 1-butanol v koncentracijah 1-10 mg/L. Izoamilni alkohol predstavlja 50 % vseh višjih alkoholov, v vinu je zastopan v koncentracijah 80-300 mg/L in ima aromo nezrele banane. 2-fenil etanol izvira iz grozdja, v vinu je zastopan v koncentracijah 10-100 mg/L in ima aromo po vrtnicah (Košmerl, 2007b; Bavčar, 2006).

Zgoraj opisane hlapne spojine in višje alkohole smo določali s pomočjo plinske kromatografije (GC).



Slika 20: Primer kromatograma hlapnih spojin in višjih alkoholov v vinu

Po končani fermentaciji smo določili koncentracijo acetaldehida, etilacetata, metanola, 2-fenil etil acetata, metil laktata, etil laktata, 1-propanola, izobutanola, 1-butanola, izoamil alkohola in 2-fenil etanola v pridelanem mladem vinu. Rezultati posameznih ponovitev vzorcev so prikazani v prilogi I. Na sliki 21, 22 in 23 pa je prikazano povprečje obeh ponovitev posameznih vzorcev ter σ .



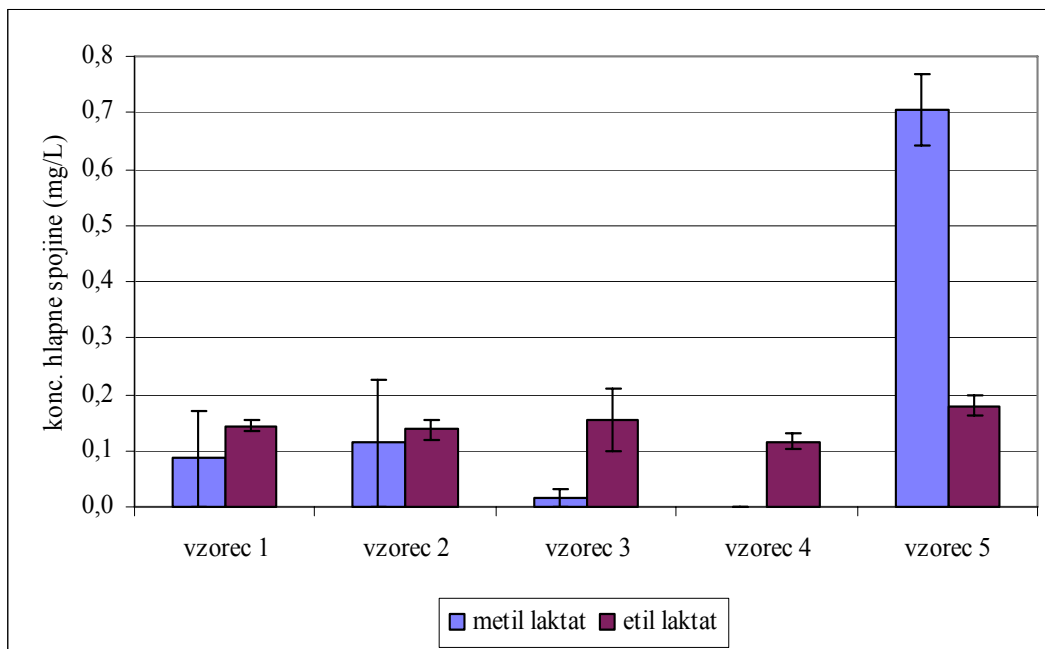
Slika 21: Vsebnost acetaldehida, etilacetata, metanola in 2-fenil etil acetata v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi

Iz slike 21 je razvidno, da je imel daleč največjo koncentracijo acetaldehida vzorec 1 (83,01 mg/L), ki pa je imel tudi zelo velik σ med ponovitvama, kar je lahko posledica večje izpostavljenosti kisiku ene od ponovitev, zaradi česar se je etanol oksidiral do acetaldehida. Pri tem vzorcu je bila zaznavna tudi oksidativna aroma pri senzorični analizi. Primerljivo koncentracijo acetaldehida sta imela vzorca 2 in 3 (43,58 in 43,83 mg/L), pri katerih smo določili le manjši σ med ponovitvama. Vzorec 4 je imel najmanjšo koncentracijo acetaldehida (32,94 mg/L) in manjši σ med ponovitvama, vzorec 5 pa je imel koncentracijo acetaldehida le nekoliko večjo in zanemarljiv σ med ponovitvama.

Vsi vzorci so imeli zelo primerljive koncentracije etilacetata (okrog 20 mg/L) in tudi manjše od pričakovanih (30-50 mg/L). Čeprav so bile te koncentracije nad pragom zaznave (12,3 mg/L) jih pri senzorični analizi nismo zaznali. Pri vzorcih 1, 3 in 5 smo določili zanemarljivo majhen σ .

Vsi vzorci, razen vzorca 1, so imeli primerljive koncentracije metanola (okrog 26 mg/L), vendar nižje od pričakovanih (40-120 mg/L). Pri vzorcu 1 pa metanola nismo določili oziroma je bila koncentracija le-tega pod mejo detekcije.

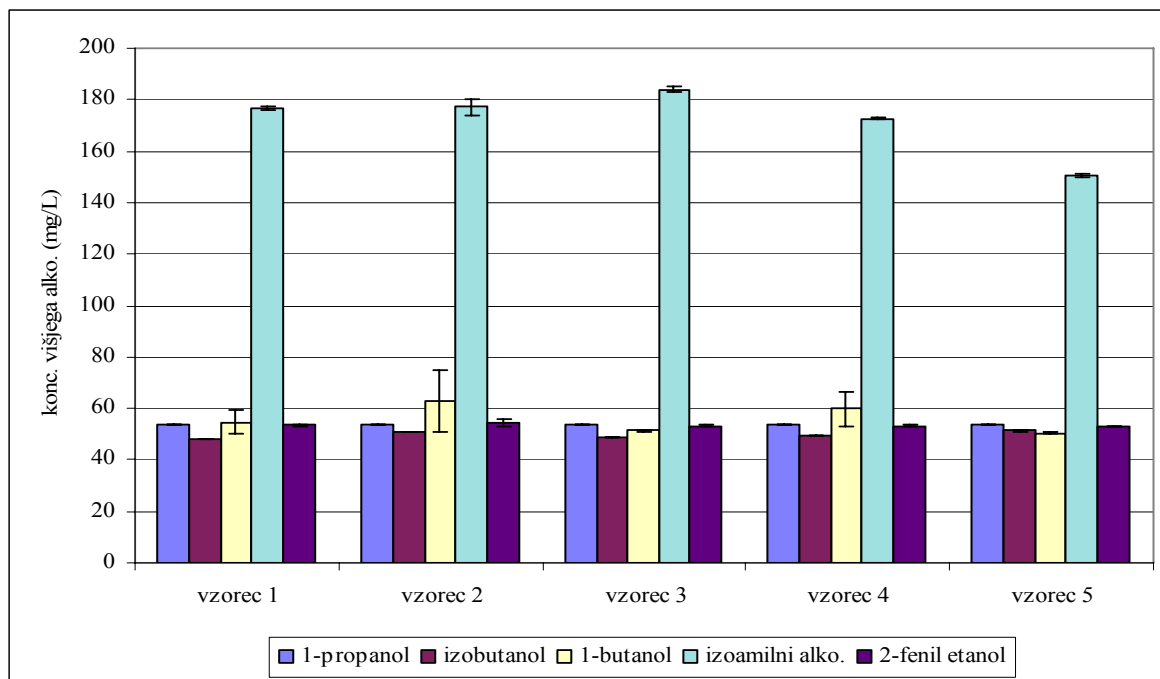
Vsi vzorci so imeli razmeroma velike in primerljive koncentracije 2-fenil etil acetata (okrog 48 mg/L), kar je bilo zaznavno tudi pri senzorični analizi (sadni vonji in okusi). Najvišjo vsebnost 2-fenil etil acetata je imel vzorec 5, pri katerem pa je bila pri senzorični analizi sadnost manj izražena.



Slika 22: Vsebnost metil laktata in etil laktata v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

Iz slike 22 je razvidno, da je imel vzorec 5 daleč največjo koncentracijo metil laktata (0,71 mg/L), kar se je pri senzorični analizi odrazilo z mlečno noto. Manjše koncentracije metil laktata smo določili pri vzorcih 1 in 2, ki pa sta imela zelo velik σ , saj smo metil laktat določili le v eni od obeh ponovitvev. Skoraj zanemarljivo koncentracijo metil laktata smo določili pri vzorcu 3, pri vzorcu 4 pa metil laktata nismo določili oziroma je bila koncentracija le-tega pod mejo detekcije.

Vzorec 5 je imel prav tako največjo koncentracijo etil laktata (0,18 mg/L), vendar le nekoliko večjo od ostalih vzorcev. Vzorca 1 in 2 sta imela enako vsebnost etil laktata, vzorec 3 ga je vseboval nekoliko več, najmanj pa ga je vseboval vzorec 4 (0,12 mg/L). Pri vzorcu 3 smo določili malo večji σ med ponovitvama, medtem ko je bil pri ostalih vzorcih σ skoraj zanemarljiv. Pri vseh vzorcih se je vsebnost etil laktata odražala z mlečnato noto pri senzorični analizi, pri vzorcih 2 in 4 pa tudi z maščobno noto in maščobnim pookusom.



Slika 23: Vsebnosti 1-propanola, izobutanola, 1-butanola, izoamil alkohola in 2-fenil etanola v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

Iz slike 23 je razvidno, da so vsi vzorci, kot pričakovano, vsebovali razmeroma velike koncentracije izoamil alkohola. Največjo koncentracijo izoamil alkohola smo določili pri vzorcu 3 (184,04 mg/L), vzorci 1, 2 in 4 pa so imeli nekoliko manjše in primerljive koncentracije izoamil alkohola. Najmanjšo koncentracijo izoamil alkohola smo določili pri vzorcu 5 (150,54 mg/L), kar se je pri senzorični analizi odrazilo z manjšo kompleksnostjo vina. Manjši σ med ponovitvama smo določili le pri vzorcu 2, medtem ko je bil pri ostalih vzorcih σ zanemarljivo majhen.

Koncentracije 1-propanola v vzorcih so bile praktično enake (53,96-54,01 mg/L) in malenkost višje od pričakovanih (10-50 mg/L).

Prav tako so bile koncentracije izobutanola v vzorcih zelo primerljive. Največ ga je vseboval vzorec 5 (51,36 mg/L), najmanj pa vzorec 1 (48,14 mg/L). Pri vseh vzorcih so bile vsebnosti izobutanola na spodnji meji pričakovanih (50-150 mg/L) oziroma nekoliko nižje. Zanemarljivo majhne σ med ponovitvama smo določili le pri vzorcih 2 in 5.

V koncentraciji 1-butanola pa so se vzorci nekoliko razlikovali in pri vseh vzorcih smo določili veliko večjo koncentracijo 1-butanola (50,33-62,94 mg/L) od pričakovane (1-10 mg/L). Največjo koncentracijo smo določili pri vzorcih 2 in 4, ki pa sta imela tudi največji σ med ponovitvama. Nekoliko manjšo koncentracijo 1-butanola smo določili pri vzorcu 1, pri katerem smo prav tako določili manjši σ med ponovitvama, vzorca 3 in 5 pa sta imela primerljivi in namanjši koncentraciji 1-butanola ter zanemarljivo majhen σ med ponovitvama.

Koncentracija 2-fenil etanola je bila pri vseh vzorcih skoraj enaka (53,07-54,44 mg/L), malenkost večjo koncentracijo smo določili le pri vzorcu 2. σ med ponovitvama vzorcev so bili zanemarljivo majhni.

4.3.10 Določanje barve vina

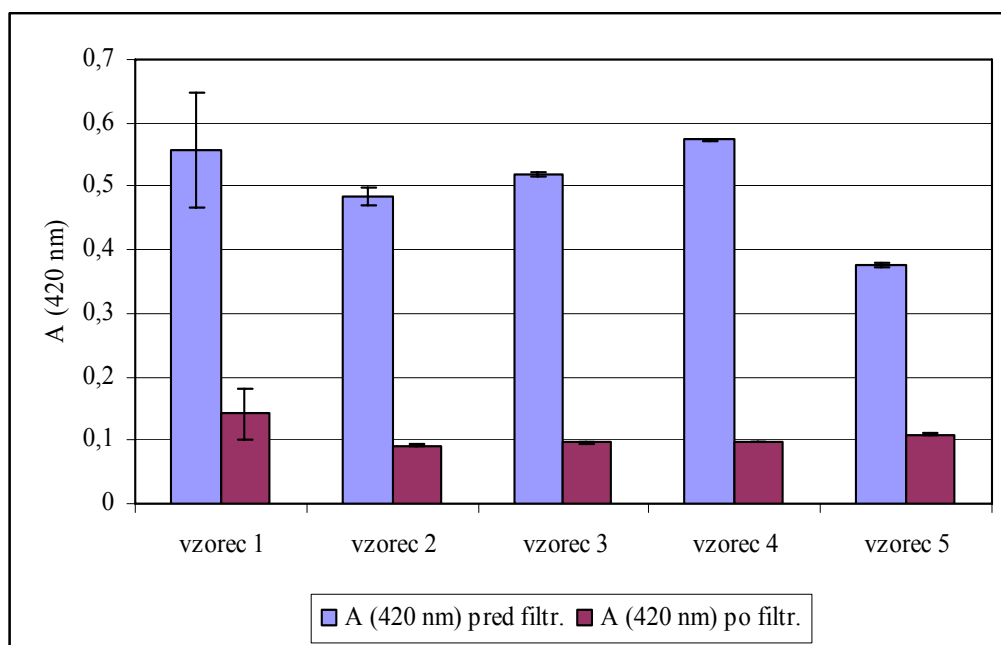
Barvila, ki jih bela vina vsebujejo, so klorofili, karotini in ksantofili. V hladnih klimatskih razmerah vsebuje grozdje bistveno več klorofila, ki obarva vino zaznavno zelenkasto v primerjavi s svetlo rumeno do rumenorjavkasto (jantarno) barvo vina, ki pomeni, da sledovi klorofila niso opazni (Košmerl in Kač, 2007).

Na barvo belih vin vplivajo tudi ne flavonoidni fenoli. To so predvsem hidroksicimetne kisline, torej kaftarna, kumarna in fertarna kislina. Po stiskanju grozdja te spojine oksidirajo in se vežejo z glutathionom. Tako nastane dokaj stabilen kompleks. Počasneje se izločajo flavonoli, zato je njihova prisotnost večja v primeru maceracije bele drozge. Prisotni so tudi katehini, predvsem pa rumeno obarvanost mladih vin dajeta flavonola kvercetin in kamferol.

Pri mladih kakovostnih vinih sorte laški rizling so barve od rumenkasto-zelenkaste do zlato rumene (Nemanič, 1996).

Intenziteta barve pri belih vinih je enaka izmerjeni absorbanci pri 420 nm. Absorbanca se zmanjša z naraščanjem pH vrednosti in večanjem koncentracije alkohola (Košmerl in Kač, 2007).

Po končani fermentaciji smo izmerili absorbanco pri 420 nm v pridelanem mlademu vinu pred in po filtraciji. Rezultati posameznih ponovitev vzorcev so prikazani v prilogi J. Na sliki 24 pa je prikazano povprečje obeh ponovitev posameznih vzorcev ter σ .

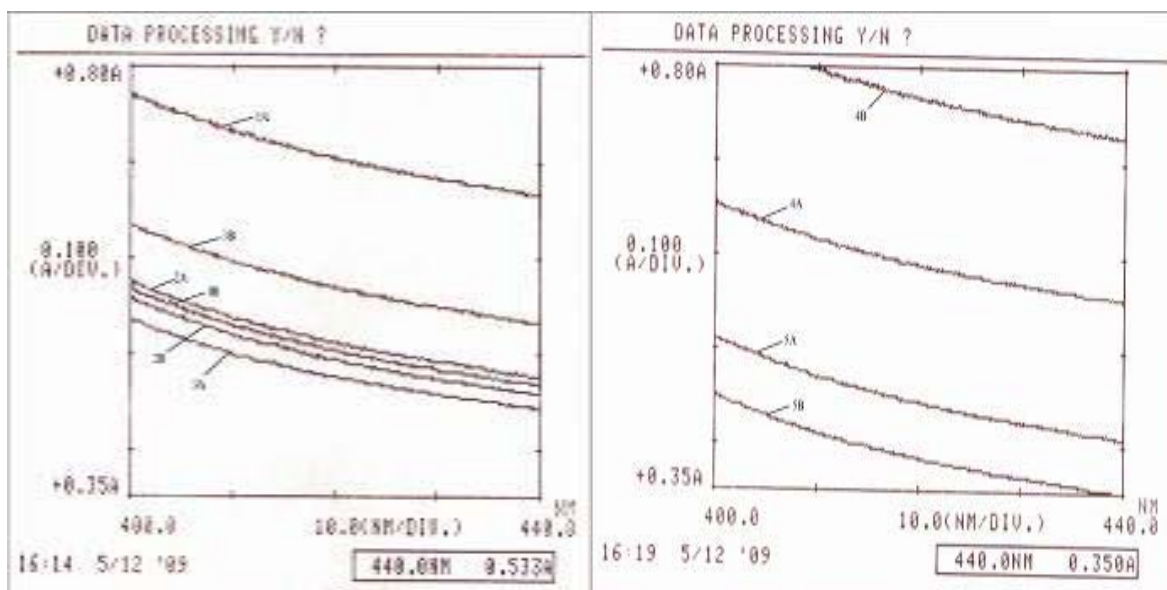


Slika 24: Absorbanca pri 420 nm v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk pred in po filtraciji

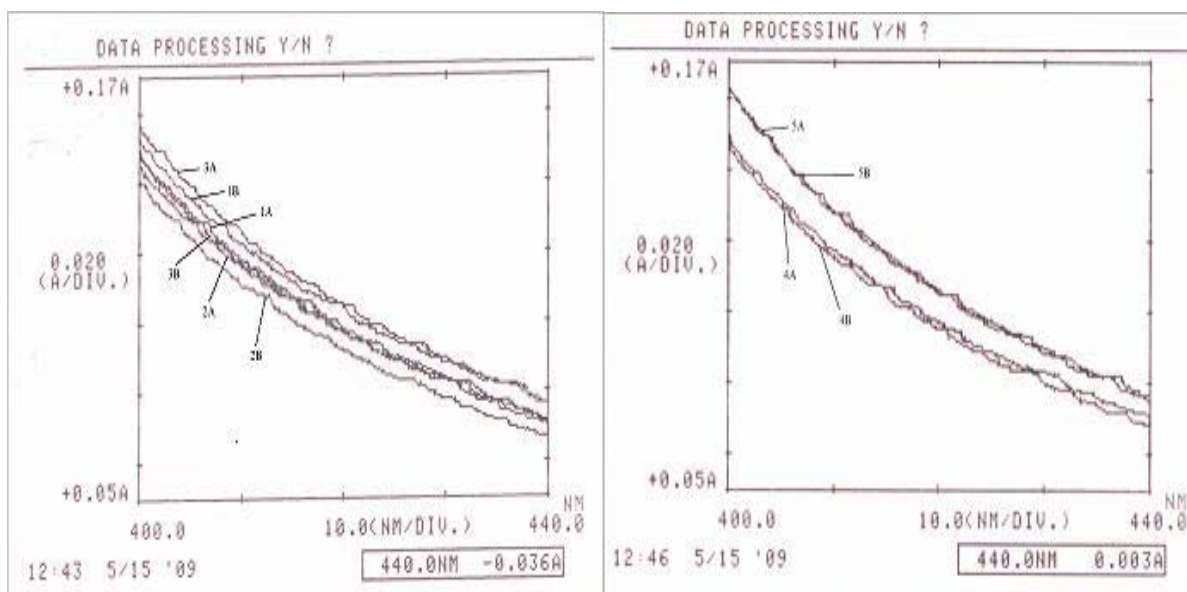
Iz slike 24 je razvidno, da je imel pred filtracijo najmanjšo intenziteto barve vzorec 5 (0,376), največjo intenziteto barve pa vzorec 4 (0,519). Primerljivo intenziteto barve sta imela vzorca 1 in 4, vendar smo pri vzorcu 1 določili precej velik σ med ponovitvama. Prav tako sta imela dokaj primerljivo intenziteto barve vzorca 2 in 3 (0,483 in 0,519) z manjšim σ pri vzorcu 3.

Po filtraciji se je pri vseh vzorcih absorbanca oziroma intenziteta barve občutno zmanjšala, saj smo s filtracijo odstranili večino motnih delcev, ki vplivajo na intenziteto barve vina. Vsi vzorci vina so imeli po filtraciji skoraj enako intenziteto barve (0,9-0,1), malenkost je izstopal le vzorec 1 z rahlo višjo intenziteto barve (0,14), pri katerem pa smo tudi med ponovitvama določili manjši σ .

Z merjenjem absorpcijskega spektra lahko sklepamo o odtenkih rumene oziroma zelene barve v vinu.



Slika 25: Absorpcijski spekter vzorcev mladega vina v območju valovne dolžine 400-440 nm pred filtracijo. Vzorci 1, 2 in 3 so prikazani na sliki levo, vzorca 4 in 5 pa na sliki desno.



Slika 25: Absorpcijski spekter vzorcev mladega vina v območju valovne dolžine 400-440 nm po filtraciji. Vzorci 1, 2 in 3 so prikazani na sliki levo, vzorca 4 in 5 pa na sliki desno.

Iz slik 25 in 26 je razvidno, da so vrednosti absorpcijskih spektrov pred filtracijo bistveno večje v primerjavi z vrednostmi po filtraciji, kar je v skladu z izmerjeno absorbanco (slika 24). Prav tako so pred filtracijo veliko večje razlike med ponovitvama, predvsem pri vzorcu 1, kar pojasnjuje tudi največji σ pri tem vzorcu, prikazan na sliki 24. Pri vzorcu 2 pred filtracijo med ponovitvama skoraj ni bilo razlik v barvi, po filtraciji pa je bila obarvanost vzorca 2 v primerjavi z ostalimi vzorci najmanjša, kar je razvidno tudi iz slike 24. Pri vzorcu 3 je bila razlika v obarvanosti ponovitev srednje velika, s tem da je bila ponovitev 3A pred filtracijo najmanj obarvana (v primerjavi z vzorci 1, 2 in 4), po filtraciji pa je bila ravno ta ponovitev najbolj obarvana. Med ponovitvama vzorca 4 so bile pred filtracijo precejšnje razlike v obarvanosti in sta bili tudi obe bolj obarvani kot vzorec 5. Po filtraciji pa med ponovitvama vzorca 4 praktično ni bilo razlik, imeli pa sta slabšo obarvanost v primerjavi z vzorcem 5. Pred filtracijo so bile tudi pri vzorcu 5 med ponovitvama manjše razlike v obarvanosti, medtem ko je bila po filtraciji ta razlika praktično zanemarljiva. Vzorec 5 je bil pred filtracijo v primerjavi z ostalimi vzorci najmanj obarvan, po filtraciji pa je bil neprimerno bolj obarvan in je imel v primerjavi z ostalimi vzorci tudi največjo obarvanost, kar je razvidno tudi iz slike 24.

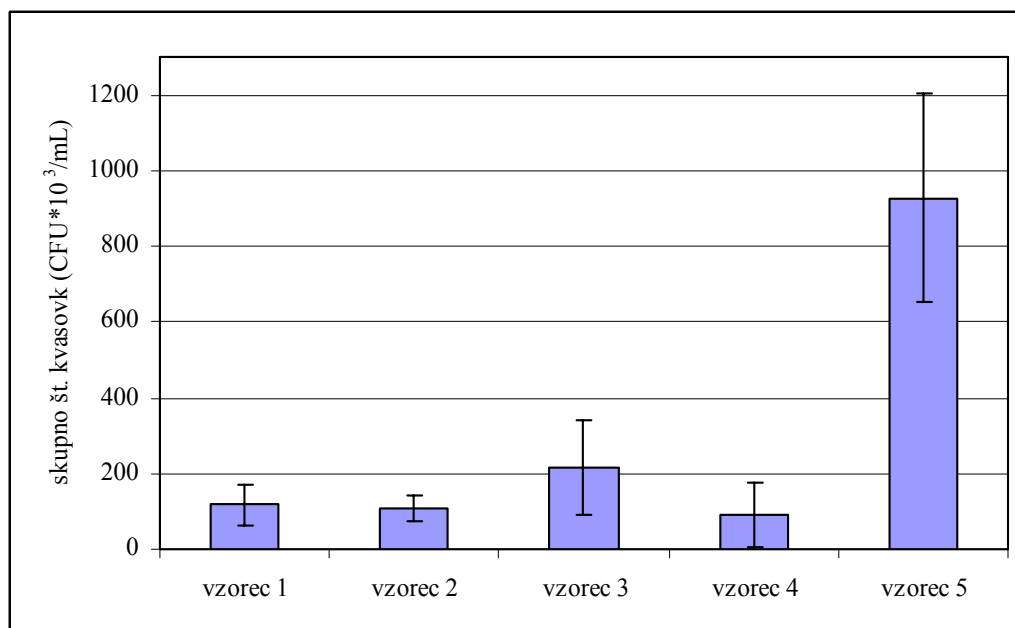
4.4 REZULTATI MIKROBIOLOŠKE ANALIZE

Po končani alkoholni fermentaciji smo določali skupno število kvasovk v mladih vinih ter naredili mikrobiološke slike kvasnih celic v drožeh in v usedlini po petmesečnem zorenju vina.

4.4.1 Skupno število kvasovk

Na začetku alkoholne fermentacije (faza razmnoževanja kvasovk), ki traja 2 do 5 dni, kvasna populacija naraste do 10^7 CFU/mL. Naslednjih 8 dni so kvasovke v stacionarni fazi rasti. Po koncu alkoholne fermentacije oziroma v pojemajoči fazi rasti, ki lahko traja nekaj tednov, pa se živa kvasna populacija zreduceira do 10^5 CFU/mL (Košmerl, 2008).

Po končani fermentaciji smo določili skupno število kvasovk v pridelanem mladem vinu. Rezultati posameznih ponovitev vzorcev so prikazani v prilogi K. Na sliki 27 pa je prikazano povprečje obeh ponovitev posameznih vzorcev ter σ .



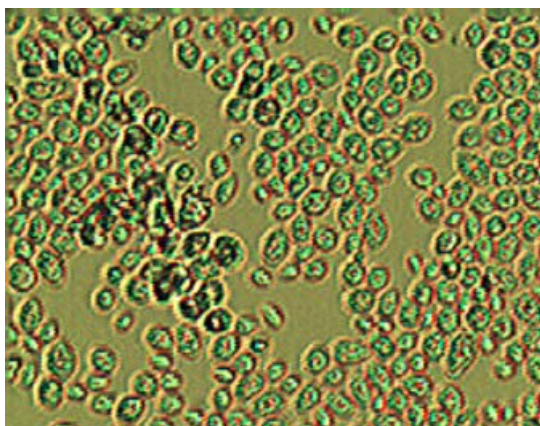
Slika 26: Skupno število kvasovk v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk.

Iz slike 27 je razvidno, da je imel vzorec 5 daleč največje skupno število kvasovk ($9,27 \times 10^5$ CFU/mL), kar je verjetno posledica nedokončane alkoholne fermentacije, kar potrjuje tudi visok preostanek reducirajočih sladkorjev (slika 9) in nizka vsebnost alkohola (slika 14) pri tem vzorcu. Pri vseh ostalih vzorcih je bilo skupno število kvasovk v pričakovanih območjih, kar kaže na dokončanje alkoholne fermentacije oziroma fazo odmiranja kvasovk. Pri vzorcu 5 smo določili zelo velik σ med ponovitvama, pri ostalih vzorcih pa so bili σ med ponovitvama manjši kot pri vzorcu 5, vendar še vedno precej veliki.

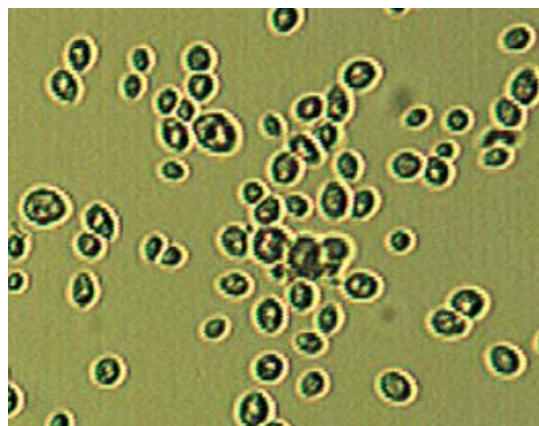
4.4.2 Mikroskopiranje kvasnih celic droži

Po kočani alkoholni fermentaciji predstavljajo droži od 1,5 do 3 % fermentirajočega volumna (Košmerl, 2007a). Droži so sestavljene iz debele plasti kvasovk, bakterij in drugih sedimentov, ki se usedejo na dno posode po končani alkoholni fermentaciji (Wondra, 2007). Definiramo jih lahko tudi kot delce, ki se usedejo na dno posode v 24 urah po fermentaciji. Sestavljene so iz rastlinskega materiala, če ni bilo zadostno opravljeno samobistrenje mošta, iz skupkov kristalov vinskega kamna in iz izločenih koloidov. Največji del pa predstavljajo odmrle kvasne celice (Košmerl, 2007a).

Po končani alkoholni fermentaciji smo naredili mikroskopske posnetke kvasovk v drožeh vzorcev vina. Na spodnjih slikah so posnetki le ene od ponovitev vzorcev, saj se kvasovke obeh ponovitev niso bistveno razlikovale.



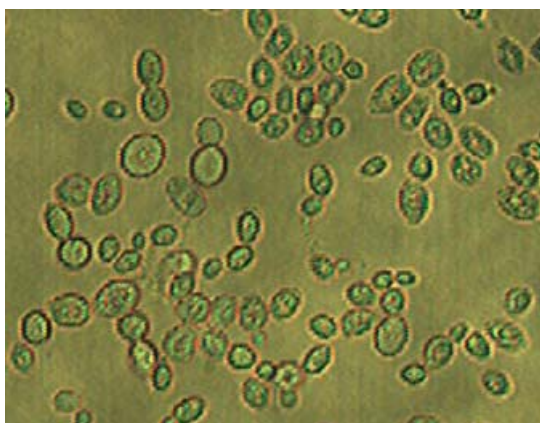
Slika 27: Mikroskopski posnetek droži vzorca 1 pri 400-kratni povečavi



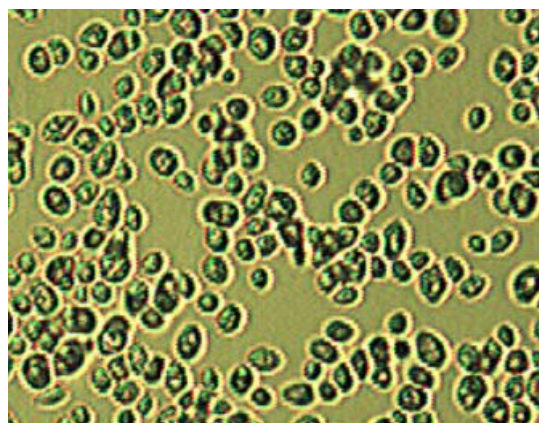
Slika 28: Mikroskopski posnetek droži vzorca 2 pri 400-kratni povečavi

Na sliki 27 je vidna čista, zelo številčna kvasna populacija. Celice so majhne in imajo obliko limon. So uniformirane in neaktivne, saj ni vidnega brstenja.

Na sliki 28 je prav tako vidna čista, a po starosti mešana kvasna populacija, ki je manj številčna kot na sliki 27. Celice so srednje velike in imajo obliko solzic. So še vedno aktivne, na sliki je opazno brstenje nekaterih celic.



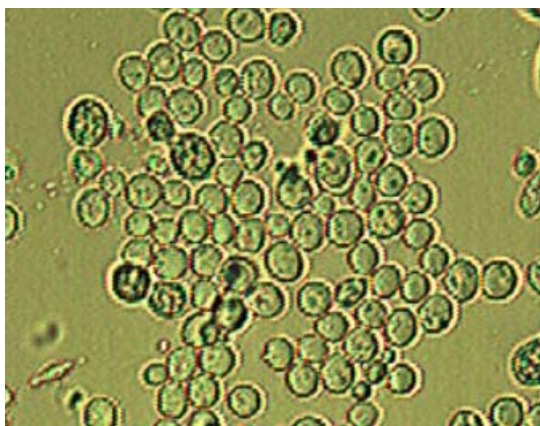
Slika 29: Mikroskopski posnetek droži vzorca 3 pri 400-kratni povečavi



Slika 30: Mikroskopski posnetek droži vzorca 4 pri 400-kratni povečavi

Na sliki 29 je vidna številčna, mešana kvasna populacija. Kvasovke so majhnih do srednjih velikosti ter elipsoidnih, kroglastih in limonastih oblik. Večje celice so neaktivne, medtem ko manjše še brstijo.

Na sliki 30 je vidna zelo številčna, čista kvasna populacija. Kvasne celice so elipsoidne oblike, srednjih velikosti. So uniformirane in neaktivne.

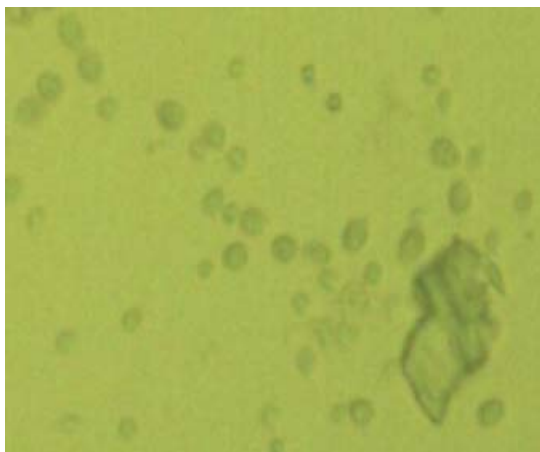


Slika 31: Mikroskopski posnetek droži vzorca 5 pri 400-kratni povečavi

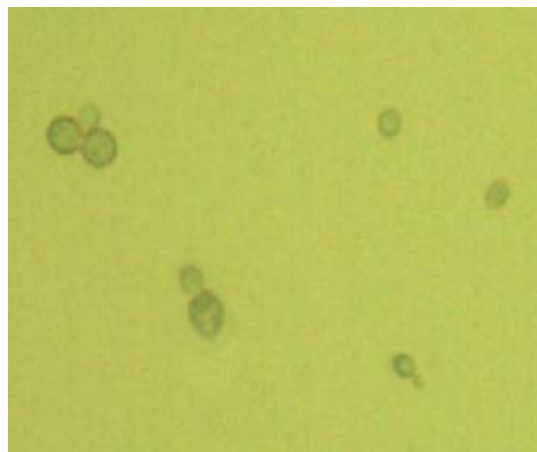
Kvasne celice na sliki 31 so opazno večje od drugih in so bolj okrogle oblike. V obliki so si zelo enotne. Kvasna populacija je številčna, čista in še zelo aktivna. Na sliki je vidno brstenje številnih kvasnih celic.

4.4.3 Mikroskopiranje usedline vina

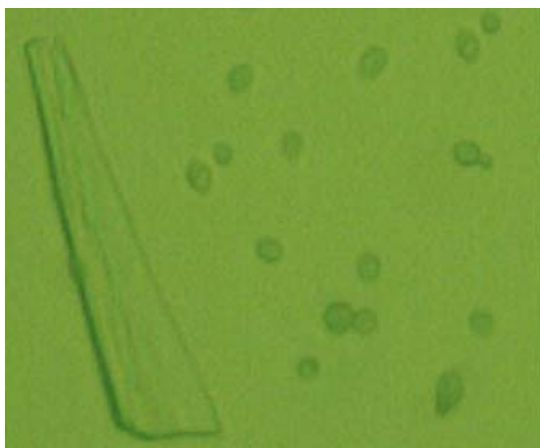
Po petih mesecih zorenja vina pri temperaturi 4 °C se je na dnu pojavila usedlina rjave barve, ki jo je sestavljala predvsem vinski kamen in odmrle kvasne celice.



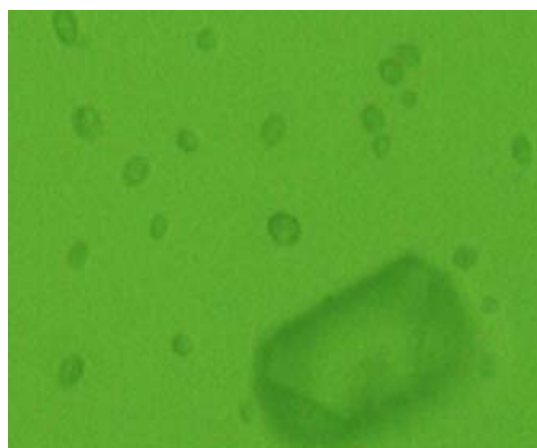
Slika 32: Mikroskopski posnetek usedline vzorca 1 pri 400-kratni povečavi



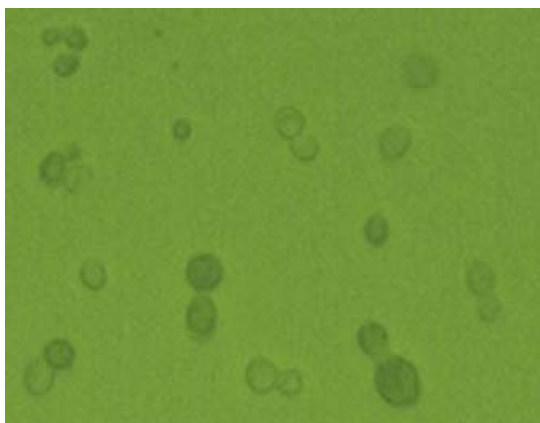
Slika 33: Mikroskopski posnetek usedline vzorca 2 pri 400-kratni povečavi



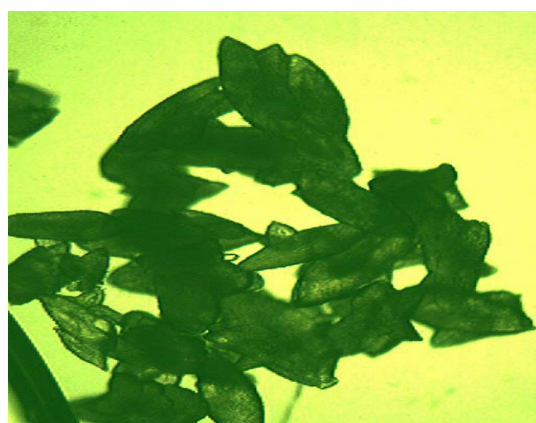
Slika 34: Mikroskopski posnetek usedline vzorca 3 pri 400-kratni povečavi



Slika 35: Mikroskopski posnetek usedline vzorca 4 pri 400-kratni povečavi



Slika 36: Mikroskopski posnetek usedline vzorca 5 pri 400-kratni povečavi



Slika 37: Mikroskopski posnetek vinskega kamna vzorca 1 pri 400-kratni povečavi

Na mikroskopskih posnetkih kvasovk v usedlini vzorcev vina lahko vidimo predvsem veliko manjšo populacijo kvasnih celic kot na mikroskopskih posnetkih kvasovk v drožeh, kar je posledica avtolize kvasovk. Kvasovke na slikah 33, 34 in 36 še zelo očitno brstijo, medtem ko so na slikah 33 in 36 vidne le odmrle kvasne celice. Na slikah 32, 34, 35 in 37 je viden vinski kamen, ki je poleg odmrlih kvasnih celic glavna komponenta usedline v vinu.

4.5 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE

4.5.1 Opis bistrosti

Bistrost pomeni odsotnost motnosti ali meglice (Košmerl, 2007b). Motnost se lahko pojavi v vinih brez čiščenja, stabilizacije in filtracije, lahko pa je posledica kemijske pomanjkljivosti, in sicer prisotnosti beljakovin, koloidov, kovinskih ionov in kristalov. Motnost lahko zato delimo na beljakovinsko, kovinsko, fenolno in mikrobiološko motnost ter na motnost, ki

nastane kot posledica kristalizacije. Glede na bistrost so vina lahko kristalno bistra ali briljantna, bistra, meglena, opalescentna in bolj ali manj motna (z ali brez usedline) (Košmerl in Wondra, 2007).

Vzorec 1 je bil razmeroma bister, vendar je prišlo do razlike v bistrosti med ponovitvama, saj je bila ena ponovitev bolj bistra kot druga, kar je razvidno tudi iz izmerjene absorbance (420 nm) obeh ponovitev, ki sta se precej razlikovali (0,648 in 0,466) oziroma je bil med njima največji σ (slika 24). Ponovitev z absorbanco oziroma intenziteto barve 0,466 je imela poleg manjše bistrosti tudi temnejšo barvo in več usedline.

Vzorec 2 je bil moten, s tem da je bila prva ponovitev bolj motna kot druga in je imela več usedline, druga ponovitev pa je imela temnejšo, bolj rjavkasto barvo. Pri merjenju absorbance obeh ponovitev pa se je izkazalo, da je imela prva ponovitev le nekoliko večjo intenziteto barve (0,497) v primerjavi z drugo ponovitvijo (0,469)(slika 24).

Vzorec 3 je bil v zgornjem delu fermentacijske steklenice bister, v spodnjem pa moten. Ena ponovitev je imela več usedline kot druga, po barvi pa sta bili enaki, kar je razvidno tudi iz izmerjene intenzitete barve obeh ponovitev (0,514 in 0,524), ki se skoraj nista razlikovali. Ponovitev z več usedline je imela izmerjeno nižjo intenziteto barve.

Vzorec 4 je bil razmeroma bister, s tem da je bila prva ponovitev bolj bistra kot druga, pri merjenju absorbance (420 nm) pa je imela prva ponovitev nekoliko večjo intenziteto bave (0,575) v primerjavi z drugo (0,572), vendar je bila ta razlika zanemarljivo majhna. Pri prvi ponovitvi je bil od zgornje četrtine proti dnu fermentacijske steklenice opazen pajčolan in je imela več usedline temnejše barve. Druga ponovitev je bila rahlo opalescentna. Barva vzorca 4 je imela zlate odtenke.

Vzorec 5 je bil moten predvsem v spodnjem delu fermentacijske steklenice, s tem da je imela ena ponovitev več usedline kot druga, v barvi pa med ponovitvama ni bilo razlik, kar je razvidno tudi iz izmerjene intenzitete barve obeh ponovitev (0,371 in 0,381), ki se skoraj nista razlikovali. Ponovitev z več usedline pa je imela izmerjeno višjo intenziteto barve.

4.5.2 Ocenjevanje vina z deskriptivno metodo po lastni presoji

Po fizikalnokemijskih in mikrobioloških analizah smo deskriptivno ocenili mlada vina in prišli do sledečih rezultatov:

Vzorec 1

Vzorec 1 je bil moten, s tem da je bila ena ponovitev bolj motna in s svetlejšim, bolj mlečnatim tonom barve kot druga. Ta ponovitev je bila tudi bolj zaprtega vonja, medtem ko je bil pri drugi ponovitvi vonj intenzivnejši, predvsem bolj hlapen in alkoholnen. V vonju sta si

bili ponovitvi podobni in sta bili obe rahlo oksidirani. Prav tako sta si bili podobni v okusu, ki je bil prazen, voden, z izstopajočo kislino. Voden in prazen okus je lahko posledica razmeroma nizke vsebnosti sladkorja prostega ekstrakta (19,25 g/L) pri tem vzorcu.

Vzorec 2

Pri vzorcu 2 je bila prva ponovitev značilno bolj motna in mlečnata kot druga in je imela tudi svetlejši odtenek barve. Vonj je bil intenziven, hlapen in alkoholno pekoč. Okus je bil v primerjavi z vzorcem 1 polnejši, bolj harmoničen, a rahlo pekoč. Druga ponovitev pa je bila v barvi rahlo oksidirana, z zaprtim, nehlapnim vonjem in z mlečno noto (diacetil). Okus je bil primerljiv prvi ponovitvi, le nekoliko bolj poln, saden, maščoben, z nekoliko manj svežine in daljšim pookusom. V tem vzorcu je bilo zaznati, da je že potekel biološki razkis.

Vzorec 3

Pri vzorcu 3 smo pri prvi ponovitvi v primerjavi z vzorcema 1 in 2 opazili največjo meglico in mlečnatost. Vonj je bil prijetno saden, a nekoliko zaprt. Okus je bil srednje poln, uravnotežen, deloval pa je rahlo omledno zaradi pomanjkanja svežine. Pri drugi ponovitvi je bila bistrost sprejemljiva, bila je intenzivnejše rumeno-zelene barve, z intenzivnejšim sadnim vonjem (po tropskem sadju) z večplastno cvetico in izraženo fermentacijsko aromo. V okusu je bila po polnosti primerljiva s prvo ponovitvijo, le z nekoliko izstopajočimi kislinami in brez izrazito prepoznavne sadnosti. Pookus je bil prijeten in dolg, vendar krajši kot pri prvi ponovitvi.

Vzorec 4

Pri vzorcu 4 je bila prva ponovitev bolj motna v primerjavi z drugo, bila je rumene, rahlo oksidirane in mlečnate barve ter hlapen, pekoč vonj z rahlo oksidiranim tonom. Okus je bil prazen, omleden, brez svežine in kratek, oksidiran in z nekoliko maslenim pookusom. Druga ponovitev je bila za razliko od prve bistrejša, a s prisotno meglico. Barva je bila intenzivnejša, vendar blede z zelenim odtenkom. Vonj je bil prijetno saden, srednje intenziven, oksidiran (a ne pekoč), okus pa prijeten, poln in harmoničen z odličnim razmerjem med sladkorji in kislinami. V pookusu je bil ta vzorec svež, saden in ni bil maščoben kot pri prvi ponovitvi.

Vzorec 5

Pri vzorcu 5 sta bili obe ponovitvi motni in mlečnati, druga ponovitev je imela v primerjavi s prvo nekoliko bolj intenzivno barvo. Pri obeh ponovitvah je bil vonj hlapen, oksidativen in z zaznavno povišano koncentracijo očetne kisline. Pri obeh je bila prikrita ali maskirana sortnost, manj sta bili izraženi sadnost in prijetnost, vonj pa ni bil alkoholno pekoč. Pri prvi ponovitvi je bil v okusu močno zaznaven preostanek sladkorja s še vedno zaznavno kislostjo (neharmoničnost) in očetno kislino. Vzorec je bil v okusu izredno kratek. Pri drugi ponovitvi pa je bil sladkor bolj povret in je zato delovala bolj harmonično, bolj polno, očetna kislina ni bila zaznavna, le v okusu je bilo čutiti CO₂.

5 SKLEPI

V diplomski nalogi smo poskušali ugotoviti, kako različni sevi vinskih kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* vplivajo na potek alkoholne fermentacije ter kemijske in senzorične lastnosti vina. Na osnovi opravljene raziskave smo prišli do naslednjih sklepov:

- Starterska kultura vzorca 5 je imela najšibkejše vrelnе sposobnosti v danih razmerah fermentacije, pri katerih so vse ostale starterske kulture normalno dokončale fermentacijo.
- Vsi sevi kvasovk, razen seva kvasovk v vzorcu 5, so povreli večino reducirajočih sladkorjev (pod 1 g/L). Sev kvasovk v vzorcu 5 pa je, s preostankom reducirajočih sladkorjev 6,25 g/L, povrel najmanj sladkorjev.
- Sev kvasovk v vzorcu 5 je med alkoholno fermentacijo tvoril zakonsko prevelike koncentracije hlapnih kislin (1,13 g/L). Sev kvasovk v vzorcu 2 pa je med alkoholno fermentacijo tvoril razmeroma visoke vsebnosti hlapnih kislin (0,69 g/L), ki pa so bile občutno nižje v vzorcu 3 z mešano kulturo sevov kvasovk (0,41 g/L).
- Vrednosti relativne gostote so bile pri vseh vzorcih v pričakovanem območju (blizu 1).
- Vzorec 5 je bil ekstraktno bolj bogat kot ostali. Vsi vzorci pa so imeli koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta v pričakovanem območju (7-30 g/L).
- Najmanjšo koncentracijo alkohola je tvoril sev kvasovk v vzorcu 5, največjo pa sev kvasovk v vzorcu 4. Mešana kultura kvasovk v vzorcu 3 je tvorila občutno večjo koncentracijo alkohola kot posamezen sev teh kvasovk.
- Vrednosti pH so bile pri vseh vzorcih višje od vrednosti pH mošta in v pričakovanih območjih (manj kot 3,6).
- Vsi vzorci so imeli koncentracijo skupnih kislin v pričakovanem območju (6-9 g/L). V vzorcu 5 je bila koncentracija skupnih kislin večja kot v moštu, medtem ko je bila pri ostalih vzorcih pričakovano manjša.
- Vsi vzorci so imeli od preiskovanih organskih kislin največ mlečne kisline, predvsem vzorec 3 z mešano kulturo kvasovk. Vsi vzorci so vsebovali več jabolčne kot vinske kisline in so si bili v koncentraciji citronske kisline skoraj enotni. Največ jantarne kisline je tvoril sev kvasovk v vzorcu 1, najmanj pa sev v vzorcu 5.
- V koncentracijah etilacetata, 2-fenil etil acetata, 1-propanola, izobutanola in 2-fenil etanola med vzorci ni bilo bistvenih razlik. Vzorec 1 je vseboval večje koncentracije acetaldehida, vzorec 5 pa je vseboval največ metil- in etil laktata ter najmanj 1-butanola in izoamil alkohola. Največjo koncentracijo izoamil alkohola smo določili v vzorcu 3. Kvasovke vzorca 4 niso tvorile metil in etil laktata.
- Vzorca 1 in 4 sta imela pred filtracijo nekoliko večjo intenziteto barve od ostalih, najmanjšo intenziteto barve pa je imel vzorec 5. Po filtraciji vzorcev je imel vzorec 1 nekoliko večjo intenziteto barve od ostalih, ki so si bili v intenziteti barve skoraj enotni.

- V vzorcu 5 so bile kvasovke prisotne v veliko večjem številu kot pri ostalih vzorcih, pri katerih so bile kvasovke v stacionarni fazi rasti oziroma v fazi odmiranja. V vzorcu 3 z mešano kulturo kvasovk pa je bilo skupno število kvasovk večje kot pri vzorcih s posameznim sevom teh kvasovk.
- Takoj po zaključku fermentacije sta bila najbolj bistra vzorca 1 in 4, najbolj moten pa je bil vzorec 2.
- Različni sevi kvasovk so iz istega mošta proizvedli senzorično zelo različno vina, na kar je vplivala tudi razlika v fermentacijskih poskusih ponovitev z istim sevom ali kombinacijo kvasovk.

6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti vpliv različnih sevov kvasovk na potek alkoholne fermentacije ter na izoblikovanje fizikalnokemijskih in senzoričnih lastnosti vina. Vzorce mošta sorte laški rizling smo inokulirali s štirimi različnimi sevi kvasovk, primerjalno pa smo inokulirali tudi kombinacijo dveh od teh štirih sevov kvasovk ter vodili alkoholno fermentacijo pri temperaturi 14-15 °C.

Med spremljanjem poteka alkoholne fermentacije smo opazili razlike v hitrosti fermentacije in s tem kinetiki oddanega CO₂ pri sevu kvasovk v vzorcu 5, ki verjetno ni bil tako prilagojen na fermentacijske prazmere ali pa je imel šibkejša vrelne sposobnosti, saj je alkoholna fermentacija s tem sevom potekala najpočasneje oziroma se tudi ni zaključila.

Po zaključku alkoholne fermentacije smo opravili osnovne fizikalnokemijske, mikrobiološke in senzorične analize vzorcev mladega vina. Ugotovili smo, da različni sevi kvasovk značilno vplivajo na nekatere fizikalnokemijske parametre in s tem na senzorične lastnosti vina.

Najbolj je izstopal sev kvasovk v vzorcu 5, s katerim je imelo pridelano vino fizikalnokemijske parametre značilno različne od ostalih, kar pa je predvsem posledica nedokončane alkoholne fermentacije. Vzorec 5 je imel največji preostanek raducirajočih sladkorjev in posledično najmanjšo koncentracijo alkohola. Vseboval je največje koncentracije skupnih in hlapnih kislin ter vinske, jabolčne in jantarne kisline, kar je vzrok za najnižjo vrednost pH tega vzorca. Vzorec je bil najbolj ekstraktno bogat in je tudi največjo gostoto, vseboval pa je najmanj mlečne kisline. Vzorec je vseboval največ etilacetata, metil laktata, etil laktata in izobutanola ter najmanj 1-butanola, izoamil alkohola in 2-fenil etanola. Senzorično je bil vzorec predvsem zaradi visokih vsebnosti raducirajočih sladkorjev in kislin najslabše ocenjen in sicer kot neharmoničen, z manj izraženo sortnostjo in sadnostjo ter z zaznavno očetno kislino v vonju in okusu.

Vzorec 1 je imel najvišjo vrednost pH in največje koncentracije citronske in jantarne kisline, zaradi česar je bila barva vina svetlejša, v okusu pa so izstopale kisline. Prav tako je ta vzorec vseboval največ acetaldehida, najmanj izobutanola in nič metanola.

Vzorec 2 je vseboval najmanj reducirajočih sladkorjev, skupnih kislin, tudi najmanj vinske in jabolčne kisline, zaradi česar je deloval bolj harmonično in polno, zaradi visoke vsebnosti alkohola pa tudi pekočno. Vzorec je vseboval največ 1-propanola, 1-butanola in 2-fenil etanola ter najmanj 2-fenil etil acetata. Prav tako je imel ta vzorec vina najmanjšo relativno gostoto in skupni suhi ekstrakt.

Vzorec 3 z mešano kulturo kvasovk je izstopal predvsem z največjo koncentracijo mlečne kisline, ki pa v vonju ni bila zaznavna. V primerjavi z vzorci s posameznimi sevi teh kvasovk (vzorca 1 in 2) je vzorec z mešano kulturo kvasovk vseboval večji koncentraciji alkohola in jabolčne kisline, ter manjši koncentraciji citronske in vinske kisline. Senzorično je imel ta

vzorec, v primerjavi z vzorci s posameznimi sevi teh kvasovk, veliko intenzivnejši saden vonj, večplastno cvetico in bolj izražene fermentacijske arome, kar pa je v skladu z najvišjo vsebnostjo izoamil alkohola pri tem vzorcu.

Vzorec 4 je bil alkoholno najbolj bogat, kar se je odražalo z alkoholno pekočim vonjem vina. Pri tem vzorcu smo določili najvišjo vsebnost metanola ter najnižjo vsebnost acetaldehida, etilacetata in 1-propanola, medtem ko metil laktata sploh ni vseboval. V okusu je bil ta vzorec prijeten, poln in harmoničen z odličnim razmerjem med sladkorji in kislinami.

Večja harmoničnost in uravnoteženost okusa, polnost in večja kompleksnost arome so tisti dejavniki, ki poglavitno vplivajo na zelene senzorične parametre in prepričajo marsikaterega ljubitelja dobrega vina. Z izbiro primernege seva kvasovk lahko pridelamo vino z zelenimi senzoričnimi lastnostmi.

7 VIRI

Amerine M. A., Ough C. S. 1988. Methods for analyses of musts and wines. New York, John Wiley & Sons: 377 str.

Batič K. 2005. Novejši tehnološki postopki pri predelavi grozdja sorte Rebula. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-3.

Bavčar D. 2006. Kletarjenje danes. Ljubljana, Kmečki glas: 286 str.

Berthels N.J., Cordero Otero R.R., Bauer F.F., Thevelein J.M., Pretorius I.S. 2004. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. FEMS Yeast Research, 4: 683-689.

Bizaj E. 2004. Seminarska naloga pri predmetu Biotehnologija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 7-9.

Bisson L. F., Boulton R. B., Kunkee R. E., Singleton V. L. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, Chapman & Hall: s. 76-88.

Blaškovič Z. 1978. Kemična analiza vina sorte Rebula s posebnim poudarkom na sestavo organskih kislin. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Živilsko-tehnološki oddelek: 5-19.

Bubić V. 2000. Populacijska dinamika kvasovk v spontanah fermentacijah mošta Malvazije. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 3-13.

Fleet G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. International Journal of Food Microbiology, 86: 11-22.

Fleet G.H. 2002. Wine microbiology and biotechnology. London, Taylor & Francis: 289-420.

Graeme M.V. 2000. Microbiology of wine-making. V: Encyclopedia of food microbiology. Vol. 3. Robinson R.K. (ed.). San Diego, Academic Press: 2306-2310.

Jackson R.S. 1994. Wine science. London, Academic Press Limited: 178-277.

King E., Swiegers H., Travis B., Francis L., Pretorius S., Connors P. 2007. Modulating Sauvignon Blanc aroma through co-inoculated fermentations. Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker, 225: 102-108.

Kordiš-Krapež M. 1996. Določanje organskih kislin s HPLC. Interno gradivo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-3.

Košmerl T. 2007a. Alkoholna fermentacija mošta: izbrana poglavja pri predmetu tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 95 str.

Košmerl T. 2007b. Senzorične lastnosti mošta in vina: študijsko gradivo za pokuševalce vina, mošta in drugih proizvodov iz grozdja in vina. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 str.

Košmerl T. 2008. Vpliv dušikovih spojin grozdja na kinetiko alkoholne fermentacije. Zapiski iz predavanj pri predmetu Enologija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.

Košmerl T., Wondra M. 2007. Senzorično in kemijsko ovrednotenje bistrosti vina. V: Vinarski dan. Ljubljana, 6. junij 2007. Čuš F. (ur.). Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije: 5-14.

Košmerl T., Kač M. 2007. Osnovne kemijske analize mošta in vina: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. 3. izd. Popravljen in dopolnjen. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 106 str.

Košmerl T. 1999. Reološke lastnosti vina. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 121 str.

Lallemant: selekcionirano iz narave. 2008. Maribor, Jurana d.o.o.: 12 str.

Mateo J.J., Jiménez M., Pastor A., Huerta T. 2001. Yeast starter cultures affecting wine fermentation and volatiles. Food Research International, 34: 307-314.

Milek M. 2001. Vpliv kemijske sestave grozdnega soka kultivarja Beli pinot in Sauvignon na kakovost vina. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-44.

Molina A.M., Guadalupe V., Varela C., Swiegers J.H., Pretorius I.S., Agosin E. 2009. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related commercial wine yeast strains. Food Chemistry, 117, 2: 189-195.

Navodilo o fizikalnokemijskih analizah mošta in vina. 2001. Uradni list Republike Slovenije, 11, 43: 4788-4806

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

Patel S., Shibamoto T. 2002. Effect of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on production of volatiles in Napa Gamay wine and Petite Sirah wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 5649-5653.

Povhe-Jemec K. 1997. Spremljanje kinetike rasti populacije kvasovk v moštu Terana s pulzno elektroforezo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 7-16.

Pravilnik o spremembah in dopolnitvah Pravilnika o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu. 2005. Uradni list Republike Slovenije, 15, 112: 12183-12183

Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 43: 5336-5357

Pretorius I.S. 2002. Vinske kvasovke za tretje tisočletje: sodobni pristopi k starodavni umetnosti vinarstva. V: Pomen mikrobiologije in biotehnologije v proizvodnji vina. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-12.

Raspor P. 1996. Kvasovke. V: Biotehnologija: osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA, d.o.o.: 69-93.

Raspor P., Šikovec S. 1992. Proizvodnja fermentiranih pijač. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur.) Ljubljana, BIA: 485-505.

Regodón Mateos J.A., Pérez-Nevado F., Ramírez Fernández M. 2006. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain on the major volatile compounds of wine. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 151-157.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donéche B., Lonvaud A. 2006a. Handbook of enology. Vol. 1. The microbiology of wine and vinifications. 2nd ed. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.: 1-79.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2006b. Handbook of enology. Vol. 2. The chemistry of wine stabilization and treatments. 2nd ed. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.: 3-230.

Romano P., Fiore C., Paraggio M., Capece A. 2003. Function of yeast species and strains in wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 169-180.

Swiegers J.H., Francis I.L., Herderich M.J., Pretorius I.S. 2006. Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery: The choice of yeast for fermentation offers great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc wines. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 21: 34-42.

Swiegers J.H., Bartowsky E.J., Henschke P.A., Pretorius I.S. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11: 139-173.

Šikovec S. 1996. Vino pijača doživetja. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 80-130.

Šikovec S. 1993. Vinarstvo od grozdja do vina. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 283 str.

Šikovec S. 1987. Za vsakogar nekaj o vinu. Ljubljana, ČGP Kmečki glas, 204 str.

Taks M. 2000. Spremljanje dozorevanja grozdja kultivarja Laški rizling v vinorodni deželi Podravje. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 3-11.

Thorgate J.H. 1998. Yeast strain and wine flavour: nature or nurture. V: Chemistry of wine flavour. Waterhouse A.L., Ebeler E.E. (eds.). Washington, DC, Oxford University Press: 66-80.

Wondra M. 2007. Zapiski iz predavanj pri predmetu Tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.

Wondra M. 1998. Vpliv kvasovk na senzorične lastnosti vina. V: Vinogradniško-vinarski dan. Ljubljana, 30. januar 1998. Marinček L. (ur.). Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije: 64-75.

vzorca	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
konc. RS (g/L)	0,95	0,95	0,40	0,70	0,80	0,55	0,65	0,65	6,50	7,00
povpr. vred.	0,95		0,55		0,675		0,65		6,75	
σ	0		0,15		0,125		0		0,25	

Priloga B: Vsebnosti hlapnih kislin v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

Oznaka vzorca	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
Hlapne kisline (g/L)	0,31	0,32	0,67	0,71	0,39	0,43	0,31	0,30	1,17	1,09
povpr. vred.	0,32		0,69		0,41		0,30		1,13	
σ	0,0075		0,022		0,018		0,0015		0,043	

Priloga C: Vrednosti relativne gostote v mladih vinih in po zaključeni alkoholni fermentaciji (dec. 08) in in štiri mesece kasneje (maj 09) s štirimi različnimi sevi kvasovk

Oznaka vzorca	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
rel. gost. (dec. 08)	0,99235	0,99223	0,99206	0,99194	0,99195	0,99222	0,99230	0,99213	0,99564	0,99597
povpr. vred.	0,99229		0,99200		0,99209		0,99222		0,99581	
σ	0,00006		0,00006		0,000135		0,000085		0,000165	
rel. gost. (maj 09)	0,99149	0,99144	0,99135	0,99131	0,99113	0,99136	0,99170	0,99167	0,99237	0,99259
povpr. vred.	0,99147		0,99133		0,99125		0,99169		0,99248	
σ	0,000025		0,00002		0,000115		0,000015		0,00011	

Priloga D: Vsebnosti skupnega in sladkorja prostega ekstrakta v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji (dec. 08) in in štiri mesece kasneje (maj 09) s štirimi različnimi sevi kvasovk

Oznaka vzorca	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
SPE (g/L)	19,50	19,00	19,49	18,81	19,42	19,87	19,80	20,87	22,17	22,30
povpr. vred.	19,25		19,15		19,65		20,34		22,24	
σ	0,25		0,34		0,225		0,535		0,065	
SE (dec. 08) (g/L)	20,45	19,95	19,89	19,51	20,22	20,42	20,45	21,52	28,67	29,30
povpr. vred.	20,20		19,70		20,32		20,99		28,99	
σ	0,25		0,19		0,1		0,535		0,315	
SE (maj 09) (g/L)	18,18	18,50	17,79	17,70	17,88	18,00	18,74	19,09	20,20	20,60
povpr. vred.	18,34		17,75		17,94		18,92		20,40	
σ	0,16		0,045		0,06		0,175		0,2	

Priloga E: Vsebnosti alkohola v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk (dec 08) in 4 mesece kasneje (maj 09)

Oznaka vzorca	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
Vol.% alkohola (dec 08)	11,75	11,68	11,82	11,78	12,02	11,86	11,92	12,30	11,62	11,57
povpr. vred.	11,72		11,8		11,94		12,11		11,6	
σ	0,035		0,02		0,08		0,19		0,025	
Vol.% alkohola (maj 09)	11,73	11,89	11,74	11,75	11,95	11,79	11,74	11,89	11,65	11,59
povpr. vred.	11,81		11,745		11,87		11,815		11,62	
σ	0,08		0,005		0,08		0,075		0,03	

Priloga F: Vrednosti pH v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

Oznaka vzorca	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
---------------	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

pH	3,394	3,388	3,380	3,383	3,371	3,374	3,378	3,372	3,330	3,312
povpr. vred.	3,391		3,3815		3,3725		3,375		3,321	
σ	0,003		0,0015		0,0015		0,003		0,009	

Priloga G: Vsebnosti skupnih (TK₂) in titracijskih (TK₁) kislin v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

Oznaka vzorca	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
TK ₁ (g/L)	7,14	7,00	6,81	6,73	6,90	6,94	6,95	6,90	7,92	7,96
povpr. vred.	7,07		6,77		6,92		6,925		7,94	
σ	0,07		0,04		0,02		0,025		0,02	
TK ₂ (g/L)	7,40	7,27	7,08	6,97	7,17	7,17	7,22	7,18	8,25	8,29
povpr. vred.	7,335		7,025		7,17		7,2		8,27	
σ	0,065		0,055		0		0,02		0,02	

Priloga H: Vsebnosti organskih kislin v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

	oznaka vzorca	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
org. kisl.											
CK (g/L)		0,53	0,51	0,5	0,53	0,48	0,53	0,46	0,49	0,46	0,54
	povpr.	0,52		0,52		0,51		0,48		0,50	
	σ	0,01		0,02		0,03		0,02		0,04	
VK (g/L)		2,02	1,73	1,7	1,84	2,06	1,73	2,06	1,93	2,06	1,99
	povpr.	1,88		1,77		1,90		2,00		2,03	
	σ	0,14		0,07		0,16		0,06		0,04	
JK (g/L)		3,06	2,78	2,79	3,04	3,11	3,04	3,09	3,06	3,09	3,14
	povpr.	2,92		2,92		3,08		3,08		3,12	
	σ	0,14		0,12		0,03		0,01		0,03	
MK (g/L)		4,09	3,8	3,65	4,24	4,32	4,29	3,93	4,35	3,93	3,93
	povpr.	3,95		3,95		4,31		4,14		3,93	
	σ	0,14		0,30		0,02		0,21		0,00	
JanK (g/L)		0,47	0,51	0,5	0,36	0,36	0,34	0,24	0,4	0,24	0,22
	povpr.	0,49		0,43		0,35		0,32		0,23	
	σ	0,02		0,07		0,01		0,08		0,01	

Priloga I: Vsebnosti hlapnih spojin in višjih alkoholov v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

	oznaka vzorca	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
Hlapna spoj./VA (mg/L)											
acetaldehid		122,85	43,18	47,81	39,35	45,99	41,67	35,99	29,89	36,06	35,06
	povpr.	83,01		43,58		43,83		32,94		35,56	
	σ	39,84		4,23		2,16		3,05		0,50	
etilacetat		21,05	18,60	20,97	20,55	20,32	19,22	19,22	20,23	21,91	21,75

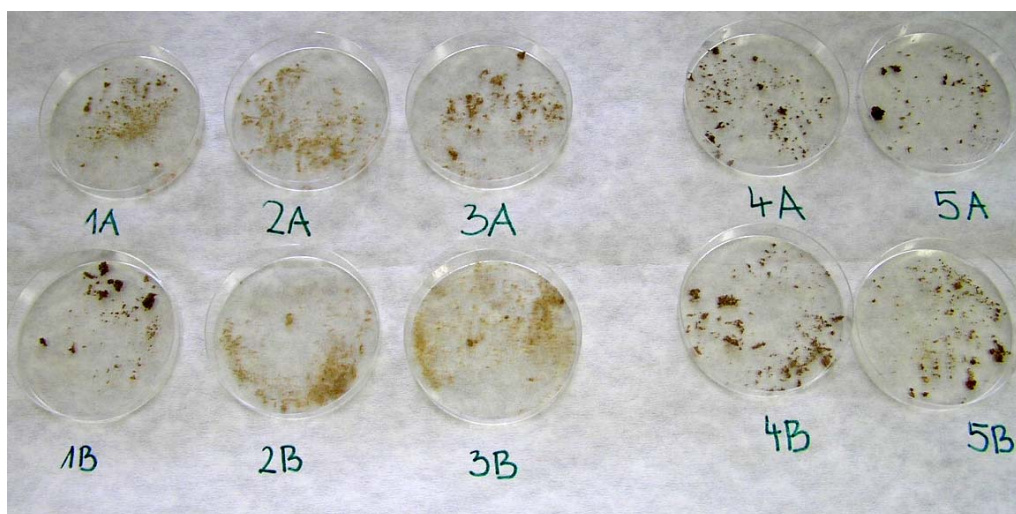
	povpr.	19,83	20,76	19,77	19,72	21,83
	σ	1,23	0,21	0,55	0,50	0,08
metanol		0,00 0,00	25,84 25,92	25,95 25,99	26,01 25,99	25,87 25,93
	povpr.	0,00	25,88	25,97	26,00	25,90
	σ	0,00	0,04	0,02	0,01	0,03
1-propanol		53,96 54,01	54,02 54,00	54,01 53,98	53,96 53,95	53,98 54,03
	povpr.	53,99	54,01	54,00	53,96	54,00
	σ	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02
izobutanol		48,16 48,13	51,10 50,77	48,74 48,79	49,31 49,38	50,96 51,77
	povpr.	48,14	50,93	48,76	49,34	51,36
	σ	0,01	0,17	0,03	0,03	0,41
1-butanol		59,50 49,91	74,85 51,03	51,10 51,84	53,30 66,30	50,53 50,13
	povpr.	54,71	62,94	51,47	59,80	50,33
	σ	4,79	11,91	0,37	6,50	0,20
izoamil alko.		177,20 176,25	180,39 174,02	183,18 184,89	172,37 172,91	149,65 151,42
	povpr.	176,73	177,20	184,04	172,64	150,54
	σ	0,47	3,19	0,86	0,27	0,88
metil laktat		0,17 0,00	0,00 0,23	0,03 0,00	0,00 0,00	0,77 0,64
	povpr.	0,09	0,11	0,01	0,00	0,71
	σ	0,09	0,11	0,01	0,00	0,06
etil laktat		0,13 0,15	0,16 0,12	0,21 0,10	0,10 0,13	0,20 0,16
	povpr.	0,14	0,14	0,15	0,12	0,18
	σ	0,01	0,02	0,05	0,01	0,02
2-fenil etil acetat		48,46 48,61	48,44 48,50	49,03 48,71	48,49 48,66	48,96 49,51
	povpr.	48,54	48,47	48,87	48,58	49,24
	σ	0,08	0,03	0,16	0,09	0,28
2-fenil etanol		53,01 53,82	55,55 53,32	52,91 53,57	53,41 52,89	53,19 52,94
	povpr.	53,42	54,44	53,24	53,15	53,07
	σ	0,40	1,12	0,33	0,26	0,12

Priloga J: Absorbanca pri 420 nm v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk pred in po filtraciji

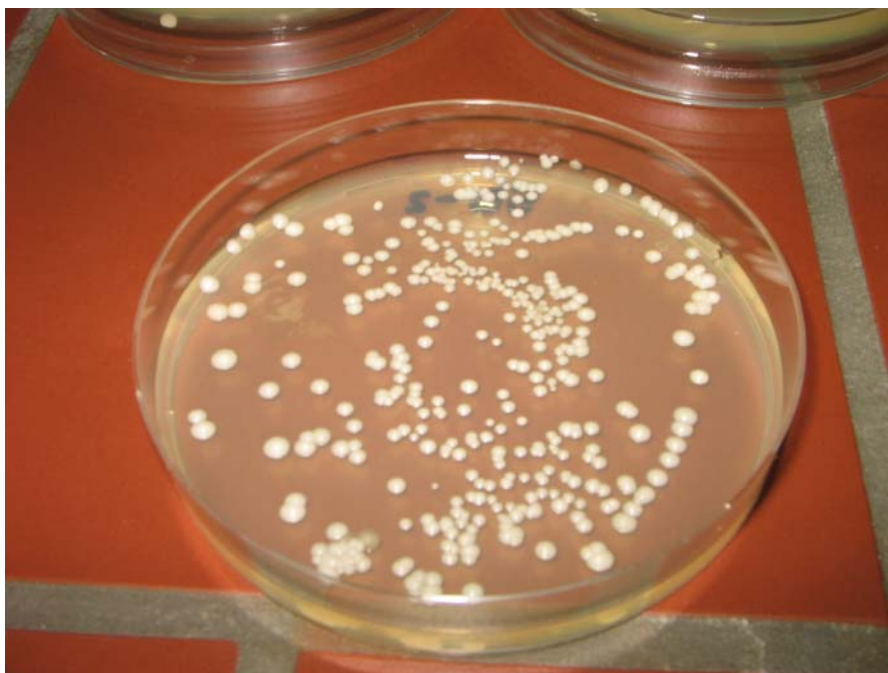
Oznaka vzorca	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
A ₄₂₀ pred filtracijo	0,647	0,466	0,497	0,469	0,514	0,524	0,575	0,572	0,371	0,381
povpr. vred.	0,557		0,483		0,519		0,5735		0,376	
σ	0,0905		0,014		0,005		0,0015		0,005	
A ₄₂₀ po filtraciji	0,182	0,101	0,09	0,094	0,095	0,097	0,098	0,096	0,11	0,107
povpr. vred.	0,142		0,092		0,096		0,097		0,109	
σ	0,0405		0,002		0,001		0,001		0,0015	

Priloga K: Skupno število kvasovk v mladih vinih po zaključeni alkoholni fermentaciji s štirimi različnimi sevi kvasovk

Oznaka vzorca	1A	1B	2A	2B	3A	3B	4A	4B	5A	5B
Skupno št. kvasovk (CFU/mL)	161	75	126	93	326	106	166	18	880	974
povpr. vred.	118		109,5		216		92		927	
σ	54,60		32,87		125,30		83,88		276,62	



Priloga L: Suha usedlina posameznih vzorcev po petmesečnem zorenju vina



Priloga M: Kolonije kvasnih celic vzorca 5 na plošči s hranilnim gojiščem YPD