

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jernej SMOLNIKAR

**VPLIV SEVOV KVASOVK IN FERMENTACIJSKE
TEMPERATURE NA AROMATIČNE ZNAČILNOSTI
MLADIH VIN SORTE SAUVIGNON**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jernej SMOLNIKAR

**VPLIV SEVOV KVASOVK IN FERMENTACIJSKE TEMPERATURE
NA AROMATIČNE ZNAČILNOSTI MLADIH VIN SORTE
SAUVIGNON**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF YEAST STRAINS AND FERMENTATION
TEMPERATURE ON AROMATIC CHARACTERISTICS OF YOUNG
WINES SAUVIGNON**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

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

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Tatjana Košmerl, za somentorico prof. dr. Helena Prosen in za recenzentko doc. dr. Polona Jamnik.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Košmerl

Somentorica: prof. dr. Helena Prosen

Recenzentka: doc. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Jernej Smolnikar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 663.252/.253:582.282.3:543.61:543.92(043)=163.6
KG	sauvignon/ mošt/ mlado vino/ starterske kulture/ vinske kvasovke/ alkoholna fermentacija/ fizikalnokemijske lastnosti/ kemijska sestava/ senzorične lastnosti/ aromatične spojine
AV	SMOLNIKAR, Jernej
SA	KOŠMERL, Tatjana (mentorica)/ PROSEN, Helena (somentorica)/ JAMNIK, Polona (recezentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2012
IN	VPLIV SEVOV KVASOVK IN FERMENTACIJSKE TEMPERATURE NA AROMATIČNE ZNAČILNOSTI MLADIH VIN SORTE SAUVIGNON
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 76 str., 10 pregl., 40 sl., 11 pril., 31 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V moštu vinske kvasovke pretvarjajo sladkor v alkohol, pri tem pa tvorijo tudi druge spojine, ki bistveno vplivajo na fizikalno-kemijsko sestavo, senzorično kakovost in končno kakovost pridelanega vina. Le-te so poleg zdravstvenega stanja in zrelosti grozdja ob trgatvi ključnega pomena za pridelavo vina z zelenimi lastnostmi. Namen diplomskega dela je ugotoviti, kako različni starterski kulture in fermentacijski temperaturi vplivata na končno kakovost pridelanega vina sorte sauvignon, letnika 2011, iz vinorodnega okoliša Štajerska Slovenija. Pri fermentacijskem poskusu smo uporabili dve starterski kulture vinskih kvasovk, sestavljeni vsaka iz dveh sevov, in dve različni fermentacijski temperaturi, nadzorovano in temperaturo kleti. Po končani alkoholni fermentaciji smo mlademu vinu določali naslednje fizikalno-kemijske parametre: alkohol in žveplov dioksid s titracijskima metodama in motnost, ki smo jo merili s turbidimetrom. S spektrofotometričnimi metodami smo določali skupne fenolne spojine, prosti aminokislinski dušik (FAN) in barvne parametre. Barvne parametre smo določali s spektrofotometrom in kromametrom. Določali smo še antioksidativni potencial (AOP) vina, prav tako pa tudi AOP droži. S potenciometrično metodo smo določali pufrno kapaciteto vina, titrabilne (skupne) kisline in kislodelujoče soli. Z metodo HPLC smo določali organske kisline, sladkorje in glicerol, aromatične spojine pa smo kvalitativno določili s pomočjo SPME in GC-MS metode. Izračunali smo tudi fermentacijsko učinkovitost, pregledali droži pod mikroskopom in opravili senzorično analizo mladih vin. Dobljeni rezultati so nam potrdili, da imajo na aromatično sestavo in na druge fizikalno-kemijske lastnosti vina vpliv tako različni temperaturi fermentacije, kot tudi različna seva kvasovk. Fermentacijska temperatura je imela največji vpliv na vsebnosti prostega aminokislinskega dušika in mlečne kisline, pufrno kapaciteto, med aromatičnimi spojinami pa na β-damascenon. Manjši vpliv temperature se je pokazal pri vsebnostih žveplovega dioksida, fenolnih spojin in skupnih kislin, motnosti in barvi vina. Različna seva uporabljenih kvasovk sta imela največji vpliv na AOP vina, pufrno kapaciteto, vsebnosti FAN, kislodelujočih soli, mlečne kisline in glicerola. Značilne razlike smo opazili tudi pri tvorbi aromatičnih snovi, kot so heksanol, etil acetat, dekanjska in oktanjska kislina. Senzorično so bili v povprečju bolje ocenjeni vzorci, pridelani s kombinacijo sevov kvasovk rodu <i>Saccharomyces</i> v primerjavi s kombinacijo sevov <i>Torulaspora delbrueckii</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ŠD Dn
DC UDC 663.252/.253:582.282.3:543.61:543.92(043)=163.6
CX sauvignon/ musts/ young wines/ starter cultures/ wine yeasts/ alcoholic fermentation/ physicochemical properties/ chemical composition/ sensory properties/ aromatic compounds
AU SMOLNIKAR, Jernej
AA KOŠMERL, Tatjana (supervisor)/ PROSEN, Helena (co-advisor)/ JAMNIK, Polona (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Tehnology
PY 2012
TI THE INFLUENCE OF YEAST STRAINS AND FERMENTATION TEMPERATURE ON AROMATIC CHARACTERISTICS OF YOUNG WINES SAUVIGNON
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIV, 76 p., 10 tab., 40 fig., 11 ann., 31 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the must, sugar is fermented into alcohol by wine yeast, while other compounds which have a significant impact on physico-chemical composition, sensory quality and final quality of a wine are also produced. Beside health and maturity of the grapes at harvest, wine yeasts are crucial for producing a wine with the desired properties. The purpose of this study was to determine how different starter cultures used and their fermentation at different temperature influence the final quality of wine varieties Sauvignon, vintage 2011, from the wine region of Štajerska Slovenia. In the fermentation experiment two starter cultures of wine yeast were used, both of them consisting of two strains, and two different fermentation temperatures, controlled and the temperature of the cellar. After completion of alcoholic fermentation the following physico-chemical parameters were determined: alcohol and sulfur dioxide by titration method and turbidity by nephelometry. With spectrophotometric method we analyzed phenolic compounds, free amino nitrogen (FAN) and color parameters. Color parameters were also determined by a chromometer. We also determined antioxidant potential (AOP) of wine as well as AOP of yeast lees. We used potentiometric methods to determine buffer capacity and titrable (total) acids of wine and acidic salts. The HPLC method was used to determine organic acids, sugars and glycerol, while aromatic compounds were determined by SPME and GC-MS method. We also calculated the efficiency of alcoholic fermentation, examined the yeast sediment by microscope and performed a sensory analysis of the young wine. The results obtained have confirmed, that different fermentation temperatures and yeast strains have an effect on aromatic composition and other physico-chemical properties of wine. Fermentation temperature had more influence on the free amino nitrogen and lactic acid content, buffer capacity and β -damascenone content among aromatic compounds. The effect of fermentation temperature had minor influence on sulfur dioxide content, phenolic compounds and total acidity, turbidity and color. Different strains of yeast had the greatest influence on antioxidant potential of wine, buffer capacity, FAN content, acidic salts, lactic acid and glycerol. Significant differences were found in the formation of aromatic compounds, such as hexanol, ethyl acetate, decanoic and octanoic acid. According to the results of sensory analysis the samples produced by a combination of yeast strains of the genus *Saccharomyces* were in average higher evaluated in comparison to used combination of yeast strain *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	IV
KAZALO VSEBINE	VI
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XIII
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 VINSKE KVASOVKE IN NJIHOVA VLOGA MED ALKOHOLNO FERMENTACIJO	3
2.1.1 Vinske kvasovke vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2.2 ALKOHOLNA FERMENTACIJA	6
2.3 SAUVIGNON (AMPELOGRAFIJA)	7
2.4 AROMATIČNE SNOVI V VINU	9
2.4.1 Primarna aroma vina	11
2.4.2 Fermentacijska aroma	11
2.4.2.1 Aldehidi	12
2.4.2.2 Višji alkoholi	12
2.4.2.3 Hlapne kisline	13
2.4.2.4 Estri	13
2.4.2.5 Žveplove spojine	14
2.4.2.6 Terpenske spojine	14
2.4.2.7 Fenolne spojine	14
2.4.2.8 Dušikove spojine	14
2.4.2.9 Laktoni	15
2.5 SESTAVINE MOŠTA IN VINA	15

2.5.1	Voda	15
2.5.2	Etanol.....	15
2.5.3	Metanol.....	16
2.5.4	Ogljikovi hidrati	17
2.5.4.1	Monosaharidi	17
2.5.4.2	Disaharidi	17
2.5.4.3	Polisaharidi	18
2.5.5	Glicerol, organske kisline in maščobne kisline	18
2.5.6	Dušikove spojine	20
2.5.7	Minerali	20
3	MATERIALI IN METODE DELA	21
3.1	ZASNOVA POSKUSA	21
3.2	MATERIAL	22
3.2.1	Mošt	22
3.2.2	Kvasovke	22
3.2.3	Kemikalije in reagenti.....	24
3.2.4	Oprema in aparature	25
3.2.5	Nastavitev fermentacijskega poskusa	25
3.3	FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE	26
3.3.1	Določanje žveplovega dioksida po Ripperju	26
3.3.2	Določanje motnosti vina.....	26
3.3.3	Določanje barvnih parametrov vina.....	27
3.3.3.1	Določanje barvnih parametrov s kromametrom	27
3.3.4	Določanje skupnih fenolnih spojin v vinu	28
3.3.5	Določanje antioksidativnega potenciala vina	28
3.3.6	Določanje prostega aminokislinskega dušika (FAN) v vinu	29
3.3.7	Določanje pufrne kapacitete vina.....	30
3.3.8	Določanje skupnih (titrabilnih) kislin v vinu	30
3.3.9	Določanje organskih kislin, sladkorjev in glicerola z metodo HPLC	31
3.3.10	Kvalitativno določanje vsebnosti aromatičnih spojin z metodo GC-MS	32

3.4	SENZORIČNA ANALIZA	33
3.5	MIKROBIOLOŠKE ANALIZE DROŽI	34
3.5.1	Antioksidativni potencial droži	34
3.5.2	Mikroskopski pregled droži.....	35
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	36
4.1	REZULTATI ANALIZ MOŠTA.....	36
4.2	REZULTATI ANALIZ VINA.....	37
4.2.1	Določanje žveplovega dioksida po Ripperju	37
4.2.2	Motnost.....	38
4.2.3	Barvni parametri.....	39
4.2.4	Skupne fenolne spojine.....	41
4.2.5	Antioksidativni potencial vina.....	42
4.2.6	Prosti aminokislinski dušik (FAN).....	43
4.2.7	Pufrna kapaciteta	44
4.2.8	Titribilne in skupne kisline ter kislodelujoče soli	45
4.2.9	Organske kisline, sladkorji in glicerol	47
4.2.10	Vsebnost aromatičnih spojin, določenih z metodo GC-MS	52
4.2.11	Izračun fermentacijske učinkovitosti	60
4.2.12	Antioksidativni potencial droži	62
4.2.13	Mikroskopski pregled droži.....	63
4.2.14	Senzorično ocenjevanje vina.....	66
5	SKLEPI.....	70
6	POVZETEK.....	72
7	VIRI.....	74
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Želene značilnosti starterskih kultur vinskih kvasovk (Košmerl, 2007a)	4
Preglednica 2: Osnovni selekcijski kriteriji vinskih kvasovk in cilji (Košmerl, 2007a)	4
Preglednica 3: Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk (Košmerl, 2007a)	6
Preglednica 4: Najbolj značilne arome vina glede na sorto (Košmerl, 2007a)	10
Preglednica 5: Vsebnost terpenov glede na tip in sorto vina (Košmerl, 2007a)	11
Preglednica 6: Tvorba nekaterih višjih alkoholov iz odgovarjajočih aminokislin in njihove koncentracije v vinu (Ribéreau-Gayon in sod., 2000)	13
Preglednica 7: Uporabljeni sevi kvasovk	23
Preglednica 8: Osnovni kemijski parametri mošta sorte sauvignon, letnika 2011	36
Preglednica 9: Rezultati spektrofotometričnih meritev mladega vina pri valovnih dolžinah 420 in 520 nm	40
Preglednica 10: Ocenjevalni elementi senzorične analize mladega vina	66

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz poteka poskusa.....	21
Slika 2: Princip optičnega merjenja motnosti vina (O.I.V., 2011)	26
Slika 3: Predstavitev parametrov $L^* a^* b^*$ iz barvnega spektra (Gordon, 2009).....	28
Slika 4: Vsebnost prostega, skupnega in vezanega SO_2 (mg/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	37
Slika 5: Motnost vina (NTU) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	38
Slika 6: Intenziteta barve pri A_{420} v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	39
Slika 7: Barvni parametri v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah podani s CIE $L^* a^* b^*$ lestvico	40
Slika 8: Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	41
Slika 9: Koncentracija prostega radikala DPPH (mmol/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	42
Slika 10: Vsebnost FAN (mg N/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	43
Slika 11: Dejanska pufna kapaciteta (mmol/L/pH) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	44
Slika 12: Koncentracija skupnih (titrabilnih) kislin (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	45
Slika 13: Koncentracija kislodelujočih soli (mg/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	46
Slika 14: Koncentracija vinske kisline (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	47
Slika 15: Koncentracija jabolčne kisline (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	48

Slika 16: Koncentracija mlečne kisline (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	48
Slika 17: Koncentracija glukoze (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	49
Slika 18: Koncentracija fruktoze (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	50
Slika 19: Koncentracija glicerola (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	51
Slika 20: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) spojine β -damascenona v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	52
Slika 21: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) višjih alkoholov v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	53
Slika 22: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) spojine 1-heksanol v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	54
Slika 23: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) spojine etil acetat v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	55
Slika 24: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) acetatnih estrov maščobnih kislin z manjšimi koncentracijami v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	56
Slika 25: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) etilnih estrov maščobnih kislin z večjimi koncentracijami v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	57
Slika 26: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) ostalih estrov maščobnih kislin v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	58
Slika 27: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) maščobnih kislin v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	59
Slika 28: Fermentacijska učinkovitost (g RS/L·vol.%) mošta v vrenju v vzorcih z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	60
Slika 29: Fermentacijska učinkovitost (g RS/L·vol.%) mladega vina z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	61

Slika 30: Antioksidativni potencial droži v vzorcih mladega vina, izražen s fluorescenco, v odvisnosti od časa analize, po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri kontrolirani nižji temperaturi alkoholne fermentacije.....	62
Slika 31: Antioksidativni potencial droži v vzorcih mladega vina, izražen s fluorescenco, v odvisnosti od časa analize, po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri nekontrolirani višji temperaturi alkoholne fermentacije	63
Slika 32: Mikroskopski posnetek droži vzorca 1* pri 400-kratni povečavi	64
Slika 33: Mikroskopski posnetek droži vzorca 6* pri 400-kratni povečavi.....	64
Slika 34: Mikroskopski posnetek droži vzorca 1 pri 400-kratni povečavi.....	65
Slika 35: Mikroskopski posnetek droži vzorca 4 pri 400-kratni povečavi.....	65
Slika 36: Ocenjevanje težje tropske arome (točke 1-5) v vzorcih mladega vina z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	66
Slika 37: Ocenjevanje sveže tropske arome (točke 1-5) v vzorcih mladega vina z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	67
Slika 38: Ocenjevanje fermentacijske arome (točke 1-5) v vzorcih mladega vina z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	67
Slika 39: Ocenjevanje prekrivanja sortnih arom (točke 1-5) v vzorcih mladega vina z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah.....	68
Slika 40: Ocenjevanje celokupne kakovosti (točke 1-5) vzorcev mladega vina z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah	69

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Barvna spektra vzorcev mladih vin sorte sauvignon v območju valovne dolžine 400 nm in 440 nm
- Priloga B: Spektra za določanje FAN vzorcev 2* in 4* v območju med 450-700 nm
- Priloga C: Spektra za določanje FAN vzorcev 3 in 5 v območju med 450-700 nm
- Priloga D: Primerjalni rezultati aromatičnih snovi v mladem vinu, ki so bile kvalitativno določene v vzorcih vina (ploščina kromatografskega vrha/10⁶)
- Priloga E: Plinski kromatogram, na osnovi katerega smo kvalitativno določili aromatične snovi pri vzorcu 1*
- Priloga F: Plinski kromatogram, na osnovi katerega smo kvalitativno določili aromatične snovi pri vzorcu 3*
- Priloga G: Plinski kromatogram, na osnovi katerega smo kvalitativno določili aromatične snovi pri vzorcu 4
- Priloga H: Plinski kromatogram, na osnovi katerega smo kvalitativno določili aromatične snovi pri vzorcu 6
- Priloga I: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mošta v vrenju pred inokulacijo z drugo startersko kulturo
- Priloga J: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina
- Priloga K: Rezultati povprečnih vrednosti fizikalno-kemijskih analiz posameznih paralelk

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

1-6	oznake vzorcev, ki so fermentirali pri nižji fermentacijski temperaturi
1*-6*	oznake vzorcev, ki so fermentirali pri višji fermentacijski temperaturi
A ₄₂₀	absorbanca pri 420 nm
AF	alkoholna fermentacija
AOP	antioksidativni potencial
°Brix	stopinja Brix (enota sladkorne stopnje mošta)
CFU	kolonijska enota (ang. <i>Colony Forming Unit</i>)
FAN	prosti aminokislinski dušik (ang. <i>Free Amino Nitrogen</i>)
F/SS _D	flourescenca glede na suho maso droži
NTU	nefelometrična turbidimetrična enota (ang. <i>Nephelometric Turbidity Unit</i>)
°Oe	Oechslejeve stopinje (enota sladkorne stopnje mošta)
Sev 1	kombinacija sevov kvasovk vrst <i>Torulaspora delbrueckii</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sev 2	kombinacija sevov kvasovk vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i> in <i>Saccharomyces bayanus</i>
TK	titrabilne kisline
VA	višji alkoholi

1 UVOD

Alkoholno fermentacijo mošta, kjer prihaja do pretvorbe grozdnega sladkorja v etanol in ogljikov dioksid, vodijo vinske kvasovke. Te so poleg zdravstvenega stanja in zrelosti grozda ob trgatvi ključnega pomena za pridelavo vina z želenimi lastnostmi. Poleg vinskih kvasovk pa na potek fermentacije značilno vpliva tudi temperatura.

Vpliv temperature pa je različen za posamezne vrste oziroma seve kvasovk. Pri temperaturi pod 20 °C je prispevek kvasovk rodov ne-*Saccharomyces* večji v primerjavi s 25 °C. Še več, pri 10 °C kvasovke vrste *Kloeckera apiculata* celo pravladajo nad vrsto *Saccharomyces cerevisiae*. V temperaturnem območju med 10-20 °C je povečana odpornost kvasovk rodov ne-*Saccharomyces* na etanol (Košmerl, 2007a).

Ena najpomembnejših lastnosti vina so aromatične snovi, ki zaradi svojega vpliva na naše čutilne organe igrajo pomembno vlogo v kakovosti vina. Sestavljajo jih aldehidi, alkoholi, estri, ogljikovodiki, ketoni, furani in verjetno še druge neidentificirane hlapne spojine. Proste hlapne spojine so v grozdju manj prisotne in so pretežno posledica delovanja endogenih encimov, ko grozdno jagodo zdrobimo (Dunlevy in sod., 2009).

V sodobnem vinarstvu se vse bolj pojavlja uporaba določenih sevov kvasovk s pozitivnim vplivom na zelen okus in aromo vina, ki ju želimo iz grozdja pridobiti. Pravimo jim komercialne starterske kulture, ki so čiste kulture kvasovk. Pri njihovi selekciji se posebna pozornost posveča osnovnim značilnostim, kot so majhna tvorba žveplovih spojin, očetne kisline in drugih snovi, ki negativno vplivajo na kakovost vina. 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, etilnega estra očetne kisline, priokusi, prekinitev in/ali zaustavitev fermentacije), se priporoča dodatek čiste kulture kvasovk (Košmerl, 2007a).

Opravili smo raziskavo na alkoholni fermentaciji in aromatici bele vinske sorte sauvignon z dvema različnima komercialnima starterskima kulturama pri dveh različnih temperaturah fermentacije.

1.1 NAMEN DELA

Moštu sorte sauvignon smo dodali dve različni komercialni starterski kulturi, LEVEL 2 (*Torulaspora delbrueckii* in *Saccharomyces cerevisiae*) in VIN7+QA23 (*Saccharomyces cerevisiae* in *Saccharomyces bayanus*). Poskus fermentacije smo izvajali v treh ponovitvah in sicer pri kontrolirani temperaturi in nekontrolirani temperaturi, temperaturi kleti, ki je v povprečju znašala 21 °C. Kontrolirana temperatura fermentorjev 1-6 je pri nastavitvi poskusa znašala 20 °C, nato pa smo alkoholno fermentacijo vodili pri temperaturi 15 °C. Proti koncu fermentacije smo hladilni sistem izklopili, tako da je fermentacija potekala pri temperaturi kleti. V povprečju je alkoholna fermentacija fermentorjev 1-6 potekala pri temperaturi 17 °C.

Želeli smo ugotoviti, kako različni sevi komercialnih kvasovk in fermentacijska temperatura vplivajo na potek fermentacije, fizikalno-kemijske parametre, tvorbo aromatičnih spojin in senzorično kakovost vina.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- pričakujemo, da bosta uporabljeni kombinaciji seva kvasovk vplivali na različno oblikovanje sortnih in fermentacijskih arom vina, prav tako pa tudi na fizikalno-kemijske parametre in senzorično kakovost vina;
- prav tako bodo na različno oblikovanje arom, fizikalno-kemijskih parametrov in senzorično kakovost vplivale različne fermentacijske temperature;
- predpostavljamo, da bodo na tvorbo hlapnih aromatičnih spojin najbolj vplivali različni sevi vinskih kvasovk;
- predpostavljamo, da med tremi ponovitvami fermentacijskih poskusov ne bo bistvenih razlik.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VINSKE KVASOVKE IN NJIHOVA VLOGA MED ALKOHOLNO FERMENTACIJO

Kvasovke so netaksonomska kategorija gliv, definirana z ozirom na morfološke in fiziološke značilnosti. So filogenetsko različna skupina organizmov in pripadajo dvem glavnim taksonom, in sicer *Ascomycotina* in *Basidiomycotina*. Razmnožujejo se nespolno z brstenjem oziroma nekatere s cepljenjem. V aerobnih razmerah metabolizirajo številne sladkorje, medtem ko imajo nekatere vrste v anaerobnih razmerah sposobnost fermentacije (Raspor, 1996).

Velika večina vinarjev uporablja za fermentacijo belih in rdečih moštov komercialne starterske kulture, ki so selekcionirane glede na štiri osnovne kriterije: fermentacijske lastnosti, senzorične značilnosti, tehnološke lastnosti in metabolne lastnosti z zdravstvenega stališča. V okviru teh kriterijev se v praksi, odvisno predvsem od fizikalno-kemijske sestave mošta, srečamo vsaj z enim od naštetih fenomenov (Košmerl, 2007a):

- nezadostna pretvorba sladkorjev v etanol (slabši izkoristek substrata) in tvorba večjih količin sekundarnih metabolitov;
- ovirana asimilacija dušikovih spojin in 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.

Selekcionirane kvasovke so postale osnoven in nenadomestljiv pripomoček vseh vinarjev, ki želijo poudariti sortne značilnosti vin in želijo dati vinom določeno osebnost in razpoznavnost. Za doseg otipljivih rezultatov pa ni dovolj, da se med številnimi komercialnimi pripravki izbere sev kvasovk s tehnološkimi značilnostmi, ki se najbolj ujemajo z operativnimi pogoji v kleti. Prav tako ni dovolj, da se izbere sev, ki je najbolj sposoben poudariti pozitivne lastnosti določene vinske sorte. Zelo pomembno je predvsem to, da ustvarimo pogoje, pri katerih dodane selekcionirane kvasovke zelo hitro prevladajo t.i. »divje« kvasovke s slabšimi enološkimi značilnostmi v vseh pogledih. Dejavnike, ki pozitivno vplivajo na uspeh vodene alkoholne fermentacije, lahko razdelimo v dve kategoriji. Prva so lastnosti uporabljenega seva kvasovk oziroma komercialnega pripravka, druga kategorija pa so zunanji dejavniki, ki so odvisni od operativnih pogojev v kleti. V prvo kategorijo spadajo genetske lastnosti kvasovke oziroma njen »fenotip« kompetitivnosti in vitalnosti. V drugo pa začetna velikost populacije »divje« mikroflore, njena kakovost oziroma sestava (rodovi, vrste in sevi kvasov), učinkovitost rehidracije starterske kulture in razmerje med številom »divjih« in inokuliranih kvasovk.

Količina selekcioniranih kvasovk v moštu mora biti za doseg prevlade nad »divjimi« kvasovkami vsaj 10-20 krat večja (De Paola, 2003).

Preglednica 1: Želene značilnosti starterskih kultur vinskih kvasovk (Košmerl, 2007a)

fermentacijske lastnosti	tehnološke lastnosti
hiter začetek fermentacije	visoka genetska stabilnost
visoka učinkovitost	visoka tolerance na sulfit (SO ₂)
visoka tolerance na etanol	nizka sposobnost vezave sulfita
visoka osmotolerantnost	majhna tvorba pene
nizek temperaturni optimum	flokulacijske lastnosti
zmerna produkcija biomase	kompaktnost usedline
aromatične značilnosti	odpornost na sušenje
majhna tvorba sulfidov/DMS/tiolov	zimocidna (killer) aktivnost
majhna tvorba hlapnih kislin	genetska označitev
majhna tvorba višjih alkoholov	proteolitična aktivnost
sprostitev prekurzorjev aromatičnih snovi	majhna potreba po dušiku
velika tvorba glicerola	metabolne lastnosti (zdravstveno stališče)
hidrolitska aktivnost	majhna tvorba sulfita
povečana avtoliza	majhna tvorba biogenih aminov
prilagojena esterazna aktivnost	nizek potencial tvorbe etilkarbamata

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

Preglednica 2: Osnovni selekcijski kriteriji vinskih kvasovk in cilji (Košmerl, 2007a)

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

2.1.1 Vinske kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*

Vrsta *Saccharomyces cerevisiae* je znana kot "vinska kvasovka". Znano je, da z različnimi sevi kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* pridelamo po kakovosti zelo različna vina (Košmerl, 2007a).

Običajno kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* ne najdemo na površini grozdnih jagod in tudi v starejših vinogradih lahko najdemo to vrsto šele proti koncu zorenja grozdja. Zrelo zdravo grozdje daje začetno kvasno populacijo s 10³-10⁵ CFU/mL, zaključni pa se v območju 10⁸-10⁹ CFU/mL. Številni dejavniki, ki vplivajo na kvasno populacijo, so

temperatura, deževje in ostale klimatske razmere, stopnja zrelosti, uporaba fungicidov, sorta grozdja, poškodbe s strani plesni, insektov, ptic itd. Med fermentacijo se število ne-*Saccharomyces* kvasovk (*Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida stellata*, *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* in *Saccharomyces ludwigii*) zmanjšuje, saj imajo manjšo odpornost na etanol. Preživetje ne-*Saccharomyces* kvasovk med fermentacijo je v veliki meri odvisno od fermentacijskih razmer, zlasti temperature in pH. Ne-*Saccharomyces* kvasovke so pomembne pri tvorbi sekundarnih metabolitov – arom, ostalih alkoholov, kislin in acetaldehida. V poznejših fazah fermentacije pa prevzame dominantno vlogo vrsta *Saccharomyces cerevisiae*, saj je odporna na večje koncentracije etanola. Poleg splošno priznanega pravila, da najboljše vino pridelamo v vinogradu, velja tudi, da različni sevi kvasovk ter dodatek hranilnih snovi za kvasovke različno in značilno prispevajo h končni senzorični kakovosti (aroma in okus) vina (Košmerl, 2003).

Dolgo se je smatralo, da z dodatkom določenih sevov kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* v mošt dosežemo njihovo prevlado nekje v sredini in/ali proti koncu fermentacije. Z raziskavami zadnjih nekaj let je dokazano, da ni nujno, da je dodan sev kvasovk tudi prevladujoči sev na koncu. Tudi dodatek velikega vcepka (inokuluma) kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* ne zatre popolnoma rasti avtohtonih kvasovk rodov ne-*Saccharomyces* s specifično biokemijsko aktivnostjo, ki s svojim razmnoževanjem in metabolno aktivnostjo vplivajo ne samo na kemijsko sestavo vina, verjetno tudi na poznejšo rast in metabolizem kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Njihov prispevek h končni kakovosti vina vsekakor ni zanemarljiv s senzoričnega stališča, saj njihov metabolizem v prvih dneh fermentacije značilno prispeva k tvorbi hlapnih snovi. Tako npr. čista kultura kvasovk vrste *Candida stellata* tvori večje koncentracije glicerola, kvasovke vrste *Torulaspora delbrueckii* pa majhne koncentracije očetne kisline, etil acetata in acetaldehida (Košmerl, 2007a).

Rast kvasovk med alkoholno fermentacijo:

- na začetku prisotnost različnih rodov in vrst;
- končno prevlada vrsta *Saccharomyces cerevisiae*;
- na začetku je značilna hitra rast, dokler ni ves kisik porabljen;
- naraščajoča vsebnost etanola postaja inhibitorna;
- hranila so omejena.

Spontana, naravna ali divja alkoholna fermentacija:

- poteka z endogeno kvasno mikrofloro (naravno prisotna, divja);
- izraz naravna fermentacija ni ustrezen, ker vse fermentacije potekajo z eno ali več vrstami kvasovk (bodisi, da je uporabljena starterska kultura ali ne);
- tako ločimo le: spontano alkoholno fermentacijo (AF) in inokulirano (vzpodbujeno ali inducirano) AF.

Z vinom povezane kvasovke (»wine-related yeasts«):

- vrsta *Saccharomyces cerevisiae* je splošno priznana kot vinska kvasovka;
- kvasovke rodov *Metschnikowia*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera* pa običajno imenujemo kvasovke kvarljivke (ang. *spoilage yeasts*).

Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* v pogojih pomanjkanja dušikovih spojin niso sposobne hidrolize ustreznih beljakovin ob sprostitvi amoniaka in aminokislin. Dejstvo pa je, da se posamezni sevi med seboj razlikujejo in ločijo med lahko in slabo izkoristljivimi viri dušika. Običajno je najlažje izkoristljiva in dostopna oblika amoniaka, kateremu v različnem vrstem redu sledijo posamezne aminokisline (Košmerl, 2003).

Preglednica 3: Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk (Košmerl, 2007a)

želeni lastnosti	neželeni 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 prekurzorjev etil karbamata
fermentacija pod tlakom	tvorba polifenoloksidaze
tvorba glicerola	
β -glukozidazna aktivnost	
zimocidna aktivnost	

Sprejeto je stališče, da dodana kultura prevlada nad avtohtonimi (divjimi) kvasovkami in dokonča fermentacijo kot čista kultura. Presenetljivi so zaključki raziskav Martinija in sod. (1996), da je prisotnost avtohtonih sevov kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* na površini grozdne jagode redkost (manj kot 10 CFU/mL), medtem ko približno 80 % vseh sevov kvasovk na površini predelovalnih strojev in opreme pripada vrsti *Saccharomyces cerevisiae* (zaostala mikroflora, ki kompetitivno tekmuje z dodano startersko kulturo). Z novejšimi mikrobiološkimi metodami (elektroforeza, genetsko markirani sevi kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*) so dokazali, da preživetje in rast avtohtonih vrst *Kloeckera apiculata* in *Candida stellata* nista ovirani tudi pri inokulumu starterske kulture 10^6 - 10^7 CFU/mL. Ni nujno, da inokuliran sev tudi res prevlada. Nobene garancije ni, da dodan sev kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* prevlada nad avtohtonim sevom iste vrste (Košmerl, 2007a).

2.2 ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Alkoholna fermentacija (AF) je pretvorba sladkorjev v alkohol in ogljikov dioksid. Medsebojno delovanje najrazličnejših vplivov (sladkorjev, alkohola, vrednosti pH, oksidacijsko-reduksijskega potenciala, žveplovega dioksida) ter številni vzporedni produkti AF pa v končni fazi določajo protimikrobne lastnosti mošta in kasneje vina. Za številne mikroorganizme je začetna količina sladkorja (glukoze in fruktoze) v grozdju nad njihovo optimalno koncentracijo. Neugodne osmotske razmene, združene s kislostjo mošta in majhno koncentracijo vodikovih ionov (pH), omejujejo tako število kor raznolikost mikroorganizmov: določajo, katere vrste oziroma sevi bodo rastli, njihovo hitrost rasti in fermentacijsko sposobnost ter nenazadnje tudi koncentracijo senzorično pomembnih

vzporednih produktov. Vpliv etanola je dobro znan, nizek okidacijsko-redukcijski potencial pa omejuje zlasti rast plesni in oecetnokislinskih bakterij (Košmerl, 2007a).

Osnovne značilnosti AF mošta so (Košmerl, 2007a):

- AF poteka z endogeno kvasno populacijo ali dodano startersko kulturo;
- povečanje celične gostote (rast) omogoči dokončanje AF (celotne pretvorbe sladkorja v alkohol): 10^6 - $5 \cdot 10^7$ CFU/mL;
- rast celic poteka v začetni fazi AF, v kateri se hitro porabi raztopljeni kisik; nastali etanol in CO₂ inhibirata aerobne mikroorganizme (oecetnokislinske bakterije in občutljive oksidativne kvasovke);
- v sredini AF prevladajo značilno močno fermentativne kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*; v idealnih razmerah preostane manj kot 1 g/L reducirajočih sladkorjev.

Med dejavnike, ki vplivajo na hitrost rasti kvasovk med alkoholno fermentacijo, prištevamo dodatek starterske kulture, temperaturo fermentacije, žveplanje, prisotnost ali uporabo kvasovk z zimocidno aktivnostjo, motnost oziroma stopnjo bistrosti mošta, fizikalno-kemijsko sestavo mošta, ostanke zaščitnih sredstev (fungicidi) in vpliv ostalih mikroorganizmov, zlasti plesni in bakterij (mlečno- in oecetnokislinskih) (Košmerl, 2007a).

Fizikalno-kemijski pogoji alkoholne fermentacije (Košmerl, 2003)

Razlikujemo tri glavne faze rastnega ciklusa:

- faza razmnoževanja, ki traja 2 do 5 dni in v kateri naraste populacija do 10^7 CFU/mL;
- stacionarna faza, ki traja približno 8 dni;
- pojemajoča faza, ki zmanjša živo populacijo do 10^5 CFU/mL (ta faza lahko traja nekaj tednov).

To je cikel klasične mikrobne rasti, ki pa ima nekaj posebnosti:

- relativno dolgo trajanje;
- celotna rast je omejena na 4 do 5 generacij;
- rast se ustavi, preden se v celoti porabijo sladkorji.

Dnevna asimilacija je v prvih desetih dneh okrog 15 g/L sladkorjev, nato pa pade na 5 g/L. Upočasnitev in zaustavitev fermentacije je posledica izčrpanega celičnega ATP. Inhibicija se pojavi, ko se etanol začne akumulirati. Poleg tega je zaradi zmanjšane vsebnosti dušika otežen in upočasnen transport sladkorjev v celico.

2.3 SAUVIGNON (AMPELOGRAFIJA)

Sinonimi:

muškatni slivanec (slo.), Sauvignon blanc (fra.), Muskar Sylvaner weisser (nem.), Sauvignon white (ang.), Sauvignon bianco (ita.)

Opis:

Izvira iz Francije. Gojijo ga v večini vinorodnih držav. Sorta je zelo bujne rasti, kar se med vegetacijo kaže s košatim zelenim delom trte. Trta je odporna proti nizkim temperaturam, grozdje pa je občutljivo za sivo grozdno plesen (Nemanič, 1999).

Pri nas je sorta razširjena zlasti v okoliših štajerskega dela in delno tudi primorskega rajona. Je pozno dozorevajoča sorta, ki ne slovi po obilni rodnosti, pač pa po veliki odpornosti proti zimskim pozebam. V polni zrelosti dobimo mošče z vsebnostjo sladkorjev 22 % in skupnih kislin 6,5 do 9 g/L, odvisno od kakovosti letnika. Iz grozdja dobimo zlasti od t.i. tehnološki zrelosti, ko grozdje ne dosega polne zrelosti in so ohranjene primarne buketne snovi (visoke srednje dnevne temperature proti koncu dozorevanja te snovi prizadanejo), visokokakovostno vino, polnega okusa, s prijetno svežo kislino, ne pretežno kar zadeva alkohol, ki se odlikuje s svojevrstno muškatno cvetico in aromo. Vsekakor je to sorta »severnega« pridelovalnega območja in ne »južnega«. Sorta zahteva dobro lego, bolj hladne noči in jutranjo roso. V toplejšem podnebju daje z alkoholom bogata, pekoča vina, premalo sveža, ker se kisline razgradijo že v soku grozdne jagode na trti, enako tudi nežne sestavine cvetice in arome. Vino se lepo vkomponira z drugimi belimi vinskimi sortami v zvrsti vina in daje posameznemu vinu nevsiljivo cvetico, kar je cenjeno zlasti pri janževcu ali haložanu. Lastnost vina, da izboljša kakovost drugim sortam, že dolgo s pridom izkoroščajo v Franciji. Sauvignon dodajajo zvrstem vina, ki spadajo v svetovnem merilu med belimi vini v sam vrh; to so bela vina iz Sauterna, zlasti iz Chateau d'Yquema, ki je bilo leta 1855 najvišje klasificirano območje. Sorta ni zaman razširjena po vsem svetu, kjer uspeva trta, od latinskoameriških držav, v Čilu, preko Argentine v ZDA, v Italiji, Avstriji, Sloveniji in Izraelu. Sicer pa je glavno pridelovalno območje te sorte Bordeaux, kjer daje sorta skupaj s sorto chardonnay sauternsko vino svetovnega slovesa (Šikovec, 1996).

Botanični opis (Hrček in Korošec-Koruza, 1996):

Vršiček mladike: rumenkasto zelen, malo povit in srednje obrasel

List: srednje velik, tro- ali petdelen, listni pecelj je dolg in nekoliko rdečkast, peceljni sinus ima obliko črke »V«. Gornja stran lista je temno zelena in nekoliko mehurjasta. Zobci lista so topi in neenaki.

Grozd: majhen, cilindričen, kratek in zbit. Grozdni pecelj je srednje dolg, debel in do sredine olesenel.

Jagoda: srednje velika, okroglasta ter ima rumenkasto zeleno kožico. Na sončni strani je jantarnorumen, pikčasta in ima srednje izražen popek. Jagodno meso je nekoliko gosto, sočno, sok pa je sladek in finega okusa.

Rozga: srednje debela s srednje debelimi internodiji, lešnikove barve, s temnejšimi srednje dolgimi internodiji.

Agrobiotične značilnosti (Hrček in Korošec-Koruza, 1996):

Bujnost: srednje močna. Ima veliko zalistnikov.

Dozorevanje grozda: srednje pozna sorta

Teža grozda: od 70 do 110 g

Pridelek: reden, vendar odvisen od gojitvenega sistema in dolžine rezi. Rodi sicer redno, vendar rodnost ni velika, podobno kot pri drugih kakovostnih sortah.

Odpornost proti boleznim: proti kriptogamnim boleznim je srednje odporna sorta.

Odpornost proti pozebi: občutljiva na nizke temperature, posebno na vzhodnih legah.

Videz in vonj:

Vino je zelenkasto rumene barve z bolj poudarjeno sortno cvetico po bezgu ali travi, pa tudi po suhih figah z rahlo muškatnim poudarkom (Šikovec, 1996).

Primarne arome so izrazite in sortno značilne, razpoznavne ne glede na poreklo, čeprav se po niansah razlikujejo. V Sloveniji in srednji Evropi (Avstrija, Hrvaška, Slovaška...) spominja sortna aroma, glede na tla in mikroklimo, na bezgov cvetni vonj, pokošeno travo, paradižnikove ali ribezove liste. Vina sauvignon, ki prihajajo z Nove Zelandije, vonjajo kot plod kosmulje. Tudi vonj po beluših je sestavni del arome tega vina (Nemanič, 1999).

Okus:

Polno telo ob skoraj praviloma zadostni kislini deluje okusno, sveže. Premalo zrelo grozdje se izrazi v vinu z grenkobo na jeziku, ki tudi priča o lahko razpornavnem značaju te sorte. Tako vino je tudi bolj kislo in zaprtega karakterja. Kljub temu oboževalci sprejemajo to »bodico« velikodušno (Nemanič, 1999).

Gospodarska vrednost sorte:

Vsebnost sladkorjev v moštu povprečno dosega 79 do 81 °Oe.

Splošna ocena sorte: sauvignon štejemo med naše visokokakovostne sorte za bela vina zaradi značilnega sortnega karakterja, ki je odvisen od vrste zemlje in mikroklime. Po vsebnosti alkohola je sicer vino srednje močno. V uradnem sortimentu je sauvignon zastopan kot priporočena sorta v vseh vinorodnih deželah in okoliših, razen v dolenskem in belokranjskem, kjer je bil vnešen kot dovoljena sorta (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

2.4 AROMATIČNE SNOVI V VINU

Aroma vina je zaradi številnih razlogov ena najbolj kompleksnih stvari, ki obstajajo v naravi. O tem govorimo, ker imajo mnoga različna vina različne arome in ker se arome istega vina spreminjajo s časom, ko so skladiščena v steklenicah ali pa natočena v kozarcih, predno jih konzumiramo. Navsezadnje v večini primerih vina nimajo enostavnih aromatičnih karakteristik, ampak so le-te sestavljene iz palete subtilnih arom, ki se jih zelo težko definira, različni ljudje pa jih različno zaznavajo. Taka senzorična kompleksnost je posledica kemijske kompleksnosti vinskih arom (Ferreira in Cacho, 2009).

Aroma je najverjetneje najbolj pomembna značilnost kakovosti vina. Veliko različnih nians lahko odkrijemo, ko vino vohamo ali okušamo, vse to pa je vzpodbudilo interes pridelovalcev vina in znanstvenikov k raziskovanju kompleksnosti arome vina. Velik razvoj analitskih tehnik in aparaturnam omogoča nadgradnjo prvih študij, ki so bila osredotočena na analizo bolj hlapnih spojin, do analiz spojin z zelo nizko koncentracijo (tudi tistih s koncentracijo manj od 1 ng/L) in nizkim pragom vonjav (Munoz-Gonzales in sod., 2011).

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 približno 1 % koncentracije etanola. Višji alkoholi, ki nastajajo med alkoholno fermentacijo, predstavljajo 50 % te vrednosti. Preostale aromatične spojine so zastopane v koncentracijah med 10^{-4} in 10^{-9} g/L. Prag zaznave določene aromatične spojine je tista najmanjša koncentracija, pri kateri pride do odziva čutilnega organa in se zelo razlikuje med posameznimi spojinami; nihajo med 10^{-4} g/L do 10^{-12} g/L. Med alkoholno fermentacijo nastajajo poleg zelenih tudi neželene aromatične snovi: aldehidi, hlapne organske žveplove spojine, vodikov disulfid, tioalkoholi, tioestri in tiolani, vendar v izredno majhnih koncentracijah, manj kot 1 mg/L (Košmerl, 2007a).

Klasifikacija aromatičnih spojin (Košmerl, 2007a):

- primarna ali grozdna aroma: spojine, kot jih najdemo v nepoškodovani grozdni jagodi;
- sekundarna aroma: aromatične spojine, ki se oblikujejo med pridelavo grozdja (pecljanje, drozganje, maceracija, stiskanje), kjer potekajo kemijske in encimske reakcije;
- fermentacijska aroma: aromatične spojine, ki se oblikujejo med alkoholno fermentacijo;
- zorilna aroma: nastala zaradi kemijskih reakcij med zorenjem vina v steklenici.

Preglednica 4: Najbolj značilne arome vina glede na sorto (Košmerl, 2007a)

sortna aroma	vino	fermentacijska aroma	zorilna aroma
po travi, po bezgu, po črnem ribezu	sauvignon	po banani	zelena paprika
po muškatu	muškatna vina	po vrtnicah	jagoda
po nageljnih	rumeni muškat	po španskem bezgu	meta
po vijolici	traminec	po janežu	
po robidah	modri pinot	po medu	
po breskvah	renski rizling		
po vrtnici	beli pinot		
po malini	refošk, teran		

2.4.1 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 preko 50 teh snovi na primer terpineol, ki diši po bezgu, citronelol, ki diši po muškatu itd. Koncentracija teh snovi v grozdju je odvisna od geoklimatskih razmer, zrelosti grozdja in agrotehničnih ukrepov v vinogradu (Wondra, 1998).

Preglednica 5: Vsebnost terpenov glede na tip in sorto vina (Košmerl, 2007a)

tip vina	sorta vina	koncentracija terpenov
muškatni	muškatne sorte, sauvignon	do 6 g/L
renski rizling	renski rizling, rizvanec, kerner	1-4 mg/L
nevtralni	silvanec, laški rizling, pinoti	koncentracija monoterpenov ne vpliva na aromo

2.4.2 Fermentacijska aroma

Pomemben del vinske arome se oblikuje med alkoholno fermentacijo. Poleg etanola in višjih alkoholov se pod vplivom kvasovk tvorijo še druge spojine, predvsem kisline, estri, aldehidi, 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 pomembnejše še 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, aldehidov in vodikovega sulfida, torej za kakovost vina čim manj negativnih snovi ter hlapnih kisliniskih 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 grozdju 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 grozdja (Košmerl, 2007a).

Višji alkoholi, višje maščobne kisline in njihovi estri so najpomembnejše sestavine fermentacijske arome. Količinsko prevladujejo višji alkoholi (50 %), številčno pa estri. Hlapne organske snovi, ki vsebujejo žveplo in ki nastajajo med alkoholno fermentacijo, so drugotnega pomena za aromo vina, ker nastopajo v ekstremno majhnih koncentracijah (Wondra, 1998).

2.4.2.1 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. Glavni aldehyd v vinu je acetaldehyd. V kvasni celici 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 alkoholdehidrogenaze, ki reducira acetaldehyd do etanola in jim ta uide skozi celično steno. Nastaja pa tudi po končani fermentaciji s kemijsko 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 kot 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. Večje koncentracije acetaldehyda kažejo na večje potrebe po žveplovm dioksidu, da lahko vino ohrani sortno značilnost. Za nevtralizacijo 1 mg acetaldehyda v vinu je potrebno 1,45 mg žveplovega dioksida (Košmerl, 2007a).

2.4.2.2 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 (VA) je rezultat dekarboksilacije in redukcije ustreznih α -keto kislin, ki so produkt preoblikovanja aminokislin po Ehrlichovi poti ali razgradnje ogljikovih hidratov. Manj VA 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 pektinmetil esteraze, 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.

Preglednica 6: Tvorba nekaterih višjih alkoholov iz odgovarjajočih aminokislin in njihove koncentracije v vinu (Ribéreau-Gayon in sod., 2000)

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

Legenda:

? – ni znano

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

2.4.2.3 Hlapne kisline

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

2.4.2.4 Estri

Etilni estri maščobnih kislin in acetati višjih alkoholov so prevladujoči estri v vinu in se tvorijo med AF. Kvasovke tvorijo acetate na enak način kot maščobne kisline. Maščobne kisline se v večjih količinah tvorijo med AF, 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).

2.4.2.5 Žveplove spojine

Hlapne organske žveplove spojine, ki nastajajo med AF, so drugotnega pomena za cvetico vina, ker nastajajo v majhnih koncentracijah. Imele pa naj bi značilen negativen vpliv na kakovost. Najpomembnejša spojina je vodikov sulfid, ki ga je navadno v koncentraciji do 1 ng/L. Poleg tioetrov, kot sta dimetil sulfid in dietil sulfid, so v nekaterih vinih našli tudi manj hlapne žveplove spojine. Največjo koncentracijo teh spojin 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 AF je podoben nastanku etanola. Med drugimi se te spojine poleg metionola, še *N*-(3-(metiltio)-propil)-acetamid in 2-metil-tiolan-3-ol (Košmerl, 2007a).

Vodikov sulfid, kot najpomembnejša žveplova spojina, povzroča vonj po gnilih jajcih. Intenzivni vonj po žveplovih snoveh povzročajo še tioetri in tioli, ki spominjajo na vonj čebule in česna (Wondra, 1998).

2.4.2.6 Terpenske spojine

Terpenske spojine pripadajo sekundarni rastlinski sestavi, imajo pomembno vlogo pri tvorbi sortne ali primarne arome, njihova biosinteza se začne z acetyl-CoA. Nekateri mikroorganizmi so prav tako sposobni tvorbe terpenskih snovi, vendar nastanka teh pri kvasovkah vrste *Saccharomyces cerevisiae* še niso opazili. Monoterpenske spojine sestavljajo primarno aromo vina in so zato primerne pri sortni kategorizaciji vin. Terpenske snovi oblikujejo sortno aromo, zato lahko govorimo o terpenskih vzorcih, ki so značilni za posamezno sorto grozdja in so odvisni od področja rasti. Vsebnost teh spojin se med AF ne spreminja (Košmerl, 2007a).

2.4.2.7 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).

2.4.2.8 Dušikove spojine

Hlapne dušikove spojine so tudi produkt 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).

2.4.2.9 Laktoni

Mnogi laktoni nastajajo v vinu po različnih metabolnih poteh. V glavnem imajo γ - in δ -molekulska struktura. V večjih količinah nastajajo med staranjem vina in avtolizo kvasovk. Večje količine laktona sotolona (4,5-dimetil-3-hidroksi-2(5*H*)-furanon) so našli v botriticidnih vinih, kjer plesen vrste *Botrytis cinerea*, ki povzroča gnitje grozdja, kar je pri ugodnih klimatskih razmerah zaželeno, daje vinu specifično aromo. Sotolon ima sladko karamelno aromo. Vsebnost tega laktona v botritiziranih vinih je 5 do 20 $\mu\text{g/L}$, pri normalnih vinih pa pod 1 $\mu\text{g/L}$. Ta spojina doprinese k aromi tudi drugih posebnih (specialnih) vin npr. sherry vin (Košmerl, 2007a).

2.5 SESTAVINE MOŠTA IN VINA

Vino sestavlja mnogo različnih spojin, v nadaljevanju so omenjene najbolj pomembne. Te so ključne za razumevanje procesa pridelave vina.

2.5.1 Voda

V vinu je najbolj zastopana spojina in sicer med 75 in 85 %. Zaradi vode se vino obnaša kot tekočina, deluje kot topilo in kot reagent v kemijskih reakcijah v celotnem procesu pridelave od grozdja do zorenja vina (Bavčar, 2009).

2.5.2 Etanol

Kot najpomembnejši alkohol v vinu, nastane kot posledica delovanja kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* v času alkoholne fermentacije. Vinu daje stabilnost, deluje kot topilo in zagotavlja posebne senzorične lastnosti.

Količinsko je skupaj z ogljikovim dioksidom glavni produkt alkoholne fermentacije ter vpliva na metabolizem kvasovk in posledično tudi na vrsto ter količino nastalih spojin v vinu. Na koncu fermentacije deluje inhibitorno na rast in razmnoževanje kvasovk in drugih mikroorganizmov.

Kot topilo ima etanol pomembno vlogo za ekstrakcijo barvil in taninov med vinifikacijo rdečih sort, raztaplja hlapne snovi, ki se akumulirajo med fermentacijo, in tiste, ki se oblikujejo med staranjem v leseni posodi. Poleg tega sodeluje pri tvorbi hlapnih snovi kot reaktant in pri staranju vina reagira z organskimi kislinami in tvori estre, z aldehydi pa acetale. Vinu senzorično doda svoj specifičen vonj in okus, stopnjuje zaznavo sladkosti in grenkobe, v večjih koncentracijah pa deluje pekoče (Bavčar, 2009).

2.5.3 Metanol

Pravimo mu tudi metilni alkohol in je posledica hidrolize pektinskih snovi pod vplivom encima pektinmetil esteraze in ni produkt alkoholne fermentacije. Ima to negativno lastnost, da se v človeškem telesu oksidira v formaldehid in mravljično kislino. Oba produkta sta toksična za centralni živčni sistem. Med normalnim procesom vinifikacije metanol nikoli ne doseže škodljive koncentracije, kar velja tudi za uporabo pektolitičnih encimov. Slovenska zakonodaja dovoljuje v belih in rose vinih do 150 mg/L metanola, v rdečih pa do 300 mg/L. Koncentracija metanola v belih vinih dosega 40 do 120 mg/L, v rdečih vinih pa je nekoliko večja, od 120 do 150 mg/L. Vina iz grozdja, okuženega s plesnijo vrste *Botrytis cinerea*, imajo običajno večjo koncentracijo metanola. Metanol ne vpliva na senzorične lastnosti vina in minimalno reagira z drugimi spojinami v vinu (Bavčar, 2009).

2.5.4 Ogljikovi hidrati

Količinsko najbolj zastopano hranilo v moštu je sladkor, ki služi kot vir energije in ogljika kvasnim celicam. V odvisnosti od seva kvasovk rodu *Saccharomyces* obstajajo velike razlike v kinetiki porabe sladkorjev (glukoze ali fruktoze) zlasti proti koncu fermentacije, ko so celice v pozni stacionarni fazi. Odmiranje kvasnih celic proti koncu fermentacije in s tem povezana njena upočasnitev in/ali prekinitev je močno povezana s količino sladkorjev v moštu (Košmerl, 2007a).

Sladkorji so glavni vir ogljika in energije, ki se med fermentacijo presnavljajo v bioprocesu glikolize. Prva faza alkoholne fermentacije je po absorpciji glukoze in fruktoze fosforilacija sladkorjev (Košmerl, 2003).

Ogljikovi hidrati nastajajo v zeleni listni površini trte iz anorganskega ogljikovega dioksida. Pojav imenujemo asimilacija, do katere pride zaradi klorofila kot katalizatorja ob sodelovanju sončne svetlobne energije. Tako nastane sladkor, kisik pa se sprosti (Šikovec, 1993).

Reakcija fotosinteze: $6\text{CO}_2 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{O}_2$... (1)

2.5.4.1 Monosaharidi

So količinsko najbolj zastopani in tudi najpomembnejši ogljikovi hidrati (OH), tako v moštu, kot kasneje v vinu. So produkti fotosinteze vinske trte in so glavni substrat za kvasovke pri alkoholni fermentaciji kot vir energije, za tvorbo etanola, višjih alkoholov, estrov maščobnih kislin in aldehydov. Najpomembnejša monosaharida sta glukoza in fruktoza. Skupna koncentracija glukoze in fruktoze v zrelem grozdju je med 150 in 300 mg/L, večinoma pa med 180 in 220 mg/L. Njuna skupna koncentracija je eden najpomembnejših podatkov za določitev zrelosti grozdja.

Kvasovke so sposobne fermentirati oba monosaharida, vendar enostavneje izkoriščajo glukozo in jo tako tudi prvo porabijo, nato pa fermentirajo še fruktozo (Bavčar, 2009).

Omeniti pa moramo tudi pentoze, ogljikove hidrate s petimi ogljikovimi atomi. Te so v moštu slabše zastopane kot heksoze, običajno je njihova koncentracija v moštu okoli 1 g/L. Med pentozami prevladuje arabinoza, v sledovih ksiloza in riboza. Kvasovke med alkoholnim vrenjem ne morejo povreti pentoz v alkohol, zato ostanejo v vinu kot sestavina ekstrakta (Šikovec, 1993).

2.5.4.2 Disaharidi

Saharoza, trsni ali pesni sladkor, je edini pomemben disaharid v tehnologiji vina. Mošt žlahtnih evropskih sort vsebuje v povprečju 2 do 5 g/L saharoze, redkeje pa več (Šikovec, 1993).

Saharoza je disaharid, sestavljen iz glukoze in fruktoze. Kvasovke saharoze ne uporabljajo direktno pri alkoholni fermentaciji, privzemajo pa produkte njene hidrolize, glukozo in fruktozo, ki jih prodobijo s pomočjo encima invertaze. Ta sposobnost kvasovk nam

omogoča, da za povečanje koncentracije sladkorjev v moštu uporabimo saharozo (Bavčar, 2009) v t.i. dovoljenem postopku obogatitve mošta (Pravilnik o pogojih..., 2004).

2.5.4.3 Polisaharidi

V grozdju imajo strukturno (celuloza, pektin), in energetske funkcije (škrob). V vino pridejo kot posledica mletja in stiskanja ali pa mikrobiološke aktivnosti. V vinu in moštu so pomembni zaradi velikosti molekul in koloidnih lastnosti, saj lahko predstavljajo probleme pri filtraciji in preprečujejo bistrenje vina.

Koncentracija polisaharidov v vinu je zelo majhna, del jih prispevajo tudi kvasovke iz svojih celičnih sten, predvsem med podaljšanim stikom vina s kvasovkami (Bavčar, 2009).

2.5.5 Glicerol, organske kisline in maščobne kisline

Glicerol je najbolj zastopana komponenta v ekstraktu suhih vin. Vinu daje poln, prijeten in harmoničen okus. Njegova koncentracija se giblje okrog 5-8 mg/L in je odvisna od vsebnosti sladkorjev v moštu, temperature fermentacije, seva kvasovk in vsebnosti pantotenske kisline. Substrat za produkcijo glicerola je sladkor, v procesu glikolize pa je njegov prekursor za nastanek dihidroksiacetonfosfat. Encim dihidroksiacetonfosfat reduktaza reducira dihidroksiacetonfosfat v glicerolfosfat od hkratni reoksidaciji NADH molekule v NAD^+ . Nadalje encim glicerolfosfat fosfataza defosforilira glicerolfosfat v glicerol (Košmerl, 2003).

Glicerol je sekundarni metabolit presnove vinskih kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* v alkoholni fermentaciji vinskega mošta. Eden najbolj učinkovitih parametrov na proces fermentacije, ki vpliva na proces biosinteze glicerola v vinih, je temperatura fermentacije. Ne samo, da temperatura posredno ali neposredno vpliva na presnovo vinskih kvasovk, temveč je tisti dejavnik, s katerim v procesnem inženirstvu v vinarstvu lahko najbolj učinkovito vodimo ali kontroliramo proces grozdne fermentacije mošta v vino (Berovič in Herga, 2007).

Kisline v vinu so različnega izvora. Vinska in jabolčna sta rezultat nepopolne oksidacije sladkorjev in iz grozdne jagode prehajata v mošt. Kot posledica delovanja plesni vrste *Botrytis cinerea* se lahko izrazito povečata koncentraciji citronske in glukonske kisline. Med alkoholno fermentacijo pa nastajajo še druge organske kisline, kot so mlečna, očetna in jantarna kislina.

Količinsko so v vinu najbolj zastopane vinska, jabolčna, mlečna in citronska kislina, njihova skupna koncentracija pa je običajno med 5,5 in 8,5 g/L. Koncentracija je pomembna za stabilnost, barvo, kislost oziroma primeren pH in obstojnost vina. Skupaj imajo velik vpliv na senzorično ravnotežje vina, sodelujejo pri stabilizaciji vina, saj pospešujejo posedanje pektinov in beljakovin. Pomembno vplivajo tudi k boljši aromatici vina (Bavčar, 2009).

Kisline v vinu (Bavčar, 2009):

Vinska kislina

- njena koncentracija v moštu je 5-10 g/L
- najbolj zastopana kislina tako v moštu kot v vinu
- koncentracija je odvisna od sorte in od končnega volumna grozdne jagode ob trgatvi
- mikroorganizmi je ne uporabljajo kot substrat
- je slabo topna, izloča se kot K- ali Ca-sol (tartrati) oziroma vinski kamen

Jabolčna kislina

- njena koncentracija v moštu je 1-4 g/L
- koncentracija je odvisna od sorte, temperature v času dozorevanja in končnega volumna jagode
- mikrobiološko je nestabilna, mlečnokislinske bakterije jo spremenijo v mlečno kislino v procesu biološkega razkisa
- delno se izloča kot kalcijeva sol (Ca-malat)

Mlečna kislina

- v vinu je njena koncentracija 0-2,5 g/L, če je potekel biološki razkis, pa izjemoma več
- nastane z dekarboksilacijo jabolčne kisline pod vplivom mlečnokislinskih bakterij
- njene soli (laktati) so dobro topne in stabilne

Ocetna kislina

- najpomembnejša hlapna kislina
- v vinu igra pomembno vlogo kot aromatična spojina in pri tvorbi estrov
- pojavi se že med alkoholno fermentacijo pod vplivom delovanja kvasovk
- povečanje njene koncentracije nad 0,8 g/L je posledica delovanja škodljivih mikroorganizmov (ocetnokislinske bakterije)

Citronska kislina

- prehaja iz grozdne jagode v mošt, tvori se pod vplivom plesni vrste *Botrytis cinerea*
- v vinu je stabilna, neobstoja je v primeru aktivnosti mlečnokislinskih bakterij
- njena povprečna koncentracija v vinu je približno 0,7 g/L

Jantarna kislina (Košmerl, 2003)

Podobno kot glicerol, spada jantarna kislina med enega glavnih sekundarnih produktov fermentacije. V vinu lahko doseže koncentracijo 1 g/L, po izvoru pa nastane iz jabolčne kisline ali pa sladkorja preko piruvične kisline z encimi v sklopu Krebsovega cikla. Pri fermentaciji se 0,3 do 0,5 % sladkorjev pretvori v jantarno kislino. Manj dušika kot ima kvasovka na razpolago, več jantarne kisline tvori.

V vinu so prisotne tudi različne maščobne kisline. Nenasičene maščobne kisline nastajajo pri reakcijah nenasičenja nasičenih maščobnih kislin. Glavne so palmitinska (C 16:0), palmitoleinska (C 16:1), stearinska (C 18:0) in oleinska (C 18:1). Kratkoverižne maščobne kisline pa predstavljata kapronska in kaprilna kislina. Vse maščobne kisline so prekurzorji pri tvorbi estrov (Košmerl, 2003).

2.5.6 Dušikove spojine

Dušikove spojine so pomemben dejavnik pri pridelavi vina. Izkoriščajo jih kvasovke za izgradnjo lastnih strukturnih in funkcijskih beljakovin, kar vodi v povečanje kvasne biomase in sintezo potrebnih encimov, ki sodelujejo v številnih biokemijskih reakcijah med alkoholno fermentacijo. Pomembno vlogo imajo tudi pri tvorbi aromatičnih snovi, tako pozitivnih (nekateri višji alkoholi), kot negativnih (H_2S) (Košmerl, 2007a).

Najpomembnejši vir dušika predstavlja arginin, ki daje 30-50 % celotnega dušika. Lizin, serin, treonin, levcin, aspartat in glutamat so naslednje aminokisline, ki se uporabljajo, glicin, tirozin, triptofan in alanin pa so zadnje transportirane aminokisline. Nepopolna poraba arginina je posledica prevzema amonijevega iona, ki je po argininu najbolj zaželen vir dušika (Košmerl, 2003).

Grozdni sok vsebuje dovolj dušikovih snovi za normalen potek alkoholne fermentacije. Več dušika vsebujejo mošti, pridobljeni iz grozdja, kjer vinograde intenzivno gnojijo z dušikom in mogoče so ta vina zato bolj izpostavljena hitremu mikrobiološkemu razkisu. V skupnem dušiku je zelo pomembna vsebnost aminokislin, ki so nosilke aromatičnih snovi (Šikovec, 1993).

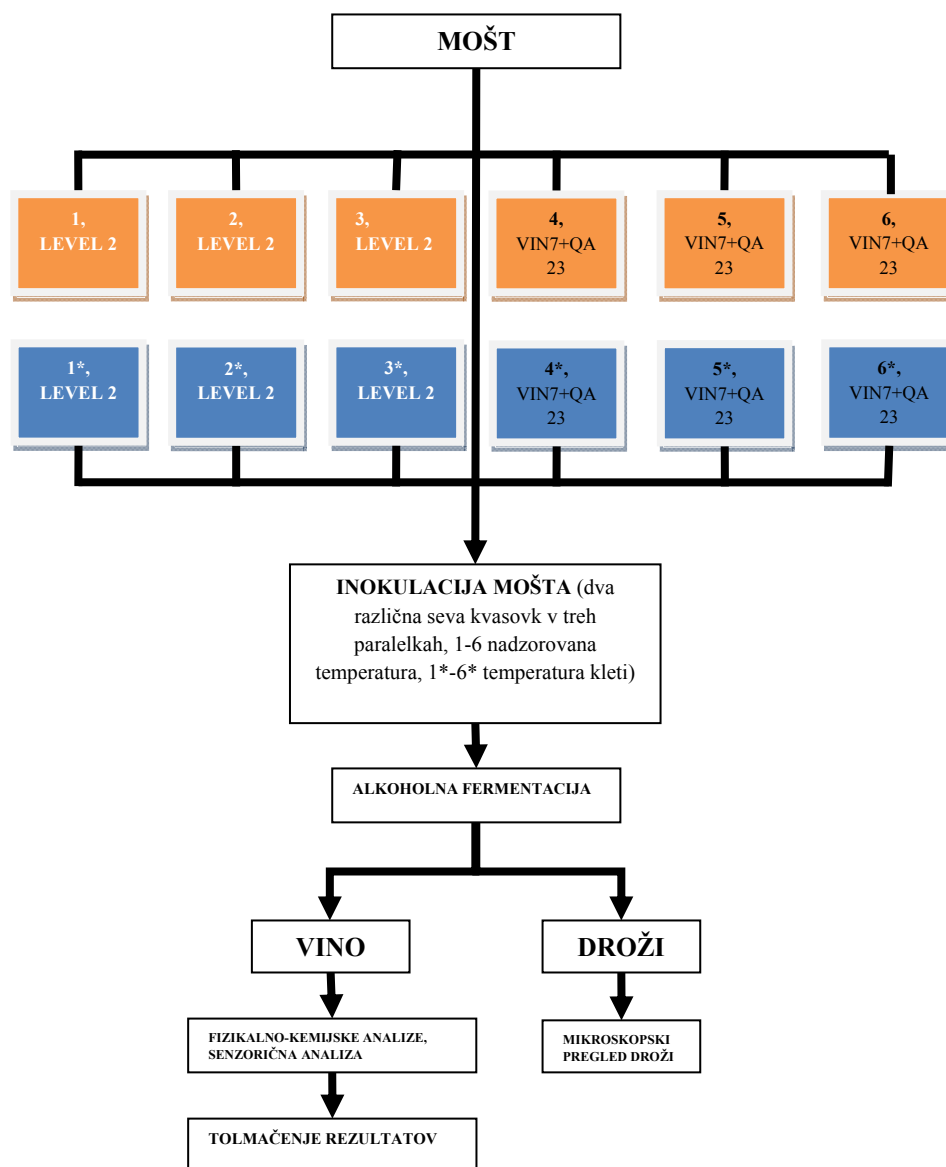
Koncentracija skupnega dušika v moštu znaša od 1,0 do 2,0 g/L. Anorganske dušikove spojine, kot so amonijak in amonijeve spojine, dosegajo do 300 mg/L, ostali del dušikovih spojin pa so organske spojine. Najpomembnejše med njimi so aminokisline, ki dosegajo 50-90 % koncentracije skupnega dušika. Vpliv dušikovih spojin na senzorično kakovost vina je minimalen (Bavčar, 2009).

2.5.7 Minerali

Minerali v vinu imajo vlogo kot sestavni deli vitaminov in encimov, sodelujejo pri izmenjavi hranil med kvasovkami in okoljem ter reagirajo z drugimi sestavinami (tvorba soli). Izjemoma lahko nekatere težke kovine, kot so svinec, živo srebro, kadmij, delujejo tudi toksično. Večina težkih kovin se izloči na dno posod pri alkoholni fermentaciji, zato so prisotne v vinih le v sledovih. V nekaterih izrednih razmerah pa lahko predvsem baker in železo povzročata napake vin, ki se odražajo v tako imenovanih lomih vina, spremembi okusa in oksidacijskih reakcijah (Bavčar, 2009).

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.1 ZASNOVA POSKUSA



Slika 1: Shematski prikaz poteka poskusa

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mošt

Uporabili smo mošt bele sorte sauvignon, letnika 2011, iz vinorodnega okolja Štajerska Slovenija. Mošt smo razdelili v dvanajst fermentorjev iz nerjavnega jekla, volumna 35 L. V spodnjih šestih fermentorjih, z oznakami od 1* do 6*, je mošt fermentiral pri nenadzorovani temperaturi oz. temperaturi kleti, ki je v povprečju znašala 21 °C. V zgornjih šestih fermentorjih, z oznako od 1 do 6, pa je fermentacija potekala pri nadzorovani temperaturi, ki je na začetku znašala 20 °C, nato smo fermentacijo vodili pri temperaturi 15 °C. Zadnji teden je alkoholna fermentacija fermentorjev 1 do 6 potekala pri temperaturi kleti.

3.2.2 Kvasovke

Pri poskusu smo za inokulacijo uporabili dva seva komercialnih kvasovk za bela vina:

LEVEL 2 (Lallemand, 2007)

- vsebuje dve vrsti kvasovk, *Torulaspora delbrueckii* in *Saccharomyces cerevisiae*
- kvasovki imata sposobnost medsebojnega dopolnjevanja, rezultat pa je boljša aromatična kompleksnost
- inokulacija poteka v dveh stopnjah in sicer najprej s kvasovko vrste *Torulaspora delbrueckii*, kasneje pa je moštu dodana še komplementarna kvasovka vrste *Saccharomyces cerevisiae*

VIN 7 + QA 23

- kombinacija vrst kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* (VIN 7) in *Saccharomyces bayanus* (QA 23)
- VIN 7 se uporablja za produkcijo aromatičnih belih vin pri nizkih temperaturah fermentacije. Sodeluje pri tvorbi arom in okusa po pasijonki, grenivki, kosmulji in guavi (Anchor wine yeast, 2008).
- QA 23 se uporablja pri pridelavi svežih belih vin. Je komplementarna kvasovka, ki se uporablja pri razvijanju vin sorte sauvignon, zanj značilna pa sta aroma in okus po pasjonki. Kvasovka je klasificirana kot vrsta *Saccharomyces bayanus* (Lallemand, 2010).

Preglednica 7: Uporabljeni sevi kvasovk

oznake fermentorjev	komercialno ime seva kvasovk	sevi kvasovk	proizvajalec	doziranje (g/hL)
1-3 in 1*-3*	Level 2 TM TD	<i>T. delbrueckii</i> (1. stopnja)	Lalemand S.A., Francija.	25
		<i>S. cerevisiae</i> (2. stopnja)		25
4-6 in 4*-6*	VIN 7	<i>S. cerevisiae</i> (1. stopnja)	Anchor Yeast, Cape Town, Južna Afrika.	15
	Lalvin QA23 [®]	<i>S. bayanus</i> (2. stopnja)	Lalemand S.A., Francija.	15

Legenda:

- vzorci 1-6 so fermentirali pri nižji temperaturi
- vzorci 1*-6* so fermentirali pri višji temperaturi

3.2.3 Kemikalije in reagenti

Pri analizah mošta in mladega vina smo uporabili naslednje reagente:

- 0,01 M raztopina joda
- $\text{Na}_2\text{O}_3\text{S}_2$ (Merck) za pripravo raztopine natrijevega tiosulfata pri določanju žveplovega dioksida v vinu po Rebeleinu
- NaOH (Merck) za pripravo 0,1 M in 1 M raztopine natrijevega hidroksida
- raztopina žveplove(VI) kisline (1 volumski del koncentrirane žveplove kisline in 3 volumski deli deionizirane vode)
- 1 % raztopina škrobovice
- galna kislina (Merck) za pripravo osnovne raztopine galne kisline pri določanju fenolnih spojin v vinu po Singletonu in Rossiju
- Folin-Ciocalteaujev reagent (Merck)
- Natrijev karbonat (Merck) za pripravo 20 % raztopine natrijevega karbonata
- Treonin (Calbiochem)) za pripravo osnovne raztopine *L*(-) treonina pri določanju FAN v vinu po Nicoliniju in sodelavcih
- acetatni pufer (pH=5,53) pri določanju FAN v vinu po Nicoliniju in sodelavcih
- ninhidrin (Merck) za pripravo barvnega reagentga pri določanju FAN v vinu po Nicoliniju in sodelavcih
- DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) (Sigma) v raztopini metanola
- reagent 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H_2DCFDA) (Sigma) za pripravo 1 mM raztopine v 96 % (v/v) etanolu
- 96 % (v/v) etanol (Merck)
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (Merck)+ kalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4) (Merck) za pripravo 50 mM kalijevega fosfatnega pufra (pH = 7,8)
- pufurna raztopina za umerjanje pH metra (pH=4,00 in pH=7,02)
- Klorovodikova kislina (37 %, Merck) za pripravo 0,1 M raztopine
- Mlečna (Sigma), jabolčna (Fluka), vinska (Merck) in jantarna (Merck) kislina ter fruktoza (Merck), glukoza (Kemika) in glicerola (Panreac) za pripravo standardnih raztopin za HPLC
- NaCl (Merck) za pripravo 0,9 M raztopine

3.2.4 Oprema in aparature

Poleg standardne laboratorijske opreme smo pri praktičnem delu uporabili naslednjo opremo:

- turbidimeter (HACH 2100 AN)
- UV-VISIBLE RECORDING spektrofotometer (Shimadzu UV-160A)
- prenosni spektrofotometer (Konica Minolta CM-700d/600d)
- pH meter s kombinirano stekleno elektrodo (Mettler Toledo DL50 Graphix)
- svetlobni mikroskop (MOTIC BA 300) s kamero in programsko opremo MOTIC IMAGES PLUS 2.0
- centrifuga (Eppendorf)
- celulozno acetatni filter 0,45 µm (Sartorius)
- plinski kromatograf z masno-spektrometričnim detektorjem (GC 5975C, masno-spektrometrični detektor MSD 7890A, Agilent Technologies)
- magnetno mešalo (Magnetic stirrer mod microvar)
- tehnica (Sartorius-analytic)
- HPLC aparat z UV in RI detektorjem (tekočinski kromatograf visoke ločljivosti, znamka Knauer)

3.2.5 Nastavitev fermentacijskega poskusa

V dvanajst fermentorjev iz nerjavnega jekla in prostornine 35 L smo razdelili mošt in jim dodali starterske kulture vinskih kvasovk. V fermentorje, označene z 1 do 3 in 1* do 3*, smo dodali komercialne vinske kvasovke LEVEL 2, v fermentorje, označene z 4 do 6 in 4* do 6*, pa smo dodali kvasovke s komercialnima imenoma VIN7+QA23. V fermentorjih označenih z 1 do 6 smo začeli alkoholno fermentacijo pri nadzorovani temperaturi 20 °C. V drugih šestih fermentorjih, označenih z 1* do 6*, pa je potekala alkoholna fermentacija pri nenadzorovani temperaturi oziroma temperaturi kleti, ki je v povprečju v celoti znašala 21 °C. Na ta način smo za vsak vzorec dobili tri paralelke. Med fermentacijo smo spremljali koncentracijo reducirajočih sladkorjev. Po koncu fermentacije smo mlado vino pretočili, očistili fermentorje in odvzeli usedlino kvasovk (droži). Sledilo je še žveplanje posameznih fermentorjev s 3,5 g kalijevega metabisulfida (10 g SO₂ / 100 L mladega vina). Natanko teden dni po opravljenem prvem pretoku in žveplanju smo začeli opravljati fizikalno-kemijske analize pridelanih mladih vin.

3.3 FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE

3.3.1 Določanje žveplovega dioksida po Ripperju

Določanje prostega in skupnega žveplovega dioksida (SO_2) po Ripperjevi metodi temelji na oksidacijsko-redukcijski reakciji z raztopino joda (I_2). Za določitev koncentracije prostega SO_2 vzorec vina naprej nakisamo z dodatkom žveplove(VI) kisline (s tem zmanjšamo oksidativni vpliv vina, predvsem polifenolnih spojin, pri titraciji z raztopino joda), dodamo indikator (škrobovico) in titriramo s standardizirano raztopino joda. Jod oksidira žveplovo(IV) kislino v žveplovo(VI) kislino in v končni točki titracije (tj. tik po ekvivalentni točki) prebitna količina joda obarva raztopino modro.

Za določitev koncentracije skupnega SO_2 smo vzorcu vina naprej dodali 1 M raztopino NaOH, da smo dosegli hidrolizo vezanega SO_2 , tj. acetaldehid- α -hidroksisulfonata in drugih bisulfidnih kompleksov. Nato smo dodali ostale reagentne in jodometrično titrirali kot pri določanju prostega SO_2 (Košmerl in Kač, 2007).

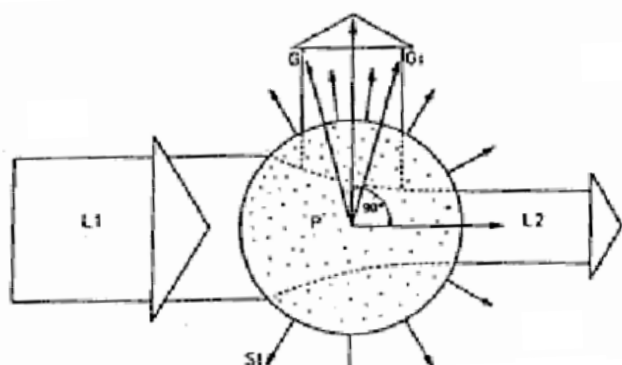
Reakcija pri določanju žveplovega dioksida po Ripperju

- oksidacija žveplove(IV) kisline v žveplovo(VI) kislino



3.3.2 Določanje motnosti vina

Motnost vina smo določali turbidimetrično s turbidimetrom znamke HACH 2100AN TURBIDIMETER. Turbidimeteru, ki opravlja meritve pri sipanju svetlobe pod kotom 90° , pravimo nefelometer. Ta izmeri motnje potovanja svetlobe skozi tekočino, ki jih povzročijo trdni delci v tekočini. Enota za merjenje motnosti je NTU (O.I.V., 2011).



Slika 2: Princip optičnega merjenja motnosti vina (O.I.V., 2011)

Princip merjenja (legenda):

L1 = svetlobni žarek

L2 = svetlobni žarek, ki je prešel skozi vzorec

P = vzorec

St = razpršena svetloba

G/G1 = žarka iz razpršene svetlobe, ki potujeta proti detektorju

3.3.3 Določanje barvnih parametrov vina

Obarvanost belih vin merimo direktno (brez razredčitve) s spektrofotometrom. Merimo absorbanco vzorca pri valovni dolžini 420 nm. V širšem spektru svetlobe od 400-440 nm lahko izmerimo tudi odtenke rjave barve belih vin (Košmerl in Kač, 2007).

Vzorec smo odpipetirali direktno v kvarčno kiveto in merili absorbanco (A_{420}) in absorpcijski spekter (A_{400} - A_{440}) proti slepemu vzorcu (voda). Za določanje odtenka oziroma tona barve pa smo merili absorbanco vzorca pri valovnih dolžinah A_{420} - A_{520} . Razmerje absorbance med 420 nm in 520 nm pomeni odtenek barve.

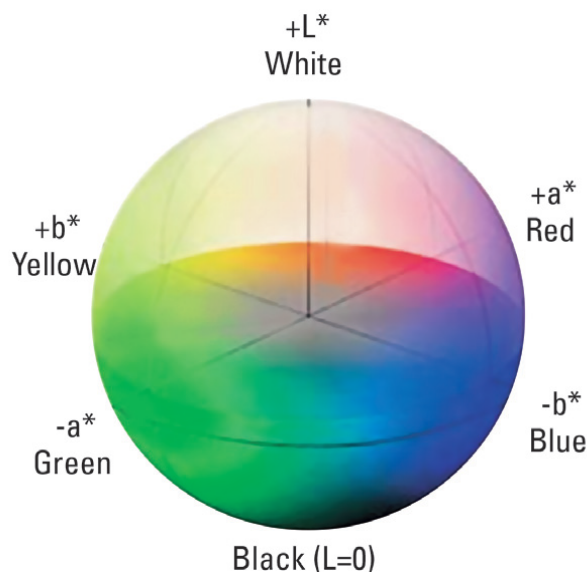
intenziteta barve: $I = A_{420}$

...(3)

3.3.3.1 Določanje barvnih parametrov s kromametrom

UV vidna spektrofotometrija je hitra, enostavna in nedestruktivna analitska tehnika za merjenje določenih lastnosti tekočin. To velja predvsem, ko govorimo o barvi nekega vzorca, ki jo lahko določimo z merjenjem absorbance pri različnih valovnih dolžinah. Prednost takih merenj je predvsem v tem, da s kromametrom lahko izmerimo barvo - intenziteto vseh valovnih dolžin naenkrat in to v delčku sekunde.

Kar nekaj pomembnih merenj kakovosti vina lahko ocenimo z matematičnimi kombinacijami vrednosti absorbanc pri različnih valovnih dolžinah. Lestvica CIE $L^* a^* b^*$ je ena najbolj široko uporabljenih mednarodnih lestvic, ki nam omogoča izračune matematičnih kombinacij vrednosti absorbanc, ki so bile posnete skozi celoten viden spekter s standardnimi nastavitvami za vir svetlobe in opazovalnega kota (Gordon, 2009).



Slika 3: Predstavitev parametrov L^* a^* b^* iz barvnega spektra (Gordon, 2009)

Slika 3 nam prikazuje parametre L^* , a^* in b^* na barvnem spektru. Vrednosti, ki jih posnamemo s kromamatrom, so v območju od 0 do 100.

Na primer: vrednost parametra $L^*=0$ pomeni popolnoma črno barvo, medtem ko vrednost parametra $L^*=100$, predstavlja popolnoma belo barvo.

3.3.4 Določanje skupnih fenolnih spojin v vinu

Fenolne spojine so lahko relativno enostavne fenolne spojine, ki izvirajo iz grozdja, kakor tudi zelo kompleksne fenolne spojine (tanini), ki se ekstrahirajo iz lesene vinske posode med procesom zorenja vina. Fenolne spojine so pomembne, saj prispevajo k barvi in stabilnosti vina, v večjih koncentracijah pa so odgovorne za trpkost (astringentnost) ter grenkobo okusa. V prisotnosti kisika se hitro oksidirajo in povzročajo porjavitev vina.

Fenolne spojine absorbirajo predvsem svetlobo UV spektra in vidnega spektra. Zato lahko odčitano vrednost absorbance pri primerni valovni dolžini uporabimo za oceno koncentracije skupnih fenolov, skupnih antocianinov, obarvanih antocianinov, deleža antocianinov v obarvani obliki, skupnih hidroksicimetnih kislin in ekvivalenta kavne kisline.

Po dodatku Folin-Ciocalteaujevega reagenta, smo pustili vzorec stati dve uri (medtem potече oksidacija fenolnih spojin), nato izmerili absorbanco (UV-VIS spektrofotometer) reakcijske mešanice pri valovni dolžini 765 nm. Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin smo odčitali iz umeritvene krivulje in rezultat izrazili kot mg galne kisline/L (Košmerl in Kač, 2007).

3.3.5 Določanje antioksidativnega potenciala vina

Antioksidativni potencial (AOP) vina smo določili s stabilnim prostim radikalom DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil). Uporabili smo metanolno raztopino radikala DPPH z absorbanco približno 1,0 pri valovni dolžini 517 nm, kjer je absorpcijski maksimum. Po

redukciji DPPH z antioksidantom (fenolne spojine v vinu) nastane DPPH₂, ki ne absorbira pri tej valovni dolžini, zato absorbanca metanolne raztopine pade. Bolj kot se absorbanca zmanjša, večji antioksidativni potencial ima vino (Podlogar, 2007).

Formule za izračun DPPH:

$$\Delta A = A_{\text{standard}} - (x \cdot A_{\text{slepa}}) \quad \dots(4)$$

$$\text{DPPH (mol)} = \frac{\Delta A}{12000 \text{ (L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}) \cdot l \text{ (cm)}} \cdot V_{\text{zmesi}} \text{ (L)} \quad \dots(5)$$

$$\text{DPPH (mol/L)} = \frac{\text{DPPH (mol)}}{V_{\text{vzorca}} \text{ (}\mu\text{L)}} \cdot R \cdot 1000000 \text{ (}\mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}) \quad \dots(6)$$

Legenda:

A_{standard} – absorbanca standarda

x – povprečje izmerjenih absorbanc vzorca

A_{slepa} – absorbanca slepe probe

V_{zmesi} – volumen reakcijske zmesi

12000 – povprečni molarni ekstinkcijski koeficient (molarna absorptivnost) DPPH

l – dolžina optične poti v kivetu

V_{vzorec} – volumen vzorca

R – razredčitev vzorca (1, za bela vina)

1000000 – faktor za preračun mikrolitrov v litre

3.3.6 Določanje prostega aminokislinskega dušika (FAN) v vinu

Aminokislinska sestava mošta je skupaj s koncentracijo sladkorjev in skupnih kislin glavni kakovostni parameter kemijske sestave mošta. Znano je, da je vsebnost aminokislin v pozitivni korelaciji s stopnjo zrelosti grozdja. Aminokislina so med alkoholno fermentacijo pomemben vir dušika za kvasovke, ki jih izkoriščajo za izgradnjo lastnih strukturnih in funkcijskih beljakovin. Tako posledično vplivajo na rast kvasne biomase, normalen potek fermentacije in sodelujejo pri tvorbi aromatičnih snovi vina.

S skupnim imenom prosti aminokislinski dušik ali FAN (Free Amino Nitrogen) označujemo dušikove spojine, ki na opisan način sodelujejo v metabolizmu kvasovk. Iz podatkov o začetni koncentraciji α-aminokislin lahko sklepamo na možne probleme med fermentacijo in napovemo potrebo po dodajanju dušikovih snovi v mošt. Pomanjkanje prostih aminokislin je pogost vzrok za počasne in nepopolne alkoholne fermentacije.

Razredčenemu vzorcu mošta ali vina smo dodali razvijalec barve (ninhidrin, fruktoza in acetatni pufer), segrevali, po ohladitvi dodali raztopino za razredčevanje, dobro premešali in posneli absorpcijski spekter v območju valovnih dolžin od 450 nm do 700 nm. Absorbanco smo izračunali pri valovni dolžini, kjer ima absorpcijski spekter maksimum. Rezultat smo izrazili v mg N/L (Košmerl in Kač, 2007).

3.3.7 Določanje pufrne kapacitete vina

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 (merilna) pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H_3O^+ ionov v raztopini (Košmerl in Kač, 2007).

Pri dodajanju baze oziroma kisline je potekla reakcija:



Pri vsakokratnem dodatku titranta potenciometrično določimo pH. Za meritve smo uporabljali kombinirano stekleno elektrodo.

Iz podatkov o pH in točnem volumnu dodanega titranta (0,1 M raztopina NaOH in 0,1 M raztopina HCl), ki smo ga preračunali v molarno koncentracijo v mešanici, je bilo možno narisati krivuljo pufrne kapacitete, to je odvisnost pH od spremembe koncentracije baze. Iz enačbe premice smo tako izračunali dejansko pufrno kapaciteto vzorca (Košmerl in Kač, 2007).

Iz obeh enačb premic smo določili dejansko pufrno kapaciteto vzorca:

$$\text{PK ob dodajanju kisline} = \text{pH}_z - 0,5 \quad \dots(8)$$

$$\text{PK ob dodajanju baze} = \text{pH}_z + 0,5 \quad \dots(9)$$

Dejanska PK vzorca = PK ob dodajanju kisline + PK ob dodajanju baze

Legenda: PK – pufrna kapaciteta
 pH_z – začetna vrednost pH

3.3.8 Določanje skupnih (titrabilnih) kislin v vinu

Uporabili smo potenciometrično metodo (Košmerl in Kač, 2007).

Pri kislinsko-bazni potenciometrični titraciji merimo razliko v potencialu med elektrodama, ki sta potopljene direktno v vzorec mošta ali vina. Ena elektroda (referenčna) ima stalen (znan) potencial, druga steklena (merilna) pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H_3O^+ ionov v raztopini. Uporabljamo pH meter s skalo v pH enotah.

Za meritve smo uporabljali kombinirano stekleno elektrodo.

Titracija z 0,10352 M oziroma z 0,009713 M raztopino NaOH je potekala na avtomatskem titratorju do končne točke titracije $\text{pH}=7,0$ oziroma $\text{pH}=8,2$.

Masno koncentracijo skupnih (titrabilnih) kislin (TK) in kislodelujočih soli smo izračunali po formulah:

$$TK_1(g/L) = \frac{a_1(mL) \cdot c \cdot M(g/mol)}{V(mL) \cdot n} \quad \dots(10)$$

oziroma

$$TK_2(g/L) = \frac{a_2(mL) \cdot c \cdot M(g/mol)}{V(mL) \cdot n} \quad \dots(11)$$

Za izračun skupnih kislin je potrebna celokupna poraba baze (a_3), ki predstavlja vsoto $a_1 + a_2$.

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 – volumen porabljene baze pri titraciji do pH 8,20 (mL)
 c – koncentracija baze 0,1 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 ($n = 2$)

Kislodelujoče soli smo izračunali po formuli:

$$\text{Kislodelujoče soli (mg/L)} = (TK_2(g/L) - TK_1(g/L)) \cdot 1000 \quad \dots(12)$$

3.3.9 Določanje organskih kislin, sladkorjev in glicerola z metodo HPLC

Koncentracijo organskih kislin (vinske, jabolčne, mlečne, jantarne), sladkorjev in glicerola smo določili z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (HPLC).

Kromatografija je separacijski proces, kromatografska analiza pa je postopek, kjer naprej ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznamo z ustrezno detekcijo s ciljem kvalitativne ali kvantitativne določitve (Žorž, 1991)

Vzorci mladih vin smo pred analizo filtrirali skozi membranski filter z velikostjo por 0,45 μm in jih injicirali na kolono. Ločitev organskih kislin je potekala na ionsko izmenjevalni koloni AMINEX HPX-87 H, ločene organske kisline pa smo detektirali z UV detektorjem pri valovni dolžini 210 nm.

Kromatografski pogoji:

- temperatura kolone: 65 °C
- mobilna faza: 0,0125 M H_2SO_4
- 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 x 7,8 mm
- avtomatski podajalec vzorcev: Spark Holland, Marathon-XT

- detektor: UV-VIS, Knauer
- zapis signala: programska oprema Eurochrom 2000

3.3.10 Kvalitativno določanje vsebnosti aromatičnih spojin z metodo GC-MS

Za določitev hlapnih sestavin arome smo uporabili najboj primerno analizno metodo, plinsko kromatografijo (GC) z masno-spektrometrično detekcijo (MS), ki omogoča identifikacijo posameznih spojin. Ker so posamezne sestavine arome prisotne v precej majhni koncentraciji, jih je pred analizo potrebno koncentrirati. V ta namen uporabljamo različne ekstrakcijske tehnike, v našem primeru brez topil. Govorimo o mikroekstrakciji na trdno fazo (angl. *solid-phase microextraction*, SPME) (Prosen in sod., 2007).

Ekstrakcijo sestavin arome iz plinske faze vzorca smo izvedli s SPME vlaknom. Po termostatiranju na vodni kopeli pri 50 °C, smo SPME vlakno vstavili v plinotesno vialo nad vzorec. Vlakno je bilo izpostavljeno (35 min) le plinski fazi, s tekočo fazo ni imelo stika. Vlakno smo nato prenesli v injektor plinskega kromatografa.

S plinskim kromatografom z masno-spektrometričnim detektorjem smo analizirali hlapne aromatične spojine v vzorcih. Uporabljali smo kolono Vocol (Supelco, ZDA), temperatura injektorja je bila 250 °C, temperatura detektorja pa 280 °C. Spojine smo identificirali na podlagi retencijskih časov (primerjava s standardi) in masnih spektrov. Ploščino kromatografskega vrha smo izmerili v kromatogramu.

3.4 SENZORIČNA ANALIZA

Senzorična analiza je opisovanje in ocenjevanje lastnosti živila s človekovimi čuti. Obsega niz različnih tehnik in načinov, ki omogočajo natančno merjenje človekovega odziva na hrano, minimalizirajo možne stranske učinke ocenjevanega izdelka ter minimalizirajo zunanje učinke, ki vplivajo na preskuševalčevo oziroma potrošnikovo zaznavo. Cilj senzorične analize je definirati posamezne senzorične lastnosti ter zagotoviti pomembne in uporabne informacije različnim profilom živilske stroke.

S priznanjem senzorične analize kot znanstvene discipline je postal njen pomen še večji in se klub številnim sodobnim in visoko občutljivim inštrumentalnim analiznim metodam (plinska in tekočinska kromatografija, infrardeča in ultravijolična spektrometrija, nuklearna magnetna resonanca itd.) še povečuje (Golob in sod., 2006).

Senzorična analiza je znanstvena disciplina o merjenju in vrednotenju lastnosti živil s čutili. Vezana je na znanstveno izvajanje s pomočjo senzoričnih metod, ali pa na neznanstveno s pomočjo organoleptičnih metod (Košmerl, 2007b).

Opisna ali deskriptivna analiza (Golob in sod., 2006)

Analiza spada med analitične senzorične preskuse. Uporabljamo jo za preiskovanje enega ali več vzorcev z namenom, da označimo tako kvaliteto kot kvantiteto ene ali več senzoričnih lastnosti. Opisna analiza je postopek opisovanja zaznanih senzoričnih lastnosti izdelka, zato pravimo, da je to metoda, pri kateri senzorične lastnosti izdelka identificiramo, jih opišemo z besedo in nato tudi kvantitativno ovrednotimo. Vse metode so objektivne, saj jih izvajajo le usposobljeni senzorični preizkuševalci. Opisna analiza temelji na dejstvu, da je senzorični vtis, ki ga pri ocenjevanju vzorca zazna preizkuševalec, sestavljen iz številnih prepoznavnih, močnejše ali slabše izraženih senzoričnih lastnosti. Te lastnosti opiše preizkuševalec z deskriptom. To je definiran izraz (beseda ali opis), s katerim preizkuševalec opiše zaznavo. Značilnost vsakega deskriptorja je, da omogoča ocenjevanje na neki intenzivnostni lestvici.

Pri senzorični analizi, ki smo jo izvedli v okviru diplomske naloge, so degustatorji ocenjevali vzorce s pomočjo lestvice od 1 do 5. Ocenjevali so naslednje parametre:

- vonj po tropskem sadju (pasjonka, mango);
- vonj po citrusih (grenivka, limona);
- vonj po sadju (hruška, jabolko);
- vonj po zelenem (zelena paprika);
- celokupna kakovost (okus in aroma);

Poleg naštetih parametrov so degustatorji na koncu podali še opisno oceno in pripombo ter rangirali vzorce od prvega do tretjega mesta.

3.5 MIKROBIOLOŠKE ANALIZE DROŽI

Določali smo antioksidativni potencial droži in pregledali vzorce droži pod mikroskopom.

3.5.1 Antioksidativni potencial droži

Celice kvasovk imajo sposobnost omejenega števila podvojevanj v smislu reproduciranja skozi svoj življenjski čas. Tako predstavljajo zanimiv model za študij, kadar govorimo o procesu staranja in na ta način omogočajo izvedbo eksperimenta, ki ga pri višjih evkariontih težko izvedemo. Ko celice kvasovk vstopijo v stacionarno fazo, se preneha razmnoževanje, metabolizem pa se upočasni. Celice so sposobne preživeti v tem stanju tudi po več tednov ali mesecev brez hranil (Jakubowski in sod., 2000).

Pri določanju antioksidativnega potenciala droži smo uporabili metodo za določanje znotrajcelične oksidacije celic. S to metodo smo želeli dokazati, da imajo kvasne celice, kljub temu, da so v stacionarni fazi rasti in že nekaj časa ne fermentirajo, določen antioksidativni potencial. Metodo smo izvajali z z barvilom 2',7'-diklorodihidrofluorescein (H_2DCF). Spojino smo dodali suspenziji celic kot 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H_2DCFDA), ki zaradi svoje nepolarnosti prehaja skozi celično membrano. V celici se deacetilira do oblike 2',7'-diklorodihidrofluorescein (H_2DCF) in nato v prisotnosti oksidantov oksidira do diklorofluoresceina (DCF), ki fluoresceira. Nižja kot je odčitana fluorescenca, večji je antioksidativni potencial določenega vzorca.

V 2-mL Eppendorf centrifugirko smo prenesli 2 mL suspenzije kvasnih celic (droži) in centrifugirali 5 min pri 14000 obr./min (centrifuga 5415 C, Eppendorf). Po odstranitvi supernatanta smo sediment 3x sprali s 50 mM kalijevim fosfatnim pufrom (pH 7,8). Sedimentu smo nato dodali 500 μ L 50 mM kalij fosfatnega pufra (pH 7,8), premešali in prenesli 100 μ L suspenzije v novo centrifugirko. Sledil je dodatek 890 μ L 50 mM kalij fosfatnega pufra (pH 7,8) in inkubacija 5 min pri 28 °C. Po končani inkubaciji smo dodali 10 μ L sveže pripravljene 1 mM raztopine H_2DCFDA . Eppendorf centrifugirke smo prenesli na stresalnik in inkubirali v temi 15 min pri 28 °C. Sledil je prenos vzorcev (200 μ L) v mikrotitrsko ploščico in merjenje fluorescence na čitalcu mikrotitrskih plošč. Valovna dolžina vzbujanja je bila 488 nm, emisije pa 520 nm. Rezultati so izraženi kot fluorescenca glede na suho maso droži (F/SS_D)

3.5.2 Mikroskopski pregled droži

Ko se je alkoholna fermentacija zaključila, smo opravili prvi pretok vina, vino žveplali in odvzeli usedlino, ki se je usedla na dno fermentorja. Z mikroskopskim pregledom droži smo ugotavljali, ali je v usedlini kvasne biomase, ki smo jo vzeli po pretoku vina, poleg kvasnih celic še kaj drugega in v kakšnem stanju so kvasne celice.

Usedlino smo naprej resuspendirali z 0,9 M NaCl, da smo vzorce nekoliko razredčili. Suspenzijo smo nato s kapalko prenesli na objektno stekelce in jo prekrili s krovnim stekelcem. Na ta način smo pripravili vzorce za pregled usedlin pod svetlobnim mikroskopom znamke MOTIC BA 300 pri 400-kratni povečavi. Digitalne fotografije kvasnih celic in drugih usedlin smo posneli s pomočjo računalniškega programa MOTIC IMAGE PLUS 2.0.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

V nadaljevanju so prikazani rezultati analiz mošta in vina, ki smo jih pridobili s fizikalno-kemijskimi in mikrobiološkimi analizami, prav tako pa tudi rezultati senzorične analize. Vzorci, označeni z 1 do 6, so tisti, ki so fermentirali pri nadzorovani (nižji) temperaturi, medtem ko so vzorci označeni z 1* do 6* tisti, ki so fermentirali pri nenadzorovani (višji) temperaturi oziroma temperaturi kleti. Ko govorimo o prvem sevu kvasovk, imamo v mislih vzorce, označene od 1 do 3 oziroma 1* do 3*. Vzorci, fermentirani z drugim sevom kvasovk, imajo oznake od 4 do 6 oziroma od 4* do 6*.

4.1 REZULTATI ANALIZ MOŠTA

Preglednica 8 nam prikazuje rezultate fizikalno-kemijskih analiz mošta sorte sauvignon, letnik 2011, ki so bila opravljena pred začetkom alkoholne fermentacije. 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).

Preglednica 8: Osnovni kemijski parametri mošta sorte sauvignon, letnika 2011

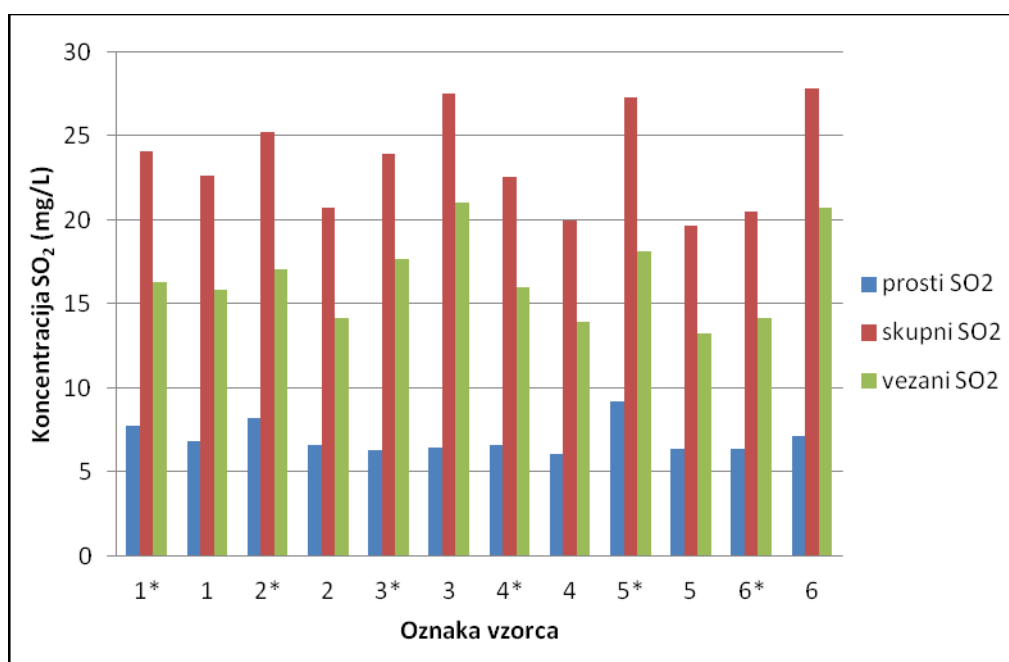
parameter	enota	izmerjena vrednost
sladkorna stopnja	°Oe	85
sladkor	°Brix	19,78
vsebnost glukoze+fruktoze	g/L	192,86
relativna gostota	/	1,0827
pH	/	3,25
titrabilne kisline (pH=7,0)	g/L	6,31
skupne kisline (pH=8,2)	g/L	6,64
kislodelujoče soli	mg/L	200
hlapne kisline	g/L	0,05
prosti SO ₂	mg/L	8
skupni SO ₂	mg/L	24
kislinska pufna kapaciteta	mmol/L/0,5 pH	19,86
bazična pufna kapaciteta	mmol/L/0,5 pH	25,21
dejanska pufna kapaciteta	mmol/L/pH	45,1
orientacijska pufna kapaciteta	mmol/L/pH	50,4
FAN	mg N/L	125,8
hlapne kisline	g očetne kisline/L	0,18

4.2 REZULTATI ANALIZ VINA

4.2.1 Določanje žveplovega dioksida po Ripperju

V vinarstvu uporabljamo žveplo kot 5-6 % vodno raztopino žveplovega dioksida ali kot kalijev metabisulfit ($K_2S_2O_5$) zaradi antioksidativnega in antimikrobnega delovanja (preprečevanje rasti in razmnoževanja neželenih kvasovk in bakterij). Koncentracija 35 mg prostega SO_2 /L vina namreč popolnoma onemogoči delovanje polifenoloksidaz. Običajno vina vsebujejo 5-40 mg prostega SO_2 /L vina. Prosti SO_2 je definiran kot nevezana oblika SO_2 v vinu oziroma kot žveplov dioksid, ki ni vezan na acetaldehid, druge aldehyde in organske spojine. V vinu je raztopljen kot SO_2 in HSO_3 . Skupni SO_2 pa je definiran kot vsota vseh zvrsti žveplovega dioksida v vinu, bodisi v prosti ali vezani obliki (Košmerl in Kač, 2007).

Koncentracija skupnega žveplovega dioksida (SO_2) pri mladih vinih ne sme presegati 150 mg/L, koncentracija prostega žveplovega dioksida pa ne sme presegati 30 mg/L za bela mlada vina (Pravilnik o pogojih..., 2004).



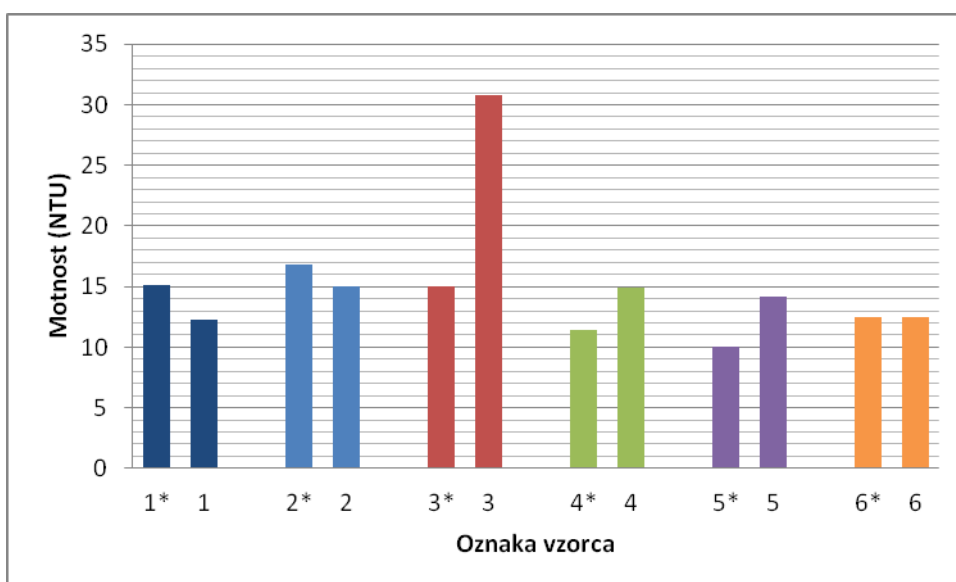
Slika 4: Vsebnost prostega, skupnega in vezanega SO_2 (mg/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 4 prikazuje rezultate vsebnosti žveplovega dioksida v mladih vinih. Mlado vino smo po pretoku samo enkrat žveplali, zato smo dobili tudi relativno majhne vsebnosti žveplovega dioksida. Če primerjamo koncentracijo skupnega dušika v moštu (24 mg/L) in mladega vina, opazimo, da se je koncentracija pri polovici vzorcev zmanjšala, pri polovici pa je ostala enaka oziroma se je povečala do 2-3 mg/L. Vzrok zmanjšanja koncentracije v polovici vzorcev je verjetno posledica tvorbe nekaterih porabnikov žvepla, kot so acetaldehid, piruvična kislina itd. Največ skupnega žveplovega dioksida je imel vzorec 6

(28 mg/L), najmanj pa vzorec 4 (20 mg/L). Glede na pravilnik, ki govori, da koncentracija prostega SO₂ ne sme presegati 30 mg/L, vsi vzorci spadajo v omenjeno območje vrednosti.

4.2.2 Motnost

Motnost je normalen pojav vsakega mošta in mladega vina. Mlado vino se začne čistiti samo od sebe 2 do 4 tedne po končani alkoholni fermentaciji, odvisno od vsebnosti titrabilnih kislin in ekstrakta. Ponovno se lahko motnost pojavi po prvem pretoku, toda tudi ta motnost sodi k normalnemu procesu zorenja vina. Pri prvem pretoku se namreč poruši fizikalno-kemijsko ravnovesje vina, do spemembe motnosti pa prav tako lahko pride zaradi spremembe temperature. Pri motnosti imajo poglavitno vlogo spremembe v kislosti, zlasti v koncentraciji prostih vodikovih ionov (H⁺) ali vrednosti pH, pa tudi zaradi električnega naboja v vinu raztopljenih koloidov, pretresov ali stresa vina (Šikovec, 1993).

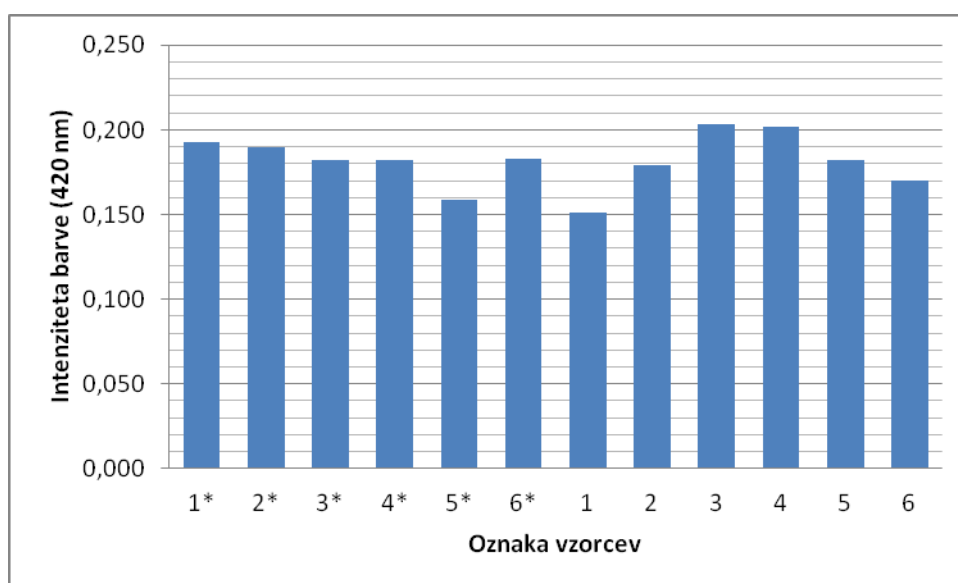


Slika 5: Motnost vina (NTU) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Na sliki 5 je razvidno, da je imel največjo motnost vzorec 3 (30,8 NTU). Razlog je v tem, da kvasovke še niso zaključile fermentacije in se še niso posedle na dno fermentorja. Pri drugih vzorcih se motnost, ne glede na različen sev kvasovk in različne fermentacijske temperature, ni bistveno razlikovala. Značilnost prvega seva kvasovk je manjša motnost pridelanih mladih vin pri višji fermentacijski temperaturi (izjema je le paralelka 3), medtem ko je pri drugem sevu ravno obratno. Najmanjšo motnost je imel vzorec 5* (10,0 NTU).

4.2.3 Barvni parametri

Bela vina vsebujejo manj barvil kot rdeča, vseeno pa tudi v belih vinih najdemo sledove nekaterih barvil kot so klorofil, karoten in ksantofil. Barvo opisujemo različno glede na spekter absorbirane in prepuščene svetlobe, pri čemer vse subjektivne zaznave ne pomenijo jasno definirane fizikalne veličine (intenziteta barve, odtenek barve, spekter svetlobe). Na barvo vina poleg pH vplivata tudi žveplov dioksid in alkohol. Z naraščanjem vrednosti pH, večanjem koncentracije SO_2 in večanjem koncentracije alkohola se zmanjšuje absorbanca pri 420 nm (Košmerl in Kač, 2007).



Slika 6: Intenziteta barve pri A_{420} v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 6 nam prikazuje intenziteto barve vzorcev, merjeno s spektrofotometrom pri 420 nm. Če se navezujemo na dejstvo, da se z naraščanjem vrednosti pH in večanjem koncentracije SO_2 absorbanca vzorca zmanjša, vidimo, da je v skladu s pričakovanji le polovica vzorcev (1*, 2*, 4*, 2, 5, 6).

Po drugi strani pa velikih odstopanj od povprečne vrednosti A_{420} , ki znaša 0,181, ni bilo, razen pri vzorcih 5*, 1, 4 in 5.

Vzorci, označene z 1*-6*, smo nato en dan pustili odprte in opazili, da so po 24 urah nekateri vzorci dobili odtenke roza barve. Na spektrofotometru smo še enkrat opravili meritve, tokrat pri valovnih dolžinah 420 in 520 nm. Z računanjem razmerja med A_{420} in A_{520} smo dobili odtenek oz. ton barve.

Sklepamo, da je sprememba barve posledica oksidativnih delovanj.

Preglednica 9: Rezultati spektrofotometričnih meritev mladega vina pri valovnih dolžinah 420 in 520 nm

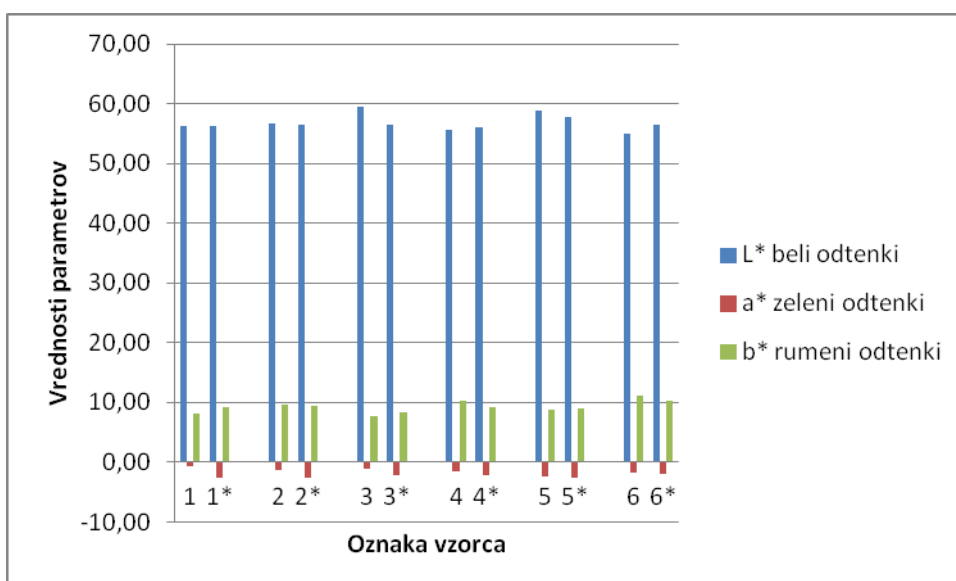
oznaka vzorca	A420	A520	A420-A520	A420/A520 (odtenek oz. ton barve)
1*	0,206	0,129	0,077	1,598
2*	0,245	0,168	0,077	1,459
3*	0,187	0,119	0,068	1,568
4*	0,229	0,145	0,085	1,586
5*	0,169	0,099	0,069	1,696
6*	0,215	0,136	0,079	1,583

Določanje barvnih parametrov s kromametrom

Barva vina igra pomembno vlogo pri zaznavi kakovosti vina, prav tako pa je uporaben indikator pri tehnologiji in razvoju vina. V ta namen se je razvila tehnika, ki omogoča vinarjem natančno spremljanje barve, konsistence in kakovosti vina. Te analize nam pomagajo postaviti kontrolne parametre za sprejemljive barvne spremembe (ETS Laboratories, 2011)

Barvne parametre vzorcev mladih vin smo določali tudi s kromametrom znamke Konica Minolta CM-700d/600d, rezultati pa so podani s CIE L* a* b* lestvico.

Parameter L* označuje belo (L=100) oziroma črno (L=0) barvo. Pozitiven parameter a* je merilo za rdeče odtenke, medtem ko negativen predstavlja odtenke z več zelene barve. Pozitiven parameter b* je merilo za več rumenih odtenkov, medtem ko negativen predstavlja bolj modre odtenke.



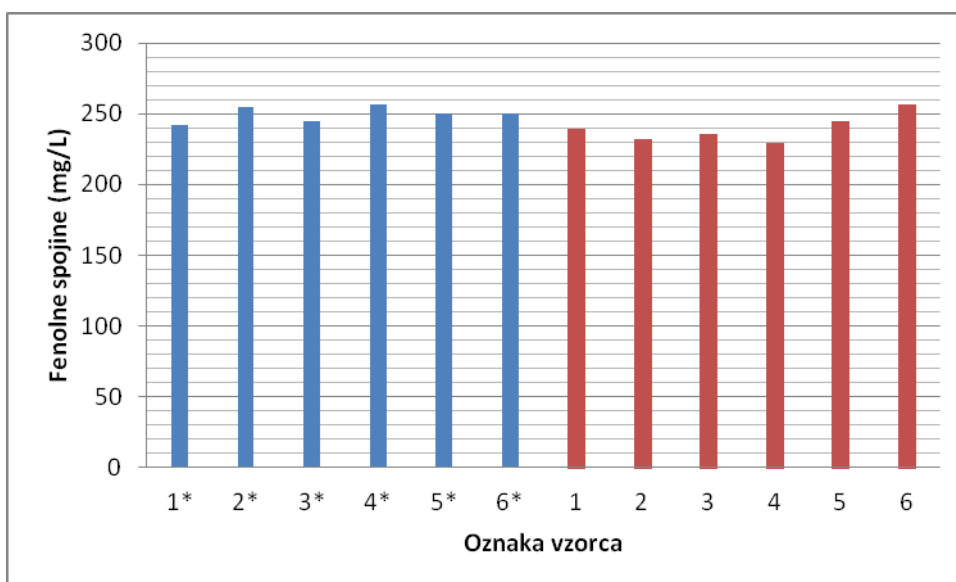
Slika 7: Barvni parametri v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah podani s CIE L* a* b* lestvico

Slika 7 nam prikazuje barvne parametre vzorcev mladih vin, ki so podani s CIE L* a* b* lestvico. Največ belih odtenkov, torej najbolj svetel, je vzorec 3. Vzorec z največ zelenih barvnih odtenkov (pozitiven parameter a*) je vzorec 5*. Največ rumenih odtenkov barve (pozitiven parameter b*) pa je imel vzorec 6. Če primerjamo rezultate glede na temperaturo fermentacije, opazimo, da imajo več zelenih odtenkov vzorci, ki so fermentirali pri nenadzorovani višji temperaturi. Smiselna je tudi primerjava barvnih odtenkov glede na različne seve kvasovk. Rezultati nam kažejo, da se po parametru L* (bela oz. črna barva) vzorci glede na različna seva kvasovk niso bistveno razlikovali. So se pa toliko bolj razlikovali pri parametru a* (rdeč oz. zelen odtenek), kjer so imeli več zelenih odtenkov vzorci z drugim sevom kvasovk. Tudi pri parametru b* (merilo za rumene oz. modre odtenke), so imeli več rumenih odtenkov vzorci, fermentirani z drugim sevom kvasovk.

4.2.4 Skupne fenolne spojine

Fenolne spojine imajo eno od glavnih vlog v enologiji. Odgovorne so za razlike med rdečimi in belimi vini, posebej pri barvi in okusu rdečih vin. Imajo zanimive zdravstvene lastnosti, to so bakteriocidne in antioksidativne lastnosti, ki varujejo potrošnike pred boleznimi srca in ožilja. Molekule fenolnih spojin prihajajo iz različnih delov grozdja in se ekstrahirajo med pridelavo vina (Ribéreau-Gayon in sod., 2000b).

Na koncentracijo skupnih fenolnih spojin v vinu pa vpliva veliko dejavnikov, kot so čas kontakta grozdnega soka s kožicami in pečkami, koncentracija etanola, temperature fermentacije, intenzivnost stiskanja, sorta vinske trte itd. Povprečna koncentracija fenolnih spojin v belih vinih je 225 mg skupnih fenolnih spojin/L, z razponom od 150 do 400 mg/L (Košmerl in Kač, 2007).

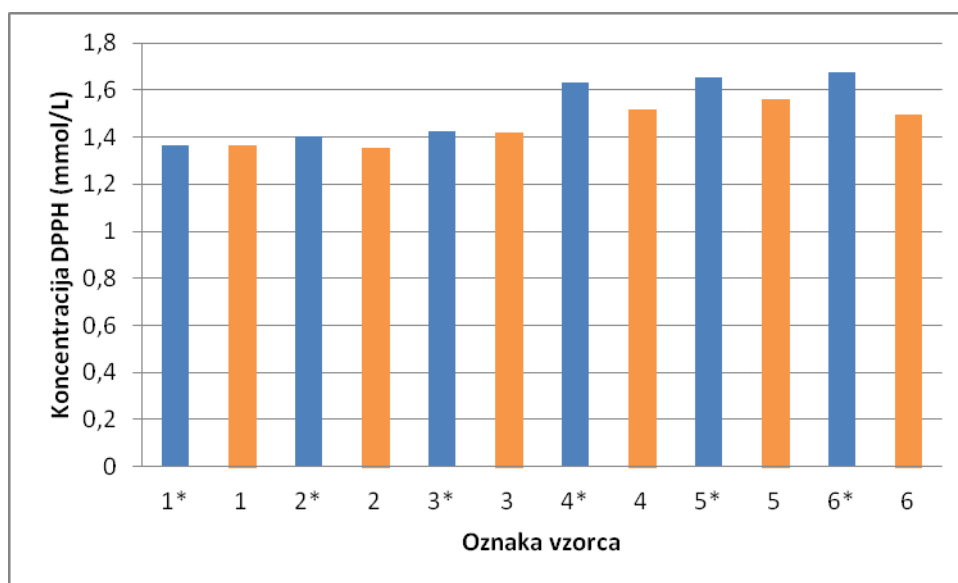


Slika 8: Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Na sliki 8 je razvidno, da je vsebnost skupnih fenolnih spojin odvisna od temperature fermentacije. Vzorci označeni z 1*-6* so fermentirali pri temperaturi kleti, medtem ko so vzorci označeni z 1-6 fermentirali pri nadzorovani nižji temperaturi. Opazimo, da so vzorci 1*-6* vsebovali več skupnih fenolnih spojin kot vzorci 1-6, z izjemo vzorca 6. Razvidna je tudi različna vsebnost skupnih fenolnih spojin glede na različen sev kvasovk. Pri obeh temperaturah fermentacije imajo vzorci s prvim sevom kvasovk manjšo vsebnost skupnih fenolnih spojin. Največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin sta imela vzorca 4* in 6, najmanjšo pa vzorec 2. Povprečna vrednost skupnih fenolnih spojin (mg/L) pri vzorcih 1*-6* je znašala 250, pri vzorcih 1-6 pa 240. Lahko rečemo, da so rezultati v skladu s pričakovanji, saj znaša povprečna koncentracija fenolnih spojin v belih vinih 225 mg/L, z razponom od 150 do 400 mg/L.

4.2.5 Antioksidativni potencial vina

Antioksidativni potencial vina smo določali s spektrofotometrično metodo s prostim radikalom DPPH*. Metoda temelji na spektrofotometričnih meritvah absorbance, ki se spreminja zaradi spremembe koncentracije DPPH*, ta pa je posledica redukcije radikala DPPH* z antioksidantom (Dawidowicz in sod., 2012).

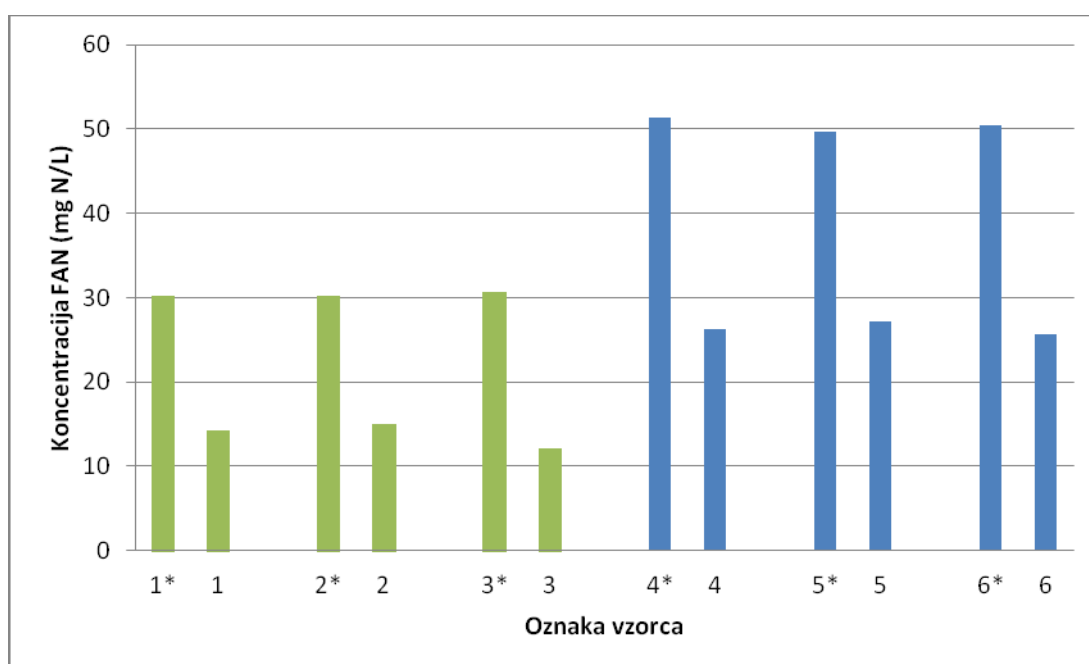


Slika 9: Koncentracija prostega radikala DPPH (mmol/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 9 nam prikazuje, da so v vseh primerih imeli večji antioksidativni potencial vzorci, ki so fermentirali z drugim sevom kvasovk, torej drugih šest vzorcev na sliki. Večja kot je koncentracija DPPH (mmol/L), večji je antioksidativni potencial vzorca. Očitno je na koncentracijo DPPH (mmol/L) vplivala tudi fermentacijska temperatura. Vsi vzorci, pri katerih je potekala alkoholna fermentacija pri nenadzorovani višji temperaturi (1*-6*), imajo večji antioksidativni potencial. Največji antioksidativni potencial je imel vzorec 6*, najmanjšega pa vzorec 2, kar sovpada s koncentracijo skupnih fenolnih spojin (slika 8).

4.2.6 Prosti aminokislinski dušik (FAN)

Med fermentacijo se koncentracije posameznih aminokislin različno hitro zmanjšujejo, odvisno tudi od metabolne aktivnosti posameznih sevov kvasovk. S skupnim imenom prosti aminokislinski dušik ali FAN (Free Amino Nitrogen) označujemo dušikove spojine, ki na opisan način sodelujejo v metabolizmu kvasovk. V moštu in vinu je predvsem šest najpomembnejših *alfa*-aminokislin: arginin, alanin, treonin, serin in glutaminska ter asparginska kislina. Iz podatkov o začetni koncentraciji *alfa*-aminokislin lahko sklepamo na možne probleme med fermentacijo in napovemo potrebo po dodajanju dušikovih snovi v mošt. Pomanjkanje prostih aminokislin je pogost vzrok za počasne in nepopolne alkoholne fermentacije (Košmerl in Kač, 2007).

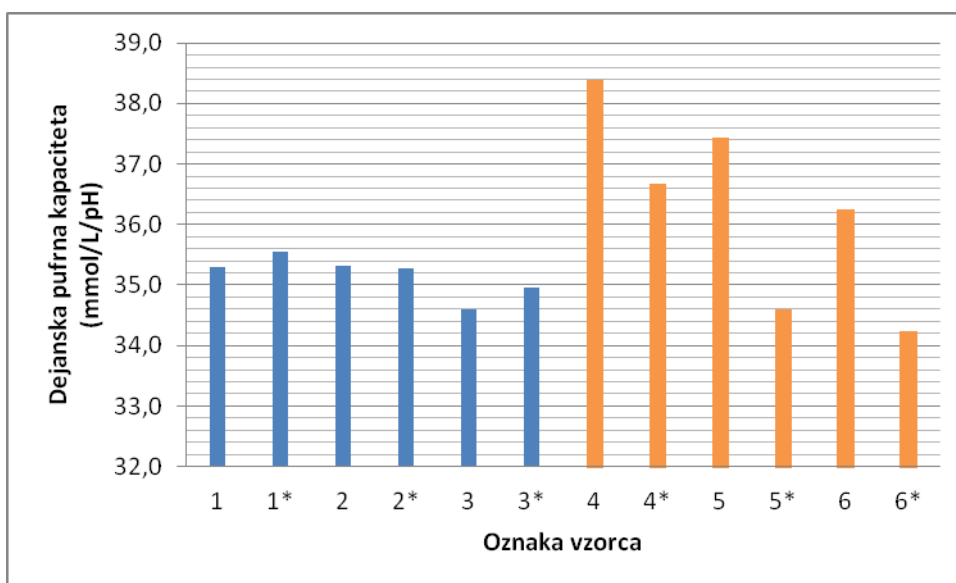


Slika 10: Vsebnost FAN (mg N/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

V moštu je znašala koncentracija prostega aminokislinskega dušika (FAN) 125,8 mg N/L. Pričakovano je bilo, da se vsebnost FAN med alkoholno fermentacijo zmanjša, kar se tudi je. S slike 10 je razvidno, da je vsebnost FAN večja pri vseh vzorcih, ki se fermentirali z drugim sevom kvasovk. Prav tako je lepo razvidno, da je vsebnost FAN povezana s temperaturo fermentacije. Vzorci, ki so fermentirali pri višjih temperaturah, imajo skoraj dvakrat večjo vsebnost FAN. Največjo vsebnost prostega aminokislinskega dušika je imel vzorec 4*, najmanjšo pa vzorec 3.

4.2.7 Pufrna kapaciteta

Pufrna kapaciteta mošta ali vina je lastnost mošta ali vina, da se njegov pH od dodatku znatnih količin kislin ali baz bistveno ne spremeni. Definirana je kot množina H_3O^+ ali OH^- ionov, ki jih moramo dodati 1 L vzorca, da se njegov pH spremeni za eno enoto. Njena številčna vrednost je obratno sorazmerna naklonu titracijske krivulje v območju pH mošta ali vina. Podatek je pomemben za razumevanje sprememb pH. Običajno je pufrna kapaciteta od 35 do 50 mmol/L/pH, v ekstremnih primerih pa lahko le 25 mmol/L/pH ali celo do 60 mmol/L/pH. Pufrna kapaciteta je funkcija pH (Košmerl in Kač, 2007).

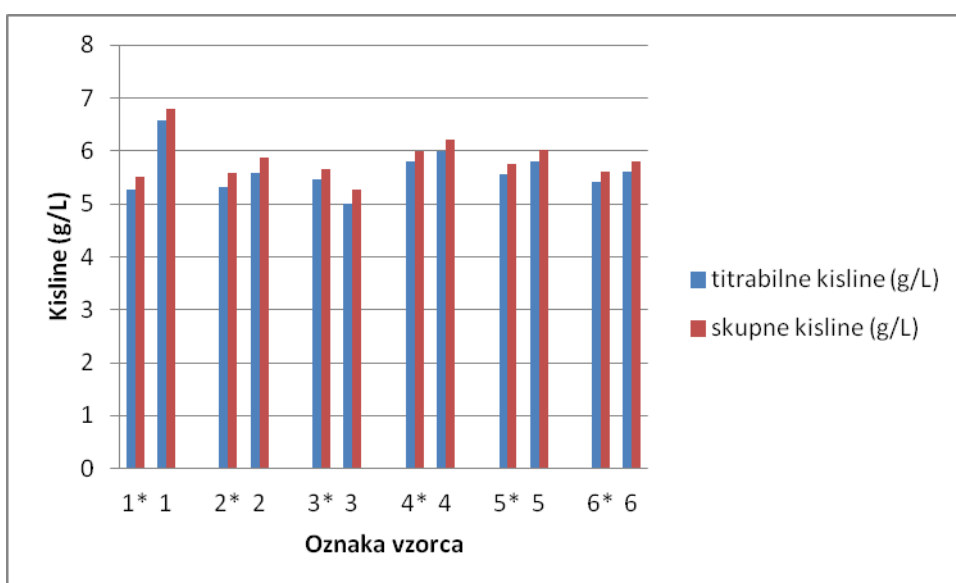


Slika 11: Dejanska pufrna kapaciteta (mmol/L/pH) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 11 prikazuje dejansko pufrno kapaciteto vzorcev mladih vin. Vzorci mladih vin, pridelani z drugim sevom kvasovk, imajo opazno večjo dejansko pufrno kapaciteto v primerjavi vzorcev s prvim sevom kvasovk. Prav tako je opazna razlika med dejansko pufrno kapaciteto glede na fermentacijsko temperaturo. Za prvi sev kvasovk je značilna večja dejanska pufrna kapaciteta vzorcev, fermentiranih pri nenadzorovani višji temperaturi, medtem ko je pri vzorcih, fermentiranih z drugim sevom kvasovk, ravno obratno, večjo dejansko pufrno kapaciteto imajo vzorci, ki so fermentirali pri nadzorovani nižji temperaturi. Rezultati dejanske pufrne kapacitete so v skladu s pričakovanji, saj so povprečne vrednosti dejanske pufrne kapacitete v območju med 35 in 50 mmol/L/pH; izjema so le vzorci 3, 3*, 5* in 6*.

4.2.8 Titrabilne in skupne kisline ter kislodelujoče soli

V grozdju so prisotne znatne količine različnih šibkih karboksilnih kislin. Med dozorevanjem je značilno zmanjševanje koncentracije kislin in s tem posledično večanje pH. Vsebnost karboksilnih kislin izražamo kot množino vinske kisline na liter mošta oziroma vina. Glede na določanje pa sta v uporabi izraza skupne kisline in titrabilne (titracijske) kisline. Prevladujoče organske kisline grozdnega soka in mošta so vinska, jabolčna in citronska kislina, med alkoholno fermentacijo in po njej pa nastajajo še očetna, propionska, piruvična, mlečna, jantarna, glikolna, galakturonska, oksalna in fumarna kislina. Skupna vsebnost karboksilnih kislin v grozdnem soku, moštu in vinu, je med 6 in 9 g/L, izražena kot g vinske kisline/L vzorca (Košmerl in Kač, 2007).

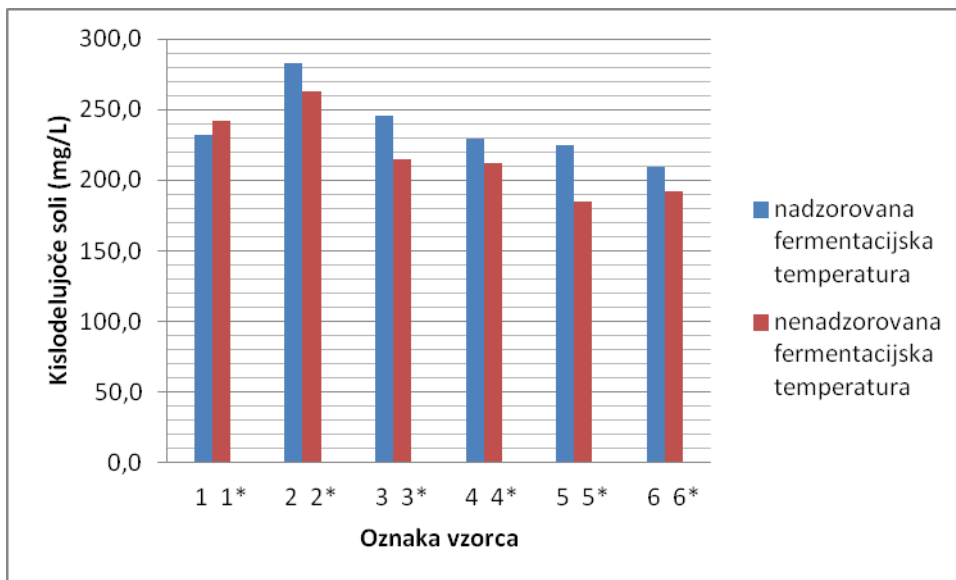


Slika 12: Koncentracija skupnih (titrabilnih) kislin (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 12 nam prikazuje titrabilne in skupne kisline v vzorcih mladega vina, sorte sauvignon 2011. V primerjavi z rezultati koncentracij titrabilnih in skupnih kislin mošta vidimo, da se je koncentracija zmanjšala pri prav vseh vzorcih, z izjemo vzorca 1, ki je imel večje koncentracije titrabilnih in skupnih kislin v mladem vinu kot v moštu. Vzorci 4*, 1, 4, 5 so imeli pričakovano skupno vrednost karboksilnih kislin, torej med 6 in 9 g/L, medtem ko so imeli vsi drugi vzorci manjšo koncentracijo od pričakovane.

Kislodelujoče soli

Kislodelujoče soli se med fermentacijo in zorenjem vina zmanjšujejo zaradi povečanja koncentracije alkohola in manjše topnosti soli.



Slika 13: Koncentracija kislodelujočih soli (mg/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

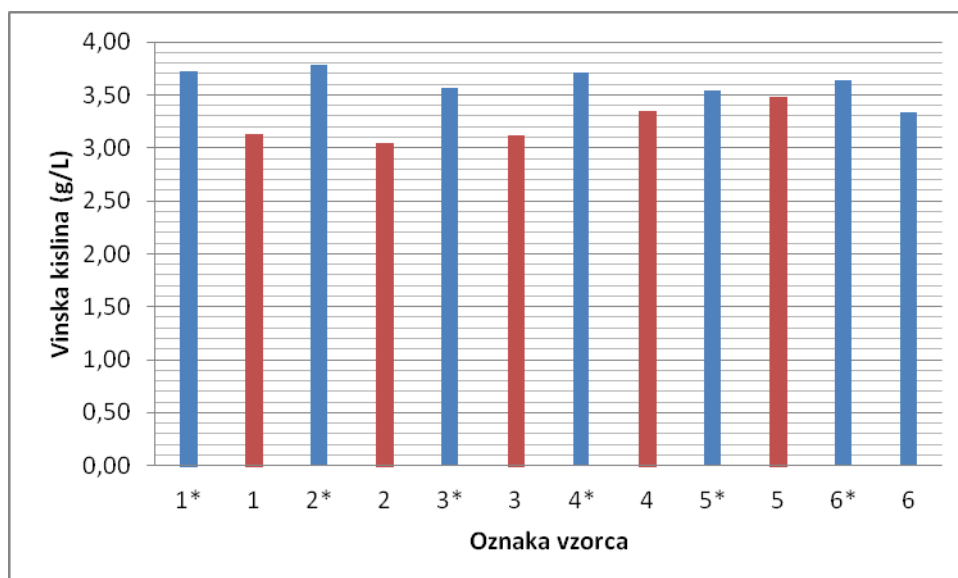
Slika 13 nam prikazuje koncentracije kislodelujočih soli. S slike je razvidno, da imata največjo koncentracijo omenjenih soli vzorca 2 in 2*. Če primerjamo vzorce glede na temperaturo fermentacije, opazimo, da imajo večjo koncentracijo kislodelujočih soli tisti vzorci, ki so fermentirali pri nadzorovani nižji fermentacijski temperaturi, kar je skladno z dejstvom, da je pri nižji temperaturi tudi obseg kristalizacije in izločanja vinskega kamna večji. Izjema je le vzorec 1*, ki ima večjo koncentracijo kot 1. Razlika v koncentraciji kislodelujočih soli je opazna tudi pri primerjavi vzorcev glede na različen sev kvasovk. Pri vzorcih, pridelanih s prvim sevom kvasovk, je koncentracija soli večja kot pri drugem sevu kvasovk. Vpliv koncentracije alkohola in zmanjšanja topnosti soli je torej manjši pri vzorcih, ki so fermentirali pri nadzorovani nižji fermentacijski temperaturi oziroma pri vzorcih, pridelanih s prvim sevom kvasovk.

4.2.9 Organske kisline, sladkorji in glicerol

Z metodo HPLC smo določili vsebnost organskih kislin (vinske, jabolčne, mlečne, jantarne), sladkorjev (glukoze in fruktoze) in glicerola. Rezultati so podani v g/L.

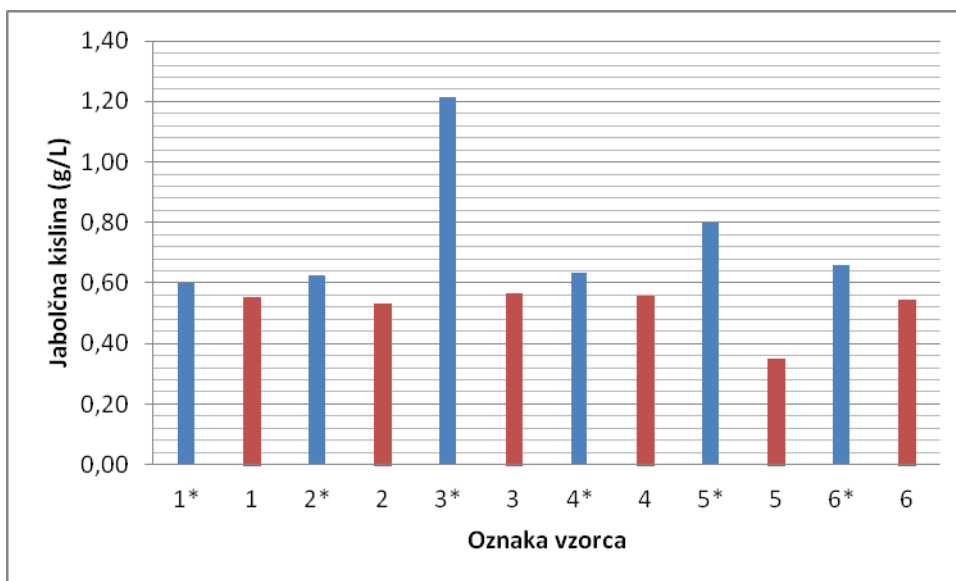
Organske kisline

Organske kisline so tiste, ki v veliki meri prispevajo k sestavi, stabilnosti in senzorični kakovosti vina, še posebej v belih vinih. Njihove sposobnosti kot konzervansov prav tako vplivajo na mikrobiološko in fizikalno-kemijsko stabilnost. Vinska kislina je ena najbolj razširjenih kislin v moštu in vinu in je relativno močna kislina, ki daje vinu vrednost pH od 3,0 do 3,5. Jabolčno kislino najdemo v vseh živih organizmih, prav tako pa je razširjena tudi citronska kislina, ki v moštu in vinu doseže koncentracijo med 0,5 in 1 g/L pred jabolčno mlečnokislinsko fermentacijo (Ribéreau-Gayon in sod., 2000b).



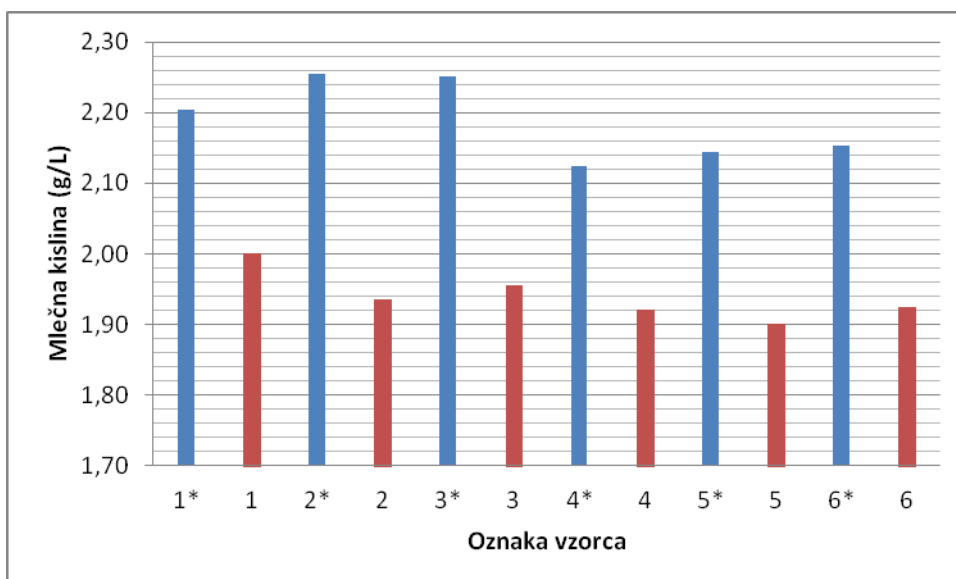
Slika 14: Koncentracija vinske kisline (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Na sliki 14 so prikazane koncentracije vinske kisline v vzorcih mladih vin. Vinska kislina je v vinu najbolj zastopana kislina, rezultati pa so nekoliko manjši od pričakovanih (5-10 g/L). Glede na sev kvasovk ne opazimo bistvenih razlik v vsebnosti vinske kisline, je pa opazna razlika med vzorci glede na temperaturo fermentacije. Vzorci, pridelani s prvim sevom kvasovk, imajo nekoliko večjo vsebnost vinske kisline v vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani višji temperaturi, pri vzorcih z drugim sevom kvasovk pa so rezultati ravno obratni. Pričakovano je bila vsebnost vinske kisline v primerjavi z drugimi organskimi kislinami v vinu največja. Najvišjo vsebnost vinske kisline ima vzorec 2*, najmanjšo pa vzorec 2.



Slika 15: Koncentracija jabolčne kisline (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Koncentracije jabolčne kisline v vinih so prikazane na sliki 15. V moštu je bila koncentracija jabolčne kisline 3,26 g/L in se je pričakovano zmanjšala. Pričakovali smo vsebnost jabolčne kisline med 1-4 g/L, tako da vsi rezultati spadajo v okvir pričakovanega. Če primerjamo vzorce glede na temperaturo fermentacije, opazimo, da so koncentracije jabolčne kisline večje pri vseh vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani višji temperaturi. Povprečno pa so vzorci, pridelani s prvim sevom kvasovk, imeli večjo vsebnost jabolčne kisline (0,68 g/L) kot vzorci z drugim sevom kvasovk (0,59 g/L). Daleč največjo koncentracijo jabolčne kisline vsebuje vzorec 3*, najmanjšo pa vzorec 5.



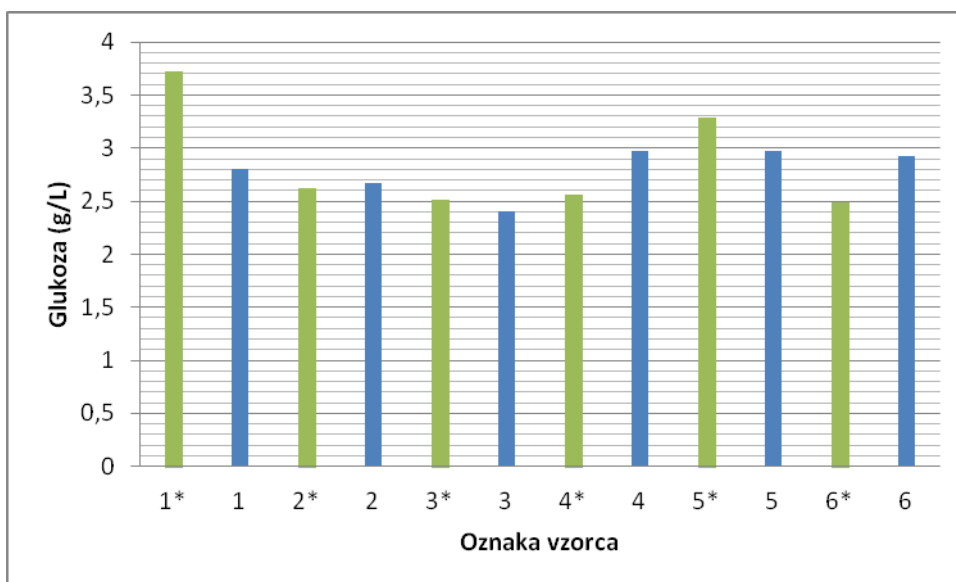
Slika 16: Koncentracija mlečne kisline (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Na sliki 16 vidimo vsebnost mlečne kisline v vzorcih mladih vin. Vsi rezultati so v skladu s pričakovanji, ki so 0-2,5 g/L mlečne kisline v vzorcih. Opazno večjo koncentracijo imajo vzorci, fermentirani pri nenadzorovani višji temperaturi (kar je v skladu z rezultati jabolčne kisline; slika 15), medtem ko različna seva kvasovk nista imela bistvenega vpliva na vsebnost kisline. Največjo vsebnost mlečne kisline ima vzorec 2*, najmanjšo pa vzorec 5.

Pri analizi vsebnosti jantarne kisline smo prišli do pričakovanih rezultatov (do 1 g/L). Kot eden glavnih sekundarnih produktov fermentacije, so vsebnosti jantarne kisline v vseh vzorcih dosegle koncentracijo 0,08 g/L.

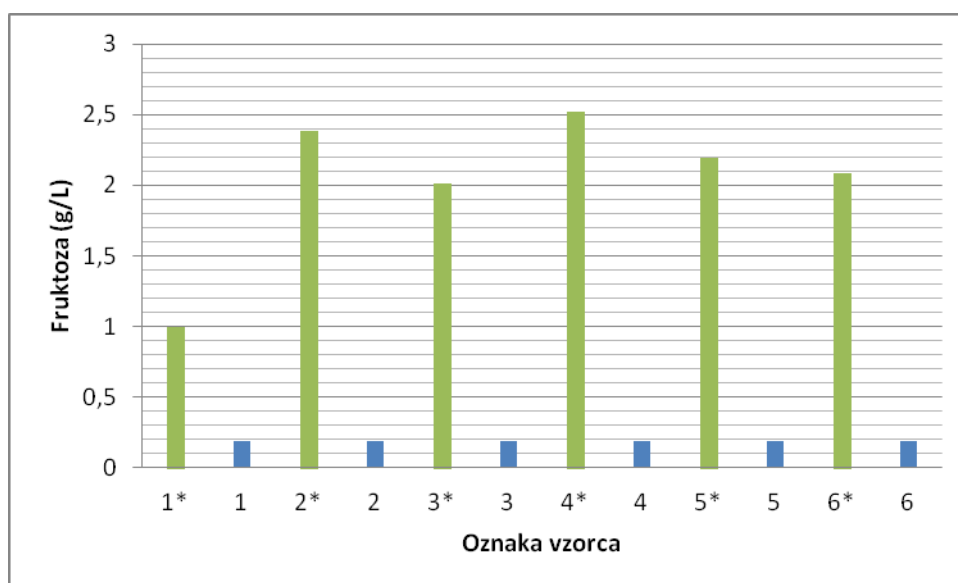
Sladkorji

Sladkorji (ogljikovi hidrati) so prekurzorji organskih kislin. Vsebujejo polifunkcionalne molekule, ki so sposobne sodelovati v veliko kemijskih, biokemijskih in metabolnih reakcijah. Glukoza je prekurzor citronske, mlečne, jantarne in vinske kisline, prav tako pa tudi prekurzor fenolov in aromatskih aminokislin, kot sta tirozin in triptofan. Med alkoholno fermentacijo se iz glukoze in fruktoze tvori etanol in drugi stranski produkti. Za tvorbo 1 vol.% etanola vinske kvasovke potrebujejo 16,5 do 18,0 g/L sladkorja. Glavna predstavnika heksoz v vinu sta glukoza in fruktoza. V suhih vinih, kjer so vsi sladkorji popolnoma fermentirani, najdemo majhne koncentracije heksoz (1 g/L). Te heksoze v glavnem predstavlja fruktoza, ker je glukoza prednostno porabljena s strani kvasovk (Ribéreau-Gayon in sod., 2000b).



Slika 17: Koncentracija glukoze (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Na sliki 17 vidimo koncentracijo glukoze v vzorcih mladih vin. V moštu je koncentracija glukoze in fruktoze znašala 192,86 g/L. Rezultati v vzorcih mladih vin so pričakovano bistveno manjši, saj so kvasovke porabile večino monosaharidov za tvorbo etanola v procesu alkoholne fermentacije. Ne glede na zmanjšanje koncentracije pa smo pričakovali manjše vsebnosti glukoze, ki jo kvasovke prednostno izkoriščajo pred fruktozo. To pomeni, da mlado vino ni do konca povrelo, zato je nekaj sladkorjev v vinu še vedno prisotnih. Med vzorci ne glede na različna seva kvasovk in fermentacijsko temperaturo ni bistvenih razlik. Od vseh rezultatov najbolj odstopa vzorec 1*, ki je najmanj povret, medtem ko je vzorec 3 najbolj povret in vsebuje najmanjšo vsebnost glukoze.



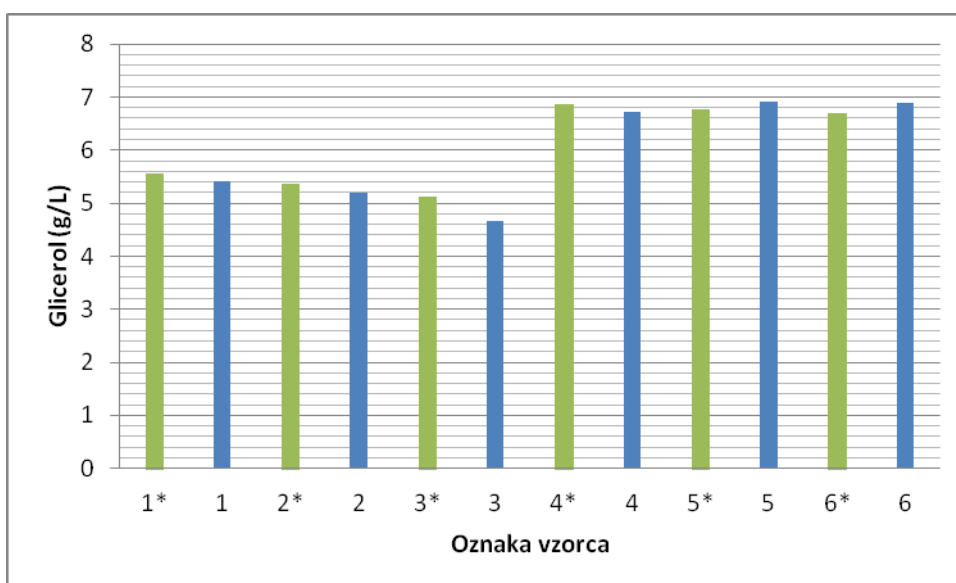
Slika 18: Koncentracija fruktoze (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Na sliki 18 vidimo koncentracijo fruktoze v vzorcih mladih vin. Rezultati niso v skladu s pričakovanji. Pričakovali smo namreč, da bo vsebnost fruktoze večja od vsebnosti glukoze, ki jo kvasovke prednostno izkoriščajo pri alkoholni fermentaciji. Več kot očitno pa je iz slike razvidno, da je koncentracija fruktoze mnogo večja pri vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani višji temperaturi. Med vzorci z različnima sevoma kvasovk ni bistvenih razlik v koncentraciji.

Glicerol

Vina vsebujejo približno 8 g glicerola na 100 g etanola. Med fermentacijo mošta 8 % sladkornih molekul opravi glicerol-piruvično fermentacijo, medtem ko 92 % sladkornih molekul opravi alkoholno fermentacijo. Med fermentacijo prvih 100 g sladkorja se tvori večina glicerola, potem pa se tvorba glicerola zmanjša, toda se ne ustavi popolnoma. Piruvična kislina izhaja iz glikolize. Kadar ta molekula ni uporabljena pri alkoholni fermentaciji, sodeluje pri tvorbi sekundarnih produktov, v tem primeru glicerola, ki se tvori z redukcijo dihidroksiacetona. Tvorba glicerola tudi uravnoteži endocelularni oksidacijsko-redukcijski potencial kvasovk ali ravnotežje NAD^+/NADH . (Ribéreau-Gayon in sod., 2000a).

Predpisana najmanjša vsebnost glicerola za namizna in deželna vina je 4 g/L, za kakovostna vina 5 g/L, za vrhunska vina pa 6 g/L (Pravilnik o pogojih..., 2004).



Slika 19: Koncentracija glicerola (g/L) v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 19 nam prikazuje rezultate koncentracije glicerola v vzorcih mladih vin. Rezultati so v skladu s pričakovanji, saj njegova koncentracija znaša od 5-8 g/L in je odvisna od seva kvasovk. Na vsebnost glicerola pa nepričakovano ni imela bistvenega vpliva temperatura fermentacije. S slike je razvidno, da imajo vzorci, pridelani z drugim sevom kvasovk, večjo vsebnost glicerola, ki je v povprečju večja za 1,6 g/L v primerjavi z drugim sevom. Največjo vsebnost glicerola ima vzorec 5, najmanjšo pa vzorec 3. Po pravilniku o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino (2004), spada prvih šest vzorcev med kakovostna vina, z izjemo vzorca 3, ki spada med namizna in deželna vina. Zadnjih šest vzorcev pa po pravilniku spada med vrhunska vina, saj je koncentracija glicerola v mladem vinu večja kot 6 g/L.

4.2.10 Vsebnost aromatičnih spojin, določenih z metodo GC-MS

V vinu je dokazanih več kot 800 spojin, ki vplivajo na vonj, okus in aromo. Spojine, ki so odgovorne za vonj, so predvsem alkoholi, kisline, aldehidi, ketoni, terpeni, norizoprenoidi, pirazini in merkaptani. V vinu se z izjemo etanola povprečno nahajajo v skupni koncentraciji od 0,2 do 1,2 g/L, od tega je približno 50 % višjih alkoholov. Ostale aromatične komponente se nahajajo v koncentracijah od 10^{-4} do 10^{-9} g/L (Bavčar, 2009).

Vsebnost aromatičnih spojin smo določili z metodo plinske kromatografije (GC) z masno-spektrometrično detekcijo (MS). V nadaljevanju sledijo slike s ploščinami kromatografskih vrhov, ki ponazarjajo vsebnost določene aromatične spojine v vzorcih mladih vin. Rezultati so v grafih, zaradi boljše preglednosti, deljeni s kvocientom $1 \cdot 10^6$.

Aromatične spojine iz grozdja

Norizoprenoidi so aromatične spojine, ki nastajajo iz karotenoidov, pod vplivom svetlobe, temperature in kisika. Poleg β -ionona, vitispirana in norizoprenoida TND, je eden najvažnejših med njimi β -damascenon, ki ima vonj po tropskem sadju. Pomembni so v sortah grozdja chardonnay, sauvignon in renski rizling. Njihova koncentracija narašča z dozorevanjem grozdja, to predvsem velja za vezano obliko, iz katere se med zorenjem vina deloma sproščajo v prosto, hlapno obliko (Bavčar, 2009).

Čeprav je prisoten v zelo majhnih koncentracijah, je β -damascenon ključni nosilec vonja v mnogih sadjih, vključno v grozdju, in pomembno prispeva k aromi vina. β -ionon je direkten produkt cepitve β -karotena in α -karotena, medtem ko nastanek β -damascenona vključuje še dodatno kemijsko modifikacijo C_{13} -norizoprenoidov (Dunlevy in sod., 2009).

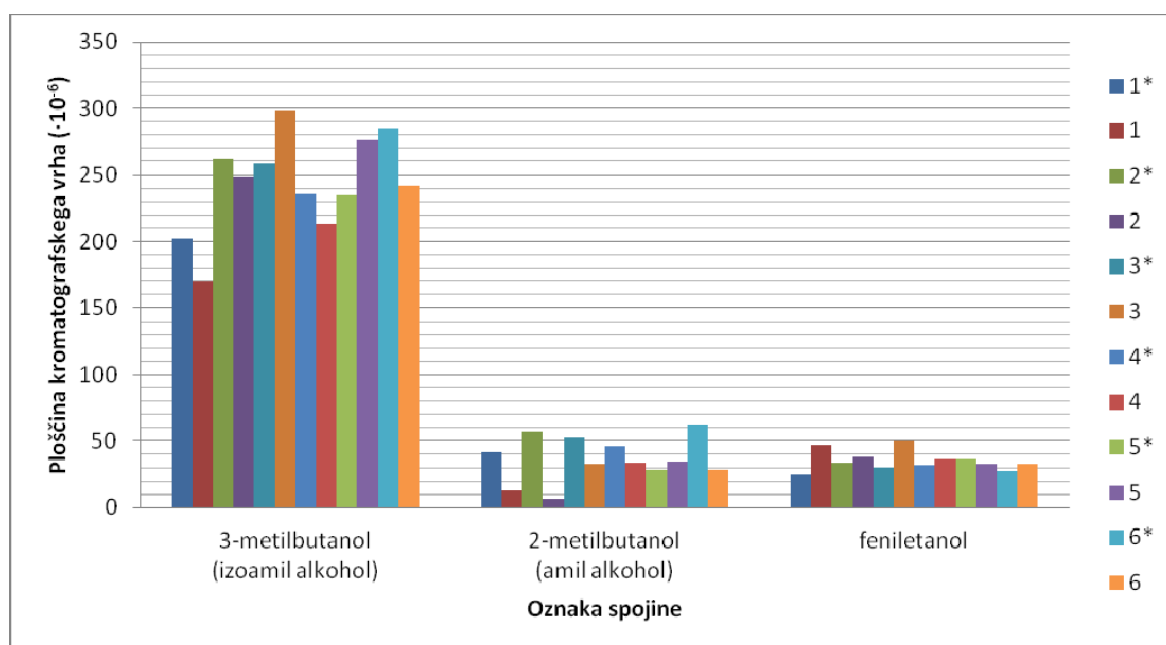


Slika 20: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) spojine β -damascenona v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Na sliki 20 je prikazana vsebnost spojine β -damascenon, ki pomembno prispeva k aromi vina po rdečem sadju. Opazno je, da imajo večjo vsebnost spojine β -damascenona vzorci, ki so fermentirali pri nenadzorovani višji temperaturi. V skladu s pričakovanji so vzorci 4*-6*, ki so tudi pri senzorični analizi dobili boljše rezultate ocenjevanja težje tropske arome od vzorcev 4-6, torej je bil vpliv β -damascenona očiten. Tega pa ne moremo trditi za vzorce 1*-3*, ki so ne glede na večjo vsebnost β -damascenona dobili slabše ocene kot vzorci 1-3, ki so imeli manjšo vsebnost omenjene spojine. Največjo vsebnost β -damascenona ima vzorec 1*, najmanjšo pa vzorec 4.

Višji alkoholi

Alkoholi z dvema ali več ogljikovima atomoma so višji alkoholi. Večina njih se tvori med alkoholno fermentacijo in dosežejo koncentracije od 150 do 550 mg/L. Višji alkoholi in njihovi estri imajo intenziven vonj in igrajo pomembno vlogo pri aromi vina. Glavni višji alkoholi, ki nastanejo med fermentacijo, so 2-metilpropanol, 2-metilbutanol in 3-metilbutanol. Pri majhnih koncentracijah (manj kot 300 mg/L) močno prispevajo k aromatični kompleksnosti vina, pri večjih koncentracijah pa njihov vonj prekriva naravno aromo vina. Višji alkoholi so produkti kvasovk direktno iz sladkorjev, ki izvirajo iz aminokislin v grozdju, nastalih v Erlichovi reakciji. Višji alkoholi v vinu so najbolj odvisni od vrste in seva kvasovk. V glavnem pa so dejavniki, ki prispevajo k večji koncentraciji višjih alkoholov, tudi večja kvasna biomasa, večja prisotnost kisika in višja temperatura fermentacije (Ribéreau-Gayon in sod., 2000b).

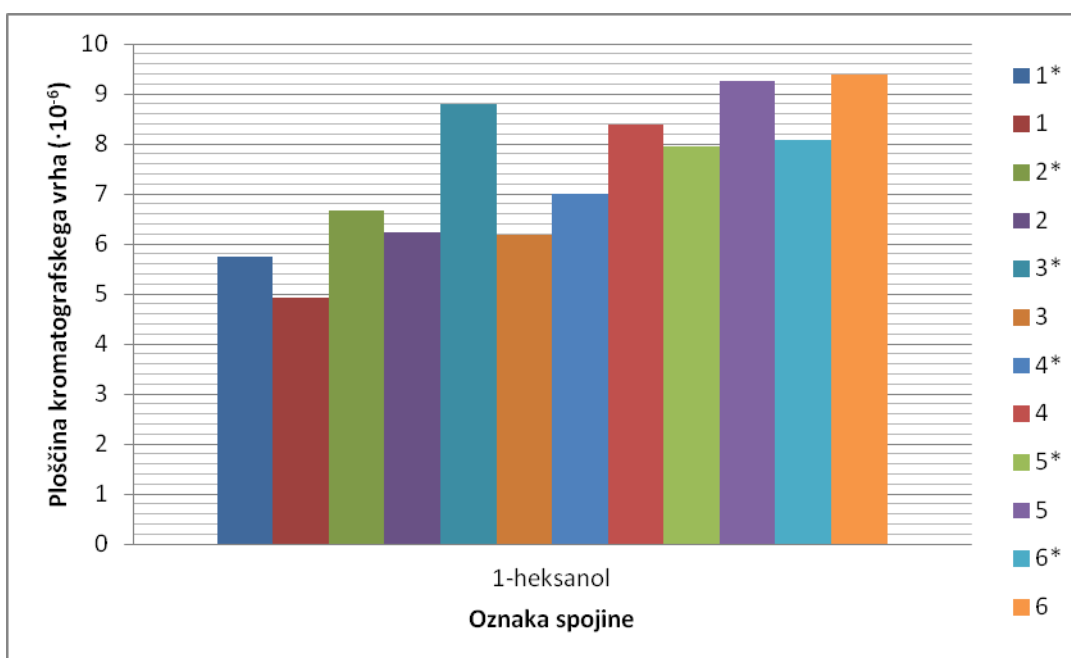


Slika 21: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) višjih alkoholov v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 21 nam prikazuje vsebnost najpomembnejših višjih alkoholov v vzorcih mladih vin. Lahko rečemo, da so rezultati v večini primerov v skladu s pričakovanji. Pričakovana je največja vsebnost 3-metilbutanola izmed vseh višjih alkoholov, sledita 2-metilbutanol in feniletanol. Pri spojini 3-metilbutanol so večje koncentracije omenjene spojine pri vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani, višji temperaturi. Izjema sta le vzorca 3* in 5*, v katerih je vsebnost 3-metilbutanola manjša kot v vzorcih 3 in 5. Opazno pa je tudi večja vsebnost 3-metilbutanola v vzorcih, pridelanih z drugim sevom kvasovk.

Največjo vsebnost 2-metilbutanola imajo vzorci, ki so fermentirali pri višji temperaturi, torej pri nenadzorovani temperaturi fermentacije. Izjema je samo vzorec 5, ki ima večjo vsebnost 2-metilbutanola kot vzorec 5*. Razlika v vsebnosti 2-metilbutanola glede na različna seva kvasovk je zanemarljiva oziroma je le malo večja pri vzorcih, pridelanih z drugim sevom kvasovk.

Vzorci, fermentirani pri nenadzorovani, višji temperaturi, imajo prav tako večjo vsebnost spojine feniletanola, spet pa je izjema vzorec 5*, ki je odstopal že pri prvih dveh spojinah. Tudi pri feniletanolu so razlike med vzorci glede na različna seva kvasovk zelo majhne; rezultati so za malenkost večji pri vzorcih, pridelanih z drugim sevom kvasovk.



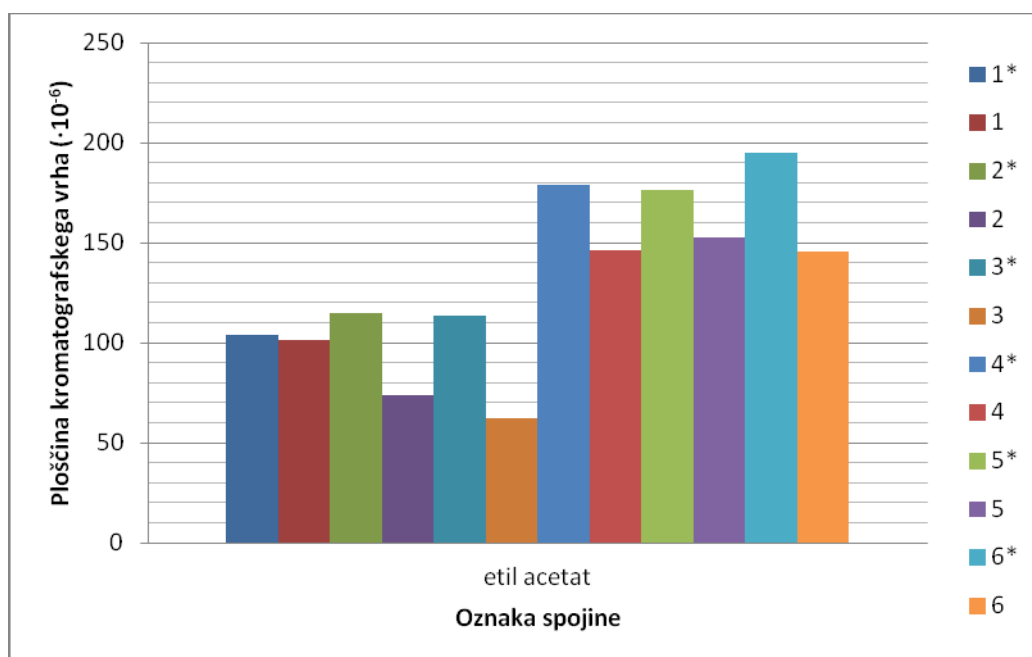
Slika 22: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) spojine 1-heksanol v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

1-Heksanol ima ne glede na majhno vsebnost pomembno vlogo pri oblikovanju arome vina. S slike 22 je razvidno, da je vsebnost omenjene spojine odvisna od seva kvasovk in fermentacijske temperature. V vzorcih, pridelanih s prvim sevom kvasovk, je vsebnost 1-heksanola večja pri vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani višji temperaturi, kar je skladno s pričakovanji. V vzorcih, pridelanih z drugim sevom kvasovk, pa je ravno obratno, vsebnost 1-heksanola je večja v vzorcih, ki so fermentirali pri nadzorovani nižji

temperaturi, ki je bila v povprečju manjša od nenadzorovane višje fermentacijske temperature. Največjo vsebnost 1-heksanola je imel vzorec 6, najmanjšo pa vzorec 1.

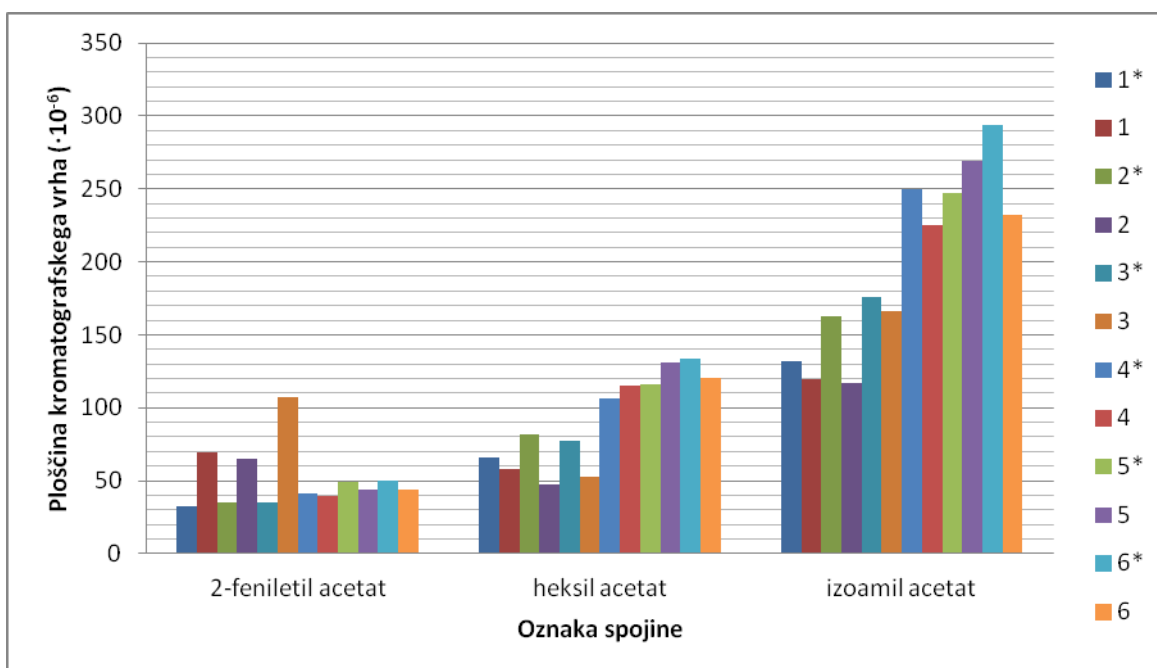
Estri

Estri nastanejo z reakcijo med hidroksilno skupino alkoholov in karboksilno skupino organskih kislin, sprosti pa se molekula vode. V vinu se nahaja mnogo različnih alkoholov in organskih kislin in s tem posledično tudi velika pestrost estrov. V grozdju ne najdemo veliko estrov, v vinu pa estri izhajajo iz dveh različnih izvorov. Prvi je encimska esterifikacija med procesom fermentacije, drugi pa je kemijska esterifikacija med zorenjem in/ali staranjem vina. Ista vrsta estra je lahko sintetizirana iz obeh izvorov. Najbolj razširjen ester v vinu je etil acetat. Manjša količina ga nastane med fermentacijo kot posledica delovanja kvasovk, večje količine pa nastanejo zaradi aerobne aktivnosti oacetnokislinskih bakterij, še posebej, če se vino stara v hrastovih sodih. Senzorični prag zazneve etil acetata je približno 160 mg/L, vendar tudi pod to vrednostjo lahko pokvari vinsko cvetico z neprijetnim ostrim tonom, ki mu pravimo etil acetatni ton. Že zelo majhne koncentracije (50-80 mg/L) etil acetata imajo lahko pozitiven vpliv in prispevajo k aromatični kompleksnosti vina. Acetatni estri maščobnih kislin in višjih alkoholov nastanejo med alkoholno fermentacijo kot posledica anaerobnega delovanja kvasovk. Acetatni estri maščobnih kislin imajo zelo prijeten vonj po medu, ki vpliva na aromatično kompleksnost belih vin, čeprav so prisotni v zelo majhnih koncentracijah. Acetatni estri višjih alkoholov (izoamil acetat in feniletil acetat) tudi spadata med fermentacijske estre. Tudi ti so prisotni v vinu v zelo majhnih koncentracijah, ampak imajo intenziven vonj po banani. Prispevajo k aromatični kompleksnosti vina, toda lahko tudi prekrivajo sortno aromo (Ribéreau-Gayon in sod., 2000b).



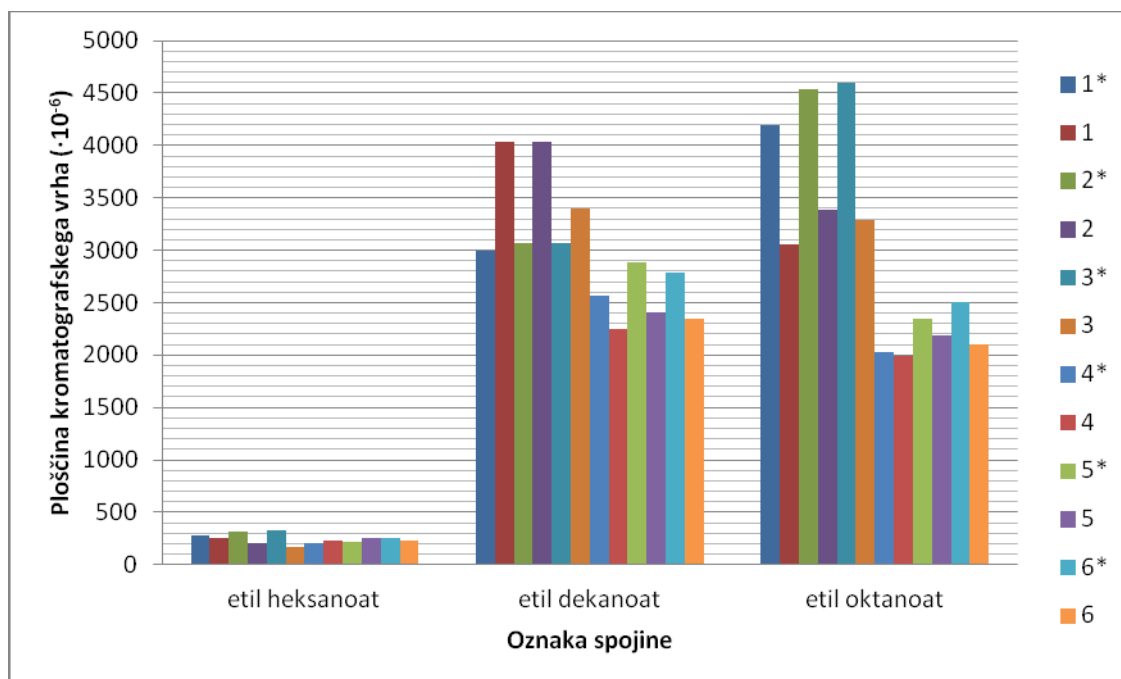
Slika 23: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) spojine etil acetat v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 23 nam prikazuje vsebnost najbolj razširjenega estra v belih vinih, etil acetata. Opazimo, da imajo vzorci, pridelani z drugim sevom kvasovk, mnogo večjo vsebnost tega estra, kot vzorci s prvim sevom. Tudi temperatura fermentacije odločilno vpliva na tvorbo etil acetata. Vzorci, fermentirani pri nenadzorovani višji temperaturi, imajo večjo ploščino kromatografskega vrha v primerjavi z vzorci, ki so fermentirali pri nadzorovani nižji temperaturi. Glede na senzorično ocenjevanje so boljše rezultate imeli vzorci, pridelani z drugim sevom kvasovk in po tem sklepamo, da je etil acetat imel pozitiven vpliv na aromatično kompleksnost vina.



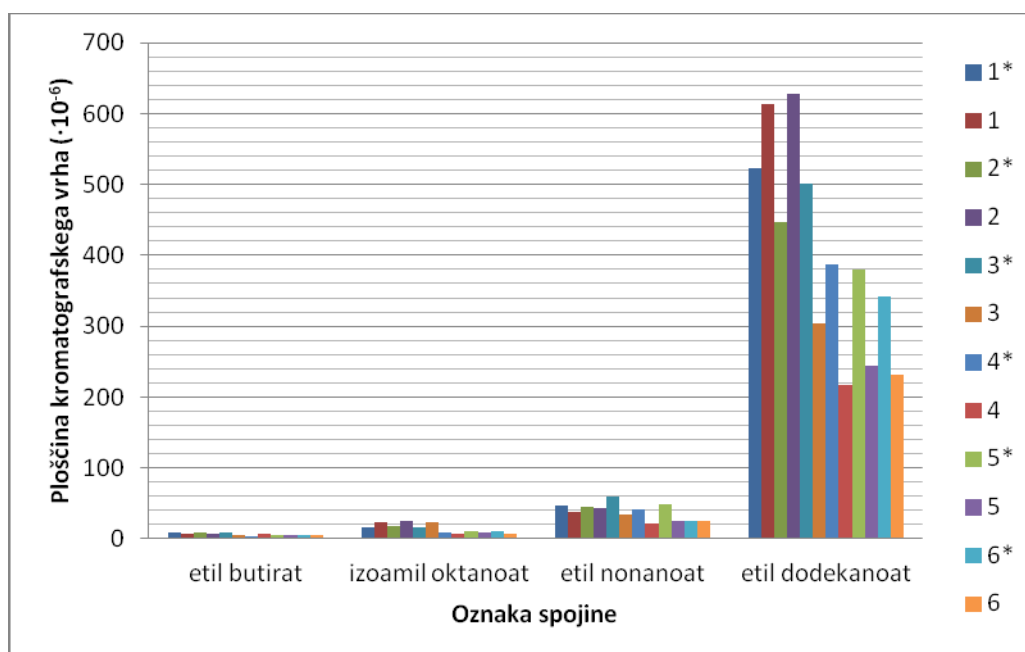
Slika 24: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) acetatnih estrov maščobnih kislin z manjšimi koncentracijami v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Na sliki 24 so prikazane vsebnosti acetatnih maščobnih kislin, ki se nahajajo v manjših koncentracijah. Aromatične spojine 2-feniletil acetat je bilo več v vzorcih, ki so fermentirali pri nadzorovani nižji temperaturi. Glede na različna seva kvasovk, je bilo omenjene spojine več v vzorcih, pridelanih s prvim sevom kvasovk. Aromatične spojine heksil acetat je v povprečju skoraj dvakrat več v vzorcih, ki so fermentirali z drugim sevom kvasovk. Če primerjamo vzorce glede na temperaturo fermentacije, pa je 2-feniletil acetata nekaj več v vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani višji temperaturi. Izoamil acetata je od treh omenjenih aromatičnih spojin v vzorcih največ. Zanj značilna je aroma po banani. Spojine je precej več v vzorcih, pridelanih z drugim sevom kvasovk in več v vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani višji temperaturi. Senzorično so bili bolje ocenjeni vzorci, pridelani z drugim sevom kvasovk, zato lahko rečemo, da ima ta aromatična spojina pozitiven vpliv na aromo vina.



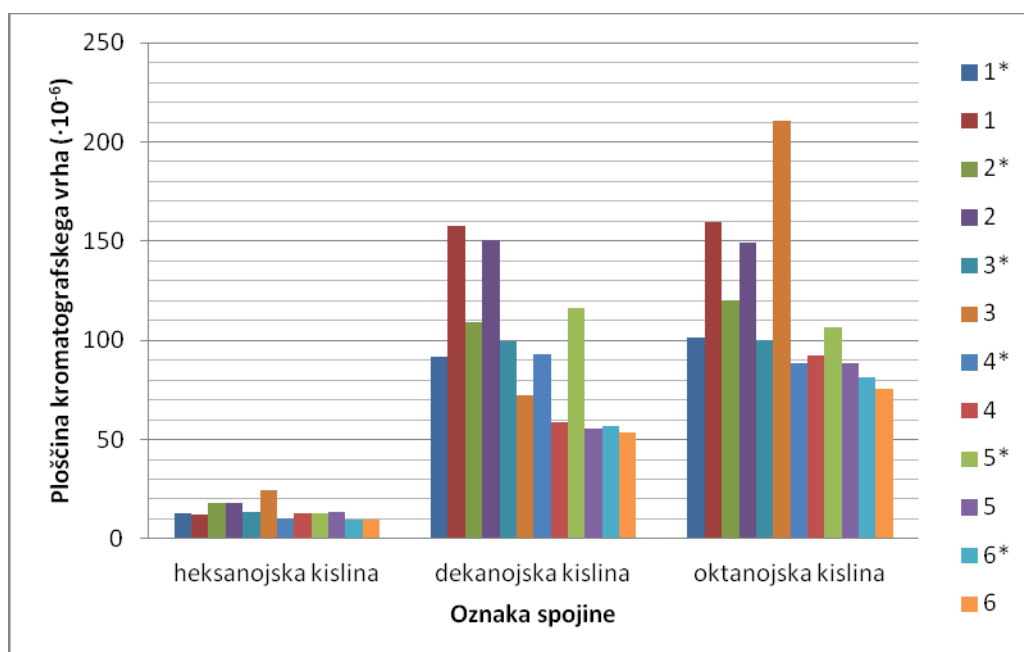
Slika 25: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) etilnih estrov maščobnih kislin z večjimi koncentracijami v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 25 nam s pomočjo ploščin kromatografskih vrhov, prikazuje vsebnost etilnih estrov maščobnih kislin, ki imajo v primerjavi z estri s slike 24, večjo vsebnost v vzorcih mladih vin. Etil heksanoat je več v vzorcih, pridelanih s prvim sevom kvasovk oziroma več v vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani višji temperaturi. Če sklepamo po senzorični analizi, kjer so bili boljše ocenjeni vzorci, pridelani s prvim sevom kvasovk, na aromatično vina etil heksanoat nima pozitivnega vpliva pri teh koncentracijah. Estra etil dekanat in etil oktanoat je v vzorcih največ. Imata značilno aromo po suhem sadju oziroma po kokosu. Obeh estrov je bilo mnogo več v vzorcih, pridelanih s prvim sevom kvasovk, čeprav so bili ti senzorično, glede na celokupno kakovost, slabše ocenjeni. Predvidevamo, da v teh koncentracijah nimajo pozitivnega vpliva na aromatično vina. Razlike v vsebnosti etil dekanata v primerjavi s temperaturo fermentacije vzorcev niso bile velike, medtem ko je bilo etil oktanoat več v vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani višji temperaturi.



Slika 26: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) ostalih estrov maščobnih kislin v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 26 nam prikazuje vsebnosti ostalih estrov maščobnih kislin, rezultati pa so podani glede na ploščino kromatografskega vrha. Slika prikazuje, da je bila vsebnost vseh štirih estrov večja pri vzorcih s prvim sevom kvasovk. Na vsebnost estrov v vzorcih je imela vpliv tudi fermentacijska temperatura, kar je najbolj razvidno pri etil dodekanoatu, ki je imel največjo koncentracijo.



Slika 27: Ploščine kromatografskih vrhov ($\cdot 10^{-6}$) maščobnih kislin v vzorcih mladega vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Na sliki 27 vidimo ploščine kromatografskih vrhov maščobnih kislin, ki ponazarjajo vsebnost aromatičnih spojin v vzorcih mladih vin. Pri heksanojski kislini se vsebnost ne glede na temperaturo fermentacije ali različna seva kvasovk bistveno ne razlikuje. Pri dekanajski kislini je razlika v vsebnosti prav tako majhna, če primerjamo vzorce glede na temperaturo fermentacije. Več dekanajske kisline imajo vzorci, ki so fermentirali s prvim sevom kvasovk. Enako velja za vsebnost oktanojske kisline, več jo je namreč v vzorcih, pridelanih s prvim sevom kvasovk. Ne glede na večji vsebnosti dekanajske in oktanojske kisline, so bili vzorci, pridelani s prvim sevom kvasovk, celokupno slabše ocenjeni kot vzorci z drugim sevom, torej lahko sklepamo, da na senzorično kakovost vina nimata pozitivnega vpliva pri teh koncentracijah.

4.2.11 Izračun fermentacijske učinkovitosti

Pri računanju fermentacijske učinkovitosti, smo uporabljali podatke o sladkorni stopnji mošta, ki smo jo dobili iz korelacijske tabele med gostoto mošta, relativno gostoto, sladkorno stopnjo mošta, % saharoze in alkoholom v vinu. Za izračun fermentacijske učinkovitosti smo poleg sladkorne stopnje potrebovali še volumske odstotke alkohola in koncentracijo reducirajočih sladkorjev.

Formula za izračun fermentacijske učinkovitosti:

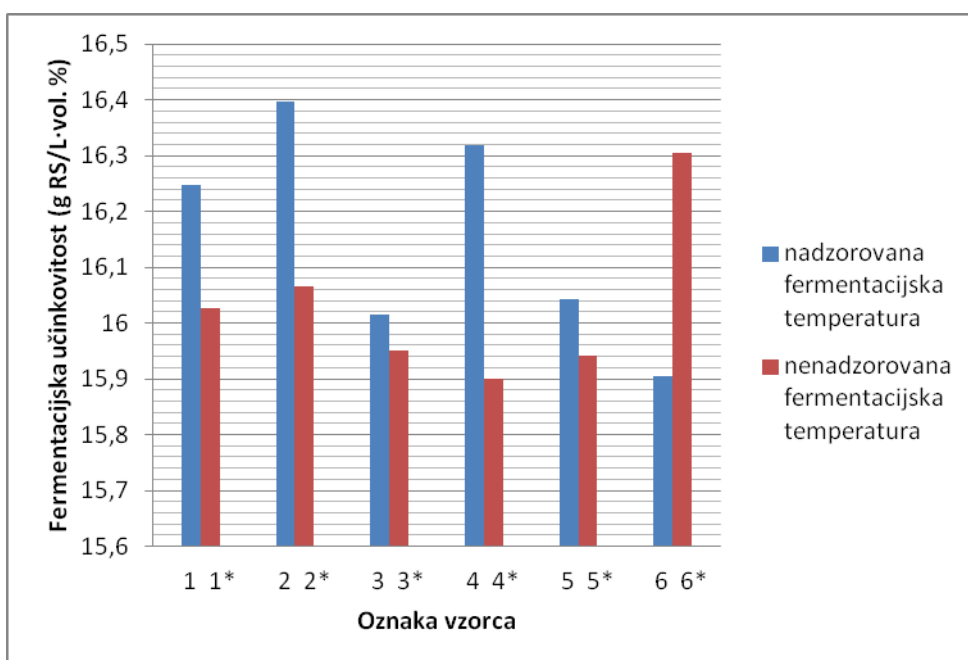
$$F_n = \frac{RS_m - RS_v}{ALK_{vol}} \quad \dots(9)$$

Legenda:

RS_m – sladkorna stopnja mošta (g/L)

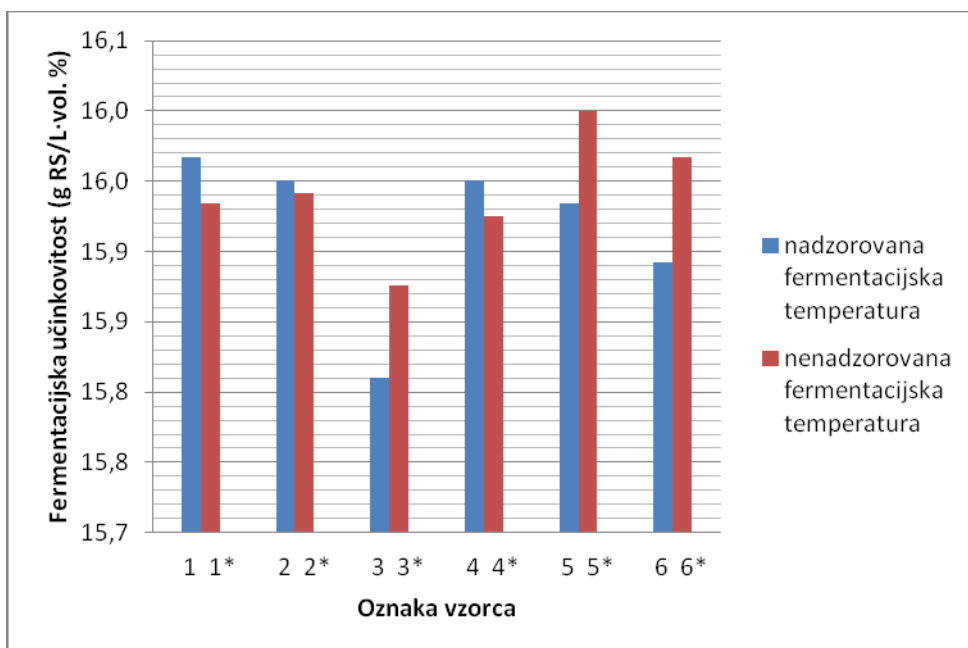
RS_v – koncentracija reducirajočih sladkorjev (g/L)

ALK_{vol} – koncentracija alkohola (vol.%)



Slika 28: Fermentacijska učinkovitost (g RS/L·vol.%) mošta v vrenju v vzorcih z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 28 nam prikazuje razlike med fermentacijsko učinkovitostjo vzorcev mošta v vrenju, ki so dejansko fermentirali en teden pri 20 °C s samo prvim dodanim sevom kvasovk. V vseh vzorcih z izjemo vzorca 6 je razvidno, da je bila fermentacijska učinkovitost boljša pri vzorcih z alkoholno fermentacijo pri nadzorovani oz. kontrolirani temperaturi. Največjo fermentacijsko učinkovitost je imel vzorec 2, najmanjšo pa vzorec 4*.

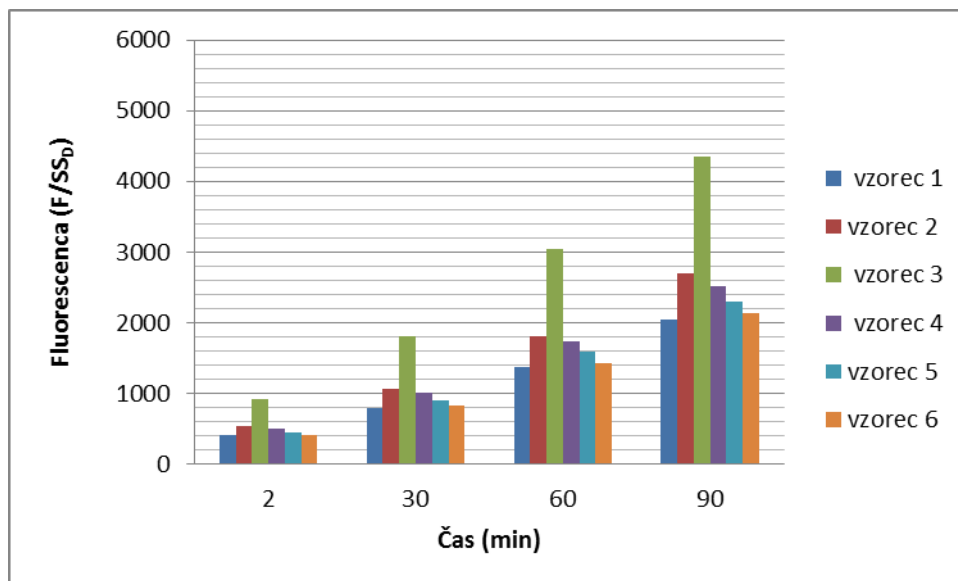


Slika 29: Fermentacijska učinkovitost (g RS/L·vol.%) mladega vina z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 29 pa nam prikazuje fermentacijsko učinkovitost mladega vina. V primerjavi s fermentacijsko učinkovitostjo mošta v vrenju so rezultati drugačni. Ne glede na to, da si rezultati med seboj niso bistveno različni, smo pričakovali, da bo fermentacijska učinkovitost boljša pri vzorcih, ki so fermentirali pri višji oz. pri nenadzorovani temperaturi. Najvišjo fermentacijsko učinkovitost je imel vzorec 5*, najmanjšo pa 3.

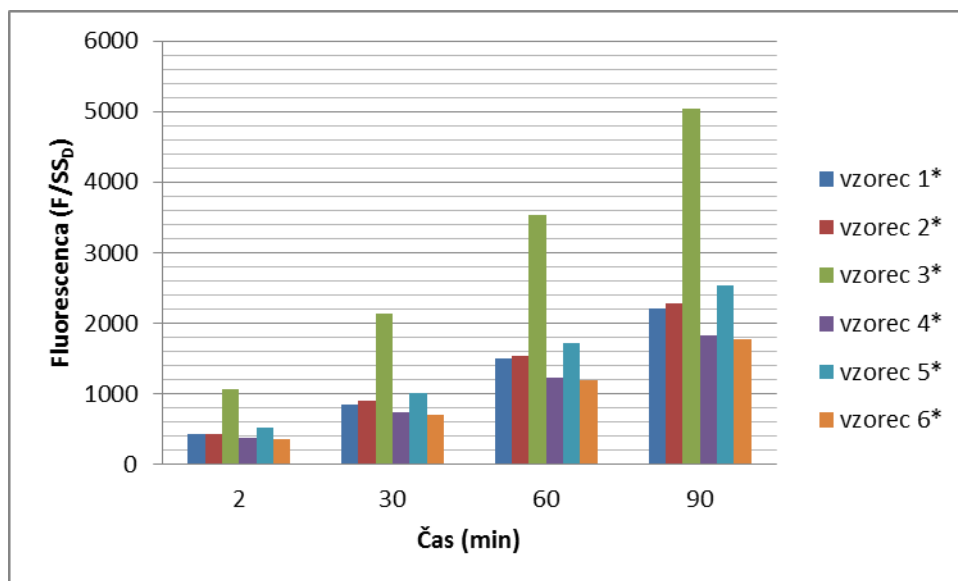
4.2.12 Antioksidativni potencial droži

Poleg določanja antioksidativnega potenciala vina smo določali tudi antioksidativni potencial droži. Na slikah 30 in 31 so prikazani histogrami, ki prikazujejo odvisnost F/SS_D (fluorescenca glede na suho maso droži), od časa trajanja analize. Analiza je trajala 120 minut, meritve se odčitajo pri 90 minutah. Večja kot je vrednost F/SS_D , manjši antioksidativni potencial ima vzorec.



Slika 30: Antioksidativni potencial droži v vzorcih mladega vina, izražen s fluorescenco, v odvisnosti od časa analize, po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri kontrolirani nižji temperaturi alkoholne fermentacije

Slika 30 nam prikazuje, da ima najmanjši antioksidativni potencial vzorec 3, ki ima najvišjo fluorescenco, glede na suho maso droži in v primerjavi z drugimi vzorci vidno izstopa. Vzorec 3 je najverjetneje že toliko oksidiral, da kaže manjšo stopnjo antioksidativnega potenciala v primerjavi z drugimi vzorci. Če sodimo rezultate po različnih sevih kvasovk, ne opazimo izrazitih razlik, kar je verjetno posledica podobnega endogenega antioksidativnega potenciala kvasnih celic. Največji antioksidativen potencial kaže vzorec 1.



Slika 31: Antioksidativni potencial droži v vzorcih mladega vina, izražen s fluorescenco, v odvisnosti od časa analize, po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima sevoma kvasovk in pri nekontrolirani višji temperaturi alkoholne fermentacije

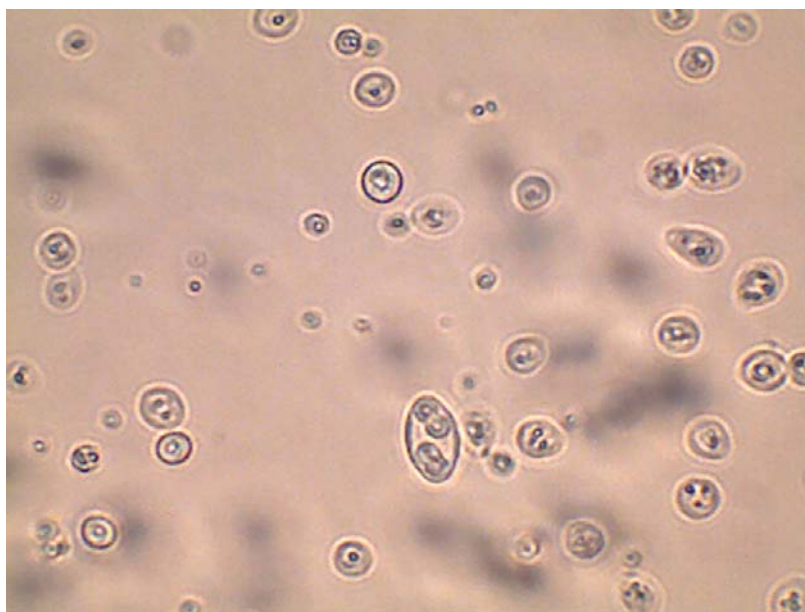
Slika 31 nam v primerjavi s sliko 30 podaja rezultate fluorescence, glede na suho maso droži, oz. antioksidativnega potenciala vzorcev pri nekontrolirani, višji temperaturi alkoholne fermentacije. V primerjavi so vrednosti fluorescence nekoliko manjše, kar pomeni, da imajo ti vzorci večji antioksidativni potencial. Rezultati so verjetno posledica stresa, kateremu so bili vzorci izpostavljeni zaradi višjih temperatur fermentacije, kar je pomenilo stalno adaptacijo na razmere v okolju in s tem posledično večji antioksidativni potencial. Če sodimo rezultate po različnih sevih kvasovk, ne opazimo izrazitih razlik, kar je verjetno posledica podobnega endogenega antioksidativnega potenciala kvasnih celic. Največji antioksidativni potencial kaže vzorec 6*.

4.2.13 Mikroskopski pregled droži

Če pod mikroskopom opazujemo preparat mladega vina po končani alkoholni fermentaciji, je normalno, da so v tem času prisotne večinoma le kvasovke. Glede na obliko in velikost uniformiranih celic lahko sklepamo, da je potekla fermentacija s čisto startersko kulturo kvasovk, kajti pri spontani fermentaciji z avtohtonimi kvasovkami bi opazili večje razlike v obliki in velikosti celic. Granulirana struktura znotraj celic kaže na to, da so kvasovke že v stacionarni fazi rasti, oziroma v fazi odmiranja in avtolize (Košmerl, 2007a).

Z mikroskopiranjem posameznih vzorcev droži smo dejansko opazovali isto kot pri zgoraj opisanem mikroskopiranju mladega vina. Dobili smo lepe slike nepoškodovanih kvasnih celic, nekatere od njih so bile tudi v fazi brstenja. Opazili smo tudi razlike v obliki med različnimi kvasovkami in na nekaterih slikah je lepo viden vinski kamen.

Na spodnjih slikah so posnetki le ene od ponovitev vzorcev, saj se slike med seboj niso bistveno razlikovale. Več ali manj vidimo goste združbe kvasovk, pri nekaterih je opazno brstenje, ponekod opazimo tudi kristale vinskega kamna (kalijev hidrogentartat).



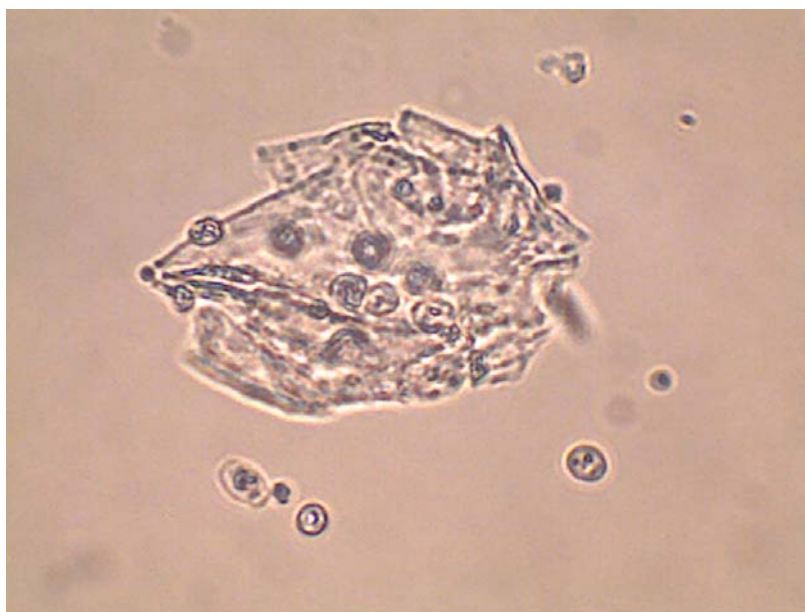
Slika 32: Mikroskopski posnetek droži vzorca 1* pri 400-kratni povečavi

Na sliki 32 vidimo posamezne kvasne celice, ki so majhne in imajo okroglo in elipsoidno obliko. Poleg avtoliziranih celic vidimo, da nekatere kvasovke še brstijo.



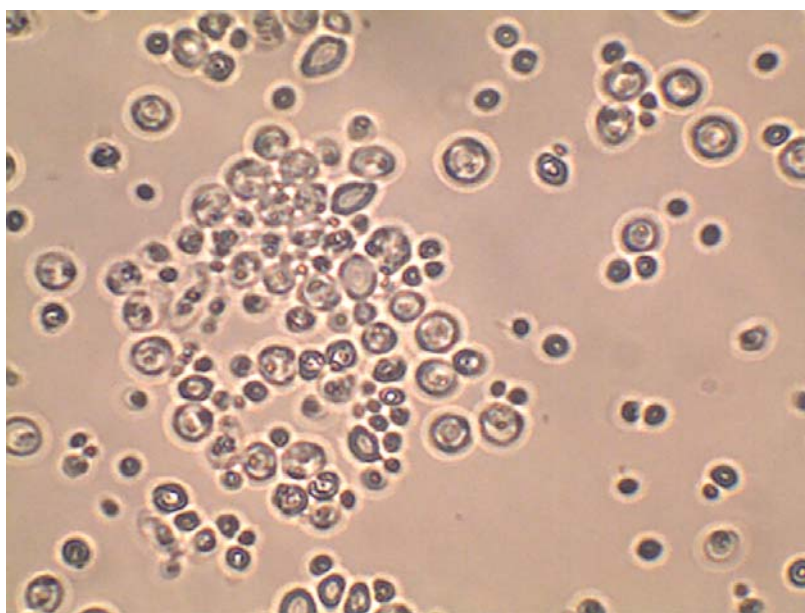
Slika 33: Mikroskopski posnetek droži vzorca 6* pri 400-kratni povečavi

Na sliki 33 vidimo posamezne kvasovke, ki so okrogle, limonaste in elipsoidne oblike. Brstenja ni opaziti.



Slika 34: Mikroskopski posnetek droži vzorca 1 pri 400-kratni povečavi

Slika 34 nam razločno prikazuje ostanek vinskega kamna (kalijev hidrogentartat). Na sliki je kvasna populacija številčno majhna, sestavljena iz okroglih kvasovk, ki ne brstijo.



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

Na sliki 35 vidimo številčno kvasno populacijo. Kvasovke so okrogle, limonaste in elipsoidne. Brstenja ni opaziti.

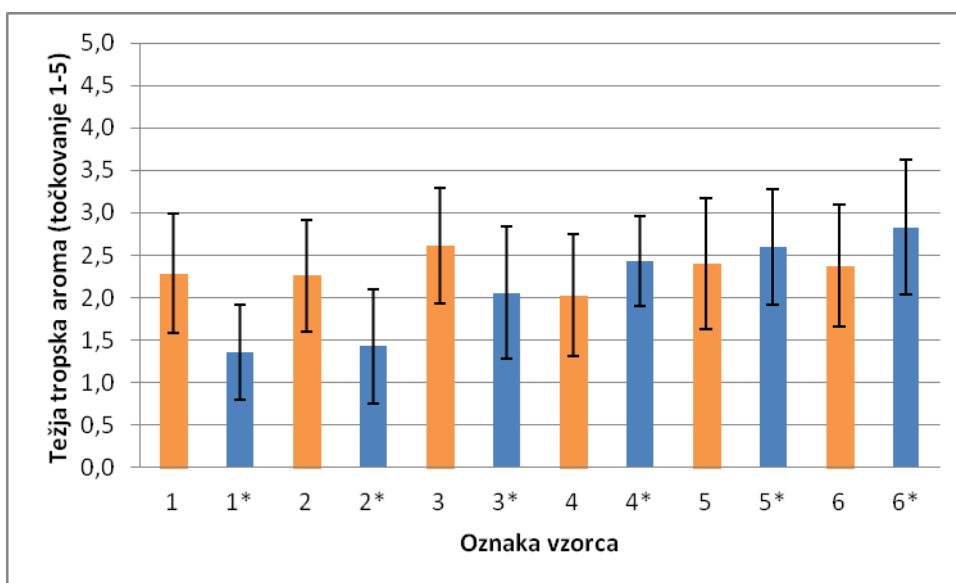
4.2.14 Senzorično ocenjevanje vina

Z deskriptivno senzorično analizo mladega vina sauvignon, letnika 2011, ki smo jo izvedli približno tri tedne po prvem pretoku in žveplanju, smo ocenjevali intenziteto različnih vonjev oziroma arom, ocenili celokupno kakovost (okus+aroma), nazadnje pa vzorce tudi rangirali od prvega do tretjega mesta. Vzorce smo ocenjevali po lestvici od 1 (najmanj) do 5 (najbolj). Senzorično analizo je izvajalo sedem ocenjevalcev.

Preglednica 10: Ocenjevalni elementi senzorične analize mladega vina

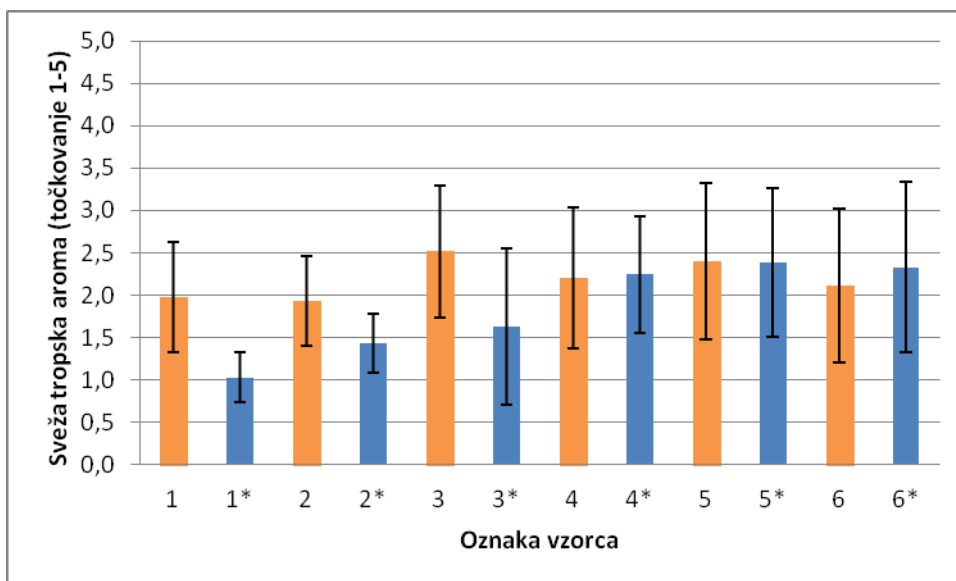
vonj	deskriptor	aroma
po tropskem sadju	pasjonka, mango	težja tropska aroma
po citrusih	grenivna, limona	sveža tropska aroma
po sadju	hruška, jabolko	fermentacijska aroma
po zelenem	zeleni paprika	prekrivanje primarnih arom

Preglednica 10 prikazuje parametre, na katere smo se navezovali pri senzoričnem ocenjevanju mladih vin. Na slikah, ki sledijo, so prikazani rezultati senzorične analize, upoštevane so bile povprečne ocene sedmih ocenjevalcev.



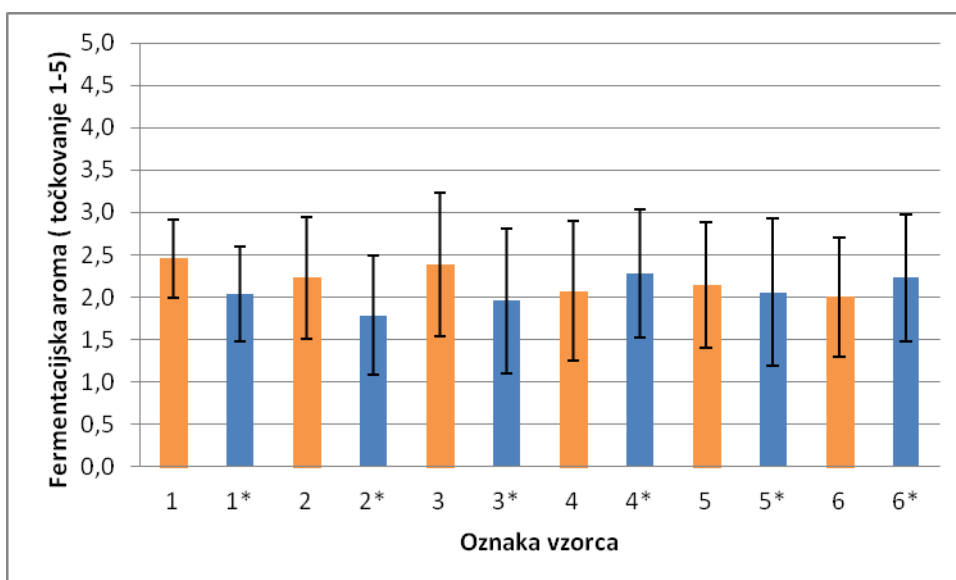
Slika 36: Ocenjevanje težje tropske arome (točke 1-5) v vzorcih mladega vina z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Na sliki 36 je prikazano ocenjevanje težje tropske arome, govorimo o aromah po tropskem sadju (pasjonka in mango). Pri vzorcih, pridelanih s prvim sevom kvasovk, so bili bolje ocenjeni tisti, ki so fermentirali pri nadzorovani nižji temperaturi. Ravno obratno pa kažejo rezultati vzorcev, pridelanih z drugim sevom kvasovk. V tem primeru so bili bolje ocenjeni vzorci, ki so fermentirali pri nenadzorovani višji temperaturi. Najboljšo oceno je dobil vzorec 6*, najmanjšo pa vzorec 1*.



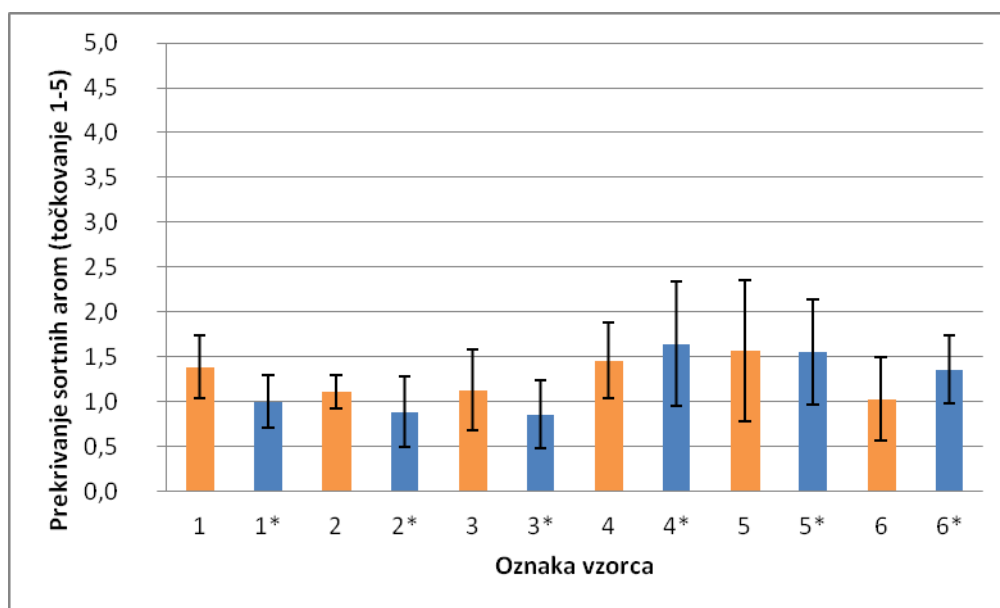
Slika 37: Ocenjevanje sveže tropske arome (točke 1-5) v vzorcih mladega vina z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 37 nam prikazuje ocenjevanje sveže tropske arome, ki zajema arome po citrusih (limona in grenivka). Če primerjamo rezultate s slike 36, so rezultati podobni. Pri vzorcih, pridelanih s prvim sevom kvasovk, so boljše ocene dobili vzorci, ki so fermentirali pri nadzorovani nižji temperaturi. Pri drugem sevu kvasovk pa so malenkostno boljše ocene dobili vzorci, fermentirani pri nenadzorovani višji temperature oz. temperaturi kleti. Najboljšo oceno je dobil vzorec 3, najmanjšo pa, kot pri ocenjevanju težje tropske arome, vzorec 1*.



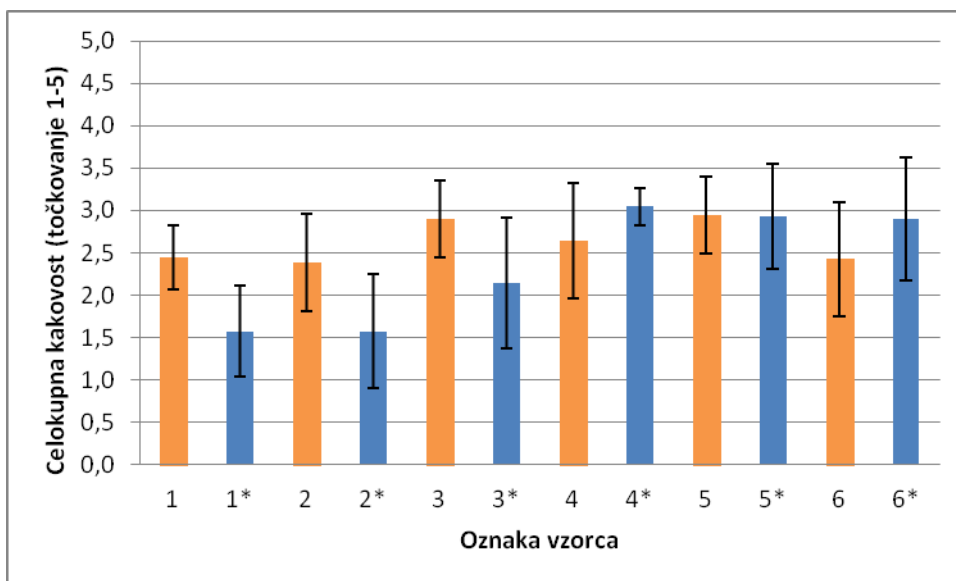
Slika 38: Ocenjevanje fermentacijske arome (točke 1-5) v vzorcih mladega vina z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Pri ocenjevanju fermentacijske arome smo dobili več ali manj izenačene ocene degustatorjev, kot kaže slika 38. Prvi sev kvasovk je bolj oblikoval oziroma ohranil fermentacijsko aromo pri nadzorovani nižji temperaturi, kar kažejo boljše ocene pri vzorcih 1-3 oz. 1*-3*. Pri drugem sevu kvasovk pa so bile fermentacijske arome bolj izražene pri vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani višji temperaturi, z izjemo vzorcev 5-5*.



Slika 39: Ocenjevanje prekrivanja sortnih arom (točke 1-5) v vzorcih mladega vina z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Slika 39 prikazuje ocenjevanje prekrivanja sortnih arom v vzorcih mladega vina. Opazno je, da je pri vzorcih, pridelanih s prvim sevom kvasovk, večja ocena prekrivanja sortnih arom pri fermentaciji z nadzorovano nižjo temperaturo. V primeru vzorcev, pridelanih z drugim sevom kvasovk, pa opazimo povečanje ocen prekrivanja sortnih arom, torej aromo po zelenem, ne glede na temperaturo fermentacije, razen pri vzorcu 6, ki je dobil najnižjo oceno prekrivanja sortnih arom. Največjo oceno je dobil vzorec 4*.



Slika 40: Ocenjevanje celokupne kakovosti (točke 1-5) vzorcev mladega vina z dvema različnima sevoma kvasovk in pri dveh fermentacijskih temperaturah

Na sliki 40 imamo prikazane ocene celokupne kakovosti posameznih vzorcev. Če primerjamo povprečne ocene vzorcev po sevih kvasovk, vidimo, da so bili bolje ocenjeni vzorci, pridelani z drugim sevom kvasovk (povprečna ocena znaša 2,8 točk), medtem ko so bili vzorci, pridelani s prvim sevom kvasovk, slabše ocenjeni (povprečna ocena znaša 2,2 točki).

Po drugi strani, če primerjamo ocene vzorcev glede na temperature alkoholne fermentacije, pa opazimo, da so bili bolje ocenjeni vzorci, ki so fermentirali pri nadzorovani nižji temperaturi (povprečna ocena znaša 2,6 točke), v primerjavi z vzorci, ki so fermentirali pri nenadzorovani višji temperaturi (povprečna ocena znaša 2,3 točke). Razlika je kljub vsemu manjša kot pri primerjavi vzorcev, pridelanih z različnima sevoma kvasovk.

Vzorci mladih vin so ocenjevalci na koncu senzorične analize tudi rangirali od prvega do tretjega mesta. Rezultati so sledeči:

- 1. mesto: vzorec 5
- 2. mesto: vzorec 3
- 3. mesto: vzorci 3*, 4 in 6*

5 SKLEPI

Diplomsko nalogo smo izvedli z namenom ugotavljanja vpliva različnih sevov kvasovk in fermentacijske temperature na aromatične značilnosti in fizikalno-kemijske ter senzorične lastnosti vina.

- Koncentracija skupnega žveplovega dioksida je bila največja v vzorcu 6 (28 mg/L), najmanjša pa v vzorcu 4 (20 mg/L). Koncentracija skupnega žveplovega dioksida je pri vseh vzorcih znašala manj kot 30 mg/L
- Pri merjenju motnosti je imel največjo vzorec 3 (30,8 NTU), kar je posledica še nezaključene fermentacije. Vzorec je vidno izstopal, večja motnost je bila vidna že s prostim očesom. Pri drugih vzorcih so bila odstopanja v motnosti minimalna.
- Ne glede na fermentacijsko temperaturo ali sev kvasovk, velikih odstopanj pri merjenju intenzitete barve pri A_{420} ni bilo. Največjo intenziteto je imel vzorec 3, najmanjšo pa vzorec 1. Barvne parametre smo merili tudi s prenosnim spektrofotometrom in rezultate podali tudi s CIE $L^* a^* b^*$ lestvico. Največ belih odtenkov je imel vzorec 3, največ zelenih vzorec 5*, največ rumenih pa vzorec 6. Vzorci, ki so fermentirali pri nenadzorovani temperaturi, imajo več zelenih odtenkov barve. Vzorci z drugim sevom kvasovk pa so imeli več zelenih in rumenih odtenkov barve v primerjavi z vzorci s prvim sevom kvasovk.
- Več fenolnih spojin so vsebovali vzorci, ki so fermentirali pri nenadzorovani temperaturi. Vzorci s prvim sevom kvasovk imajo pri obeh temperaturah fermentacije večjo vsebnost fenolnih spojin glede na vzorce z drugim sevom. Največjo vsebnost fenolnih spojin sta imela vzorca 4* in 6*, najmanjšo pa vzorec 2.
- Vzorci vina s prvim sevom kvasovk so v vseh primerih imeli večji antioksidativni potencial. Glede na fermentacijsko temperaturo so imeli pri vseh vzorcih večji antioksidativni potencial vzorci, ki so fermentirali pri nadzorovani temperaturi. Najmanjši oksidativen potencial je imel vzorec 6*, največjega pa vzorec 2.
- Pričakovano je vsebnost FAN v mladem vinu manjša kot v moštu. Vsebnost FAN je bila veliko večja pri vseh vzorcih, ki vsebovali drugi sev kvasovk. Glede na fermentacijsko temperaturo je bila vsebnost FAN skoraj dvakrat manjša pri vzorcih, ki so fermentirali pri nadzorovani temperaturi.
- Dejanska pufrna kapaciteta je bila višja pri vzorcih z drugim sevom kvasovk. Rezultati dejanske pufrne kapacitete so v skladu s pričakovanji, saj so nižji kot pri moštu in v območju med 35 in 50 mmol/L/pH.
- Koncentracija skupnih in titrabilnih kislin v vinu je bila pri vseh vzorcih pričakovano manjša kot v moštu z izjemo vzorca 1. Vzorci 4*, 1, 4 in 5 so imeli vrednost skupnih kislin med 6 in 9 g/L, kar je pričakovano, medtem ko so imeli drugi vzorci manjšo vsebnost karboksilnih kislin.
- Največjo vsebnost kislodelujočih soli sta imela vzorca 2 in 2*. Večjo vsebnost kislodelujočih soli so imeli vzorci s prvim sevom kvasovk in tisti, ki so fermentirali pri nadzorovani temperaturi, z izjemo vzorca 1.
- Vinske kisline je bilo v vseh vzorcih manj od pričakovanega (5-10 g/L), več pa jo je bilo pri vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani temperaturi. Različen sev kvasovk ni bistveno vplival na razlike v vsebnosti vinske kisline.

- Koncentracija jabolčne kisline je bila nižja od pričakovane (1-4 g/L), z izjemo vzorca 3* (1,21 g/L). Vsebnost jabolčne kisline je bila večja pri vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani temperaturi in pri vzorcih s prvim sevom kvasovk.
- Vsi vzorci so imeli pričakovano vsebnost mlečne kisline (med 0 in 2,5 g/L). Vsebnost je bila večja pri vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani temperaturi, medtem ko različna seva kvasovk nista bistveno vplivala na razlike med vzorci.
- Jantarne kisline je bilo v vzorcih, kot smo pričakovali, torej do 1 g/L. Koncentracija je bila več ali manj ista pri vseh vzorcih.
- Vsebnost glukoze v vinu je pričakovano padla v primerjavi z vsebnosti v moštu. Ne glede na sev in temperaturo fermentacije večjih odstopanj ni bilo. Vzorec 1* je bil najmanj povret, vseboval je največ glukoze, najmanj pa jo je vseboval vzorec 3.
- Vsebnost fruktoze ni bila v skladu s pričakovanji, saj smo pričakovali, da bo večja od vsebnosti glukoze, ki jo kvasovke prioriteto porabijo pri fermentaciji. Občutno več fruktoze je v vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani temperaturi.
- Glicerola je bilo v vzorcih v skladu s pričakovanji (5-8 g/L), več pri vzorcih z drugim sevom kvasovk. Nepričakovano temperatura fermentacije ni imela bistvenega vpliva na vsebnost glicerola v vzorcih.
- Vsebnosti aromatičnih spojin v vzorcih so bile različne. Največ β -damascenona je bilo pri vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani temperaturi, od višjih alkoholov pa je bilo, v vseh vzorcih, pričakovano največ 3-metilbutanola. Vsebnost 1-heksanola je bila večja pri vzorcih z drugim sevom kvasovk, prav tako pa tudi vsebnost estra etil acetata. Omenjene spojine je bilo več pri vzorcih, ki so fermentirali pri nenadzorovani temperaturi. Od kislin je imela največjo vsebnost v vzorcih oktanojska kislina, sledila sta dekanajojska in heksanojska. Kislin je bilo več pri vzorcih s prvim sevom kvasovk.
- Fermentacijska učinkovitost mošta je bila, z izjemo vzorca 6*, boljša pri vzorcih, ki so fermentirali pri nadzorovani temperaturi. Rezultati fermentacijske učinkovitosti mladega vina so, ne glede na iste ponovitve, različni.
- Med vzorci, ki so fermentirali pri nadzorovani temperaturi, ima najmanjši antioksidativni potencial droži vzorec 3, ki vidno izstopa iz povprečja. Vzorci, ki so fermentirali pri nenadzorovani temperaturi, imajo nekoliko večji antioksidativni potencial droži, zopet pa iz povprečja izstopa vzorec 3*, ki ima najmanjši AOP. Glede na različna seva kvasovk, pri rezultatih ne opazimo bistvenih razlik.
- Celokupno so bili pri senzorični analizi v povprečju bolje ocenjeni vzorci z drugim sevom kvasovk (ocena 2,8), medtem ko so imeli vzorci s prvim sevom kvasovk povprečno oceno 2,2.

6 POVZETEK

Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti, kako različna seva kvasovk in različni fermentacijski temperaturi vplivata na aromatične značilnosti in druge fizikalno-kemijske ter senzorične lastnosti mladih vin.

Uporabili smo mošt in kasneje mlado vino sorte sauvignon, letnika 2011. Mošt smo razdelili v dvanajst fermentorjev volumna 35 L. Sledila je inokulacija z dvema različnima sevoma kvasovk in začeli fermentacijo pri nadzorovani temperaturi in nenadzorovani temperaturi oz. temperaturi kleti. Na ta način smo dobili po tri paralelke za oba seva pri dveh različnih temperaturah fermentacije, skupaj dvanajst vzorcev.

Med potekom alkoholne fermentacije smo spremljali in nadzorovali temperaturo fermentacije, proti koncu pa spremljali še koncentracijo reducirajočih sladkorjev in motnost mladega vina.

Po zaključeni alkoholni fermentaciji smo opravili fizikalno-kemijske in senzorične analize mladega vina ter mikrobiološke analize droži. Z dobljenimi rezultati smo ugotovili, da različna seva kvasovk in različni fermentacijski temperaturi vplivata na kakovost in druge značilnosti pridobljenega vina.

Vzorci 1*-3*, ki vsebujejo prvi sev kvasovk, so sestavljali prvo skupino preiskovanih vzorcev v treh paralelkah, primerjalno pa so nas zanimalo predvsem razlike med vzorci 1*-3* in 4*-6*, ki so vsebovali drugi sev kvasovk. Obe skupini vzorcev sta fermentirali pri nenadzorovani temperaturi fermentacije. V primerjavi z vzorci 4*-6*, so imeli vzorci 1*-3* v povprečju večje koncentracije skupnega SO₂, bili so bolj motni, imeli večjo intenziteto barve pri A₄₂₀, večjo koncentracijo kislodelujočih soli, večjo koncentracijo mlečne kisline in večji antioksidativni potencial. Vzorci 4*-6* so imeli večje koncentracije FAN, večjo dejansko pufrno kapaciteto, večjo koncentracijo skupnih kislin in glicerola, imeli pa so tudi boljšo fermentacijsko učinkovitost. Manj razlik med skupinama 1*-3* in 4*-6* je bilo pri rezultatih skupnih fenolnih spojin, koncentracijah vinske in jabolčne kisline, sladkorjev in AOP droži. Pri analizi AOP droži je iz povprečja močno izstopal le vzorec 3*, ki je imel mnogo manjši antioksidativni potencial. Skupina vzorcev 4*-6* je imela nekoliko večjo vsebnost spojine 1-heksanol, precej več pa je bilo spojine etil acetata, heksil acetata in izoamil acetata. V vzorcih 1*-3* pa je bilo v primerjavi z vzorci 4*-6* več etil dekanoata, etil oktanoata, dekanolske in oktanojske kisline.

Vzorci 1-3, ki so vsebovali prvi sev kvasovk, so sestavljali skupino preiskovanih vzorcev v treh paralelkah, prav tako pa so nas zanimalo razlike v rezultatih fizikalno-kemijskih in mikrobioloških analiz ter senzorične analize, v primerjavi z vzorci 4-6, ki so vsebovali drugi sev kvasovk. Obe skupini vzorcev s tremi paralelkami sta fermentirali pri nadzorovani temperaturi. Skupina vzorcev 1-3 je imela večji antioksidativni potencial, večjo koncentracijo kislodelujočih soli in večje koncentracije jabolčne ter mlečne kisline. Skupina vzorcev 4-6 je imela večjo koncentracijo skupnih fenolnih spojin, FAN, večjo pufrno kapaciteto in večjo vsebnost vinske kisline, glukoze ter glicerola. Fermentacijsko je bila bolj učinkovita skupina vzorcev 4-6. Manj razlik v rezultatih med skupinama vzorcev

1-3 in 4-6, pa je bilo pri analizah SO₂, motnosti, z izjemo vzorca 3, intenzitete barve in vsebnostjo skupnih in titrabilnih kislin. Rezultati AOP droži so prav tako bili primerljivi, izstopal je le vzorec 3, ki je imel mnogo manjši antioksidativni potencial droži. Če gledamo v povprečju, sta bile senzorično obe skupini presenetljivo enakovredno celokupno ocenjeni, najbolj sta izstopala le vzorca 3 in 5, ki sta bila ocenjena najbolje. Pri analizah aromatičnih spojin, je v skupini vzorcev 1-3 večja vsebnost β-damascenona, feniletanola, 2-fenilacetata, etil dekanoata in etil oktanoata ter dekanoidske in oktanojske kisline. Po drugi strani pa je pri skupini vzorcev 4-6 več 2-metilbutanola, 1-heksanola, etil acetata, heksil acetata ter izoamil acetata.

Če primerjamo vzorce z istim sevom kvasovk, ki so fermentirali pri različnih temperaturah, torej 1-3 in 1*-3*, opazimo bistvene razlike pri naslednjih fizikalno-kemijskih parametrih. Prostega aminokislinskega dušika (FAN) je bilo dvakrat več pri vzorcih, ki so fermentirali pri višji oz. nenadzorovani temperaturi. Isto lahko trdimo tudi, če primerjamo vzorce 4-6 in 4*-6*. Pri vzorcih, ki so fermentirali pri višjih temperaturah (1*-6*) opazimo tudi večje koncentracije vinske in mlečne kislin ter koncentracije fruktoze, v primerjavi z vzorci 1-6. Pri določanju vsebnosti aromatičnih spojin, so bile pri vzorcih, ki so fermentirali pri višji temperaturi (1*-6*) določene večje koncentracije β-damascenona, 2-metilbutanola ter etil oktanoata. Senzorično so bili vzorci s prvim sevom kvasovk, ki so fermentirali pri nižji temperaturi (1-3) bolje ocenjeni kot vzorci 1*-3*. Ravno obratno pa je bilo pri vzorcih 4*-6*, ki so bili bolje ocenjeni kot vzorci 4-6.

Z dodatkom dveh različnih sevov kvasovk in fermentacije pri dveh različnih temperaturah smo po pričakovanju dobili zelo različne rezultate. Razlike smo dokazali s fizikalno-kemijskimi in mikrobiološkimi analizami, na koncu pa še s senzorično analizo. V prvi vrsti sta na razlike v rezultatih vplivala dva različna seva kvasovk, kot posledico pa smo dokazali različno oblikovanje sortnih in fermentacijskih arom vina in drugih fizikalno-kemijskih parametrov. Prav tako lahko potrdimo hipotezo, da so bile razlike v rezultatih posledica različnih fermentacijskih temperatur, nadzorovane in nenadzorovane. Na tvorbo aromatičnih spojin sta pričakovano najbolj vplivala različna seva kvasovk, prav tako pa tudi različni temperaturi fermentacije. Hipotezo, kjer smo predpostavljali, da med tremi paralelkami v skupinah vzorcev med fermentacijo ne bo bistvenih razlik, pa smo zavrgli, saj so se razlike pojavljale pri več fizikalno-kemijskih, mikrobioloških in senzoričnih parametrih.

Uporaba različnih sevov kvasovk in različne temperature alkoholne fermentacije nam omogoča spoznati različne vplive na pridelavo mladega vina. Z izbiro primernega seva kvasovk in temperature fermentacije lahko bistveno pripomoremo k pridelavi vina z zelenimi lastnostmi.

7 VIRI

- Anchor wine yeast. 2008. VIN 7. Eppindust, Anchor Wine Yeast: 2 str.
<http://anchorwineyeast.com/envin7.html> (6.feb. 2012)
- Bavčar D. 2009. Kletarjenje danes. 2. izd. Ljubljana, ČZD Kmečki glas d.o.o.: 295 str.
- Berovič M., Herga M. 2007. Vpliv temperaturnega šoka na vcepek *Saccharomyces cerevisiae* in produkcijo glicerola v vinih. V: Vinarski dan. Ljubljana, 6. junij 2007. Čuš F. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 85-92
- Dawidowicz A.L., Wianowska D., Olszowy M. 2012. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH[•] method (problems in estimation of antioxidant activity). Food Chemistry, 131: 1037-1043
- De Paola M. 2003. Zagotovitev prevlade dodanih selekcioniranih vinskih kvasovk nad »divjo« mikroflore. V: Vinarski dan. Ljubljana, 12. junij 2003. Marinček L. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 81-97
- Dunlevy J.D., Kalua C.M., Keyzers R.A., Boss P.K. 2009. The production of flavour & aroma compounds in grape berries. V: Grapevine molecular physiology & biotechnology. 2nd ed. Roubelakis-Angelakis (ed.). Dordrecht, Springer Science + Business Media D.V.: 293-340
- ETS Laboratories. 2011. Technical Bulletin: ETS Wine color analysis. St. Helena, ETS Laboratories: 2 str.
<http://www.etslabs.com/resources/publications/color-analysis/technical-bulletin.aspx>
- Ferreira V., Cacho J. 2009. Identification of impact odorants of wines. V: Wine chemistry and biochemistry. Moreno-Arribas M.V., Polo M.C. (eds.). New York, Springer Science + Business Media, LLC.: 393-415
- Golob T., Bertonecelj J., Doberšek U., Jamnik M. 2006. Senzorična analiza živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81 str.
- Gordon B. 2009. Wine color analysis using the evolution array UV-visible spectrophotometer. Madison, Thermo Fischer Scientific: 2 str.
http://www.analiticaweb.com.br/newsletter/09/51852_UV_WineColor.pdf
- Hrček L., Korošec – Koruza Z. 1996. Sorte in podlage vinske trte: ilustrirani prikaz trsnega izbora za Slovenijo. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas, d.d.: 45-47
- Jakubowski W., Biliński T., Bartosz G. 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Free Radical Biology & Medicine, 28: 659-664

- Košmerl T. 2003. Pomen hranilnih snovi za optimalen potek alkoholne fermentacije in jabolčno-mlečnokislinske fermentacije. V: Vinarski dan. Ljubljana, 12. junij 2003. Marinček L. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 13-35
- 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., 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.
- Lallemend. 2007. Level 2: A breakthrough in winemaking. Toulouse, Lallemend Corporation: 2 str.
<http://www.lallemendwine.com/spip.php?article575&lang=en> (6. feb. 2012)
- Lallemend. 2010. Yeast selected from nature. Toulouse, Lallemend Corporation: 7 str.
http://www.lallemendwine.us/products/yeast_strains.php (6. feb. 2012)
- Muñoz-González C., Rodríguez J.J., Moreno-Arribas V., Pozo-Bayón A. 2011. Beyond the characterization of wine aroma compounds: looking for analytical approaches in trying to understand aroma perception during wine consumption. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401: 1497-1512
- Nemanič J. 1999. Spoznajmo vino: vinske arome v sortah in zvrsteh, degustacija in ocenjevanje, vino in hrana. Dopolnjena izdaja. Ljubljana, Kmečki glas: 59-60
- O.I.V. 2011. Compendium of international methods of wine and must analysis. Vol 1. Paris, O.I.V. – International Organisation of Vine and Wine: 100-106
- Podlogar A. 2007. Ohranjanje antioksidativnih lastnosti rdečih vin. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 77 str.
- Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za predelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 43: 5336-5357
- Prosen H., Strlič M., Rusjan D., Košmerl T., 2007. Aroma grozdja in vina: razvoj kemijske analitike za kontrolo kvalitete. V: Vinarski dan. Ljubljana, 6. junij 2007. Čuš F. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 75-84

- Raspor P. 1996. Kvasovke. V: Biotehnologija: osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA, d.o.o.: 69-93
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. 2000a. Handbook of enology. Vol 2. The microbiology of wine and vinification. 2nd ed. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd: 51-74
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2000b. Handbook of enology. Vol 2. The chemistry of wine stabilization and treatments. 2nd ed. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd: 3-185
- Šikovec S. 1993. Vinarstvo od grozdja do vina. Ljubljana, ČZP, Kmečki glas: 284 str.
- Šikovec S. 1996. Vino pijača doživetja. Ljubljana, ČZP, Kmečki glas: 134
- Wondra M. 1998. Vpliv kvasovk na senzorične lastnosti vina. V: Vinarski dan. Ljubljana, 30. januar 1998. Marinček L. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 64-74
- Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 5-5

ZAHVALA

V prvi vrsti se zahvaljujem mentorici prof. dr. Tatjani Košmerl za pomoč pri delu, oblikovanju in pregledu diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi somentorici prof. dr. Heleni Prosen, za pomoč pri analizi hlapnih aromatičnih spojin in pregledu diplomske naloge.

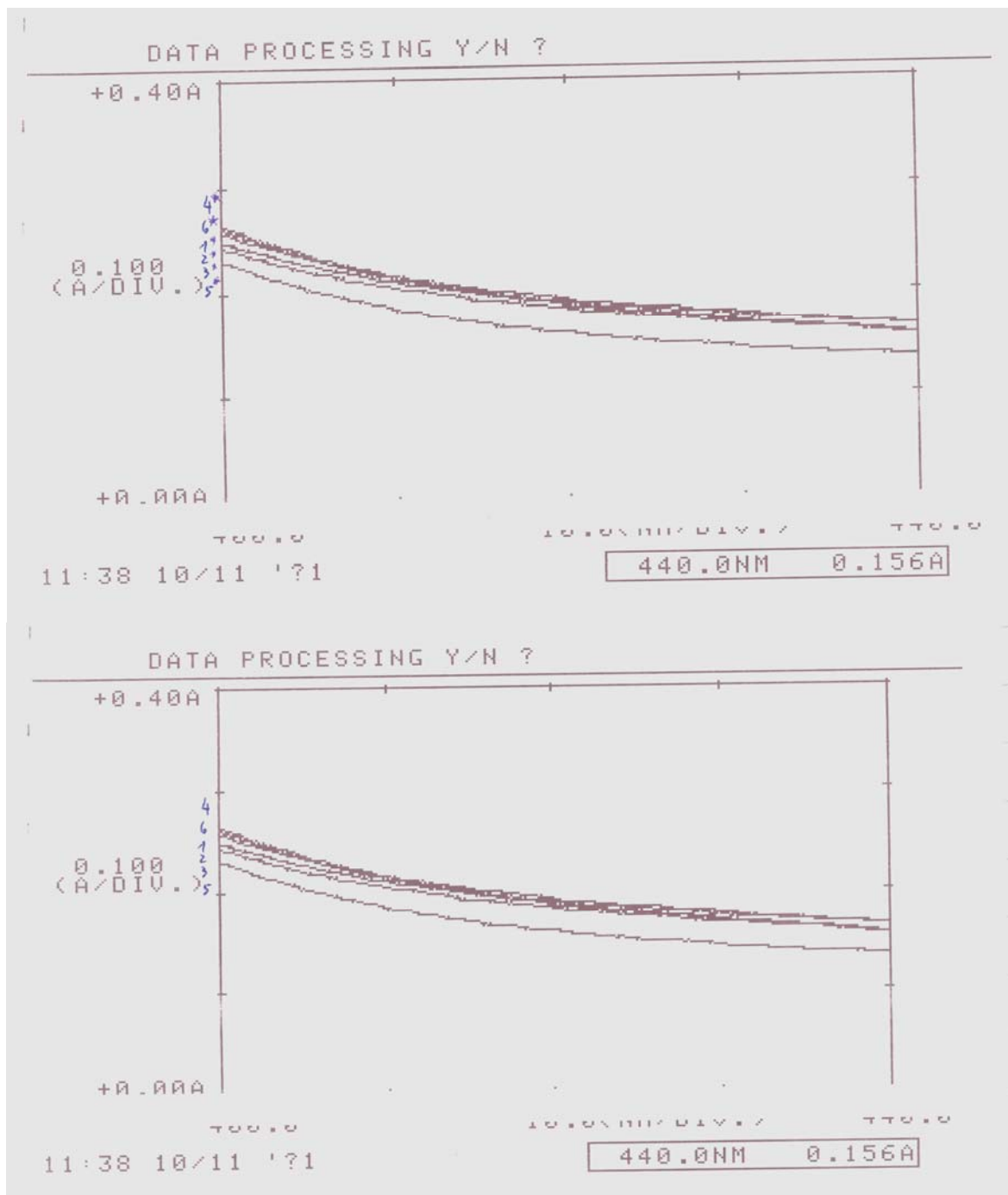
Zahvaljujem se tudi recenzentki doc. dr. Poloni Jamnik za pregled diplomskega dela in Zdenki Zupančič za pomoč pri laboratorijskem delu.

Hvala ge. Lini Burkan Makivić pri urejanju literature.

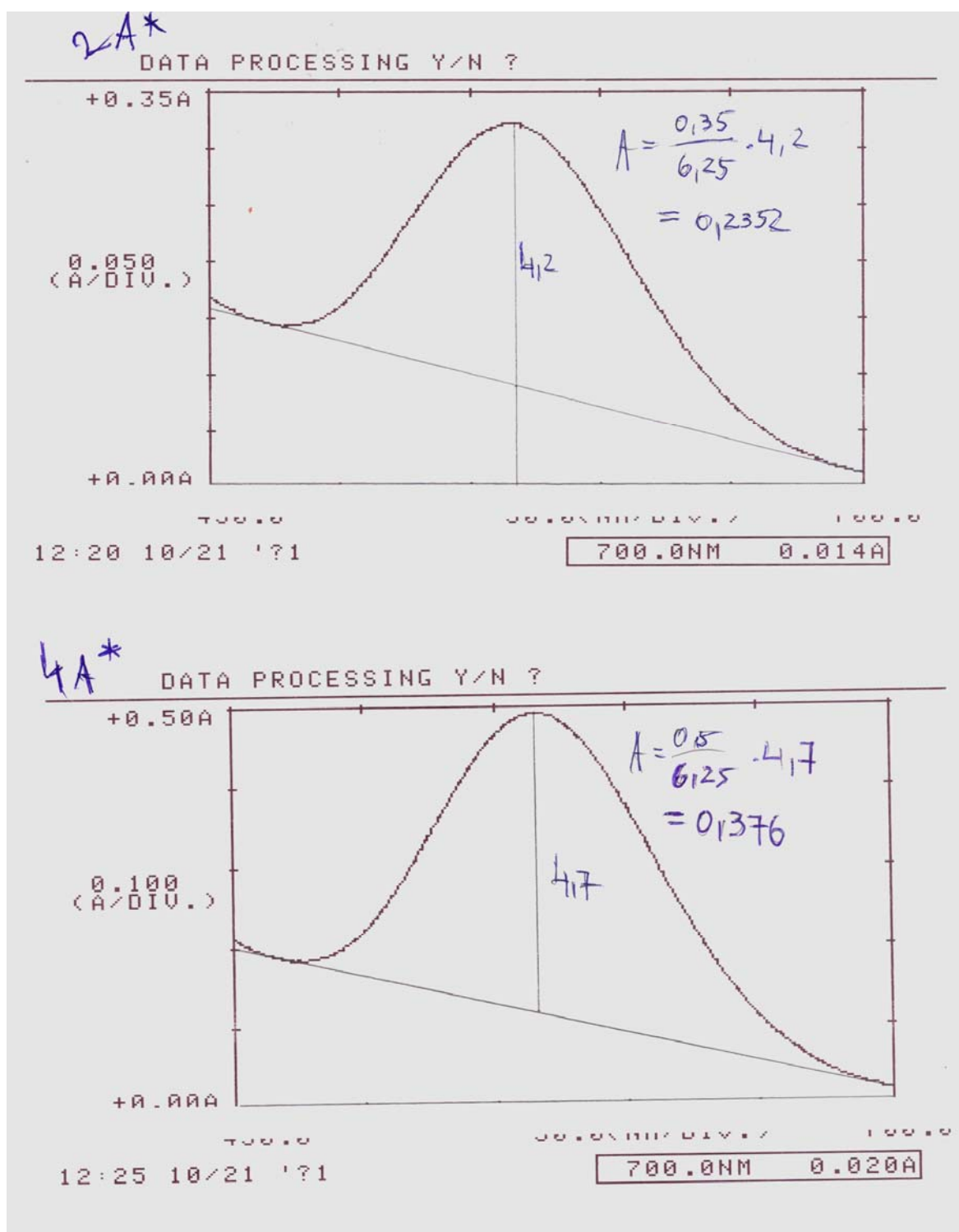
Iskreno se zahvaljujem mojim staršem, ki so mi omogočili študij in me ves čas podpirali.

Zahvaljujem se tudi vsem drugim, ki so mi pomagali pri izvedbi, pisanju in oblikovanju diplomskega dela.

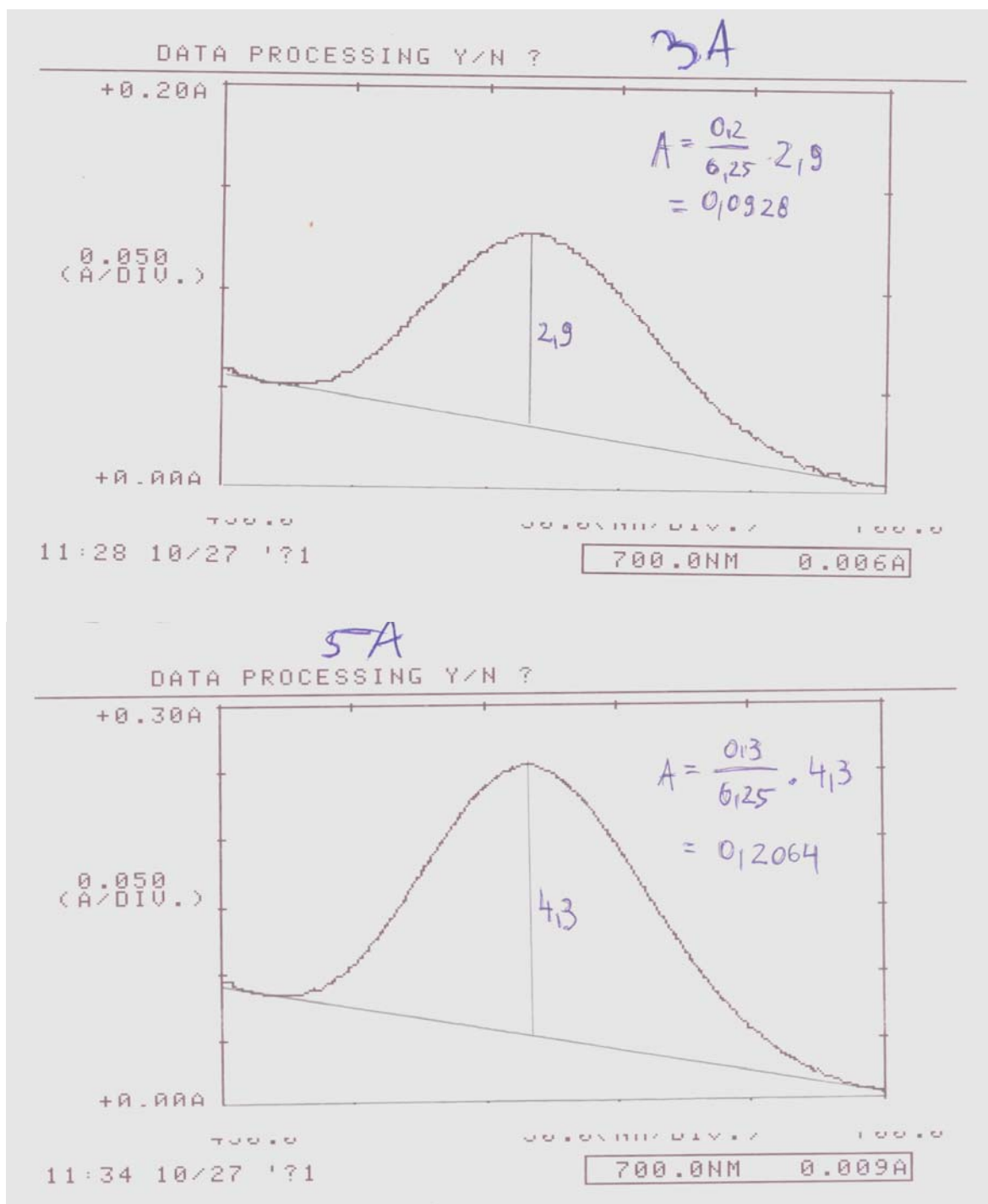
PRILOGE



Priloga A: Barvna spektra vzorcev mladih vin sorte sauvignon v območju valovne dolžine 400 nm in 440 nm



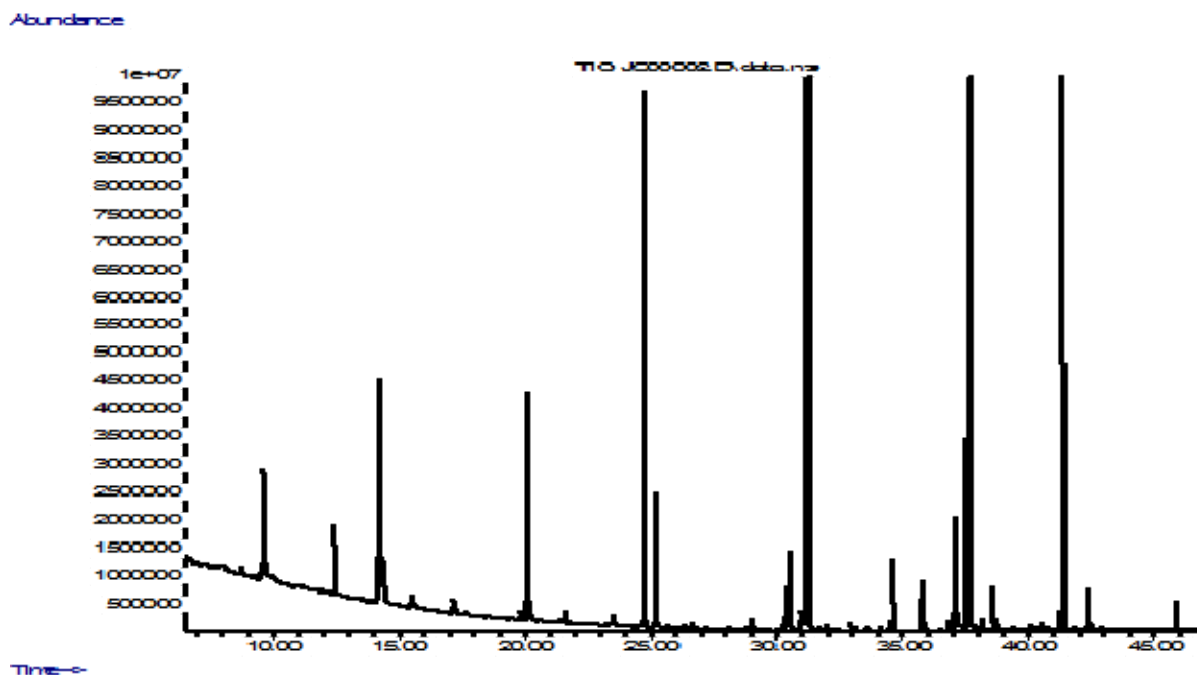
Priloga B: Spektra za določanje FAN vzorcev 2* in 4* v območju med 450-700 nm



Priloga C: Spektra za določanje FAN vzorcev 3 in 5 v območju med 450-700 nm

Priloga D: Primerjalni rezultati aromatičnih snovi v mladem vinu, ki so bile kvalitativno določene v vzorcih vina (ploščina kromatografskega vrha/10⁶)

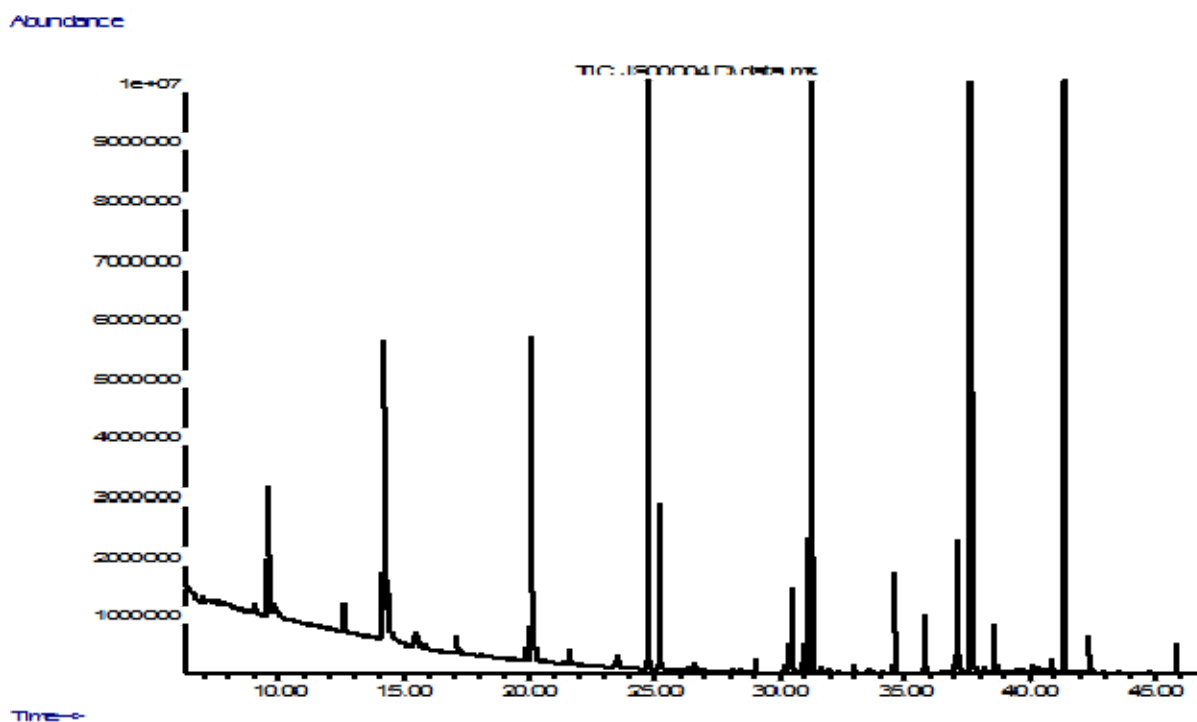
spojina/oznaka vzorca	1*	1	2*	2	3*	3	4*	4	5*	5	6*	6
etil acetat	103,61	101,60	114,97	73,69	113,80	62,12	178,91	146,04	176,60	152,90	195,00	145,58
3-metilbutanol (izoamil alkohol)	201,98	169,54	261,44	248,31	258,76	299,07	235,40	213,04	234,39	275,85	284,92	242,13
2-metilbutanol (amil alkohol)	41,63	13,14	57,21	6,56	52,46	33,00	46,13	33,82	28,34	34,34	62,55	28,02
2,3-butandiol	5,81	0,00	1,63	1,15	0,94	0,00	1,56	8,62	5,65	2,27	1,85	1,55
etil butirat	8,63	6,68	9,00	6,97	9,12	5,47	3,94	6,74	5,54	5,25	5,05	5,61
1-heksanol	5,76	4,93	6,68	6,24	8,79	6,19	6,99	8,38	7,94	9,25	8,07	9,38
izoamil acetat	131,61	119,87	162,81	117,29	176,19	166,36	249,90	225,32	247,43	269,36	294,18	232,22
amil acetat	8,20	1,79	9,25	1,62	10,83	3,14	18,22	8,96	12,60	10,22	22,75	8,94
heksanojska kislina	12,73	12,15	18,20	18,29	13,61	24,62	10,50	13,06	12,60	13,35	9,39	9,88
etil heksanoat	274,79	250,98	315,00	205,74	324,17	166,29	203,12	227,86	211,44	258,23	250,16	227,34
heksil acetat	65,96	57,91	81,30	47,07	77,47	52,95	106,61	114,92	116,42	130,57	133,41	120,09
etil hektanoat	1,37	0,38	1,36	0,34	1,62	0,68	0,47	0,39	0,49	0,71	0,56	0,79
nonanal	1,98	0,43	0,70	0,00	1,05	0,00	0,43	0,00	0,32	0,00	0,37	0,00
metil oktanoat	5,75	2,95	6,67	3,88	6,64	4,17	2,14	2,08	2,33	2,32	3,05	2,17
oktanojska kislina	101,44	159,70	120,15	149,26	100,26	210,69	88,43	92,28	106,45	88,69	81,49	75,57
feniletanol	24,28	46,85	33,33	38,03	30,47	49,79	31,78	35,99	36,62	32,86	27,04	32,61
etil oktanoat	4197,65	3060,30	4541,69	3382,69	4599,99	3284,92	2027,11	1991,36	2346,49	2189,05	2510,79	2098,24
dekanal	1,95	1,60	1,27	1,40	1,30	0,00	0,93	0,00	1,90	1,77	1,24	1,78
izoamil heksanoat	4,88	2,48	5,74	42,30	5,35	3,63	1,50	1,44	1,19	1,44	1,69	1,73
metil salicilat	1,78	1,75	2,06	1,62	1,76	1,67	1,93	2,03	2,18	2,27	2,10	2,55
kumaran	3,07	4,02	2,46	0,00	1,59	0,00	1,81	0,00	0,71	0,00	0,64	0,00
etil nonanoat	46,66	37,11	45,15	43,65	59,92	34,34	41,78	21,11	48,25	25,34	24,97	24,55
2-feniletil acetat	32,39	69,43	34,69	64,85	35,23	107,52	41,55	39,69	49,00	44,28	49,98	43,59
metil dekanoat	1,75	2,75	1,68	3,57	1,62	1,66	0,97	1,17	1,60	1,55	1,61	1,57
3-metilpropil oktanoat	1,65	1,35	1,57	1,77	1,86	1,35	1,06	0,68	1,07	0,00	1,03	0,00
dekanojska kislina	91,71	157,89	109,44	150,29	99,25	72,17	93,17	58,98	116,19	55,62	57,06	53,54
etil dekanoat	2995,85	4029,19	3069,95	4040,67	3063,43	3394,45	2571,53	2246,81	2880,27	2412,97	2781,59	2344,57
etil 9-decenoat	0,97	2,51	1,20	3,24	1,17	1,64	2,90	3,07	3,28	3,27	3,57	3,01
dodekanal	4,04	0,46	2,86	3,35	1,99	0,39	2,02	2,82	4,69	3,38	2,66	3,58
izoamil oktanoat	15,25	22,87	17,79	25,68	16,77	22,75	9,21	7,52	9,90	9,27	10,11	7,82
amil oktanoat	1,74	3,33	2,57	2,64	2,46	2,18	1,15	0,87	0,35	0,95	1,02	0,86
beta-damascenon	5,69	3,58	4,65	2,96	4,31	3,39	4,56	2,73	4,85	2,84	3,87	3,33
etil undekanoat	0,86	1,04	0,35	1,07	0,79	0,70	0,93	0,91	0,98	0,73	0,50	0,89
3-metilpropil dekanoat	1,81	1,85	1,34	2,06	1,89	0,96	1,45	7,28	1,58	0,92	1,38	0,00
etil dodekanoat	522,73	614,20	447,35	628,14	500,47	303,91	387,94	216,70	379,71	244,50	341,94	230,62
izoamil pentadekanoat	15,69	27,53	13,18	28,61	13,83	16,56	13,51	7,60	15,41	9,88	12,73	8,39
amil pentadekanoat	1,50	3,61	1,12	2,50	1,25	1,40	1,35	0,80	1,81	1,00	1,27	0,85
etil tetradekanoat	20,04	1,46	16,86	39,76	17,67	17,12	10,16	6,35	12,41	6,48	9,70	7,09



Priloga E: Plinski kromatogram, na osnovi katerega smo kvalitativno določili aromatične snovi pri vzorcu 1*

Legenda z retencijskimi časi (min):

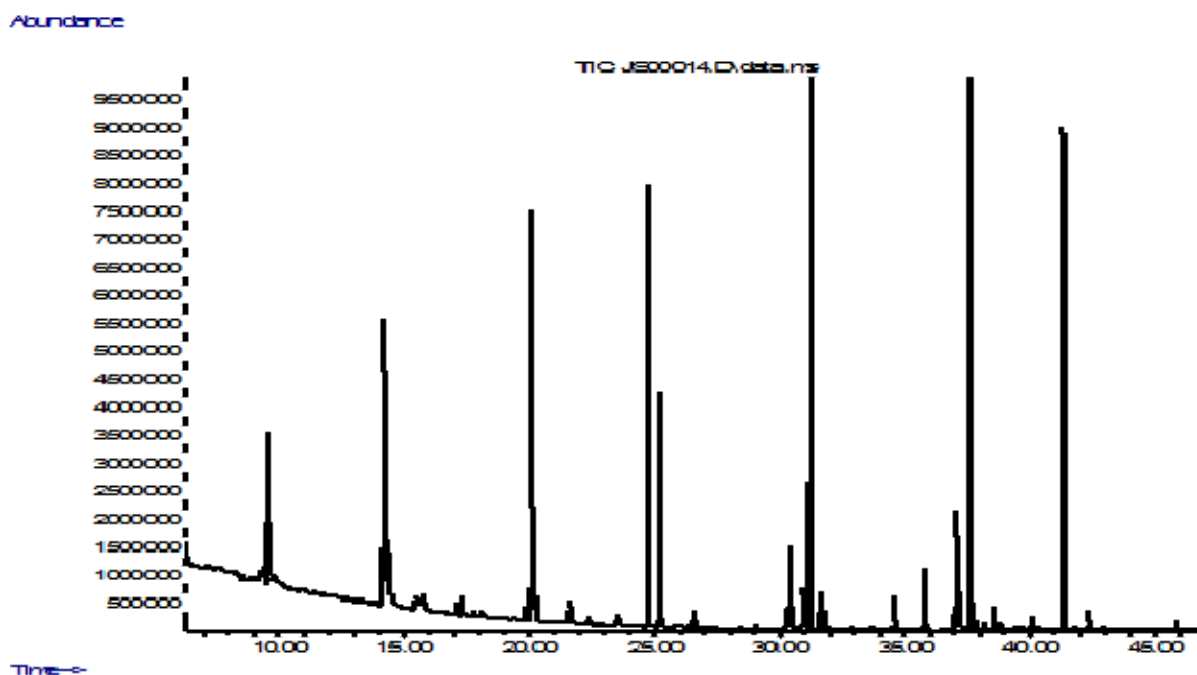
- 9,57 – etil acetat
- 14,25 – 3-metilbutanol (izoamil alkohol)
- 14,40 – 2-metilbutanol (amil alkohol)
- 17,08 – etil butirat
- 19,84 – 1-heksanol
- 20,11 – izoamil acetat
- 23,53 – heksanojska kislina
- 24,73 – etil heksanoat
- 25,21 – heksil acetat
- 30,50 – oktanojska kislina
- 30,91 – feniletanol
- 31,27 – etil oktanoat
- 34,59 – etil nonanoat
- 35,75 – 2-feniletal acetat
- 37,03 – dekanjska kislina
- 37,60 – etil dekanat
- 38,55 – izoamil oktanoat
- 38,73 – β -damascenon
- 41,32 – etil dodekanat



Priloga F: Plinski kromatogram, na osnovi katerega smo kvalitativno določili aromatične snovi pri vzorcu 3*

Legenda z retencijskimi časi (min):

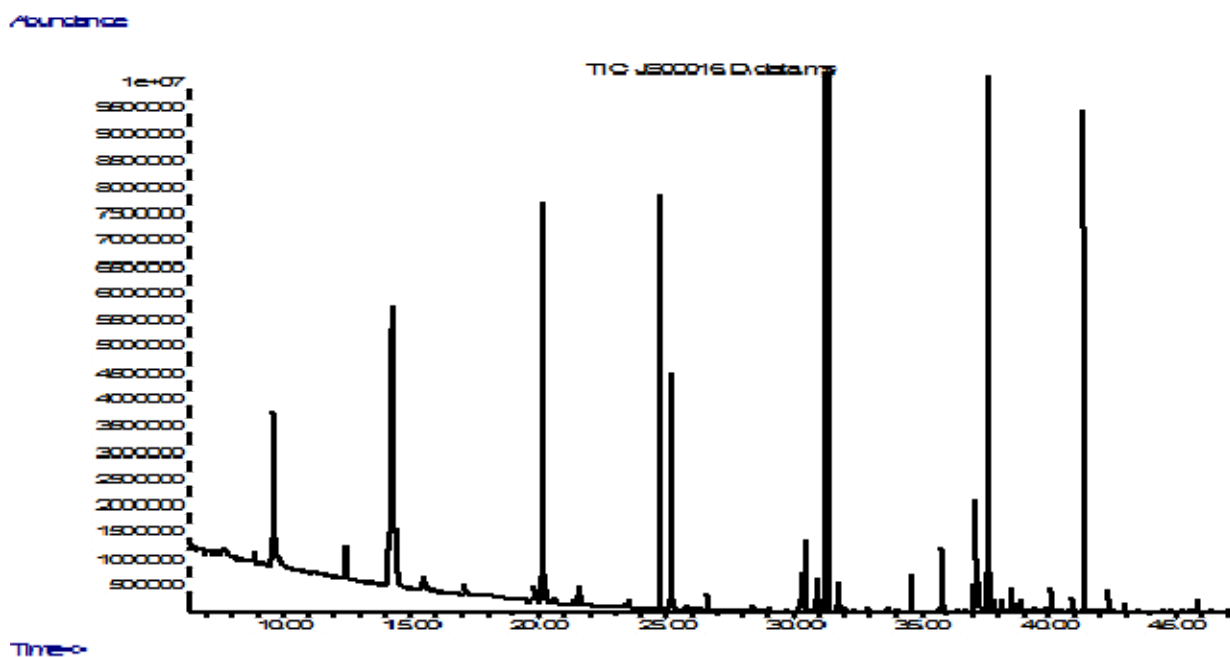
- 9,57 – etil acetat
- 14,25 – 3-metilbutanol (izoamil alkohol)
- 14,40 – 2-metilbutanol (amil alkohol)
- 17,08 – etil butirat
- 19,84 – 1-heksanol
- 20,11 – izoamil acetat
- 23,53 – heksanojska kislina
- 24,73 – etil heksanoat
- 25,21 – heksil acetat
- 30,50 – oktanojska kislina
- 30,91 – feniletanol
- 31,27 – etil oktanoat
- 34,59 – etil nonanoat
- 35,75 – 2-feniletal acetat
- 37,03 – dekanoska kislina
- 37,60 – etil dekanat
- 38,55 – izoamil oktanoat
- 38,73 – β -damascenon
- 41,32 – etil dodekanoat



Priloga G: Plinski kromatogram, na osnovi katerega smo kvalitativno določili aromatične snovi pri vzorcu 4

Legenda z retencijskimi časi (min):

- 9,57 – etil acetat
- 14,25 – 3-metilbutanol (izoamil alkohol)
- 14,40 – 2-metilbutanol (amil alkohol)
- 17,08 – etil butirrat
- 19,84 – 1-heksanol
- 20,11 – izoamil acetat
- 23,53 – heksanojska kislina
- 24,73 – etil heksanoat
- 25,21 – heksil acetat
- 30,50 – oktanojska kislina
- 30,91 – feniletanol
- 31,27 – etil oktanoat
- 34,59 – etil nonanoat
- 35,75 – 2-feniletil acetat
- 37,03 – dekanosjska kislina
- 37,60 – etil dekanooat
- 38,55 – izoamil oktanoat
- 38,73 – β -damascenon
- 41,32 – etil dodekanoat



Priloga H: Plinski kromatogram, na osnovi katerega smo kvalitativno določili aromatične snovi pri vzorcu 6

Legenda z retencijskimi časi (min):

- 9,57 – etil acetat
- 14,25 – 3-metilbutanol (izoamil alkohol)
- 14,40 – 2-metilbutanol (amil alkohol)
- 17,08 – etil butirat
- 19,84 – 1-heksanol
- 20,11 – izoamil acetat
- 23,53 – heksanojska kislina
- 24,73 – etil heksanoat
- 25,21 – heksil acetat
- 30,50 – oktanojska kislina
- 30,91 – feniletanol
- 31,27 – etil oktanoat
- 34,59 – etil nonanoat
- 35,75 – 2-feniletil acetat
- 37,03 – dekanajojska kislina
- 37,60 – etil dekanoat
- 38,55 – izoamil oktanoat
- 38,73 – β -damascenon
- 41,32 – etil dodekanoat

Priloga I: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mošta v vrenju pred inokulacijo z drugo startersko kulturo

parameter	1	1*	2	2*	3	3*	4	4*	5	5*	6	6*
alkohol (vol. %)	4,25	6,43	3,73	7,24	5,90	8,35	4,78	6,76	4,68	7,12	4,73	6,93
reducirajoči sladkorji (g/L)	126,25	92,25	134,14	78,99	100,81	62,11	117,3	87,81	120,22	81,79	120,07	82,31
skupne kisline (g/L)	7,54	7,41	7,51	7,41	7,6	7,52	6,97	7,98	8,07	7,95	8,03	7,83
hlapne kisline (g očetne kisline/L)	0,15	0,22	0,18	0,22	0,23	0,22	0,69	0,67	0,67	0,67	0,66	0,64
pH	3,16	3,24	3,16	3,25	3,19	3,26	3,30	3,26	3,22	3,27	3,23	3,26
jabolčna kislina (g/L)	3,6	3,5	3,7	3,41	3,75	3,41	1,8	3,61	3,73	3,50	3,70	3,54

Priloga J: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina

parameter	1	1*	2	2*	3	3*	4	4*	5	5*	6	6*
relativna gostota	0,9924	0,9924	0,9923	0,9931	0,9925	0,9928	0,9923	0,9933	0,9926	0,9928	0,9928	0,9930
alkohol (vol. %)	12,1	12,1	12,1	12,0	12,1	12,1	12,1	12,0	12,1	12,0	12,1	12,0
skupni ekstrakt (g/L)	21,4	21,4	21,5	23,0	22,0	22,1	21,2	23,3	21,9	22,3	22,5	22,7
ekstrakt po odbitku sladkorja (g/L)	20,4	19,9	20,2	20,0	19,1	19,9	20,0	20,1	20,4	20,1	20,6	20,0
reducirajoči sladkorji (g/L)	2,1	2,5	2,3	4,0	4,0	3,2	2,3	4,2	2,5	3,3	3,0	3,7
skupne kisline (g/L)	6,9	6,3	6,2	6,3	5,3	6,8	6,3	6,1	6,2	6,3	6,4	6,1
hlapne kisline (g/L)	0,50	0,54	0,54	0,51	0,54	0,50	1,09	1,02	1,11	1,00	1,07	0,99
pH	3,31	3,34	3,37	3,34	3,41	3,29	3,41	3,40	3,43	3,38	3,41	3,39
jabolčna kislina (g/L)	2,3	1,5	1,3	1,4	Neg.	2,3	Neg.	0,1	Neg.	0,4	0,3	0,3
citronska kislina (g/L)	0,14	0,15	0,15	0,15	0,14	0,15	0,13	0,14	0,13	0,14	0,14	0,15
mlečna kislina (g/L)	0,3	0,8	0,9	0,9	1,6	0,5	1,7	1,5	1,5	1,3	1,3	1,4
vinska kislina (g/L)	3,4	3,4	3,5	3,4	3,4	3,2	3,2	3,3	3,4	3,3	3,5	3,3

Priloga K: Rezultati povprečnih vrednosti fizikalno-kemijskih analiz posameznih paralelk

parameter	vzorci 1*-3*	vzorci 4*-6*	vzorci 1-3	vzorci 4-6
skupni žveplov dioksid (mg/L)	24,41	23,44	23,62	22,47
motnost (NTU)	15,67	11,30	19,35	13,87
intenziteta barve (420 nm)	0,188	0,175	0,178	0,185
skupne fenolne spojine (mg/L)	247,58	252,69	235,67	243,67
koncentracija DPPH (AOP vina) (mmol/L)	1,399	1,652	1,379	1,524
FAN (mg N/L)	30,36	50,50	13,78	26,34
dejanska pufna kapaciteta (mmol/L/pH)	35,26	35,17	35,07	37,35
skupne kisline (g/L)	5,59	5,79	5,97	6,02
kislodelujoče soli (g/L)	240	197	254	221
koncentracija vinske kisline; jabolčne kisline; mlečne kisline (g/L)	3,69 0,81 2,24	3,63 0,70 2,14	3,10 0,55 1,96	3,39 0,48 1,92
koncentracija glukoze; fruktoze; glicerola (g/L)	2,95 1,80 5,35	2,78 2,27 6,78	2,63 0,19 5,09	2,95 0,19 6,84
vsebnost aromatičnih spojin (ploščina kromatografskega vrha · 10 ⁻⁶)				
β-damascenon;	4,88	4,43	3,31	2,97
3-metilbutanol;	240,73	251,57	238,97	243,67
2-metilbutanol;	50,44	45,67	17,57	32,06
feniletanol;	29,36	31,81	44,89	33,82
1-heksanol;	7,08	7,67	5,79	9,00
etil acetat;	110,79	183,51	79,14	148,17
etil butirat;	8,92	4,84	6,37	5,87
izoamil acetat;	156,87	263,84	134,51	242,30
etil heksanoat;	304,65	221,57	207,67	237,81
heksil acetat;	74,91	118,81	52,64	121,86
etil oktanoat;	4446,44	2294,80	3242,63	2092,88
etil nonanoat;	50,57	38,33	38,37	23,67
2-feniletilacetat;	34,10	46,84	80,60	42,52
etil dekanoat;	3043,08	2744,46	3821,44	2334,78
izoamil oktanoat;	16,60	9,74	23,77	8,20
etil dodekanoat;	490,18	369,86	515,42	230,61
heksanojska kislina;	14,85	10,83	18,35	12,10
dekanojska kislina;	100,13	88,81	126,78	56,04
oktanojska kislina	107,28	92,13	173,22	85,51
ocenjevanje celokupne kakovosti pri senzorični analizi (točke 1-5)	1,8	3,0	2,6	2,7