

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mojca JENKO

**VPLIV KVASOVK NA VSEBNOSTI GLUTATIONA
IN AROMATIČNIH SPOJIN V VINIH SAUVIGNON**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Mojca JENKO

**VPLIV KVASOVK NA VSEBNOSTI GLUTATIONA IN
AROMATIČNIH SPOJIN V VINIH SAUVIGNON**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**INFLUENCE OF YEASTS ON THE CONTENTS OF
GLUTATHIONE AND AROMATIC COMPOUNDS IN
SAUVIGNON WINES**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Popravki:

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 6. 7. 2011 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje živilstvo. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Tatjana Košmerl in za somentorja prof. dr. Franc Čuš.

Poskusi in analize so bili izvedeni na Katedri za tehnologije, prehrano in vino Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, na Kmetijskem inštitutu Slovenije v Ljubljani ter v Ptujski kleti na Ptuju.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Košmerl

Somentor: prof. dr. Franc Čuš

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Tatjana KOŠMERL
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Franc ČUŠ
Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za sadjarstvo,
vinogradništvo in vinarstvo

Član: prof. dr. Marin BEROVIČ
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Doktorandka:
Mojca Jenko

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dd
DK UDK 663.252.4:663.221:582.282.23:543.61(043)=163.6
KG vino/sauvignon/alkoholna fermentacija/starterske kulture/kvasovke/
fermentacijska kinetika/kemijska sestava/glutation/hidroksicimetne kisline/
aromatične spojine/senzorične lastnosti
AV JENKO, Mojca, univ. dipl. inž. živil. tehnol.
SA KOŠMERL, Tatjana (mentorica)/ČUŠ, Franc (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij
Bioznanosti, področje živilstvo
LI 2013
IN VPLIV KVASOVK NA VSEBNOSTI GLUTATIONA IN AROMATIČNIH
SPOJIN V VINIH SAUVIGNON
TD Doktorska disertacija
OP XVI, 166 str., 34 pregl., 30 sl., 13 pril., 194 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V raziskavi smo preverili vpliv čistosti starterske kulture, različnih komercialnih sevov kvasovk in njihovih kombinacij, ter pogojev alkoholne fermentacije (AF) (temperatura in delovni volumen) na vsebnosti osnovnih kemijskih parametrov, prostega aminokislinskega dušika (FAN), glutaciona (GSH), hidroksicimetnih kislin (HCK) in glavnih aromatičnih spojin v vinu sorte sauvignon (*Vitis vinifera* L.) ter s tem na njegovo senzorično kakovost. V raziskavo smo vključili tri letnike (2009-2011) mošta sauvignon iz vinorodne dežele Podravje, vinifikacije pa smo izvedli v različnih delovnih volumnih (mikro- in makrovinifikacije) in pri različnih temperaturah (nižje in višje) z uporabo 13 izbranih starterskih kultur kvasovk. Posamezne spojine v moštu in vinu smo kvantitativno določili z uporabo HPLC-FLD (GSH), HPLC-DAD (HCK), GC-MS (hlapni tioli) in HS-SPME-GC-MS (metoksipirazini). Čistost starterskih kultur je pomembno vplivala na fermentacijsko kinetiko, tvorbo hlapnih kislin (HK) in ohranjanje vsebnosti GSH v vinih. Potrdili smo značilen vpliv starterskih kultur na vsebnost HK, FAN, HCK, GSH in hlapnih tiolov v vinu. Starterska kultura SK6 je značilno tvorila večje vsebnosti HK, izkazala najmanjše potrebe po dušiku in ohranila največje vsebnosti HCK v vinih. Starterska kultura SK10 je v vinih ohranila značilno največje vsebnosti GSH. Sposobnost sproščanja hlapnih tiolov pri posameznih starterskih kulturah je bila v veliki meri odvisna od temperature AF, saj smo predvsem pri višjih temperaturah AF pridelali vina z večjimi vsebnostmi 4-merkapt-4-metil-pentan-2-ona (4MMP) in 3-merkapt-3-heksan-1-ola (3MH), ter manjšimi vsebnostmi 3-merkapt-3-heksil acetata (3MHA). Vina z večjimi vsebnostmi hlapnih tiolov, predvsem 4MMP, so bila večinoma višje ocenjena za senzorični lastnosti tropska aroma in celokupna kakovost, kar smo potrdili predvsem pri vinih SK6, SK7, SK11, SK12, SK13. Višje temperature AF so se odrazile s hitrejšo fermentacijsko kinetiko kvasovk ter posledično manjšimi vsebnostmi GSH in HCK v pridelanih vinih. Hitro znižanje temperature v začetni fazi AF je negativno vplivalo na presnovo starterskih kultur, kar se je odrazilo z zmanjšanjem vsebnosti HCK in GSH kot tudi vseh treh hlapnih tiolov v vinih. Določene lastnosti posameznih starterskih kultur so se izrazile ne glede na uporabljen delovni volumen fermentorja, temperaturo AF ali letnik mošta, s čimer smo potrdili ponovljivost njihovih lastnosti tako v mikrovinifikacijskih kot v industrijskih merilih. Potrdili smo, da niti starterske kulture, niti delovni volumen in temperatura AF ne vplivajo na vsebnosti metoksipirazinov v vinu. Na osnovi končnih rezultatov vsebnosti GSH in hlapnih tiolov v vinih smo kot najbolj primerni starterski kulturi za pridelavo vina sauvignon določili SK6 in SK10. Z njuno primerjavo v vinifikacijah zadnjega dela poskusa smo v vinih SK6 določili predvsem večje vsebnosti 4MMP in 3MHA, kar se je odrazilo z intenzivnejšo tropsko aromo in boljšo celokupno kakovostjo teh vin.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dd
DC UDC 663.252.4:663.221:582.282.23:543.61(043)=163.6
CX wine/sauvignon/alcoholic fermentation/starter cultures/yeasts/fermentation kinetics/chemical composition/glutathione/hidroxicinnamic acids/aromatic compounds/sensory properties
AU JENKO, Mojca
AA KOŠMERL, Tatjana (supervisor)/ČUŠ, Franc (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Postgraduate Study of Biosciences, field Food Science and Technology
PY 2013
TI INFLUENCE OF YEASTS ON THE CONTENTS OF GLUTATHIONE AND AROMATIC COMPOUNDS IN SAUVIGNON WINES
DT Doctoral dissertation
NO XVI, 166 p., 34 tab., 30 fig., 13 ann., 194 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The research was conducted to determine the influence of yeast starter culture purity, different commercial wine yeast strains and their combinations (mixed cultures), and also to examine the conditions of alcoholic fermentation (AF) (temperature and working volume) influencing the main chemical parameters, free amino nitrogen (FAN), content of GSH, hydroxycinnamic acids (HCK) and the main aromatic compounds in sauvignon blanc wines (*Vitis vinifera* L.) and thereby its sensory quality. Three vintages (2009-2011) of sauvignon must from the winegrowing region of Podravje were included in the research; in addition, the vinifications were performed in different working volumes (micro- and macrovinifications) and at different fermentation temperatures (lower and higher), using 13 selected yeast starter cultures. Moreover, individual must and wine compounds were quantified, using HPLC-FLD (GSH), HPLC-DAD (HCK), GC-MS (volatile thiols) and HS-SPME-GC-MS (methoxypyrazines). Starter culture purity greatly influenced the fermentation kinetics and consequently lower contents of GSH and HCK in produced wines. Rapid decrease of the fermentation temperature in the initial phase of AF had a negative effect on yeast metabolism reflecting in lower contents of HCK, GSH and all three volatile thiols in wines. Certain characteristics of individual starter cultures were expressed irrespective of the working volume, temperature or vintage, confirming repeatability of their characteristics in both microvinification and industrial scale. We confirmed that neither the yeast starter culture nor the working volume and nor the fermentation temperature affected the content of methoxypyrazines in wines. Based on the final contents of GSH and volatile thiols in wines, the starter cultures SK6 and SK10 were confirmed to be the most appropriate for sauvignon wine production. The comparison between them in the last part of the research determined wines SK6 having higher contents of 4MMP and 3MHA, which resulted in intense tropical aroma and better overall quality of these wines.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	X
	Kazalo slik	XII
	Kazalo prilog	XV
	Okrajšave in simboli	XVI
1	UVOD	1
1.1	UTEMELJITEV PREDLAGANE RAZISKAVE	1
1.2	NAMEN DELA	2
1.3	DELOVNE HIPOTEZE	3
2	PREGLED OBJAV	4
2.1	VINSKE KVASOVKE	4
2.1.1	Starterske kulture kvasovk rodu <i>Saccharomyces</i>	4
2.1.1.1	Čistost komercialnih starterskih kultur	5
2.1.2	Mešane starterske kulture kvasovk rodov <i>Saccharomyces</i> in <i>ne-Saccharomyces</i>	6
2.1.3	Mešane starterske kulture kvasovk rodu <i>Saccharomyces</i>	8
2.1.4	Hibridni sevi kvasovk	9
2.1.5	Kvasovke mutanti	12
2.2	VPLIV INTERAKCIJ MED SESTAVINAMI MOŠTA IN KVASOVKAMI TER POGOJEV ALKOHOLNE FERMENTACIJE NA KEMIJSKO SESTAVO VINA	13
2.2.1	Faze rasti kvasovk in fermentacijska kinetika	13
2.2.1.1	Dejavniki, ki vplivajo na rast kvasovk in fermentacijsko kinetiko	14
2.2.2	Presnova sladkorja	15
2.2.3	Presnova dušikovih spojin	17
2.2.4	Presnova žveplovih spojin	19
2.2.5	Tvorba očetne kisline	20
2.2.6	Fenolne spojine v vinu	22
2.2.6.1	Hidroksicimetne kisline	22
2.3	NOSILCI SORTNE AROME VINA SAUVIGNON TER VPLIV KVASOVK NA NJIHOVO VSEBNOST V VINU	24
2.3.1	Metokspirazini	24

2.3.2	Hlapni tioli	26
2.3.2.1	Vpliv kvasovk na vsebnost hlapnih tiolov v vinu	27
2.3.2.2	Drugi dejavniki, ki vplivajo na vsebnost hlapnih tiolov v vinu	30
2.3.2.4	Analitske metode za določanje hlapnih tiolov v vinu	30
2.4	GLUTATION V MOŠTU IN VINU TER VPLIV KVASOVK IN DRUGIH DEJAVNIKOV VINIFIKACIJE NA NJEGOVO VSEBNOST	31
2.4.1	GSH v grozdju in moštu	32
2.4.2	Vloga GSH v vinarstvu	33
2.4.2.1	Antioksidativna aktivnost GSH v moštu in vinu	33
2.4.2.2	Vpliv GSH na aromatične spojine v vinu	34
2.4.3	Dejavniki, ki vplivajo na vsebnost GSH v vinu	34
2.4.4	Analitske metode za določanje GSH	35
3	MATERIAL IN METODE	36
3.1	ZASNOVA POSKUSA	36
3.1.1	Poskus 1	36
3.1.2	Poskus 2	37
3.1.3	Poskus 3	38
3.1.4	Poskus 4	40
3.1.5	Poskus 5	41
3.2	MATERIAL	43
3.2.1	Mošt	43
3.2.2	Starterske kulture kvasovk	43
3.2.2.1	Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusu 1	43
3.2.2.2	Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusu 2	44
3.2.2.3	Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusih 3 in 4	45
3.2.2.4	Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusu 5	45
3.2.3	Kemikalije	46
3.2.4	Aparature in oprema	47
3.3	METODE	48
3.3.1	Določanje osnovnih kemijskih parametrov vina in mošta	48
3.3.1.1	Določanje sladkorne stopnje mošta	48
3.3.1.2	Določanje reducirajočih sladkorjev	48
3.3.1.3	Določanje skupnih kislin	48
3.3.1.4	Določanje pH	49
3.3.1.5	Določanje hlapnih kislin	49

3.3.1.6	Določanje dejanskega alkohola.....	49
3.3.2	Določanje vsebnosti prostega aminokislinskega dušika	50
3.3.3	Določanje vsebnosti hidroksicimetnih kislin	50
3.3.4	Določanje vsebnosti hlapnih tiolov	51
3.3.4.1	Ekstrakcija hlapnih tiolov	51
3.3.4.2	Pogoji za kromatografijo.....	52
3.3.4.3	Validacija metode	52
3.3.5	Določanje vsebnosti metokspirazinov	53
3.3.5.1	Priprava vzorcev	53
3.3.5.2	Pogoji ekstrakcije in kromatografije HS-SPME-GC-MS	53
3.3.5.3	Validacija metode	54
3.3.6	Določanje vsebnosti glutaciona	55
3.3.6.1	Priprava vzorcev	55
3.3.6.2	Pogoji za derivatizacijo in kromatografijo HPLC-FLD.....	55
3.3.6.3	Validacija metode	56
3.4	MIKROBIOLOŠKE ANALIZE	56
3.4.1	Izolacija čistih kultur komercialnih kvasovk	56
3.4.2	Spremljanje mikrobne populacije med AF	57
3.5	SPREMLJANJE ODDANEGA CO ₂ MED ALKOHOLNO FERMENTACIJO.....	57
3.6	SENZORIČNE ANALIZE	57
3.6.1	Test razlikovanja z uporabo razvrščanja vzorcev	57
3.6.2	Deskriptivna senzorična analiza	58
3.7	STATISTIČNE ANALIZE	58
3.7.1	ANOVA	58
3.7.2	Analiza z metodo glavnih komponent (PCA)	58
3.7.3	Linearna diskriminantna analiza (LDA)	59
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	60
4.1	POSKUS 1	61
4.1.1	Osnovni kemijski parametri, FAN in HCK v moštu	62
4.1.2	Osnovni kemijski parametri vina in FAN	63
4.1.3	Hidroksicimetne kisline	64
4.1.3.1	Prvi del poskusa 1	65
4.1.3.2	Drugi del poskusa 1	66
4.1.4	Spremljanje vsebnosti glutaciona	67

4.1.4.1	Prvi del poskusa 1	67
4.1.4.2	Drugi del poskusa 1	69
4.1.5	Vsebnosti hlapnih tiolov v vinih	71
4.1.5.1	Prvi del poskusa 1	71
4.1.5.2	Drugi del poskusa 1	72
4.1.6	Vsebnosti metokspirazinov v vinih	74
4.1.7	Analiza glavnih osi (PCA) in linearna diskriminantna analiza (LDA) poskusa 1	75
4.1.7.1	PCA in LDA prvega dela poskusa 1	76
4.1.7.2	PCA in LDA drugega dela poskusa 1	77
4.1.8	Razprava poskusa 1	78
4.2	POSKUS 2	80
4.2.1	Osnovni kemijski parametri, FAN in HCK v moštu	81
4.2.2	Fermentacijska kinetika	81
4.2.3	Osnovni kemijski parametri, FAN in HCK v vinu	83
4.2.4	Spremljanje vsebnosti glutaciona	85
4.2.5	Aromatične spojine vina	86
4.2.5.1	Vsebnosti hlapnih tiolov v vinih	86
4.2.5.2	Vsebnosti metokspirazinov v vinih.....	87
4.2.6	Mikrobiološka analiza	88
4.2.7	Senzorična analiza	88
4.2.8	PCA in LDA poskusa 2	88
4.2.9	Razprava poskusa 2	90
4.3	POSKUS 3	91
4.3.1	Osnovni kemijski parametri in FAN v moštu	92
4.3.2	Fermentacijska kinetika	92
4.3.3	Osnovni kemijski parametri vina, FAN in HCK	94
4.3.4	Spremljanje vsebnost glutaciona	97
4.3.5	Vsebnosti hlapnih tiolov v vinih	98
4.3.6	Senzorična analiza	101
4.3.7	PCA in LDA poskusa 3	103
4.3.8	Razprava poskusa 3	105
4.4	POSKUS 4	107
4.4.1	Osnovni kemijski parametri vina in HCK	107
4.4.2	Vsebnost glutaciona v vinu	109

4.4.3	Vsebnost aromatičnih spojin	111
4.4.3.1	Vsebnost hlapnih tiolov v vinih	111
4.4.3.2	Vsebnosti metokspirazinov v vinih	113
4.4.4	Senzorična analiza	113
4.4.5	PCA in LDA poskusa 4	115
4.4.6	Razprava poskusa 4	117
4.5	POSKUS 5	118
4.5.1	Osnovni kemijski parametri mošta	119
4.5.2	Fermentacijska kinetika	119
4.5.3	Osnovni kemijski parametri, FAN in HCK v vinih	120
4.5.4	Vsebnost glutaciona v vinu	122
4.5.5	Vsebnosti hlapnih tiolov v vinih	122
4.5.6	Senzorična analiza	124
4.5.7	PCA in LDA poskusa 5	125
4.5.8	Razprava poskusa 5	127
5	SKLEPI	129
6	POVZETEK	135
6.1	POVZETEK.....	135
6.2	SUMMARY	141
7	VIRI	148
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Poskusi, letniki pridelave mošta, prostornine in temperature alkoholnih fermentacij ter števila in oznake uporabljenih starterskih kultur kvasovk	36
Preglednica 2:	Kemijski parametri moštov sorte sauvignon, letnikov 2009, 2010 in 2011, uporabljenih v poskusih	43
Preglednica 3:	Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusu 1	44
Preglednica 4:	Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusu 2	44
Preglednica 5:	Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusih 3 in 4	45
Preglednica 6:	Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusu 5	45
Preglednica 7:	Kemikalije, uporabljene v metodah poskusov	46
Preglednica 8:	Aparature in oprema, uporabljena v metodah poskusov	47
Preglednica 9:	Pogoji za kromatografijo GC-MS za določanje hlapnih tiolov v vinu	52
Preglednica 10:	Pogoji uporabe SPME vlaken za določanje metoksipirazinov v vinu	53
Preglednica 11:	Pogoji za kromatografijo HS-SPME-GC-MS za določanje metoksipirazinov v vinu	54
Preglednica 12:	Območja linearnosti, kvadrati korelacijskih koeficientov (R^2), meje zaznav (LOD) in meje določitev (LOQ) metode HS-SPME-GC-MS za določanje vsebnosti metoksipirazinov v vinu	55
Preglednica 13:	Vsebnosti reducirajočih sladkorjev (RS), hlapnih kislin (HK) in prostega aminokislinskega dušika (FAN) v moštih iz poskusa 1	62
Preglednica 14:	Vsebnost hidroksicimetnih kislin (HCK) v moštih iz poskusa 1	63
Preglednica 15:	Vsebnosti reducirajočih sladkorjev (RS), hlapnih kislin (HK) in prostega aminokislinskega dušika (FAN) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s prečiščenimi in neprečiščenimi starterskimi kulturami SK1–SK5	63
Preglednica 16:	Vsebnosti hidroksicimetnih kislin (HCK) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s prečiščenimi in neprečiščenimi starterskimi kulturami SK1–SK5	65
Preglednica 17:	Vsebnosti glutaciona (GSH) v moštih in vinih v različnih fazah vinifikacij s prečiščenimi in neprečiščenimi starterskimi kulturami SK1–SK5. Začetna koncentracija GSH v moštu je bila 40 mg/L	67
Preglednica 18:	Vsebnosti metoksipirazinov 3-izobutil-2-metoksipirazina (IBMP) in 3-izopropil-2-metoksipirazina (IPMP) v vinih po končani alkoholni fermentaciji z neprečiščenimi starterskimi kulturami SK1-SK5	74
Preglednica 19:	Vsebnosti reducirajočih sladkorjev (RS), alkohola, skupnih kislin (SK), hlapnih kislin (HK), pH in prostega aminokislinskega dušika (FAN) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6-SK9	83
Preglednica 20:	Vsebnosti hidroksicimetnih kislin (HCK) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6-SK9	84

Preglednica 21:	Vsebnosti glutaciona (GSH) v vinih v različnih fazah alkoholne fermentacije s starterskimi kulturami SK6-SK9	85
Preglednica 22:	Vsebnosti metoksipirazinov 3-izobutil-2-metoksipirazina (IBMP) in 3-izopropil-2-metoksipirazina (IPMP) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6-SK9	87
Preglednica 23:	Vsota rangov posameznih senzoričnih lastnosti za vina SK6-SK9	88
Preglednica 24:	Vsebnosti reducirajočih sladkorjev (RS), alkohola, skupnih kislin (SK), hlapnih kislin (HK), pH in prostega aminokislinskega dušika (FAN) v vinih, po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK7 in SK10-SK13 pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi	95
Preglednica 25:	Vsebnosti hidroksicimetnih kislin (HCK) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK7 in SK10-SK13 pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi	96
Preglednica 26:	Vsebnosti glutaciona (GSH) v vinih v različnih fazah alkoholne fermentacije s starterskimi kulturami SK6, SK7 in SK10, SK11-SK13 pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi	97
Preglednica 27:	Povprečja točk posameznih senzoričnih lastnosti za vina SK6, SK7 in SK10-SK13, pridelana pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi	101
Preglednica 28:	Vsebnosti reducirajočih sladkorjev (RS), alkohola, skupnih kislin (SK), hlapnih kislin (HK) in pH v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11 pri nižji (25 L) in višji (2500 L) temperaturi AF	108
Preglednica 29:	Vsebnosti hidroksicimetnih kislin (HCK) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11 pri nižji (25 L) in višji (2500 L) temperaturi	109
Preglednica 30:	Vsebnosti metoksipirazinov (IBMP, IPMP) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11 pri nižji (25 L) in višji (2500 L) temperaturi	113
Preglednica 31:	Povprečja točk posameznih senzoričnih lastnosti za vina SK6, SK10 in SK11, pridelana pri nižji (25 L) in višji (2500 L) temperaturi alkoholne fermentacije	114
Preglednica 32:	Vsebnosti reducirajočih sladkorjev (RS), alkohola, skupnih kislin (SK), hlapnih kislin (HK), pH in FAN v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6 in SK10 pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi AF	120
Preglednica 33:	Vsebnosti hidroksicimetnih kislin (HCK) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6 in SK10 pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi AF	121
Preglednica 34:	Povprečja točk posameznih senzoričnih lastnosti za vina SK6 in SK10, pridelana pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi AF	124

KAZALO SLIK

Slika 1:	Shematski prikaz postopka hibridizacije kvasovk (Hybrid wine yeasts, 2013)	10
Slika 2:	Faze rasti kvasovk vrste <i>S. cerevisiae</i> med alkoholno fermentacijo (Zamora, 2009: 5)	13
Slika 3:	Shematski prikaz pretvorbe glukoze v etanol pri kvasovkah vrste <i>S. cerevisiae</i> (Aranda in sod., 2011)	16
Slika 4:	Shematski prikaz presnove žvepla pri kvasovkah vrste <i>S. cerevisiae</i> (Fugelsang in Edwards, 2007: 24)	19
Slika 5:	Strukturni formuli 3-izobutil-2-metoksipirazina (IBMP) (1) in 3-izopropil-2-metoksipirazina (IPMP) (2) (El-Sayed, 2012)	25
Slika 6:	Tvorba hlapnih tiolov iz njihovih prekurzorjev. Pretvorba posameznega prekurzorja (R-4MMP, R-3MH; R – cistein ali glutation) v hlapni tiol: 4-merkapt-4-metilpentan-2-on (4MMP) (1) in 3-merkapt-4-metilpentan-2-on (3MH) (2) ter pretvorba 3MH v 3-merkapt-4-metilpentan-2-on acetat (3MHA) (3)	28
Slika 7:	Strukturni formuli glutaciona (GSH) (1) in glutation disulfida (GSSG) (2) (Glutathione, 2011)	31
Slika 8:	Shema poskusa 1 (SK1-SK5 – starterske kulture kvasovk (glej preglednico 3))	37
Slika 9:	Shema poskusa 2 (SK6-SK9 – starterske kulture kvasovk (glej preglednico 4))	38
Slika 10:	Shema poskusa 3 (SK6, SK7, SK10-SK13 – starterske kulture kvasovk (glej preglednico 5))	39
Slika 11:	Shema poskusa 4 (SK6, SK10, SK11 – starterske kulture kvasovk (glej preglednico 5))	40
Slika 12:	Shema poskusa 5 (SK6, SK10 – starterski kulturi kvasovk (glej preglednico 6))	42
Slika 13:	Deleži GSH (%) v fermentorjih s prečiščenimi starterskimi kulturami kvasovk v različnih fazah alkoholne fermentacije (AF) in zorenja vina na drožeh*	68
Slika 14:	Deleži GSH (%) v fermentorjih z neprečiščenimi starterskimi kulturami kvasovk v različnih fazah alkoholne fermentacije (AF)	70
Slika 15:	Vsebnosti hlapnih tiolov 4-merkapt-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (1), 3-merkapt-4-metilpentan-2-ona (3MH) (2) in 3-merkapt-4-metilpentan-2-on acetata (3MHA) (3) v vinih, pridelanih s prečiščenimi starterskimi kulturami SK1-SK5, po 10-mesečnem zorenju vina na drožeh	71
Slika 16:	Vsebnosti hlapnih tiolov 4-merkapt-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (1), 3-merkapt-4-metilpentan-2-ona (3MH) (2) in 3-merkapt-4-metilpentan-2-on acetata (3MHA) (3) v vinih, pridelanih z neprečiščenimi starterskimi kulturami SK1-SK5, po trimesečnem zorenju vina na drožeh	73
Slika 17:	Projekcija podatkov 1. dela poskusa 1, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama (LDA)	76
Slika 18:	Projekcija podatkov 2. dela poskusa 1, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama (LDA)	77

Slika 19:	Količina sproščenega CO ₂ (g/L) med alkoholno fermentacijo s kulturami SK6-SK9	82
Slika 20:	Vsebnosti hlapnih tiolov 4-merkapt-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (1), 3-merkaptotheksan-1-ola (3MH) (2) in 3-merkaptotheksil acetata (3MHA) (3) v vinih, po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6-SK9; vrednosti so prikazane kot $\bar{x} \pm SO$ (povprečje \pm standardni odklon); a, b, c – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$)	86
Slika 21:	Projekcija podatkov poskusa 2, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama (LDA)	89
Slika 22:	Sladkorna stopnja mošta (°Oe) med alkoholno fermentacijo s starterskimi kulturami SK6 (■) in SK10 (▲) (1), SK11 (●) in SK12 (◆) (2), SK7 (★) in SK13 (▼) (3), pri nižji oz. kontrolirani (modra barva) in višji oz. kletni (rdeča barva) temperaturi alkoholne fermentacije	93
Slika 23:	Vsebnosti hlapnih tiolov 4-merkapt-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (1), 3-merkaptotheksan-1-ola (3MH) (2) in 3-merkaptotheksil acetata (3MHA) (3) v vinih, po končani alkoholni fermentaciji pri nižji (modri stolpci) in višji (rdeči stolpci) temperaturi s starterskimi kulturami SK6, SK7 in SK10-SK13	99
Slika 24:	Projekcija podatkov poskusa 3, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama (LDA); ▲ – višja temperatura alkoholne fermentacije, ■ – nižja temperatura alkoholne fermentacije	104
Slika 25:	Vsebnosti glutaciona (GSH) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11 pri nižji temperaturi in v manjši prostornini (modri stolpci – vrednosti so prikazane kot povprečja dveh paralelk) ter višji temperaturi in v večji prostornini (rdeči stolpci)	110
Slika 26:	Vsebnosti hlapnih tiolov 4-merkapt-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (1), 3-merkaptotheksan-1-ola (3MH) (2) in 3-merkaptotheksil acetata (3MHA) (3) v vinih, po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11 pri nižji temperaturi in manjši prostornini (modri stolpci – vrednosti so prikazane kot povprečja dveh paralelk) ter višji temperaturi in večji prostornini (rdeči stolpci)	111
Slika 27:	Projekcija podatkov poskusa 4, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama (LDA); ▲ – višja temperatura alkoholne fermentacije, ■ – nižja temperatura alkoholne fermentacije	116
Slika 28:	Sladkorna stopnja mošta (°Oe) med alkoholno fermentacijo s starterskima kulturama SK6 (■) in SK10 (▲) pri nižji oz. kontrolirani (modra barva) in višji oz. kletni (rdeča barva) temperaturi alkoholne fermentacije	119
Slika 29:	Vsebnosti* hlapnih tiolov 4-merkapt-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (1), 3-merkaptotheksan-1-ola (3MH) (2) in 3-merkaptotheksil acetata (3MHA) (3) v vinih, po končani alkoholni fermentaciji pri nižji (modri stolpci) in višji (rdeči stolpci) temperaturi s starterskimi kulturami SK6 in SK10. *določene v združenih paralelkah treh ponovitev	123

Slika 30: Projekcija podatkov poskusa 5, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama (LDA); ▲ – višja temperatura alkoholne fermentacije, ▲ – nižja temperatura alkoholne fermentacije

126

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Lastnosti posameznih komercialnih sevov kvasovk, uporabljenih v poskusu
- Priloga B: Osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih analiz 1. dela poskusa 1
- Priloga C: Korelacijski koeficienti med spremenljivkami 1. dela poskusa 1, uporabljenimi v LDA
- Priloga D: Osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih analiz 2. dela poskusa 1
- Priloga E: Korelacijski koeficienti med spremenljivkami 2. dela poskusa 1, uporabljenimi v LDA
- Priloga F: Osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih in senzoričnih analiz poskusa 2
- Priloga G: Korelacijski koeficienti med spremenljivkami poskusa 2, uporabljenimi v LDA
- Priloga H: Osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih in senzoričnih analiz poskusa 3
- Priloga I: Korelacijski koeficienti med spremenljivkami poskusa 3, uporabljenimi v LDA
- Priloga J: Osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih in senzoričnih analiz poskusa 4
- Priloga K: Korelacijski koeficienti med spremenljivkami poskusa 4, uporabljenimi v LDA
- Priloga L: Osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih in senzoričnih analiz poskusa 5
- Priloga M: Korelacijski koeficienti med spremenljivkami poskusa 5, uporabljenimi v LDA

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AF	alkoholna fermentacija
CE LIF	kapilarna elektroforeza in detekcija z lasersko inducirano fluorescenco
CFU	enote, ki tvorijo kolonije
ESI-MS	masna spektrometrija z ionizacijo z elektrorazprševanjem
FAN	prosti aminokislinski dušik
GC-MS	plinska kromatografija z masnospektrometričnim detektorjem
GRP	grozdni reakcijski produkt
GSH	glutation
HCK	hidroksicimetne kisline
HK	hlapne kisline
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HPLC-FD	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti s fluorescenčno detekcijo
HS-SPME	mikroekstrakcija na trdno fazo iz plinske faze vzorca
IBMP	3-izobutil-2-metoksipirazin
IPMP	3-izopropil-2-metoksipirazin
LDA	linearna diskriminantna analiza
LOD	meja zaznave
LOQ	meja določitve
MPZ	metoksipirazini
PCA	metoda glavnih komponent
Poskus 1	mikroviniifikacije (120 mL) mošta sauvignon (letnik 2009) s prečiščenimi in neprečiščenimi starterskimi kulturami SK1-SK5 pri temperaturi 15 °C
Poskus 2	mikroviniifikacije (3 L) mošta sauvignon (letnik 2009) s starterskimi kulturami SK6-SK9 pri temperaturi 15 °C
Poskus 3	mikroviniifikacije (35 L) mošta sauvignon (letnik 2010) s starterskimi kulturami SK6, SK7, SK10-SK13 pri dveh različnih temperaturah
Poskus 4	mikroviniifikacije (25 L) in makroviniifikacije (2500 L) mošta sauvignon (letnik 2010) s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11 pri dveh različnih temperaturah
Poskus 5	mikroviniifikacije (35 L) mošta sauvignon (letnik 2011) s starterskima kulturama SK6 in SK10 pri dveh različnih temperaturah
RS	reducirajoči sladkorji
R^2	kvadrat korelacijskega koeficienta
SK	skupne kisline
SK1-SK13	oznake starterskih kultur
SPME	mikroekstrakcija na trdno fazo
UPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti
UPLC-PAD	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti z detektorjem z nizom fotodiod
3MH	3-merkaptotheksan-1-ol
3MHA	3-merkaptotheksil acetat
4MMP	4-merkaptot-4-metil-pentan-2-on

1 UVOD

1.1 UTEMELJITEV PREDLAGANE RAZISKAVE

Vinske kvasovke igrajo pomembno vlogo pri vinifikaciji grozdnega mošta, saj v procesu alkoholne fermentacije (AF) pretvorijo grozdni sladkor v etanol in ogljikov dioksid, obenem pa tvorijo številne hlapne presnovke, ki oblikujejo senzorične lastnosti pridelanega vina. V vinarstvu se za zagotavljanje sprejemljive fermentacijske kinetike in kakovosti vina za izvedbo AF uporabljajo predvsem komercialno dostopne, suhe, aktivne starterske kulture kvasovk rodu *Saccharomyces* (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Krieger-Weber, 2009). Z namenom izboljšanja senzorične kakovosti in kompleksnosti arome vina so raziskave v zadnjih nekaj letih usmerjene predvsem v izboljšanje specifičnih lastnosti starterskih kultur kvasovk. Številne kvasovke rodu *ne-Saccharomyces* lahko v kombinaciji s kvasovkami rodu *Saccharomyces* prispevajo k večji kompleksnosti vina (Rojas in sod., 2003; Bely in sod., 2008; Comitini in sod., 2011; Ciani in Comitini, 2011; Andorra in sod., 2012; Maturano in sod., 2012; Sadoudi in sod., 2012). Izboljšanje senzorične kakovosti vina lahko dosežemo tudi z uporabo različnih kombinacij komercialnih sevov kvasovk rodu *Saccharomyces* (Howell in sod., 2006; King in sod., 2010) kot tudi z uporabo kvasovk z izboljšanimi lastnostmi, kot so hibridi in mutanti (Gonzalez in sod., 2003; Belloch in sod., 2008; Querol in Bond, 2009; Gangl in sod., 2009; Cadière in sod., 2011; Gamero in sod., 2011; Jenko in sod., 2011). Presnova posameznih starterskih kultur je v veliki meri odvisna od sestave mošta in pogojev med AF. Ena od pomembnejših parametrov mošta, ki vplivata na fermentacijsko kinetiko kvasovk, sta vsebnost sladkorjev in dušika. Visoke vsebnosti sladkorjev v moštu lahko povzročajo osmotski stres pri kvasovkah, kar se lahko odrazi z upočasnjeno ali zaustavljeno AF (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Aranda in sod., 2011) in povečano tvorbo hlapnih kislin (Erasmus in sod., 2004). Različni sevi kvasovk imajo zelo različne potrebe po dušiku med AF (Henschke in Jiranek, 1993; Julien in sod., 2000; Bell in Henschke, 2005), prisotnost neprimernih (prevelikih ali premajhnih) vsebnosti dušika v moštu pomembno vpliva predvsem na fermentacijsko kinetiko ter tvorbo hlapnih kislin in H₂S (Henschke in Jiranek, 1993; Spiropoulos in sod., 2000; Vilanova in sod., 2007). Eden od pomembnejših pogojev AF je temperatura AF. Vpliva na fermentacijsko kinetiko kvasovk in s tem na presnovo posameznih sestavin v moštu. Pri višjih temperaturah je fermentacijska kinetika in s tem tudi asimilacija dušika pri kvasovkah hitrejša, obenem pa se poveča toksičnost etanola in njegovo izhlapevanje zaradi intenzivnega sproščanja CO₂. Hkrati je pri višjih temperaturah večje tudi izhlapevanje drugih hlapnih spojin, ki so ključnega pomena za senzorično kakovost predvsem belih vin (Torija in sod., 2003; Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Aranda in sod., 2011). Za ohranitev hlapnih aromatičnih spojin v belih vinih zato večinoma uporabljamo nižje temperature AF, ki pa lahko privedejo v upočasnjeno ali zaustavljeno AF (Torija in sod., 2003; Aranda in sod., 2011).

Za tipično aromo vina sauvignon, ki je tako v Sloveniji kot v svetu ena od najbolj priljubljenih belih sort, so odgovorni predvsem metokspirazini in hlapni tioli. Metokspirazini izvirajo iz grozdja in dajejo vinu aromo po zelenem (zelena paprika, paradižnikovi listi, šparglji, pušpan). Njihova koncentracija v moštu in vinu je odvisna predvsem od klimatskih razmer, sorte in zrelosti grozdja ter drugih vinogradniških dejavnikov (Allen in sod., 1991; Lacey in sod., 1991; Marais, 1994; Sala in sod., 2005; Šuklje in sod., 2012). Najpomembnejši hlapni tioli v vinu so 4-merkapt-4-metil-pentan-2-on (4MMP), 3-merkaptohexan-1-ol (3MH) in 3-merkaptohexil acetat (3MHA) in dajejo vinu aromo po tropskem sadju (pasijonka, grenivka, kosmulja, guava). Hlapna tiola 4MMP in 3MH sta v grozdju in moštu prisotna v obliki nehlapnih, nearomatičnih prekurzorjev (cisteinskih in glutationskih) in se sprostita šele med AF s pomočjo liaz vinskih kvasovk, 3MHA pa nastane z esterifikacijo 3MH s pomočjo alkohol acetyltransferaz vinskih kvasovk (Darriet in sod., 1995; Tominaga in sod., 1996, 1998, 2000; Peyrot des Gachons in sod., 2002; Subileau in sod., 2008; Coetzee in Du Toit, 2012). Posamezni sevi kvasovk imajo zelo različno sposobnost sproščanja hlapnih tiolov 4MMP in 3MH iz njihovih prekurzorjev kot tudi pretvorbe 3MH v 3MHA (Murat in sod., 2001b, Howell in sod., 2004; Dubourdieu in sod., 2006; Swiegers in sod., 2009). Na sproščanje hlapnih tiolov pomembno vpliva tudi temperatura AF, vendar zelo različno v odvisnosti od seva kvasovk, saj nekateri sevi kvasovk sprostito več tiolov pri višjih temperaturah AF, nekateri pa pri nižjih (Howell in sod., 2004; Masneuf-Pomarède in sod., 2006; Swiegers in sod., 2006).

Glutation (GSH) (γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicin) je eden od najpomembnejših antioksidantov v vinu, saj preprečuje njegovo oksidacijo in s tem podaljšuje življenjsko dobo vina ter ohranja njegov aromatski potencial (Singleton in Cilliers, 1995; Rollini in Manzoni, 2006). Vsebnost GSH v vinu je v največji meri odvisna od njegove vsebnosti v grozdju. Številne raziskave potrjujejo tudi pomen seva kvasovk, saj imajo različni sevi kvasovk različno sposobnost ohranjanja, biosinteze in sproščanja GSH med AF kot tudi po njej med zorenjem vina na drožeh (Park in sod., 2000a, 2000b; Du Toit, 2007; Lavigne in sod., 2007; Patel in sod., 2010; Andujar-Ortiz in sod., 2012). Vloga različnih sevov kvasovk na ohranjanje oz. povečanje koncentracije GSH in s tem na ohranjanje aromatskega potenciala v slovenskih vinih še ni raziskana.

1.2 NAMEN DELA

Osnovni namen poskusov v okviru doktorske disertacije je bil ugotoviti vpliv čistosti starterske kulture, različnih komercialnih sevov kvasovk in njihovih kombinacij, ter pogojev AF (temperatura in delovni volumen fermentorjev) na vsebnosti GSH, hidroksicimetnih kislin (HCK) in glavnih aromatičnih spojin v vinih sorte sauvignon (*Vitis vinifera* L.) ter s tem na njegovo senzorično kakovost. Le redke raziskave poročajo o vsebnostih GSH, hlapnih tiolov in metokspirazinov v slovenskih vinih

sauvignon (Janeš in sod., 2010; Lisjak in sod., 2010; Lisjak in sod., 2011), medtem ko objav o vplivu kvasovk na omenjene spojine v slovenskih vinih še ni. Namen prvega poskusa v raziskavi je bil ugotoviti vpliv bakterij, prisotnih v komercialnih starterskih kulturah, na delovanje kvasovk in s tem na vsebnost GSH med AF in v pridelanem vinu. Z namenom preučevanja vpliva sestave mošta in pogojev AF smo poskus izvedli na treh zaporednih letnikih mošta in pri različnih temperaturah AF. Z uporabo različnih velikosti fermentorjev smo preverili tudi prenosljivost rezultatov mikroviniifikacij v industrijsko merilo. Na podlagi pridobljenih rezultatov o vsebnosti GSH, aromatičnih spojin ter drugih kemijskih in senzoričnih parametrov vina smo določili dve najbolj obetavni mešani starterski kulturi kvasovk, ki smo ju uporabili v viniifikacijah zadnjega dela poskusa. Namen zadnjega dela poskusa je bil primerjava omenjenih dveh mešanih starterskih kultur kvasovk ter dveh temperatur AF za pridelavo vina sauvignon.

Izbira primerne starterske kulture za izvedbo AF je ključnega pomena za pridelavo vina z izboljšano kemijsko in senzorično kakovostjo. V raziskavi smo preverili vpliv številnih komercialnih starterskih kultur kvasovk v različnih pogojih AF na kemijsko in senzorično kakovost vina. Rezultati raziskave imajo zato izrazito aplikativno vrednost.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

V okviru namena dela doktorske disertacije smo postavili sledeče delovne hipoteze:

- med prečiščeno in neprečiščeno startersko kulturo kvasovk ni značilnih razlik v končni vsebnosti GSH po alkoholni fermentaciji,
- v vinu sauvignon starterska kultura kvasovk odločilno vpliva na vsebnost GSH, HCK, aromatičnih spojin in senzorično kakovost,
- temperatura alkoholne fermentacije vpliva na vsebnost GSH, HCK, aromatičnih spojin in druge senzorično pomembne parametre,
- posamezna starterska kultura kvasovk daje primerljive rezultate tako v laboratorijskem in mikroviniifikacijskem merilu kot v industrijskem merilu alkoholne fermentacije,
- na vsebnost senzorično pomembnih parametrov vpliva letnik pridelanega vina,
- na osnovi končnih rezultatov vsebnosti glutaciona in aromatičnih spojin je možno znotraj našega izbora določiti najbolj primerno startersko kulturo kvasovk za pridelavo vina sauvignon.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VINSKE KVASOVKE

Vinske kvasovke igrajo ključno vlogo pri vinifikaciji grozdnega mošta, saj v procesu alkoholne fermentacije (AF) anaerobno pretvorijo grozdni sladkor, predvsem glukozo in fruktozo, v etanol in ogljikov dioksid, obenem pa tvorijo številne hlapne presnovke, kot so estri, višji alkoholi, terpeni in tioli, ki oblikujejo senzorični karakter pridelanega vina.

Avtohtone vinske kvasovke izvirajo iz površine grozdnih jagod ali tudi iz vinske kleti, od koder preidejo v grozdni sok oz. mošt (Fleet, 1999). Sveže stisnjen grozdni sok vsebuje številne vrste kvasovk, predvsem askomicetnih rodov *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces* in *Saccharomyces*. Redkeje so prisotne tudi kvasovke rodov *Zygosaccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulasporea*, *Brettanomyces/Dekkera* in *Schizosaccharomyces*. Prisotne kvasovke rodu *Saccharomyces* (predvsem kvasovke rodov *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Candida* in *Metschnikowia*) začnejo spontano AF mošta, vendar jih prav kmalu (po dveh do treh dneh AF) izpodrinejo močnejše fermentativne in na koncentracijo alkohola bolj odporne (kritična točka je 4-5 vol.% alkohola) kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* (Fleet, 2003), ki dokončajo AF. Na podlagi pozitivnih značilnosti avtohtonih kvasovk rodu *Saccharomyces* so prišli do številnih izolatov kvasovk, ki so danes na tržišču pod različnimi komercialnimi imeni in se s pridom uporabljajo v vinarstvu kot starterske kulture.

2.1.1 Starterske kulture kvasovk rodu *Saccharomyces*

V vinarstvu se za zagotavljanje konstantne fermentacijske kinetike in kakovosti vina za izvedbo AF uporabljajo predvsem komercialno dostopne suhe aktivne starterske kulture kvasovk vrst *S. cerevisiae* in *S. bayanus*. Starterske kulture kvasovk so v taki obliki enostavne za uporabo, saj se preprosto rehidrirajo v vodi ali mešanici enakih volumnov vode in mošta pri temperaturi 35-40 °C v razmerju 1:10 (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Krieger-Weber, 2009).

Za doseganje primerne fermentacijske kinetike je običajno potrebna inokulacija mošta z 10^5 - 10^6 kvasnih celic na mL mošta oz. 10-20 g suhih aktivnih kvasovk/hL mošta. Z dodatkom večjih koncentracij starterskih kultur sicer zmanjšamo možnost upočasnjene ali zaustavljene AF, vendar povečamo možnost za tvorbo nekaterih negativnih aromatičnih spojin (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Komercialne starterske kulture kvasovk naj bi v čim večji meri zadoščale želenim lastnostim, kot so hiter začetek (oz. kratka faza prilagajanja kvasovk) in enakomeren potek AF s pretvorbo vsega razpoložljivega sladkorja oz. do koncentracije manj kot

1 g/L reducirajočih sladkorjev (RS). Želeno je, da so kvasovke odporne na nizek pH, SO₂, etanol in s tem oksidativni stres ter osmotski in temperaturni stres. Med AF naj bi tvorile manjše koncentracije H₂S in drugih negativnih hlapnih spojin, manjše koncentracije hlapnih kislin (HK) ter večje koncentracije glicerola in aromatičnih spojin. Pomembno je tudi, da imajo kvasovke manjše potrebe po dušiku in da lahko fermentirajo pri nizkih temperaturah (kriotoleranca). Manjša tvorba pene med AF je prav tako zaželena lastnost kvasovk (González in sod., 2011).

Izbira starterske kulture s primernimi lastnostmi za izvedbo AF je ključnega pomena pri pridelavi specifičnih stilov in vrst vina. Izbrati pa moramo tudi takšno kulturo, ki lahko raste in izraža svojo presnovno aktivnost v danih razmerah, npr. za hladnejša pridelovalna območja izberemo sev z večjo odpornostjo na nizke temperature fermentacije ipd. Izbira zagotovo ni lahka in je še toliko težja zaradi različnih informacij, ki jih posamezni proizvajalci podajajo o lastnostih istih sevov kvasovk. Na inštitutu v Geisenheimu v Nemčiji so zato poenotili lastnosti nekaterih najbolj uporabljenih sevov kvasovk (Krieger-Weber, 2009).

V preteklosti so izbirali starterske kulture kvasovk glede na njihove tehnološke lastnosti, danes se v vinarstvu daje večji poudarek na starterske kulture kvasovk, ki izboljšajo senzorične lastnosti in povečajo celokupno kakovost vina (Krieger-Weber, 2009). Na tržišču je ogromno različnih sevov kvasovk rodu *Saccharomyces* in številne raziskave so pokazale, da različne vrste komercialnih sevov zelo različno vplivajo na senzorično kakovost vina, saj imajo različno sposobnost sinteze, sproščanja in pretvarjanja aromatičnih spojin med AF. Nekatere imajo močno β-glukozidazno aktivnost in sprostijo večje koncentracije terpenov (Gamero in sod., 2011; Jenko in sod., 2011), druge imajo močno β-liazno in alkohol acetiltransferazno aktivnost in sprostijo večje koncentracije aromatičnih hlapnih tiolov (Murat in sod., 2001b; Howell in sod., 2004; Dubourdieu in sod., 2006; Swiegers in sod., 2006, 2009), spet druge tvorijo večje koncentracije višjih alkoholov in estrov ter izboljšajo sadni karakter vina (Torrens in sod., 2008; Molina in sod., 2009). Na tržišču je cel nabor različnih sevov kvasovk rodu *Saccharomyces* z različnimi lastnostmi.

2.1.1.1 Čistost komercialnih starterskih kultur

Po resoluciji OIV-oeno 329-2009 (OIV, 2012) morajo komercialne suhe aktivne starterske kulture kvasovk vrste *S. cerevisiae* vsebovati vsaj 10¹⁰ enot, ki tvorijo kolonijo (CFU, angl. colony forming units)/g, lahko pa vsebujejo določen delež drugih mikroorganizmov od tistih, ki so označeni na embalaži. Vsebujejo lahko do največ 10⁵ CFU/g drugih kvasnih celic, kot je označeno na embalaži, manj kot 10³ CFU/g plesni, do 10⁵ CFU/g mlečnokislinskih bakterij in do 10⁴ CFU/g očetnokislinskih bakterij.

O interakcijah med kvasovkami in bakterijami v komercialnih starterskih kulturah kvasovk ni veliko znanega. Znano je, da kvasovke in bakterije na začetku AF tekmujejo za prisotna hranila v moštu, med AF pa lahko kvasovke rodu *Saccharomyces* tvorijo SO₂, kratkoverižne maščobne kisline (heksanojska, oktanojska in dekanosjska kislina), peptide in proteine, ki inhibirajo rast bakterij. Tudi bakterije so razvile sposobnost tvorbe protimikrobnih spojin, tudi fungicidnih, s pomočjo katerih lahko tekmujejo v boju za obstanek z drugimi močnejšimi mikroorganizmi (Krieger-Weber, 2009).

2.1.2 Mešane starterske kulture kvasovk rodov *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces*

Zaradi šibkih fermentativnih sposobnosti kvasovk naravne mikroflore grozdja se za izvedbo AF mošta uporabljajo predvsem selekcionirane vinske kvasovke rodu *Saccharomyces*, kljub temu pa prispevek naravne mikroflore k aromi in kompleksnosti vina vsekakor ni zanemarljiv. Čeprav so kvasovke rodu ne-*Saccharomyces* v vinarstvu poznane predvsem kot kvarljivke in so v splošnem nezaželene med AF, lahko številni rodovi in sevi teh kvasovk pozitivno vplivajo na senzorično kakovost vina, predvsem s tvorbo določenih aromatičnih spojin, kar jim omogoča njihova dobra encimska aktivnost. Pri inokulaciji čistih kultur kvasovk rodu ne-*Saccharomyces* se med AF v večjih koncentracijah tvorijo številne spojine, kot so očetna kislina, acetoin, etil acetat in acetaldehid, ki negativno vplivajo na senzorično kakovost vina. V mešani kulturi s kvasovkami rodu *Saccharomyces* se tvorba negativnih aromatičnih spojin zmanjša (Jolly in sod., 2006; Ciani in Comitini, 2011).

S tega stališča je obetavna uporaba nekaterih kvasovk rodu ne-*Saccharomyces* v mešani kulturi s kvasovkami rodu *Saccharomyces* (Ciani in Comitini, 2011). Zaradi različnih interakcij med kvasovkami v mešani kulturi je zelo pomemben način inokulacije tovrstnih mešanih kultur, in sicer zaporedje inokulacije in razmerje med posameznimi rodovi kvasovk v inokulumu. Inokulacija mešanih starterskih kultur lahko poteka hkratno (obe kulturi kvasovk naenkrat; t. i. koinokulacija) ali zaporedno (najprej kvasovke rodu ne-*Saccharomyces*, čez nekaj dni še kvasovke rodu *Saccharomyces*; t. i. sekvenčna inokulacija). Pri zaporedni inokulaciji lahko začetna hitra rast kvasovk rodu ne-*Saccharomyces* deluje inhibitorno na kasnejšo rast kvasovk rodu *Saccharomyces*, predvsem zaradi tekmovanja za preostala hranila (predvsem dušik in vitamine) v moštu, kar pogosto vodi v upočasnjeno ali zaustavljeno AF (Ciani in sod., 2006; Medina in sod., 2012; Andorra in sod., 2012). Pri hkratni inokulaciji pa lahko kvasovke rodu *Saccharomyces* inhibitorno delujejo na rast kvasovk rodu ne-*Saccharomyces* in jih prevladajo, zaradi česar je prispevek kvasovk rodu ne-*Saccharomyces* k senzorični kakovosti vina manjši. Medina in sod. (2012) so zato kot najboljši način inokulacije tovrstnih mešanih kultur predpostavili zaporedno inokulacijo z dodatkom dušika ob inokulaciji kvasovk rodu *Saccharomyces*. Razmerje

med *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* rodovoma kvasovk v inokulumu (1:1, 1:10, 1:100, ...) v veliki meri vpliva na tvorbo aromatičnih spojin med AF, saj se več pomembnih aromatičnih spojin tvori pri večjem odstotku kvasovk rodu ne-*Saccharomyces* v mešanih kulturah. Čiste kulture kvasovk rodu ne-*Saccharomyces* običajno tvorijo večje koncentracije določenih aromatičnih spojin kot v mešani kulturi s kvasovkami rodu *Saccharomyces*, zato se s povečanjem deleža kvasovk rodu ne-*Saccharomyces* v inokulumu poveča tudi vsebnost aromatičnih spojin v vinu (Bely in sod., 2008).

Inokulacije mešanih starterskih kultur kvasovk *Saccharomyces*/ne-*Saccharomyces* so se prvotno začele uporabljati z namenom zmanjšanja vsebnosti očetne kisline v vinih, in sicer so uporabili zaporedno inokulacijo mešane kulture *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae*. S to mešano kulturo so poleg zmanjšanja vsebnosti očetne kisline dosegli tudi izboljšanje senzoričnih lastnosti vina (Moreno in sod., 1991). Kasneje so Bely in sod. (2008) uporabili to mešano kulturo za AF mošta z velikimi vsebnostmi sladkorja in ugotovili, da lahko ta mešana kultura pri hkratni inokulaciji v razmerju 20:1 (*T. delbrueckii*:*S. cerevisiae*) tvori tudi do 60 % manj HK in acetaldehida, ki negativno vplivata na senzorično kakovost vina. Pri zaporedni inokulaciji je vpliv na zmanjšanje HK manjši (Bely in sod., 2008), prav tako pa lahko zaporedna inokulacija *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* vodi v upočasnjeno ali zaustavljeno AF (Ciani in sod., 2006). S hkratno inokulacijo te mešane kulture so poleg zmanjšanja tvorbe HK in acetaldehida dosegli tudi povečano tvorbo 2-feniletanola, ki prispeva k cvetličnim aromam vina (Comitini in sod., 2011). Kvasovke vrste *T. delbrueckii* so znane po čisti in enakomerni fermentacijski kinetiki, tvorbi manjših koncentracij nekaterih hlapnih spojin (očetne kisline, H₂S, hlapni fenoli) in glicerola (Renault in sod., 2009) ter tvorbi večjih koncentracij nekaterih laktonov in estrov (Plata in sod., 2003; Hernandez-Orte in sod., 2008). Vrsta kvasovk *T. delbrueckii* ima tudi močno encimsko aktivnost, predvsem β-glukozidazo, ki pripomore k sproščanju nehlapnih v hlapne oblike terpenov med AF. Ta encimska aktivnost se odraža tudi v mešanih kulturah *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* (Maturano in sod., 2012). V eni od naših raziskav smo z zaporedno inokulacijo te mešane kulture pridelali vina sorte traminec z večjimi vsebnostmi nekaterih terpenov (linalool in α-terpineol), kar je bistveno vplivalo na senzorično kakovost, saj so bila ta vina senzorično najvišje rangirana za parameter celokupna kakovost vina (Jenko in sod., 2011). Mešane kulture *T. delbrueckii*/*S. cerevisiae* so v praksi ene od najbolj uporabljenih mešanih kultur, saj so komercialno dostopne, tako v obliki same čiste kulture vrste *T. delbrueckii* (npr. Zymaflore® Alpha^{TD} n. Sacch), kot tudi v kompletu s kompatibilnimi kvasovkami vrste *S. cerevisiae* (npr. Level2TM TD).

Za izboljšanje kompleksnosti in specifičnih lastnosti vina so preizkusili številne mešane kulture kvasovk vrste *S. cerevisiae* s kvasovkami rodu ne-*Saccharomyces*. Za mešane kulture različnih vrst kvasovk rodu *Hanseniaspora* (*H. guilliermondii*, *H. uvarum*,

H. vineae, *H. osmophila*) s kvasovkami vrste *S. cerevisiae* so tako večkrat pokazali, da tvorijo večje koncentracije nekaterih aromatičnih estrov in višjih alkoholov (Rojas in sod., 2003; Moreira in sod., 2005; Domizio in sod., 2011; Viana in sod., 2011; Andorra in sod., 2012) ter imajo dobro encimsko aktivnost, predvsem β -glukozidazno, proteazno in ksilanazno (Maturano in sod., 2012). Nekatero vrsto kvasovk rodu *Candida* (*C. zemplinina*, *C. pulcherrima*) so se v mešani kulturi s kvasovkami rodu *Saccharomyces* izkazale s povečano tvorbo nekaterih estrov, višjih alkoholov, terpenov in laktonov (Rodriguez in sod., 2010; Andorra in sod., 2012; Sadoudi in sod., 2012), predvsem pri zaporedni inokulaciji (Rodriguez in sod., 2010). Z uporabo mešane kulture nekaterih vrst kvasovk rodu *Pichia* (*P. anomala*, *P. fermentans*) s kvasovkami vrste *S. cerevisiae* lahko povečamo vsebnost številnih estrov in višjih alkoholov, obenem pa zmanjšamo tvorbo očetne kisline in acetaldehida, ki je značilna za kvasovke rodu *Pichia* (Rojas in sod., 2003; Clemente-Jimenez in sod., 2005; Domizio in sod., 2011). Z uporabo mešane kulture *Kluyveromyces thermotolerans*/*S. cerevisiae* lahko uspešno znižamo pH in povečamo vsebnost 2-feniletanola in glicerola v vinu (Ciani in sod., 2006; Comitini in sod., 2011). Povečanje vsebnosti nekaterih aromatičnih spojin med AF so dosegli tudi s številnimi drugimi mešanimi kulturami kvasovk rodov *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces*, kot so vrste *K. apiculata* in *M. pulcherrima*, rodova *Saccharomycodes* in *Zygosaccharomyces* ter drugi v hkratni inokulaciji s kvasovkami vrste *S. cerevisiae* (Comitini in sod., 2011; Domizio in sod., 2011; Sadoudi in sod., 2012).

2.1.3 Mešane starterske kulture kvasovk rodu *Saccharomyces*

Pozitiven premik na področju uporabe komercialnih sevov kvasovk rodu *Saccharomyces* je kombiniranje le-teh in uporaba mešanih kultur *Saccharomyces*/*Saccharomyces*, s čimer lahko s primerno kombinacijo dosežemo izražanje pozitivnih značilnosti obeh sevov kvasovk in na ta način izboljšamo določene parametre, ki vplivajo na senzorično kakovost vina (King in sod., 2010).

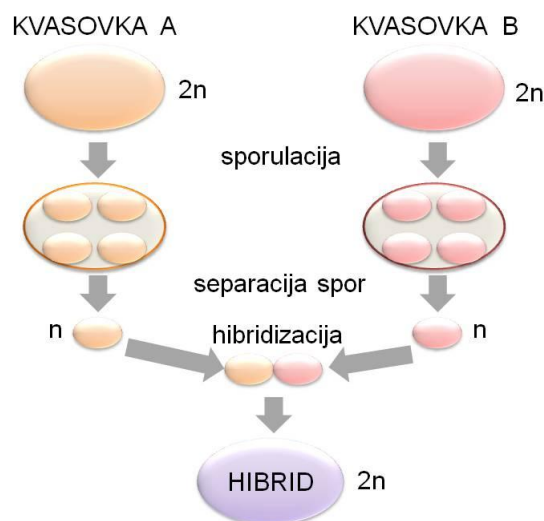
Specifična zastopanost hlapnih aromatičnih spojin v vinih, pridelanih s takšnimi mešanimi kulturami, je domnevno posledica interakcij med sevi kvasovk, ki temeljijo na izmenjavi presnovkov (Howell in sod., 2006). To domnevo so potrdili Cheraiti in sod. (2005), ki so ugotovili, da je redoks stanje v mešanih kulturah drugačno kot pri posameznih sevih kvasovk, kar nakazuje na interakcije med sevi kvasovk, povezane z difuzijo presnovkov znotraj mešanih kultur. To domnevo so Howell in sod. (2006) še podkrepili z ugotovitvijo, da sestave in senzoričnih lastnosti vin, pridelanih z mešano kulturo kvasovk, ni možno doseči z mešanjem vin, pridelanih s posameznimi sevi teh kvasovk. Osnovni mehanizmi tovrstnih presnovnih interakcij med kvasovkami še niso raziskani.

Sevi kvasovk, ki jih uporabimo v mešanih kulturah *Saccharomyces/Saccharomyces*, morajo biti komplementarni oz. morajo med njimi potekati pozitivne interakcije, da lahko uspešno izboljšamo aromatični profil vin. King in sod. (2008) so izvedli vinifikacije mošta sauvignon s posameznimi in mešanimi kulturami komercialnih sevov kvasovk VIN7, QA23 in VIN13. Vina, pridelana z mešano kulturo VIN7/QA23, so imela največje vsebnosti aromatičnih hlapnih tiolov 3-merkaptotioheksan-1-ola (3MH) in 3-merkaptotioheksil acetata (3MHA), ki dajejo vinu aromo po tropskem sadju, kar se ni odrazilo pri mešani kulturi VIN7/VIN13. Seva kvasovk VIN7 in QA23 sta bila v mešani kulturi torej bolj komplementarna seva. V tej raziskavi so tudi pokazali, da večje koncentracije HK, ki jih običajno tvori sev VIN7, niso prisotne v vinih z mešanimi kulturami s tem sevom (King in sod., 2008). V eni od naših raziskav smo z mešano kulturo VIN7/QA23 pridelali vina z visokimi vsebnostmi 3MHA in nekoliko nižjimi vsebnostmi 3MH, z mešano kulturo VL3/QA23 pa vina s povprečnimi vsebnostmi 3MH in značilno nižjimi vsebnostmi 3MHA (Jenko in sod., 2013).

Zaradi razlik v lastnostih posameznih sevov kvasovk je proti koncu AF v populaciji praviloma prevladujoč le en sev kvasovk, kljub temu pa ima vsak sev v mešani kulturi vpliv na sestavo hlapnih spojin v pridelanem vinu (Grossmann in sod., 1996; Howell in sod., 2006). Sevi kvasovk v mešani kulturi so lahko bolj ali manj prevladujoči. Favale in sod. (2007) so z mešano kulturo kvasovk vrst *S. bayanus* var. *bayanus* in *S. bayanus* var. *uvarum* pridelali vina, ki so imela zelo podobno sestavo kot vina, pridelana samo s kvasovkami vrste *S. bayanus* var. *uvarum*. V tem primeru je bil sev *S. bayanus* var. *uvarum* bolj prevladujoč in je nadvladal sev *S. bayanus* var. *bayanus* v mešani kulturi, zaradi česar delovanje slednjega ni bilo izraženo. V tem primeru seva v mešani kulturi nista komplementarna.

2.1.4 Hibridni sevi kvasovk

V zadnjem desetletju v vinarstvu vedno več pozornosti namenjamo hibridnim sevom kvasovk. Hibridni sevi kvasovk imajo genom, sestavljen iz genetskih elementov dveh ali več vrst kvasovk, kar pomeni, da lahko izražajo lastnosti obeh/vseh starševskih sevov. Hibridizacija je definirana kot združenje dveh gamet z različno genetsko sestavo, pri čemer nastane aloploiden genom, sestavljen iz kopij genomov starševskih sevov (Rieger in sod., 1976). Pri hibridizaciji gre v principu za sporulacijo diploidov, ohranjanje posameznih haploidnih askospor in parjenje haploidnih celic nasprotnih paritvenih tipov, pri čemer nastanejo novi heterozigotni diploidi (slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz postopka hibridizacije kvasovk (Hybrid wine yeasts, 2013)

Figure 1: Scheme of yeast hybridisation process (Hybrid wine yeasts, 2013)

Hibridni sevi kvasovk so lahko naravni oz. so produkti naravne/spontane hibridizacije, lahko pa so produkti laboratorijske hibridizacije, ki je v zadnjem času postala učinkovit način za izboljšanje in kombiniranje lastnosti s poligenskim nadzorom, s katerim lahko relativno hitro dosežemo vključitev ali odstranitev določenih lastnosti kvasovk. Hibridizacija je izvedljiva samo med zelo sorodnimi vrstami kvasovk rodu *Saccharomyces sensu stricto* (*S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*, *S. pastorianus/S. carlsbergensis* in *S. paradoxus*). Nastali hibridi so bolj prilagojeni na industrijske razmere oz. razmere med AF ter večinoma izkazujejo lastnosti obeh starševskih sevov (Belloch in sod., 2008; Querol in Bond, 2009).

Za pridobitev hibridnih sevov vinskih kvasovk z želenimi lastnostmi so v uporabi različne hibridizacijske tehnike, od katerih so ene od najbolj uporabljenih parjenje spor, naključno parjenje in zlitje protoplastov (Sipiczki, 2008). Hibridizacija s parjenjem spor in naključnim parjenjem veljata za naravno pridobivanje hibridov, od katerih so številni hibridi že na tržišču, medtem ko s fuzijo protoplastov pridobimo gensko spremenjene kvasovke, ki z zakonom v Evropski uniji še niso dovoljene za uporabo. S primerjavo uporabnosti teh treh hibridizacijskih metod so označili naključno parjenje kot najbolj uporabno, saj je enostavna metoda za pridobivanje stabilnih hibridov, ki vsebujejo celoten set kromosomov obeh staršev in niso obravnavani kot gensko spremenjene kvasovke (Perez-Traves in sod., 2012).

Številne naravne hibride kvasovk so izolirali iz grozdja, mošta in različnih faz AF ter kasneje tudi ovrednotili njihove enološke lastnosti. Gonzalez in sod. (2007) so z uporabo naravnega hibrida *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* (izoliran v Švici, tržno dostopen) za vinifikacijo mošta sort macabeo in tempranillo pridelali vina z večjimi vsebnostmi aromatičnih spojin (predvsem višjih alkoholov) in glicerola ter manjšimi

vsebnostmi očetne kisline. Naravni hibrid teh dveh vrst kvasovk (izoliran v Avstriji) se je pri vinifikaciji sort blauburger in muškata ottonel izkazal z enakomerno fermentacijsko kinetiko ter večjo sposobnostjo tvorbe etanola in aromatičnih spojin, predvsem nekaterih višjih alkoholov in estrov (Gangl in sod., 2009). Naravni hibrid *S. cerevisiae* × *S. bayanus* se je izkazal z veliko hidrolitično aktivnostjo med AF (Hernandez-Orte in sod., 2008). Različni naravni hibridi *S. cerevisiae* × *S. bayanus*, *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii*, *S. cerevisiae* × *S. bayanus* × *S. kudriavzevii* so pokazali pozitivne lastnosti obeh/vseh starševskih vrst kvasovk: sevi vrste *S. cerevisiae* so odporni na stres zaradi visoke temperature in visoke vsebnosti etanola, medtem ko so sevi vrste *S. bayanus* in *S. kudriavzevii* bolj prilagojeni na rast pri nižjih temperaturah in so manj odporni na etanol. Vsi omenjeni hibridi imajo izraženo lastnost starševskega seva kvasovk vrste *S. cerevisiae* in imajo boljšo odpornost na stres zaradi temperature in etanola (Belloch in sod., 2008). Omenjene tri vrste hibridov prav tako tvorijo (*de novo*) večje koncentracije nekaterih terpenov in šikimskih derivatov (*S. cerevisiae* × *S. bayanus*) in imajo povečano sintezo nekaterih laktonov, večine benzojskih derivatov ter fenilacetaldehida (*S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii*). Trojni hibrid *S. cerevisiae* × *S. bayanus* × *S. kudriavzevii* je od vseh preiskovanih hibridov in sevov sprostil največ aromatičnih spojin (Gamero in sod., 2011). V eni od naših raziskav se je hibrid *S. cerevisiae* × *S. paradoxus* (komercialen sev) izkazal predvsem s tvorbo večjih koncentracij terpenov (predvsem citronelola) v vinu sorte traminec, ki je bilo posledično senzorično najboljše ocenjeno za parameter aroma po tropskem sadju (Jenko in sod., 2011).

Hibridni sevi kvasovk pa ne izražajo vedno zelenih lastnosti obeh starševskih sevov. Hibrid *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* (izoliran med AF, tržno dostopen), ki je bil proučevan v iskanju kvasovk, ki tvorijo manjše koncentracije etanola in večje koncentracije glicerola v vinu, ni izkazal zelenih lastnosti. Delovanje hibrida je bilo namreč zelo podobno starševskemu sevu kvasovk vrste *S. cerevisiae* in se je bistveno razlikovalo od delovanja drugega starševskega seva kvasovk vrste *S. kudriavzevii*, ki je izkazoval močno aktivnost encima glicerol-3-fosfat dehidrogenaze (encim, ki sodeluje v prvem koraku sinteze glicerola) (Arroyo-Lopez in sod., 2010).

Številne seve kvasovk, ki so jih izolirali kot vrsto kvasovk *S. cerevisiae*, so kasneje z razvojem genske tehnologije okarakterizirali kot hibridne seve. Eden od takšnih primerov je komercialen sev kvasovk VIN7, ki se trži kot vrsta kvasovk *S. cerevisiae*, a so Borneman in sod. (2011) pokazali, da je ta sev kvasovk hibrid vrst *S. cerevisiae*/*S. kudriavzevii*.

2.1.5 Kvasovke mutanti

Mutacija na molekularni ravni je vsaka sprememba v zaporedju nukleinskih kislin, ki sestavljajo nek genom, ne glede na to, ali ta sprememba povzroči tudi fenotipske spremembe ali ne. V sekvenci nukleinskih kislin lahko pride do številnih sprememb, kot so zamenjava baz, insercija, delecija, zamik čitalnega okvira in druge spremembe (Gasparič in Komel, 1996). Povprečna frekvenca mutacij pri kvasovkah vrste *S. cerevisiae* med spontano AF na katerem koli specifičnem lokusu je približno 10^{-6} na generacijo (Pretorius, 2000). Z uporabo mutagenov, ki so lahko kemijski ali fizikalni, lahko bistveno povečamo frekvenco mutacij v populaciji kvasovk. Naključna mutageneza s kemijskimi ali fizikalnimi mutageni je verjetno najpreprostejši način za gensko izboljšanje kvasovk, ki so kot take tudi dovoljene za uporabo v vinarstvu. Mutageneza se najpogosteje izvaja z UV- ali gama-sevanjem, uporabljajo se tudi številne kemijske spojine, kot je etil metansulfonat, metil metansulfonat, hidroksilamin, dušikova(III) kislina in drugi (Gasparič in Komel, 1996; Giudici in sod., 2005). Mutacija, ki ji sledi selekcija »spremenjenih« sevov kvasovk (ponavadi s precepljanjem na selektivna gojišča), je racionalen in pogosto uporabljen pristop k razvoju seva, kadar želimo, da večje število lastnosti kvasovk ostane nespremenjenih, spremenimo pa le eno lastnost. Z mutacijami vinskih kvasovk lahko tako izboljšamo določene enološko pomembne lastnosti, vendar lahko hkrati inhibiramo ali popolnoma odstranimo izražanje druge lastnosti (Pretorius, 2000).

Mutacije se (verjetno) z enako frekvenco pojavljajo pri haploidnih, diploidnih in poliploidnih sevih, vendar jih je v diploidnih in poliploidnih težje zaznati zaradi prisotnosti ne-mutiranih alelov. Iz tega razloga so za mutagenezo bolj zaželeni haploidni sevi kvasovk, pri katerih je mutacija dominantna z zaznavnimi fenotipskimi spremembami, medtem ko haploidnost ni nujna za indukcijo mutacije (Pretorius, 2000).

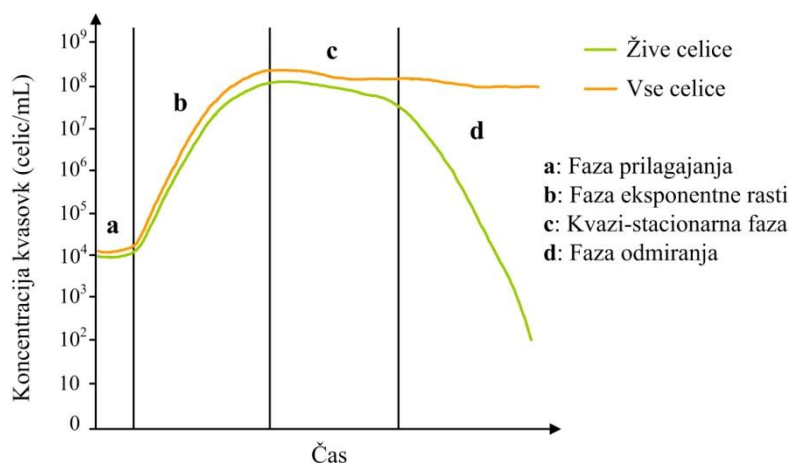
Primeri naravne mutageneze za izboljšanje lastnosti vinskih kvasovk so le redki. Z mutagenezo z UV-sevanjem so pridobili vinske kvasovke, ki hitreje avtolizirajo med sekundarno fermentacijo penečih vin. Mutanti so v krajšem času sprostili več znotrajceličnih spojin, ki pozitivno vplivajo na kemijsko sestavo in senzorične lastnosti vina. S hitrejšim sproščanjem teh spojin se skrajša tudi čas proizvodnje penin (Gonzalez in sod., 2003). Z enako vrsto mutageneze so pridobili termo-občutljive, avtolitične kvasovke z izboljšano sposobnostjo sproščanja manoproteinov iz celične stene med AF (Giovani in Rosi, 2007). V raziskavi so Cadière in sod. (2011) dlje časa gojili kulture kvasovk na glukonatu, ki ga kvasovke vrste *S. cerevisiae* zelo težko asimilirajo in se mobilizira preko pentoza fosfatne poti. Po prilagoditvi kvasovk na dane razmere so izbrali tiste seve, ki so razvili sposobnost povečane asimilacije glukonata, pri katerih se je tok ogljika (glukoze) preusmeril iz glikolize na pentoza fosfatno pot in večjo sintezo lipidov. Tok ogljika na pentoza fosfatno pot je bil pri sevu ECA5 17 %, pri starševskem sevu EC1118 pa le 11 %. Med AF je sev ECA5 izkazal večje presnovne spremembe,

predvsem z zmanjšanjem tvorbe očetne kisline, boljšo fermentacijsko kinetiko in povečano tvorbo aromatičnih spojin, predvsem 2-feniletanola, 2-feniletil acetata in izoamil acetata. Sev je že komercialno dostopen.

2.2 VPLIV INTERAKCIJ MED SESTAVINAMI MOŠTA IN KVASOVKAMI TER POGOJEV ALKOHOLNE FERMENTACIJE NA KEMIJSKO SESTAVO VINA

2.2.1 Faze rasti kvasovk in fermentacijska kinetika

Faze rasti kvasovk vrste *S. cerevisiae* med AF so prikazane na sliki 2.



Slika 2: Faze rasti kvasovk vrste *S. cerevisiae* med alkoholno fermentacijo (Zamora, 2009: 5)
Figure 2: Growth phases of *S. cerevisiae* yeasts during alcoholic fermentation (Zamora, 2009: 5)

V prvih nekaj urah po inokulaciji kvasovk v mošt se njihova koncentracija ne poveča, saj se kvasovke v fazi prilagajanja prilagajajo na nove razmere v mediju. Grozdni mošt je za kvasovke dokaj zahteven medij, predvsem zaradi velikih vsebnosti sladkorjev, ki pri kvasovkah povzročajo osmotski stres. V tej kratki začetni fazi je koncentracija kvasovk okrog $5 \cdot 10^6$ celic/mL (Zamora, 2009). Ko se kvasovke prilagodijo na razmere v moštu, se začne eksponentna faza rasti kvasovk, ki običajno traja od 2 do 5 dni s povečanjem koncentracije kvasovk na 10^7 do 10^8 celic/mL. V tej fazi je fermentacijska kinetika konstantna in najhitrejša, v njej kvasovke asimilirajo eno tretjino do eno polovico začetne koncentracije sladkorjev. Rast kvasovk se nato počasi ustavi zaradi pomanjkanja nekaterih hranil in začne se kvazi-stacionarna faza. V tej fazi, ki traja okrog 8 dni, se koncentracija kvasovk skoraj ne spreminja, kvasovke ostanejo presnovno aktivne in fermentacijska kinetika ostane hitra. Zadnja faza, faza odmiranja, je običajno tri do štirikrat daljša od faze rasti in v njej kvasovke asimilirajo še kar nekaj preostalih sladkorjev. V tej fazi kvasovke počasi odmirajo, tako zaradi pomanjkanja hranil (in s tem energije v obliki adenozin-3-fosfata (ATP)) kot tudi zaradi toksičnosti etanola in drugih spojin, ki se tvorijo med AF. Z zmanjšanjem števila živih kvasovk se

zmanjša tudi fermentacijska kinetika (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Zamora, 2009; Aranda in sod., 2011).

2.2.1.1 Dejavniki, ki vplivajo na rast kvasovk in fermentacijsko kinetiko

Temperatura AF je eden najpomembnejših dejavnikov, ki vplivajo na razvoj kvasovk in s tem na fermentacijsko kinetiko. Optimalna temperatura za rast kvasovk vrste *S. cerevisiae* je 30 °C, sposobne pa so rasti v zelo širokem temperaturnem območju, do največ 40 °C, ko se njihova rast ustavi in velik del kvasovk odmre. S povišanjem temperature se intenzivnost AF pri kvasovkah poveča, in sicer se podvoji za vsakih 10 °C povišanja temperature v temperaturnem območju med 10 in 32 °C. Tako je AF pri 30 °C dvakrat hitrejša kot AF pri 20 °C, za vsako 1 °C povišanja temperature pa kvasovke razgradijo 10 % več sladkorjev v istem času (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Aranda in sod., 2011). Kljub temu, da kvasovke izkazujejo boljšo fermentacijsko kinetiko pri višjih temperaturah, le-te med AF niso priporočene, saj se z naraščajočo temperaturo poveča toksičnost etanola, zaradi česar lahko veliko število kvasovk odmre, AF pa se prezgodaj zaključi s preostankom sladkorjev in posledično manjšimi vsebnostmi alkohola v vinu (Torija in sod., 2003). Višje temperature prav tako povzročijo izhlapevanje etanola in drugih hlapnih spojin, ki so ključnega pomena za senzorično kakovost predvsem belih vin, zaradi intenzivnega sproščanja CO₂ (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Aranda in sod., 2011). Prenizke temperature AF tudi niso priporočljive, saj lahko vodijo v upočasnjene ali zaustavljene AF, kar je posledica spremenjene tekočnosti membrane pri kvasovkah. Pri nižjih temperaturah AF faza odmiranja kvasovk običajno ne nastopi, pač pa kvazi-stacionarna faza traja vse do konca AF (Torija in sod., 2003; Aranda in sod., 2011). Za ohranitev hlapnih aromatičnih spojin v belih vinih običajno AF izpeljemo pri temperaturah med 10 in 18 °C, medtem ko zaradi boljše ekstrakcije fenolnih spojin v rdečih vinih izvajamo AF pri temperaturah med 18 in 29 °C. Na začetku AF je priporočena temperatura okrog 20 °C, da spodbudimo začetek rasti kvasovk oz. skrajšamo fazo prilagajanja. Nižje temperature na začetku AF lahko spodbudijo rast prisotnih ne-*Saccharomyces* vrst kvasovk (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Aranda in sod., 2011). Hitrejše temperaturne spremembe med AF, npr. iz 19 °C na 12 °C ali obratno, lahko povzročijo upočasnjeno ali zaustavljeno AF in s tem ostanek reducirajočih sladkorjev (RS) v pridelanem vinu. Če se temperaturni šok pojavi v zadnji fazi AF (po zmanjšanju RS za približno 120 g/L), je vpliv na kinetiko AF manjši (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Na rast kvasovk in fermentacijsko kinetiko med AF v prvi vrsti vpliva sestava grozdnega mošta, predvsem prisotnost hranil, kot so sladkorji, dušikove in žveplove spojine, katerih presnovne poti so opisane v naslednjih poglavjih. Vitamini in minerali, ki jih kvasovke potrebujejo za normalno presnovo ter ohranjanje pH in ionskega

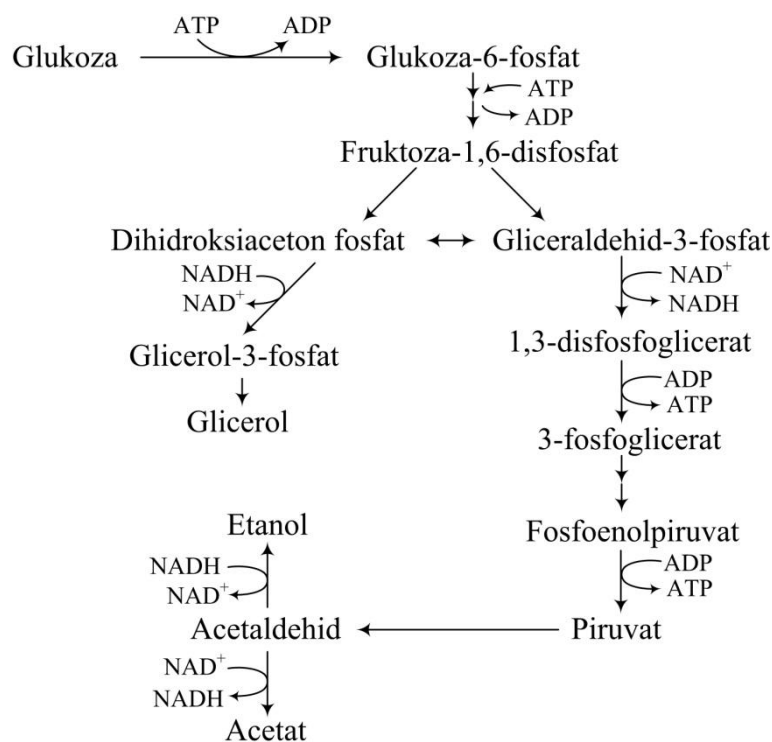
ravnovesja v celici, so v moštih običajno prisotni v zadostnih koncentracijah. V moštu prisotni sulfiti in pesticidi lahko v večjih koncentracijah inhibitorno vplivajo na rast vinskih kvasovk. Tudi zračenje med AF lahko deluje inhibitorno na presnovo kvasovk (Pasteurjev efekt), v prekomernih količinah pa lahko vodi tudi v tvorbo acetaldehida in H₂S, in obenem se zmanjša tvorba aromatičnih estrov. Kvasovke sicer potrebujejo med 5 in 7,5 mg O₂/L za sintezo sterolov (predvsem ergosterola) in nenasičenih maščobnih kislin ter normalno rast med AF, vendar je količina kisika, ki preide v mošt pri stiskanju grozdja zadostna za te presnovne aktivnosti (Rosenfeld in sod., 2003; Aranda in sod., 2011). Na rast kvasovk inhibitorno vplivajo tudi zelo nizke vrednosti pH mošta (pod 2,80), pri katerih se jim zmanjša odpornost na SO₂ in etanol. Običajne vrednosti pH mošta so med 2,75 in 4,20. Z bistrenjem mošta oz. odstranjevanjem trdnih delcev mošta, ki je eden od pomembnih vinifikacijskih postopkov pri pridelavi belih vin, odstranimo tudi hranila (predvsem dušik) za kvasovke, kar vpliva na njihovo rast. Trdni delci v nebistrenih moštih delujejo tudi kot osnova pri tvorbi mehurčkov CO₂ in tako pospešujejo njihovo nastajanje, CO₂ pa v večjih količinah inhibira rast kvasovk. V večini primerov imajo zato bela vina, pridelana iz bistrenih moštov, boljše senzorične lastnosti (Aranda in sod., 2011).

2.2.2 Presnova sladkorja

Kvasovke kot glavni vir ogljika med AF uporabljajo glukozo in fruktozo, ki sta glavna sladkorja v grozdju in moštu. Vsebnost sladkorjev v zrelem grozdju je v povprečju med 170 in 220 g/L. Pri vsebnostih sladkorjev v moštu nad 200 g/L se fermentacijska kinetika upočasni, vsebnosti med 250 in 300 g/L pa inhibirajo rast kvasovk, kar vodi v nižje alkoholne stopnje pridelanih vin. Med AF oz. presnovo sladkorjev nastali etanol v zadnjih fazah AF zavira rast kvasovk, katerih odpornost na etanol je večinoma do 14 vol.% (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Aranda in sod., 2011).

Kvasovke lahko presnovijo heksoze (glukozo in fruktozo) po dveh presnovnih poteh – v procesu AF ali v procesu dihanja. Obe presnovni poti se začneta s procesom glikolize, ki poteče v citoplazmi celice, po prehodu sladkorjev preko plazemske membrane s pomočjo posebnih transporterjev. Glikoliza je serija desetih encimsko kataliziranih reakcij (slika 3). V prvih petih reakcijah glikolize kvasovke porabijo energijo, da aktivirajo sladkorje z ATP-odvisno fosforilacijo, pri čemer nastane fruktoza-1,6-disfosfat, iz katere nato nastane dihidroksiaceton fosfat in glicerol-3-fosfat. V naslednjih petih reakcijah glikolize pa kvasovke pridobivajo energijo – glicerol-3-fosfat se reaktivira, pri čemer nastane 1,3-disfosfoglicerat in fosfoenol piruvat, ki preneseta svojo visoko-energijsko fosfatno skupino na adenzin difosfat (ADP), pri čemer nastane energijsko bogata molekula ATP. Kemijsko energijo ATP lahko kvasovke porabijo za druge presnovne procese, povezane s celično rastjo. V zadnji reakciji glikolize iz fosfoenol piruvata nastane piruvat, ki je končni produkt

glikolize. Šesta reakcija glikolize je oksidacijska reakcija, ki jo katalizira gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, ki za reakcijo potrebuje koencim nikotin-amid dinukleotid (NAD^+). NAD^+ se v tej reakciji reducira v NADH (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Aranda in sod., 2011).



Slika 3: Shematski prikaz pretvorbe glukoze v etanol pri kvasovkah vrste *S. cerevisiae* (Aranda in sod., 2011)

Figure 3: Scheme of glucose to ethanol conversion in *S. cerevisiae* yeasts (Aranda et al., 2011)

Glikolizi sledi proces AF, ki ravno tako poteče v citoplazmi celice v dveh reakcijah, pri katerih se v glikolizi nastali NADH reoksidira nazaj v NAD^+ (slika 3), kar zagotavlja nemoten potek glikolize. V prvi reakciji se piruvat, ki je končni produkt glikolize, s pomočjo encima piruvat dekarboksilaze dekarboksilira v acetaldehid (etanal) in CO_2 , acetaldehid pa se nato s pomočjo encima alkohol dehidrogenaze reducira v etanol, pri čemer se NADH oksidira v NAD^+ (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Zamora, 2009).

Kvasovke pri presnovi sladkorjev sproščajo velike količine CO_2 , ki izpodrine kisik nad površino fermentirajočega mošta, pri čemer se ustvarijo semi-anaerobne razmere, ki skupaj z veliko vsebnostjo sladkorjev v moštu zavirajo presnovni proces dihanja in spodbujajo proces AF. Oba končna produkta AF, etanol in CO_2 , prehajata iz celice z enostavno difuzijo (Zamora, 2009).

V procesu glikolize nastajajo številni vmesni produkti, ki jih kvasovke porabijo tudi kot substrate za biosintezo molekul, povezanih s povečanjem biomase. Glukoza-6-fosfat se lahko iz glikolize preusmeri v pentoza fosfatno pot, katere končni produkt sta NADPH in riboza fosfat, ki sta potrebna za biosintezo maščobnih kislin in nukleotidov. Piruvat je

pomemben substrat za sintezo oksalacetata, sukcinata, organskih kislin in aminokislin, ki se tvorijo predvsem na začetku AF. Spojina 3-fosfoglicerat lahko preide iz glikolizne poti in sodeluje pri sintezi aminokislin. Dihidroksiaceton fosfat se lahko porabi za tvorbo glicerola, ki pomembno vpliva na senzorično kakovost vina, sodeluje v biosintezi triacilglicerola in ga kvasovke tvorijo kot odziv na osmotski stres, kateremu so izpostavljene predvsem na začetku AF (Aranda in sod., 2011). V prisotnosti sulfita se le-ta lahko veže na acetaldehid, ki nastane v prvi reakciji AF, ta pa tako postane nedostopen za redukcijo z encimom alkohol dehidrogenazo in zato ne pride do oksidacije NADH v NAD⁺. Kvasovke morajo zato oksidirati NADH po drugi poti, da kompenzirajo primanjkljaj NAD⁺, in sicer s tvorbo glicerola, pri čemer pride do oksidacije v NAD⁺. Kvasovke tvorijo glicerol na začetku AF tudi zato, ker pri razmnoževanju kvasnih celic poteka biosinteza proteinov, lipidov, nukleotidov itd., večina teh molekul pa se sintetizira iz piruvata. Vsakič, ko se piruvat porabi anabolno, pride do primanjkljaja NAD⁺, ki ga mora celica nadomestiti z gliceropiruvično fermentacijo, pri čemer se tvori glicerol (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

2.2.3 Presnova dušikovih spojin

Grozdni mošt vsebuje relativno velike vsebnosti dušikovih spojin (0,1-1 g N/L), ki vključujejo amonijeve katione (3-10 % skupnega dušika), aminokislino (25-30 %), polipeptide (25-40 %) in proteine (5-10 %). Vsebnost dušika v moštu je odvisna od številnih dejavnikov, predvsem od sorte, uporabe dušikovih gnojil, lege vinograda, klimatskih razmer in tal ter svetlobe in temperature, uporabe dodatkov dušika v mošt in stopnje bistrenja (belih) moštov. Vsebnost dušika v moštu lahko povečamo s počasnim stiskanjem grozdja in maceracijo, saj so jagodne kožice bogat vir dušika (Bell in Henschke, 2005; Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Kvasovke vrste *S. cerevisiae* lahko kot vir dušika med AF porabljajo le amonijeve katione (NH₄⁺) in aminokislino, medtem ko presnove nitratov in nitritov ter hidrolize polipeptidov in proteinov niso sposobne zaradi pomanjkanja ekstracelularne proteolitične aktivnosti (Henschke in Jiranek, 1993). Dušik, ki ga kvasovke lahko porabljajo, pogosto imenujemo YAN (Yeast Assimilable Nitrogen) ali tudi FAN (Free Amino Nitrogen). NH₄⁺ ioni so pomembnejši del FAN, ker jih kvasovke prednostno in tudi najhitreje presnovijo (Bell in Henschke, 2005; Ribéreau-Gayon in sod., 2006), medtem ko posamezne aminokislino kvasovke presnovijo v odvisnosti od preferenc do njih. Kvasovke namreč prednostno presnovijo tiste vire dušika, ki spodbujajo njihovo rast, in sicer NH₄⁺, glutaminsko in asparaginsko kislino, ki jim sledijo arginin, alanin, glicin in glutamat. Zelo redko in v zelo omejenih količinah pa kvasovke presnovijo prolin, za presnovo katerega je potrebna prisotnost kisika, in ureo (Aranda in sod., 2011). Kvasovke potrebujejo dušikove spojine za izgradnjo svojih lastnih strukturnih in funkcionalnih spojin v celici, kot so proteini, peptidi, poliamini, nukleinske kisline,

vitamini itd. NH_4^+ ioni zlahka preidejo v kvasne celice s pospešeno difuzijo, kjer se vgradijo v nekatere aminokislino, največkrat v glutamat in glutamin, ki sta prekurzorja za biosintezo vseh ostalih aminokislin (Walker, 1998). Aminokislino preidejo v kvasne celice s specifičnimi membranskimi procesi (s pomočjo različnih permeaz), kjer se vgradijo neposredno v proteine ali pa se razgradijo po različnih presnovnih poteh, kot so dekarboksilacija, deaminacija in transaminacija (Walker, 1998).

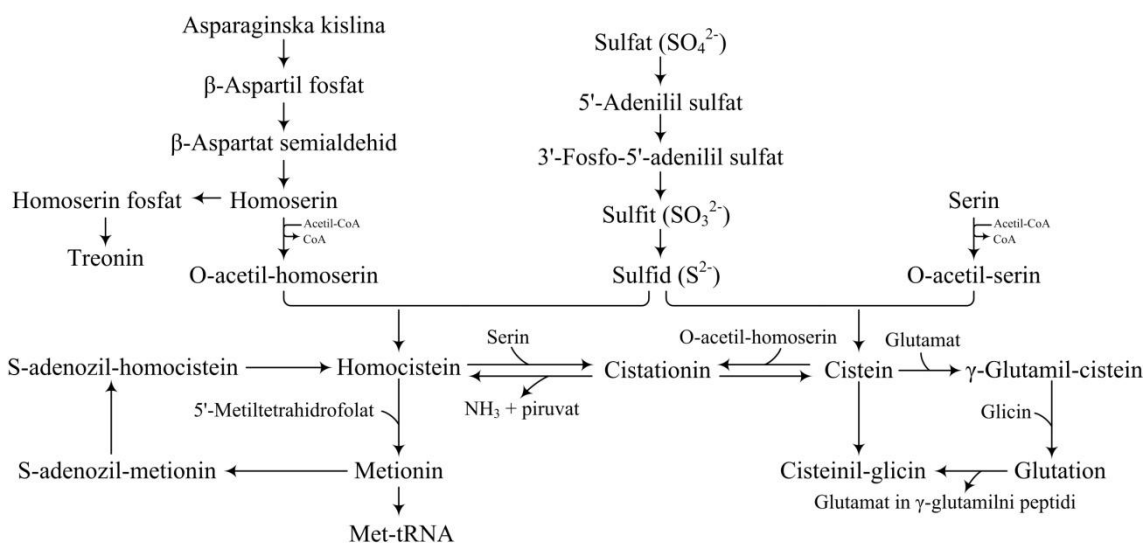
Vsebnost FAN v moštu pomembno vpliva na populacijo kvasnih celic, fermentacijsko kinetiko in trajanje AF. Če so vsebnosti FAN v moštu manjše kot 150 mg/L, so možnosti za slabši potek AF večje (Henschke in Jiranek, 1993). Posamezni sevi kvasovk imajo različne potrebe po dušiku, zato so v številnih raziskavah poskušali ugotoviti, kolikšna je najmanjša vsebnost dušika v moštu, ki je potrebna, da kvasovke uspešno izpeljejo AF oz. da ne pride do upočasnjene ali zaustavljene AF. Ugotovili so, da imajo različni sevi kvasovk zelo različne potrebe po dušiku, in sicer v območju med 70 in 267 mg/L oz. v povprečju 140 mg/L (Bell in Henschke, 2005). Julien in sod. (2000) so za primerjanje potreb po dušiku pri različnih kvasovkah predpostavili zelo uporabno metodo, s katero se meri količina dušika, ki je potrebna za ohranjanje konstantne fermentacijske kinetike med stacionarno fazo rasti kvasovk. Različni sevi kvasovk so porabili med 1 in 2,5 mg dušika na g sproščenega CO_2 . S to metodo lahko učinkovito določimo kvasovke z manjšimi potrebami po dušiku, kar je pomemben kriterij za uporabo v moštih z manjšo vsebnostjo dušika (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Na presnovo dušika pri kvasovkah ima pomemben vpliv temperatura AF ter etanol. Pri višji temperaturi kvasovke hitreje presnavljajo dušik. Raziskave so pokazale, da različni sevi kvasovk vrste *S. cerevisiae* med AF pri 15,5 °C presnovijo manj dušika kot pri 20 °C. Med AF nastali etanol zavira presnovo dušika pri kvasovkah, saj spremeni sistem aktivnega transporta preko celične membrane. Večja kot je vsebnost etanola, manjša je asimilacija dušika, kar lahko vodi v upočasnjeno ali zaustavljeno AF (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Dušikove spojine prispevajo tudi k tvorbi nekaterih aromatičnih spojin v vinu, predvsem višjih alkoholov in estrov, ki jih kvasovke tvorijo iz pripadajočih aminokislin. Višji alkoholi in estri prispevajo k sadnim in cvetličnim aromam vina. Prav tako pa dušikove spojine vplivajo na tvorbo drugih hlapnih spojin pri kvasovkah, kot so H_2S , tioli/merkaptani in monoterpeni. Sproščanje monoterpenov je pri kvasovkah spodbujeno z večjimi vsebnostmi dušika v moštu (Albers in sod., 1996; Bell in Henschke, 2005). Tvorba aromatičnih spojin je odvisna od seva kvasovk, saj različni sevi pri enakih vsebnostih dušika v moštu tvorijo različen profil aromatičnih spojin (Carrau in sod., 2008).

2.2.4 Presnova žveplovih spojin

Vinske kvasovke potrebujejo žveplo za biosintezo aminokislin cisteina in metionina. Kot vir žvepla med AF porabljajo tako anorganske (sulfat, sulfid, SO_2 , elementarno žveplo) kot organske (žveplovsebujoče aminokislino, glutation) žveplove spojine, ki so prisotne v moštu. Ker grozdni mošt običajno vsebuje zelo malo organskih žveplovih spojin, si kvasovke te žveplove spojine sintetizirajo iz anorganskih virov, ki so v moštu prisotni v večjih količinah. Kot glavni vir žvepla kvasovke med AF porabljajo sulfat, ki se v moštu nahaja v koncentracijah 160-400 mg/L (Henschke in Jiranek, 1993; Park, 2000a; Moreira in sod., 2002; Aranda in sod., 2011). Sulfat s pomočjo encima sulfat permeaze preide iz mošta v kvasne celice, kjer se aktivira z adenilacijo in reducira do sulfida v seriji encimsko kataliziranih reakcij. Sulfid se nato lahko vgradi v aminokislino s pomočjo številnih encimov. Če se med AF redukcijske reakcije dogajajo v prisotnosti zadostnih količin dušika, se sulfid vgradi v *o*-acetil serin in *o*-acetil homoserin, ki izvirata iz presnove dušika. *o*-acetil serin (iz serina) pri vezavi s sulfidom tvori cistein, *o*-acetil homoserin (iz asparaginske kisline) pa ob vezavi s sulfidom tvori homocistein, ki se lahko naprej pretvori v metionin ali cistein (Henschke in Jiranek, 1993; Spiropoulos in sod., 2000; Moreira in sod., 2002).



Slika 4: Shematski prikaz presnove žvepla pri kvasovkah vrste *S. cerevisiae* (Fugelsang in Edwards, 2007: 24)

Figure 4: Scheme of sulphur metabolism in *S. cerevisiae* yeasts (Fugelsang and Edwards, 2007: 24)

Kadar pa se omenjene redukcijske reakcije dogajajo v prisotnosti nezadostnih količin dušika in posledično tudi nezadostnih količin prekursorjev za aminokislino (*o*-acetil serin in *o*-acetil homoserin), se sulfid ne vgrajuje v omenjene spojine, ampak se nalaga v celicah in nato sprosti v mošt v obliki H_2S . Sulfid se spontano pretvori v H_2S zaradi reaktivnih razmer, ki so prisotne med anaerobno AF pri nizkih vrednostih pH (Henschke in Jiranek, 1993; Spiropoulos in sod., 2000). Prag zaznave H_2S je 10-80 $\mu\text{g/L}$, v odvisnosti od vrste in stila vina. V koncentracijah nad pragom zaznave

negativno vpliva na senzorično kakovost vina in je ena od najpogostejših napak v vinu z vonjalno zaznavo po gnilih jajcih. V manjših vsebnostih prispeva k fermentacijski aromi mladih vin (Aranda in sod., 2011). Količina H₂S, ki se tvori med AF, je odvisna od prisotnosti žveplovih spojin, razmer med AF, sestave mošta ter uporabljenega seva kvasovk (Rauhut, 1993; Spiropoulos in sod., 2000). Tvorba H₂S pri kvasovkah je genetsko pogojena, saj različni sevi kvasovk v enakih razmerah tvorijo različne količine H₂S. V normalnih razmerah AF ga kvasovke tvorijo 3-4 µg/L, nekateri sevi kvasovk pa lahko tvorijo tudi do 1 mg/L. Drugi okoljski dejavniki, ki vplivajo na tvorbo H₂S so vsebnost elementarnega žvepla in bakra, prisotnost SO₂, prisotnost žveplovsebujočih organskih spojin, pomanjkanje pantotenske kisline in večja vsebnost treonina (glede na ostale aminokislino) (Henschke in Jiranek, 1993; Rauhut, 1993; Spiropoulos in sod., 2000).

Kvasovke vrste *S. cerevisiae* med AF tvorijo sulfid v koncentracijah 10-30 mg/L, v povprečju pa manj kot 10 mg/L. Tvorba sulfida je odvisna tako od seva kvasovk kot tudi od sestave mošta. Zaradi različne aktivnosti encimov, ki sodelujejo v presnovi žvepla, se sevi kvasovk bistveno razlikujejo po količini proizvedenega sulfida. Tvorba sulfida pri kvasovkah je odvisna tudi od prisotnosti hranil v moštu, vsebnosti sulfata, bistrenja mošta, pH mošta, temperature itd. (Aranda in sod., 2011). Kvasovke lahko med AF tvorijo tudi številne druge hlapne žveplove spojine, ki vplivajo na senzorično kakovost vina, kot so metantiol (vonj po kuhanem zelju), dimetilsulfid, dimetildisulfid in dimetiltrisulfid (vonj po zelju, cvetači, česnu) in metiltioestri (vonj po kuhani cvetači, siru, drobnjaku) (Swiegers in sod., 2005; Aranda in sod., 2011). Kvasovke rodu *ne-Saccharomyces* tvorijo več negativnih žveplovih spojin v primerjavi s kvasovkami rodu *Saccharomyces*. V raziskavi so pokazali, da kvasovke rodu *Hanseniaspora* tvorijo bistveno večje koncentracije negativnih žveplovih spojin kot kvasovke vrste *S. cerevisiae*, medtem ko je mešana kultura *Hanseniaspora/S. cerevisiae* tvorila enake koncentracije žveplovih spojin kot čista kultura kvasovk vrste *S. cerevisiae* (Moreira in sod., 2005).

2.2.5 Tvorba očetne kisline

Očetna kislina v vinu predstavlja več kot 90 % skupnih hlapnih organskih kislin. Njena običajna vsebnost je v mejah med 0,2 in 1 g/L. V manjših koncentracijah (<0,3 g/L) je očetna kislina zaželena aromatična spojina vina, saj prispeva h kompleksnosti okusa in vonja vina, predvsem pa je pomembna pri tvorbi acetatnih estrov (etil- in izoamil acetat), ki prispevajo k sadnim aromam vina. V večjih koncentracijah (>0,8 g/L) pa očetna kislina postane moteča in daje vinu vonj po kislu. Optimalna vsebnost očetne kisline v vinu je nekje med 0,2 in 0,7 g/L (Erasmus in sod., 2004; Aranda in sod., 2011). Povečana vsebnost očetne kisline v vinu je večinoma posledica delovanja očetnokislinskih bakterij, vendar tudi vinske kvasovke med AF tvorijo očetno kislino. V

zdravem moštu z zmerno vsebnostjo sladkorja (<220 g/L), kvasovke vrste *S. cerevisiae* tvorijo relativno majhne količine očetne kisline (0,1-0,3 g/L), kar je odvisno od seva kvasovk (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Tvorba očetne kisline pri kvasovkah vrste *S. cerevisiae* je kompleksna. Kvasovke med AF tvorijo acetat kot intermediat v piruvat-dehidrogenazni poti, ki vključuje pretvorbo piruvata v acetaldehid s pomočjo encima piruvat dekarboksilaze in nadaljnjo oksidacijo v acetat s pomočjo encima aldehid dehidrogenaze (ALD) (slika 3). Acetat se nato pretvori v acetyl-CoA s pomočjo encima acetyl CoA sintaza (ACS). Pomanjkanje encima ACS verjetno povzroči povečanje vsebnosti acetata. Tvorba očetne kisline pri kvasovkah torej predstavlja ravnovesje med aktivnostjo encimov ALD in ACS; kvasovke z nizko aktivnostjo ALD in visoko aktivnostjo ACS tvorijo manj očetne kisline (Verduyn in sod., 1990).

Kot omenjeno, različne vrste kvasovk rodu *Saccharomyces* tvorijo med AF zelo različne koncentracije očetne kisline (Patel in Shibamoto, 2002; Torrens in sod., 2008). Sevi kvasovk vrste *S. bayanus* tvorijo značilno manj očetne kisline kot sevi kvasovk vrste *S. cerevisiae* (Erasmus in sod., 2004). Od sedmih preizkušenih komercialnih sevov kvasovk je med AF največje količine očetne kisline tvoril sev kvasovk VIN7 (0,5 g/L), najmanjše pa sev kvasovk VIN13 (0,2 g/L) (Swiegers in sod., 2009). Velika količina očetne kisline, ki jo običajno tvori sev kvasovk VIN7, ni bila prisotna v vinih s ko-inokulacijo tega seva kvasovk s sevi kvasovk QA23 ali VIN13 (King in sod., 2008). Za zmanjšanje vsebnosti očetne kisline v vinu so številni avtorji predlagali uporabo mešanih kultur *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* rodov kvasovk za izvedbo AF (Moreno in sod., 1991; Bely in sod., 2008; Comitini in sod., 2011). Comitini in sod. (2011) so pokazali, da mešana kultura kvasovk rodu ne-*Saccharomyces* (*Lachancea thermotolerans*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Torulasporea delbrueckii*) s kvasovkami vrste *S. bayanus* (EC1118) tvori manjše koncentracije očetne kisline v vinu kot čista kultura kvasovk vrste *S. bayanus*.

Dejavniki, ki vplivajo na tvorbo očetne kisline med AF, so poleg seva kvasovk tudi vsebnost dušika (Vilanova in sod., 2007), vrednost pH in vsebnost sladkorjev v moštu ter temperatura AF (Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Pri večjih začetnih vsebnostih sladkorjev v moštu kvasovke med AF tvorijo večje količine očetne kisline, kar je reden pojav v vinih posebne kakovosti, kot sta suhi jagodni izbor in ledeno vino (Erasmus in sod., 2004). Velike vsebnosti dušika v moštu običajno vodijo v povečano tvorbo očetne kisline (Vilanova in sod., 2007). Enak učinek ima tudi zelo nizek pH (<3,1) ali zelo visok pH (>4), pomanjkanje nekaterih aminokislin in vitaminov v moštu ter previsoka temperatura (25-30 °C) v eksponentni fazi rasti kvasovk (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

2.2.6 Fenolne spojine v vinu

Fenolne spojine v vinu izvirajo predvsem iz grozdja in jih v splošnem delimo na flavonoide (antociani, flavonoli, flavan-3-oli) in neflavonoide (hidroksicimetne kisline, hidroksibenzojeve spojine, stilbeni). Neflavonoidi predstavljajo 80 % vseh fenolnih spojin v belih vinih. Fenolne spojine v vinu so izrednega pomena, saj vplivajo na barvo, vonj in okus vina, so močni antioksidanti, konzervansi, delujejo protimikrobno in predstavljajo osnovo za zorenje in staranje vina (Jackson, 2000). Vinske kvasovke so zadovoljivo odporne na protimikrobne učinke fenolnih spojin, inhibitorno delujeta na kvasovke le galna in elagova kislina v večjih vsebnostih (Aranda in sod., 2011).

Zaradi svoje antioksidativne narave so fenolne spojine glavni povzročitelji porjavenja pri belih vinih, ki se pojavi med vinifikacijo in vpliva na videz, aromo in okus vina. Porjavenje je lahko encimsko, ki skoraj v celoti poteče v moštu, ali pa je neencimsko (kemijska oksidacija), ki pa se pojavi večinoma med staranjem vina (Oliveira in sod., 2011). Encimsko porjavenje mošta vključuje delovanje dveh skupin encimov: polifenol oksidaz (kateholoksidaze, tirozinaze, fenolaze, kresolaze in *o*-difenoloksidaze), ki izvirajo iz grozdja, in lakaz, ki izvirajo iz grozdja, okuženega s plesnijo vrste *Botryotinia fuckeliana*. V prisotnosti kisika polifenol oksidaze oksidirajo hidroksicimetne kisline (HCK), ki predstavljajo glavno skupino fenolnih spojin v belih moštih, do *orto*-kinonov kaftarne kisline. Nastali *o*-kinoni se lahko naprej polimerizirajo v rjave pigmente (Singleton in sod., 1985; Betés-Saura in sod., 1996; Waterhouse, 2002). Neencimsko porjavenje mošta nastopi z oksidacijo fenolnih spojin do pripadajočih kinonov in nadaljnjo polimerizacijo do rjavih pigmentov. Rjavi pigmenti nastanejo tudi s polimerizacijskimi reakcijami med fenoli in drugimi spojinami v vinu, vključno z acetaldehidom in glioksalno kislino. Fenolne spojine, ki so najbolj podvržene kemijski oksidaciji v vinu, so kavna in kaftarna kislina, katehin, epikatehin in galna kislina (Li in sod., 2008).

2.2.6.1 Hidroksicimetne kisline

HCK so glavna skupina neflavonoidnih fenolnih spojin v belih vinih in so tudi prve, ki se oksidirajo ter začnejo proces porjavenja mošta. V nepoškodovani grozdni jagodi so HCK predvsem v vakuolah in niso v stiku z encimom polifenol oksidazo, ki se nahaja v citoplazmi. Ko pa grozdno jagodo stisnemo v prisotnosti kisika, se membranski sistem poškoduje in polifenol oksidaze pretvorijo HCK v reaktivne elektrofilne *o*-kinone. Polifenol oksidaza najprej pretvori kutarno v kaftarno kislino, ki jo tirozinaza naprej oksidira v *o*-kinon kaftarne kisline (Singleton in sod., 1985; Waterhouse, 2002). Ti *o*-kinoni so zelo reaktivni in hitro oksidirajo druge spojine mošta, predvsem askorbinsko kislino, SO₂ in druge *o*-difenoole (Cheynier in Van Hulst, 1988; Rigaud in sod., 1991).

HCK so v grozdju v obliki *cis*- in *trans*-izomernih oblik kaftarne, kutarne in fertarne kisline, ki so estri HCK kavne, *p*-kumarne in ferulne kisline. Proste HCK (kavna, *p*-kumarna in ferulna kislina) se v grozdju le redko pojavljajo; v vinu je njihova prisotnost posledica hidrolize, ki jo katalizirajo encimi kvasovk in/ali grozdja, ali posledica kislinske hidrolize njihovih estrov (zaradi nižje pH vrednosti vina) (Somers in sod., 1987; Vanzo in sod., 2007).

Vsebnost HCK je v grozdju sort žlahtne vinske trte (*Vitis vinifera* L.) zelo različna, kar je odvisno predvsem od letnika, lege vinograda in nekaterih vinogradniških dejavnikov. V največjih količinah je vedno prisotna kaftarna kislina (okrog 170 mg/kg grozdja), sledi kutarna kislina (okrog 20 mg/kg) in nato fertarna kislina (okrog 5 mg/kg) (Ong in Nagel, 1978; Singleton, 1987). V kasnejših raziskavah so v grozdnem soku belih sort v največjih količinah določili *trans*-kaftarno kislino (15-20 mg/L), nato *trans*-kutarno kislino (10-12 mg/L) in *cis*-kutarno kislino (okrog 10 mg/L) (Betés-Saura in sod., 1996). Med AF se vsebnost HCK zmanjša za približno 27 %, z izjemo *trans*-kavne kisline, katere koncentracija se poveča na račun hidrolize *trans*-kaftarne kisline (Betés-Saura in sod., 1996). V belih vinih se vsebnost skupnih HCK giblje med 80 in 166 mg/L (Waterhouse, 2002; Vanzo in sod., 2007).

Kvasovke lahko z adsorpcijo nekaterih HCK, predvsem *p*-kumarne kisline, zmanjšajo vsebnost HCK v vinu. Nekateri raziskovalci so pokazali, da imajo različni sevi kvasovk različen vpliv na vsebnost in sestavo HCK v vinu. Po končani AF so celične stene kvasovk zaščitene s polifenoli pred delovanjem hidrolitičnih encimov, na ta račun je upočasnjena tudi avtoliza kvasnih celic po končani AF (Aranda in sod., 2011). Kvasovke rodu *Dekkera* /*Brettanomyces* lahko v dveh encimsko kataliziranih reakcijah pretvorijo *trans*-ferulno in *trans-p*-kumarno kislino v hlapne fenole, ki z vonjem po konjskem znoju, hlevu in usnju negativno vplivajo na senzorično kakovost vina. V prvi reakciji encim hidroksicinamat dekarboksilaza pretvori omenjeni HCK v vinilfenole (4-vinilgvajakol, 4-vinilfenol), v drugi reakciji encim vinilfenol reduktaza pretvori vinilfenole v etilfenole (4-etilgvajakol, 4-etilfenol). Raziskave so pokazale, da lahko etilfenole tvorijo tudi nekateri sevi kvasovk vrste *Pichia guillermondi* ter nekatere mlečnokislinske bakterije v sintetičnem mediju, vinilfenole pa lahko tvorijo tudi številni sevi kvasovk tako rodov ne-*Saccharomyces* kot tudi *Saccharomyces* (Manzanares in sod., 2011).

2.3 NOSILCI SORTNE AROME VINA SAUVIGNON TER VPLIV KVASOVK NA NJIHOVO VSEBNOST V VINU

Bela vinska sorta 'Sauvignon' *Vitis vinifera* L. cv. izvira iz Francije (Bordeaux), kjer je poznana predvsem pod imenom 'Sauvignon Blanc'. Sorta se je kasneje razširila v številne vinorodne dežele z zmerno klimo, najbolj pa je izven Evrope razširjena v Čilu, Kanadi, Avstraliji, Novi Zelandiji, Južni Afriki, Braziliji in Kaliforniji. V Sloveniji predstavlja 6,7 % vseh sajenih sort, na letni ravni pa se pridelava okrog 1.800.000 L vina te sorte. Skoraj vsa pridelava vina te sorte je omejena na vinorodno deželo Primorska (99,77 %), znatno manjše količine pa pridelajo v vinorodni deželi Podravje (0,16 %) in Posavje (0,07 %) (Mavrič Štrukelj in sod., 2012; Rusjan in sod., 2012).

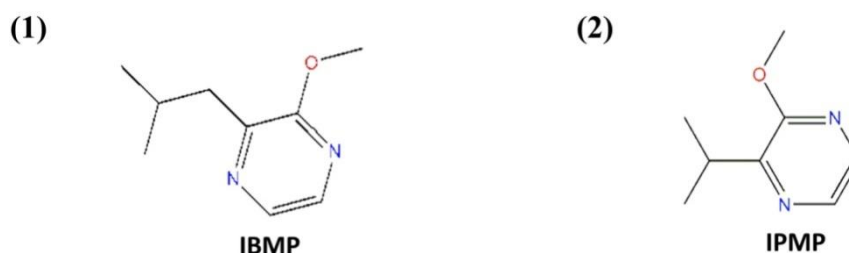
Tako v Sloveniji kot v svetu je sorta sauvignon postala ena od najbolj priljubljenih belih sort, saj imajo vina te sorte intenzivno in kompleksno tipično aromo, ki je lahko prepoznavna in jo opisujemo kot zeleno (aroma po zeleni papriki, paradižnikovih listih, špargljih) ali kot tropsko (aroma po pasijonki, grenivki, kosmuljah, guavi). Nosilci arome po zelenem so predvsem metoksipirazini, medtem ko tropski karakter vinu dajejo predvsem hlapni tioli. Obe vrsti spojin izvirata iz grozdja, s tem da se hlapni tioli nahajajo v grozdju v obliki nehlapnih, nearomatičnih prekurzorjev in se sprostito šele med AF s pomočjo vinskih kvasovk. V zadnjem času so omenjene aromatične hlapne spojine in njihovi prekurzorji v grozdju predmet številnih raziskav. Prav tako so se metode pridelave vina sorte sauvignon v zadnjem času bistveno spremenile in med drugim vključujejo AF v lesenih sodih in zorenje vina na drožeh (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Swiegers in sod., 2009).

Aroma vina sorte sauvignon je v veliki meri odvisna od klimatskih razmer med dozorevanjem grozdja in zato odvisna od letnika pridelave. Najbolj aromatična vina te sorte pridelujejo na Novi Zelandiji, kar je posledica njihovega hladnega podnebja in najmanj aromatična v mediteranskem podnebju (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Swiegers in sod., 2009). Na izoblikovanje aromatičnega profila vina sauvignon poleg klimatskih razmer vplivajo še številni drugi vinogradniški in vinifikacijski dejavniki, eden poglobitnejših je izbira primerne starterske kulture kvasovk za izvedbo AF.

2.3.1 Metoksipirazini

Metoksipirazini (MPZ) so heterociklične spojine z dušikom, ki dajejo vinu sauvignon značilno aromo po zelenem, travnatem, zeliščnem, kosmuljah, beluših in zelenem popru (Allen in sod., 1991). Najpogostejša in pomembnejša MPZ sta 3-izobutil-2-metoksipirazin (IBMP), ki ga povezujemo z bolj zelenimi, zeliščnimi ali rastlinskimi aromami (zelena paprika, beluši), in 3-izopropil-2-metoksipirazin (IPMP), ki pa ga povezujemo z bolj zemeljskimi in zelenjavnimi aromami (slika 5) (Allen in sod., 1991; Lacey in sod., 1991; Belancic in Agosin, 2007). Prag zaznave MPZ je zelo

nizek – okrog 2 ng/L (v vodni raztopini) oz. okrog 8 ng/L (v vinu sauvignon) za IBMP in okrog 2 µg/L (v vodni raztopini) za IPMP. Vsebnosti IPMP v moštu in vinu so običajno okrog sedemkrat manjše od vsebnosti IBMP, zato IPMP ne vpliva na aromo vina, medtem ko imajo lahko večje vsebnosti IBMP negativen vpliv na aromo vina (Allen in sod., 1991; Belancic in Agosin, 2007). Vsebnosti IBMP v moštih in vinih so zelo različne in odvisne od klimatskih razmer, sorte, gostote listne površine in zrelosti grozdja. Nekateri avtorji poročajo o vsebnostih IBMP v moštu in vinu med 2 in 40 ng/L (Lacey in sod., 1991; Bakker in Clarke, 2012), medtem ko drugi poročajo o vsebnostih med 5 in 13 ng/L (Šuklje in sod., 2012).



Slika 5: Strukturni formuli 3-izobutil-2-metoksipirazina (IBMP) (1) in 3-izopropil-2-metoksipirazina (IPMP) (2) (El-Sayed, 2012)

Figure 5: The structural formula of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP) (1) and 3-isopropyl-2-methoxypyrazine (IPMP) (2) (El-Sayed, 2012)

MPZ se sintetizirajo v rastlinah kot sekundarni produkti presnove aminokislin. V grozdnih jagodah se začnejo akumulirati ob tvorbi grozdnih jagod, največja količina pa se jih akumulira v času med 30. in 50. dnevom zorenja grozdja. Akumulacija se ustavi po približno 50 dnevih zorenja jagod oz. z začetkom zmanjševanja vsebnosti jabolčne kisline in se začne zmanjševati 1-2 tedna pred polno zrelostjo grozdja kot posledica povečanja grozdnih jagod in s tem razredčenja njihove koncentracije (Scheiner in sod., 2009). Ker se v zadnji fazi dozorevanja grozdja koncentracija MPZ zmanjšuje, je za ohranitev arome po zelenem treba pri sorti sauvignon trgatev opraviti pred polno zrelostjo (Bavčar, 2009).

Poleg stopnje zrelosti grozdja na vsebnost MPZ v grozdu v veliki meri vplivajo tudi sorta grozdja, klimatske razmere, tla ter drugi vinogradniški in vinifikacijski postopki (Belancic in Agosin, 2007; Candelon in sod., 2010). Večje količine MPZ se ohranijo v hladnejših pridelovalnih območjih. Prav tako je vsebnost MPZ večja v grozdu, pridelanem v namakanih vinogradih in z večjo gostoto trt na površino (Lacey in sod., 1991; Marais, 1994; Sala in sod., 2005). Neposredna osvetlitev grozdja pospešuje razgradnjo MPZ zaradi njihove občutljivosti na svetlobo (fotodegradacija). Z odstranjevanjem listov pospešimo razgradnjo MPZ (Šuklje in sod., 2012), hkrati pa odstranjujemo zrele liste, ki vsebujejo do desetkrat več MPZ kot grozdje samo. Iz listov MPZ prehajajo tudi v grozdne jagode. Končna vsebnost MPZ v grozdu je torej odvisna od sinteze v listih, prenosa v grozdje in razpada pod vplivom svetlobe (Bavčar, 2009).

Vsebnost MPZ v moštu se poveča tudi z maceracijo, predvsem prvi dan po pecljanju in stiskanju grozdja, kar je posledica kontakta jagodnih kožic in pečk z grozdnim sokom, pri čemer metoksipirazini preidejo v mošt (Sala in sod., 2005).

Ker so metoksipirazini v moštu in vinu prisotni v zelo majhnih količinah, je njihova identifikacija in kvantifikacija zahtevna. Natančnejšo kvantifikacijo IBMP so dosegli z uporabo GC-MS in devteriranih internih standardov. Ta metoda je zelo zahtevna, saj vključuje destilacijo vina in ekstrakcijo IBMP s kation-izmenjevalnim gelom in ekstrakcijo tekoče-tekoče (Lacey in sod., 1991; Allen in sod., 1991). Kasneje so se pojavile enostavnejše in hitrejše metode za določanje metoksipirazinov z uporabo ekstrakcije tekoče-tekoče ter GC-MS in uporabo devteriranih internih standardov v analizi redčenja stabilnih izotopov (angl. SIDA – stable isotope dilution analysis) (Kotseridis in sod., 1999). Še višje izkoristke in nižje meje detekcije so dobili z metodo HS-SPME in GC-MS (King in sod., 2011; Šuklje in sod., 2012).

2.3.2 Hlapni tioli

Hlapni tioli 4-merkaptio-4-metilpentan-2-on (4MMP) (imenovan tudi 4-metil-4-sulfanilpentan-2-on, 4MSP), 3-merkaptioheksan-1-ol (3MH) (imenovan tudi 3-sulfanilheksan-1-ol, 3SH) in 3-merkaptioheksil acetat (3MHA) (imenovan tudi 3-sulfanilheksil acetat, 3SHA) dajejo vinu sauvignon značilno tropsko aromo (Darriet in sod., 1995; Tominaga in sod., 1996, 1998, 2000; Coetzee in Du Toit, 2012). Spojina 4MMP je v vinu sauvignon prisotna v precej večjih koncentracijah, kot je njen prag zaznave (0,8 ng/L) (Tominaga in sod., 1998), zato igra pomembno vlogo pri oblikovanju značilnih aromatskih profilov vina. 4MMP daje vinu aromo po pušpanu, pasijonki in črnem ribezu, v večjih koncentracijah pa spominja na vonj po mačjem urinu (Darriet in sod., 1995; Guth, 1997). V vinu sauvignon so 4MMP določili v koncentracijah med 4 in 24 ng/L. Spojina 3MH je v vinih sauvignon prisotna v največjih koncentracijah, in sicer med 200 in 5000 ng/L. Vinu daje aromo po grenivki, pasijonki in guavi in ima prag zaznave pri 60 ng/L (Tominaga in sod., 1996, 1998; Dubourdieu in sod., 2006; Dubourdieu in Tominaga, 2009). 3MHA daje vinu aromo po grenivki, pasijonki in pušpanu, ima nizek prag zaznave – 4 ng/L, v vinu sauvignon pa so ga določili v koncentracijah med 212-724 ng/L. 3MHA se med staranjem vina hidrolizira v 3MH. Hlapne tiole so določili tudi v vinu drugih sort, kot so colombard, chenin blanc, renski rizling, semillon, traminec, sivi pinot, scheurebe, bacchus, merlot in cabernet sauvignon (Tominaga in sod., 2000; Murat in sod., 2001b).

3MH je v vinu prisoten v dveh enantiomernih oblikah, *R*- in *S*-obliki, ki sta v suhih belih vinih običajno prisotni v razmerju 50:50. Njuna aroma se rahlo razlikuje, in sicer daje oblika *R*, s pragom zaznave 50 ng/L, aromo po grenivki in citrusih, medtem ko daje oblika *S*, s pragom zaznave 60 ng/L, aromo po pasijonki. Tudi 3MHA se v vinu pojavlja

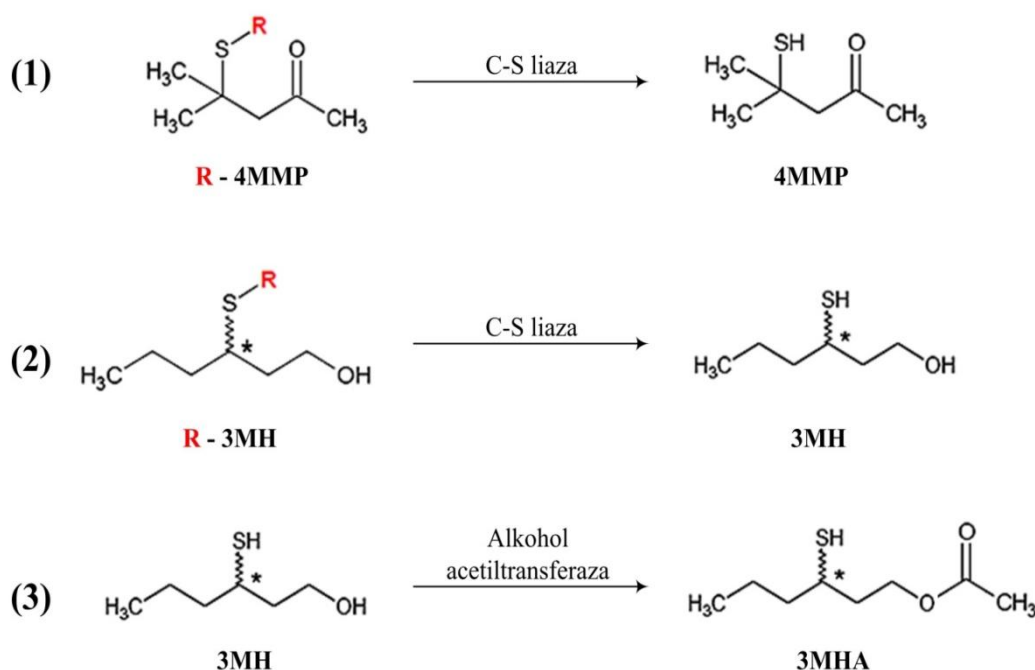
v dveh enantiomernih oblikah, običajno v razmerju 30:70 (*R:S*). Oblika *R*, s pragom zaznave 9 ng/L, daje vinu aromo po pasijonki, oblika *S*, s pragom zaznave 2,5 ng/L, pa daje aromo po zeliščih in pušpanu (Tominaga in sod., 2006).

Hlapna tiola 4MMP in 3MH se v grozdju nahajata v obliki nehlapnih, nearomatičnih prekurzorjev, ki so sestavljeni iz tiola (4MMP ali 3MH), vezanega na cistein ali glutation (slika 6 (1) in (2)) (Tominaga in sod., 1998; Peyrot des Gachons in sod., 2002; Subileau in sod., 2008). V grozdnem soku sorte sauvignon so identificirali prekurzorja za 3MH *S*-3-(heksan-1-ol)-L-cistein (Cys-3MH) (Tominaga in sod., 1998) in *S*-3-(heksan-1-ol)-glutation (Glut-3MH) kot pro-prekurzor za Cys-3MH (Peyrot des Gachons in sod., 2002). Kot potencialne prekurzorje za 4MMP pa so v grozdnem soku iste sorte identificirali 4-(4-metilpentan-2-on)-L-cistein (Cys-4MMP) (Tominaga in sod., 1995) in 4-*S*-glutacionil-4-metilpentan-2-on (Glut-4MMP) (Fedrizzi in sod., 2009). Sinteza Glut-3MH v grozdju in nadaljnja presnova do Cys-3MH se poveča z različnimi stresnimi dejavniki okolja preko aktivacije GSH *S*-transferaz (Kobayashi in sod., 2010). Mošt sort sauvignon in semillon je imel znatno večje vsebnosti prekurzorjev za hlapne tirole, če je bilo grozdje okuženo s plesnijo *Botryotinia fuckeliana* (Thibon in sod., 2009), ki izloča presnovke, ki stimulirajo tvorbo Cys-3MH v grozdnih jagodah (Thibon in sod., 2011).

2.3.2.1 Vpliv kvasovk na vsebnost hlapnih tiolov v vinu

Kvasovke med AF odcepijo tiol (4MMP ali 3MH) od ustreznega prekurzorja v moštu (slika 6 (1) in (2)), pri čemer tiol postane hlapen oz. aromatično aktiven (Darriet in sod., 1995). V raziskavi so Tominaga in sod. (1995) pokazali, da lahko encimski ekstrakt bakterij vrste *Eubacterium limosum*, ki vsebuje C-S liazne encime (podrazred liaz, ki cepi dvojno vez med ogljikom in žveplom), sprosti 4MMP iz prekurzorja Cys-4MMP. Tako je nastala hipoteza, da tudi kvasovke zelo verjetno sprostijo tirole s podobnim mehanizmom (s pomočjo C-S liaznih encimov). To hipotezo so preverili tako, da so laboratorijskemu sevu kvasovk vrste *S. cerevisiae* odstranili gene, ki domnevno kodirajo C-S liaze. Štirje od teh genov so vplivali na sproščanje hlapnega tiola 4MMP, iz česar lahko sklepamo, da mehanizem sproščanja verjetno vključuje več genov. Te štiri gene so odstranili pri komercialnem sevu kvasovk VL3, kar je vodilo v pričakovano zmanjšanje sproščanja 4MMP. Ugotovili so, da kvasovke vrste *S. cerevisiae* sproščajo 4MMP in 3MH iz njihovih prekurzorjev s pomočjo specifičnih β -liaz (Howell in sod., 2005). Tretji omenjeni tiol, 3MHA, se med AF tvori z esterifikacijo 3MH z očetno kislino s pomočjo kvasnega encima alkohol acetiltransferaze (slika 6 (3)) (Swiegers in sod., 2007).

Vinske kvasovke imajo omejeno sposobnost sproščanja tiolov iz njihovih prekurzorjev. V raziskavah so namreč ugotovili, da se le manjši delež (1,6 %) Cys-3MH sprosti v obliki 3MH (Dubourdieu in sod., 2000). Pri vinifikaciji mošta cabernet sauvignon in merlot se je sprostil okrog 3,2 % 3MH iz vse razpoložljive količine Cys-3MH v moštu, skupna količina sproščenega 3MH pa je bila premosorazmerna količini prisotnih prekurzorjev – večja kot je bila vsebnost prekurzorjev v grozdju, večja je bila vsebnost tiolov v vinu (Murat in sod., 2001a). Vinske kvasovke torej sprostijo le majhen delež razpoložljivih tiolov iz njihovih prekurzorjev, kar pomeni, da velik delež potencialne arome ostane v vinu neizkoriščen.



Slika 6: Tvorba hlapnih tiolov iz njihovih prekurzorjev. Pretvorba posameznega prekurzorja (R-4MMP, R-3MH; R – cistein ali glutation) v hlapni tiol: 4-merkpto-4-metilpentan-2-on (4MMP) (1) in 3-merkptoheksan-1-ol (3MH) (2) ter pretvorba 3MH v 3-merkptoheksil acetat (3MHA) (3)

Figure 6: Formation of volatile thiols from their precursors. Conversion of each precursor (R-4MMP, R-3MH; R – cystein or glutathione) into volatile thiol: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) (1) and 3-mercaptohexan-1-ole (3MH) (2) and conversion of 3MH into 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) (3)

Posamezni sevi kvasovk imajo različno sposobnost sproščanja hlapnih tiolov iz njihovih prekurzorjev kot tudi pretvorbe 3MH v 3MHA (Murat in sod., 2001b, Howell in sod., 2004; Dubourdieu in sod., 2006; Swiegers in sod., 2009). To sposobnost določajo genetske in fiziološke lastnosti kvasovk. Sposobnost sproščanja hlapnih tiolov pri različnih komercialnih sevih kvasovk so določali že številni avtorji. Murat in sod. (2001b) so v raziskavi pokazali, da komercialni sevi kvasovk vrste *S. cerevisiae* VL3 in EG8 sprostijo več hlapnih tiolov v primerjavi s sevi kvasovk VL1 in 522d ter da sevi kvasovk vrste *S. bayanus* v splošnem sprostijo več 4MMP kot sevi kvasovk vrste

S. cerevisiae. Vina, pridelana s hibridnimi sevi kvasovk *S. cerevisiae*/*S. bayanus*, so vsebovala največje vsebnosti hlapnih tiolov. V kasnejših raziskavah so za pridelavo vina sauvignon uporabili sedem komercialnih sevov kvasovk (vključno z VL3), s katerimi so pridobili zelo različne vsebnosti hlapnih tiolov, sev kvasovk VIN7 je sprostil največ 4MMP in 3MHA, sev kvasovk VIN13 pa je sprostil največ 3MH (Swiegers in sod., 2006).

Ko so v modelnih AF preverjali, koliko 3MH lahko različni komercialni sevi kvasovk pretvorijo v 3MHA, so ugotovili, da v nekaterih primerih ta sposobnost ni v povezavi s sposobnostjo sproščanja ostalih hlapnih tiolov, saj so nekateri sevi kvasovk izkazali visoko sposobnost pretvorbe 3MH v 3MHA, vendar niso imeli sposobnosti sproščanja značilnih količin hlapnih tiolov iz njihovih prekurzorjev. Vsebnost 3MHA v vinu sauvignon je bila zelo različna glede na uporabljen sev kvasovk, in sicer so največje vsebnosti 3MHA v vinu pridobili z uporabo seva kvasovk VIN7, ki sta mu sledila seva QA23 in NT116, največjo sposobnost pretvorbe 3MH v 3MHA pa so določili pri sevu kvasovk QA23, ki sta mu sledila seva NT116 in VL3 (Swiegers in sod., 2005, 2006). Večja vsebnost 3MHA v vinu torej ne pomeni nujno, da ima sev kvasovk visoko sposobnost pretvorbe 3MH v 3MHA, saj se mora 3MH najprej sprostiti, da se lahko nato pretvori v 3MHA. Sev kvasovk VIN7 sprosti veliko 3MH in je tako na voljo veliko tega tiola, ki se lahko pretvori v 3MHA. Čeprav sev kvasovk VIN7 ni najboljši pretvornik 3MH v 3MHA, imajo vina, pridelana s tem sevom, velike vsebnosti 3MHA preprosto zato, ker sprosti veliko 3MH, iz katerega nastane 3MHA. Raziskava je pokazala, da imata dva seva kvasovk z najmanjšo sposobnostjo sproščanja tiolov največjo sposobnost pretvorbe 3MH v 3MHA. Zato se za povečanje vsebnosti 3MHA priporoča uporaba kombinacij sevov kvasovk z visoko sposobnostjo sproščanja tiolov s sevi kvasovk z visoko sposobnostjo pretvorbe 3MH v 3MHA. Na ta način lahko bistveno povečamo intenzivnost arome vina, saj ima 3MHA nižji prag zaznave kot 3MH. Glede na izsledke teh raziskav, bi za mešane kulture, ki tvorijo večje koncentracije 3MHA, lahko uporabili enega od sevov kvasovk z veliko sposobnostjo pretvorbe 3MH v 3MHA, kot so QA23 ali NT116, v kombinaciji s sevom kvasovk z veliko sposobnostjo sproščanja 3MH, kot so VIN7, VIN13, VL3 ali X5 (Swiegers in sod., 2006). V nadaljnjih raziskavah so zato King in sod. (2008) izvedli AF mošta sauvignon z inokulacijo mešanih kultur komercialnih sevov kvasovk VIN7, QA23 in VIN13 v različnih kombinacijah ter določili vsebnost hlapnih tiolov v vinu. Največje vsebnosti 3MH in 3MHA so določili v vinih z mešano kulturo VIN7/QA23, kar pa se ni odrazilo pri kombinaciji kvasovk VIN7/VIN13. Z uporabo komplementarnih kvasovk v mešani kulturi za izvedbo AF lahko torej izboljšamo aromatske lastnosti vina (King in sod., 2008).

2.3.2.2 Drugi dejavniki, ki vplivajo na vsebnost hlapnih tiolov v vinu

Temperatura AF bistveno vpliva na vsebnost hlapnih tiolov v pridelanem vinu. Masneuf-Pomarède in sod. (2006) so v raziskavi pokazali, da kvasovke pri višji temperaturi AF (20 °C) sprostijo večje količine vseh treh hlapnih tiolov kot pri nižji temperaturi AF (13 °C), ne glede na uporabljen sev kvasovk. Ravno nasprotno so Swiegers in sod. (2006) pokazali, da se sprostijo več 4MMP in pretvori več 3MH v 3MHA pri nižji temperaturi AF (18 °C) kot pri višji (23 in 28 °C). V raziskavi, ki so jo opravili Howell in sod. (2004), so nekateri sevi sprostili večje koncentracije 4MMP pri nižji temperaturi (18 °C), nekateri pa pri višji (28 °C).

V raziskavi, kjer so Swiegers in sod. (2009) opravili AF mošta sauvignon v dveh volumnih fermentorjev (20 in 5000 L), so ugotovili, da v manjših delovnih volumnih fermentorjev največ 4MMP sprosti sev kvasovk VIN7, kateremu sledita seva VIN13 in VL3. Največ 3MH je sprostil sev kvasovk VIN13, ki mu sledita seva VIN7 in X5. Pri AF v večjih delovnih volumnih so v vinu, pridelanem s sevom kvasovk VIN7, prav tako določili največjo vsebnost 4MMP, sledila pa sta mu seva X5 in VIN13. Največ 3MH je v velikih fermentorjih sprostil sev kvasovk VIN7, sledili pa so mu sevi X5, VL3 in VIN13. Čeprav je prišlo do razlik med sposobnostjo sproščanja hlapnih tiolov v majhnih fermentorjih v primerjavi z velikimi, se je pokazal značilen trend, ki razdeli seve kvasovk na skupino, ki sprosti veliko tiolov in skupino, ki jih sprosti malo, ne glede na delovni volumen fermentorja.

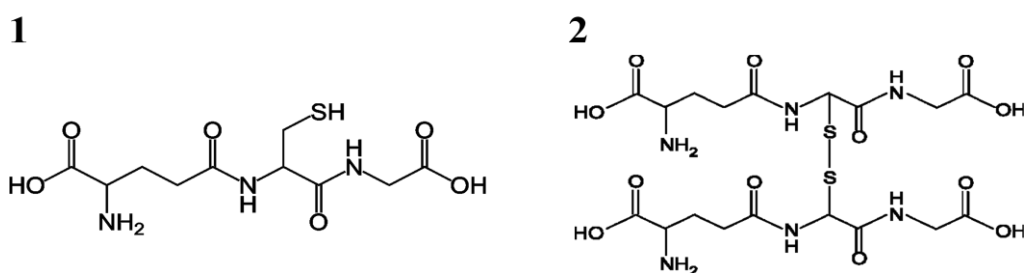
2.3.2.4 Analitske metode za določanje hlapnih tiolov v vinu

Metoda za določanje hlapnih tiolov v vinu, ki so jo predpostavili Tominaga in sod. (1998), temelji na selektivni ekstrakciji tiolov iz ekstrakta vina v diklormetanu z uporabo reverzibilne kelacije med SH-skupino in natrijevim *p*-hidroksimerkuribenzoatom. Za identifikacijo in kvantifikacijo hlapnih tiolov so uporabili plinsko kromatografijo z masno spektrometrijo (GC-MS). S to metodo so določili 4MMP, 3MH in 3MHA v vinu sauvignon z zadovoljivo ponovljivostjo. Vendar pa je imela ta metoda dve veliki pomanjkljivosti – slabo specifičnost za analize 4MMP in možnost razgradnje 3MHA v 3MH zaradi alkalnih pogojev ekstrakcijskega postopka. Kasneje so razvili številne metode, ki so temeljile na podobnem postopku ekstrakcije, vendar s številnimi izboljšavami za odpravo pomanjkljivosti obstoječe metode (Ferreira in sod., 2007; Fedrizzi in sod., 2008; Mateo-Vivaracho in sod., 2007, 2009). Natančnost metode se je bistveno izboljšala z razvojem uporabe SIDA (Schneider in sod., 2003; Rodriguez-Bencomo in sod., 2009; Capone in sod., 2011). Ta tehnika kvantifikacije zahteva sintezo izotopsko označenih analogov tiolov, ki se uporabijo kot interni standardi. Zadnji pomembnejši napredek v kvantifikaciji tiolov je povezan z določanjem enantiomernih oblik 3MH in 3MHA v vinih (Tominaga in sod., 2006). Danes se za

kvantifikacijo hlapnih tiolov v vinu uporablja predvsem GC-MS z direktnim injiciranjem ter z uporabo SIDA, za določanje prekurzorjev hlapnih tiolov pa se ta metoda kombinira s HPLC-MS/MS (Rodriguez-Bencomo in sod., 2009; Capone in sod., 2011).

2.4 GLUTATION V MOŠTU IN VINU TER VPLIV KVASOVK IN DRUGIH DEJAVNIKOV VINIFIKACIJE NA NJEGOVO VSEBNOST

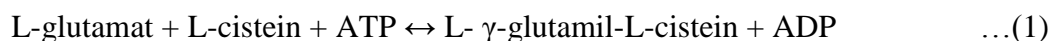
Glutation (GSH) ali γ -L-glutamil-L-cisteinilglicin je najbolj razširjena neproteinska tiolna spojina, ki je prisotna v živih organizmih, tako v prokariotih kot eukariotih. Sestavljen je iz treh aminokislin – glutaminske kisline, cisteina in glicina (slika 7 (1)). Glutaminska kislina in cistein sta med seboj povezana z γ -peptidno vezjo, ki preprečuje hidrolizo GSH z večino od peptidaznih encimov, zato ne oksidira tako hitro kot njegova prekurzorja cistein in γ -glutamilcistein (Anderson, 1998).



Slika 7: Strukturni formuli glutationa (GSH) (1) in glutation disulfida (GSSG) (2) (Glutathione, 2011)

Figure 7: Structural formula of glutathione (GSH) (1) and glutathione disulfide (GSSG) (2) (Glutathione, 2011)

V celicah se GSH tvori z zaporednim delovanjem encimov γ -glutamilcistein sintetaze (1) in GSH sintetaze (2) (Anderson, 1998):



Glutation se v celicah pojavlja v reducirani obliki (GSH) in oksidirani obliki kot glutation disulfid (GSSG) (slika 7 (2)), lahko pa je tudi v obliki mešanih disulfidov – GS-S-Cys in GS-S-CoA (Fahey, 2001). V celici je več kot 90 % GSH v reducirani obliki, ki je kot tak biološko pomemben predvsem zaradi proste sulfhidrilne (-SH) skupine na cisteinskem ostanku. Oksidirana oblika se lahko s pomočjo encima glutation reduktaze reducira nazaj v GSH (Anderson, 1998; Li in sod., 2004).

Glutation je v celicah prisoten v velikih koncentracijah (do 10 mM) in ima številne pomembne funkcije: sodeluje kot koencim in je povezan s transportom aminokislin, s

presnovno in ohranjanjem tiolnih molekul, proteinov in nizkomolekularnih spojin (cistein, koencim A), z ohranjanjem askorbinske kisline v njeni reducirani obliki in s tvorbo deoksiribonukleotidov. Povezan je z osnovnimi celičnimi funkcijami, vzdrževanjem mitohondrijske strukture, integriteto membrane ter s celično diferenciacijo in razvojem (Pócsi in sod., 2004). GSH lahko encimsko (z glutation *S*-transferazami) ali ne-encimsko reagira s toksičnimi spojinami in ščiti celico pred oksidativnimi poškodbami, ki jih povzročijo reaktivne oblike kisika. Ker ima GSH zelo nizek redoks potencial ($E'_0 = -240$ mV) igra vlogo celičnega redoks pufra (Anderson, 1998; Walker, 1998). Tvorba GSH je povezana tudi s celičnim obrambnim mehanizmom, saj nekatere vrste kvasovk tvorijo velike znotrajcelične koncentracije GSH pri pomanjkanju hranil in oksidativnem stresu kot tudi med razmnoževanjem (Rollini in Manzoni, 2006).

GSH je tudi v človeškem telesu eden od najpomembnejših antioksidantov in se tvori v vseh organih, predvsem v jetrih. Igra pomembno vlogo pri antioksidativni zaščiti celic, presnovi hranil in regulaciji presnovnih poti, ki so ključnega pomena za homeostazo celotnega telesa. Današnji načina življenja, nezdrava prehrana, različni toksini iz okolja, prosti radikali, pesticidi, kemikalije, zdravila ter travma in stres, lahko vodijo v pomanjkanje GSH v telesu. Pomanjkanje GSH prispeva k pojavu oksidativnega stresa, ki igra ključno vlogo pri staranju in patogenezi številnih kroničnih bolezni, kot so srčne bolezni, kronične infekcije, Alzheimerjeva, Parkinsonova in avtoimunska bolezen, bolezen jeter, cistična fibroza, srpasta anemija, artritis, astma, rak in diabetes (Pastore in sod., 2003; Wu in sod., 2004). Vsebnost GSH v telesu lahko učinkovito povečamo z uživanjem živil, ki vsebujejo večje vsebnosti GSH ali njegovih prekurzorjev. Takšna živila so predvsem sadje in zelenjava (beluši, kapusnice, avokado, špinača, breskev, česen, čebula) ter surovo meso (Jones, 1995), kot tudi grozdje, mošt in pridelano vino.

2.4.1 GSH v grozdju in moštu

V grozdju se GSH sintetizira v citosolu in kloroplastih rastlinskih celic v že omenjenih dveh zaporednih reakcijah ((1) in (2)) in je med zorenjem grozdja v več kot 90 % v reducirani obliki. Z zorenjem grozdja se vsebnost reducirane oblike GSH povečuje. V rastlinah ima številne fiziološke in biokemijske funkcije, predvsem vzdrževanje redoks potenciala, detoksifikacijo in presnovo žvepla (Noctor in Foyer, 1998; Okuda in Yokotsuka, 1999; Dubourdieu in sod., 2004).

GSH so v grozdju prvič kvantitativno določili Cheynier in sod. leta 1989, in sicer v grozdju in moštu 28 sort žlahtne vinske trte (*Vitis vinifera* L.), v katerih so določili med 17 in 114 mg GSH/kg grozdja. Velike razlike v vsebnosti GSH niso bile odvisne le od sorte grozdja, pač pa tudi od letnika pridelave, lege vinograda in tehnoloških postopkov (Cheynier in sod., 1989). V kasnejših raziskavah so v grozdju določili GSH med 14 in

102 mg/L (Du Toit in sod., 2007; Janeš in sod., 2010). Vsebnost GSH v grozdju je odvisna od stopnje zrelosti grozdnih jagod (sladkorne stopnje) – vsebnost narašča od začetka zorenja grozdnih jagod do sladkorne stopnje 16 °Brix in je nato stabilna (Adams in Liyanage, 1993). Vsebnost GSH v grozdnih jagodah je odvisna tudi od vsebnosti dušika v tleh. Gnojenje z dušikom je vplivalo na povečanje vsebnosti GSH v grozdju belih sort (Lacroux in sod., 2008; Dubourdieu in Lavigne-Cruege, 2004). Vsebnost GSH v moštu pa je odvisna od številnih dejavnikov v procesu predelave grozdja. Zmanjšanje vsebnosti GSH je lahko posledica izpostavljenosti grozdnega soka kisiku, visoke aktivnosti polifenol oksidaz (predvsem tirozinaz) in maceracije pred fermentacijo. S stiskanjem grozdja v reduktivnih razmerah lahko v veliki meri ohranimo vsebnost GSH v moštu (Du Toit in sod., 2007; Maggu in sod., 2007; Patel in sod., 2010).

2.4.2 Vloga GSH v vinarstvu

Vloga in uporaba GSH v vinarstvu je v zadnjem času predmet številnih raziskav, saj je eden od najpomembnejših antioksidantov v grozdju in kvasovkah ter posledično v moštu in vinu. V vinarstvu igra pomembno vlogo pri kontroli oksidativnega kvara vina, ki je pomemben problem v pridelavi belih vin, saj vodi v izgubo značilne arome ter razvoj neznačilnega starikavega tona in neželenih barvnih odtenkov. GSH igra pri oksidaciji mošta in vina ključno vlogo, saj veže oksidacijske produkte, ki se tvorijo med oksidacijo fenolnih spojin, in na ta način omeji količino rjavih pigmentov, obenem pa zaščiti številne aromatične spojine v vinu pred oksidacijo (Singleton in Cilliers, 1995; Du Toit in sod., 2007).

2.4.2.1 Antioksidativna aktivnost GSH v moštu in vinu

GSH s svojo -SH skupino deluje kot elektronsko bogat nukleofilni center, ki se vključi v elektrofilni obroč *o*-kinona kaftarne kisline, ki nastane pri oksidaciji HCK (Singleton in sod., 1985). Tako nastane tioeter 2-*S*-glutationil kaftarna kislina ali grozdni reakcijski produkt (GRP), ki pa ni substrat za nadaljnjo oksidacijo s polifenol oksidazo, čeprav ima *o*-dihidroksi fenolno strukturo (Salgues in sod., 1986; Cheynier in sod., 1986). Na ta način GSH »ujame« *o*-kinone v brezbarvno obliko in tako omeji tvorbo rjavih polimerov (Singleton in sod., 1985). Vsebnost GRP v belih vinih je običajno med 5 in 7 mg/L (Waterhouse, 2002). Čeprav je GRP neobčutljiv na delovanje polifenol oksidaz, pa je občutljiv na delovanje lakaz, ki so produkt plesni vrste *Botryotinia fuckeliana*. Lakaze oksidirajo GRP do 2,5-di-*S*-glutationil kaftarne kisline (GRP2), ki pa ni substrat za nadaljnjo oksidacijo z lakazami (Boulton in sod., 1996). Encimske oksidacijske reakcije so zelo občutljive na prisotnost kisika in SO₂. SO₂ inhibira polifenol oksidazo in s tem prepreči tvorbo GRP, zaradi česar se v moštu ohrani visok nivo prostih HCK z

visokim potencialom za porjavenje (Oliveira in sod., 2011). Če je v moštu prisotna zadostna količina GSH, *o*-kinoni kaftarne kisline reagirajo z GSH in porjavenje se ne pojavi. Sorte z velikimi vsebnostmi HCK in majhnimi vsebnostmi GSH imajo zato povečan potencial za porjavenje ob stiku s kisikom (Mattivi in sod., 2012).

2.4.2.2 Vpliv GSH na aromatične spojine v vinu

Hlapni tioli so občutljivi na oksidacijo med AF in predvsem med zorenjem vina. Predpostavili so, da jih GSH lahko zaščiti med staranjem v steklenicah. Dodatek 10-20 mg/L GSH v vino pred stekleničenjem se je odrazil z značilno večjo vsebnostjo 3MH v primerjavi s kontrolo po določenem času staranja v steklenicah (Dubourdieu in Lavigne-Cruege, 2004; Ugliano in sod., 2011). Prav tako lahko hlapni tioli zelo hitro reagirajo z *o*-kinoni, ki nastanejo pri oksidaciji HCK. GSH zaščiti hlapne tirole na ta način, da se prej veže na *o*-kinone oz. »tekmuje« zanje in na ta način omeji izgubo sortne arome (Cheynier in sod., 1986).

Kot je bilo že omenjeno zgoraj, je GSH prekurzor za hlapne tirole (Glut-3MH, Glut-4MMP). GSH lahko reagira z α,β -nenasičenimi karbonilnimi spojinami, kar vodi v tvorbo S-glutationilnih oblik (Peyrot des Gachons in sod., 2002; Fedrizzi in sod., 2009), ki se kasneje razgradijo do S-cisteinilnih oblik (Tominaga in sod., 1998). Tvorba vezanih oblik je povezana z razpoložljivostjo GSH in α,β -nenasičenih karbonilnih spojin (npr. (E)-2-heksenala) med zorenjem grozdja in v predfermentativnih fazah predelave grozdja (predvsem pri stiskanju).

2.4.3 Dejavniki, ki vplivajo na vsebnost GSH v vinu

Vinske kvasovke zelo različno vplivajo na koncentracijo GSH med AF, saj se je v nekaterih raziskavah vsebnost GSH med AF povečala (Park in sod., 2000a, 2000b; Lavigne in sod., 2007; Andujar-Ortiz in sod., 2012), v nekaterih pa zmanjšala (Du Toit, 2007; Patel in sod., 2010). GSH je pri kvasovkah vrste *S. cerevisiae* vpleten v številne mehanizme stresnega odziva, kot so pomanjkanje žvepla in dušika, oksidativni stres, detoksifikacija težkih kovin in ksenobiotikov (Penninckx, 2002). Med AF lahko GSH prehaja v kvasne celice ali iz njih preko specifičnih transporterjev (Miyake in sod., 1998; Dhaoui in sod., 2011) in na ta način kvasovke s porabo in izločanjem GSH med AF vplivajo na vsebnost GSH v vinu. Kvasovke na začetku AF, predvsem v prvih štirih dneh, porabljajo GSH kot vir žvepla in dušika, ki ga potrebujejo za rast in razmnoževanje (Penninckx, 2002; Dubourdieu in Lavigne-Cruege, 2004), zato na presnovo kvasovk zelo verjetno vpliva vsebnost ekstracelularnega GSH. Proti koncu AF in v prvih nekaj mesecih zorenja na drožeh se nekaj GSH z avtolizo kvasovk sprosti nazaj v vino. Kvasovke, ki tvorijo in sprostijo večje koncentracije GSH med AF in

zorenjem na drožeh, lahko torej prispevajo k stabilizaciji hlapnih tiolov in preprečujejo porjavenje (Dubourdieu in Lavigne-Cruege, 2004).

Vsebnost GSH v pridelanem vinu je lahko manjša, enaka ali večja od vsebnosti GSH v moštu, kar nakazuje na kompleksno in raznoliko biokemijo GSH med AF (Park in sod., 2000a, 2000b; Du Toit in sod., 2007; Lavigne in sod., 2007; Andujar-Ortiz in sod., 2012). Janeš in sod. (2010) so v 28 vinih sauvignon določili GSH v povprečju 12,5 mg/L. Med staranjem vina se vsebnost GSH običajno zmanjša (Lavigne in sod., 2007; Ugliano in sod., 2011). Lavigne in sod. (2007) so pokazali, da se vsebnost GSH v vinu poveča z zorenjem vina na drožeh. Različna izpostavljenost kisiku med staranjem vina v steklenicah prav tako vpliva na vsebnost GSH v vinu (Ugliano in sod., 2011). Vina sauvignon, ki so bila med staranjem v steklenicah izpostavljena manjšim koncentracijam kisika, so imela večje vsebnosti GSH kot vina, ki so bila med staranjem v steklenicah izpostavljena večjim koncentracijam kisika.

2.4.4 Analitske metode za določanje GSH

Za določanje GSH v grozdju, moštu in vinu uporabljamo številne metode. Encimske metode za določanje GSH v grozdnih jagodah in vinu temeljijo na reakciji GSH s 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojsko) kislino (DTNB), pri čemer nastane 2-nitro-5-tiobenzojska kislina, ki jo lahko spektrofotometrično določimo (absorpcija pri 412 nm) (Wang in sod., 2007). Za kvantifikacijo GSH in/ali GSSG v grozdnem soku in vinu so razvili številne metode tekočinske kromatografije in kapilarne elektroforeze (Park in sod., 2000b (HPLC-FD); Du Toit in sod., 2007 (HPLC ESI-MS/MS); Lavigne in sod., 2007 (CE LIF); Marchand in De Revel, 2010 (HPLC-FD); Janeš in sod., 2010 (HPLC-FD); Fracassetti in sod., 2011 (UPLC-PAD); Andújar-Ortiz in sod., 2012 (HPLC-FD)). Večina metod je dolgotrajnih, zahteva obsežno pripravo vzorca in derivatizacijo. Najnovejše objavljene metode za kvantifikacijo GSH v vinu ne zahtevajo derivatizacije. Mattivi in sod. (2012) so uporabili HPLC ESI-MS; Kritzinger in sod. (2013) so uporabili UPLC ESI-MS/MS, saj z velikimi koncentracijami SO₂ in askorbinske kisline inhibirajo oksidacijo GSH. Z razvojem analitskih metod so razvili metode, ki so kratkotrajne in občutljive ter primerne za rutinske analize velikega števila vzorcev.

3 MATERIAL IN METODE

Zaradi lažje predstavitve in interpretacije smo poskuse, opravljene v okviru doktorske disertacije, razdelili na šest tematskih delov. Posamezni poskusi, letniki pridelave mošta, delovni volumni fermentorjev in temperature alkoholnih fermentacij ter števila in iznake uporabljenih starterskih kultur kvasovk so predstavljeni v preglednici 1. Podrobnejši opis materialov in metod dela je predstavljen v nadaljevanju.

Preglednica 1: Poskusi, letniki pridelave mošta, delovni volumni fermentorjev in temperature alkoholnih fermentacij ter števila in oznake uporabljenih starterskih kultur kvasovk

Table 1: Experiments, vintages, working volumes and temperatures of alcoholic fermentation and the number of used yeast starter cultures

Poskusi	Letnik	Delovni volumen	Temperatura	Število in oznake starterskih kultur
Poskus 1 (1. del)	2009	120 mL	15 °C	5 (SK1-SK5)
Poskus 1 (2. del)	2009	120 mL	15 °C	5 (SK1-SK5)
Poskus 2	2009	3 L	15 °C	4 (SK6-SK9)
Poskus 3	2010	35 L	dve različni	6 (SK6, SK7, SK10-SK13)
Poskus 4	2010	25 in 2500 L	dve različni	3 (SK6, SK10, SK11)
Poskus 5	2011	35 L	dve različni	2 (SK6, SK10)

3.1 ZASNOVA POSKUSA

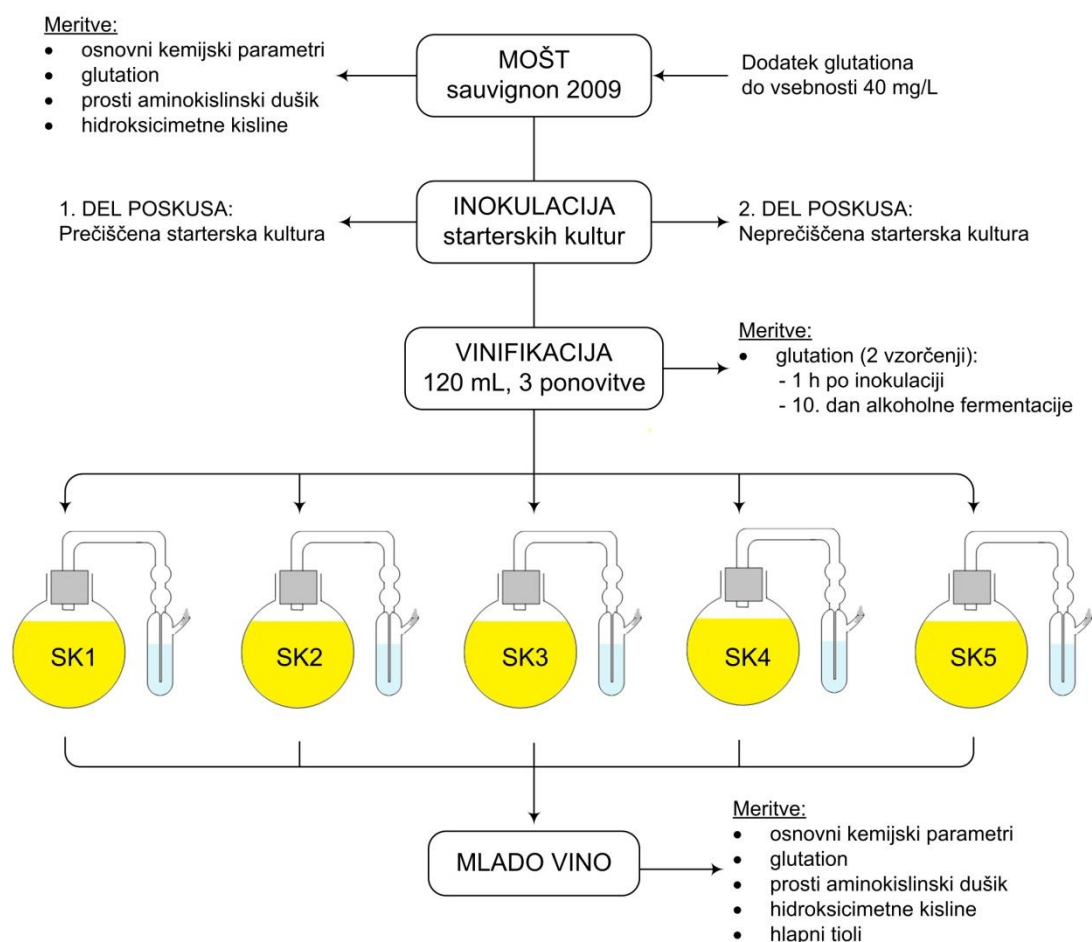
3.1.1 Poskus 1

Namen poskusa 1 je bil ugotoviti vpliv bakterij, prisotnih v komercialnih starterskih kulturah (OIV-oeno 329-2009 (OIV, 2012)), na delovanje kvasovk med alkoholno fermentacijo (AF). Osredotočili smo se predvsem na vpliv prečiščenih (brez prisotnih bakterij) in neprečiščenih (z običajno prisotnimi bakterijami) starterskih kultur kvasovk na vsebnost glutaciona (GSH) v različnih fazah AF in v pridelanem vinu, kot tudi na vsebnost drugih kemijsko in senzorično pomembnih parametrov vina.

V poskusu 1 smo zato izvedli mikrovinifikacije mošta letnika 2009 z izbranimi starterskimi kulturami (SK1-SK5) v prečiščeni in neprečiščeni obliki. Shema mikrovinifikacij je prikazana na sliki 8. V moštu smo določili osnovne kemijske parametre (vsebnost reducirajočih sladkorjev (RS) in hlapnih kislin (HK)) ter vsebnost prostega aminokislinskega dušika (FAN), hidroksicimetnih kislin (HCK) in GSH. Glede na začetno koncentracijo GSH v moštu smo moštu dodali GSH v reducirani obliki (Sigma Aldrich) do končne koncentracije 40 mg/L. Mošt smo razdelili v 120 mL steklene fermentorje in jih opremili s fermentacijskimi vehami.

V 1. delu poskusa 1 smo mošt inokulirali s petimi prečiščenimi starterskimi kulturami (SK1-SK5) v aseptičnih razmerah, v 2. delu pa smo v enakih razmerah inokulirali neprečiščene starterske kulture (SK1-SK5). Vse inokulacije smo izvedli v treh

ponovitvah. Med AF, ki je potekala pri kontrolirani temperaturi 15 °C, smo določali vsebnost GSH v različnih fazah AF – 1 h po inokulaciji starterske kulture in 10. dan AF. Po končani AF smo v pridelanih mladih vinih določili osnovne kemijske parametre ter vsebnost GSH, FAN, HCK, metoksipirazinov (v 2. delu poskusa 1) in hlapnih tiolov. Vina, pridelana v 1. delu poskusa 1, smo po končani AF prenesli na 4 °C, kjer smo jih pustili zoreti na drožeh tri mesece in pol ter spremljali vsebnost GSH v vinu v različnih fazah tekom zorenja – po mesecu in pol, po dveh mesecih in pol ter po treh mesecih in pol.



Slika 8: Shema poskusa 1 (SK1-SK5 – starterske kulture kvasovk (glej preglednico 3))

Figure 8: Scheme of the experiment 1 (SK1-SK5 - yeast starter cultures (see table 3))

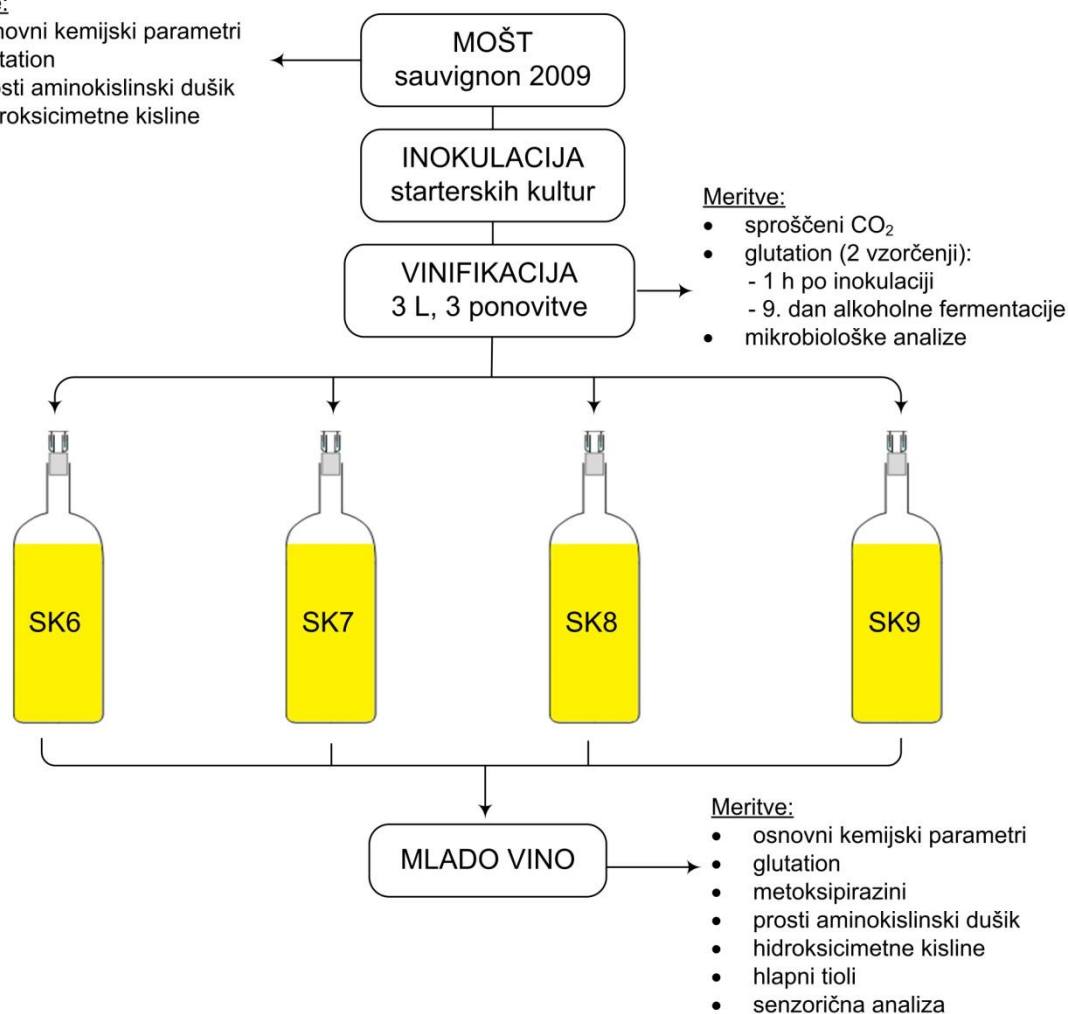
3.1.2 Poskus 2

V poskusu 2 smo izvedli mikroviniifikacije mošta letnika 2009 z izbranimi starterskimi kulturami, kot je prikazano na sliki 9. V moštu smo določili osnovne kemijske parametre (RS, HK, pH, in skupne kisline (SK) ter vsebnost FAN, HCK in GSH). Mošt smo razdelili v 3 L steklene fermentorje in jih opremili s fermentacijskimi vehami. Mošt smo inokulirali s štirimi starterskimi kulturami (SK6-SK9) v treh ponovitvah za vsako

startersko kulturo. Med AF, ki je potekala pri kontrolirani temperaturi prostora/kleti 15 °C, smo določali količino sproščenega CO₂ in vsebnost GSH ter izvedli mikrobiološke analize. Po končani AF smo v pridelanih mladih vinih določili osnovne kemijske parametre ter vsebnost GSH, FAN, HCK, metokspirazinov (MPZ) in hlapnih tiolov ter izvedli senzorično analizo z rangiranjem vzorcev (Meilgaard in sod., 1999).

Meritve:

- osnovni kemijski parametri
- glutation
- prosti aminokislinski dušik
- hidroksicimetne kisline



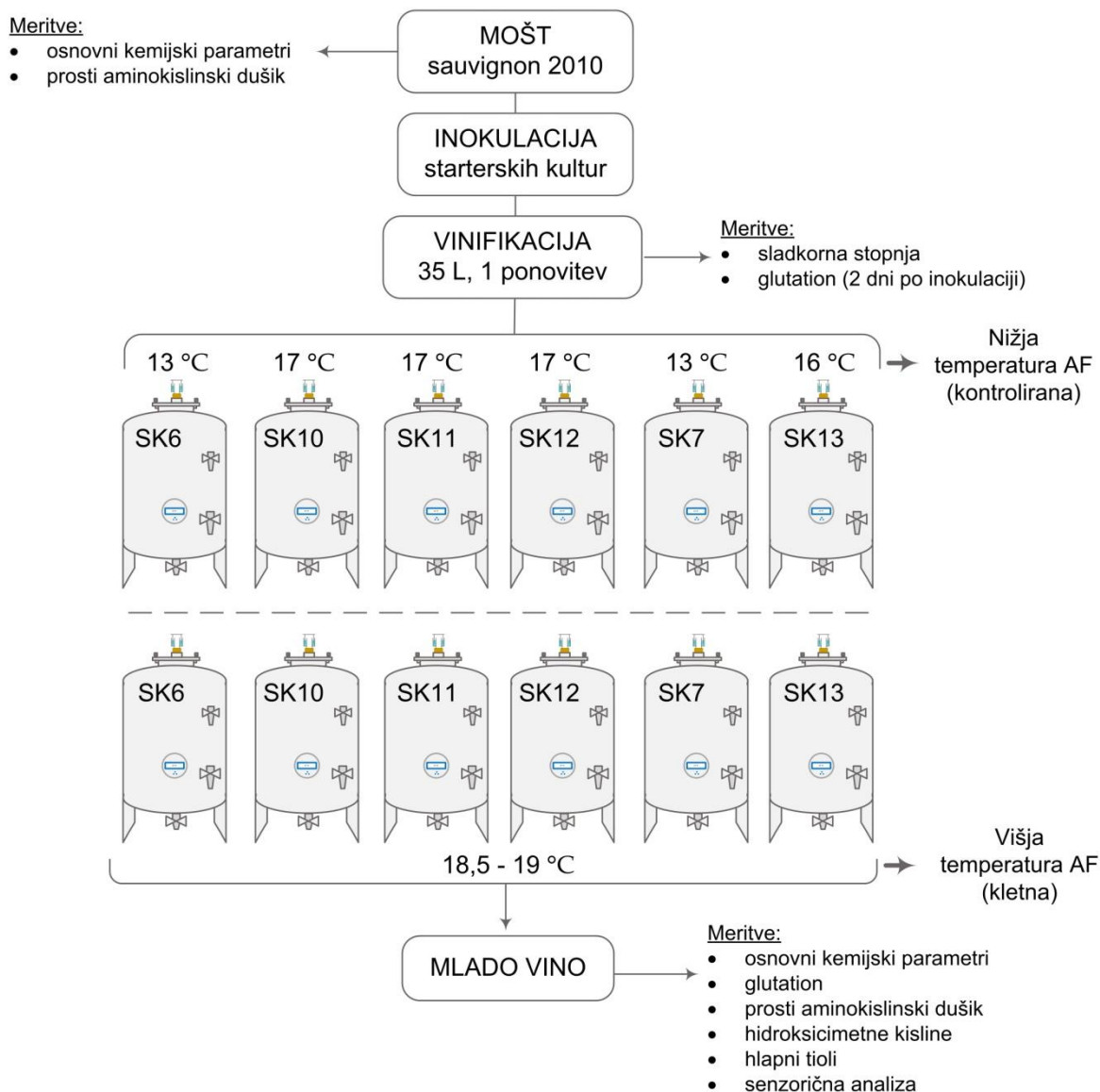
Slika 9: Shema poskusa 2 (SK6-SK9 - starterske kulture kvasovk (glej preglednico 4))

Figure 9: Scheme of the experiment 2 (SK6-SK9 - yeast starter cultures (see table 4))

3.1.3 Poskus 3

V poskusu 3 smo izvedli mikroviniifikacije mošta letnika 2010 z izbranimi starterskimi kulturami in pri različnih temperaturah AF, kot je prikazano na sliki 10. V moštu smo določili osnovne kemijske parametre (sladkorna stopnja, pH in SK) ter vsebnost FAN, ga razdelili v 35 L fermentorje iz nerjavnega jekla z možnostjo regulacije temperature in jih opremili s fermentacijskimi vehami. Mošt smo inokulirali s šestimi starterskimi kulturami (SK6, SK7, SK10-SK13) pri dveh temperaturah AF – kontrolirani

(nastavljena priporočena temperatura za posamezno startersko kulturo) oz. nižji temperaturi ter kletni (brez uravnavanja temperature v fermentorjih) oz. višji temperaturi. Med AF smo določali sladkorno stopnjo mošta in vsebnost GSH. V pridelanih mladih vinih smo določili osnovne kemijske parametre ter vsebnost GSH, FAN, HCK in hlapnih tiolov ter izvedli senzorično analizo.

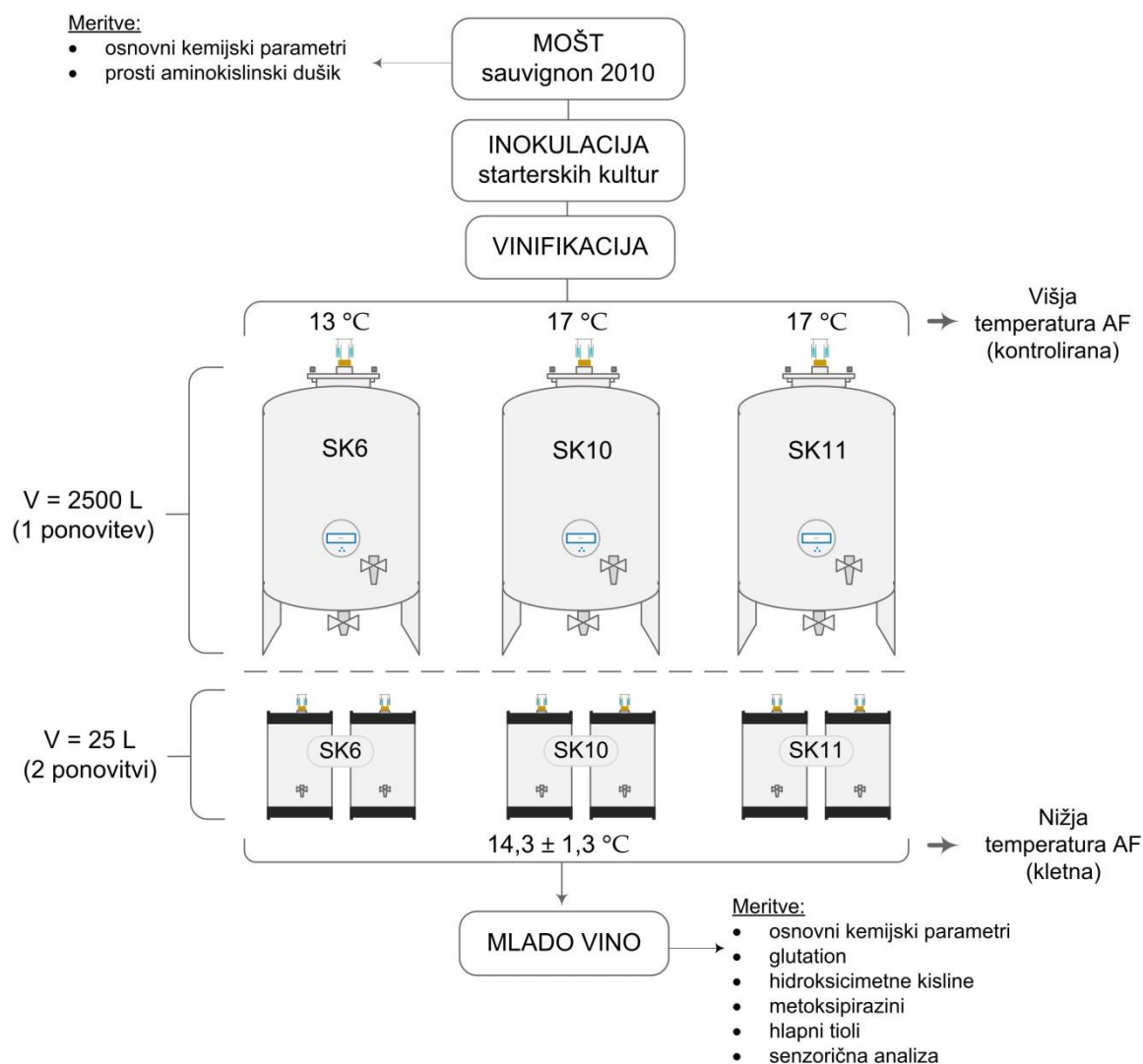


Slika 10: Shema poskusa 3 (SK6, SK7, SK10-SK13 - starterske kulture kvasovk (glej preglednico 5))

Figure 10: Scheme of the experiment 3 (SK6, SK7, SK10-SK13 - yeast starter cultures (see table 5))

3.1.4 Poskus 4

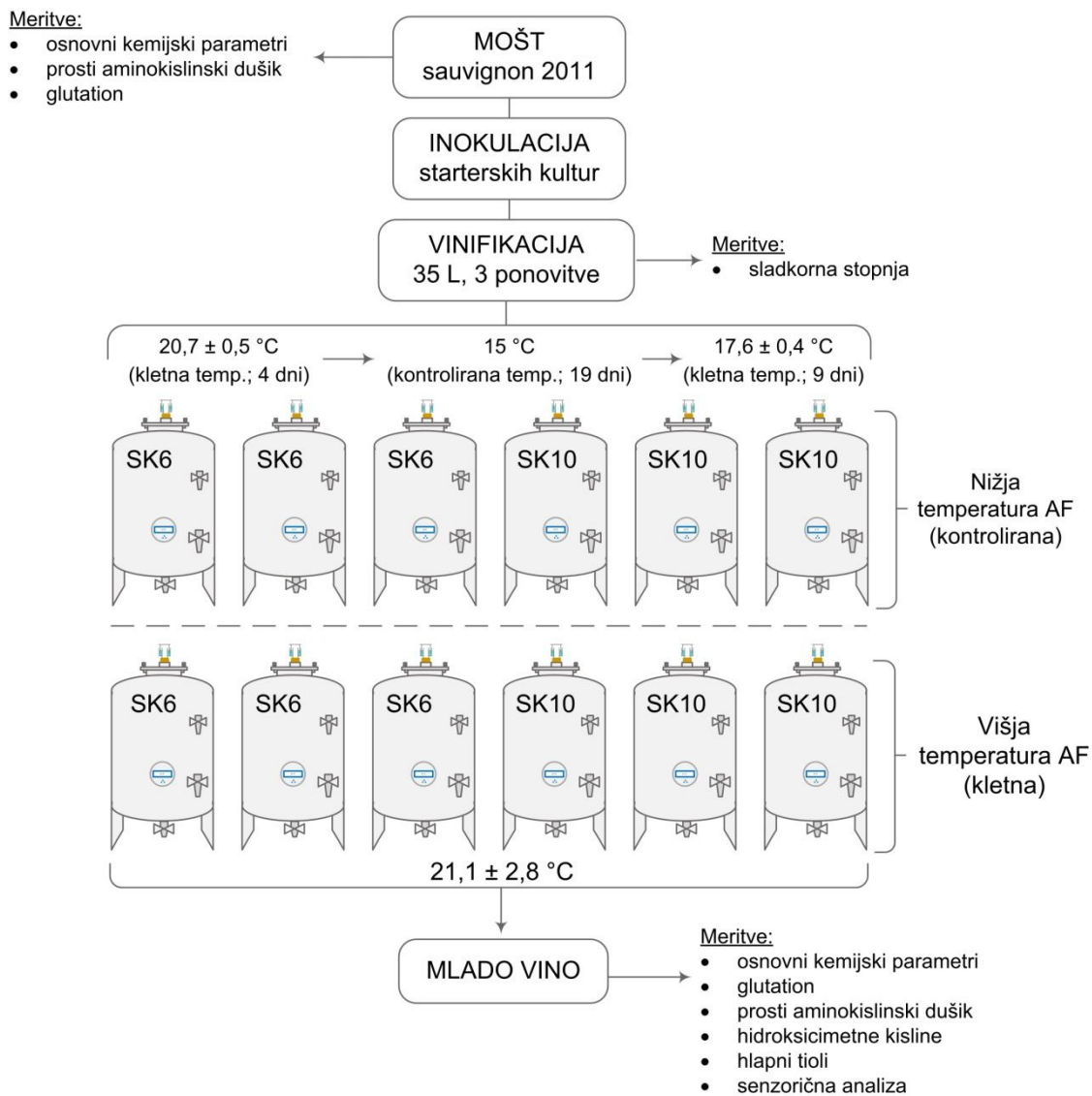
V poskusu 4 smo izvedli mikro- in makrovinifikacije mošta letnika 2010 z izbranimi starterskimi kulturami v različnih delovnih volumnih fermentorjev in pri različnih temperaturah AF, kot je prikazano na sliki 11. V moštu smo določili osnovne kemijske parametre (sladkorna stopnja, pH in SK) ter vsebnost FAN, ga razdelili v 25 in 2500 L fermentorje iz nerjavnega jekla ter jih opremili s fermentacijskimi vehami. Mošt smo inokulirali s tremi starterskimi kulturami (SK6, SK10, SK11), v primeru 25 L fermentorjev v dveh ponovitvah, v primeru 2500 L fermentorjev v eni ponovitvi. Mikrovinifikacije so potekale pri kletni oz. nižji temperaturi, makrovinifikacije pa pri kontrolirani (nastavljena priporočena temperatura za posamezno startersko kulturo) oz. višji temperaturi. V pridelanih mladih vinih smo določili osnovne kemijske parametre, GSH, HCK, MPZ in hlapne tioler ter izvedli senzorično analizo.



Slika 11: Shema poskusa 4 (SK6, SK10, SK11 - starterske kulture kvasovk (glej preglednico 5))
Figure 11: Scheme of the experiment 4 (SK6, SK10, SK11 - yeast starter cultures (see table 5))

3.1.5 Poskus 5

V poskusu 5 smo izvedli mikrovinifikacije mošta letnika 2011 z izbranimi starterskima kulturama pri različnih temperaturah AF, kot je prikazano na sliki 12. V moštu smo določili osnovne kemijske parametre (sladkorna stopnja, SK, pH, HK) ter vsebnost FAN in GSH ter ga razdelili v 35 L fermentorje iz nerjavnega jekla z možnostjo regulacije temperature, ki smo jih opremili s fermentacijskimi vehami. Mošt smo inokulirali z dvema starterskima kulturama (SK6, SK10) pri dveh temperaturah: kontrolirani (najprej temperatura kleti ($20,7 \pm 0,5$ °C), nato znižanje temperature na 15 °C, proti koncu AF spet temperatura kleti ($17,6 \pm 0,4$ °C)) oz. nižji temperaturi in kletni (brez uravnavanja temperature v fermentorjih) oz. višji temperaturi ($21,1 \pm 2,8$ °C). Potek AF smo spremljali z določanjem sladkorne stopnje mošta. V pridelanih mladih vinih smo določili osnovne kemijske parametre, vsebnost GSH, FAN, HCK in hlapnih tiolov ter izvedli senzorično analizo.



Slika 12: Shema poskusa 5 (SK6, SK10 - starterski kulturi kvasovk (glej preglednico 6))
Figure 12: Scheme of the experiment 5 (SK6, SK10 - yeast starter cultures (see table 6))

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mošt

V fermentacijski poskus smo vključili tri letnike (2009, 2010 in 2011) mošta sorte 'Sauvignon' (*Vitis vinifera* L.) iz vinorodne dežele Podravje, okoliša Štajerska Slovenija. Grozdje je bilo pridelano v vinogradih Ptujске kleti, kjer je bilo razpecljano, zdrozgano in stisnjeno v inertni atmosferi. Grozdni sok smo zbistрили preko noči pri nizki temperaturi (4 °C). Bister grozdni mošt smo razdelili v predvidene delovne volumne fermentorjev, kot je opredeljeno v 3.1 Zasnova poskusa. V obeh delih poskusa 1 in v poskusu 2 smo uporabili mošt, ki smo ga takoj po bistrenju zamrznili na -20 °C ter ga odmrznili tik pred izvedbo poskusa. Kemijski parametri moštov, uporabljenih v posameznih poskusih, so prikazani v preglednici 2.

Preglednica 2: Kemijski parametri moštov sorte sauvignon, letnikov 2009, 2010 in 2011, uporabljenih v poskusih

Table 2: Chemical parameters of sauvignon musts, vintages 2009, 2010 and 2011, used in the experiments

Letnik	Poskus	Parameter					
		RS (g/L)	SK (g/L)	pH	HK (g/L)	FAN (mg N/L)	HCK (mg/L)
2009	Poskus 1 (1. del)	269,8	/	/	0,04	82,2	171,0
	Poskus 1 (2. del)	219,4	/	/	0,00	77,4	276,3
	Poskus 2	197,0	5,9	3,10	0,01	115,5	183,1
2010	Poskus 3 in 4	170,0*	8,3	3,23	/	124,7	/
2011	Poskus 5	195,3*	6,5	3,23	0,18	115,0	/

* Vrednost dobljena s pretvorbo iz vrednosti v °Oe, / nismo določali

3.2.2 Starterske kulture kvasovk

Starterske kulture kvasovk, ki smo jih uporabili v fermentacijskem poskusu, so komercialno dostopne in smo jih pridobili od posameznih proizvajalcev. Posamezne starterske kulture smo izbrali na podlagi pozitivnih referenc, bodisi s strani proizvajalca kvasovk (deklaracija) ali s strani izvornih znanstvenih člankov. Lastnosti uporabljenih starterskih kultur kvasovk so predstavljene v prilogi A.

3.2.2.1 Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusu 1

V obeh delih poskusa 1 smo za AF uporabili starterske kulture kvasovk, navedene v preglednici 3. V 1. delu poskusa 1 smo uporabili prečiščene starterske kulture (glej 3.4.1 Izolacija čistih kultur komercialnih kvasovk), shranjene pri temperaturi -80 °C. Nacepili smo jih na plošče z YM gojiščem (kvasni ekstrakt 3,0 g/L, sladni ekstrakt 3,0 g/L, pepton 5,0 g/L, glukoza 10,0 g/L, agar 20,0 g/L) ter jih po tri- do petdnevni inkubaciji

pri temperaturi 26-28 °C precepili v tekoče YM gojišče z 18 % glukoze. Inokulirana tekoča YM gojišča smo za 24 h postavili na stresalo (150 rpm) pri sobni temperaturi. Nato smo s pomočjo hemacitometra prešteli kvasne celice v tekočem gojišču (inokulumu), pri čemer smo določili okrog $1 \cdot 10^{10}$ kvasnih celic/mL mošta. V mošt z dodatkom reduciranega GSH do 40 mg/L smo vnesli 1 % inokulum.

Preglednica 3: Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusu 1

Table 3: Yeast starter cultures used in the experiment 1

Oznaka starterske kulture	Komercialna imena sevov kvasovk	Sev kvasovk	Proizvajalec	Količina dodatka
SK1	VIN7	<i>S. cerevisiae</i>	Anchor Yeast, Cape Town, South Africa	1 % inokulum
SK2	Lalvin QA23 [®]	<i>S. cerevisiae</i>	Lallemand S.A., France	1 % inokulum
SK3	Fermol Sauvignon	<i>S. cerevisiae</i>	AEB Group, San Francisco, CA	1 % inokulum
SK4	Siha Whitearome	<i>S. cerevisiae</i>	Begerow, Reston, VA	1 % inokulum
SK5	Ceres B 201 YSEO	<i>S. cerevisiae</i>	Oenofrance, Bordeaux, France	1 % inokulum

V 2. delu poskusa 1 smo starterske kulture kvasovk iz preglednice 3 v suhi obliki rehidrirali v sterilni destilirani vodi s temperaturo 35-40 °C (neprečiščena kultura). Pripravili smo redčitveno vrsto in ustrezne redčitve nacepili na plošče z YM gojiščem. Po tri- do petdnevni inkubaciji pri temperaturi 26-28 °C smo reprezentativne kolonije še enkrat precepili na plošče z YM gojiščem, po inkubaciji pa smo jih precepili v tekoče YM gojišče z 18 % glukoze. Inokulirana tekoča YM gojišča smo za 24 h postavili na stresalnik (150 rpm) pri sobni temperaturi. Nato smo s pomočjo hemacitometra prešteli kvasne celice v tekočem gojišču in ga uporabili kot 1 % inokulum za mošt z dodatkom GSH do 40 mg/L (glej 3.1.1 Poskus 1).

3.2.2.2 Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusu 2

Starterske kulture kvasovk, uporabljene v tem poskusu, so prikazane v preglednici 4. Kvasovke smo pred inokulacijo rehidrirali po navodilih proizvajalca. V primeru SK9 smo inokulirali najprej kvasovke rodu ne-*Saccharomyces* (*T. delbrueckii*), po 10 dneh AF oz. po znižanju vsebnosti RS za približno 30 g/L smo inokulirali še kvasovke rodu *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*).

Preglednica 4: Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusu 2

Table 4: Yeast starter cultures used in the experiment 2

Oznaka starterske kulture	Komercialna imena sevov kvasovk	Sev kvasovk	Proizvajalec	Količina dodatka (g/hL)
SK6	VIN 7	<i>S. cerevisiae</i>	Anchor Yeast, Cape Town, South Africa	10
	Lalvin QA23 [®]	<i>S. cerevisiae</i>	Lallemand S.A., France	10
SK7	Alchemy II	<i>Saccharomyces</i> spp.	Anchor Yeast, Cape Town, South Africa	20
SK8	Zymaflore VL3 [®]	<i>S. cerevisiae</i>	Laffort, Bordeaux Cedex, France	10
	Lalvin QA23 [®]	<i>S. cerevisiae</i>	Lallemand S.A., France	10
SK9	Zymaflore [®] Alpha ^{TD n. Sacch}	<i>T. delbrueckii</i>	Laffort, Bordeaux Cedex, France	10
	Zymaflore VL3 [®]	<i>S. cerevisiae</i>	Laffort, Bordeaux Cedex, France	10

3.2.2.3 Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusih 3 in 4

V poskusu 3 smo uporabili starterske kulture kvasovk, predstavljene v preglednici 5, v poskusu 4 pa smo od teh uporabili le prve tri: SK6, SK10 in SK11. Kvasovke smo pred inokulacijo rehidrirali po navodilih proizvajalca. V primeru uporabe SK10 smo inokulirali najprej kvasovke rodu *ne-Saccharomyces* (*T. delbrueckii* (1st level)) in po petih dneh AF še kvasovke *S. cerevisiae* (2nd level).

Preglednica 5: Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusih 3 in 4

Table 5: Yeast starter cultures used in the experiments 3 and 4

Oznaka starterske kulture	Komercialna imena sevov kvasovk	Sev kvasovk	Proizvajalec	Količina dodatka (g/hL)
SK6	VIN 7	<i>S. cerevisiae</i>	Anchor Yeast, Cape Town, South Africa	15
	Lalvin QA23 [®]	<i>S. cerevisiae</i>	Lallemand S.A., France	15
SK7	Alchemy II	<i>Saccharomyces</i> spp.	Anchor Yeast, Cape Town, South Africa	30
SK10	Level2 TM TD	<i>T. delbrueckii</i> (1 st level)	Lallemand S.A., France	25
		<i>S. cerevisiae</i> (2 nd level)		25
SK11	Exotics SPH	Hibrid <i>S. cerevisiae</i> / <i>S. paradoxus</i>	Anchor Yeast, Cape Town, South Africa	30
SK12	ECA5	<i>S. cerevisiae</i>	Lallemand S.A., France	30
SK13	Zymaflore VL3 [®]	<i>S. cerevisiae</i>	Laffort, Bordeaux Cedex, France	20

3.2.2.4 Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusu 5

V poskusu 5 smo uporabili starterske kulture kvasovk, predstavljene v preglednici 6. Kvasovke smo pred inokulacijo rehidrirali po navodilih proizvajalca. Pri obeh starterskih kulturah smo najprej inokulirali en sev kvasovk (VIN7 pri SK6 in *T. delbrueckii* (1st level) pri SK10) in po sedmih dneh AF še drugi sev kvasovk starterske kulture (Lalvin QA23[®] pri SK6 in *S. cerevisiae* (2nd level) pri SK10).

Preglednica 6: Starterske kulture kvasovk, uporabljene v poskusu 5

Table 6: Yeast starter cultures used in the experiment 5

Oznaka starterske kulture	Komercialna imena sevov kvasovk	Sev kvasovk	Proizvajalec	Količina dodatka (g/hL)
SK6	VIN 7	<i>S. cerevisiae</i>	Anchor Yeast, Cape Town, South Africa	15
	Lalvin QA23 [®]	<i>S. cerevisiae</i>	Lallemand S.A., France	15
SK10	Level2 TM TD	<i>T. delbrueckii</i> (1 st level)	Lallemand S.A., France	25
		<i>S. cerevisiae</i> (2 nd level)		25

3.2.3 Kemikalije

Kemikalije, ki smo jih uporabili v posameznih metodah poskusov, so predstavljene v preglednici 7.

Preglednica 7: Kemikalije, uporabljene v metodah poskusov

Table 7: Chemicals used in the methods of the experiments

Uporabljene kemikalije	
- agar (Biolife)	- natrijev acetat (Merck)
- ampicilin (Sigma Aldrich)	- natrijev acetat trihidrat (Merck)
- bakrov sulfat (J.T.Baker)	- natrijev borat (Merck)
- cistein (Sigma Aldrich)	- natrijev hidroksid (Merck)
- destilirana voda (Milli Q)	- natrijev klorid (Merck)
- diklorometan (Merck)	- natrijev sulfat brezvodni (Sigma Aldrich)
- Dowex gel (Sigma Aldrich)	- natrijev tiosulfat (Sigma Aldrich)
- D(-)fruktoza (Sigma Aldrich)	- ninhidrin (Merck)
- etanol absolutni (Sigma Aldrich)	- <i>N</i> -acetil-L-cistein (Sigma Aldrich)
- etanol 96 vol.% (Kefo)	- <i>o</i> -ftalaldehid (Sigma Aldrich)
- etil acetat (Sigma Aldrich)	- pepton (Oxoid)
- etilendiaminotetraoetna kislina (EDTA) (Kemika)	- <i>p</i> -hidroksimerkuribenzoat (2 mM) (Sigma Aldrich)
- fenolftalein (Sigma Aldrich)	- Segnetova sol (kalijev-natrijev tartrat) (Merck)
- fiziološka raztopina	- sladni ekstrakt (Oxoid)
- glukoza (Merck)	- škrobovica (Merck)
- jod (I ₂) (Merck)	- <i>terc</i> -butil-4-metoksifenol (0,02 mM) (Sigma Aldrich)
- kalcijev hidroksid (Merck)	- <i>trans</i> -kaftarna kislina
- kalijev hidrogenftalat (Merck)	- vinska kislina (Merck)
- kalijev jodid (Carlo Erba reagents)	- vinska kislina v obliki kristalov (Merck)
- kalijev jodid v obliki kristalov (Merck)	- WL gojišče (Merck)
- kalijev jodat (Merck)	- žveplova(VI) kislina (Sigma Aldrich)
- kanamicin (Sigma Aldrich)	- 2-aminoetanol (Sigma Aldrich)
- kloramfenikol (Sigma Aldrich)	- 2-izobutil-3-metoksi- <i>d</i> ₃ -pirazin (Sigma Aldrich)
- klorovodikova kislina (Sigma Aldrich)	- 3-izobutil-2-metoksipirazin (Sigma Aldrich)
- komercialni pufri pH 3, pH 4 in pH 7 (Hach Lange GmbH)	- 3-izopropil-2-metoksipirazin (Sigma Aldrich)
- kvasni ekstrakt (Biolife)	- 3-merkaptotioheksil acetat (Oxford Chemical Limited)
- ledocetna kislina (100 %) (Merck)	- 3-merkaptotioheksan-1-ol (Oxford Chemical Limited)
- L-glutation (Sigma Aldrich)	- 4-merkaptotio-4-metil-pentan-2-on (Interchim, Montlucon)
- L(-)treonin (Merck)	- 4-metoksi-2-metil-2-merkaptobutan (Penta Manufacturing Company)
- metanol (Sigma Aldrich)	- [² H ₂]-3-merkaptotioheksil acetat (Oxford Chemical Limited)
- mravljična kislina (Merck)	- [² H ₂]-3-merkaptotioheksan-1-ol (Oxford Chemical Limited)

*Kemika (Zagreb, Hrvaška), Sigma Aldrich (St. Louis, MO, ZDA), Merck (Darmstadt, Nemčija), Penta Manufacturing Company (Fairfield, ZDA), Oxford Chemical Limited (UK), Interchim, Montlucon (Francija), J.T.Baker (Deventer, Nizozemska), Carlo Erba reagents (Pariz, Francija), Hach Lange GmbH (Berlin, Nemčija), Kefo (Ljubljana, Slovenija), Biolife (Milano, Italija), Oxoid (Hampshire, UK)

3.2.4 Aparature in oprema

Aparature in oprema, ki smo jo uporabili v posameznih metodah poskusov, so predstavljene v preglednici 8.

Preglednica 8: Aparature in oprema, uporabljena v metodah poskusov

Table 8: Apparatus and equipment used in the methods of the experiments

Uporabljene aparature in oprema	
- Agilent NSD ChemStation	- kombinirana elektroda DG 115 SC z avtomatskim
- Agilent Technologies 7890A (Agilent Technologies)	titratorjem Mettler Toledo DL 53 (Mettler Toledo)
- Agilent 1100 HPLC z DAD detektorjem (Agilent Technologies)	- konusne bučke
- avtomatski podajalnik vzorcev Gerstel MPS 2	- krovna stekla
- birete	- kvarčne kivete (10 mm)
- brezprašna komora LFVP 12 (Iskra Pio)	- lij ločnik
- centrifuga Biofuge Stratos (Thermo scientific)	- magnetno mešalo in magneti
- cepilne zanke	- merilne bučke, epruvete, valji
- čaše	- mikroskop Eclipse 80i (Nikon)
- destilacijska aparatura	- »navojne ependorfke«
- detektor Agilent Technologies 5975C (Triple Axis)	- objektna stekla
- digitalni refraktometer Leo Kübler	- parni destilator Oenoextracteur Chenard
- ekstrakcijske kolone	- Pasteurjeve pipete
- električni grelec	- petrijeve plošče
- elektronski denzimeter Anton Paar DMA 4500	- pH-meter PHM 210 (Radiometer analytical)
- epruvete in zamaški	- pipete
- erlenmajerice	- plastični lončki
- filtri Minisart RC 0,45 μm (Sartorius)	- predkolona ODS Hypersil guard (2,1 x 20 mm, 5 μm , Agilent Technologies)
- Gerstel MPS 2-SPME	- programska oprema Agilent Chemstation Rev. B.03.01 (Agilent Technologies)
- gorilnik	- rotavapor Büchi R114
- HPLC-FLD s predkolonsko derivatizacijo	- steklena volna
- inkubator (Termo medicinski aparati)	- UV-VIS spektrofotometer Agilent8453 (Agilent Technologies)
- inserti za 2 mL vial	- vial (2 mL, 20 mL)
- kapalka	- vlakno DVB/CAR/PDMS (Supelco)
Kolone:	- vodna kopel
- Agilent J&W GC HP-INNOWAX (30 m x 0,32 mm, 0,25 μm , Agilent Technologies)	- vortex IKA MS3
- Agilent J&W GC HP-INNOWAX (60 m x 0,25 mm, 0,25 μm , Agilent Technologies)	- vrelni kamenčki
- Agilent J&W GC HP-1MS (30 m x 0,32 mm, 0,25 μm , Agilent Technologies)	
- ODS Hypersil C18 (2,1 x 250 mm, 5 μm , Agilent Technologies)	
- Synergi Fusion-RP 80A (4 μm , 150 mm x 2.0 mm, Phenomenex)	

*Leo Kübler (Karlsruhe, Nemčija), Mettler Toledo (Columbus, OH, ZDA), Oenoextracteur Chenard (Bordeaux, Francija), Sartorius (Goettingen, Nemčija), Agilent Technologies (Palo Alto, CA, ZDA), Phenomenex (Torrance, CA, ZDA), Anton Paar (Graz, Avstrija), Thermo scientific (Waltham, MA, ZDA), IKA (Staufen, Nemčija), Radiometer analytical (Cedex, Francija), Büchi (New Castle, DE, ZDA), Iskra Pio (Šentjernej, Slovenija), Termo medicinski aparati (Dugo selo, Hrvaška), Nikon (Tokio, Japonska)

3.3 METODE

3.3.1 Določanje osnovnih kemijskih parametrov vina in mošta

Osnovne kemijske parametre mošta in vina smo določili po priporočenih metodah Evropske skupnosti (Commission regulation (EEC) 2676/90 in Commission regulation (EC) 355/2005). V nadaljevanju so na kratko opisani postopki posameznih metod določanja.

3.3.1.1 Določanje sladkorne stopnje mošta

Sladkorno stopnjo mošta smo določali z ročnim digitalnim refraktometrom Leo Kübler. Vzorec smo dobro premešali in kanili kapljico le-tega na merilno prizmo refraktometra. Izpis in odčitek rezultata je v °Oe.

3.3.1.2 Določanje reducirajočih sladkorjev

Vsebnost reducirajočih sladkorjev (RS) v moštu in vinu smo določali z jodometrično titracijo ob upoštevanju slepega vzorca. V 300 mL erlenmajerico smo odpipetirali 10 mL raztopine bakrovega sulfata (CuSO_4), 5 mL raztopine Segnetove soli (kalijev-natrijev tartrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$), dodali nekaj vrelnih kamenčkov in 2 mL vzorca. Erlenmajerico smo pokrili, segrevali na električnem grelcu do vrenja ter nadaljevali z vrenjem 45 sekund. Erlenmajerico smo ohladili pod tekočo mrzlo vodo. Nato smo dodali 5 mL 30 % raztopine kalijevega jodida (KI), 5 mL 16 % raztopine žveplove (VI) kisline in 5 mL raztopine škrobovice, premešali in titrirali z 0,1 M raztopino natrijevega tiosulfata do barvnega preskoka (kremasto bela barva). Z n smo označili število porabljenih mL titranta. Slep vzorec smo pripravili po enakem postopku, le da smo namesto vzorca uporabili destilirano vodo. Z n' smo označili število porabljenih mL natrijevega tiosulfata za slepo titracijo. Koncentracija RS v vzorcu je podana v tabeli (Commission regulation (EEC) 2676/90) kot funkcija števila (n - n') porabljenih mililitrov in jo podajamo v gramih na liter vina (g/L).

3.3.1.3 Določanje skupnih kislin

Vsebnost skupnih kislin (SK) v moštu in vinu smo določali s potenciometrično titracijo vzorca do končne točke pH vrednosti 7 s standardizirano raztopino natrijevega hidroksida in kombinirano elektrodo DG 115 SC z avtomatskim titratorjem Mettler Toledo DL 53. V 100 mL lonček smo odpipetirali 5 mL vina in dopolnili do 40 mL s prekuhano destilirano vodo. Lonček z vzorcem smo vstavili na avtomatski podajalnik

titratorja, kjer se je izvedla titracija in izračun SK v gramih vinske kisline na liter vina (g/L).

3.3.1.4 Določanje pH

Za določanje vrednosti pH v moštu in vinu smo uporabili kombinirano elektrodo DG 115 SC na avtomatskem titratorju Mettler Toledo DL53. Po umerjanju s pufri 3 in 7 ter preverjanju s pufrom 4 smo izmerili pH vrednost vzorcev mošta in vina.

3.3.1.5 Določanje hlapnih kislin

Vsebnost hlapnih kislin (HK) v moštu in vinu smo določili s titracijo s standardno raztopino natrijevega hidroksida po predhodni destilaciji z vodno paro. V destilacijsko bučko parnega destilatorja Oenoextracteur Chenard smo odpipetirali 20 mL vzorca vina, dodali približno 0,5 g vinske kisline in destilirali. Zbrali smo vsaj 250 mL destilata, dodali 2 kapljici fenolftaleina kot indikatorja in titrirali z 0,1 M raztopino natrijevega hidroksida do barvnega preskoka (vijolična). Volumen porabljenega NaOH v mL smo označili z n . Nato smo dodali 4 kapljice razredčene raztopine klorovodikove kisline, 2 mL raztopine škroba, nekaj kristalov kalijevega jodida in titrirali z 0,005 M raztopino joda do barvnega preskoka (modra). Volumen porabljene raztopine joda v mL smo označili z n' . Nato smo dodali še nasičeno raztopino natrijevega borata in ponovno titrirali z 0,005 M raztopino joda do barvnega preskoka (modra). Porabljen volumen v mL smo označili z n'' . HK, izražene v gramih očetne kisline na liter (g/L), smo izračunali po naslednji formuli:

$$\text{HK (g očetne kisline/L)} = 0,3 \cdot (n - 0,1 \cdot n' - 0,5 \cdot n'') \quad \dots(3)$$

3.3.1.6 Določanje dejanskega alkohola

Dejanski alkohol v vinu smo določali z destilacijo vina in merjenjem relativne gostote destilata pri 20 °C z elektronskim denzimetrom Anton Paar DMA 4500. V 200 mL merilno bučko smo odpipetirali 200 mL vina, jo termostatirali na 20 °C in uravnali točen volumen vina. Vzorec smo kvantitativno prenesli v destilacijsko bučo, dodali 10 mL 2 M kalcijevega hidroksida in nekaj vrelnih kamenčkov ter destilirali. Destilat smo zbrali v merilno bučko, ki smo jo med destilacijo hladili. Ko smo pridobili vsaj 150 mL destilata, smo bučko dopolnili z vodo nekoliko pod oznako, jo termostatirali pri 20 °C in nato dopolnili točno do oznake. Relativno gostoto destilata pri 20 °C smo določili z elektronskim denzimetrom. Iz relativne gostote destilata smo odčitali koncentracijo alkohola v vol.% s pomočjo korelacijskih tabel.

3.3.2 Določanje vsebnosti prostega aminokislinskega dušika

Prosti aminokislinski dušik (FAN) smo v vzorcih mošta in vina določali po metodi Nicolini in sod. (2004), ki temelji na reakciji aminokislin z ninhidrinom, pri čemer se razvije vijolična barva. Vzorce smo centrifugirali, filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,45 μm in jih ustrezno redčili z vodo (Milli Q). V 20 mL epruvete smo odpipetirali 4 mL razredčenega vzorca in 2 mL barvnega reagenta (10 g/L ninhidrina in 3 g/L fruktoze v acetatnem pufru pH 5,53), dobro premešali, zaprli epruvete z gumijastimi zamaški in jih 20 min segrevali v vodni kopeli pri 100 °C. Nato smo vzorce ohladili na 20 °C, dodali 10 mL raztopine za razredčevanje (2 g/L KIO₃ v 40 % raztopini etanola) in dobro premešali. Po 10 min smo izmerili absorpcijski spekter vzorca v območju valovne dolžine med 450 in 700 nm proti slepemu vzorcu. Slepri vzorec se pripravi po zgoraj opisanem postopku, le da vzorec nadomestimo z vodo (Milli Q). Za vsako serijo vzorcev smo po enakem postopku pripravili tudi standardno raztopino s koncentracijo 2 mg N/L ali 1 mg N/L, glede na katerega smo izračunali koncentracijo FAN v vzorcih, izraženo v miligramih dušika na liter vina (mg N/L) po naslednji formuli:

$$\text{FAN (mg/L)} = (A_{\text{vz}} / A_{\text{st}}) \cdot C_{\text{st}} \cdot R \quad \dots(4)$$

kjer pomenijo: A_{vz} - absorbanca vzorca, A_{st} - absorbanca standarda, C_{st} - koncentracija standarda, R - redčitev.

Umeritvena krivulja s petimi koncentracijskimi točkami, ki smo jo pripravili s standardnimi raztopinami L(-)-treonina, je bila linearna v območju med 0,4 in 2 mg N/L, $R^2=0,9987$.

3.3.3 Določanje vsebnosti hidroksicimetnih kislin

Vsebnost hidroksicimetnih kislin (HCK) v moštu in vinu smo določili z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) z detektorjem z nizom diod DAD (Vanzo in sod., 2007). V ta namen smo uporabili Agilent 1100 HPLC z DAD detektorjem (Agilent Technologies), Agilent NSD ChemStation, kolono ODS Hypersil C18 (2,1 x 250 mm, 5 μm , Agilent Technologies) in predkolono ODS Hypersil guard (2,1 x 20 mm, 5 μm , Agilent Technologies). Za mobilno fazo A smo uporabili 0,5 % raztopino mravljične kisline (HCOOH) v destilirani vodi, za mobilno fazo B pa 2 % raztopino mravljične kisline v metanolu. Pred injiciranjem na HPLC smo vzorce filtrirali skozi 0,22 μm PVDF filter (premer 13 mm). Ločba je potekala 33 min pri 40 °C. Gradienti so bili linearni: 16 % B do 25 % B v 15 min, do 43 % B v 13 min, do 100 % B v 0,1 min, 100 % B 4,9 min in nazaj do 16 % B v 0,1 min. Kolona je bila pred vsakim injiciranjem 10 min uravnovežena z začetnim gradientom 16 % B. Pretok je bil nastavljen na 0,4 mL/min, volumen injiciranega vzorca pa na 10 μL . UV-VIS spekter je bil posnet med 220 in 400 nm z detekcijo vrhov pri 320 nm. Posamezne HCK smo

kvantificirali kot ekvivalente eksterne standarda *trans*-kaftarne kisline glede na ploščino pod vrhom pri 320 nm.

Umeritveno krivuljo smo pripravili z injiciranjem standarda *trans*-kaftarne kisline v območju med 1,05 mg/L in 210 mg/L. Umeritvena krivulja je bila linearna v celotnem območju z R^2 0,99987. Meja zaznave (LOD) je bila 0,11 mg/L in meja kvantitativne določitve (LOQ) 0,34 mg/L. Ponovljivost metode smo preverili z zaporednim injiciranjem 1,18 mg/L *trans*-kaftarne kisline ($n = 10$). Koeficient variacije koncentracij je bil 1,75 %, koeficient variacije retencijskih časov pa 0,29 %.

3.3.4 Določanje vsebnosti hlapnih tiolov

Vsebnosti hlapnih tiolov (4-merkapt-4-metil-pentan-2-on (4MMP), 3-merkaptohexil acetat (3MHA) in 3-merkaptohexan-1-ol (3MH)) v vzorcih vina smo določili s plinsko kromatografijo z masno selektivnim detektorjem (GC-MS) z nekoliko spremenjeno metodo, kot sta jo opisala Tominaga in Dubourdieu (2006). Metoda temelji na predhodni ekstrakciji hlapnih tiolov iz vina, ki ji sledi kvalitativno in kvantitativno ovrednotenje z uporabo GC-MS.

3.3.4.1 Ekstrakcija hlapnih tiolov

Najprej smo Dowex gel aktivirali s spiranjem z 0,1 M klorovodikovo kislino in mu nato s spiranjem z vodo (Milli-Q) uravnali pH na 5-6. Gel smo prenesli v steklene ekstrakcijske kolone in ga ponovno sprali s 100 mL vode (Milli-Q) s pretokom skozi kolono 1 kapljica/3 s.

V 100 mL čašo smo odpipetirali 50 mL vzorca vina, dodali 2 mM p-hidroksimerkuribenzoat in 0,02 mM terc-butil-4-metoksifenol (butiliran hidroksianizol, BHA) ter mešali 1 min s pomočjo magnetnega mešala. Nato smo dodali interne standarde 4-metoksi-2-metil-2-merkaptobutan (4M2M2MB), [$^2\text{H}_2$]-3-merkaptohexil acetat (d3MHA) in [$^2\text{H}_2$]-3-merkaptohexan-1-ol (d3MH) ter mešali še 10 min. pH vzorca smo uravnali na 7 in tako pripravljen vzorec nanесли na ekstrakcijsko kolono s pretokom 1 kapljica/5 s. Ko je vzorec odtekel iz kolone, smo jo sprali s čistilnim pufrom (0,1 M natrijev acetat z dodatkom BHA, pH 6). Nato smo kolono obrnili za 180° in eluirali hlapne tiole s spiranjem kolone s cisteinskim pufrom (0,1 M natrijev acetat z dodatkom cisteina in BHA, pH 6). Hitrost pretoka pri eluaciji smo nastavili na 1 kapljico/7 s. Eluiranemu vzorcu smo dodali etil acetat in diklorometan ter mešali 5 min. Vzorec smo nato prenesli v lij ločnik, dobro premešali in odlili spodnjo organsko fazo v 20 mL vialo z brezvodnim natrijevim sulfatom, na katerega se je vezala voda iz vzorca. Brezvodno organsko fazo smo nato prefiltrirali

preko steklene volne v 50 mL konusno bučko, v kateri smo jo koncentrirali z evaporacijo pri 250 mbar v vodni kopeli (20 °C) do volumna 0,5 mL. Nadaljnje koncentriranje vzorca je potekalo v 2 mL viali pri 100 mbar v vodni kopeli (20 °C) do volumna 30 µL, ki smo ga nato prenesli v 2 mL temno vialo z insertom in takoj analizirali.

3.3.4.2 Pogoji za kromatografijo

Za določanje hlapnih tiolov smo uporabili pogoje, ki so navedeni v preglednici 9.

Preglednica 9: Pogoji za kromatografijo GC-MS za določanje hlapnih tiolov v vinu

Table 9: Chromatographic conditions of GC-MS for determination of volatile thiols in wine

Aparatura	Agilent Technologies 7890A
detektor	Agilent Technologies 5975C, Triple Axis
avtomatski podajalnik vzorcev	Gerstel MPS 2
kolona	Agilent J&W GC, HP-INNOWAX 60 m x 0,25 mm; debelina filma 0,25 µm
temperatura injektorja	240 °C
temperaturni gradient	50 °C; 5 min 3 °C/min; od 50 °C do 115 °C 40 °C/min; od 115 °C do 150 °C 150 °C; 3 min 3 °C/min; od 150 °C do 205 °C 10 °C/min; od 205 °C do 250 °C 19,625 min; 250 °C 40 °C/min; od 250 °C do 50 °C 50 °C; 3 min
temperatura ionskega izvora	230 °C
temperatura vmesnika	250 °C
temperatura analizatorja	150 °C
nosilni plin	helij; konstanten pretok 0,6 mL/min
detekcija in izbrani ioni	Selective Ion Monitoring (SIM) (tarčni ion, kvalifikator): 4-metoksi-2-metil-2-merkaptobutan (4M2M2MB) (134 m/z, 75 m/z) 4-merkaptio-4-metil-pentan-2-on (4MMP) (132 m/z, 75 m/z) [² H ₂]-3-merkaptioheksil acetat (d3MHA) (118 m/z, 103 m/z) 3-merkaptioheksil acetat (3MHA) (116 m/z, 101 m/z) [² H ₂]-3-merkaptioheksan-1-ol (d3MH) (136 m/z, 102 m/z) 3-merkaptioheksan-1-ol (3MH) (134 m/z, 100 m/z)

3.3.4.3 Validacija metode

Izvedli smo enotočkovno kalibracijo z uporabo kalibracijskih standardov v alkoholni raztopini s končno koncentracijo 65 ng/L 4MMP, 650 ng/L 3MHA in 1202 ng/L 3MH. Kvadrati korelacijskih koeficientov (R^2) so bili 0,8980 (4MMP), 0,9986 (3MH) in 0,9990 (3MHA).

Standarda 3-merkaptotioheksil acetat (Oxford Chemical Limited) in 3-merkaptotioheksan-1-ol (Oxford Chemical Limited) sta imela 98 % čistost. Standard 4-merkaptotio-4-metil-pentan-2-on (Interchim) je bil v obliki 1 % raztopine v propilen glikolu. Standard 4-metoksi-2-metil-2-merkaptobutan (Penta Manufacturing Company) je bil prav tako v obliki 1 % raztopine v propilen glikolu.

3.3.5 Določanje vsebnosti metoksipirazinov

Vsebnost metoksipirazinov (3-izobutil-2-metoksipirazin (IBMP) in 3-izopropil-2-metoksipirazin (IPMP)) v vinu smo določali s plinsko kromatografijo z masnospektrofotometričnim detektorjem in mikroekstrakcijo na trdno fazo iz plinske faze vzorca (HS-SPME-GC-MS) po metodi, ki so jo opisali Šuklje in sod. (2012). Metoda temelji na ekstrakciji metoksipirazinov iz vina s pomočjo HS-SPME, ki ji sledi kvalitativno in kvantitativno ovrednotenje z uporabo GC-MS.

3.3.5.1 Priprava vzorcev

Vzorci vina smo pripravili tako, da smo v 25 mL bučke odpipetirali 10 mL vina, dodali 125 µL internega standarda 2-izobutil-3-metoksi-d₃-pirazina ([²H₃]-IBMP) s koncentracijo 5 µg/L in bučke dopolnili z vinom do oznake. V 20 mL SPME vialah smo odpipetirali 1,6 mL pripravljene vzorca vina, 6,4 mL vode (Milli-Q) in 2 mL 4 M raztopine natrijevega hidroksida ter dodali 3 g natrijevega klorida in kapsulne magnete. Zaprte vialah smo postavili na magnetno mešalo in počakali, da se je natrijev klorid raztopil.

3.3.5.2 Pogoji ekstrakcije in kromatografije HS-SPME-GC-MS

Za določanje metoksipirazinov smo uporabili pogoje, ki so navedeni v preglednicah 10 in 11.

Preglednica 10: Pogoji uporabe SPME vlaken za določanje metoksipirazinov v vinu

Table 10: Conditions of the use of SPME fibers for determination of methoxypyrazines in wine

Aparatura	Gerstel MPS 2-SPME
inkubator	stresalnik
čas inkubacije	5 min
hitrost stresanja	350 rpm
čas absorpcije	40 min
temperatura absorpcije	40 °C
čas desorpcije	180 s
vlakno	Supelco, DVB/CAR/PDMS

Preglednica 11: Pogoji za kromatografijo HS-SPME-GC-MS za določanje metokspirazinov v vinu
Table 11: Chromatographic conditions of HS-SPME-GC-MS for determination of methoxypyrazines in wine

Aparatura	Agilent Technologies 7890A
detektor	Agilent Technologies 5975C, Triple Axis
avtomatski podajalnik vzorcev	Gerstel MPS 2
kolona 1	Agilent J&W GC, HP-1MS 30 m x 0,32 mm; debelina filma 0,25 µm
kolona 2	Agilent J&W GC, HP-INNOWAX 30 m x 0,32 mm; debelina filma 0,25 µm
temperatura injektorja	250 °C
temperaturni gradient	60 °C; 10 min 7 °C/min; od 60 °C do 100°C 100 °C; 10 min 7 °C/min; od 100 do 170 °C 40 °C/min; od 170 do 230 °C 230 °C; 20 min 40 °C/min; od 230 do 60 °C 60 °C; 3 min
temperatura ionskega izvora	230 °C
temperatura vmesnika	250 °C
temperatura analizatorja	150 °C
nosilni plin	helij; konstanten pretok 1,5 mL/min
detekcija in izbrani ioni	Selective Ion Monitoring (SIM) (tarčni ion, kvalifikator): 2-izobutil-3-metoksi-d ₃ -pirazin (² H ₃)-IBMP) (127 m/z, 154 m/z) 3-izobutil-2-metokspirazin (IBMP) (124 m/z, 151 m/z) 3-izopropil-2-metokspirazin (IPMP) (137 m/z, 152 m/z)

3.3.5.3 Validacija metode

Za kalibracijo smo uporabili kalibracijske standarde v alkoholni raztopini s 25 ng/L IBMP, 25 ng/L [²H₃]-IBMP in 28 ng/L IPMP. Osnovno raztopino smo pripravili v metanolu z 250 mg/L IBMP, 500 mg/L [²H₃]-IBMP in 280 mg/L IPMP. Delovne raztopine smo pripravili v metanolu z 2,5 µg/L IBMP, 5,0 µg/L [²H₃]-IBMP in 2,8 µg/L IPMP. Alkoholno raztopino smo pripravili v 1000 mL buči z mešanjem 500 mL vode (Milli Q), 120 mL absolutnega etanola in 1 g vinske kisline; bučo smo nato dopolnili z vodo (Milli Q) do oznake in uravnali pH na 3,2. Kalibracijske standarde smo pripravili v 25 mL bučkah, v katere smo odpipetirali nekaj alkoholne raztopine, dodali 250 µL delovne raztopine IBMP, 250 µL delovne raztopine IPMP in 125 µL delovne raztopine [²H₃]-IBMP. V 20 mL SPME vialo smo odpipetirali 1,6 mL kalibracijskega standarda, 6,4 mL vode (Milli-Q) in 2 mL 4M NaOH ter dodali 3 g NaCl in kapsulne magnetne. Zaprte vialo smo postavili na magnetno mešalo in počakali, da se je NaCl raztopil.

Za kalibracijo v devetih koncentracijskih točkah (štiri ponovitve na kalibracijski nivo) smo uporabili alkoholne raztopine s standardi. Za določitev območja linearnosti smo uporabili multiplo linearno regresijo (F-test), za izračun LOD in LOQ pa smo uporabili

kalibracijsko krivuljo. Območja linearnosti, kvadrati korelacijskih koeficientov (R^2), LOD in LOQ so predstavljeni v preglednici 12.

Preglednica 12: Območja linearnosti, kvadrati korelacijskih koeficientov (R^2), meje zaznav (LOD) in meje določitev (LOQ) metode HS-SPME-GC-MS za določanje vsebnosti metokspirazinov v vinu

Table 12: Linearity ranges, coefficients of correlation (R^2), limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) of the HS-SPME-GC-MS method for determination of methoxypyrazines in wine

Metokspirazin	Območje (ng/L)	R^2	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
IBMP	1 - 196	0,9986	0,4	1,2
IPMP	1 - 200	0,9985	0,5	1,6

Vsi standardi (IBMP (Sigma Aldrich), [$^2\text{H}_3$]-IBMP (Sigma Aldrich) in IPMP (Sigma Aldrich)) so imeli 99,0 % čistost.

3.3.6 Določanje vsebnosti glutaciona

Vsebnost reducirane oblike glutaciona (GSH) v moštu in vinu smo določali z uporabo predkolonske derivatizacije in tekočinske kromatografije visoke ločljivosti s fluorescenčnim detektorjem (HPLC-FLD) po metodi, ki so jo opisali Janeš in sod. (2010).

3.3.6.1 Priprava vzorcev

V 20 mL merilne epruvete smo nalili 18 mL ohlajenega metanola, prepihanega z dušikom. Nato smo dodali 0,6 mL internega standarda *N*-acetil-L-cisteina (27 mg/L) in 2 mL vzorca mošta ali vina, prepihali z dušikom, merilne epruvete zaprli in dobro premešali. Vzorce mošta ali vina smo filtrirali skozi 0,45 μm filtre Ministar RC 25. Filtrirane vzorce smo redčili v razmerju 1:1 (v:v) s 5 mM pufrom natrijevega acetata z 0,1 mM etilendiaminotetraocetno kislino (EDTA) in jih takoj analizirali.

3.3.6.2 Pogoji za derivatizacijo in kromatografijo HPLC-FLD

Za identifikacijo in kvantifikacijo GSH smo uporabili HPLC-FLD s predkolonsko derivatizacijo ter programsko opremo Agilent Chemstation Rev. B.03.01 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, ZDA).

Predkolonsko derivatizacijo z *o*-ftalaldehidom in 2-aminoetanolom smo izvedli neposredno s HPLC inštrumentom za vsak vzorec tik pred injiciranjem. Derivatizacija je potekala na sledeč način: 2 μL *o*-ftalaldehida, 5-kratno spiranje z vodo, 5 μL vzorca,

5-kratno spiranje z vodo, 2 μ L 2-aminoetanola, mešanje reagentov in vzorca 1 min. Derivatiziran vzorec je bil takoj analiziran.

Ločba je potekala pri 25 °C na reverzno fazni koloni Synergi Fusion-RP 80A (4 μ m, 150 mm \times 2.0 mm, Phenomenex). Za mobilno fazo smo uporabili 50 mM pufer natrijevega acetata pH 5,7 (Mobilna faza A) in metanol (Mobilna faza B). Gradient je bil naslednji: 10 % B 1 min, od 10 % B do 34 % B v 26 min, od 34 % B do 100 % B v 2 min, 100 % B 3 min, od 100 % B do 10 % B v 2 min in na koncu 5 min kondicioniranja pri 10 % B. Pretok mobilne faze je bil 0,7 mL/min, volumen injiciranega vzorca pa 9 μ L. Valovna dolžina je bila 340 nm za ekscitacijo in 450 nm za emisijo.

3.3.6.3 Validacija metode

Linearnost smo določili s standardnimi raztopinami glutaciona na devetih koncentracijskih nivojih in v petih ponovitvah za vsak koncentracijski nivo. Linearnost in območje merjenja smo izračunali z multiplo linearno regresijo in F-testom. Umeritvena premica je bila linearna v koncentracijskem območju od 0,2 mg/L do 60 mg/L, ($R^2=0,9984$). Meja zaznave (LOD) je bila 0,06 mg/L, meja določitve (LOQ) pa 0,2 mg/L.

Vsi standardi, reduciran L-glutation (Sigma Aldrich), interni standard *N*-acetil-L-cistein (Sigma Aldrich), 2-aminoetanol (Sigma Aldrich) in *o*-ftalaldehid (Sigma Aldrich), so imeli 99 % čistost.

3.4 MIKROBIOLOŠKE ANALIZE

3.4.1 Izolacija čistih kultur komercialnih kvasovk

V 1. delu poskusa 1 smo pri petih komercialnih sevih kvasovk eliminirali prisotne bakterijske kulture in jih shranili kot čiste kulture kvasovk. Zatehtali smo 1,0 g suhih vinskih kvasovk in jih rehidrirali 20 min v 10 mL sterilne destilirane vode (35-40 °C). Pripravili smo redčitveno vrsto in ustrezne redčitve kvasovk nacepili na plošče s hranilnim gojiščem YM (kvasni ekstrakt 3,0 g/L, sladni ekstrakt 3,0 g/L, pepton 5,0 g/L, glukoza 10,0 g/L, agar 20,0 g/L). Plošče smo inkubirali 3-5 dni pri 26-28 °C in nato ovrednotili kvasne celice v izbrani koloniji z morfološkim in mikroskopskim pregledom. Ker smo pri vseh nacepljenih sevih kvasovk ugotovili večjo ali manjšo prisotnost bakterijskih kultur, smo iz reprezentativnih števnih plošč precepili prevladujoče vrste kolonij na YM gojišču z dodatkom antibiotika ampicilina (50 mg/L) (Sigma Aldrich). Plošče smo inkubirali 3-5 dni pri 26-28 °C in nato ponovno ovrednotili stanje kvasnih celic z morfološkim in mikroskopskim pregledom plošč. Ker so bile pri nekaterih nacepljenih sevih kvasovk še vedno prisotne bakterijske kolonije, smo

reprezentativne prevladujoče vrste kolonij precepili še na plošče z gojiščem YM z dodatkom antibiotikov kanamicina (25 mg/L) (Sigma Aldrich) in kloramfenikola (50 mg/L) (Sigma Aldrich). Po tri- do petdnevi inkubaciji pri 26-28 °C smo plošče ponovno pregledali in čiste kulture posameznih sevov kvasovk shranili v krioprotektor (destilirana voda z 10 % glicerola in 0,125 % fiziološke raztopine) pri -80 °C.

3.4.2 Spremljanje mikrobne populacije med AF

V poskusu 2 smo izvedli mikrobiološke analize v vinifikacijah, kjer smo kot startersko kulturo uporabili mešano kulturo kvasovk rodu *Saccharomyces* in rodu *ne-Saccharomyces* (SK9). Z namenom spremljanja mikrobne populacije posameznih rodov kvasovk smo prvo aseptično vzorčenje opravili 72 h po inokulaciji kvasovk rodu *ne-Saccharomyces* SK9, drugo pa 16. dan AF oz. šest dni po inokulaciji kvasovk rodu *Saccharomyces*. Za vsak vzorec smo pripravili redčitveno vrsto in ustrezne redčitve nacepili na plošče z WL gojiščem (Merck), ki omogoča razlikovanje med posameznimi rodovi in sevi kvasovk na podlagi različnih morfoloških lastnosti kolonij. Po tri- do petdnevni inkubaciji pri 26-28 °C smo določili koncentracijo živih kvasnih celic v vzorcih z morfološkim in mikroskopskim pregledom plošč. Za določitev deleža posameznih vrst kvasovk v vzorcih smo uporabili plošče, ki smo jih nacepili s posameznimi komercialnimi sevi teh kvasovk in jih uporabili kot referenčne.

3.5 SPREMLJANJE ODDANEGA CO₂ MED ALKOHOLNO FERMENTACIJO

Količino oddanega CO₂ med AF smo določali s tehtanjem fermentorjev z digitalno tehtnico in jo izrazili v gramih sproščenega CO₂ na liter vzorca.

3.6 SENZORIČNE ANALIZE

3.6.1 Test razlikovanja z uporabo razvrščanja vzorcev

V poskusu 2 smo po šestih mesecih zorenja vina pri 12 °C tri ponovitve vin iz vinifikacij s posameznimi starterskimi kulturami kvasovk združili v en vzorec. Senzorično analizo smo opravili s pomočjo testa razlikovanja z uporabo razvrščanja vzorcev po kakovosti ocenjevane senzorične lastnosti vina. Senzorično analizo je opravila skupina 12 izkušenih pokuševalcev vina. Vina so bila postrežena ohlajena na 12 °C. Pokuševalcem je bila podana informacija o sorti in letniku vina. Pokuševalci so rangirali vzorce vina od najboljšega (ocena 4) do najslabšega (ocena 1) za senzorični lastnosti aroma po tropskem sadju in celokupna kakovost vina. Pred rangiranjem vzorcev vina so bili pokuševalci za senzorično lastnost aroma po tropskem sadju

uvadeni s standardno raztopino 4MMP (20 ng/L), 3MH (500 ng/L) in 3MHA (100 ng/L) v vodi z dodatkom 50 mg/L GSH. Za posamezno senzorično lastnost je vsak pokuševalec ovrednotil serijo štirih vin. Vrstni red vzorcev v vsaki seriji je bil naključno izbran za vsakega posameznega pokuševalca. Vsako od štirih vin je predstavljalo posamezne starterske kulture kvasovk, uporabljene za izvedbo AF. Rezultate senzorične analize smo statistično obdelali z uporabo Friedmanove analize (Meilgaard in sod., 1999).

3.6.2 Deskriptivna senzorična analiza

V poskusih 3, 4 in 5 je po dveh mesecih zorenja vina pri temperaturi kleti (približno 18 °C v poskusih 3 in 5 in približno 14 °C v poskusu 4) 5-članska skupina izkušenih pokuševalcev opravila senzorično analizo. Vina so bila postrežena ohlajena na 12 °C. Pokuševalcem je bila podana informacija o sorti in letniku vina. Pokuševalci so ocenili intenzivnost težje tropske arome (pasijonka, mango), sveže tropske arome (limona, grenivka), fermentacijske arome (hruška, jabolko), zelene arome (zelena paprika) ter celokupno kakovost posameznega vzorca vina s točkami od 1 (najmanj intenzivna aroma) do 5 (najbolj intenzivna aroma). Vsak vzorec vina je predstavljal posamezne starterske kulture kvasovk oz. eno od ponovitev posameznih starterskih kultur kvasovk, uporabljenih za izvedbo AF. Rezultate senzorične analize smo statistično obdelali z uporabo multivariantne analize variance.

3.7 STATISTIČNE ANALIZE

3.7.1 ANOVA

Rezultate meritev parametrov, ki smo jih določili v poskusih s tremi ponovitvami (poskus 1, 2 in 5), smo analizirali z analizo variance (ANOVA) in jih primerjali z LSD testom z uporabo statistične programske opreme Statgraphics® Centurion XVI (StatPoint Technologies, Warenton, VA, ZDA).

3.7.2 Analiza z metodo glavnih komponent (PCA)

Metoda glavnih komponent (PCA, angl. principal component analysis) je ena od najpogosteje uporabljenih multivariantnih metod. To metodo smo v naši raziskavi uporabili za določitev nekaj prvih lastnosti iz nabora vseh določenih lastnosti (parametrov), ki pojasnjujejo čim večji delež razpršenosti (variance) vseh analiziranih podatkov posameznega poskusa. Osnovna zamisel metode je opisati razpršenost n enot v m razsežnem prostoru, ki je določen z m merjenimi spremenljivkami – z množico

nekoreliranih spremenljivk (komponent), ki so linearne kombinacije originalnih merjenih spremenljivk. Nove spremenljivke, komponente, so urejene od najpomembnejše, to je tiste, ki pojasnjuje kar največ razpršenosti osnovnih podatkov, do najmanj pomembne, to je tiste, ki pojasnjuje najmanjši del razpršenosti opazovanih spremenljivk (Freedman in sod., 2007).

Cilj metode PCA je poiskati nekaj prvih komponent, ki pojasnjujejo čim večji del razpršenosti analiziranih podatkov. Na ta način torej zmanjšamo razsežnost podatkov s čim manjšo izgubo informacij. Z metodo PCA želimo poiskati takšne linearne kombinacije opazovanih spremenljivk, ki kar se da močno korelirajo z opazovanimi spremenljivkami oz. pojasnijo kar se da veliko razpršenosti (variacije) opazovanih spremenljivk (Freedman in sod., 2007; Košmelj, 2007).

V literaturi je za določanje števila najpomembnejših komponent več pravil:

- izbrano število komponent naj pojasni vsaj 80 odstotkov skupne variance;
- lastne vrednosti komponent naj bodo večje kot povprečna vrednost lastnih vrednosti;
- delež pojasnjene variance zadnje še izbrane komponente naj bo vsaj 5 odstotkov;
- število komponent določimo na osnovi grafične predstavitve lastnih vrednosti na podlagi diagrama: v koordinatni sistem nanašamo na abscisno os število komponent, na ordinatno os pa ustrezne lastne vrednosti. V točki, kjer se krivulja na grafu lomi, je sugestija za število komponent (Košmelj, 2007).

3.7.3 Linearna diskriminantna analiza (LDA)

PCA poišče smeri v prostoru, vzdolž katerih je varianca največja, vendar pri tem ne upošteva potencialne informacije o tem, kateri skupini posamezen primer pripada. V nasprotju s tem linearna diskriminantna analiza (LDA, angl. linear discriminant analysis) išče smeri, ki omogočajo kar se da dobro ločevanje med skupinami. V naši raziskavi smo z uporabo metode LDA na izbranih podatkih (pridobljenih z metodo PCA) poiskali smeri oz. linearne kombinacije, ki omogočajo kar se da dobro ločevanje med skupinami vin, pridelanimi z različnimi starterskimi kulturami v posameznih poskusih. LDA je klasifikacijska metoda za iskanje linearnih kombinacij osnovnih p spremenljivk, ki najbolje pojasnijo razlike med skupinami. Dobljene linearne kombinacije imenujemo diskriminantne spremenljivke ali diskriminantne funkcije. Prva diskriminantna spremenljivka določa po katerih osnovnih spremenljivkah se populacije najbolj razlikujejo, v drugi diskriminantni spremenljivki so kot pomembnejše zastopane osnovne spremenljivke, ki po pomembnosti sledijo tistim v prvi diskriminantni spremenljivki itd. Tako kot pri PCA lahko tudi diskriminantne spremenljivke uredimo po pomembnosti glede na pripadajoče lastne vrednosti (Freedman in sod., 2007; Kastelec in Košmelj, 2008).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Glavni namen izvedenih vinifikacij je bila izbira starterske kulture kvasovk, s katero lahko dosežemo dobro kemijsko in senzorično kakovost vina sauvignon. S tem namenom smo za izvedbo alkoholne fermentacije (AF) mošta uporabili številne komercialne starterske kulture kvasovk in njihove kombinacije, spremljali njihovo fermentacijsko kinetiko ter med in po zaključeni AF v pridelanih mladih vinih določali kakovostne parametre s poudarkom na vsebnosti glutaciona (GSH) in aromatičnih spojin, tipičnih za vino sauvignon. Poleg izbire starterske kulture kvasovk smo v poskusih preverjali tudi vpliv čistosti starterske kulture, temperature AF in delovnega volumna fermentorjev ter letnika pridelave na omenjene kakovostne parametre vina.

Znano je, da lahko kvasovke med in po AF vplivajo na koncentracijo GSH, ki je eden od najpomembnejših antioksidantov v moštu oz. vinu (Park in sod., 2000a, 2000b; Dubourdieu in Lavigne-Cruege, 2004; Du Toit, 2007). Kvasovke, tako kot skoraj vse druge evkariontske in številne prokariontske celice, sintetizirajo GSH, ki je pomemben tako za številne celične funkcije kot tudi za zaščito celic v različnih stresnih razmerah (Pócsi in sod., 2004; Rollini in Manzoni, 2006). Med AF, predvsem v njeni začetni fazi, lahko kvasovke porabljajo GSH iz mošta kot vir dušika in žvepla, ki ga potrebujejo za rast in razmnoževanje (Penninckx, 2002; Dubourdieu in Lavigne-Cruege, 2004). Proti koncu AF in v prvih nekaj mesecih zorenja na drožeh se GSH z avtolizo kvasovk sprosti nazaj v vino (Dubourdieu in Lavigne-Cruege, 2004). Različni sevi kvasovk imajo različno sposobnost biosinteze, ohranjanja ter sproščanja GSH v vino. Po drugi strani lahko komercialne suhe starterske kulture kvasovk vsebujejo določen delež drugih mikroorganizmov (OIV-oen 329-2009 (OIV, 2012)), predvsem bakterij, ki lahko potencialno vplivajo na delovanje kvasovk med AF in s tem na vsebnost GSH v vinu, vendar teh podatkov v literaturi ni.

Ene od najpomembnejših aromatičnih spojin v vinu sauvignon so hlapni tioli in metokspirazini (MPZ). Hlapni tioli se v grozdju nahajajo v obliki nehlapnih, nearomatičnih prekurzorjev in se sprostijo šele med AF s pomočjo encimov kvasovk liaz in alkohol acetiltransferaz (Darriet in sod., 1995; Swiegers in sod., 2007). Raziskave so pokazale, da imajo različni sevi kvasovk različno sposobnost sproščanja hlapnih tiolov med AF (Murat in sod., 2001b, Howell in sod., 2004; Dubourdieu in sod., 2006; Swiegers in sod., 2005, 2006, 2009). Ker so hlapni tioli občutljivi na oksidacijo (Dubourdieu in Lavigne-Cruege, 2004, Ugliano in sod., 2011) in zelo hitro reagirajo z *o*-kinoni, ki nastanejo pri oksidaciji hidroksicimetnih kislin (HCK) (Cheynier in sod., 1986), je vsebnost GSH v vinu izrednega pomena, saj jih le-ta ščiti pred oksidacijo (Dubourdieu in Lavigne-Cruege, 2004, Cheynier in sod., 1986). Vsebnost MPZ v vinu pa je odvisna predvsem od vinogradniških dejavnikov (Belancic in Agosin, 2007; Candelon in sod., 2010; Lacey in sod., 1991; Marais, 1994; Sala in sod., 2005; Šuklje in sod., 2012) in po dosedanjem vedenju kvasovke ne vplivajo na njihovo vsebnost v vinu.

Znano je, da temperatura AF vpliva na fermentacijsko kinetiko kvasovk in s tem na tvorbo nekaterih senzorično pomembnih aromatičnih spojin v vinu, kar smo z vinifikacijami pri različnih temperaturah AF preverjali tudi v naši raziskavi. Pri višjih temperaturah AF je fermentacijska kinetika hitrejša, pri nižjih temperaturah AF, ali celo drastičnih znižanjih temperature v začetnih fazah AF, pa se AF lahko upočasnijo ali zaustavi (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Torija in sod., 2003). Temperatura AF pomembno vpliva tudi na vsebnost hlapnih tiolov v vinu, vendar je to odvisno od uporabljenega seva kvasovk (Masneuf-Pomarède in sod., 2006; Swiegers in sod., 2006; Howell in sod., 2004). Vpliv temperature AF na vsebnost GSH v vinu še ni raziskan.

Sestava mošta pomembno vpliva tako na delovanje kvasovk kot tudi na končno kakovost pridelanega vina, zato smo v naši raziskavi izvedli vinifikacije z mošti treh zaporednih letnikov. Z namenom, da bi ugotovili, ali daje posamezna starterska kultura kvasovk primerljive rezultate tako v mikrovinifikacijskem kot v industrijskem merilu, smo vinifikacije izvedli tudi pri različnih delovnih volumnih fermentorjev (120 mL, 3 L, 25 L, 35 L in 2500 L). Prenos mikrobiološkega procesa iz laboratorijskega v industrijsko merilo (scale up) je ključnega pomena za realizacijo izboljšane procesa v komercialne namene. Spremljanje in razumevanje procesov v laboratorijskih merilih je veliko bolj enostavno zaradi večje homogenosti fermentirajočega mošta, temperature in pH vrednosti v fermentorjih. Takšno homogenost je v večjih merilih težko doseči, zato so dobitki v industrijskih merilih na splošno nižji, kot bi pričakovali glede na rezultate, dobljene z laboratorijskimi raziskavami (Villadsen in sod., 2011).

V nadaljevanju predstavljamo in komentiramo rezultate osnovnih kemijskih parametrov vina, vsebnosti GSH in aromatičnih spojin (hlapnih tiolov in metoksipirazinov), prostega aminokislinskega dušika (FAN), hidroksicimetnih kislin (HCK) ter senzorične analize pridelanih vin. Rezultate posameznih poskusov smo statistično obdelali z metodo glavnih komponent (PCA) in linearno diskriminantno analizo (LDA). Rezultati so predstavljeni in komentirani po posameznih poskusih in s pripadajočo razpravo na koncu posameznega sklopa.

4.1 POSKUS 1

V poskusu 1 smo izvedli vinifikacije mošta letnika 2009 v 120 mL fermentorjih in pri kontrolirani temperaturi 15 °C s petimi komercialnimi sevi kvasovk. Seve kvasovk smo izbrali na podlagi njihovih deklaracij, po katerih so primerni za pridelavo vina sauvignon, imajo dobro sposobnost sproščanja hlapnih tiolov ter podobno (močno) fermentacijsko kinetiko in temperaturni razpon delovanja (priloga A). Seva kvasovk VIN7 (SK1) in QA23 (SK2) sta bila izbrana tudi na podlagi pozitivnih referenc številnih znanstvenih objav (Swiegers in sod., 2006; King in sod., 2008; Swiegers in sod., 2009). Ker nas je zanimalo, ali imajo bakterije, ki so prisotne v komercialnih

starterskih kulturah (OIV-oeno 329-2009 (OIV, 2012)) vpliv na delovanje kvasovk, na koncentracijo GSH in ostalih kemijskih parametrov vina, smo v 1. delu poskusa komercialne starterske kulture očistili bakterij in jih inokulirali v mošt kot čiste kulture kvasovk, v 2. delu poskusa pa smo inokulirali neprečiščene starterske kulture. Ker smo v moštu določili razmeroma majhne vsebnosti GSH (okrog 10 mg/L), smo v mošt dodali reducirano obliko GSH do končne vsebnosti 40 mg/L.

Vpliv prisotnosti oz. odsotnosti bakterijskih kultur v starterski kulturi kvasovk na koncentracijo GSH med AF in v pridelanem vinu še ni bil raziskan. Sklepamo, da lahko bakterije vstopajo v interakcije z vinskimi kvasovkami in vplivajo tudi na vsebnost GSH.

V nadaljevanju so predstavljeni in komentirani rezultati osnovnih kemijskih parametrov mošta in vina, vsebnosti FAN, HCK, GSH, hlapnih tiolov in MPZ obeh delov poskusa 1.

4.1.1 Osnovni kemijski parametri, FAN in HCK v moštu

Ker smo 1. in 2. del poskusa 1 opravljali ločeno oz. v različnem časovnem obdobju, smo tudi manjše količine mošta odmrznili ločeno. Mošta, ki smo ju uporabili za AF, kljub enotni razdelitvi v manjše volumne pred zmrzovanjem, sta se bistveno razlikovala v vsebnosti izmerjenih parametrov (preglednica 13).

Preglednica 13: Vsebnosti reducirajočih sladkorjev (RS), hlapnih kislin (HK) in prostega aminokislinskega dušika (FAN) v moštih iz poskusa 1

Table 13: Content of reducing sugars (RS), volatile acidity (HK) and free amino nitrogen (FAN) in musts of the experiment 1

Parameter	Mošt sauvignon 2009	
	1. del poskusa	2. del poskusa
RS (g/L)	269,8	219,4
HK (g/L)	0,04	0,00
FAN (mg N/L)	82,2	77,4

Mošt, ki smo ga uporabili v 1. delu poskusa, je vseboval predvsem mnogo več (50 mg/L) reducirajočih sladkorjev (RS) kot mošt, ki smo ga uporabili v 2. delu poskusa. Večje vsebnosti RS v moštu so za nekatere kvasovke zavirajoč dejavnik, saj povzročajo osmotski stres, ki se pri kvasovkah lahko odrazi z upočasnjeno fermentacijsko kinetiko na začetku AF (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Aranda in sod., 2011). Mošt, ki smo ga uporabili v 2. delu poskusa je vseboval bistveno večje vsebnosti HCK (kar 100 mg/L več) kot mošt, ki smo ga uporabili v 1. delu poskusa (preglednica 14). Večje vsebnosti HCK naj ne bi imele vpliva na rast in delovanje kvasovk med AF (Aranda in sod., 2011). V vsebnosti hlapnih kislin (HK) in prostega aminokislinskega dušika (FAN) med moštoma obeh delov poskusa ni bilo večjih razlik.

Preglednica 14: Vsebnost hidroksicimetičnih kislin (HCK) v moštih iz poskusa 1

Table 14: Hydroxycinnamic acids (HCK) content in musts of the experiment 1

Mošt sauvignon 2009		
HCK (mg/L)	1. del poskusa	2. del poskusa
<i>cis</i> -kaftarna kislina	3,6	6,9
kaftarna kislina	100,5	151,2
GRP	22,4	30,0
<i>cis</i> -kutarna kislina	11,1	24,3
kutarna kislina	27,3	41,2
<i>cis</i> -fertarna kislina	0,4	1,6
fertarna kislina	3,3	6,5
kavna kislina	1,6	10,8
<i>p</i> -kumarna kislina	0,7	3,0
ferulna kislina	0,1	0,8
HCK skupaj	171,0	276,3

4.1.2 Osnovni kemijski parametri vina in FAN

Alkoholna fermentacija je v obeh delih poskusa 1 potekala pri kontrolirani temperaturi 15 °C in se je v 1. delu poskusa zaključila po 26 dneh, v 2. delu poskusa pa po 36 dneh. Daljše trajanje AF v 2. delu poskusa je posledica počasnejše fermentacijske kinetike neprečiščenih starterskih kultur kvasovk, o kateri smo lahko sklepali glede na vsebnost RS v vinu med AF. V pridelanih mladih vinih smo določili vsebnosti RS, HK in FAN, katerih vrednosti so prikazane v preglednici 15.

Preglednica 15: Vsebnost reducirajočih sladkorjev (RS), hlapnih kislin (HK) in prostega aminokislinskega dušika (FAN) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s prečiščenimi in neprečiščenimi starterskimi kulturami SK1–SK5

Table 15: Content of reducing sugars (RS), volatile acidity (HK) and free amino nitrogen (FAN) in wines after the completion of alcoholic fermentation with purified and unpurified starter cultures SK1-SK5

Parameter	Starterska kultura/vino				
	SK1	SK2	SK3	SK4	SK5
1. del poskusa					
RS (g/L)	1,9±0,5 ^{*a}	3,5±0,7 ^b	2,3±0,5 ^{ab}	2,5±0,7 ^{ab}	2,3±1,2 ^{ab}
HK (g/L)	0,57±0,08 ^c	0,45±0,04 ^b	0,38±0,03 ^{ab}	0,40±0,01 ^{ab}	0,33±0,05 ^a
FAN (mg N/L)	26,2±1,7 ^d	20,4±1,0 ^c	15,7±1,7 ^b	11,7±2,0 ^a	18,7±2,0 ^{bc}
2. del poskusa					
RS (g/L)	8,7±2,5 ^c	2,8±0,8 ^a	5,7±0,3 ^b	4,5±1,3 ^{ab}	5,3±0,6 ^b
HK (g/L)	0,56±0,08 ^c	0,42±0,03 ^a	0,53±0,08 ^{bc}	0,37±0,05 ^a	0,44±0,04 ^{ab}
FAN (mg N/L)	28,0±1,7 ^c	18,7±1,0 ^b	18,1±2,7 ^b	9,9±2,7 ^a	16,9±2,7 ^b

* $\bar{x} \pm SO$ (povprečje treh ponovitev \pm standardni odklon); a, b, c – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$)

V 1. delu poskusa so se vina v vseh izmerjenih parametrih statistično značilno razlikovala. Vsebnost RS je bila statistično značilno največja v vinu SK2 (3,5 g/L), kateremu so sledila vina SK3-SK5 (2,3-2,5 g/L), statistično značilno najmanjšo vsebnost pa smo določili v vinu SK1 (1,9 g/L). Vsebnost HK je bila statistično značilno največja v vinu SK1 (0,57 g/L), kar je verjetno posledica značilne povečane tvorbe HK

tega seva kvasovk, kar so pokazali že drugi avtorji (King in sod., 2008; Swiegers in sod., 2009). Po vsebnosti HK je vinu SK1 sledilo vino SK2 (0,45 g/L), nato SK3 in SK4 (0,38–0,40 g/L), statistično značilno najmanjšo vsebnost pa smo določili v vinu SK5 (0,33 g/L). Vsebnost FAN je bila statistično značilno največja v vinu SK1 (26,2 mg N/L), ki mu je sledilo vino SK2 (20,4 mg N/L), nato SK3 ter SK5 (15,7–18,7 mg N/L), statistično značilno najmanjšo vsebnost pa smo določili v vinu SK4 (11,7 mg N/L). Med AF se je vsebnost FAN zmanjšala za 56,0 mg/L (SK1)–70,5 mg/L (SK4) v odvisnosti od uporabljenega seva kvasovk. Glede na poročanja Bell in Henschke (2005), da kvasovke porabijo med AF 70–267 mg N/L, so imele kvasovke v našem poskusu zelo majhne potrebe po dušiku. Potrdimo lahko, da ima od preiskovanih starterskih kultur najmanjše potrebe po dušiku med AF starterska kultura SK1, največje pa starterska kultura SK4.

Tudi v 2. delu poskusa so se vina v izmerjenih parametrih statistično značilno razlikovala. Statistično značilno največje vsebnosti RS smo določili v vinih SK1 (8,7 g/L), ki sta mu sledili vini SK3 in SK5 (5,3–5,7 g/L), nato SK4 (4,5 g/L), statistično značilno najmanjše vsebnosti smo določili v vinih SK2 (2,8 g/L). Vsebnost HK je bila tudi v tem delu poskusa statistično značilno največja v vinu SK1 (0,56 g/L), ki mu sledijo vina SK3 (0,53 g/L), nato SK5 (0,44 g/L), najmanjše vsebnosti smo določili v vinih SK2 (0,42 g/L) in SK4 (0,37 g/L). Tudi vsebnosti FAN so bile, kot že v 1. delu poskusa, statistično značilno največje v vinu SK1 (28,0 mg N/L), ki so mu sledila vina SK2, SK3 in SK5 (16,9–18,7 mg N/L), statistično značilno najmanjše vsebnosti FAN pa smo določili v vinu SK4 (9,9 mg N/L). Starterske kulture kvasovk so med AF porabile med 49,4 mg/L (SK1) in 67,5 mg/L (SK4) FAN. Enak trend v porabi dušika pri starterskih kulturah SK1 in SK4 se je pokazal že v 1. delu poskusa, iz česar lahko sklepamo, da ima starterska kultura SK1 manjše oz. starterska kultura SK4 večje potrebe po dušiku.

4.1.3 Hidroksicimetne kisline

Vsebnosti posameznih in skupnih HCK, ki smo jih določili v vinih obeh delov poskusa 1 po končani AF, so predstavljene v preglednici 16.

Preglednica 16: Vsebnosti hidroksicimetnih kislin (HCK) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s prečiščenimi in neprečiščenimi starterskimi kulturami SK1–SK5

Table 16: Contents of hydroxycinnamic acids (HCK) in wines after the completion of alcoholic fermentation with purified and unpurified starter cultures SK1-SK5

HCK (mg/L)	Starterska kultura				
	SK1	SK2	SK3	SK4	SK5
1. del poskusa					
<i>cis</i> -kaftarna kislina	2,9±0,1 ^{*c}	2,8±0,2 ^{bc}	2,7±0,0 ^{ab}	2,7±0,0 ^a	3,2±0,0 ^d
kaftarna kislina	104,1±0,6 ^c	105,6±1,2 ^c	69,1±1,5 ^a	68,2±1,2 ^a	86,3±1,1 ^b
GRP	22,4±0,2 ^c	22,4±0,1 ^c	13,3±0,1 ^a	13,5±0,0 ^a	18,1±0,2 ^b
<i>cis</i> -kutarna kislina	12,0±1,0 ^c	12,1±0,4 ^c	7,7±0,1 ^a	7,6±0,2 ^a	9,8±0,1 ^b
kutarna kislina	23,7±0,2 ^c	23,7±0,2 ^c	16,5±0,3 ^a	16,1±0,1 ^a	20,2±0,3 ^b
<i>cis</i> -fertarna kislina	0,3±0,0 ^b	0,2±0,0 ^a	0,3±0,0 ^b	0,3±0,0 ^c	0,3±0,0 ^c
fertarna kislina	3,7±0,0 ^c	3,7±0,1 ^c	2,2±0,0 ^a	2,2±0,0 ^a	2,8±0,1 ^b
kavna kislina	5,1±0,1 ^c	5,2±0,2 ^c	2,8±0,5 ^a	2,9±0,3 ^a	3,9±0,1 ^b
<i>p</i> -kumarna kislina	0,7±0,0 ^b	1,0±0,1 ^c	0,3±0,0 ^a	0,3±0,0 ^a	0,4±0,1 ^a
ferulna kislina	0,2±0,0 ^c	0,1±0,0 ^b	₋ ^a	₋ ^a	₋ ^a
HCK skupaj	175,0±1,5 ^c	176,9±1,7 ^c	114,9±2,4 ^a	113,7±1,7 ^a	144,9±1,7 ^b
2. del poskusa					
<i>cis</i> -kaftarna kislina	6,5±0,1 ^c	6,2±0,1 ^{bc}	5,8±0,3 ^{ab}	5,8±0,1 ^{ab}	5,6±0,2 ^a
kaftarna kislina	148,1±10,1 ^a	143,0±4,1 ^a	140,4±3,1 ^a	142,6±1,0 ^a	139,6±2,5 ^a
GRP	32,2±1,5 ^c	30,3±0,8 ^b	30,0±1,0 ^{ab}	29,6±0,1 ^{ab}	28,5±0,5 ^a
<i>cis</i> -kutarna kislina	25,1±1,6 ^b	23,6±0,6 ^{ab}	22,8±1,7 ^a	22,2±1,3 ^a	22,1±0,7 ^a
kutarna kislina	37,2±3,8 ^a	37,3±1,9 ^a	34,8±2,6 ^a	35,0±0,2 ^a	35,3±1,3 ^a
<i>cis</i> -fertarna kislina	1,2±0,3 ^a	1,2±0,0 ^a	1,1±0,1 ^a	1,2±0,2 ^a	1,0±0,0 ^a
fertarna kislina	6,3±0,6 ^{ab}	6,4±0,8 ^b	5,8±0,5 ^{ab}	5,4±0,4 ^a	5,6±0,4 ^{ab}
kavna kislina	16,2±1,0 ^b	15,0±0,8 ^{ab}	13,5±2,0 ^a	14,9±1,8 ^{ab}	14,0±0,6 ^{ab}
<i>p</i> -kumarna kislina	14,1±1,6 ^b	3,3±0,2 ^a	2,9±0,5 ^a	2,5±0,6 ^a	1,7±1,3 ^a
ferulna kislina	2,5±1,5 ^b	1,0±0,5 ^a	0,8±0,3 ^a	0,5±0,1 ^a	0,8±0,4 ^a
HCK skupaj	289,4±17,6 ^b	267,4±8,9 ^a	257,8±6,0 ^a	259,8±4,0 ^a	245,8±13,6 ^a

* $\bar{x} \pm SO$ (povprečje treh ponovitev \pm standardni odklon); a, b, c, d – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$)

4.1.3.1 Prvi del poskusa 1

Kot je razvidno iz preglednice 16, so se vina prvega dela poskusa statistično značilno razlikovala med seboj v vsebnosti tako posameznih kot tudi skupnih HCK. V vseh vinih je bila prevladujoča HCK kaftarna kislina (68,2 (SK3)-105,6 (SK2) mg/L), katere vsebnost se je med AF večinoma zmanjšala za 14-32 %. Druga najbolj zastopana HCK v vinih je bila kutarna kislina (16,1 (SK4)-23,7 (SK1, SK2) mg/L), katere vsebnost se je tekom AF ravno tako zmanjšala za 13-41 %. Fertarna kislina je bila v vinih zastopana v manjših vsebnostih kot ostala dva estra (2,2 (SK3, SK4)-3,7 (SK1, SK2) mg/L), njena vsebnost pa se je med AF ravno tako večinoma zmanjšala za 15-33%. *cis*-Oblike kaftarne, kutarne in fertarne kisline so bile v vinih zastopane v vsebnostih 2,7-3,2 mg/L (*cis*-kaftarna kislina), 7,6-12,1 mg/L (*cis*-kutarna kislina) in 0,2-0,3 mg/L (*cis*-fertarna kislina). Tudi vsebnosti le-teh so se med AF večinoma zmanjšale, v povprečju za 11-50 %. Zmanjšanje vsebnosti estrov HCK je lahko posledica njihove hidrolize (encimske ali kislinske) med AF, pri čemer nastanejo proste HCK (kavna, *p*-kumarna in ferulna kislina) (Somers in sod., 1987; Vanzo in sod., 2007). Lahko pa je posledica

njihove pretvorbe v *o*-kinone kaftarne kisline, ki lahko reagirajo z GSH, pri čemer nastane GRP (Salgues in sod., 1986). V vinih smo določili med 13,3 (SK3) in 22,4 (SK1, SK2) mg/L GRP, njegova vsebnost pa se je med AF večinoma zmanjšala za 16-41 %.

Proste HCK so bile v vinih zastopane v nižjih vsebnostih. Vsebnost kavne kisline se je med AF povečala in smo jo v vinih določili v vsebnostih med 2,8 (SK3) in 5,2 (SK2) mg/L. Vsebnost *p*-kumarne kisline se je med AF večinoma zmanjšala in smo jo v vinih določili v vsebnostih med 0,3 (SK3, SK4) in 1 (SK2) mg/L. Tudi vsebnost ferulne kisline se je tekom AF zmanjšala, določili pa smo jo le v vinih SK1 in SK2. Zmanjšanje vsebnosti *p*-kumarne in ferulne kisline med AF je lahko posledica tvorbe vinilfenolov iz omenjenih HCK s pomočjo kvasnih encimov (dekarboksilaze *p*-kumarne in ferulne kisline). Prav tako se lahko vsebnost nekaterih prostih HCK zmanjša z adsorpcijo v celične stene kvasovk (Somers in sod., 1987). Vsebnost vseh HCK je bila statistično značilno največja v vinih SK1 (175,0 mg/L) in SK2 (176,9 mg/L), v katerih je bila tudi zanemarljivo večja kot v moštu (171,0 mg/L), tem so sledila vina SK5 (144,9 mg/L), statistično značilno najmanjše vsebnosti pa smo določili v vinih SK3 (114,9 mg/L) in SK4 (113,7 mg/L). V vinih SK3-SK5 se je vsebnost skupnih HCK med AF zmanjšala za 15-34 % glede na začetno vsebnost HCK v moštu.

4.1.3.2 Drugi del poskusa 1

Tudi vina 2. dela poskusa so se statistično značilno razlikovala med seboj v vsebnosti skoraj vseh HCK (razen kaftarne, kutarne in *cis*-fertarne kisline) kot tudi skupnih HCK (preglednica 16). Prevladujoča HCK v vinih je bila kaftarna kislina (139,6-148,1 mg/L), katere vsebnost je bila v vseh vinih za 2-8 % manjša kot v moštu. Kutarna kislina je bila v vinih druga najbolj zastopana HCK (34,8-37,3 mg/L), njena vsebnost pa se je tekom AF zmanjšala za 9-16 %. Tekom AF se je zmanjšala tudi vsebnost fertarne kisline (za 2-17 %), ki smo jo v vinih določili v vsebnostih med 5,4 (SK4) in 6,4 (SK2) mg/L. *cis*-Oblike kaftarne, kutarne in fertarne kisline so bile v vinih zastopane v vsebnostih 5,6-6,5 mg/L (*cis*-kaftarna kislina), 22,1-25,1 mg/L (*cis*-kutarna kislina) in 1,0-1,2 mg/L (*cis*-fertarna kislina). Njihove vsebnosti so se med AF večinoma zmanjšale, v povprečju za 3-37 %. Vsebnosti GRP, ki nastane z vezavo *o*-kinona kaftarne kisline in GSH, so bile v vinih v vsebnostih med 28,5 (SK5) in 32,2 (SK1) mg/L. Vsebnosti GRP v vinu se niso bistveno razlikovale od vsebnosti GRP v moštu. Vsebnost kavne kisline se je med AF povečala (za 25-50 %) in smo jo v vinih določili v vsebnostih med 13,5 (SK3) in 16,2 (SK1) mg/L. Vsebnosti *p*-kumarne in ferulne kisline so se tekom AF zmanjšale, v vinih pa sta bili prisotni v vsebnostih 3,3-14,1 mg/L (*p*-kumarna kislina) in 0,5-2,5 mg/L (ferulna kislina). Vsebnosti vseh HCK so bile statistično značilno večje le v vinih SK1 (289,4 mg/L), v katerih so bile tudi malenkost večje (5 %) kot v moštu, medtem ko med ostalimi vini v vsebnosti HCK ni bilo statistično značilnih razlik

(245,8-267,4 mg/L), njihova vsebnost pa je bila za 3-11 % manjša kot v moštu (276,3 mg/L).

4.1.4 Spremljanje vsebnosti glutaciona

Vsebnost GSH, ki smo ga v obeh delih poskusa 1 dodali v mošt do končne vsebnosti 40 mg/L, smo spremljali v različnih fazah AF. V 1. delu poskusa smo njegovo vsebnost spremljali tudi med zorenjem vina na drožeh. Rezultati so prikazani v preglednici 17.

Preglednica 17: Vsebnosti glutaciona (GSH) v moštih in vinih v različnih fazah vinifikacij s prečiščenimi in neprečiščenimi starterskimi kulturami SK1–SK5. Začetna koncentracija GSH v moštu je bila 40 mg/L

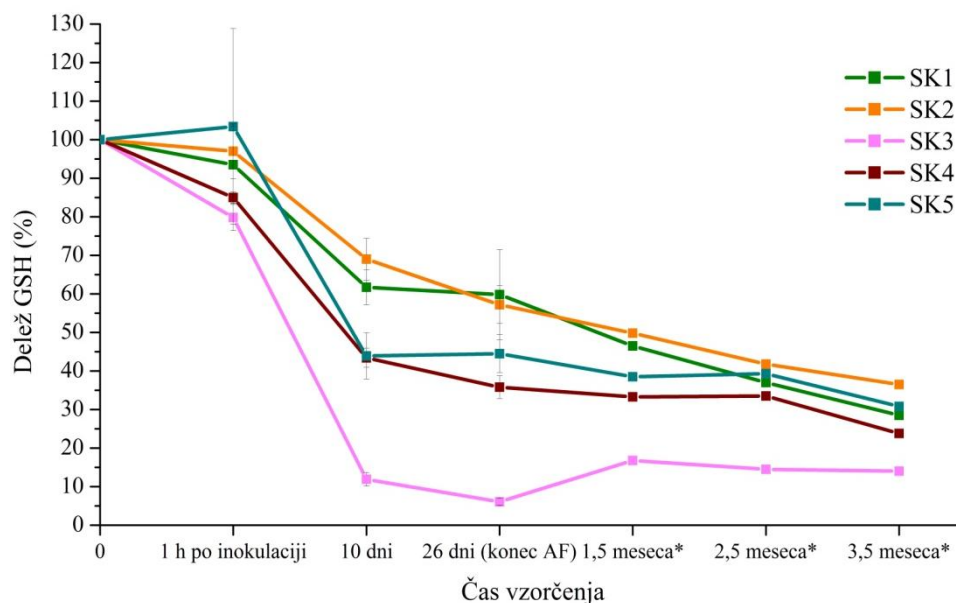
Table 17: Contents of glutathione (GSH) in musts and wines at different stages of vinifications with purified and unpurified starter cultures SK1-SK5. Initial GSH concentration in must was 40 mg/L

Čas vzorčenja	Starterska kultura				
	SK1	SK2	SK3	SK4	SK5
1. del poskusa					
1 h po inokulaciji	37,4±4,0* ^{ab}	38,8±2,8 ^{ab}	31,9±1,4 ^a	34,0±0,6 ^{ab}	41,4±10,1 ^b
10 dni	24,7±1,8 ^c	27,6±2,2 ^c	4,8±0,7 ^a	17,4±1,0 ^b	17,6±2,4 ^b
26 dni (konec AF)	23,9±4,7 ^c	22,9±2,0 ^c	2,4±0,3 ^a	14,3±1,2 ^b	17,8±2,0 ^b
70 dni†	18,6	19,9	6,7	13,3	15,4
102 dni†	14,8	16,7	5,8	13,4	15,7
133 dni†	11,4	14,6	5,6	9,5	12,3
2. del poskusa					
1 h po inokulaciji	40,2±0,9 ^b	37,0±0,5 ^a	36,8±0,8 ^a	36,7±0,5 ^a	35,5±1,9 ^a
10 dni	23,4±0,3 ^a	27,0±1,7 ^b	28,6±0,5 ^{bc}	30,2±1,6 ^c	30,6±2,2 ^c
36 dni (konec AF)	14,1±0,6 ^a	15,6±1,1 ^{ab}	14,6±1,5 ^a	17,8±0,5 ^c	16,7±0,6 ^{bc}

* $x \pm SO$ (povprečje \pm standardni odklon); † meritev v združenih paralelkah vina; a, b, c, d – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$)

4.1.4.1 Prvi del poskusa 1

Kot je razvidno iz preglednice 17, se je koncentracija GSH v fermentorjih statistično značilno razlikovala že takoj po inokulaciji starterskih kultur v mošt (eno uro po inokulaciji). Statistično značilno največje vsebnosti GSH smo določili v fermentorjih SK5 (41,4 mg/L), ki so jim sledili fermentorji SK1, SK2 in SK4 (34,0-38,8 mg/L), statistično značilno najmanjše vsebnosti pa smo določili v fermentorjih SK3 (31,9 mg/L). V prvi uri AF se je vsebnost GSH v fermentorjih zmanjšala za 3 % (SK2)-20 % (SK3) glede na začetno vsebnost GSH v moštu (40 mg/L), z izjemo fermentorjev SK5, v katerih se je vsebnost GSH nekoliko povečala (3 %) (slika 13). Kvasovke predvsem na začetku AF (v fazi prilagajanja in v začetku eksponentne faze rasti kvasovk) porabljajo GSH kot vir žvepla in dušika, ki ga potrebujejo za rast in razmnoževanje (Penninckx, 2002; Dubourdieu in Lavigne-Cruege, 2004).



Slika 13: Deleži GSH (%) v fermentorjih s prečiščenimi starterskimi kulturami kvasovk v različnih fazah alkoholne fermentacije (AF) in zorenja vina na drožeh*

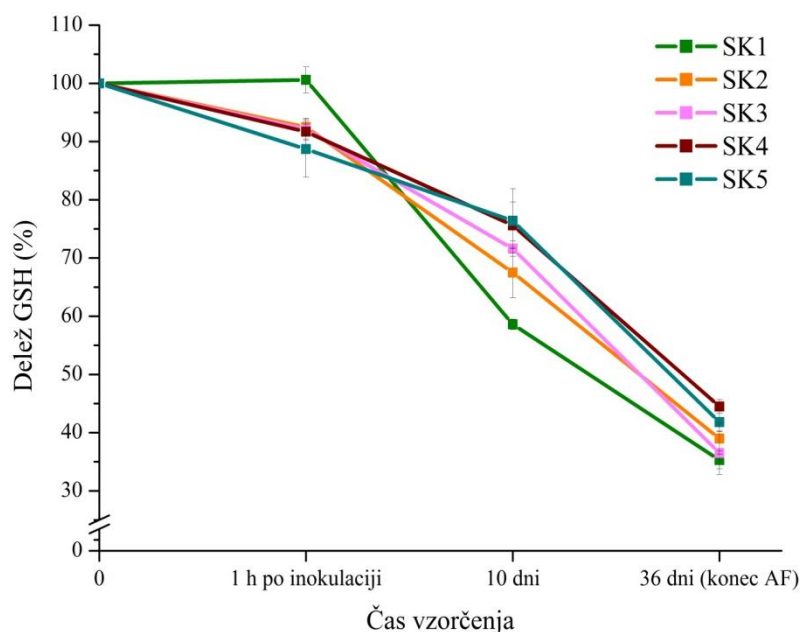
Figure 13: Proportions of GSH (%) in fermentors with purified yeast starter cultures at different stages of alcoholic fermentation (AF) and maturing wine on lees*

Od prvega (1 h po inokulaciji) do desetega dne AF se je v vseh fermentorjih vsebnost GSH zmanjšala še za 28 % (SK2)–68 % (SK3) glede na začetno vsebnost GSH v moštu, kar je v nasprotju z rezultati nekaterih raziskav, v katerih se je vsebnost GSH po tretjem oz. četrtem dnevu AF začela povečevati (Park in sod., 2000a; Dubourdiu in Lavigne-Cruege, 2004). Statistično značilno največje vsebnosti GSH smo 10. dan AF, v eksponentni fazi rasti kvasovk, določili v fermentorjih SK1 (24,7 mg/L) in SK2 (27,6 mg/L), ki so jim sledili fermentorji SK4 (17,4 mg/L) in SK5 (17,6 mg/L), statistično značilno najmanjše vsebnosti pa smo določili v fermentorjih SK3 (4,8 mg/L). Do konca AF se je vsebnost GSH v skoraj vseh fermentorjih še zmanjševala, vendar bistveno manj kot v prvih desetih dneh. Od 10. dne do konca AF se je vsebnost GSH v fermentorjih zmanjšala še za 2 % (SK1)-12 % (SK2) glede na začetno vsebnost GSH v moštu, z izjemo fermentorjev SK5, v katerih se je vsebnost GSH povečala, vendar zanemarljivo malo. Po končani AF smo statistično značilno največje vsebnosti GSH določili v vinih SK1 (23,9 mg/L) in SK2 (22,9 mg/L), ki so jim sledila vina SK4 (14,3 mg/L) in SK5 (17,8 mg/L), statistično značilno najmanjše vsebnosti GSH pa smo določili v vinih SK3 (2,4 mg/L). Tekom AF se je vsebnost GSH v vseh fermentorjih torej zmanjšala – glede na začetno vsebnost GSH v moštu so ga v vinu največ ohranile starterske kulture SK1 (60 %) in SK2 (57 %), nekoliko manj sta ga ohranili starterski kulturi SK5 (45 %) in SK4 (36 %), daleč najmanj ga je ohranila kultura SK3 (6 %) (slika 13).

Po končani AF smo mlada vina 1. dela poskusa žveplali s 50 mg/L SO₂ ter jih pustili v fermentorjih, ki smo jih prenesli na 4 °C, ležati na kvasovkah oz. drožeh. Po mesecu in pol zorenja vina na drožeh (70 dni) smo v skoraj vseh fermentorjih, z izjemo SK3, zasledili nadaljnje zmanjševanje vsebnosti GSH v vinu (slika 13). V 1,5 meseca zorenja vina na drožeh se je vsebnost GSH v vinih zmanjšala še za 3 % (SK4)-13 % (SK1) glede na začetno vsebnost GSH v moštu, z izjemo vin SK3, v katerih se je vsebnost GSH povečala za 11 %. Kot je razvidno iz preglednice 17, smo nekoliko večje vsebnosti GSH določili v vinih SK1 (18,6 mg/L) in SK2 (19,9 mg/L), nekoliko manjše v vinih SK4 (13,3 mg/L) in SK5 (15,4 mg/L), najmanjše vsebnosti GSH pa smo določili v vinu SK3 (6,7 mg/L), kljub povečanju vsebnosti GSH med zorenjem vina na drožeh. Pri slednjem je povečanje vsebnosti GSH najverjetneje posledica avtolize kvasovk in s tem sproščanja GSH v vino. V naslednjem mesecu zorenja vina na drožeh (2,5 meseca oz. 102 dni) se je vsebnost GSH v vinih SK1-SK3 zmanjšala še za 2 % (SK3)-10 % (SK1) glede na začetno vsebnost GSH v moštu, medtem ko se je v ostalih fermentorjih vsebnost GSH zanemarljivo malo povečala. Po dveh mesecih in pol zorenja vina na drožeh (102 dni) smo najmanjše vsebnosti GSH določili v vinu SK3 (5,8 mg/L), medtem ko smo v ostalih vinih določili GSH med 13,4 (SK4) in 16,7 (SK2) mg/L. Po treh mesecih in pol zorenja vina na drožeh (133 dni) smo nekoliko večjo vsebnost GSH določili v vinu SK2 (14,6 mg/L), nekoliko manjšo v vinih SK1 (11,4 mg/L) in SK5 (12,3 mg/L), najmanjše vsebnosti GSH smo določili v vinih SK3 (5,6 mg/L) in SK4 (9,5 mg/L). V zadnjem mesecu zorenja vina na drožeh (3,5 meseca) se je vsebnost GSH v vinih zmanjšala še za 5 % (SK2)-10 % (SK4) glede na začetno vsebnost GSH v moštu, z izjemo vina SK3, v katerem se je vsebnost GSH zanemarljivo malo zmanjšala. Tekom tri in pol mesečnega zorenja vina na drožeh se je vsebnost GSH v vinih torej zmanjšala še za dodatnih 32 % (SK1), 20 % (SK2), 13 % (SK4) in 15 % (SK5) glede na začetno vsebnost GSH v moštu. Izjema je bilo le vino SK3, v katerem se je v teh treh mesecih in pol vsebnost GSH povečala za 9 %.

4.1.4.2 Drugi del poskusa 1

V 2. delu poskusa smo spremljali vsebnost GSH v različnih fazah AF. Kot je razvidno iz preglednice 17, smo eno uro po inokulaciji statistično značilno večjo vsebnost GSH določili le v fermentorjih SK1 (40,2 mg/L), med ostalimi ni bilo statistično značilnih razlik v vsebnosti GSH (35,5-37,0 mg/L). V prvi uri AF se je vsebnost GSH v fermentorjih zmanjšala za 8 % (SK2-SK4) in 11 % (SK5) glede na začetno vsebnost GSH v moštu (40 mg/L), z izjemo fermentorjev SK1, v katerih se je vsebnost GSH zanemarljivo malo povečala (slika 14).



Slika 14: Deleži GSH (%) v fermentorjih z neprečiščeniimi starterskimi kulturami kvasovk v različnih fazah alkoholne fermentacije (AF)

Figure 14: Proportions of GSH (%) in fermentors with unpurified yeast starter cultures at different stages of alcoholic fermentation (AF)

V eksponentni fazi rasti kvasovk (med prvim in desetim dnevom AF) se je vsebnost GSH v vseh fermentorjih zmanjšala, in sicer za 12 % (SK5)-42 % (SK1) glede na začetno vsebnost GSH v moštu. Statistično značilno največje vsebnosti GSH smo 10. dan AF določili v fermentorjih SK4 (30,2 mg/L) in SK5 (30,6 mg/L), ki so jim sledili fermentorji SK3 (28,6 mg/L), nato SK2 (27,0 mg/L), statistično značilno najmanjše vsebnosti GSH pa smo določili v fermentorjih SK1 (23,4 mg/L). Do konca AF se je vsebnost GSH v vseh fermentorjih še zmanjševala, v večini primerov v večji meri kot v prvih desetih dneh. Od 10. dne do konca AF se je vsebnost GSH v fermentorjih zmanjšala še za 23 % (SK1)-35 % (SK3, SK5) glede na začetno vsebnost GSH v moštu. V vinih smo po končani AF statistično značilno največje vsebnosti GSH določili v fermentorjih SK4 (17,8 mg/L), ki so jim sledili fermentorji SK5 (16,7 mg/L), nato fermentorji SK2 (15,6 mg/L), statistično značilno najmanjše vsebnosti pa smo določili v fermentorjih SK1 (14,1 mg/L) in SK3 (14,6 mg/L). Tekom AF se je vsebnost GSH tudi v tem delu poskusa v vseh fermentorjih zmanjšala. Glede na začetno vsebnost GSH v moštu so največ GSH v vinu ohranile starterske kulture SK4 (45 %) in SK5 (42 %), nekoliko manj sta ga ohranili starterski kulturi SK2 (39 %) in SK3 (37 %), najmanj pa ga je ohranila starterska kultura SK1 (35 %) (slika 14).

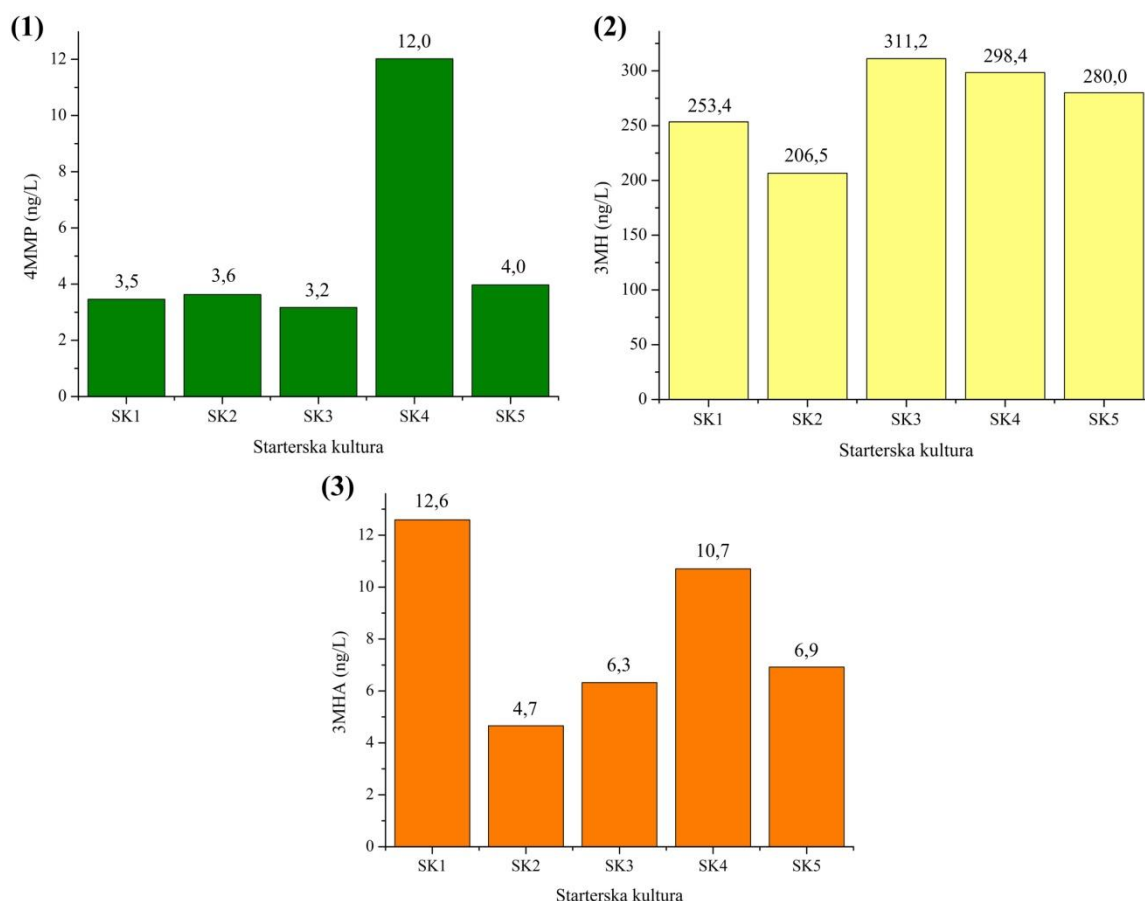
Starterski kulturi SK1 in SK2 sta v 1. delu poskusa v vinu ohranili večji delež (60 in 57 %) začetne vsebnosti GSH v moštu kot v 2. delu poskusa (35 in 39 %). Manjša poraba GSH v 1 delu poskusa je lahko posledica čistosti kulture kvasovk, kot tudi krajšega trajanja AF. Ravno obratno je starterska kultura SK3 v 2. delu poskusa ohranila

bistveno večji delež (37 %) začetne vsebnosti GSH v moštu kot v 1. delu poskusa (6 %). Iz tega lahko sklepamo, da starterska kultura SK3 bolje deluje v neprečiščeni obliki kot v prečiščeni, verjetno v simbiozi s prisotnimi bakterijami.

4.1.5 Vsebnosti hlapnih tiolov v vinih

4.1.5.1 Prvi del poskusa 1

V prvem delu poskusa smo vsebnosti hlapnih tiolov 4-merkapt-4-metilpentan-2-ona (4MMP), 3-merkapt-6-heksan-1-ola (3MH) in 3-merkapt-6-heksil acetata (3MHA) v vinu določali 10 mesecev po zaključeni AF oz. po desetih mesecih zorenja vina na drožeh (pri 4 °C) v združenih ponovitvah. Vsebnost hlapnih tiolov smo določali kasneje (ne takoj po zaključeni AF) zato, ker prej nismo imeli postavljene metode za določanje hlapnih tiolov v vinu. Rezultati so prikazani na sliki 15.



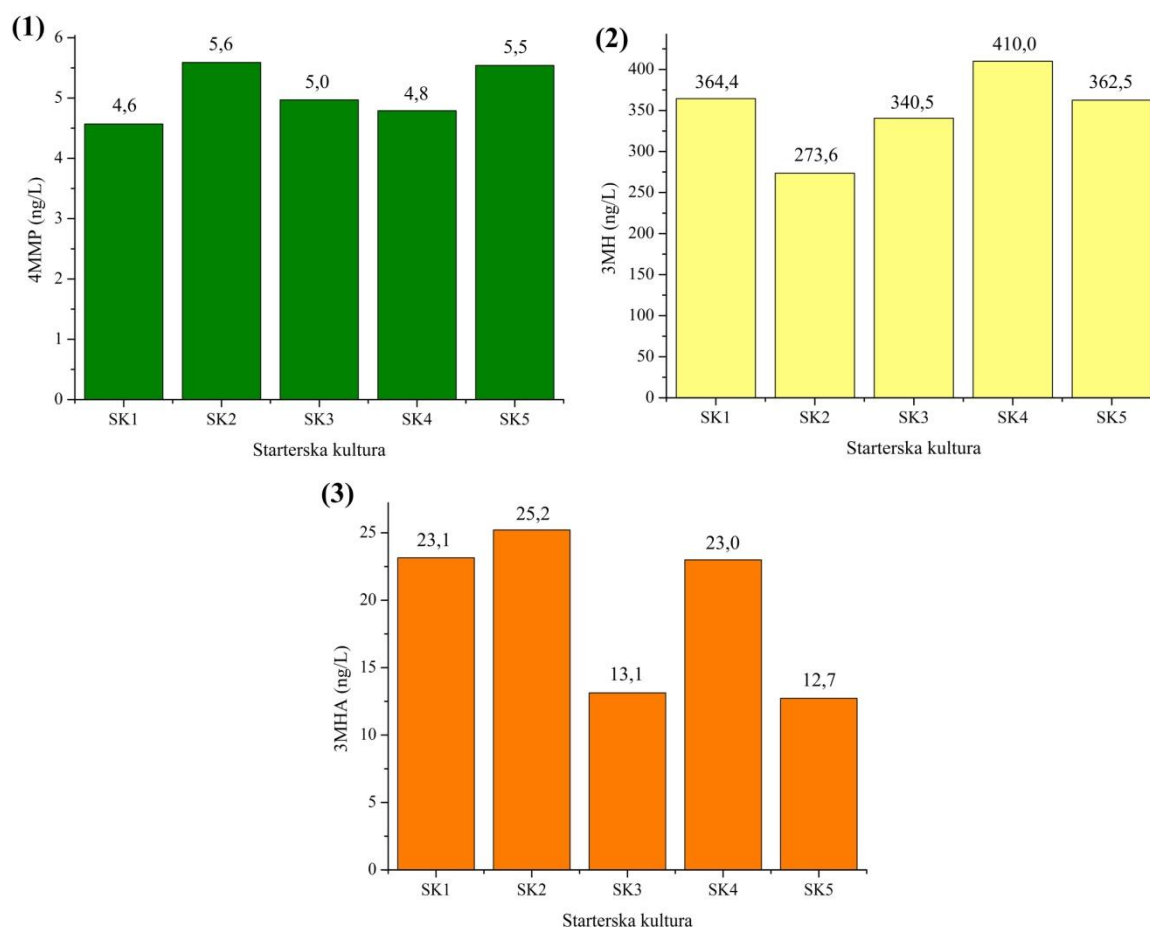
Slika 15: Vsebnosti hlapnih tiolov 4-merkapt-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (1), 3-merkapt-6-heksan-1-ola (3MH) (2) in 3-merkapt-6-heksil acetata (3MHA) (3) v vinih, pridelanih s prečiščenimi starterskimi kulturami SK1-SK5, po 10-mesečnem zorenju vina na drožeh

Figure 15: Contents of volatile thiols 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) (1), 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) (2) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) (3) in wines, produced with purified starter cultures SK1-SK5, after 10 months of maturing wine on lees

Po 10-mesečnem zorenju vina na drožeh smo največjo vsebnost 4MMP določili v vinih SK4, v katerih smo določili 12 ng/L 4MMP, v ostalih vinih pa smo določili tri- do štirikrat manjše vsebnosti 4MMP, in sicer med 3,2 ng/L (SK3) in 4,0 ng/L (SK5). Kljub temu, da so določene vsebnosti 4MMP (kot tudi ostalih hlapnih tiolov) v vinu na račun oksidacije verjetno nekoliko manjše kot so bile takoj po zaključeni AF, lahko sklepamo, da je starterska kultura SK4 sposobna sprostiti večje koncentracije 4MMP kot ostale preizkušene starterske kulture. Največje vsebnosti 3MH smo določili v vinu SK3 (311,2 ng/L), ki so mu sledila vina SK4 (298,4 ng/L) in SK5 (280,0 ng/L), nato vina SK1 z nekoliko manjšo vsebnostjo (253,4 ng/L), ter vina SK2 z najmanjšo vsebnostjo (206,5 ng/L). Vsebnosti 3MHA so bile največje v vinu SK1 (12,6 ng/L), ki mu je sledilo vino SK4 (10,7 ng/L), pri ostalih smo določili manjše vsebnosti, in sicer med 4,7 ng/L (SK2) in 6,9 ng/L (SK5). Zaradi kasnejšega določanja vsebnosti hlapnih tiolov v vinu moramo upoštevati, da so vsebnosti nekoliko manjše, kot so bile takoj po zaključeni AF, kljub temu pa še vedno nad pragom zaznave vseh treh hlapnih tiolov (0,8 ng/L 4MMP, 60 ng/L 3MH in 4 ng/L 3MH).

4.1.5.2 Drugi del poskusa 1

V drugem delu poskusa smo določali hlapne tiole 4MMP, 3MH in 3MHA v vinih tri mesece po zaključeni AF oz. po trimesečnem zorenju vina na drožeh (pri 4 °C). Rezultati so prikazani na sliki 16.



Slika 16: Vsebnosti hlapnih tiolov 4-merkapt-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (1), 3-merkaptohexan-1-ola (3MH) (2) in 3-merkaptohexil acetata (3MHA) (3) v vinih, pridelanih z neprečiščenimi starterskimi kulturami SK1-SK5, po trimesečnem zorenju vina na drožeh

Figure 16: Contents of volatile thiols 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) (1), 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) (2) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) (3) in wines, produced with unpurified starter cultures SK1-SK5, after three months of maturing wine on lees

Kot je razvidno iz slike 16, smo tudi v tem delu poskusa vse tri hlapne tirole določili v koncentracijah nad njihovimi pragi senzorične zaznave. Po 3-mesečnem zorenju vina na drožeh smo največje vsebnosti 4MMP določili v vinih SK2 (5,6 ng/L) in SK5 (5,5 ng/L), v ostalih vinih pa smo določili malenkost manjše vsebnosti 4MMP (4,6 (SK1)-5,0 (SK3) ng/L). V tem delu poskusa smo v vinih določili 24-36 % več 4MMP kot v vinih 1. dela poskusa, z izjemo SK4, v katerem smo določili 60 % manj 4MMP kot v 1. delu poskusa. Največje vsebnosti 3MH smo določili v vinu SK4 (410,0 ng/L), ki so jim sledila vina SK1, SK3 in SK5 (364,4 (SK1)-362,5 (SK5) ng/L), najmanjše vsebnosti pa smo določili v vinu SK2 (273,6 ng/L). V obeh delih poskusa 1 smo določili večje vsebnosti 3MH v vinih SK4 in najmanjše v vinih SK2, iz česar lahko sklepamo o sposobnosti sproščanja tega tiola pri teh dveh starterskih kulturah. V tem delu poskusa smo večinoma določili 23-30 % več 3MH kot v 1. delu poskusa. Vsebnost

3MHA je bila največja v vinu SK2 (25,2 ng/L), ki so mu sledila vina SK1 (23,1 ng/L) in SK4 (23,0 ng/L), najmanjše vsebnosti pa smo določili v vinih SK3 (13,1 ng/L) in SK5 (12,7 ng/L). Vsebnosti 3MHA so bile že v 1. delu poskusa večje v vinih SK1 in SK4 ter manjše v vinih SK3 in SK5, iz česar ravno tako lahko predvidevamo večjo sposobnost sproščanja 3MHA pri starterskih kulturah SK1 in SK4 ter manjšo pri starterskih kulturah SK3 in SK5. Starterska kultura SK2 se je v 2. delu poskusa izkazala z največjo koncentracijo sproščenega 3MHA, medtem ko smo v 1. delu poskusa določili najmanjše vsebnosti 3MHA v vinih, pridelanih s to startersko kulturo. V 2. delu poskusa smo večinoma določili 46-53 % več 3MHA kot v 1. delu poskusa. Večinoma manjše vsebnosti vseh treh hlapnih tiolov v vinih 1. dela poskusa so posledica kasnejšega določanja le-teh (sedem mesecev kasneje) kot v 2. delu poskusa. Vsebnost hlapnih tiolov se je zmanjšala predvsem kot posledica oksidacije, zmanjšanje vsebnosti 3MHA pa je lahko tudi posledica njegove pretvorbe nazaj v 3MH med zorenjem vina na drožeh.

4.1.6 Vsebnosti metokspirazinov v vinih

Vsebnost MPZ 3-izobutil-2-metokspirazina (IBMP) in 3-izopropil-2-metokspirazina (IPMP) smo določali samo v vinih 2. dela poskusa zaradi premajhne količine vzorca v 1. delu poskusa. Rezultati so prikazani v preglednici 18.

Preglednica 18: Vsebnosti metokspirazinov 3-izobutil-2-metokspirazina (IBMP) in 3-izopropil-2-metokspirazina (IPMP) v vinih po končani alkoholni fermentaciji z neprečiščenimi starterskimi kulturami SK1-SK5

Table 18: Contents of methoxypyrazines 3-isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP) in 3-isopropyl-2-methoxypyrazine (IPMP) in wines after the completion of alcoholic fermentation with unpurified starter cultures SK1-SK5

Metokspirazini (ng/L)†	Starterska kultura				
	SK1	SK2	SK3	SK4	SK5
IBMP	1,84	<LOQ	1,34	2,06	1,38
IPMP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

† meritev v združenih paralelkah za posamezno startersko kulturo; <LOQ – pod mejo določitve (1,2 ng/L IBMP in 1,6 ng/L IPMP)

Kot je razvidno iz preglednice 18, se vina v vsebnosti IBMP niso bistveno razlikovala z vsebnostmi od 1,34 ng/L (SK3) do 2,06 ng/L (SK4), z izjemo vina SK2, v katerem je bila vsebnost IBMP pod mejo določitve (LOQ = 1,2 ng/L). Če upoštevamo prag senzorične zaznave, ki so ga določili za vina sauvignon (8 ng/L; Allen in sod., 1991), smo v vseh vinih določili IBMP pod pragom zaznave. Vsebnost metokspirazina IPMP pa je bila v vseh vinih pod vrednostjo LOQ (1,6 ng/L).

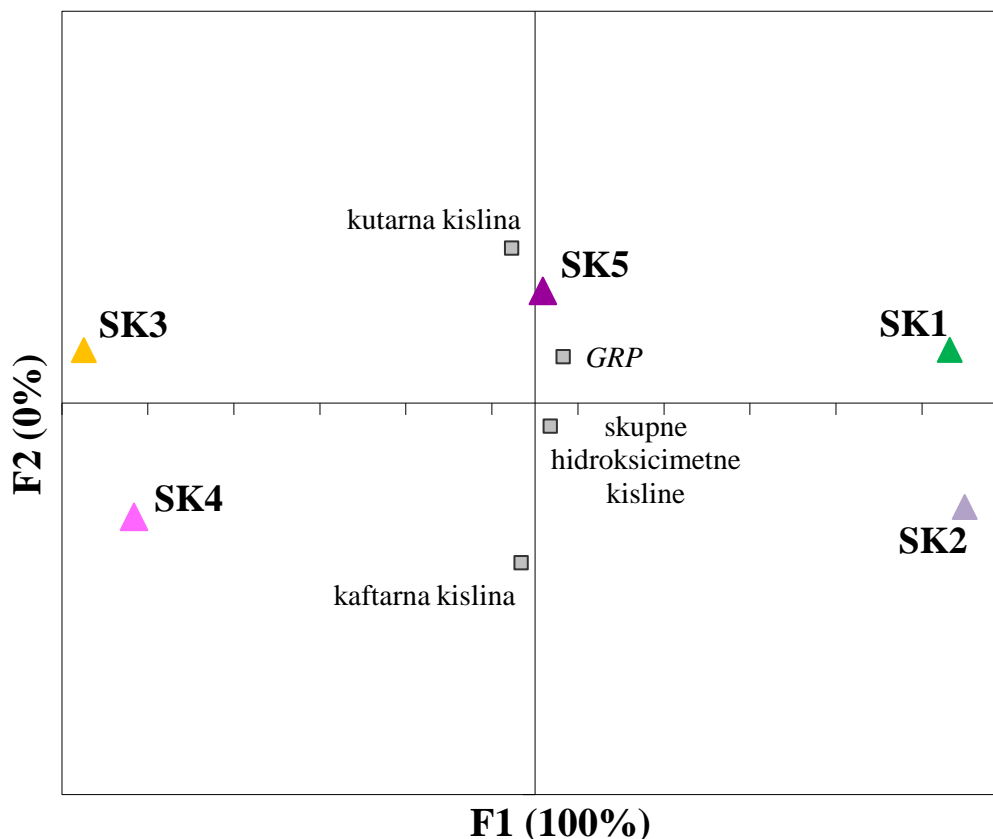
4.1.7 Analiza glavnih osi (PCA) in linearna diskriminantna analiza (LDA) poskusa 1

V poskusu zbrane podatke kemijskih analiz vin smo analizirali po metodi najmanjših kvadratov s postopkom GLM, povezave med parametri pa smo določili z multivariantnima metodama PCA in LDA. Z metodo PCA smo najprej poiskali nekaj prvih komponent, ki pojasnjujejo čim večji delež razpršenosti (variance) analiziranih podatkov. Z metodo LDA pa smo nato (z izbranimi podatki) poiskali smeri oz. linerane kombinacije, ki omogočajo kar se da dobro ločevanje med skupinami. Vsaka diskriminantna funkcija, ki jo dobimo z analizo LDA, predstavlja neodvisen vzrok variabilnosti, torej so sosednje lastnosti v pozitivni korelaciji, lastnosti, ki so med seboj pravokotne (90°) so neodvisne, in lastnosti, ki so si nasproti (180°) so v negativni korelaciji. Vse diskriminantne funkcije so linearne kombinacije lastnosti, pri čemer lastnost, katere pravokotna projekcija na določeno diskriminantno funkcijo je največja, prevladujoče opredeljuje to diskriminantno funkcijo.

Rezultati LDA obeh delov poskusa 1 so prikazani na slikah 17 in 18, v prilogah B, C, D in E pa so podani osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih analiz in korelacijski koeficienti med njimi.

4.1.7.1 PCA in LDA prvega dela poskusa 1

Slika 17 prikazuje projekcijo podatkov 1. dela poskusa 1, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama.



Slika 17: Projekcija podatkov 1. dela poskusa 1, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama (LDA)

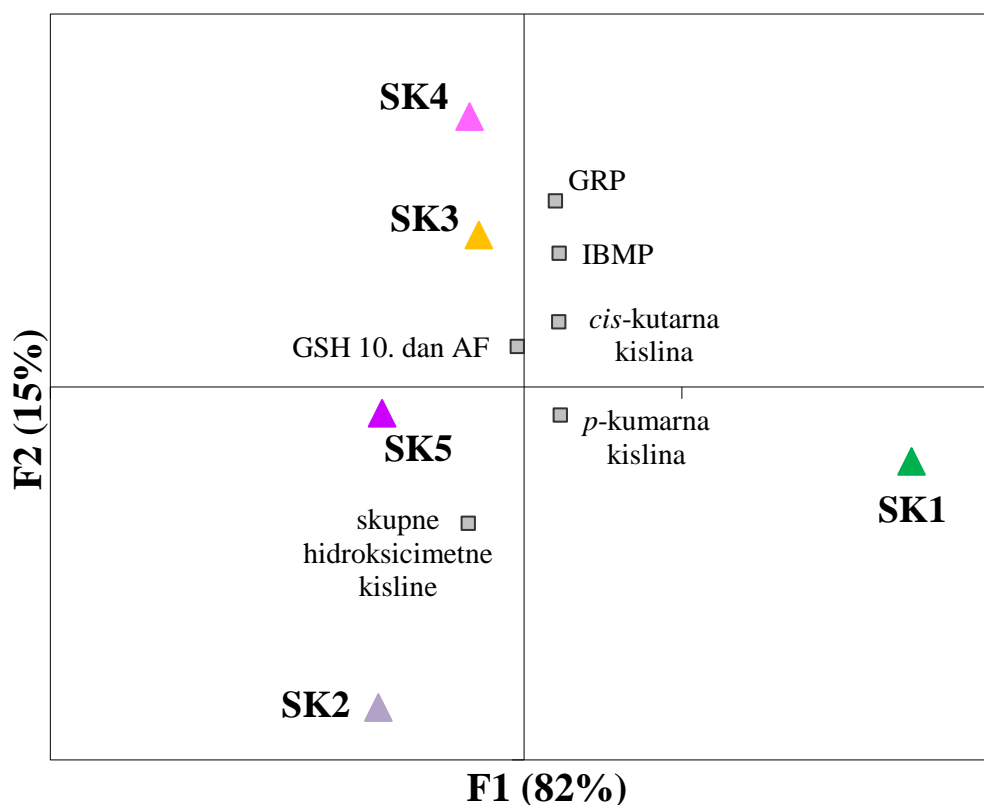
Figure 17: Data projection of the 1st part of the experiment 1, in the plane defined by the first two discriminant functions (LDA)

Kot je razvidno iz slike 17, smo za analizo LDA uporabili štiri najbolj determinirajoče parametre, in sicer kaftarno in kutarno kislino, GRP in skupne HCK. Pri analizi LDA na izbranih podatkih (15 vzorcev (pet vzorcev v treh ponovitvah) in štiri lastnosti) smo pridobili dve diskriminantni funkciji, od katerih že funkcija 1 pojasnjuje 100 % skupne variabilnosti, zato je funkcija 2 ne pojasnjuje skupne variabilnosti. Ločimo lahko skupino spremenljivk, katerih pravokotna projekcija na prvo diskriminantno funkcijo je največja. Ta skupina vključuje kutarno kislino na eni in kaftarno kislino na nasprotni strani. Lastnosti, ki ležijo blizu druga drugi, so v visoki pozitivni korelaciji, kot sta v tem primeru GRP in skupne HCK. Slika 17 prikazuje tudi tri ločene skupine vin, pridelanih z različnimi starterskimi kulturami. Prva skupina vključuje vina, pridelana s starterskima kulturama SK1 in SK2 ter leži na skrajni desni strani slike. Na skrajni levi strani slike leži druga skupina, ki se bistveno razlikuje od prve skupine, in vključuje vina, pridelana s starterskima kulturama SK3 in SK4. Tretjo skupino, ki leži blizu

izhodišča in v območju večine determinirajočih parametrov, predstavljajo vina, pridelana s startersko kulturo SK5.

4.1.7.2 PCA in LDA drugega dela poskusa 1

S pomočjo analize PCA smo izmed vključenih 21 parametrov določili pet najbolj determinirajočih, in sicer *cis*-kutarno, *p*-kumarno in ferulno kislino, GRP in skupne HCK. Skupaj so razložile 87,2 % skupne variabilnosti med proučevanimi vzorci (47 %; 14,1 %; 11,2 %; 8 %; 6,9 %). Pri analizi LDA smo za boljšo porazdelitev vzorcev v skupine uporabili poleg ostalih še dve lastnosti (GSH 10. dan AF in IBMP), ene lastnosti pa nismo upoštevali (ferulna kislina). Pri analizi LDA na izbranih podatkih (15 vzorcev (pet vzorcev v treh ponovitvah) in šest lastnosti) smo pridobili štiri diskriminantne funkcije. Funkcija 1 pojasnjuje 82,3 % skupne variabilnosti, funkcija 2 pa 15,4 %, kot je razvidno iz slike 18, ki prikazuje projekcijo podatkov 2. dela poskusa 1, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama. Funkciji 3 in 4 pa pojasnujeta le 2,3 % skupne variabilnosti.



Slika 18: Projekcija podatkov 2. dela poskusa 1, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama (LDA)

Figure 18: Data projection of the 2nd part of the experiment 1, in the plane defined by the first two discriminant functions (LDA)

Kot je razvidno iz slike 18, lahko jasno ločimo skupino spremenljivk, katerih pravokotna projekcija na prvo diskriminantno funkcijo je največja. Ta skupina vključuje GRP in IBMP na eni ter skupne HCK na nasprotni strani. Ker lastnosti *cis*-kutarna in *p*-kumarna kislina ter GSH 10. dan AF ležijo blizu druga drugi, so v visoki pozitivni korelaciji. Slika 18 prikazuje tudi tri ločene skupine vin, pridelanih z različnimi starterskimi kulturami. Prva skupina vključuje vina, pridelana s starterskima kulturama SK3 in SK4 ter leži v zgornjem levem delu slike, blizu večine determinirajočih parametrov (predvsem SK3). Druga skupina, ki se razlikuje od prve, leži v spodnjem levem kvadrantu in vključuje vina, pridelana s startersko kulturo SK2. Vina, pridelana s starterskima kulturama SK1 in SK5, verjetno pripadajo različnim skupinam (tretji in četrti), vendar sta obe relativno blizu abscisne osi in sta si zato bolj podobni med sabo.

4.1.8 Razprava poskusa 1

Kemijska sestava moštov, uporabljenih v posameznih delih poskusa 1, je bila precej različna, zato sta oba dela poskusa (s prečiščenimi in neprečiščenimi starterskimi kulturami kvasovk) med seboj težko primerljiva. Določene lastnosti starterskih kultur so bile vseeno bolj ali manj izražene v obeh delih poskusa. Čeprav je mošt, uporabljen v 1. delu poskusa, vseboval precej večje vsebnosti RS, ki bi lahko inhibitorno delovale na rast kvasovk (Ribéreau-Gayon in sod., 2006), se je AF v tem delu poskusa hitreje zaključila z manjšim preostankom RS v vinih (1,9-3,5 g/L) v primerjavi z 2. delom poskusa (2,8-8,7 g/L). Glede na vsebnosti RS v pridelanih vinih lahko sklepamo na boljšo fermentacijsko sposobnost starterskih kultur v 1. delu poskusa, kljub večjim vsebnostim RS v moštu, kar je mogoče lahko posledica čistosti oz. odsotnosti bakterij v teh starterskih kulturah kvasovk. Navezujoč se na vsebnost RS v vinih, je imela starterska kultura SK1 v 1. delu poskusa najboljšo fermentacijsko kinetiko, v 2. delu poskusa pa najslabšo, kar potrjuje boljšo učinkovitost te starterske kulture v obliki čiste kulture. Starterska kultura SK1 je v obeh delih poskusa tvorila statistično značilno največje vsebnosti HK, kar je značilno za ta sev kvasovk, saj so do takšnih rezultatov prišli tudi drugi avtorji (King in sod., 2008; Swiegers in sod., 2009). Nekoliko večja tvorba HK pri tem sevu kvasovk je tudi deklarirana (Anchor VIN7-Product Data Sheet, 2013). Medtem ko sta starterski kulturi SK1 in SK2 tvorili približno enako vsebnost HK v obeh delih poskusa, so ostale starterske kulture tvorile nekoliko več HK v 2. delu poskusa. Kvasovke običajno tvorijo večje vsebnosti HK pri večjih vsebnostih RS v moštu (Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Manjše vsebnosti HK v 1. delu poskusa so zato lahko posledica hitrejšega fermentacijske kinetike oz. hitrejšega zaključka AF v tem delu poskusa, kot tudi čistosti starterskih kultur. Različni sevi kvasovk imajo zelo različne potrebe po dušiku (Bell in Henschke, 2005), kar smo pokazali tudi v poskusu 1. V obeh delih poskusa je starterska kultura SK1 med AF porabila najmanj dušika, starterska kultura SK4 pa največ, kar nakazuje na značilne potrebe teh kvasovk po dušiku. V obeh delih poskusa 1 so posamezne starterske kulture izkazale približno enake potrebe po

dušiku glede na začetno vsebnost FAN v moštu. Čistost starterskih kultur kvasovk torej ni vplivala na asimilacijo dušika pri kvasovkah.

V skladu s poročanji drugih avtorjev (Ong in Nagel, 1978; Singleton, 1987; Betés-Saura in sod., 1996; Vanzo in sod., 2007) je bila v moštih in vinih obeh delov poskusa najbolj zastopana HCK kaftarna kislina, ki ji je po vsebnosti sledila kutarna kislina. Med AF se je vsebnost HCK večinoma zmanjšala, z izjemo kavne kisline, katere vsebnost se je v obeh delih poskusa povečala. V raziskavah, ki so jih opravili Betés-Saura in sod. (1996) se je vsebnost vseh HCK med AF zmanjšala za približno 27 %, medtem ko se je v našem poskusu zmanjšala za 15-34 % (1. del) oz. 3-11 % (2. del). Manjši delež zmanjšanja vsebnosti HCK v 2. delu poskusa je verjetno posledica večje vsebnosti HCK v moštu, uporabljenem v tem delu poskusa. V obeh delih poskusa smo največje vsebnosti HCK določili v vinih SK1 in SK2, kar nakazuje na manjšo stopnjo oksidacije teh vin.

Vsebnost GSH, ki smo ga dodali v mošt do končne vsebnosti 40 mg/L, se je v obeh delih poskusa 1 tekom AF zmanjševala, kar je v nasprotju z rezultati nekaterih raziskav, v katerih se je koncentracija GSH po tretjem oz. četrtem dnevu AF začela povečevati (Park in sod., 2000a; Dubourdieu in Lavigne-Cruege, 2004). V 1. delu poskusa so kvasovke večji delež v moštu prisotnega GSH porabile v prvih 10 dneh AF, do konca AF pa le še manjši delež. Ravno obratno so v 2. delu poskusa kvasovke porabile večji delež GSH v zaključnih fazah AF, kar je verjetno posledica daljšega trajanja AF kot v 1. delu poskusa oz. šibkejše fermentacijske kinetike v zaključni fazi AF. Največje vsebnosti GSH v pridelanem vinu 1. dela poskusa sta ohranili starterski kulturi SK1 in SK2 (64 % oz. 59 %), najmanjše pa starterska kultura SK3 (7 %). V 2. delu poskusa je največje vsebnosti GSH v vinu ohranila starterska kultura SK4 (48 %), najmanjše pa starterski kulturi SK3 in SK1 (40 % oz. 35 %). Čistost starterske kulture in sestava mošta sta odločilno vplivala na presnovo GSH pri starterski kulturi SK1, ki je v prečiščeni obliki ohranila največje vsebnosti GSH v vinu, v neprečiščeni obliki pa najmanjše. Starterska kultura SK3 je v obeh delih poskusa 1 ohranila manjše vsebnosti GSH v vinu, kar potrjuje večjo porabo GSH pri tej starterski kulturi. Medtem ko sta starterski kulturi SK4 in SK5 v obeh delih poskusa ohranili približno enak delež GSH v vinu, je starterska kultura SK2 ohranila nekoliko večji delež GSH v 1. delu poskusa kot v 2. delu poskusa. Vsebnosti GSH so bile v vinih 1. dela poskusa večje kot v vinih 2. dela poskusa (z izjemo vin SK3), kar je verjetno posledica tako daljšega trajanja AF v 2. delu poskusa kot tudi čistosti starterskih kultur v 1. delu poskusa. Čeprav številni avtorji (Dubourdieu in Lavigne-Cruege, 2004; Lavigne in sod., 2007) poročajo o povečanju vsebnosti GSH v vinu med zorenjem na drožeh, se je v našem poskusu 1 (1. del) njegova vsebnost še naprej zmanjševala, razen v fermentorjih SK3, v katerih se je vsebnost GSH med zorenjem na drožeh nekoliko povečala. V vinih z večjimi vsebnostmi GSH ob koncu AF je bil delež zmanjšanja GSH med zorenjem na drožeh večji kot v vinih z nižjimi vsebnostmi ob koncu AF. Po 3,5-mesečnem zorenju vina na

drožeh se je največ GSH ohranilo v vinih SK2 in SK5, najmanj pa, kljub povečanju njegove vsebnosti, v vinih SK3.

Vsebnosti hlapnih tiolov v vinih so se bistveno razlikovale glede na uporabljen sev kvasovk, kar so v raziskavah pokazali že številni drugi avtorji (Murat in sod., 2001b, Howell in sod., 2004; Dubourdieu in sod., 2006; Swiegers in sod., 2005, 2006, 2009). V vsebnosti 4MMP med vini v posameznih delih poskusa ni bilo bistvenih razlik, z izjemo vina SK4 v 1. delu poskusa, ki je vsebovalo približno trikrat večje vsebnosti 4MMP kot vsa ostala vina v obeh delih poskusa 1. Večjo sposobnost sproščanja 3MH med AF smo potrdili za startersko kulturo SK4, večjo sposobnost sproščanja 3MHA pa za starterski kulturi SK1 in SK4. Starterska kultura SK1 se je izkazala s povečano tvorbo 3MHA tudi v raziskavah, ki so jih izvedli Swiegers in sod. (2006). Vsebnosti hlapnih tiolov so bile v obeh delih poskusa 1 nad njihovimi pragi senzorične zaznave (Tominaga in sod., 1998, 2000) in so torej imele vpliv na senzorično kakovost vina, vsebnost MPZ v 2. delu poskusa pa je bila pod njihovim pragom senzorične zaznave (Allen in sod., 1991) ali celo pod LOQ (IPMP). Medtem ko so se vsebnosti hlapnih tiolov v vinih precej razlikovale glede na uporabljen sev kvasovk, med vini v 2. delu poskusa v vsebnosti MPZ ni bilo bistvenih razlik, kar potrjuje, da kvasovke ne vplivajo na njihovo vsebnost.

4.2 POSKUS 2

V poskusu 2 smo izvedli mikroviniifikacije mošta letnika 2009 v 3 L fermentorjih in pri kontrolirani temperaturi 15 °C z uporabo štirih mešanih starterskih kultur, od katerih so bile tri mešane kulture sevov kvasovk rodu *Saccharomyces*, ena pa mešana kultura sevov kvasovk rodu *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces*. Seva kvasovk, ki sestavlja eno od mešanih kultur kvasovk rodu *Saccharomyces* (SK6), smo uporabili že v poskusu 1 (SK1 in SK2). Z uporabo te mešane kulture lahko izboljšamo aromatični profil vina (večja sposobnost sproščanja hlapnih tiolov) in zmanjšamo tvorbo HK, kar so pokazali že King in sod. (2008). Mešana kultura SK7 je industrijsko formulirana mešanica dveh komplementarnih sevov kvasovk rodu *Saccharomyces* z deklarirano večjo sposobnostjo sproščanja hlapnih tiolov v vinih sauvignon (priloga A) in je bila v času izvedbe poskusa relativno nova na tržišču. Mešani kulturi SK8 in SK9 smo formulirali sami – SK8 je kombinacija dveh sevov kvasovk rodu *Saccharomyces* z dobro poznano (Murat in sod., 2001b; Swiegers in sod., 2006; King in sod., 2008) in deklarirano (priloga A) večjo sposobnostjo sproščanja hlapnih tiolov, SK9 pa kombinacija dveh sevov kvasovk rodu *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* z deklarirano večjo sposobnostjo sproščanja hlapnih tiolov (priloga A). Glavni namen tega dela poskusa je bil ugotoviti vpliv izbranih mešanih starterskih kultur na vsebnost GSH, hlapnih tiolov in MPZ v pridelanih vinih ter s tem na senzorično kakovost vina.

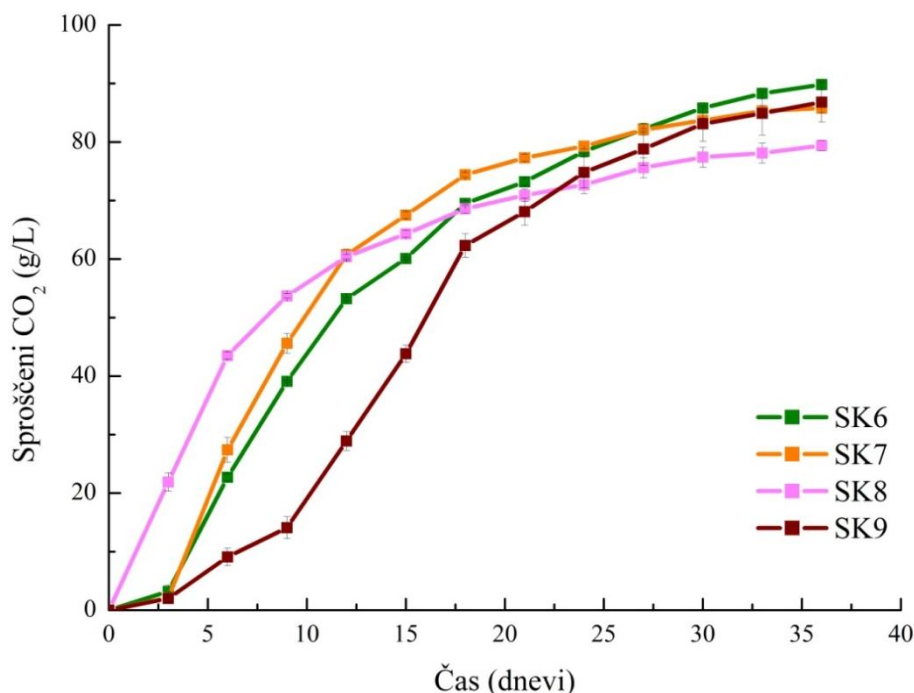
Rezultati tega dela poskusa so že publicirani v reviji s faktorjem vpliva Food Science and Technology research (Jenko in sod., 2013). V nadaljevanju so predstavljeni in komentirani rezultati osnovnih kemijskih parametrov mošta in vina, fermentacijske krivulje, vsebnosti FAN, HCK, GSH, hlapnih tiolov in MPZ, mikrobiološke analize (opravljene v fermentorjih z mešano kulturo *Saccharomyces* in *ne-Saccharomyces* sevov kvasovk), senzorična analiza mladih vin ter statistična obdelava podatkov (PCA in LDA).

4.2.1 Osnovni kemijski parametri, FAN in HCK v moštu

Osnovni kemijski parametri mošta so bili sledeči: reducirajoči sladkorji (RS) 197 g/L, pH 3,10, skupne kisline (SK) 5,9 g/L, hlapne kisline (HK) 0,01 g/L in prosti aminokislinski dušik (FAN) 115,5 mg N/L. Koncentracija skupnih HCK v moštu je bila 183,1 mg/L s sledečo sestavo posameznih HCK: *cis*-kaftarna kislina 3,6 mg/L; kaftarna kislina 108,5 mg/L; GRP 19,8 mg/L; *cis*-kutarna kislina 15,0 mg/L; kutarna kislina 28,7 mg/L; *cis*-fertarna kislina 0,5 mg/L; fertarna kislina 3,5 mg/L; kavna kislina 2,4 mg/L; *p*-kumarna kislina 1,0 mg/L; ferulna kislina 0,1 mg/L.

4.2.2 Fermentacijska kinetika

Med AF smo s tehtanjem fermentorjev spremljali količino sproščenega CO₂ (g/L) in na ta način določili fermentacijsko kinetiko. Kot je razvidno iz slike 19, se je fermentacijska kinetika med posameznimi starterskimi kulturami kvasovk bistveno razlikovala.



Slika 19: Količina sproščenega CO₂ (g/L) med alkoholno fermentacijo s kulturami SK6-SK9
Figure 19: The amount of released CO₂ (g/L) during alcoholic fermentation with cultures SK6-SK9

Na začetku AF ni bilo bistvenih razlik v količini sproščenega CO₂ z izjemo starterske kulture SK8 s hitrejšo fermentacijsko kinetiko v prvih treh dneh AF (22 g CO₂/L), kar nakazuje na hitrejšo prilagoditev te starterske kulture na razmere AF. Do devetega dne AF so se posamezne starterske kulture bistveno razlikovale v fermentacijski kinetiki – najhitrejšo fermentacijsko kinetiko je imela še vedno starterska kultura SK8 (54 g CO₂/L), ki sta ji sledili starterski kulturi SK7 (46 g CO₂/L) in SK6 (39 g CO₂/L). Najpočasnejšo fermentacijsko kinetiko je imela starterska kultura SK9 (14 g CO₂/L), kar je posledica inokulacije ne-*Saccharomyces* seva kvasovk vrste *T. delbrueckii*, za katere je značilna šibkejša fermentacijska kinetika v primerjavi s kvasovkami rodu *Saccharomyces* (Ciani in sod., 2006). V nadaljevanju AF je imela hitrejšo fermentacijsko kinetiko starterska kultura SK7, počasnejšo pa še vedno starterska kultura SK9. Po 16. dnevu in do konca AF je imela počasnejšo fermentacijsko kinetiko starterska kultura SK8, hitrejšo pa starterska kultura SK6. Po končani AF (36. dan) je bila količina sproščenega CO₂ primerljiva med vsemi preiskovanimi starterskimi kulturami in je bila med 82 in 92 g CO₂/L.

4.2.3 Osnovni kemijski parametri, FAN in HCK v vinu

Osnovni kemijski parametri in vsebnost FAN v vinih po končani AF, so prikazani v preglednici 19.

Preglednica 19: Vsebnosti reducirajočih sladkorjev (RS), alkohola, skupnih kislin (SK), hlapnih kislin (HK), pH in prostega aminokislinskega dušika (FAN) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6-SK9

Table 19: Contents of reducing sugars (RS), alcohol, total acidity (SK), volatile acidity (HK), pH and free amino nitrogen (FAN) in wines after the completion of alcoholic fermentation with starter cultures SK6-SK9

Parameter	Starterska kultura			
	SK6	SK7	SK8	SK9
RS (g/L)	1,9±0,6 ^{*a}	1,4±0,5 ^a	1,7±0,3 ^a	1,5±0,6 ^a
Alkohol (vol.%)	11,2±0,3 ^a	11,4±0,1 ^a	11,4±0,1 ^a	11,1±0,3 ^a
SK (g/L)	6,6±0,0 ^c	6,3±0,1 ^a	6,5±0,1 ^c	6,4±0,1 ^b
HK (g/L)	0,79±0,06 ^b	0,42±0,08 ^a	0,56±0,03 ^a	0,56±0,10 ^a
pH	3,28±0,00 ^b	3,27±0,01 ^b	3,24±0,01 ^a	3,23±0,02 ^a
FAN (mg N/L)	38,5±3,0 ^{bc}	33,5±3,0 ^{ab}	31,6±2,1 ^a	41,8±3,1 ^c

* x ± SO (povprečje ± standardni odklon); a, b, c – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$)

Kot je razvidno iz preglednice 19, se vina niso statistično značilno razlikovala v vsebnosti RS, ki je bila med 1,4 g/L (SK7) in 1,9 g/L (SK6), in vsebnosti alkohola, ki je bila med 11,1 vol.% (SK9) in 11,4 vol.% (SK7, SK8). Statistično značilne razlike med vini smo določili v vsebnosti skupnih kislin (SK), ki smo jih največ določili v vinih SK6 (6,6 g/L) in SK8 (6,5 g/L), in najmanj v vinih SK7 (6,3 g/L). V vsebnosti HK so se le vina SK6 z največjimi vsebnostmi (0,79 g/L) statistično značilno razlikovala od preostalih vin z vsebnostmi med 0,42 g/L (SK7) in 0,56 g/L (SK8, SK9). Večje vsebnosti HK v vinih SK6 so verjetno posledica delovanja enega od sevov kvasovk (SK1), ki je sestavni del te starterske kulture in za katerega smo tako mi v poskusu 1 kot tudi drugi avtorji pokazali, da tvori večje koncentracije HK. Mešana starterska kultura SK6 (=SK1+SK2) je tvorila večje koncentracije HK kot sama SK1 v poskusu 1, kar pa je v nasprotju z ugotovitvami drugih avtorjev (King in sod., 2008), ki so pokazali, da starterska kultura SK1 tvori manjše koncentracije HK, če je v mešani kulturi s *Saccharomyces* kvasovkami. Prav tako je bil pH vin SK6 (3,28) in SK7 (3,27) statistično značilno višji kot pri vinih SK8 (3,24) in SK9 (3,23), vendar so te razlike iz tehnološkega vidika zanemarljive. Iz preglednice 19 je razvidno tudi, da smo statistično značilno največje vsebnosti FAN določili v vinih SK9 (41,8 mg N/L), ki so jim sledila vina SK6 ter SK7, statistično značilno najmanjše vsebnosti pa smo določili v vinih SK8 (31,6 mg N/L). Starterske kulture kvasovk so med AF porabile med 73,7 (SK9) in 83,9 (SK8) mg N/L. Iz tega lahko sklepamo, da ima od preiskovanih starterskih kultur najmanjše potrebe po dušiku starterska kultura SK9, največje pa starterska kultura SK8.

Vsebnost HCK, ki smo jih določili v vinih po končani AF, so prikazane v preglednici 20.

Preglednica 20: Vsebnosti hidroksicimetnih kislin (HCK) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6-SK9

Table 20: Content of hydroxycinnamic acids (HCK) in wines after the completion of alcoholic fermentation with starter cultures SK6-SK9

HCK (mg/L)	Starterska kultura/vino			
	SK6	SK7	SK8	SK9
<i>cis</i> -kaftarna kislina	2,2±0,0* ^b	2,1±0,0 ^a	2,1±0,0 ^a	2,2±0,0 ^b
kaftarna kislina	40,7±0,1 ^b	38,1±0,3 ^a	37,9±1,5 ^a	40,3±0,4 ^b
GRP	19,6±0,2 ^a	20,2±0,4 ^a	20,3±0,8 ^a	19,5±0,1 ^a
<i>cis</i> -kutarna kislina	12,7±0,0 ^b	12,3±0,1 ^a	12,5±0,0 ^b	12,6±0,1 ^b
kutarna kislina	13,8±0,1 ^b	13,8±0,0 ^b	13,8±0,0 ^b	13,2±0,0 ^a
<i>cis</i> -fertarna kislina	0,2±0,0 ^a	0,2±0,0 ^a	0,2±0,0 ^a	0,2±0,0 ^a
fertarna kislina	1,3±0,0 ^a	1,3±0,0 ^a	1,3±0,0 ^a	1,3±0,0 ^a
kavna kislina	2,6±0,0 ^c	2,6±0,0 ^{bc}	2,5±0,1 ^a	2,5±0,0 ^{ab}
<i>p</i> -kumarna kislina	1,6±0,0 ^c	2,0±0,0 ^d	1,0±0,0 ^b	0,9±0,0 ^a
ferulna kislina	0,5±0,0 ^c	0,5±0,0 ^c	0,1±0,0 ^a	0,2±0,0 ^b
HCK skupaj	95,2±0,2 ^c	93,0±0,2 ^b	91,6±0,8 ^a	92,9±0,4 ^b

* $\bar{x} \pm SO$ (povprečje \pm standardni odklon); a, b, c, d – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$)

Kot je razvidno iz preglednice 20, so se vina statistično značilno razlikovala tako v vsebnosti nekaterih posameznih HCK kot tudi v vsebnosti skupnih HCK. Vsebnosti estrov HCK (*cis*-kaftarne, kaftarne, *cis*-kutarne, kutarne, *cis*-fertarne in fertarne kisline) so bile v pridelanih vinih manjše kot v moštu, posledično so bile za približno polovico manjše tudi vsebnosti skupnih HCK. Vsebnosti GRP in prostih HCK (kavne, *p*-kumarne in ferulne kisline) pa so bile v pridelanih vinih primerljive ali nekoliko večje kot v moštu.

Vina, pridelana z različnimi starterskimi kulturami kvasovk, so se statistično razlikovala v vsebnosti tako skupnih kot posameznih HCK, z izjemo GRP, fertarne in *cis*-fertarne kisline, v vsebnosti katerih med vini ni bilo statistično značilnih razlik. Tudi v tem poskusu je bila prevladujoča HCK v vinih kaftarna kislina (37,9 (SK8)-40,7 (SK6) mg/L), ki ji je po zastopanosti sledila kutarna kislina (13,2 (SK9)-13,8 (SK6-SK8) mg/L), fertarna kislina pa je bila zastopana v manjših vsebnostih (1,3 mg/L). Med *cis*-oblikami estrov HCK je bila najbolj zastopana *cis*-kutarna kislina (12,3 (SK7)-12,7 (SK6, SK8, SK9) mg/L), medtem ko so bile ostale prisotne v manjših vsebnostih (2,1-2,2 mg/L (*cis*-kaftarna kislina) in 0,2 mg/L (*cis*-fertarna kislina)). V vseh vinih je bila vsebnost kavne kisline, ki je bila najbolj zastopana prosta HCK, nekoliko večja kot v moštu (2,5-2,6 mg/L). Vsebnosti *p*-kumarne in ferulne kisline so bile zastopane v manjših vsebnostih (0,9-2,0 mg/L (*p*-kumarna kislina) in 0,1-0,5 mg/L (ferulna kislina)). Statistično značilno največje vsebnosti skupnih HCK smo določili v vinih SK6, ki so jim sledila vina SK7 in SK9, statistično značilno najmanjše vsebnosti pa smo določili v vinih SK8. Vsebnost skupnih HCK se je med AF zmanjšala za 48-50 %.

4.2.4 Spremljanje vsebnosti glutaciona

Vpliv izbranih starterskih kultur na vsebnost GSH v vinu smo spremljali z določanjem vsebnosti GSH v posameznih fazah AF – eno uro po inokulaciji starterskih kultur oz. v fazi prilagajanja kvasovk, v eksponentni fazi rasti kvasovk oz. deveti dan AF ter v vinu po končani AF (preglednica 21). V moštu smo določili 6,1 mg/L GSH.

Preglednica 21: Vsebnosti glutaciona (GSH) v vinih v različnih fazah alkoholne fermentacije s starterskimi kulturami SK6-SK9

Table 21: Contents of glutathione (GSH) in wines at different stages of alcoholic fermentation with starter cultures SK6-SK9

Čas vzorčenja	Starterska kultura/vino			
	SK6	SK7	SK8	SK9
1 h po inokulaciji	5,5±0,6 ^{*a}	5,4±1,1 ^a	5,1±0,7 ^a	5,2±0,3 ^a
9 dni	6,6±0,2 ^b	7,8±0,7 ^c	7,7±0,7 ^c	1,9±0,3 ^a
Po končani AF	4,9±0,1 ^c	3,9±0,3 ^b	2,4±0,7 ^a	3,3±0,3 ^b

* $\bar{x} \pm SO$ (povprečje \pm standardni odklon); a, b, c – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$)

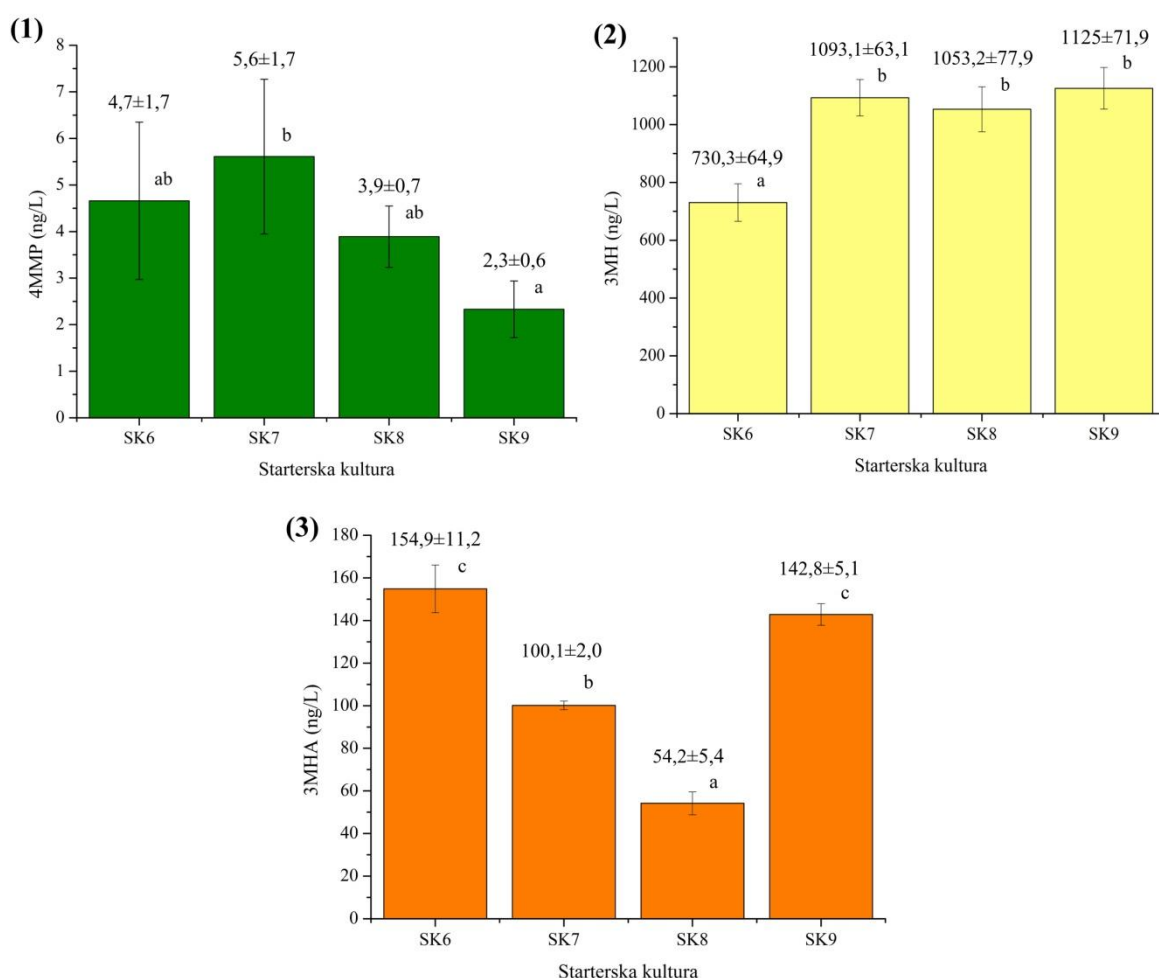
Vsebnost GSH v moštu eno uro po inokulaciji starterskih kultur je bila manjša kot v moštu pred razdelitvijo v fermentorje in sicer v vseh primerih, brez statistično značilnih razlik med vzorci (5,1 mg/L (SK8) do 5,5 mg/L (SK6)). Zmanjšanje vsebnosti GSH je lahko posledica oksidacije med polnjenjem fermentorjev in asimilacije GSH pri kvasovkah, ki ga v tej fazi (fazi prilagajanja) porabljajo za presnovne funkcije (Penninckx, 2002; Dubourdieu in Lavigne-Cruege, 2004). Med eksponentno fazo rasti kvasovk se je v skoraj vseh fermentorjih vsebnost GSH dvignila nad koncentracijo, določeno v moštu, kar je lahko posledica biosinteze GSH pri kvasovkah in sproščanje le-tega v fermentirajoči mošt. O povečanju vsebnosti GSH v fermentirajočem moštu po nekaj dneh AF so poročali tudi drugi raziskovalci (Park in sod., 2000a, 2000b; Lavigne in sod., 2007; Andujar-Ortiz in sod., 2012). V tej fazi (deveti dan AF) smo določili statistično značilno največje vsebnosti GSH v vzorcih SK7 (7,8 mg/L) in SK8 (7,7 mg/L). V fermentorjih SK9 pa se je vsebnost GSH v tej fazi znatno zmanjšala (1,9 mg/L), iz česar lahko sklepamo, da sev kvasovk vrste *T. delbrueckii*, porabi večje količine GSH med AF. Zmanjšanje vsebnosti GSH je v tem primeru lahko tudi posledica šibke fermentacijske kinetike, ki jo je ta sev kvasovk izkazal v času eksponentne faze. Po končani AF se je vsebnost GSH v vzorcih zmanjšala, z izjemo vzorca SK9, pri katerem se je vsebnost GSH povečala, kar je lahko posledica biosinteze GSH pri kasneje inokuliranih kvasovkah rodu *Saccharomyces* ali pa sproščanja GSH pri avtolizi kvasovk rodu ne-*Saccharomyces*. Statistično značilno največjo vsebnost GSH smo določili v mladih vinih SK6 (4,9 mg/L), ki so mu sledila vina SK7 (3,9 mg/L) in SK9 (3,3 mg/L). Najmanjšo vsebnost GSH smo določili v vinih SK8 (2,4 mg/L).

4.2.5 Aromatične spojine vina

Po končani AF smo v pridelanih mladih vinih določili vsebnosti hlapnih tiolov (4MMP, 3MH in 3MHA) in metokspirazinov (IBMP in IPMP) v vinu. Rezultati so predstavljeni v nadaljevanju.

4.2.5.1 Vsebnosti hlapnih tiolov v vinih

Vsebnosti hlapnih tiolov v vinih po končani AF so prikazani na sliki 20. Kot je razvidno iz slike 20, so bile vsebnosti vseh treh hlapnih tiolov v vinu precej nad njihovim pragom senzorične zaznave.



Slika 20: Vsebnosti hlapnih tiolov 4-merkaptio-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (1), 3-merkaptioheksan-1-ola (3MH) (2) in 3-merkaptioheksil acetata (3MHA) (3) v vinih, po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6-SK9; vrednosti so prikazane kot $x \pm SO$ (povprečje \pm standardni odklon); a, b, c – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$)

Figure 20: Contents of volatile thiols 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) (1), 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) (2) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) (3) in wines, after the completion of alcoholic fermentation with starter cultures SK6-SK9; values are presented as $x \pm SO$ (mean \pm standard deviation); a, b, c – statistically significant differences with LSD test ($p \leq 0,05$)

Statistično značilno največje vsebnosti 4MMP smo določili v vinih SK7 (5,6 ng/L), ki so mu sledila vina SK6 (4,7 ng/L) in SK8 (3,9 ng/L). Statistično značilno najmanjše vsebnosti 4MMP smo določili v vinih SK9 (2,3 ng/L). Vsebnosti 3MH so bile statistično značilno najmanjše v vinih SK6 (730,3 ng/L), medtem ko so bile vsebnosti 3MH v drugih vinih med 1053,2 ng/L (SK8) in 1125,8 ng/L (SK9). Statistično značilne razlike med vini so se pokazale tudi v vsebnosti 3MHA, ki je bila statistično značilno največja v vinih SK6 (154,9 ng/L) in SK9 (142,8 ng/L), ki so jim sledila vina SK7 (100,1 ng/L). Statistično značilno najmanjše vsebnosti 3MHA smo določili v vinih SK8 (54,2 ng/L). Za izračun pretvorbe 3MH v 3MHA pri posameznih starterskih kulturah, smo koncentracijo 3MHA delili s koncentracijo 3MH (Swiegers in sod., 2009). Statistično značilno največjo stopnjo pretvorbe je imela starterska kultura SK6 (21 %), pri kateri so ugotovili veliko stopnjo pretvorbe tudi King in sod. (2008). Tej so sledile starterske kulture SK9 (13 %) in SK7 (9 %), statistično značilno najmanjšo stopnjo pretvorbe pa je imela starterska kultura SK8 (5 %).

4.2.5.2 Vsebnosti metokspirazinov v vinih

Vsebnosti MPZ v vinih SK6-SK9 po končani AF so prikazane v preglednici 22.

Preglednica 22: Vsebnosti metokspirazinov 3-izobutil-2-metokspirazina (IBMP) in 3-izopropil-2-metokspirazina (IPMP) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6-SK9

Table 22: Contents of methoxypyrazines 3-isobutyl-2-methoxypyrazine (IBMP) in 3-isopropyl-2-methoxypyrazine (IPMP) in wines after the completion of alcoholic fermentation with starter cultures SK6-SK9

Metokspirazin (ng/L)	Starterska kultura/vino			
	SK6	SK7	SK8	SK9
IBMP	3,08±0,40 ^{*a}	3,23±0,33 ^a	3,57±0,50 ^a	3,77±0,45 ^a
IPMP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

* $x \pm SO$ (povprečje \pm standardni odklon); a – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$); <LOQ – pod mejo določitve

Vina se v vsebnosti metokspirazina IBMP niso statistično značilno razlikovala, z vsebnostmi od 3,08 ng/L (SK6) do 3,78 ng/L (SK9). Če upoštevamo njegov prag zaznave (8 ng/L; Allen in sod., 1991), smo v pridelanih vinih določili IBMP pod pragom senzorične zaznave. Vsebnost metokspirazina IPMP pa je bila v vseh vinih pod LOQ (1,6 ng/L). Iz rezultatov lahko zaključimo, da kvasovke ne vplivajo na vsebnost MPZ v vinu.

4.2.6 Mikrobiološka analiza

V mikrobiološki analizi, ki smo jo izvedli v fermentorjih inokuliranih z mešano kulturo *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* sevov kvasovk (SK9), smo 72 h po inokulaciji prve starterske kulture (*T. delbrueckii*) določili $1,4 \pm 0,3 \times 10^7$ CFU/mL. Takšno število kvasnih celic je običajno prisotno v eksponentni fazi rasti kvasovk (Povhe Jemec in Raspor, 2005; Aranda in sod., 2011). Naslednje vzorčenje smo opravili šest dni po inokulaciji druge starterske kulture (*S. cerevisiae*) in ugotovili, da je bila tudi ta že v eksponentni fazi rasti kvasovk, saj smo v določili $1,5 \pm 0,2 \times 10^7$ CFU/mL.

4.2.7 Senzorična analiza

Rezultati senzorične analize z uporabo metode rangiranja in 12 pokuševalcev so predstavljeni v preglednici 23. Manjša kot je vsota območij (rangov), manjša je intenzivnost arome po tropskem sadju oz. slabša je celokupna kakovost vina.

Preglednica 23: Vsota rangov posameznih senzoričnih lastnosti za vina SK6-SK9

Table 23: Rank sums of each sensory property for wines SK6-SK9

Senzorična lastnost	Vina – vsote rangov (n=12)			
	SK6	SK7	SK8	SK9
Aroma po tropskem sadju	26	38*	34	22*
Celokupna kakovost vina	26	34	33	27

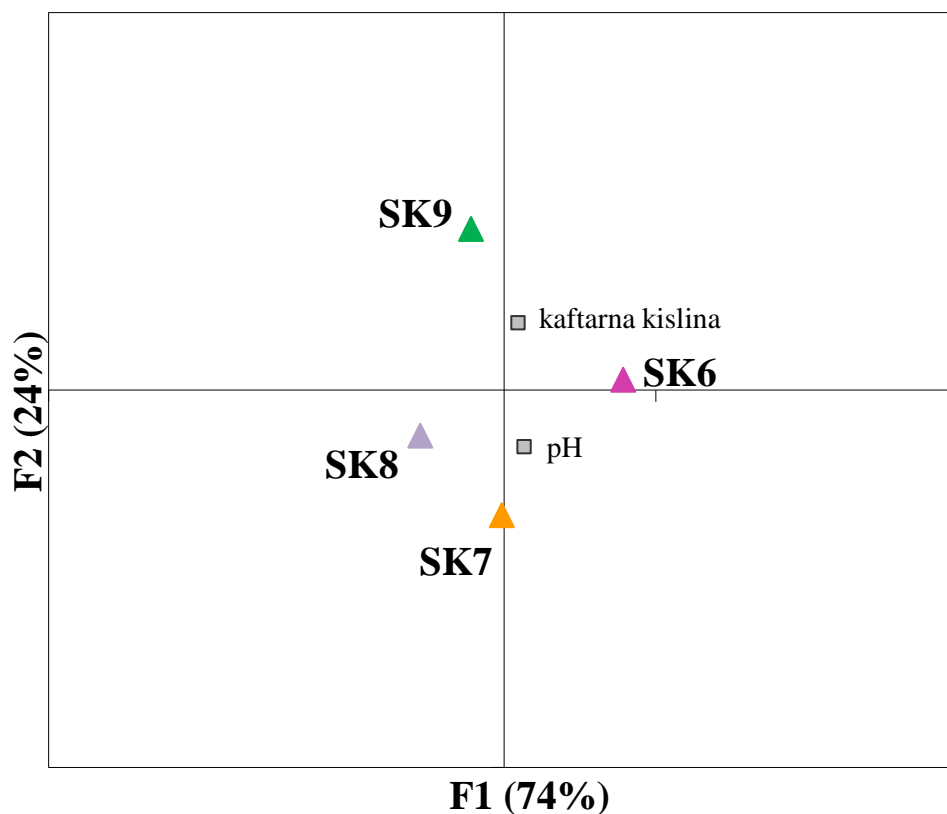
*Statistično značilna razlika med vzorcema. Mejna vrednost več primerjav je 15,18. Vzorca, katerih vsota se razlikuje za mejno vrednost ali več, sta statistično različna pri 5 % stopnji tveganja

Za senzorično lastnost aroma po tropskem sadju je bilo najvišje rangirano vino SK7 (38 točk), kar je verjetno posledica največjih vsebnosti 4MMP v tem vinu. Temu sta sledili vini SK8 (34 točk) in SK6 (26 točk). Vino SK9 je bilo z 22 točkami rangirano statistično značilno nižje (za 16 točk) kot vino SK7. To vino je bilo nižje ocenjeno verjetno zaradi najmanjših vsebnosti 4MMP, čeprav so bile vsebnosti ostalih dveh tiolov med največjimi. Vsebnost 4MMP v vinu očitno bolj pomembno vpliva na intenzivnost tropske arome kot ostala dva tiola. Tudi za senzorično lastnost celokupna kakovost vina je bilo vino SK7 rangirano najvišje (34 točk), sledila so mu vina SK8 (33 točk), SK9 (27 točk) in SK6 (26 točk). V celokupni kakovosti se vina niso statistično značilno razlikovala.

4.2.8 PCA in LDA poskusa 2

Metodi PCA in LDA smo uporabili za razvrstitev eksperimentalnih skupin pridelanih mladih vin glede na uporabljeno startersko kulturo. Vključili smo skupno 26 parametrov, od katerih je bilo šest diskriminantnih. Skupaj pojasnjujejo 92,2 % celotne variance (28,9 %; 21,7 %; 12,7 %; 10,5 %; 7,8 %; 5,9 %; 4,6 %). Za analizo LDA smo uporabili le dve najbolj determinantni lastnosti, in sicer pH in kaftarno kislino. Rezultati

LDA poskusa 2 so prikazani na sliki 21, v prilogah F in G pa so podani osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih in senzoričnih analiz ter korelacijski koeficienti med njimi.



Slika 21: Projekcija podatkov poskusa 2, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama (LDA)

Figure 21: Data projection of the experiment 2, in the plane defined by the first two discriminant functions (LDA)

Pri analizi LDA na izbranih podatkih (12 vzorcev (štirje vzorci v treh ponovitvah) in dve lastnosti) smo pridobili dve diskriminantni funkciji, od katerih funkcija 1 pojasnjuje 75,9 % skupne variance, funkcija 2 pa 24,1 %. Jasno lahko razlikujemo spremenljivki, katerih pravokotna projekcija na prvo diskriminantno funkcijo je največja. Ta skupina vključuje kaftarno kislino na eni in pH na nasprotni strani. Na sliki 21 lahko vidimo tudi tri ločene skupine vin, pridelanih z različnimi starterskimi kulturami. Prva skupina leži v levem zgornjem kvadrantu in vključuje vina, pridelana s startersko kulturo SK9. Le-ta se razlikuje od druge skupine v spodnjem delu slike, ki vključuje vina, pridelana s startersko kulturo SK7. Vina, pridelana s starterskima kulturama SK6 in SK8, predstavljajo tretjo skupino, ki leži najbližje abscisni osi, zato so si vzorci med sabo bolj podobni.

4.2.9 Razprava poskusa 2

Sev kvasovk vrste *T. delbrueckii* v starterski kulturi SK9 je izkazal slabšo fermentacijsko kinetiko v prvih desetih dneh AF v primerjavi z ostalimi (*Saccharomyces* spp.) starterskimi kulturami, kar je značilno za kvasovke rodu *ne-Saccharomyces* (Ciani in sod., 2006). Statistično značilno večje vsebnosti HK v vinih SK6 so verjetno posledica delovanja seva kvasovk VIN7 v mešani starterski kulturi SK6, ki je tako v našem poskusu 1 (SK1) kot v raziskavah drugih avtorjev (King in sod., 2008; Swiegers in sod., 2009) tvoril več HK. King in sod. (2008) so pokazali, da starterska kultura VIN7 kot monokultura med AF tvori večje vsebnosti HK kot v mešani kulturi s sorodnim sevom kvasovk (QA23 ali VL3). Po naših rezultatih je starterska kultura VIN7 (SK1) tvorila med AF manjše vsebnosti HK v obliki monokulture (poskus 1) kot v obliki mešane kulture s startersko kulturo QA23 (SK6, poskus 2). Glede na izmerjene vsebnosti FAN v vinih, ima starterska kultura SK9 manjše potrebe po dušiku, kar verjetno posledica delovanja seva kvasovk vrste *T. delbrueckii* v tej starterski kulturi. Tudi starterska kultura SK6 je izkazala manjše potrebe po dušiku, kar se je za oba seva kvasovk (SK1 + SK2) te starterske kulture pokazalo že v poskusu 1. Vsebnost HCK se je med AF zmanjšala za približno polovico, predvsem na račun kaftarne, kutarne in fertarne kisline, medtem ko so se vsebnosti ostalih HCK nekoliko povečale ali ostale enake. Največje vsebnosti skupnih HCK smo določili v vinih, pridelanih s startersko kulturo SK6. Ravno tako smo v poskusu 1 večje vsebnosti HCK določili v vinih, pridelanih s sevoma kvasovk, ki sestavljata startersko kulturo SK6.

Vsebnost GSH se je na začetku AF le nekoliko zmanjšala, kar se je v začetni fazi AF zgodilo tudi v poskusu 1, v kasnejših fazah pa so bile vsebnosti GSH zelo različne v odvisnosti od uporabljene starterske kulture. Za razliko od poskusa 1, je v tem poskusu prišlo do povečanja vsebnosti GSH med eksponentno fazo rasti kvasovk, o čemer so poročali že drugi avtorji (Park in sod., 2000a, 2000b; Lavigne in sod., 2007; Andujar-Ortiz in sod., 2012). V poskusu 1 smo mošt obogatili z GSH in so bile njegove vsebnosti skoraj sedemkrat večje kot v tem delu poskusa. Postopno zmanjševanje vsebnosti GSH med AF v poskusu 1 je zato lahko posledica toliko večjih začetnih vsebnosti GSH v moštu, kot tudi drugačne presnove GSH pri kvasovkah, kadar je le-ta dodan v mošt. V vinifikacijah s sevom kvasovk vrste *T. delbrueckii* (SK9 pred ko-inokulacijo s sevom kvasovk vrste *S. cerevisiae*) se je vsebnost GSH bistveno zmanjšala, kar je lahko posledica intenzivne porabe GSH pri tem sevu kvasovk ali pa tudi zgodnje oksidacije GSH zaradi slabše fermentacijske kinetike. Po končani AF smo največje vsebnosti GSH določili v vinu SK6, kar je lahko posledica fermentacijske kinetike te starterske kulture (relativno konstantna in hitra proti koncu AF). Ravno nasprotno je starterska kultura SK8 izkazala zelo hitro fermentacijsko kinetiko na začetku AF ter najpočasnejšo proti koncu AF, kar je lahko vodilo v zgodnjo oksidacijo vina in posledično najmanjšo vsebnost GSH. Vsebnost GSH v vinih po zaključeni AF je bila manjša kot v moštu, kar se je pokazalo tudi v drugih raziskavah (Lavigne in sod.,

2007; Du Toit in sod., 2007) in je verjetno posledica porabe GSH pri kvasovkah zaradi pomanjkanja hranil v zaključni fazi AF. Tudi vsebnosti hlapnih tiolov v vinih so bile zelo različne, glede na uporabljen sev kvasovk, kar so ugotovili tudi drugi avtorji (Murat in sod., 2001b, Howell in sod., 2004; Dubourdieu in sod., 2006; Swiegers in sod., 2005, 2006, 2009) in tudi mi v poskusu 1. Medtem ko so starterske kulture kvasovk rodu *Saccharomyces* (SK6-SK8) izkazale relativno veliko sposobnost sproščanja 4MMP, je starterska kultura SK9 (kombinacija kvasovk rodu *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces*) izkazala slabo sposobnost sproščanja 4MMP, saj so vina SK9 vsebovala statistično značilno manjše vsebnosti tega tiola. Posledično so bila vina SK6-SK8 rangirana višje za senzorično lastnost tropska aroma kot vina SK9. Statistično značilno manjše vsebnosti 3MH v vinih SK6 so mogoče lahko posledica velike sposobnosti pretvorbe 3MH v 3MHA pri starterski kulturi SK6, katero so potrdili za oba seva kvasovk te starterske kulture že Swiegers in sod. (2009). Medtem, ko smo s kombinacijo sevov kvasovk VL3 in QA23 v starterski kulturi SK8 pridelali vina z majhnimi vsebnostmi 3MHA, smo s kombinacijo sevov kvasovk VL3 in *T. delbrueckii* v starterski kulturi SK9, pridelali vina z večjimi vsebnostmi 3MH in 3MHA. Iz tega lahko sklepamo, da ima lahko kombinacija sevov kvasovk VL3 in QA23 negativen vpliv na vsebnost 3MHA v vinu. Kljub večjim vsebnostim 3MHA sta bili vini SK6 in SK9 nižje rangirani za senzorični lastnosti tropska aroma in celokupna kakovost. Vini SK7 in SK8 z večjimi vsebnostmi 4MMP (SK7) in 3MH in majhnimi vsebnostmi 3MHA pa sta bili rangirani višje za obe senzorični lastnosti. Kljub temu, da so se vina v vsebnosti 3MHA statistično značilno razlikovala, so imele razlike v vsebnosti 3MH večji vpliv na zaznavo tropske arome pri pokaševalcih. Starterske kulture kvasovk niso vplivale na vsebnost MPZ v vinu, kar smo potrdili že v poskusu 1.

4.3 POSKUS 3

V poskusu 3 smo izvedli vinifikacije letnika 2010 v 35 L fermentorjih z uporabo šestih starterskih kultur kvasovk pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi AF. Nižja oz. kontrolirana temperatura je bila nastavljena na priporočeno temperaturo za posamezen sev kvasovk s strani proizvajalca, ki je bila v odvisnosti od seva med 13 in 17 °C. Višja oz. kletna temperatura pa je bila med 18,5 in 19 °C. Dve od uporabljenih mešanih starterskih kultur kvasovk rodu *Saccharomyces* (SK6, SK7) smo uporabili že v poskusu 2, v katerem sta izkazali najbolj pozitiven celokupen vpliv na kemijsko in senzorično kakovost vina. Ostale starterske kulture so vključevale: industrijsko formulirano mešano kulturo *T. delbrueckii/S. cerevisiae* (SK10), ki je bila v času izvedbe relativno nova na tržišču in deklarirana za proizvodnjo kompleksnih polnih vin z intenzivno svežo tropsko in cvetlično aromo (priloga A); hibridni sev kvasovk *S. cerevisiae/S. paradoxus* (SK11), ravno tako relativno nov na tržišču in deklariran za proizvodnjo belih vin z eksotično aromo in polnim okusom (priloga A); in dva seva kvasovk rodu *S. cerevisiae*, od katerih je eden mutant s spremenjeno pentozafosfatno

potjo (SK12) in posledično boljšo sposobnostjo sproščanja aromatičnih estrov, ki v času izvedbe poskusa še ni bil na tržišču, drugi pa je v raziskavah zelo pogosto uporabljen in dobro proučen (SK13). Glavni namen tega dela poskusa je bil ugotoviti vpliv temperature na delovanje izbranih starterskih kultur kvasovk med AF in s tem na vsebnost GSH in aromatičnih spojin v vinu ter posledično na senzorično kakovost vina.

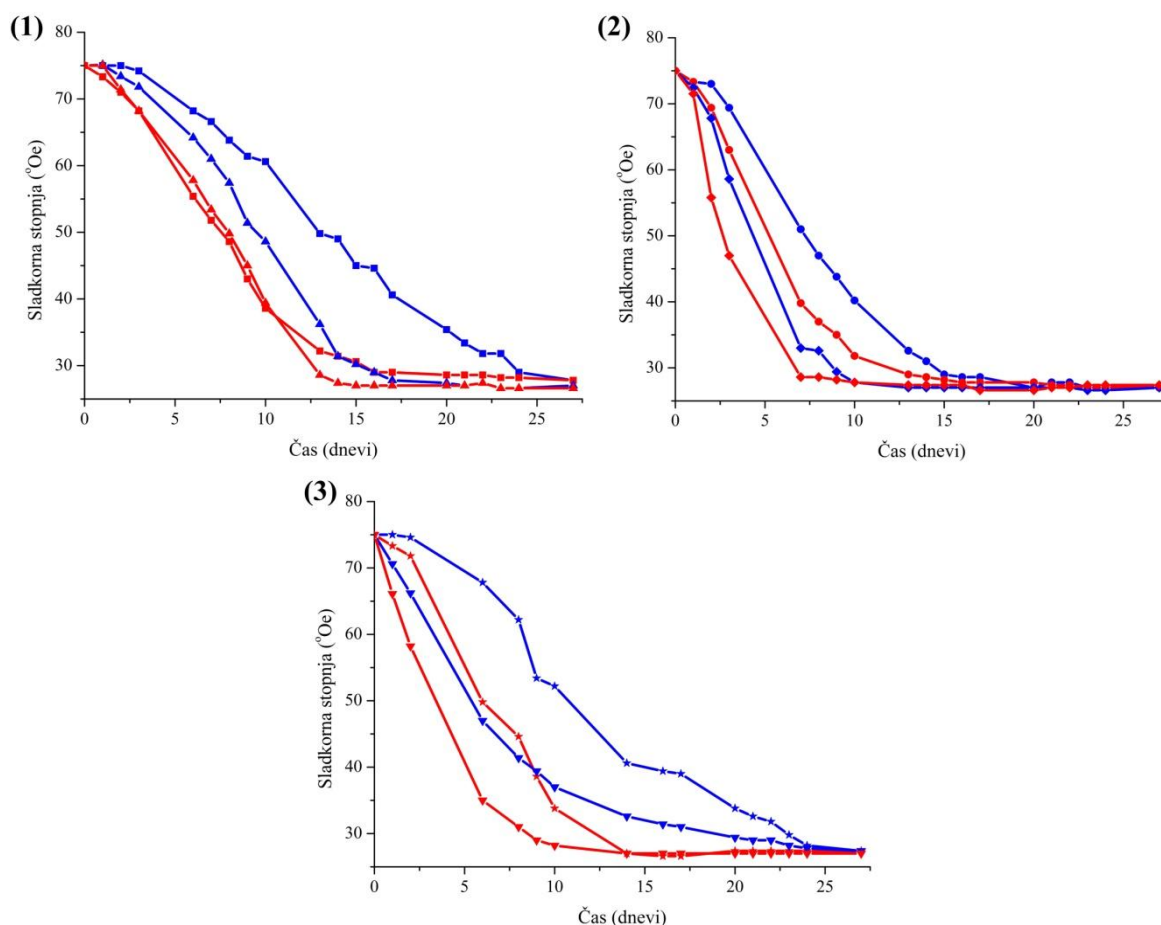
V nadaljevanju so predstavljeni in komentirani rezultati osnovnih kemijskih parametrov, fermentacijskih krivulj, vsebnosti FAN, HCK, GSH in hlapnih tiolov, senzorične analize mladih vin ter statistična obdelava podatkov (PCA in LDA).

4.3.1 Osnovni kemijski parametri in FAN v moštu

Osnovni kemijski parametri mošta, uporabljenega v tem delu poskusa, so bili sledeči: sladkorna stopnja 75 °Oe (približno 170 g/L RS), pH 3,23, skupne kisline (SK) 8,3 g/L in prosti aminokislinski dušik (FAN) 124,7 mg N/L.

4.3.2 Fermentacijska kinetika

V tem delu poskusa smo spremljali potek AF z merjenjem sladkorne stopnje fermentirajočega mošta ter na ta način določili fermentacijsko kinetiko pri posameznih starterskih kulturah. Kot je razvidno iz slike 22, ki prikazuje zmanjševanje sladkorne stopnje med AF, se je fermentacijska kinetika starterskih kultur bistveno razlikovala in je bila zelo odvisna od temperature AF. Kvasovke imajo hitrejšo fermentacijsko kinetiko pri višji temperaturi (Aranda in sod., 2011), kar se je pri vseh starterskih kulturah izkazalo tudi v našem poskusu.



Slika 22: Sladkorna stopnja mošta (°Oe) med alkoholno fermentacijo s starterskimi kulturami SK6 (■) in SK10 (▲) (1), SK11 (●) in SK12 (◆) (2), SK7 (★) in SK13 (▼) (3), pri nižji oz. kontrolirani (modra barva) in višji oz. kletni (rdeča barva) temperaturi alkoholne fermentacije

Figure 22: Sugar levels of must (°Oe) during alcoholic fermentation with starter cultures SK6 (■) and SK10 (▲) (1), SK11 (●) and SK12 (◆) (2), SK7 (★) and SK13 (▼) (3), at lower or controlled (blue color) and at higher or cellar (red color) temperature of alcoholic fermentation

V prvem tednu AF pri nižji temperaturi sta imeli najhitrejšo fermentacijsko kinetiko starterski kulturi SK12 in SK13, ki sta v tem času znižali sladkorno stopnjo mošta na 33 °Oe (SK12) oz. 44 °Oe (SK13). Najpočasnejšo fermentacijsko kinetiko pa sta v prvem tednu izkazali starterski kulturi SK6 in SK10, ki pa sta v tem času znižali sladkorno stopnjo mošta na 67 °Oe (SK6) oz. 61 °Oe (SK10). Počasnejša fermentacijska kinetika starterske kulture SK10 je posledica delovanja seva kvasovk vrste *T. delbrueckii*, ki je prvi inokuliran sev te mešane kulture, v prvih petih dneh AF. Že v poskusu 2 smo pri tej vrsti kvasovk ugotovili šibkejšo fermentacijsko kinetiko, kar je značilno za kvasovke rodu *ne-Saccharomyces* (Ciani in sod., 2006). V sledečem tednu sta imeli starterski kulturi SK12 in SK13 še vedno najhitrejšo fermentacijsko kinetiko, zmanjševanje sladkorne stopnje se je pri starterski kulturi SK12 trinajsti dan AF ustavilo, sladkorna stopnja se ni več spreminjala in je ostala konstantna (27 °Oe) do konca AF. Proces AF se je za startersko kulturo SK12 torej zaključil. V drugem tednu AF sta imeli starterski kulturi SK6 in SK7 najpočasnejšo fermentacijsko kinetiko z

znižanjem sladkorne stopnje na 49 °Oe (SK6) oz. 41 °Oe (SK7). Tretji teden sta najhitrejšo fermentacijsko kinetiko izkazali starterski kulturi SK10 in SK11, ki sta v tem času znižali sladkorno stopnjo na 27 °Oe (SK10) oz. 28 °Oe (SK11), najpočasnejšo pa še vedno starterski kulturi SK6 in SK7 z znižanjem sladkorne stopnje na 33 °Oe. V naslednjih petih dneh AF se je zmanjševanje sladkorne stopnje ustavilo pri vseh starterskih kulturah. AF pri nižjih temperaturah je trajala 13-27 dni, v odvisnosti od uporabljene starterske kulture.

Tudi pri višji temperaturi AF sta imeli v prvem tednu najhitrejšo fermentacijsko kinetiko starterski kulturi SK12 in SK13, ki sta v tem času znižali sladkorno stopnjo mošta na 29 °Oe (SK12) oz. 33 °Oe (SK13). Najpočasnejšo fermentacijsko kinetiko sta v prvem tednu prav tako izkazali starterski kulturi SK6 in SK10, ki pa sta v tem času znižali sladkorno stopnjo mošta na 52 °Oe (SK6) oz. 53 °Oe (SK10). V drugem tednu AF sta imeli prav tako najhitrejšo fermentacijsko kinetiko starterski kulturi SK12 in SK13. Starterska kultura SK12 se je 13. dan AF nekoliko upočasnila, povečala pa se je hitrost fermentacijske kinetike starterske kulture SK7, ki je skupaj s startersko kulturo SK13 14. dan zaključila AF oz. se sladkorna stopnja do konca AF ni več spreminjala in je bila konstantna pri 27 °Oe. Najpočasnejšo fermentacijsko kinetiko v drugem tednu AF je imela še vedno starterska kultura SK6, ki se ji je v drugi polovici tedna pridružila še SK11, v tem času sta znižali sladkorno stopnjo na 31 °Oe (SK6) in 29 °Oe (SK11). V tretjem tednu AF se je zmanjševanje sladkorne stopnje ustavilo še v fermentorjih SK10 (16. dan), SK12 (17. dan) in SK11 (21. dan), medtem ko je zmanjševanje sladkorne stopnje v fermentorjih SK6 trajalo vse do 26. (zadnjega) dne AF. Celoten proces AF pri višjih temperaturah je torej trajal 14-26 dni, v odvisnosti od uporabljene starterske kulture.

4.3.3 Osnovni kemijski parametri vina, FAN in HCK

Po končani AF smo v mladih vinih določili osnovne kemijske parametre (RS, alkohol, SK, HK in pH) ter vsebnosti FAN. Rezultati so prikazani v preglednici 24.

Preglednica 24: Vsebnosti reducirajočih sladkorjev (RS), alkohola, skupnih kislin (SK), hlapnih kislin (HK), pH in prostega aminokislinskega dušika (FAN) v vinih, po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK7 in SK10-SK13 pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi

Table 24: Contents of reducing sugars (RS), alcohol, total acidity (SK), volatile acidity (HK), pH and free amino nitrogen (FAN) in wines, after the completion of alcoholic fermentation with starter cultures SK6, SK7 and SK10-SK13 at lower (controlled) and higher (cellar) temperature

Parameter	Starterska kultura/vino					
	SK6	SK10	SK11	SK12	SK7	SK13
Nižja (kontrolirana) temperatura						
RS (g/L)	1,6	1,3	2,2	1,7	1,3	1,8
Alkohol (vol.%)	10,9	10,9	10,8	10,7	10,8	11,0
SK (g/L)	8,5	7,6	7,6	7,7	7,5	7,5
pH (/)	3,36	3,37	3,38	3,33	3,36	3,36
HK (g/L)	0,99	0,48	0,55	0,41	0,58	0,64
FAN (mg N/L)	67,7	50,3	60,2	37,6	52,1	57,1
Višja (kletna) temperatura						
RS (g/L)	1,6	1,1	2,0	1,8	1,2	1,4
Alkohol (vol.%)	10,7	10,8	10,8	10,6	10,9	11,0
SK (g/L)	8,6	7,6	7,3	7,9	7,9	7,7
pH (/)	3,38	3,37	3,40	3,32	3,36	3,36
HK (g/L)	1,25	0,47	0,55	0,41	0,65	0,60
FAN (mg N/L)	74,9	51,2	56,9	38,6	56,6	53,3

Mlada vina so imela primerljive vsebnosti RS (1,1-2,2 g/L), alkohola (10,6-11,0 vol.%) in vrednosti pH (3,32-3,40), iz česar lahko sklepamo, da niti starterska kultura kvasovk niti fermentacijska temperatura nista imeli bistvenega vpliva na omenjene parametre. Vsebnost SK je bila večja v vinih SK6 pri obeh fermentacijskih temperaturah (8,5 in 8,6 g/L), medtem ko se druga vina v vsebnosti SK niso bistveno razlikovala (7,3-7,9 g/L). Večje vsebnosti SK v vinih, pridelanih s startersko kulturo SK6, smo določili tudi v poskusu 2. Vina SK6 so imela tudi bistveno večjo vsebnost HK (0,99 in 1,25 g/L) kot ostala vina (0,41-0,65 g/L) in so med AF pri višji temperaturi celo preseгла največjo dovoljeno koncentracijo HK (1 g/L; Pravilnik o pogojih..., 2004). Večje vsebnosti HK v vinih, pridelanih s startersko kulturo SK6, smo določili tudi v poskusu 2, v poskusu 1 pa smo potrdili tvorbo večjih koncentracij HK pri sevu kvasovk SK1, ki je sestavlja startersko kulturo SK6.

Največje vsebnosti FAN smo določili v vinih SK6 (67,7 in 74,9 mg N/L) pri obeh temperaturah AF, kar je lahko posledica najpočasnejše fermentacijske kinetike pri tej starterski kulturi. Manjšo porabo dušika smo pri starterski kulturi SK6 kot tudi pri sevu kvasovk (SK1), ki je sestavni del te starterske kulture, potrdili že v predhodnih poskusih. Najmanjše vsebnosti FAN smo prav tako pri obeh fermentacijskih temperaturah določili v vinu SK12 (37,6 in 38,6 mg N/L), pri ostalih pa se je bila vsebnost FAN med 50,3 in 60,2 mg N/L. Manjše vsebnosti FAN v vinih SK12 so lahko posledica zelo hitre fermentacijske kinetike pri tej starterski kulturi ter s tem hitrejše asimilacije dušika. Med AF pri nižji temperaturi so starterske kulture kvasovk porabile med 57,0 (SK6) in 87,1 (SK12) mg N/L, med AF pri višji temperaturi pa med 49,8

(SK6) in 86,1 (SK12) mg N/L. Čeprav kvasovke pri višji temperaturi AF načeloma hitreje asimilirajo dušik (Ribéreau-Gayon in sod., 2006), smo v našem poskusu v večini primerov določili večjo vsebnost FAN v vinih, pridelanih pri višji temperaturi AF, v primerjavi z vini, pridelanimi pri nižji (kontrolirani) temperaturi. Večje vsebnosti FAN v vinih, pridelanih pri višji temperaturi AF, so najverjetneje posledica sproščanja dušikovih spojin z avtolizo kvasnih celic. Le-ta se je v vinifikacijah pri višjih temperaturah verjetno pričela prej kot v vinifikacijah pri nižjih temperaturah kot posledica hitrejšega zaključka AF.

Vsebnosti posameznih in skupnih hidroksicimetnih kislin v pridelanih vinih po končani AF, so prikazane v preglednici 25.

Preglednica 25: Vsebnosti hidroksicimetnih kislin (HCK) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK7 in SK10-SK13 pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi

Table 25: Contents of hydroxycinnamic acids (HCK) in wines after the completion of alcoholic fermentation with starter cultures SK6, SK7 and SK10-SK13 at lower (controlled) and higher (cellar) temperature

HCK (mg/L)	Starterska kultura/vino					
	SK6	SK10	SK11	SK12	SK7	SK13
Nižja (kontrolirana) temperatura						
<i>cis</i> -kaftarna kislina	16,2	12,9	7,1	7,6	12,7	9,4
kaftarna kislina	28,5	29,7	23,6	28,0	29,0	27,8
GRP	9,4	9,2	8,5	9,6	9,5	9,8
<i>cis</i> -kutarna kislina	6,3	5,6	3,9	5,5	5,5	4,6
kutarna kislina	2,0	1,8	1,7	1,7	1,9	1,9
<i>cis</i> -fertarna kislina	12,1	13,5	10,0	9,2	13,8	13,3
fertarna kislina	0,8	0,7	0,8	0,7	1,4	0,6
kavna kislina	1,0	2,0	2,2	2,4	2,3	1,8
<i>p</i> -kumarna kislina	0,5	0,6	0,4	0,3	0,8	0,2
ferulna kislina	0,9	0,9	1,0	1,0	1,1	1,0
HCK skupaj	77,9	77,1	59,3	65,9	77,9	70,5
Višja (kletna) temperatura						
<i>cis</i> -kaftarna kislina	14,2	15,2	8,9	7,8	13,4	14,4
kaftarna kislina	27,3	28,3	30,2	25,5	28,4	24,2
GRP	9,8	9,0	10,0	9,4	10,2	9,8
<i>cis</i> -kutarna kislina	5,1	7,3	5,4	4,5	5,7	5,7
kutarna kislina	2,0	1,8	1,9	1,6	1,9	1,8
<i>cis</i> -fertarna kislina	14,9	12,5	9,7	10,0	12,2	11,5
fertarna kislina	1,0	0,6	0,8	0,8	1,2	0,6
kavna kislina	1,4	1,2	1,8	2,0	1,7	1,0
<i>p</i> -kumarna kislina	0,6	0,5	0,3	0,2	0,7	0,3
ferulna kislina	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	1,2
HCK skupaj	77,4	77,7	70,1	62,9	76,3	70,7

Pridelana vina so se bistveno razlikovala tako v vsebnosti posameznih kot skupnih HCK. Največje vsebnosti HCK smo po zaključeni AF pri nižjih temperaturah določili v vinih SK6 in SK7 (77,9 mg/L), kar je lahko posledica počasnejše in bolj konstantne fermentacijske kinetike ter daljšega trajanja AF, s tem pa manjše oksidacije HCK zaradi konstantne prisotnosti CO₂ nad površino fermentirajočega mošta. Večje vsebnosti HCK

v vinih, pridelanih z omenjenima starterskima kulturama, smo določili že v poskusu 2. Najmanjše vsebnosti HCK pa smo po zaključeni AF pri nižjih temperaturah določili v vinih SK11 (59,3 mg/L) in SK12 (65,9 mg/L), kar je ravno nasprotno lahko posledica hitrejše fermentacijske kinetike, ki sta jo izkazali ti dve starterski kulturi. Tudi v vinih, pridelanih pri višjih temperaturah AF, smo največje vsebnosti HCK določili v vinih SK6 (77,4 mg/L) in SK10 (77,7 mg/L), kar je ravno tako verjetno posledica počasnejše in konstantnejše fermentacijske kinetike v fermentorjih SK6, ter počasnejše na začetku in hitrejše fermentacijske kinetike proti koncu AF v fermentorjih SK10. Najmanjše vsebnosti HCK smo tudi med vini, pridelanimi pri višji temperaturi, določili v vinih SK11 (70,1 mg/L) in SK12 (62,9 mg/L). Vina SK11 so imela manjše vsebnosti HCK kljub temu, da je bila fermentacijska kinetika starterske kulture SK11 pri višji temperaturi med najpočasnejšimi. Najmanjše vsebnosti HCK v vinih SK12 pa so verjetno posledica najhitrejše fermentacijske kinetike.

V vinih, pridelanih pri nižjih temperaturah AF, smo določili predvsem več kaftarne in kavne kisline v primerjavi z vini, pridelanimi pri višjih temperaturah, v katerih smo določili predvsem več *cis*-kaftarne in ferulne kisline. Na vsebnost omenjenih HCK je imela torej temperatura AF pomemben vpliv. V vinu SK11, pridelanem pri nižji temperaturi AF, smo določili znatno manjšo vsebnost GRP (8,5 mg/L) kot v vinu SK11, pridelanem pri višji temperaturi AF (10,0 mg/L), kar je verjetno posledica hitrejše fermentacijske kinetike te starterske kulture pri nižji temperaturi ter počasnejše pri višji temperaturi. Iz istega razloga so imela vina SK11, pridelana pri nižji temperaturi AF, tudi bistveno manjše vsebnosti vseh HCK.

4.3.4 Spremljanje vsebnosti glutaciona

Vsebnost GSH smo v tem delu poskusa določali v fermentorjih 48 ur po inokulaciji starterskih kultur (drugi dan AF), torej v začetku eksponentne faze rasti kvasovk, ter v vinu po končani AF (27. dan AF). Rezultati so prikazani v preglednici 26.

Preglednica 26: Vsebnosti glutaciona (GSH) v vinih v različnih fazah alkoholne fermentacije s starterskimi kulturami SK6, SK7 in SK10, SK11-SK13 pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi

Table 26: Contents of glutathione (GSH) in wines at different stages of alcoholic fermentation with starter cultures SK6, SK7 and SK10-SK13 at lower (controlled) and higher (cellar) temperature

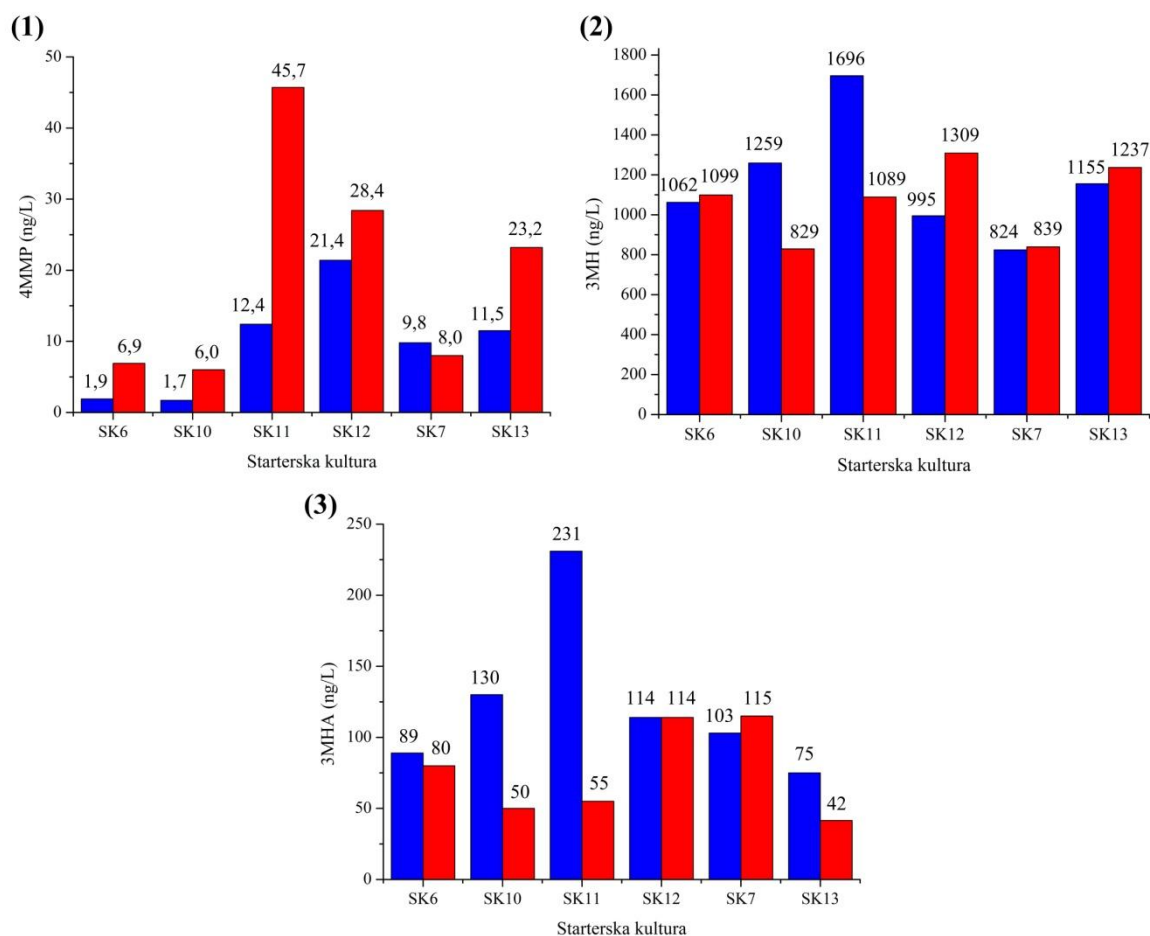
Čas vzorčenja	Starterska kultura					
	SK6	SK10	SK11	SK12	SK7	SK13
Nižja (kontrolirana) temperatura						
48 h po inokulaciji	9,0	8,8	10,7	11,6	11,2	12,4
Po končani AF	13,1	15,8	11,1	15,3	14,4	11,0
Višja (kletna) temperatura						
48 h po inokulaciji	11,9	8,6	10,1	11,1	10,9	15,0
Po končani AF	10,6	15,3	10,7	11,6	14,6	10,4

Kot je razvidno iz preglednice 26, smo 48 ur po inokulaciji starterskih kultur določili največje vsebnosti GSH v fermentorjih s SK13 (12,4 in 15,0 mg/L) in SK12 (11,6 in 11,1 mg/L) pri obeh temperaturah AF, iz česar lahko sklepamo, da starterski kulturi za svojo presnovo v začetni fazi AF porabljata manj GSH ne glede na temperaturo AF in kljub hitri fermentacijski kinetiki. Starterska kultura SK6 je po 48 urah AF pri višji temperaturi porabila veliko manj GSH kot pri nižji. Pri obeh temperaturah AF smo določili nekoliko manjše vsebnosti GSH v fermentorjih SK10 (8,8 in 8,6 mg/L), kar je verjetno posledica delovanja seva kvasovk vrste *T. delbrueckii* v tej starterski kulturi, saj smo podobno že v poskusu 2 v fermentacijah s to vrsto kvasovk določili manjše vsebnosti GSH v eksponentni fazi rasti kvasovk. Iz tega lahko zaključimo, da sev kvasovk vrste *T. delbrueckii* dejansko porabi več GSH v primerjavi s kvasovkami rodu *Saccharomyces*. Pri nižji temperaturi AF smo v fermentorjih po 48 urah določili večje vsebnosti GSH kot v fermentorjih pri višji temperaturi, kar je verjetno posledica počasnejše fermentacijske kinetike pri nižji temperaturi. Izjema sta bili le starterski kulturi SK6 in SK13, pri katerih smo določili znatno večje vsebnosti GSH v fermentorjih pri višji temperaturi. Mogoče so za ti dve starterski kulturi višje temperature na začetku AF bolj primerne v smislu ohranjanja vsebnosti GSH.

Po končani AF je skoraj v vseh fermentorjih prišlo do povečanja vsebnosti GSH glede na prvo merjenje, kar je verjetno posledica sproščanja GSH z avtolizo kvasovk v zaključnih fazah AF. Največje vsebnosti GSH smo določili v vinih SK10 (15,8 in 15,3 mg/L), pridelanih pri obeh temperaturah AF, kar je lahko posledica biosinteze GSH pri kasneje inokuliranih kvasovkah rodu *Saccharomyces* ali pa sproščanja GSH pri avtolizi kvasovk rodu ne-*Saccharomyces*. Enak trend se je z uporabo tovrstne mešane starterske kulture pokazal tudi v poskusu 2. Iz tega lahko sklepamo, da mešane kulture kvasovk rodu *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* pozitivno vplivajo na vsebnost GSH v pridelanem vinu. V vinih SK13 pa smo po zaključeni AF pri obeh temperaturah AF določili najmanjše vsebnosti GSH (11,0 in 10,4 mg/L), kar je verjetno posledica hitre fermentacijske kinetike in porabe GSH v zaključnih fazah AF zaradi pomanjkanja hranil. V vseh vinih, pridelanih pri nižji temperaturi (razen pri SK7), smo določili večje vsebnosti GSH kot v vinih, pridelanih pri višji temperaturi, kar je zagotovo posledica enakomernejše fermentacijske kinetike pri nižjih temperaturah in s tem manjše oksidacije GSH.

4.3.5 Vsebnosti hlapnih tiolov v vinih

Vsebnosti hlapnih tiolov v vinih po končani AF pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi so prikazani na sliki 23.



Slika 23: Vsebnosti hlapnih tiolov 4-merkpto-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (1), 3-merkptoheksan-1-ola (3MH) (2) in 3-merkptoheksil acetata (3MHA) (3) v vinih, po končani alkoholni fermentaciji pri nižji (modri stolpci) in višji (rdeči stolpci) temperaturi s starterskimi kulturami SK6, SK7 in SK10-SK13

Figure 23: Contents of volatile thiols 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) (1), 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) (2) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) (3) in wines, after the completion of alcoholic fermentation at lower (blue column) and higher (red column) temperature with starter cultures SK6, SK7 in SK10-SK13

Kot je razvidno iz slike 23, je bila vsebnost vseh treh hlapnih tiolov v vinu zelo različna v odvisnosti tako od uporabljene starterske kulture kvasovk kot tudi temperature AF. Vina, pridelana pri višji temperaturi AF, so imela večje vsebnosti 4MMP (razen SK7), kot vina, pridelana pri nižji temperaturi (slika 23 (1)). Do takšnih zaključkov so prišli tudi Masneuf-Pomarède in sod. (2006). Največje vsebnosti 4MMP smo določili v vinih SK11 (12,4 in 45,7 mg/L) in SK12 pri obeh temperaturah AF (21,4 in 28,4 mg/L). Prav tako smo najmanjše vsebnosti 4MMP določili v vinih SK6 (1,9 in 6,9 mg/L) in SK10 (1,7 in 6,0 mg/L) pri obeh temperaturah AF. Manjše vsebnosti 4MMP v vinih, pridelanih z mešano kulturo kvasovk vrst *T. delbrueckii* in *S. cerevisiae*, smo določili tudi v poskusu 2, iz česar lahko zaključimo, da imajo tovrstne mešane starterske kulture slabšo sposobnost sproščanja 4MMP iz prekursorjev v moštu.

Temperatura AF je imela zelo različen vpliv na sproščanje 3MH pri kvasovkah, saj so nekatere starterske kulture sprostile več 3MH pri nižji temperaturi, nekatere pa pri višji (slika 23 (2)). V večini primerov pa so kvasovke več 3MH sprostile pri višjih temperaturah AF. Vsebnost 3MH je bila v vinih, pridelanih pri nižji temperaturi AF, največja v vinih SK11 (1696 ng/L) in SK10 (1259 ng/L), najmanjša pa v vinih SK12 (995 ng/L) in SK7 (824 ng/L). Med vini, pridelanimi pri višji temperaturi AF, pa smo večje vsebnosti 3MH določili v vinih SK12 (1309 ng/L) in SK13 (1237 ng/L), manjše vsebnosti pa v vinih SK7 (839 ng/L) in SK10 (829 ng/L). Različna temperatura AF je imela večji ali manjši vpliv na sproščanje hlapnih tiolov pri posameznih starterskih kulturah – pri starterskih kulturah SK6, SK7 in SK13 temperatura ni bistveno vplivala, saj ni bilo večjih razlik v vsebnosti 3MH med vini, pridelanimi pri različnih temperaturah, medtem ko je imela pri ostalih starterskih kulturah temperatura bistven vpliv na sproščanje 3MH.

Kot je razvidno iz slike 23 (3), smo pri nižjih temperaturah AF pridelali vina z večjimi vsebnostmi 3MHA (razen pri SK12 in SK7), iz česar lahko sklepamo, da večina starterskih kultur pretvori več 3MH v 3MHA pri nižjih temperaturah AF. Sicer pa je temperatura zelo različno vplivala na pretvorbo 3MH v 3MHA pri posameznih starterskih kulturah – pri starterskih kulturah SK6, SK7 in SK12 temperatura AF ni imela bistvenega vpliva na pretvorbo 3MH v 3MHA, medtem ko je imela pri ostalih starterskih kulturah bistveno večji vpliv. V vinih, pridelanih pri nižji temperaturi AF, smo večje vsebnosti 3MHA določili v vinih SK11 (231 ng/L) in SK10 (130 ng/L), manjše vsebnosti pa v vinih SK6 (89 ng/L) in SK13 (75 ng/L). Med vini, pridelanimi pri višji temperaturi AF, smo večje vsebnosti 3MHA določili v vinih SK7 (115 ng/L) in SK12 (114 ng/L), manjše pa v vinih SK10 (50 ng/L) in SK13 (41,5 ng/L). V vinih SK13 smo torej določili najmanjše vsebnosti 3MHA pri obeh temperaturah AF, kar potrjuje manjšo sposobnost pretvorbe 3MH v 3MHA pri tej starterski kulturi.

Tudi pri izračunu pretvorbe 3MH v 3MHA pri posameznih kvasovkah smo ugotovili, da imajo starterske kulture (razen SK7) pri nižji temperaturi AF večjo stopnjo pretvorbe 3MH v 3MHA. O večjih stopnjah pretvorbe pri nižjih temperaturah AF so poročali že drugi avtorji (Swiegers in sod., 2006). Pri nižji temperaturi AF so imele večjo stopnjo pretvorbe starterske kulture SK11 (14 %) in SK7 (13 %), manjšo stopnjo pretvorbe pa SK6 (8 %) in SK13 (6 %). Pri višji temperaturi AF pa so imele večjo stopnjo pretvorbe starterske kulture SK7 (14 %) in SK12 (9 %), manjšo stopnjo pretvorbe pa starterske kulture SK11 (5 %) in SK 13 (3 %).

Ker se je proces AF v nekaterih vinifikacijah zaključil veliko pred žveplanjem vin (26. dan AF), je v času od zaključka AF do žveplanja lahko prišlo do določene stopnje oksidacije hlapnih tiolov. Bolj zgodaj se je proces AF zaključil predvsem v vinifikacijah SK12 pri višji ter SK7 in SK13 pri nižji temperaturi AF. Z ozirom na večje oz.

povprečne vsebnosti hlapnih tiolov v teh vinih pa ta oksidacija verjetno ni bila obsežnejša.

4.3.6 Senzorična analiza

Senzorična analiza pridelanih mladih vin je bila opravljena dva meseca po končani AF s panelom sedmih izkušenih pokaševalcev, ki so posameznim vinom dodelili od 1 (najmanj) do 5 (največ) točk glede na intenzivnost posamezne senzorične lastnosti. Rezultati so prikazani v preglednici 27.

Preglednica 27: Povprečja točk posameznih senzoričnih lastnosti za vina SK6, SK7 in SK10-SK13, pridelana pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi

Table 27: Average number of points of each sensory property for wines SK6, SK7 in SK10-SK13, produced at lower (controled) and higher (cellar) temperature

Senzorična lastnost	Vino – točkovanje (1-5)					
	SK6	SK10	SK11	SK12	SK7	SK13
Nižja (kontrolirana) temperatura						
Težja tropska aroma	2,6±0,5 ^{*ab}	2,6±0,8 ^{ab}	2,6±0,9 ^{ab}	3,1±0,6 ^b	2,3±0,9 ^a	2,8±0,6 ^{ab}
Sveža tropska aroma	2,9±0,6 ^a	2,7±0,8 ^a	2,5±0,6 ^a	2,8±0,6 ^a	2,4±0,8 ^a	2,9±0,8 ^a
Fermentacijska aroma	2,9±0,5 ^a	2,4±0,5 ^a	2,7±0,5 ^a	2,4±0,6 ^a	2,7±0,6 ^a	2,7±0,3 ^a
Zelena aroma	2,7±1,0 ^b	2,6±0,4 ^b	2,2±0,5 ^{ab}	2,1±0,4 ^{ab}	1,9±0,9 ^a	2,3±0,6 ^{ab}
Celokupna kakovost	2,6±0,4 ^{ab}	2,7±0,6 ^{ab}	2,6±0,4 ^{ab}	2,9±0,8 ^b	2,1±0,7 ^a	2,9±0,5 ^b
Višja (kletna) temperature						
Težja tropska aroma	2,7±0,8 ^a	2,5±0,9 ^a	2,1±0,8 ^a	2,6±1,2 ^a	1,8±1,1 ^a	2,2±0,9 ^a
Sveža tropska aroma	2,4±0,6 ^a	1,9±0,5 ^a	1,7±0,6 ^a	2,3±0,7 ^a	1,9±0,9 ^a	2,1±0,7 ^a
Fermentacijska aroma	2,5±0,9 ^a	2,4±0,6 ^a	2,6±0,9 ^a	2,6±0,8 ^a	2,4±0,8 ^a	2,4±0,8 ^a
Zelena aroma	2,1±0,8 ^b	2,3±0,6 ^b	1,3±0,4 ^a	1,7±0,7 ^{ab}	1,9±0,7 ^{ab}	1,8±0,9 ^{ab}
Celokupna kakovost	2,2±0,6 ^a	2,4±0,6 ^a	1,9±0,5 ^a	2,5±0,4 ^a	2,1±0,5 ^a	2,3±0,8 ^a

* $\bar{x} \pm SO$ (povprečja točk sedmih pokaševalcev \pm standardni odklon); a, b – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$)

Za težjo tropsko aromo vina so odgovorni predvsem hlapni tioli in sta jo predstavljala predvsem aroma po pasijonki in mangu. Med vini, pridelanimi pri nižji temperaturi, je bila težja tropska aroma najvišje ocenjena v vinu SK12 (3,1 točke), kar je verjetno v povezavi z večjimi vsebnostmi 4MMP v tem vinu. Obratno je bilo vino SK7, ki je vsebovalo manjše vsebnosti 4MMP (vendar ne najmanjše), najnižje ocenjeno za težjo tropsko aromo (2,3 točke). Vina, pridelana pri nižjih temperaturah, so bila višje ocenjena (razen SK6) za senzorično lastnost težja tropska aroma v primerjavi z vini, pridelanimi pri višji temperaturi AF. Med vini, pridelanimi pri višji temperaturi AF, ni bilo statistično značilnih razlik v težji tropski aromi, sicer pa je bilo najvišje ocenjeno vino SK6 (2,7 točk), najnižje pa tudi pri tej temperaturi vino SK7 (1,8 točk), kar lahko prav tako pripišemo manjšim vsebnostim 4MMP v tem vinu.

V sveži tropski aromi, za katero so ravno tako odgovorni predvsem hlapni tioli in sta jo predstavljala predvsem aroma po limoni in grenivki, med vini ni bilo statistično značilnih razlik. Sicer pa sta bili med vini, pridelanimi pri nižji temperaturi, najvišje

ocenjeni vini SK6 in SK13 (2,9 točk), najnižje pa vino SK7 (2,4 točke), kar ponovno lahko pripišemo manjši vsebnosti 4MMP v tem vinu. Vsa vina, pridelana pri nižji temperaturi AF, so bila višje ocenjena za senzorično lastnost sveža tropska aroma v primerjavi z vini, pridelanimi pri višji temperaturi. Med vini, pridelanimi pri višji temperaturi, je bilo za senzorično lastnost sveža tropska aroma najvišje ocenjeno vino SK6 (2,4 točke), najnižje pa vino SK11 (1,7 točk), kar je verjetno lahko posledica manjših vsebnosti 3MHA v tem vinu.

Tudi v fermentacijski aromi, za katero so odgovorni predvsem fermentacijski estri in sta jo predstavljala predvsem aroma po hruški in jabolku, med vini ni bilo statistično značilnih razlik. Sicer pa je bilo med vini, pridelanimi pri nižji temperaturi AF, najvišje ocenjeno vino SK6 (2,9 točk), čeprav smo pričakovali, da bo fermentacijska aroma bolj intenzivna v vinu SK12, ki je bilo pridelano s startersko kulturo ECA5, katera naj bi imela izraženo lastnost tvorbe fermentacijskih estrov (Cadière in sod., 2011). Višje ocenjena fermentacijska aroma v vinu SK6 je verjetno posledica najpočasnejše fermentacijske kinetike starterske kulture SK6, pri čemer se je ohranilo več fermentacijskih estrov. Najnižje ocenjena vina za to lastnost pa so bila ravno SK12 in SK10 (2,4 točke), kar bi ravno tako lahko povezali s fermentacijsko kinetiko, ki je bila pri teh starterskih kulturah hitrejša. Vina, pridelana pri nižji temperaturi AF, so bila višje ocenjena (razen SK12 in SK10) za senzorično lastnost fermentacijska aroma v primerjavi z vini, pridelanimi pri višji temperaturi. Med vini, pridelanimi pri višji temperaturi AF, skoraj ni bilo razlik v intenzivnosti fermentacijske arome – nekoliko višje sta bili ocenjeni vini SK11 in SK12 (2,6 točk), nekoliko nižje pa vina SK7, S10 in SK13 (2,4 točke). Starterska kultura SK12 je torej nekoliko bolj izrazila svoje (domnevne) karakteristike pri višjih temperaturah AF.

Za zeleno aromo vina so odgovorni predvsem metokspirazini in jo je predstavljala predvsem aroma po zeleni papriki. Med vini, pridelanimi pri nižji temperaturi AF, so bila za zeleno aromo statistično značilno najvišje ocenjena vina SK6 (2,7 točk) in SK10 (2,6 točk), statistično značilno najnižje vina SK7 (1,9 točk). Vina, pridelana pri nižji temperaturi AF, so bila višje ocenjena za senzorično lastnost zelena aroma v primerjavi z vini, pridelanimi pri višji temperaturi. Med vini, pridelanimi pri višji temperaturi AF, so bila za senzorično lastnost zelena aroma statistično značilno najvišje ocenjena vina SK6 (2,1 točke) in SK10 (2,3 točke), statistično značilno najnižje pa vino SK11 (1,3 točke).

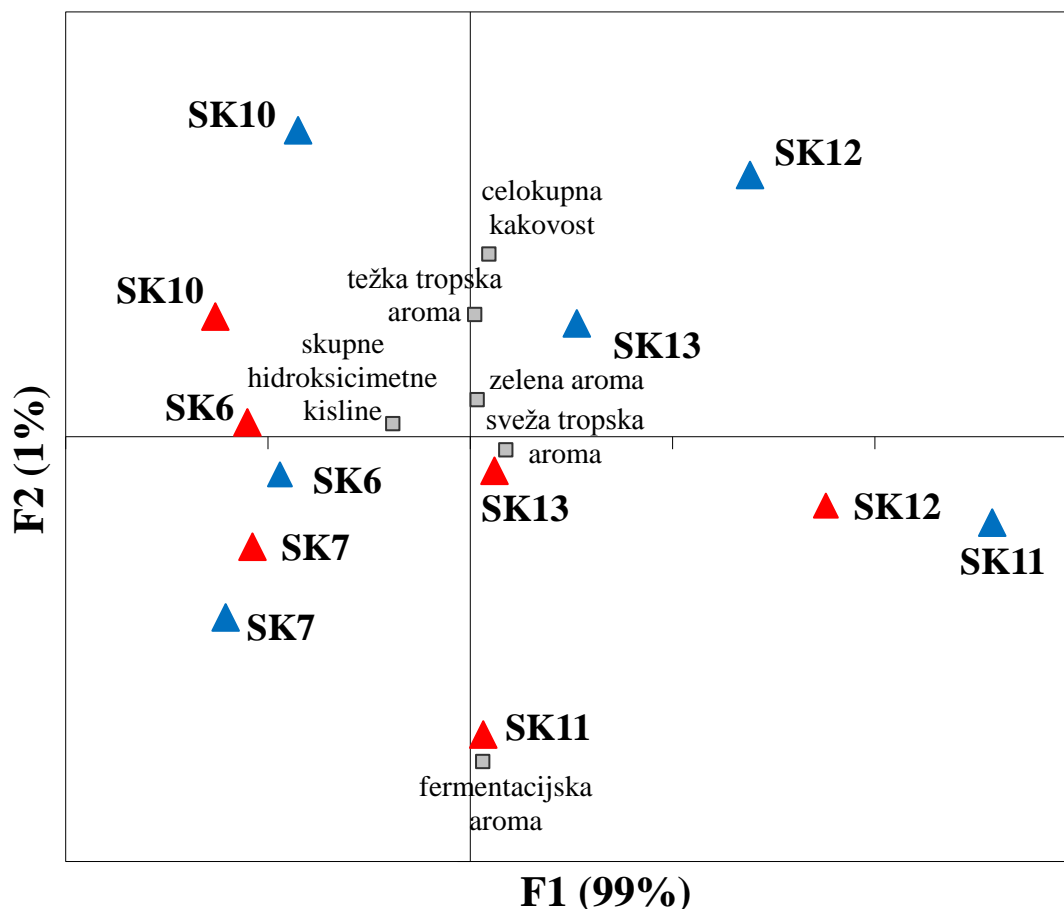
Za celokupno kakovost, parameter, ki združuje aromo in okus vina, so bila med vini, pridelanimi pri nižji temperaturi, statistično značilno najvišje ocenjena vina SK12 in SK13 (2,9 točk), ki so bila najvišje ocenjena tudi za senzorični lastnosti težja (SK12) in sveža (SK13) tropska aroma. Med vini, pridelanimi pri nižji temperaturi AF, pa je bilo statistično značilno najnižje ocenjeno vino SK7 (2,1 točka), ki je bilo tudi najnižje ocenjeno za senzorične lastnosti težja in sveža tropska aroma ter zelena aroma. Vina,

pridelana pri nižji temperaturi AF, so bila višje ocenjena (razen SK7) za senzorično lastnost celokupna kakovost v primerjavi z vini, pridelanimi pri višji temperaturi. Med vini, pridelanimi pri višji temperaturi, v celokupni kakovosti ni bilo statistično značilnih razlik, sicer pa je bilo najvišje ocenjeno vino SK12 (2,5 točk), najnižje pa vino SK11 (1,9 točk), ki je bilo tudi najnižje ocenjeno za senzorične lastnosti sveža tropska in zelena aroma.

Z uporabo multiple regresije nismo našli statistično značilne povezave med vsebnostjo hlapnih tiolov in številom dodeljenih točk pri senzorični analizi ($p \geq 0,05$), razen za senzorično lastnost zelena aroma. Kljub temu, da so za zeleno aromo odgovorni predvsem metoksipirazini, smo določili statistično značilno povezavo med hlapnimi tioli in zeleno aromo pri 95 % stopnji zaupanja ($p = 0,01781$). Ta povezava pa je statistično značilna predvsem za hlapni tiol 4MMP ($p = 0,00453$), kar je mogoče lahko posledica percepcije arome tega tiola (pušpan) pri pokuševalcih bolj kot zelene.

4.3.7 PCA in LDA poskusa 3

S pomočjo PCA in LDA smo razvrstili pridelana mlada vina v skupine glede na uporabljeno startersko kulturo in temperaturo AF. Pri analizi PCA smo izmed vključenih 27 parametrov določili šest najbolj determinirajočih, in sicer skupne HCK ter senzorične lastnosti težja in sveža tropska aroma, fermentacijska aroma, zelena aroma in celokupna kakovost. Skupaj so razložile 92,2 % skupne variabilnosti med proučevanimi vzorci (28,9 %; 21,7 %; 12,7 %; 10,5 %; 7,8 %; 5,9 %; 4,6 %). Izbrane podatke (12 vzorcev, šest lastnosti) smo vnesli v analizo LDA, katere rezultati so prikazani na sliki 24, v prilogah H in I pa so podani osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih in senzoričnih analiz ter korelacijski koeficienti med njimi.



Slika 24: Projekcija podatkov poskusa 3, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama (LDA); ▲ – višja temperatura alkoholne fermentacije, ▲ – nižja temperatura alkoholne fermentacije

Figure 24: Data projection of the experiment 3, in the plane defined by the first two discriminant functions (LDA); ▲ – higher fermentation temperature, ▲ – lower fermentation temperature

Pri analizi LDA na izbranih podatkih smo pridobili štiri diskriminantne funkcije, od katerih funkcija 1 pojasnjuje kar 99,0 % skupne variance, funkcija 2 pa 0,6 %. Ostali dve diskriminantni funkciji pojasnujeta le 0,3 % skupne variance. Spremenljivke, katerih pravokotni projekciji na prvo diskriminantno funkcijo sta največji in največ prispevata k porazdelitvi vzorcev, sta celokupna kakovost in težka tropska aroma ter na nasprotni strani fermentacijska aroma. Lastnosti, ki ležijo blizu druga drugi, so v visoki pozitivni korelaciji, kot so to skupne HCK in senzorični lastnosti zelena in sveža tropska aroma. Iz slike 24 je razvidna dokaj velika razpršenost vin, pridelanih z različnimi starterskimi kulturami pri višji in nižji temperaturi AF. V grobem pa lahko razdelimo pridelana vina v pet skupin. Prva skupina leži v zgornjem levem delu slike in vključuje vina SK10, pridelana pri obeh temperaturah AF. Druga skupina leži pretežno v spodnjem levem delu slike in vključuje vina SK6 in SK7, ravno tako pridelana pri obeh temperaturah AF. V tretjo skupino, ki leži v zgornjem desnem delu slike, so uvrščena vina SK12 in SK13, pridelana pri nižji temperaturi AF. Četrta in peta skupina

pa ležita v spodnjem desnem delu slike. Četrta skupina vključuje vino SK11, pridelano pri nižji temperaturi AF in vino SK12, pridelano pri višji temperaturi AF. Peta skupina pa vključuje vini SK11 in SK13, pridelani pri višji temperaturi AF.

4.3.8 Razprava poskusa 3

Fermentacijska kinetika vinifikacij poskusa 3 je bila v veliki meri odvisna tako od posameznih starterskih kultur kot od temperature AF. Kot pričakovano (Aranda in sod., 2011), so imele vse starterske kulture hitrejšo fermentacijsko kinetiko pri višji temperaturi AF. Sev kvasovk vrste *T. delbrueckii* v starterski kulturi SK10 je izkazal slabšo fermentacijsko kinetiko v prvih petih dneh AF v primerjavi z ostalimi (*Saccharomyces* spp.) starterskimi kulturami. Slabšo fermentacijsko kinetiko smo na račun delovanja seva kvasovk vrste *T. delbrueckii* v starterski kulturi SK9 določili tudi v poskusu 2. Starterska kultura SK6 je tvorila značilno večje vsebnosti HK, kar smo za to startersko kulturo potrdili že v poskusu 2. Pri višji temperaturi AF je ta starterska kultura tvorila HK celo v koncentracijah nad največjo dovoljeno mejo (1 g/L; Pravilnik o pogojih..., 2004). Tvorba HK pri starterski kulturi SK6 je bila v tem poskusu večja kot v poskusu 1, kar je lahko posledica sestave mošta (letnika) kot tudi šibkejše fermentacijske kinetike, ki jo je v tem poskusu izkazala ta starterska kultura pri obeh temperaturah AF. Ne glede na temperaturo AF je starterska kultura SK6 med AF porabila najmanj FAN, starterska kultura SK12 pa največ, kar je verjetno povezano z njuno fermentacijsko kinetiko med AF (počasna pri SK6 in hitra pri SK12). Manjše potrebe po dušiku pri starterski kulturi SK6 kot tudi pri sevu kvasovk, ki sestavlja to startersko kulturo, smo potrdili tudi v obeh predhodnih poskusih. Čeprav poteka asimilacija dušika pri kvasovkah hitreje pri višjih temperaturah AF (Ribéreau-Gayon in sod., 2006), smo v našem poskusu določili v večini vin, pridelanih pri višji temperaturi AF, višje vsebnosti FAN. Višje vsebnosti FAN v teh vinih so verjetno posledica sproščanja dušikovih spojin nazaj v vino pri avtolizi kvasnih celic, ki se je v vinifikacijah pri višji temperaturi verjetno pričela prej kot v vinifikacijah pri nižji temperaturi. Fermentacijska kinetika posameznih starterskih kultur je pomembno vplivala tudi na vsebnost HCK v vinih. Ne glede na temperaturo AF smo največje vsebnosti HCK določili v vinih, pridelanih s startersko kulturo SK6 s počasnejšo fermentacijsko kinetiko, najmanjše pa v vinih SK11 in SK12 s hitrejšo fermentacijsko kinetiko. V vinih, pridelanih s startersko kulturo SK6, smo tudi v poskusu 2 pridelali vina z največjo vsebnostjo HCK. Temperatura AF ni imela bistvenega vpliva na vsebnost HCK v vinih, pridelanih s posamezno startersko kulturo.

Tudi v tem delu poskusa so imele tako starterske kulture kot temperatura AF pomemben vpliv na vsebnost GSH v pridelanih vinih. Starterski kulturi SK12 in SK13 sta v začetni fazi AF porabili manj GSH kot ostale starterske kulture, v kasnejših fazah AF pa sta ga porabili bistveno več, saj smo v teh vinih določili najnižje vsebnosti GSH po končani

AF. Za razliko od ostalih, je bila v vinih SK13 vsebnost GSH tudi manjša kot v začetni fazi AF, ne glede na temperaturo AF. Startersko kulturo SK13 lahko torej potrdimo kot večjo porabnico GSH med AF, predvsem zaradi njene hitre fermentacijske kinetike. Ravno nasprotno je sev kvasovk vrste *T. delbrueckii* v starterski kulturi SK10 v začetni fazi AF porabil za svojo presnovo največ GSH, kar smo za to vrsto kvasovk potrdili tudi v poskusu 2. Kljub manjšim vsebnostim GSH v fermentorjih SK10 v začetku AF, smo v vinih po končani AF določili največje vsebnosti GSH. Enak trend se je z uporabo tovrstne mešane starterske kulture pokazal tudi v poskusu 2. Potrdimo lahko torej, da mešane kulture kvasovk rodu *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* pozitivno vplivajo na vsebnost GSH v pridelanem vinu. Temperatura AF je posredno vplivala na vsebnost GSH v vinih – nižje temperature AF so vodile v počasnejšo fermentacijsko kinetiko kvasovk, kar se je odrazilo z večjimi vsebnostmi GSH v pridelanih vinih. Ravno nasprotno smo pri nižjih temperaturah AF večinoma pridelali vina z manjšimi vsebnostmi hlapnih tiolov 4MMP in 3MH, vendar večjimi vsebnostmi 3MHA, v primerjavi z vini, pridelanimi pri višjih temperaturah AF. Na sproščanje in pretvorbo hlapnih tiolov pri kvasovkah je temperatura zelo različno vplivala, kar so v poskusih pokazali tudi drugi avtorji (Masneuf-Pomarède in sod., 2006; Swiegers in sod., 2006; Howell in sod., 2004). Prav tako pa so imele posamezne starterske kulture zelo različno sposobnost sproščanja hlapnih tiolov, kar so prav tako pokazali že drugi avtorji (Murat in sod., 2001b; Howell in sod., 2004; Dubourdieu in sod., 2006; Swiegers in sod., 2009), kot tudi mi v prejšnjih delih poskusov.

S starterskima kulturama SK12 in SK13 smo pridelali vina z večjimi vsebnostmi 4MMP, ter povprečnimi vsebnostmi 3MH in 3MHA, ki so bila predvsem visoko ocenjena za senzorične parametre težja tropska aroma (SK12 nižja temperatura pridelave), sveža tropska aroma (SK13 nižja temperatura pridelave) in celokupna kakovost. Ravno nasprotno smo s startersko kulturo SK6 pridelali vina z manjšimi vsebnostmi 4MMP ter povprečnimi vsebnostmi 3MH in 3MHA, ki so bila vseeno visoko ocenjena za težjo (višja temperatura pridelave) in svežo tropsko aromo. Na intenzivnejšo zaznavo aromatičnih spojin v teh vinih je verjetno vplivala večja vsebnost HK v teh vinih, saj smo tudi v vinih SK10 določili manjše vsebnosti 4MMP, vendar večje vsebnosti 3MH in 3MHA, vina pa so bila povprečno ocenjena za posamezne senzorične parametre. Kljub visokim vsebnostim vseh treh hlapnih tiolov v vinih SK11, so bila ta vina povprečno (višje temperature pridelave) ali celo najnižje ocenjena za senzorični lastnosti sveža tropska aroma in celokupna kakovost. Različne vsebnosti hlapnih tiolov v vinih, ki so jih sprostile posamezne starterske kulture, so torej zelo različno vplivale na posamezne senzorične lastnosti vina. Fermentacijska aroma vin je bila v veliki meri povezana s fermentacijsko kinetiko kvasovk. Vina, pridelana s startersko kulturo SK12, ki je izkazala hitrejšo fermentacijsko kinetiko, so bila nižje ocenjena za senzorično lastnost fermentacijska aroma. Počasnejša fermentacijska

kinetika starterske kulture SK6 pa se je odrazila z najvišjimi ocenami za senzorično lastnost fermentacijska aroma v teh vinih.

4.4 POSKUS 4

V poskusu 4 smo izvedli vinifikacije mošta letnika 2010 z uporabo treh starterskih kultur v dveh delovnih volumnih fermentorjev in pri različnih temperaturah AF. Vinifikacije v 2500 L fermentorjih (večji delovni volumen) so potekale pri kontrolirani oz. priporočeni temperaturi za posamezno startersko kulturo (13 °C in 17 °C), ki je bila za večino starterskih kultur višja od temperature kleti ($14,3 \pm 1,3$ °C), pri kateri so potekale vinifikacije v 25 L fermentorjih (manjši delovni volumen) v dveh ponovitvah. V tem delu poskusa smo uporabili tri starterske kulture, ki so bile istočasno uporabljene tudi v poskusu 3 (SK6, SK10 in SK11). Glavni namen tega dela poskusa je bil ugotoviti vpliv izbranih starterskih kultur na vsebnost GSH in aromatičnih spojin pri različnih temperaturah AF in v različnih delovnih volumnih fermentorjev. Z vinifikacijami pri različnih delovnih volumnih smo želeli ugotoviti, ali se lastnosti posameznih starterskih kultur odražajo enako pri obeh delovnih volumnih fermentorjev oz. ali so mikrovinifikacijski fermentacijski poskusi prenosljivi na večja industrijska merila.

V nadaljevanju so predstavljeni in komentirani rezultati osnovnih kemijskih parametrov, vsebnosti HCK, GSH, hlapnih tiolov in MPZ, senzorična analiza pridelanih mladih vin in statistična obdelava podatkov (PCA in LDA).

4.4.1 Osnovni kemijski parametri vina in HCK

Osnovni kemijski parametri mošta v tem delu poskusa so bili enaki kot v poskusu 3. Osnovni kemijski parametri pridelanega vina so predstavljeni v preglednici 28.

Preglednica 28: Vsebnosti reducirajočih sladkorjev (RS), alkohola, skupnih kislin (SK), hlapnih kislin (HK) in pH v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11 pri nižji (25 L) in višji (2500 L) temperaturi AF

Table 28: Contents of reducing sugars (RS), alcohol, total acidity (SK), volatile acidity (HK) and pH in wines after the completion of alcoholic fermentation with starter cultures SK6, SK10 and SK11 at lower (25 L) and higher (2500 L) temperature

Parameter	Starterska kultura/vino		
	SK6	SK10	SK11
Nižja temperatura (25 L)*			
RS (g/L)	1,5	1,5	9,6
Alkohol (vol.%)	10,5	10,3	10,0
SK (g/L)	7,7	7,1	7,1
pH (/)	3,31	3,32	3,33
HK (g/L)	0,90	0,40	0,59
Višja temperatura (2500 L)			
RS (g/L)	1,2	1,8	1,7
Alkohol (vol.%)	9,5	10,2	10,5
SK (g/L)	7,6	7,4	7,2
pH (/)	3,31	3,31	3,37
HK (g/L)	0,68	0,33	0,59

*Vrednosti so podane kot povprečje dveh paralelk

Pridelana vina se v vsebnosti RS niso bistveno razlikovala (1,25-1,80 g/L), z izjemo SK11 v manjših delovnih volumnih, pri katerih smo določili večje vsebnosti (9,55 g/L), kar je verjetno posledica upočasnjene ali zaustavljene AF. Tudi v vsebnosti alkohola se vina med seboj niso bistveno razlikovala (10,03-10,53 vol.%), nekoliko manjšo vsebnost smo določili le v vinu SK6, pridelanem v večjem delovnem volumnu (9,49 vol.%). V vsebnosti SK in pH vrednosti se posamezna vina med seboj niso bistveno razlikovala. Največjo vsebnost HK smo, kot v vseh prejšnjih poskusih, določili v vinih SK6, pridelanih tako v manjših delovnih volumnih fermentorjev (0,90 g/L), ki so za to startersko kulturo predstavljali višjo temperaturo, kot tudi v večjem delovnem volumnu (0,68 g/L) oz. pri nižji temperaturi. V vsebnosti HK med vini SK11, pridelanimi pri različnih temperaturah in delovnih volumnih, ni bilo razlik (0,59 g/L), torej omenjeni fizikalni parametri ne vplivajo na tvorbo hlapnih kislin pri tej starterski kulturi. Najmanjše vsebnosti HK smo določili v vinih SK10, pridelanih pri obeh temperaturah AF in v obeh delovnih volumnih fermentorjev. Vina SK10, pridelana pri nižji temperaturi AF, so imela nekoliko večje vsebnosti HK (0,40 g/L) v primerjavi z vinom SK10, pridelanem pri višji temperaturi (0,33 g/L).

Vsebnosti posameznih in skupnih HCK v vinih so prikazane v preglednici 29.

Preglednica 29: Vsebnosti hidroksicimetnih kislin (HCK) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11 pri nižji (25 L) in višji (2500 L) temperaturi

Table 29: Contents of hydroxycinnamic acids (HCK) in wines after the completion of alcoholic fermentation with starter cultures SK6, SK10 and SK11 at lower (25 L) and higher (2500 L) temperature

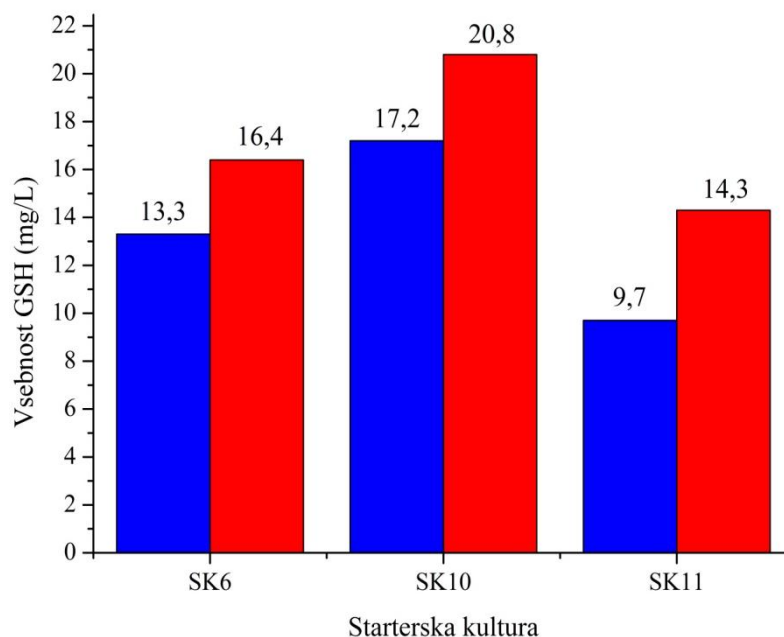
HCK (mg/L)	Starterska kultura/vino		
	SK6	SK10	SK11
Nižja temperatura (25 L)*			
<i>cis</i> -kaftarna kislina	11,7	12,7	12,6
kaftarna kislina	28,5	28,1	29,2
GRP	8,6	8,0	7,9
<i>cis</i> -kutarna kislina	6,6	7,3	6,6
kutarna kislina	1,6	1,6	1,6
<i>cis</i> -fertarna kislina	8,1	8,9	9,2
fertarna kislina	0,9	0,7	0,7
kavna kislina	1,7	1,6	1,2
<i>p</i> -kumarna kislina	0,4	0,5	0,4
ferulna kislina	0,8	0,9	1,2
HCK skupaj	69,0	70,3	70,6
Višja temperatura (2500 L)			
<i>cis</i> -kaftarna kislina	9,5	9,4	8,4
kaftarna kislina	31,6	29,6	27,8
GRP	8,2	8,3	8,3
<i>cis</i> -kutarna kislina	6,6	7,7	4,9
kutarna kislina	1,6	1,6	1,6
<i>cis</i> -fertarna kislina	5,0	6,7	4,7
fertarna kislina	1,0	0,9	1,1
kavna kislina	2,3	2,7	2,7
<i>p</i> -kumarna kislina	0,2	0,4	0,3
ferulna kislina	0,7	0,8	0,8
HCK skupaj	66,6	68,1	60,6

*Vrednosti so podane kot povprečje dveh paralelk

Med vini, pridelanimi pri nižji temperaturi AF in v manjšem delovnem volumnu, v vsebnosti HCK skoraj ni bilo razlik in so bile med 69,0 mg/L (SK6) in 70,6 mg/L (SK11). Nekoliko večje razlike v vsebnosti HCK so se pokazale med vini, pridelanimi pri višji temperaturi AF in v večjem delovnem volumnu – največjo vsebnost smo določili v vinu SK10 (68,1 mg/L), nekoliko manjšo v vinu SK6 (66,6 mg/L), najmanjšo pa v vinu SK11 (60,6 mg/L). Pri nižji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu smo pridelali vina z večjo vsebnostjo HCK.

4.4.2 Vsebnost glutaciona v vinu

Vsebnosti GSH smo v tem delu poskusa določali le v vinih po končani AF in so prikazane na sliki 25.



Slika 25: Vsebnosti glutaciona (GSH) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11 pri nižji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu (modri stolpci – vrednosti so prikazane kot povprečja dveh paralelek) ter višji temperaturi in v večjem delovnem volumnu (rdeči stolpci)

Figure 25: Contents of glutathione (GSH) in wines, after the completion of alcoholic fermentation with starter cultures SK6, SK10 and SK11 at lower temperature and in smaller working volume (blue columns – values are presented as means of two replicates), and at higher temperature and in larger working volume (red columns)

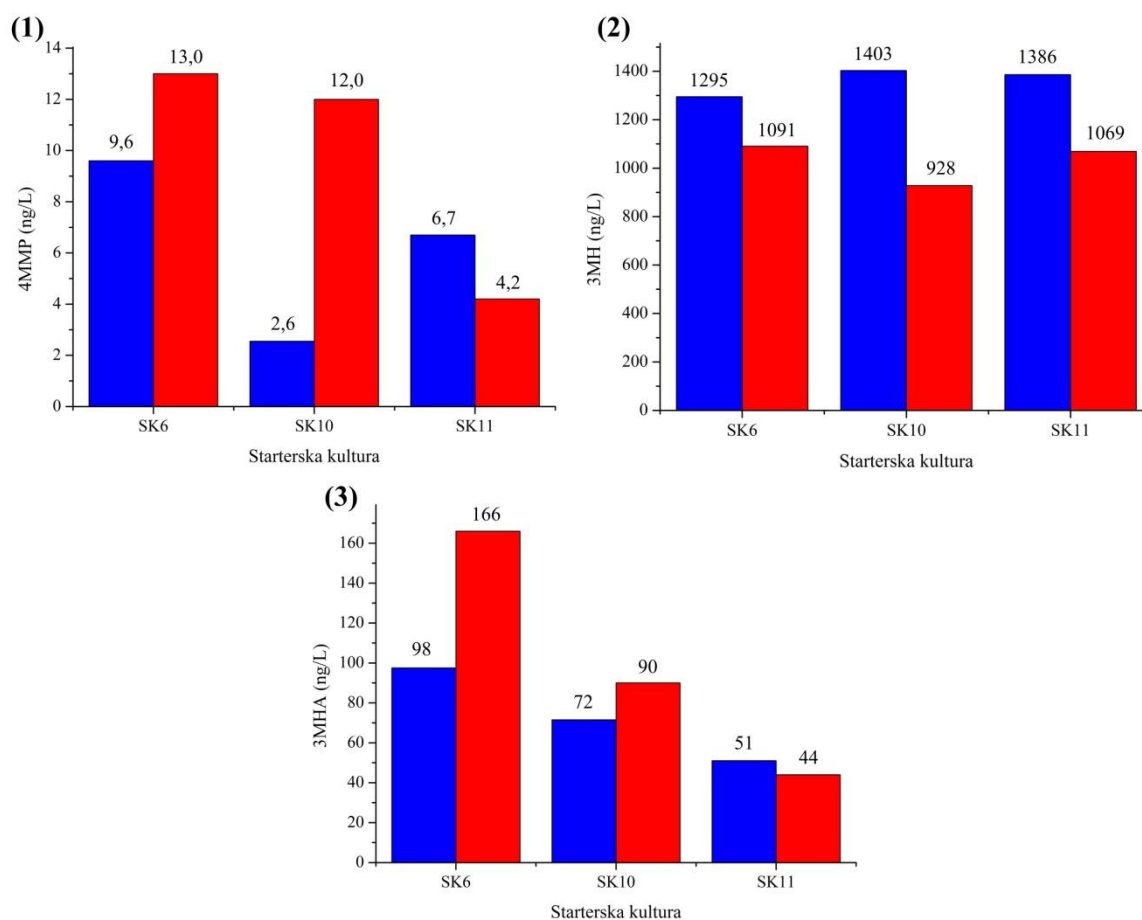
Kot je razvidno iz slike 25, so bile vsebnosti GSH precej odvisne tako od uporabljene starterske kulture kvasovk kot tudi od temperature AF in delovnega volumna fermentorjev. Večje vsebnosti GSH smo določili v vinih, pridelanih v večjih delovnih volumnih in pri višji temperaturi AF, kar je verjetno predvsem posledica manjše izpostavljenosti mošta oz. vina kisiku, zaradi razmerja površina:volumen in s tem manjše oksidacije GSH. Pri obeh temperaturah AF in delovnih volumnih fermentorjev smo največje vsebnosti GSH določili v vinih SK10 (17,2 in 20,8 mg/L), kar potrjuje že v prejšnjem poskusu postavljeno trditev, da lahko mešane kulture kvasovk vrste *T. delbrueckii* s kvasovkami rodu *Saccharomyces* prispevajo k povečanju vsebnosti GSH v pridelanem vinu. S tovrstnimi mešanimi kulturami smo tako v poskusu 2 kot v poskusu 3 pridelali vina z večjimi vsebnostmi GSH. Vinom SK10 so po vsebnosti GSH sledila vina SK6 (13,3 in 16,4 mg/L), najmanjše vsebnosti GSH pa smo določili v vinih SK11 (9,7 in 14,3 mg/L). Ohranjanje koncentracije GSH v vinu je očitno značilnost posamezne starterske kulture, ne glede na delovni volumen fermentorja in temperaturo AF, saj smo v poskusu 3 za te tri starterske kulture določili enak trend v ohranjanju GSH kot v tem delu poskusa – večje vsebnosti GSH smo določili v vinih SK10, ki so jim sledila vina SK6, nižje vsebnosti pa smo določili v vinih SK11.

4.4.3 Vsebnost aromatičnih spojin

Po končani AF smo v pridelanih mladih vinih določili vsebnosti hlapnih tiolov (4MMP, 3MH in 3MHA) in metokspirazinov (IBMP in IPMP).

4.4.3.1 Vsebnost hlapnih tiolov v vinih

Vsebnosti hlapnih tiolov, ki smo jih določili v vinih SK6, SK10 in SK11 po zaključeni AF so prikazane na sliki 26.



Slika 26: Vsebnosti hlapnih tiolov 4-merkpto-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (1), 3-merkptoheksan-1-ola (3MH) (2) in 3-merkptoheksil acetata (3MHA) (3) v vinih, po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11 pri nižji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu (modri stolpci – vrednosti so prikazane kot povprečja dveh paralelek) ter višji temperaturi in v večjem delovnem volumnu (rdeči stolpci)

Figure 26: Contents of volatile thiols 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) (1), 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) (2) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) (3) in wines, after the completion of alcoholic fermentation with starter cultures SK6, SK10 and SK11 at lower temperature and in smaller working volume (blue columns – values are presented as means of two replicates), and at higher temperature and in larger working volume (red columns)

Kot je razvidno iz slike 26, smo v vinih določili zelo različne koncentracije vseh treh hlapnih tiolov. V vinih SK6, pridelanih pri obeh temperaturah in delovnih volumnih, smo določili največje vsebnosti 4MMP (9,6 in 13,0 ng/L). Starterska kultura SK6 je sprostila večje koncentracije 4MMP pri nižji temperaturi in v večjem delovnem volumnu (13 ng/L), kot pri višji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu (9,6 ng/L). Ker pri tej starterski kulturi med višjo in nižjo temperaturo ni bilo večjih razlik, so različne vsebnosti 4MMP v vinih verjetno posledica delovnega volumna, torej manjše oksidacije (razmerje površina:volumen) v večjih delovnih volumnih, pri čemer se je ohranilo več 4MMP. Starterska kultura SK10 je pri višji temperaturi in v večjem delovnem volumnu sprostila veliko večje koncentracije 4MMP (12 ng/L) kot pri nižji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu (2,6 ng/L). Ta starterska kultura je tudi v poskusu 3 sprostila večje koncentracije 4MMP pri višjih kot pri nižjih temperaturah AF. Starterska kultura SK11 pa je ravno nasprotno pri nižjih temperaturah in v manjšem delovnem volumnu sprostila večje koncentracije 4MMP (6,7 ng/L), kot pri višji temperaturi in v večjem delovnem volumnu (4,2 ng/L).

Vsebnost 3MH v vinih je bila bolj kot s startersko kulturo povezana s temperaturo AF (oz. delovnim volumnom) – v vinih, pridelanih v manjšem delovnem volumnu (in pri nižji temperaturi) smo določili značilno večje vsebnosti 3MH kot v vinih, pridelanih v večjem delovnem volumnu (in pri višji temperaturi). Vina so si bila v vsebnosti 3MH pri posameznih delovnih volumnih (oz. temperaturi AF) zelo podobna. V vinih, pridelanih v manjšem delovnem volumnu, smo določili vsebnosti 3MH med 1295,0 ng/L (SK6) in 1403,0 ng/L (SK10), v vinih pridelanih v večjem delovnem volumnu pa med 928,0 ng/L (SK10) in 1091,0 ng/L (SK6).

Starterska kultura SK6 je sprostila največje koncentracije 3MHA pri obeh temperaturah (oz. delovnih volumnih) AF v primerjavi z ostalimi starterskimi kulturami. Prav tako je starterska kultura SK6 sprostila precej večje vsebnosti 3MHA pri nižji temperaturi in v večjem delovnem volumnu (97,5 ng/L), kot pri višji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu (166 ng/L). Starterska kultura SK6 je tudi v poskusu 3 sprostila nekoliko več 3MHA pri nižji temperaturi AF. Po vsebnosti 3MHA so vinom SK6 sledila vina SK10. Starterska kultura SK10 je sprostila večje vsebnosti 3MHA pri višji temperaturi in v večjem delovnem volumnu (90 ng/L) kot pri nižji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu (71,5 ng/L). Najmanjše vsebnosti 3MHA smo določili v vinih SK11 (51 in 44 ng/L) ne glede na temperaturo AF in delovni volumen fermentorjev. Pri nižji temperaturi AF je ta starterska kultura sprostila nekoliko več 3MHA kot pri višji temperaturi AF, kar se je za to startersko kulturo pokazalo tudi v poskusu 3. Za izračun pretvorbe 3MH v 3MHA pri posameznih starterskih kulturah, smo koncentracijo 3MHA delili s koncentracijo 3MH (Swiegers in sod., 2009). Stopnja pretvorbe 3MH v 3MHA je bila pri starterskih kulturah SK6 in SK10 večja pri nižji temperaturi in v večjem delovnem volumnu fermentorjev, pri SK11 pa je bila enaka v obeh temperaturah AF in delovnih volumnih fermentorjev. Pri obeh temperaturah in

delovnih volumnih fermentorjev je imela največjo stopnjo pretvorbe 3MH v 3MHA starterska kultura SK6 (7 in 15 %), ki ji je sledila starterska kultura SK10 (5 in 10 %), najmanjšo stopnjo pretvorbe pa je imela starterska kultura SK11 (4 %).

4.4.3.2 Vsebnosti metokspirazinov v vinih

Vsebnosti metokspirazinov IBMP in IPMP v pridelanih vinih po zaključeni AF, so prikazane v preglednici 30.

Preglednica 30: Vsebnosti metokspirazinov (IBMP, IPMP) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11 pri nižji (25 L) in višji (2500 L) temperaturi

Table 30: Contents of methoxypyrazines (IBMP, IPMP) in wines after the completion of alcoholic fermentation with starter cultures SK6, SK10 and SK11 at lower (25 L) and higher (2500 L) temperature

Metokspirazin (ng/L)	Starterska kultura/vino		
	SK6	SK10	SK11
	Nižja temperatura (25 L)*		
IBMP	2,90	3,15	3,07
IPMP	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	Višja temperatura (2500 L)		
IBMP	2,35	2,46	2,43
IPMP	<LOQ	<LOQ	<LOQ

*Vrednosti so podane kot povprečje dveh paralelk; <LOQ – pod mejo določitve (1,6 ng/L)

Kot je razvidno iz preglednice 30, so se pridelana vina v vsebnosti metokspirazinov le malenkost razlikovala. Pri nižji temperaturi AF in v manjšem delovnem volumnu smo pridelali vina z nekoliko večjimi vsebnostmi (2,90-3,15 ng/L) metokspirazina IBMP kot pri višji temperaturi AF in v večjem delovnem volumnu (2,35-2,46 ng/L), kar je mogoče posledica počasnejšega samočiščenja mladega vina po zaključeni AF v manjšem delovnem volumnu. Vseeno pa so bile razlike v vsebnosti IBMP zelo majhne in iz tehnološkega stališča nepomembne. Če upoštevamo prag zaznave, ki so ga določili za vina sauvignon (8 ng/L; Allen in sod., 1991), smo v vseh vinih določili IBMP pod pragom zaznave. Vsebnost metokspirazina IPMP je bila v vseh vinih pod vrednostjo LOQ (1,6 ng/L).

4.4.4 Senzorična analiza

Dva meseca po končani AF je bila opravljena senzorična analiza pridelanih mladih vin (skupaj z vini iz poskusa 3) s panelom sedmih izkušenih pokaševalcev, ki so posameznim vinom dodelili od 1 (najmanj) do 5 (največ) točk glede na intenzivnost posamezne senzorične lastnosti. Rezultati so kot povprečja točk vseh sedmih pokaševalcev prikazani v preglednici 31.

Preglednica 31: Povprečja točk posameznih senzoričnih lastnosti za vina SK6, SK10 in SK11, pridelana pri nižji (25 L) in višji (2500 L) temperaturi alkoholne fermentacije

Table 31: Average number of points of each sensory property for wines SK6, SK10 in SK11, produced at lower (25 L) and higher (2500 L) temperature of alcoholic fermentation

Vina – točkovanje (1-5) (n=7)			
Senzorična lastnost	SK6	SK10	SK11
Nižja temperatura (25 L)			
Težja tropska aroma	3,3±0,6 ^{b*}	3,1±0,7 ^b	2,3±0,5 ^a
Sveža tropska aroma	3,1±0,5 ^b	2,9±0,7 ^{ab}	2,3±0,8 ^a
Fermentacijska aroma	2,6±0,8 ^a	2,9±0,5 ^a	3,2±0,6 ^a
Zelena aroma	2,4±0,7 ^a	2,1±1,1 ^a	1,9±0,8 ^a
Celokupna kakovost	3,3±0,5 ^a	3,1±0,7 ^a	2,6±0,5 ^a
Višja temperatura (2500 L)			
Težja tropska aroma	2,5±0,8 ^a	3,1±1,1 ^a	2,7±0,6 ^a
Sveža tropska aroma	2,9±0,5 ^a	2,8±0,8 ^a	2,6±0,7 ^a
Fermentacijska aroma	2,7±0,6 ^a	3,1±0,6 ^a	3,0±0,7 ^a
Zelena aroma	2,3±0,6 ^a	2,3±1,0 ^a	2,1±0,9 ^a
Celokupna kakovost	2,9±0,9 ^a	3,1±0,7 ^a	3,1±0,4 ^a

* $\bar{x} \pm SO$ (povprečja točk sedmih pokuševalcev \pm standardni odklon); a, b – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$)

Kot je razvidno iz preglednice 31, smo statistično značilne razlike v senzoričnih lastnostih med vini določili le v vinifikacijah pri nižji temperaturi (25 L), in sicer le v težji in sveži tropski aromi. Vina SK6 in SK10 so bila statistično značilno višje ocenjena za senzorično lastnost težja tropska aroma, za senzorično lastnost sveža tropska aroma pa so bila statistično značilno višje ocenjena le vina SK6. Med vini, pridelanimi pri nižji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu, so bila vina SK6 najvišje ocenjena za vse senzorične lastnosti (razen za fermentacijsko aromo). Višje ocene vina SK6 so lahko posledica visokih vsebnosti vseh treh hlapnih tiolov v teh vinih, predvsem 4MMP in 3MHA. Vina SK10, pridelana pri teh pogojih, so bila povprečno ocenjena za posamezne senzorične lastnosti. Vina SK11, pridelana pri teh pogojih, so bila najvišje ocenjena za senzorično lastnost fermentacijska aroma, ter najslabše za vse ostale senzorične lastnosti, kar je lahko posledica nizkih vsebnosti 3MHA v teh vinih.

Ravno nasprotno je bilo med vini, pridelanimi pri višji temperaturi in v večjem delovnem volumnu, vino SK10 najvišje ocenjeno za težjo tropsko in fermentacijsko aromo ter je bilo, skupaj z vinom SK11, najvišje ocenjeno za celokupno kakovost. Vino SK6, pridelano v teh pogojih, je bilo najvišje ocenjeno za svežo tropsko in zeleno aromo, vendar najnižje za težjo tropsko in fermentacijsko aromo in je bilo tudi nižje ocenjeno za celokupno kakovost. Vino SK11 pa je bilo, kljub povprečno ocenjenim senzoričnim lastnostim, in tudi najnižji oceni za svežo tropsko in zeleno aromo, skupaj z vinom SK10 najvišje ocenjeno za celokupno kakovost.

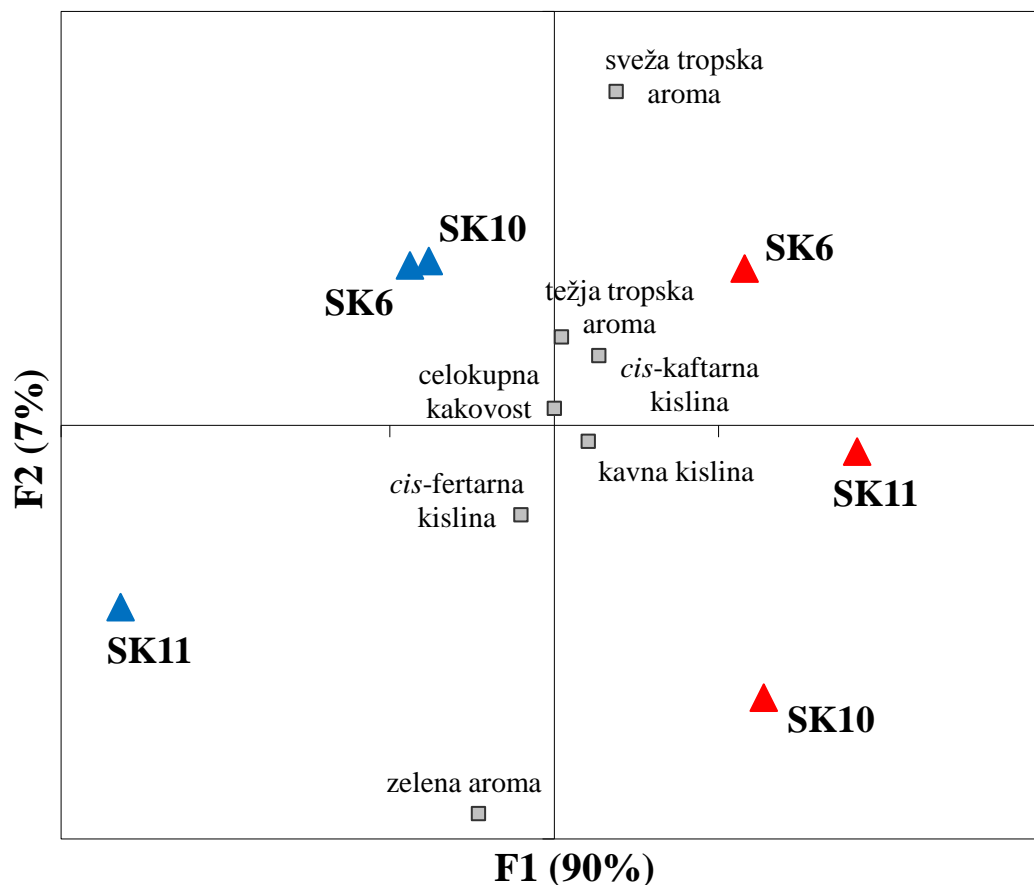
Vina SK6, pridelana pri višji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu, so bila za večino senzoričnih lastnosti (razen za fermentacijsko aromo) višje ocenjena kot vino

SK6, pridelano pri nižji temperaturi in v večjem delovnem volumnu. Vina SK10, pridelana pri nižji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu, so bila višje ocenjena za senzorično lastnost sveža tropska aroma ter nižje za senzorični lastnosti fermentacijska in zelena aroma, kot vino SK10, pridelano pri višji temperaturi in v večjem delovnem volumnu. Vina SK11, pridelana pri nižji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu, so bila višje ocenjena le za senzorično lastnost fermentacijska aroma, za vse ostale pa nižje kot vino SK11, pridelano pri višji temperaturi in v večjem delovnem volumnu.

Z uporabo multiple regresije nismo našli statistično značilne povezave med vsebnostjo hlapnih tiolov in številom dodeljenih točk za posamezne senzorične lastnosti ($p \geq 0,05$).

4.4.5 PCA in LDA poskusa 4

Z metodama PCA in LDA smo razvrstili pridelana mlada vina v skupine, glede na uporabljeno startersko kulturo in temperaturo AF. Pri analizi PCA smo izmed vključenih 26 parametrov določili šest najbolj determinirajočih, in sicer *cis*-kaftartno, *cis*-fertarno in kavno kislino ter senzorične lastnosti težjo in svežo tropsko aromo, zeleno aromo in celokupno kakovost. Skupaj so razložile 95,1 % skupne variabilnosti med proučevanimi vzorci (32,6 %; 23,4 %; 17,1 %; 10,4 %; 7,4 %; 4,2 %). Izbrane podatke (devet vzorcev (trije vzorci v eni ponovitvi in trije vzorci v dveh ponovitvah) in sedem lastnosti) smo vnesli v LDA, katere rezultati so prikazani na sliki 27, v prilogah J in K pa so podani osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih in senzoričnih analiz ter korelacijski koeficienti med njimi.



Slika 27: Projekcija podatkov poskusa 4, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama (LDA); ▲ – višja temperatura alkoholne fermentacije, ▲ – nižja temperatura alkoholne fermentacije

Figure 27: Data projection of the experiment 4, in the plane defined by the first two discriminant functions (LDA); ▲ – higher fermentation temperature, ▲ – lower fermentation temperature

Pri analizi LDA na izbranih podatkih smo pridobili pet diskriminantnih funkcij, od katerih funkcija 1 pojasnjuje 90,1 % skupne variance, funkcija 2 pa 6,6 %, kot je razvidno iz slike 27. Ostale funkcije skupaj pojasnjujejo le 3,3 % skupne variance. Jasno lahko razlikujemo spremenljivki, katerih pravokotna projekcija na prvo diskriminantno funkcijo je največja. Ta skupina vključuje svežo tropsko aromo na eni in zeleno aromo na nasprotni strani. Lastnosti, ki ležijo blizu druga drugi, so v visoki pozitivni korelaciji, kot so to celokupna kakovost in kavna kislina ter težka tropska aroma in *cis*-kaftarna kislina. Na sliki 27 lahko vidimo tudi tri ločene skupine vin, pridelanih z različnimi starterskimi kulturami. Prva skupina leži v levem zgornjem kvadrantu in vključuje vina, pridelana s starterskima kulturama SK6 in SK10 pri nižji temperaturi AF, ki ležita zelo blizu druga drugi. Ta skupina se razlikuje od druge skupine v levem spodnjem kvadrantu, ki vključuje vina, pridelana pri nižji temperaturi AF s startersko kulturo SK11, ter od tretje skupine, ki leži na desni strani slike in vključuje vina, pridelana pri višji temperaturi AF s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11.

4.4.6 Razprava poskusa 4

Pridelana vina v tem delu poskusa so se v nekaterih kemijskih in senzoričnih parametrih bistveno razlikovala v odvisnosti od starterske kulture, temperature AF in delovnega volumna fermentorjev, v nekaterih pa so si bila bolj primerljiva. Večje vsebnosti RS v vinih SK11, pridelanih pri nižji temperaturi oz. v manjšem delovnem volumnu, so verjetno posledica upočasnjene oz. zaustavljene AF zaradi prenizkih temperatur AF za to startersko kulturo, ki ima deklarirano večjo občutljivost na nizke temperature (Anchor Exotics SPH-Product Data Sheet, 2013). Kot predvideno, glede na rezultate poskusa 1 in 2, je starterska kultura SK6 tvorila značilno največje vsebnosti HK, ne glede na temperaturo AF in delovni volumen fermentorja. Starterska kultura SK6 je tvorila večje vsebnosti HK pri višji kot pri nižji temperaturi AF, kar smo za to startersko kulturo potrdili tudi v poskusu 3. Trend tvorbe HK pri preiskovanih treh starterskih kulturah je bil enak kot v poskusu 3 – največ HK je tvorila starterska kultura SK6, najmanj pa SK10. Vsebnost HCK v vinih je bila bolj kot od uporabljene starterske kulture odvisna od delovnega volumna oz. temperature AF. Večje vsebnosti HCK smo določili v vinih, pridelanih pri nižji temperaturi oz. v manjšem delovnem volumnu, kar bi lahko bila posledica počasnejšega usedanja trdnih delcev v manjšem delovnem volumnu v primerjavi z večjim delovnim volumnom, kljub nižji temperaturi (večji vpliv delovnega volumna kot temperature). Starterske kulture kvasovk niso pomembno vplivale na vsebnost HCK v vinih, pridelanih pri posameznih temperaturah in delovnih volumnih fermentorjev.

Vsebnost GSH je bila večja v vinih, pridelanih pri višjih temperaturah AF in v večjem delovnem volumnu, ne glede na uporabljeno startersko kulturo kvasovk. Največje vsebnosti GSH smo določili v vinih SK10, ne glede na temperaturo AF in delovni volumen fermentorjev. Večjo sposobnost sproščanja oz. ohranjanja GSH smo za mešane kulture kvasovk rodov *Saccharomyces* in *T. delbrueckii* potrdili tudi v poskusih 2 in 3. V vinih SK11 pa smo ravno tako pri obeh temperaturah AF in delovnih volumnih fermentorjev določili najmanjše vsebnosti GSH. Tudi za to startersko kulturo smo že v poskusu 3 potrdili večjo porabo oz. manjše sproščanje GSH med AF ter posledično manjše vsebnosti GSH v vinu.

Pridelana vina so se bistveno razlikovala tudi po vsebnosti hlapnih tiolov in posledično v senzorični kakovosti. Različne starterske kulture niso imele bistvenega vpliva na vsebnost 3MH v vinu, saj med vini, pridelanimi pri enakih temperaturah in delovnih volumnih, skoraj ni bilo razlik v vsebnosti 3MH. Pomembnejši vpliv na vsebnost 3MH v vinu sta imela temperatura AF in delovni volumen fermentorjev, saj so vse starterske kulture sprostile večje koncentracije 3MH pri nižji temperaturi AF in v manjšem delovnem volumnu. Največje vsebnosti 4MMP in 3MHA smo pri obeh temperaturah AF in delovnih volumnih določili v vinih SK6, ki so bila posledično višje ocenjena za senzorične lastnosti težja in sveža tropska aroma ter celokupna kakovost, vendar le tista,

ki so bila pridelana pri višji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu. Vino SK6, pridelano pri nižji temperaturi in v večjem delovnem volumnu je bilo najvišje ocenjeno le za senzorično lastnost sveža tropska aroma, za senzorični lastnosti težja tropska aroma in celokupna kakovost pa je bilo ocenjeno najnižje, kljub večjim vsebnostim vseh treh hlapnih tiolov. Temperatura AF in delovni volumen fermentorja sta pomembno vplivala na sproščanje 4MMP pri starterski kulturi SK10, ki je pri nižji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu sprostita najnižje koncentracije 4MMP, pri višji temperaturi in in v večjem delovnem volumnu pa najvišje. Večje vsebnosti 4MMP v vinu SK10, pridelanem pri višji temperaturi in v večjem delovnem volumnu, so se odrazile z višjimi ocenami za senzorični lastnosti težja tropska aroma in celokupna kakovost. Starterska kultura SK11 je pri obeh temperaturah AF in delovnih volumnih sprostita najmanjše koncentracije 4MMP in 3MHA. Vina SK11 so bila posledično nižje ocenjena za vse senzorične lastnosti, z izjemo celokupne kakovosti v vinu, pridelanem pri višji temperaturi in v večjem delovnem volumnu, ki je bilo (skupaj z vinom SK10) ocenjeno najvišje. Kot smo potrdili že v poskusu 1 in 2, tudi v tem poskusu starterske kulture kvasovk niso vplivale na vsebnost metoksipirazinov v pridelanih vinih. Tudi temperatura AF in delovni volumen fermentorja na njihovo vsebnost nista imeli bistvenega vpliva. Kljub temu, da med vini ni bilo pomembnih razlik v vsebnosti metoksipirazinov, so se vina značilno razlikovala v senzorični lastnosti zelena aroma. Za zeleno aromo so bila najvišje ocenjena vina SK6, najnižje pa vina SK11, ne glede na temperaturo AF in delovni volumen fermentorja.

4.5 POSKUS 5

V poskusu 5 smo izvedli vinifikacije mošta letnika 2011 z dvema starterskima kulturama, ki sta se v prejšnjih poskusih izkazali kot najbolj primerni za AF mošta sauvignon. Od teh je bila ena mešana starterska kultura kvasovk rodu *Saccharomyces* (SK6), druga pa mešana starterska kultura kvasovk rodov *Saccharomyces* in *ne-Saccharomyces* (SK10). Obe mešani starterski kulturi sta bili v tem delu poskusa inokulirali zaporedno (najprej en sev kvasovk in po sedmih dneh AF še drugi). Vinifikacije so potekale pri nižji oz. kontrolirani in višji oz. kletni temperaturi. Nižja oz. kontrolirana temperatura je v tem delu poskusa predstavljala temperaturo, ki smo jo spreminjali v različnih fazah AF – prve štiri dni AF temperature nismo kontrolirali, in je bila torej enaka temperaturi kleti oz. višji temperaturi; z namenom skrajšanja faze prilagajanja kvasovk in hitrejšega začetka AF. Po štirih dneh AF smo temperaturo znižali na 15 °C, kar lahko v tej fazi rasti kvasovk povzroči temperaturni stres (Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Proti koncu AF (23. dan) smo izklopili hlajenje kontroliranih vinifikacij ter nadaljevali AF pri temperaturi kleti (višji temperaturi). Temperatura kleti v času vinifikacij je bila $21,1 \pm 2,8$ °C. Glavni namen tega dela

poskusa je bil ugotoviti vpliv temperature AF in izbranih starterskih kultur kvasovk na vsebnost GSH in hlapnih tiolov ter na senzorično kakovost vina.

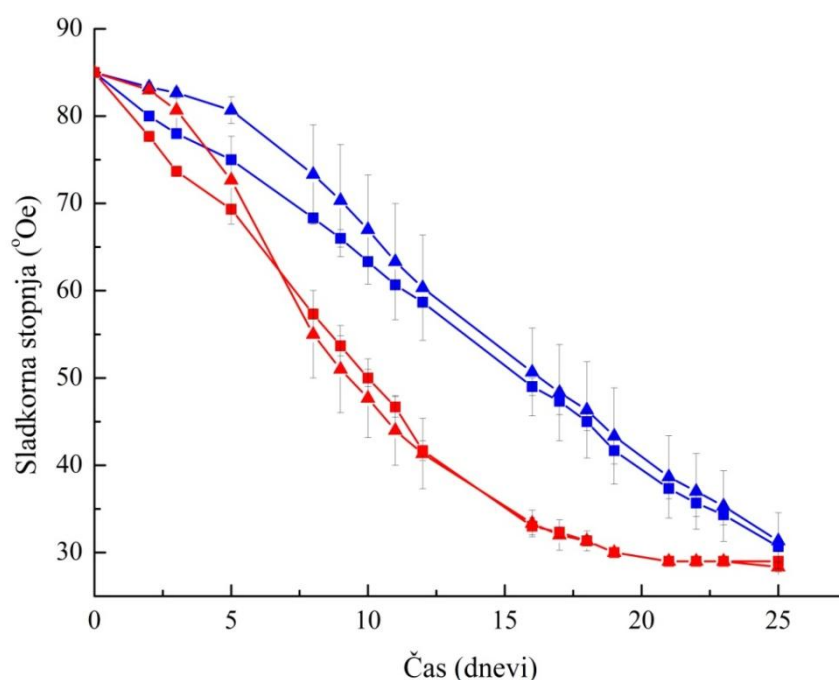
V nadaljevanju so predstavljeni in komentirani rezultati osnovnih kemijskih parametrov, fermentacijske kinetike, vsebnosti FAN, HCK, GSH, hlapnih tiolov, senzorične analize pridelanih mladih vin in statistične obdelave podatkov (PCA in LDA).

4.5.1 Osnovni kemijski parametri mošta

Osnovni kemijski parametri mošta so bili: sladkorna stopnja 85 °Oe ($\approx 195,3$ g/L RS), pH 3,23, skupne kisline (SK) 6,5 g/L, hlapne kisline (HK) 0,18 g/L in prosti aminokislinski dušik (FAN) 115 mg N/L.

4.5.2 Fermentacijska kinetika

Fermentacijsko kinetiko smo določili z merjenjem sladkorne stopnje v °Oe med AF. Rezultati so prikazani na sliki 28. Kot je razvidno, se je fermentacijska kinetika vinifikacij bistveno razlikovala v odvisnosti od temperature AF.



Slika 28: Sladkorna stopnja mošta (°Oe) med alkoholno fermentacijo s starterskima kulturama SK6 (■) in SK10 (▲) pri nižji oz. kontrolirani (modra barva) in višji oz. kletni (rdeča barva) temperaturi alkoholne fermentacije

Figure 28: Sugar levels of must (°Oe) during alcoholic fermentation with starter cultures SK6 (■) and SK10 (▲) at lower or controlled (blue color) and at higher or cellar (red color) temperature of alcoholic fermentation

Prve tri dni AF je imel sev kvasovk vrste *T. delbrueckii* (SK10) statistično značilno počasnejšo fermentacijsko kinetiko kot sev kvasovk VIN7 (SK6), pri katerem smo določili tudi statistično značilne razlike med »paralelkami« (prve štiri dni je bila temperatura AF v vseh fermentorjih enaka). Peti dan AF, torej en dan po znižanju temperature pri fermentorjih s kontrolirano temperaturo, je bila fermentacijska kinetika seva kvasovk vrste *T. delbrueckii* (SK10) pri višji temperaturi veliko hitrejša kot pri nižji temperaturi in je bila podobna fermentacijski kinetiki seva kvasovk VIN7 (SK6), ki je imel pri višji temperaturi AF statistično značilno hitrejšo fermentacijsko kinetiko kot pri nižji. Pri nižji temperaturi AF pa je imel sev kvasovk vrste *T. delbrueckii* (SK10) statistično značilno najpočasnejšo fermentacijsko kinetiko. Osmi dan AF oz. en dan po inokulaciji drugega seva kvasovk starterskih kultur (QA23 pri SK6 in *S. cerevisiae* pri SK10) sta imeli obe starterski kulturi pri višji temperaturi AF statistično značilno hitrejšo fermentacijsko kinetiko kot pri nižji temperaturi AF. Med starterskima kulturama v vinifikacijah pri enaki temperaturi AF ni bilo statistično značilnih razlik v količini sproščenega CO₂, torej sta imeli enako fermentacijsko kinetiko pri posamezni temperaturi AF. Takšna fermentacijska kinetika je ostala skoraj do konca AF oz. do 24. dne AF, ko v fermentacijski kinetiki med fermentorji ni bilo več statistično značilnih razlik. Vinifikacije pri višji (kletni) temperaturi so se zaključile po 25 dneh AF, medtem ko smo vinifikacije pri nižji temperaturi, zaradi še vedno velike vsebnosti RS v vinih, pustili potekati še en teden. Med starterskima kulturama SK6 in SK10 v vinifikacijah pri enaki temperaturi v fermentacijski kinetiki ni bilo statistično značilnih razlik, razen v začetni fazi AF.

4.5.3 Osnovni kemijski parametri, FAN in HCK v vinih

Po zaključeni AF smo v pridelanih mladih vinih določili osnovne kemijske parametre in vsebnost FAN. Rezultati so prikazani v preglednici 32.

Preglednica 32: Vsebnosti reducirajočih sladkorjev (RS), alkohola, skupnih kislin (SK), hlapnih kislin (HK), pH in FAN v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskima kulturama SK6 in SK10 pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi AF

Table 32: Contents of reducing sugars (RS), alcohol, total acidity (SK), volatile acidity (HK), pH and FAN in wines after the completion of alcoholic fermentation with starter cultures SK6 and SK10 at lower (controled) and higher (cellar) temperature

Parameter	Starterska kultura/vino			
	SK6		SK10	
	Nižja temp.	Višja temp.	Nižja temp.	Višja temp.
RS (g/L)	2,6±0,4 ^{*a}	3,7±0,4 ^a	2,8±1,0 ^a	3,2±0,7 ^a
Alkohol (vol.%)	12,1±0,0 ^b	12,0±0,0 ^a	12,1±0,0 ^b	12,1±0,1 ^b
SK (g/L)	6,3±0,1 ^a	6,2±0,1 ^a	6,1±0,8 ^a	6,5±0,3 ^a
HK (g/L)	1,09±0,02 ^c	1,00±0,02 ^b	0,53±0,02 ^a	0,52±0,02 ^a
pH	3,42±0,01 ^b	3,39±0,01 ^b	3,36±0,05 ^{ab}	3,32±0,03 ^a
FAN (mg N/L)	53,3±2,6 ^b	51,0±2,0 ^b	28,5±5,0 ^a	26,8±1,3 ^a

* x ± SO (povprečje treh ponovitev ± standardni odklon); a, b, c – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$)

Kot je razvidno iz preglednice 32, se vina niso statistično značilno razlikovala v vsebnosti RS, ki je bila med 2,6 in 3,7 g/L, in vsebnosti SK, ki je bila med 6,1 in 6,5 g/L. Vsebnost alkohola je bila statistično značilno manjša le v vinih SK6, pridelanih pri višji temperaturi. Vrednost pH so bile statistično značilno višje v vinih SK6 pri obeh temperaturah AF. Vsebnosti HK so bile statistično značilno večje v vinih SK6, pridelanih pri obeh temperaturah AF (1,09 in 1,00 g/L), in sicer kar dvakrat večje kot v vinih SK10 (0,53 in 0,52 g/L). Pri nižji temperaturi AF je ta starterska kultura tvorila statistično značilno večje koncentracije HK kot pri višji temperaturi, kar je lahko posledica stresa zaradi hitre spremembe temperature v prvih dneh AF. Tvorba veliko večjih količin HK je glede na vse predhodne poskuse tudi značilna za to startersko kulturo. Pri starterski kulturi SK10 temperatura AF ni vplivala na tvorbo HK. V vinih SK6 smo določili statistično značilno večje vsebnosti FAN (53,3 in 51,0 mg N/L) kot v vinih SK10 (28,5 in 26,8 mg N/L), ne glede na temperaturo AF. Starterska kultura SK6 je med AF torej porabila 61,7 in 64,0 mg N/L, starterska kultura SK10 pa 86,5 in 88,2 mg N/L. S tem smo potrdili rezultate poskusa 3.

Vsebnosti HCK v vinih po končani AF so prikazane v preglednici 33.

Preglednica 33: Vsebnosti hidroksicimetnih kislin (HCK) v vinih po končani alkoholni fermentaciji s starterskima kulturama SK6 in SK10 pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi AF

Table 33: Contents of hydroxycinnamic acids (HCK) in wines after the completion of alcoholic fermentation with starter cultures SK6 and SK10 at lower (controled) and higher (cellar) temperature

HCK (mg/L)	Starterska kultura/vino			
	SK6		SK10	
	Nižja temp.	Višja temp.	Nižja temp.	Višja temp.
<i>cis</i> -kaftarna kislina	2,8 ± 0,2 ^{*b}	2,3 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,3 ^{ab}	2,4 ± 0,1 ^{ab}
kaftarna kislina	6,7 ± 0,4 ^a	11,5 ± 0,8 ^b	7,9 ± 1,6 ^a	14,9 ± 2,7 ^c
GRP	10,5 ± 0,9 ^a	26,4 ± 0,8 ^b	11,4 ± 2,0 ^a	24,8 ± 3,4 ^b
<i>cis</i> -kutarna kislina	10,9 ± 0,4 ^c	8,0 ± 1,6 ^{ab}	9,3 ± 0,4 ^{bc}	6,6 ± 1,2 ^a
kutarna kislina	3,3 ± 0,2 ^b	1,5 ± 0,0 ^a	4,1 ± 0,9 ^b	1,8 ± 0,7 ^a
<i>cis</i> -fertarna kislina	1,1 ± 0,0 ^b	0,2 ± 0,0 ^a	0,8 ± 0,3 ^b	0,3 ± 0,3 ^a
fertarna kislina	2,3 ± 0,0 ^c	1,1 ± 0,0 ^a	2,1 ± 0,0 ^b	1,1 ± 0,0 ^a
kavna kislina	14,9 ± 0,1 ^a	17,7 ± 0,3 ^b	14,3 ± 1,8 ^a	16,8 ± 1,9 ^{ab}
<i>p</i> -kumarna kislina	9,9 ± 0,4 ^{ab}	13,9 ± 0,5 ^b	5,4 ± 0,2 ^a	8,3 ± 5,1 ^a
ferulna kislina	0,8 ± 0,0 ^a	0,6 ± 0,0 ^a	2,3 ± 2,7 ^a	0,3 ± 0,1 ^a
HCK skupaj	63,2 ± 2,4 ^a	83,0 ± 1,7 ^b	60,0 ± 3,9 ^a	77,3 ± 5,2 ^b

* $\bar{x} \pm SO$ (povprečje treh ponovitev \pm standardni odklon); a, b, c – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$)

Kot je razvidno iz preglednice 33, so se vina statistično značilno razlikovala v vsebnosti skoraj vseh (razen ferulne kisline) HCK. V vinih, pridelanih pri višji temperaturi, smo določili statistično značilno večje vsebnosti vseh HCK (83,0 mg/L (SK6) in 77,3 mg/L (SK10)) kot v vinih, pridelanih pri nižji temperaturi (63,2 mg/L (SK6) in 60,0 mg/L (SK10)), predvsem na račun statistično značilno manjših vsebnosti kaftarne in kavne kisline ter GRP v teh vinih. Majhne vsebnosti HCK v vinih, pridelanih pri nižji

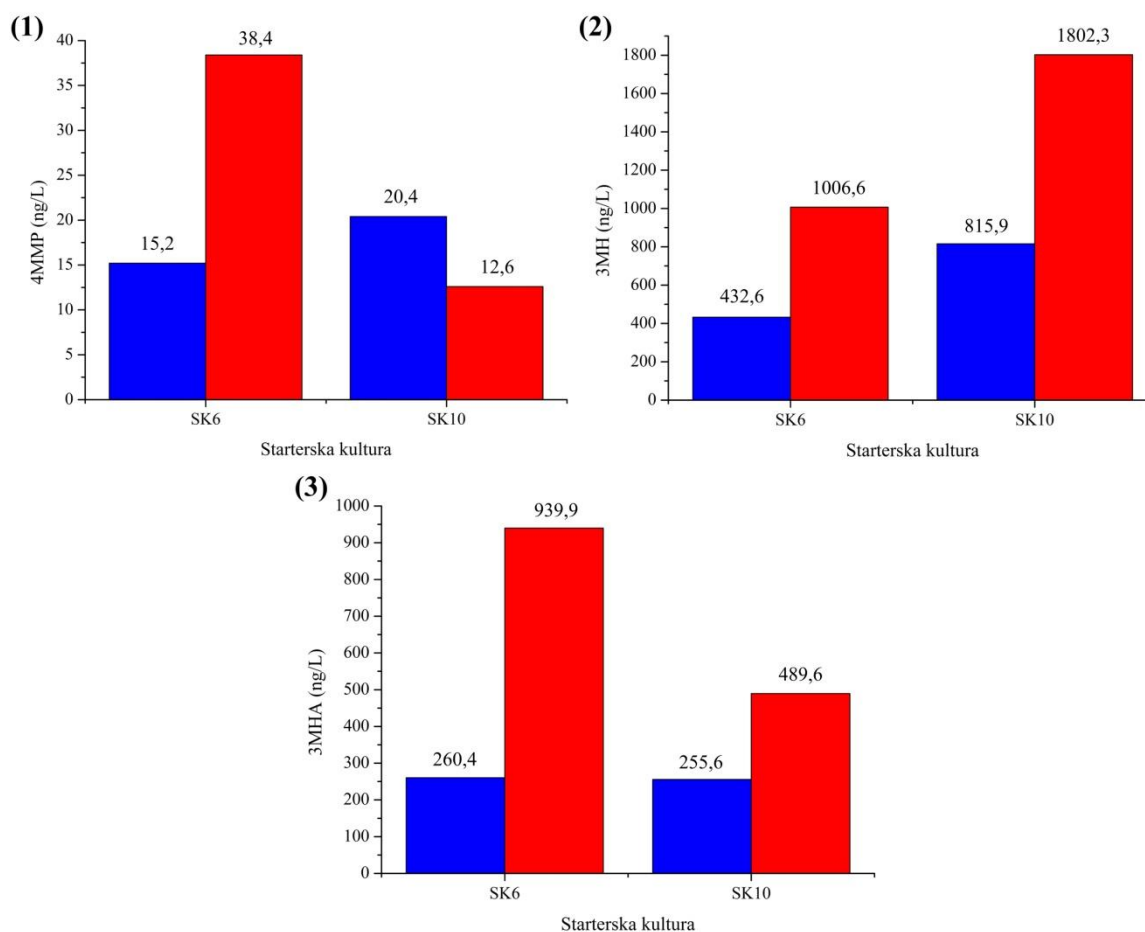
temperaturi, so lahko posledica počasne fermentacijske kinetike v zaključni fazi AF in s tem oksidacije HCK.

4.5.4 Vsebnost glutaciona v vinu

Vsebnost GSH v vinih po končani AF je bila bolj odvisna od temperature AF in njenega trajanja, kot od uporabljene starterske kulture. Vina, pridelana pri nižji temperaturi AF, so imela statistično značilno manjše vsebnosti GSH ($<0,2$ mg/L (SK6) in $1,5\pm 0,8$ mg/L (SK10) kot vina, pridelana pri višji temperaturi ($7,3\pm 1,5$ mg/L (SK6) in $8,0\pm 1,6$ mg/L (SK10)). Majhne vsebnosti GSH v vinih, pridelanih pri nižji temperaturi, so verjetno posledica dolgotrajnejše AF pri tej temperaturi in posledično oksidacija GSH predvsem v zaključni fazi AF. Pri obeh temperaturah AF pa smo določili večje vsebnosti GSH v vinih SK10, kar potrjuje v prejšnjih delih poskusa postavljeno trditev, da lahko mešane kulture kvasovk vrst *T. delbrueckii* in *S. cerevisiae* pozitivno vplivajo na vsebnost GSH v pridelanem vinu.

4.5.5 Vsebnosti hlapnih tiolov v vinih

Po končani AF smo v združenih paralelkah vin, pridelanih s posameznimi starterskimi kulturami pri različnih temperaturah AF, določali vsebnost hlapnih tiolov 4MMP, 3MH in 3MHA. Rezultati so predstavljeni na sliki 29.



Slika 29: Vsebnosti* hlapnih tiolov 4-merkapt-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (1), 3-merkapt-6-oks-1-ola (3MH) (2) in 3-merkapt-6-oksil acetata (3MHA) (3) v vinih, po končani alkoholni fermentaciji pri nižji (modri stolpci) in višji (rdeči stolpci) temperaturi s starterskima kulturama SK6 in SK10. *določene v združenih paralelkih treh ponovitvah

Figure 29: Contents* of volatile thiols 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) (1), 3-mercaptohexan-1-ol (3MH) (2) and 3-mercaptohexyl acetate (3MHA) (3) in wines, after the completion of alcoholic fermentation at lower (blue column) and higher (red column) temperature with starter cultures SK6 and SK10. *determined in united runs of three replicates

Kot je razvidno iz slike 29, je bila vsebnost vseh hlapnih tiolov (z izjemo 4MMP pri SK10) v vinih, pridelanih pri nižji temperaturi manjša, kot v vinih, pridelanih pri višji temperaturi, kar je verjetno posledica oksidacije le-teh zaradi šibkejše fermentacijske kinetike v zaključni fazi AF. Večje vsebnosti 4MMP in 3MH v vinih SK6 so lahko tudi posledica večje sposobnosti sproščanja teh dveh hlapnih tiolov pri starterski kulturi SK6 pri višjih temperaturah AF, kar smo potrdili v poskusu 3. Ravno obratno je starterska kultura SK10 v poskusu 3 sprostil večje koncentracije 3MH in 3MHA pri nižji temperaturi AF, zato so nizke vsebnosti teh dveh hlapnih tiolov v vinih SK10 verjetno bolj posledica oksidacije. Večjo stopnjo oksidacije in s tem manjšo vsebnost hlapnih

tiolov potrjuje tudi majhna vsebnost GSH in HCK v vinih, pridelanih pri nižji temperaturi AF.

Pri nižji temperaturi AF je starterska kultura SK10 sprostil več 4MMP (20,4 ng/L) kot starterska kultura SK6 (15,2 ng/L), pri višji temperaturi pa je veliko več 4MMP sprostil starterska kultura SK6 (38,4 ng/L) v primerjavi s startersko kulturo SK10 (12,6 ng/L). Vsebnost 3MH je bila v vinih SK10 (815,9 in 1802,3 ng/L) večja kot v vinih SK6 (432,5 in 1006,6 ng/L) ne glede na temperaturo AF. Ravno obratno pa je bila vsebnost 3MHA pri obeh temperaturah AF večja v vinih SK6 (260,4 in 939,9 ng/L) kot v vinih SK10 (255,6 in 489,5 ng/L). Po izračunu pretvorbe 3MH v 3MHA pri posameznih starterskih kulturah, je stopnja pretvorbe zelo velika, predvsem pri starterski kulturi SK6 60 % (pri nižji temperaturi) in 93 % (pri višji temperaturi), pri starterski kulturi SK10 pa smo določili 31 % (pri nižji temperaturi) in 27 % (pri višji temperaturi) stopnjo pretvorbe. Potrdimo lahko torej, da ima starterska kultura SK6 večjo sposobnost pretvorbe 3MH v 3MHA kot starterska kultura SK10. Večjo stopnjo pretvorbe 3MH v 3MHA pri starterski kulturi SK6 v primerjavi s startersko kulturo SK10 smo določili tudi v poskusu 4.

4.5.6 Senzorična analiza

Dva meseca po zaključeni AF je sedemčlanska komisija točkovala vina od 1 (najmanj) do 5 (največ) glede na intenzivnost posameznih senzoričnih parametrov. Rezultati točkovanja so predstavljeni v preglednici 34.

Preglednica 34: Povprečja točk posameznih senzoričnih lastnosti za vina SK6 in SK10, pridelana pri nižji (kontrolirani) in višji (kletni) temperaturi AF

Table 34: Average number of points of each sensory property for wines SK6 and SK10, produced at lower (controlled) and higher (cellar) temperature

Senzorična lastnost	Vino – točkovanje (1-5) (n=7)			
	SK6		SK10	
	Nižja temp.	Višja temp.	Nižja temp.	Višja temp.
Težja tropska aroma	2,3±0,2 ^{*b}	2,6±0,2 ^b	2,4±0,2 ^b	1,6±0,4 ^a
Sveža tropska aroma	2,2±0,2 ^b	2,3±0,1 ^b	2,1±0,3 ^b	1,3±0,3 ^a
Fermentacijska aroma	2,1±0,1 ^{ab}	2,2±0,1 ^{bc}	2,4±0,2 ^c	1,9±0,1 ^a
Zelena aroma	1,4±0,3 ^b	1,5±0,1 ^b	1,2±0,2 ^{ab}	0,9±0,1 ^a
Celokupna kakovost	2,6±0,3 ^b	2,9±0,1 ^b	2,6±0,3 ^b	1,8±0,3 ^a

* $x \pm SO$ (povprečje treh ponovitev \pm standardni odklon); a, b, c – statistično značilne razlike z LSD testom ($p \leq 0,05$)

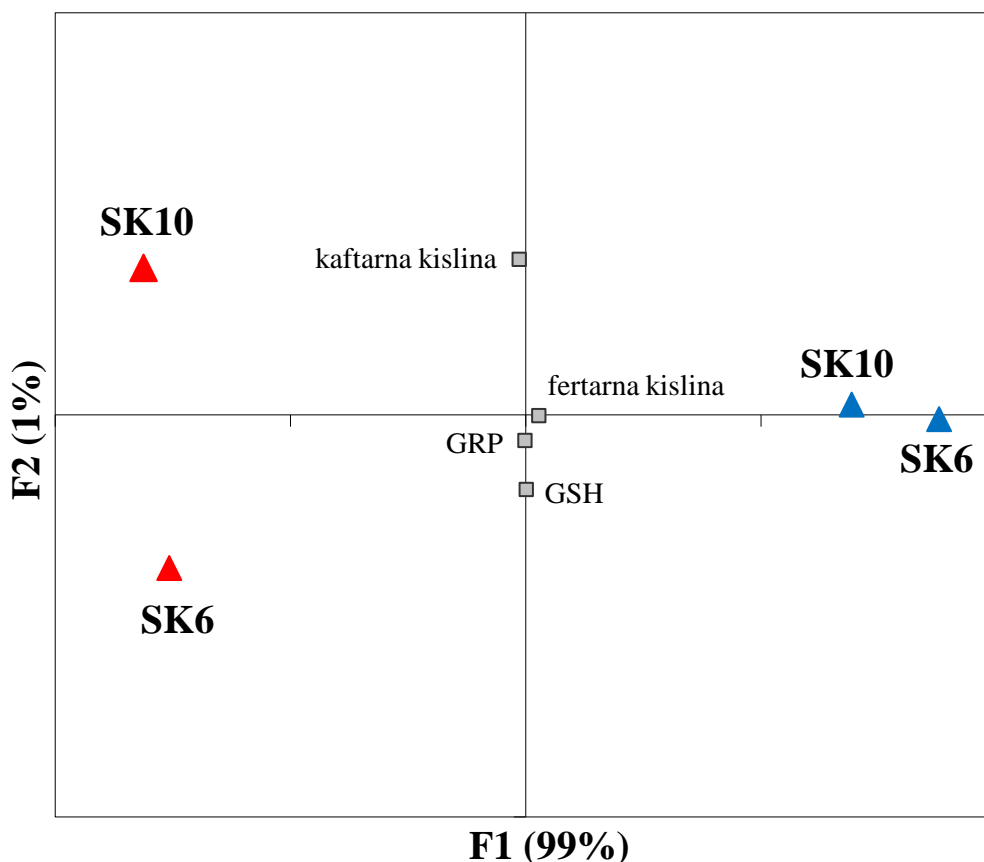
Kot je razvidno iz preglednice 34, so se vina statistično značilno razlikovala v vseh ocenjenih senzoričnih lastnostih. Za senzorični lastnosti težja in sveža tropska aroma so bila statistično značilno nižje ocenjena vina SK10, pridelana pri višji temperaturi (1,6 in 1,3 točke), kar je verjetno posledica najmanjših vsebnosti 4MMP v teh vinih. Med ostalimi vini v teh dveh senzoričnih lastnostih ni bilo statistično značilnih razlik (2,1-2,6 točk). Fermentacijska aroma je bila statistično značilno najvišje ocenjena v

vinih SK10, pridelanih pri nižji temperaturi AF (2,4 točke), najnižje pa v vinih SK10, pridelanih pri višji temperaturi AF (1,9 točk). Zelena aroma je bila intenzivnejša v vinih SK6 kot v vinih SK10, ne glede na temperaturo pridelave. Celokupna kakovost pa je bila statistično značilno nižje ocenjena le v vinih SK10, pridelanih pri višji temperaturi (1,8 točk), kar je verjetno posledica statistično značilno nižjih ocen za senzorični lastnosti težja in sveža tropska aroma pri teh vinih. Med ostalimi vini v celokupni kakovosti ni bilo statistično značilnih razlik (2,6-2,9 točk).

Z uporabo multiple regresije smo našli statistično značilne povezave med vsebnostjo hlapnih tiolov in številom točk pri senzorični analizi ($p \leq 0,05$), predvsem za senzorične lastnosti težja tropska aroma ($p = 0,01458$, $R^2 = 0,71333$), sveža tropska aroma ($p = 0,00343$, $R^2 = 0,80257$) in celokupna kakovost ($p = 0,00192$; $R^2 = 0,82987$).

4.5.7 PCA in LDA poskusa 5

Z metodama PCA in LDA smo razvrstili pridelana mlada vina v skupine glede na uporabljeno startersko kulturo in temperaturo AF. Pri analizi PCA smo izmed vključenih 26 parametrov določili štiri najbolj determinirajoče, in sicer kaftartno in fertarno kislino, GRP ter GSH. Skupaj so razložile 90,3 % skupne variabilnosti med proučevanimi vzorci (41,9 %; 28,1 %; 13,2 %; 7,1 %). Izbrane podatke (12 vzorcev (štirje vzorci v treh ponovitvah) in štiri spremenljivke) smo vstavili v analizo LDA, katere rezultati so prikazani na sliki 30, v prilogah L in M pa so podani osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih in senzoričnih analiz ter korelacijski koeficienti med njimi.



Slika 30: Projekcija podatkov poskusa 5, v ravnini, definirani s prvima dvema diskriminantnima funkcijama (LDA); ▲ – višja temperatura alkoholne fermentacije, ▲ – nižja temperatura alkoholne fermentacije

Figure 30: Data projection of the 4th part of the experiment, in the plane defined by the first two discriminant functions (LDA); ▲ – higher fermentation temperature, ▲ – lower fermentation temperature

Pri analizi LDA na izbranih podatkih smo pridobili dve glavni diskriminantni funkciji, od katerih funkcija 1 pojasnjuje 99,9 % skupne variance, funkcija 2 pa preostali 0,1 %. Razlikujemo lahko med spremenljivkama, katerih pravokotna projekcija na prvo diskriminantno funkcijo je največja, in to sta kaftarna kislina na eni in GSH na nasprotni strani. Lastnosti, ki ležijo blizu druga drugi, so v visoki pozitivni korelaciji, kot sta to fertarna kislina in GRP. Na sliki 30 lahko vidimo tudi dve ločeni skupini vin, pridelanih pri višji in nižji temperaturi AF ter z različnimi starterskimi kulturami. Prva skupina leži na levi strani slike in vključuje vina, pridelana pri višji temperaturi AF s starterskima kulturama SK6 in SK10. Ravno nasprotno pa druga skupina, ki se bistveno razlikuje od prve skupine, leži na desni strani slike in vključuje vina, pridelana pri nižji temperaturi s starterskima kulturama SK6 in SK10.

4.5.8 Razprava poskusa 5

Sev kvasovk vrste *T. delbrueckii* v starterski kulturi SK10 se je tudi v tem poskusu izkazal s počasnejšo fermentacijsko kinetiko v primerjavi s sevom kvasovk vrste *S. cerevisiae* v starterski kulturi SK6. Fermentacijska kinetika seva kvasovk vrste *T. delbrueckii* je bila bistveno boljša pri višji kot pri nižji temperaturi AF, kot smo pokazali že v poskusu 3. Potrdimo lahko torej pozitiven vpliv višjih temperatur AF na fermentacijsko kinetiko seva kvasovk vrste *T. delbrueckii*. Po prvem tednu AF je bila fermentacijska kinetika kvasovk statistično značilno različna le glede na uporabljeno temperaturo AF – obe starterski kulturi sta imeli, brez statistično značilnih razlik med seboj, hitrejšo fermentacijsko kinetiko pri višji temperaturi AF kot pri nižji. Hitrejšo fermentacijsko kinetiko kvasovk pri višji temperaturi AF smo potrdili tudi v poskusu 3. V vinih SK6 smo tudi v tem delu poskusa, tako kot v vseh prejšnjih, določili statistično značilno večje vsebnosti HK, in sicer kar dvakrat večje kot v vinih SK10. Ravno nasprotno kot v poskusih 3 in 4, je starterska kultura SK6 je pri nižji temperaturi AF tvorila statistično značilno večje vsebnosti HK (celo nad največjo zakonsko dovoljeno koncentracijo (1 g/L; Pravilnik o pogojih..., 2004)) kot pri višji temperaturi AF. Večja tvorba HK pri nižji temperaturi AF v tem delu poskusa je verjetno posledica odziva kvasovk na stres pri znižanju temperature v začetni fazi AF (Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Starterska kultura SK6 je med AF porabila manj dušika kot starterska kultura SK10, ne glede na temperaturo AF, kar smo pokazali tudi v poskusu 3. Starterska kultura SK6 je zato mogoče bolj primerna za AF moštov s pomanjkanjem dušika, kar je zelena lastnost starterskih kultur (González in sod., 2011), kot starterska kultura SK10. Na porabo dušika pri starterski kulturi SK6 pa je tako v tem, kot v poskusu 3, pomembno vplivala temperatura AF – pri višji temperaturi AF je starterska kultura porabila več dušika kot pri nižji. Temperatura AF je pomembno vplivala tudi na vsebnost HCK in GSH v pridelanih vinih. Vina, pridelana pri nižji temperaturi AF so imela statistično značilno manjše vsebnosti HCK in GSH kot vina, pridelana pri višji temperaturi. Nižje vsebnosti HCK in GSH so lahko posledica oksidacije le-teh zaradi zelo počasne fermentacijske kinetike kvasovk v zaključni fazi AF, kot tudi večje porabe GSH pri kvasovkah zaradi stresa ob znižanju temperature v začetni fazi AF (Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Starterska kultura SK10 je tudi v tem poskusu v vinih ohranila večje vsebnosti GSH kot starterska kultura SK6, ne glede na temperaturo AF.

Vsebnosti hlapnih tiolov v vinih, pridelanih v tem delu poskusa, so bile v veliki meri odvisne od temperature AF. Vina, pridelana pri nižji temperaturi, so imela manjše vsebnosti hlapnih tiolov (razen 4MMP pri SK10) kot vina, pridelana pri višji temperaturi. Glede na manjše vsebnosti HCK in GSH v teh vinih, ki so neke vrste indikator oksidacije vina, bi tudi za majhne vsebnosti hlapnih tiolov lahko rekli, da so v večji meri posledica oksidacije v zaključni fazi AF. Največje vsebnosti hlapnih tiolov 4MMP in 3MHA smo določili v vinih SK6, pridelanih pri višji temperaturi. Sproščanje večjih koncentracij teh dveh hlapnih tiolov med AF pri obeh sevih kvasovk v mešani

kulturi SK6 so potrdili že drugi avtorji (Swiegers in sod., 2005, 2006). Vina SK6 so imela večje vsebnosti 4MMP in 3MHA kot vina SK10 tudi v poskusu 4, ne glede na temperaturo AF, kar dodatno potrjuje tvorbo večjih koncentracij teh dveh hlapnih tiolov pri starterski kulturi SK6. Starterska kultura SK10 je sprostila večje koncentracije 3MH kot starterska kultura SK6, ne glede na temperaturo AF. V poskusih 3 in 4 je starterska kultura SK10 sprostila večje koncentracije 3MH kot starterska kultura SK6, vendar le pri nižji temperaturi AF. Tudi za startersko kulturo SK10 lahko torej potrdimo večjo sposobnost sproščanja 3MH. Vina SK10, pridelana pri višji temperaturi, so bila statistično značilno nižje ocenjena za senzorične lastnosti težja in sveža tropska aroma ter (posledično tudi) celokupna kakovost. Razlog za to so lahko najmanjše vsebnosti 4MMP v teh vinih, kljub obenem najvišjim vsebnostim 3MH. Med ostalimi vini ni bilo statistično značilnih razlik v ocenah omenjenih treh senzoričnih parametrov. Glede na število dodeljenih točk pa so bila vina SK6, pridelana pri višji temperaturi, najvišje ocenjena za vse omenjene senzorične lastnosti, kar je v skladu z najvišjimi vsebnostmi 3MH in predvsem 4MMP v teh vinih.

5 SKLEPI

Na osnovi rezultatov opravljenih raziskav v okviru doktorske disertacije smo prišli do naslednjih pomembnih zaključkov.

Ugotovili smo značilne razlike med prečiščeno in neprečiščeno startersko kulturo kvasovk v vplivu na vsebnost glutaciona (GSH) kot tudi na fermentacijsko kinetiko in tvorbo hlapnih kislin (HK). Prvo postavljeno hipotezo, ki pravi, da med prečiščeno in neprečiščeno kulturo kvasovk ni značilnih razlik v končni vsebnosti GSH po alkoholni fermentaciji (AF), smo torej ovrgli. Obenem prvič poročamo o vplivu bakterijskih kultur, prisotnih v komercialnih starterskih kulturah, na vsebnost GSH v vinu. V vseh poskusih smo potrdili odločilen vpliv starterskih kultur na vsebnost HK, GSH in hlapnih tiolov v vinu. V posameznih poskusih pa smo potrdili vpliv starterskih kultur na vsebnost prostega aminokislinskega dušika (FAN) (poskusi 1-3, 5), hidroksicimetnih kislin (HCK) (poskusi 1-3) in senzorično kakovost vina (poskusi 2-5). Pokazali smo, da niti starterske kulture niti temperatura AF in delovni volumen fermentorja ne vplivajo na vsebnost metokspirazinov (MPZ) v vinu. V zadnjih treh poskusih smo potrdili pomemben vpliv temperature AF na fermentacijsko kinetiko kvasovk ter s tem na vsebnost HK, GSH, hlapnih tiolov in senzorično kakovost vina. V posameznih poskusih pa smo potrdili vpliv temperature tudi na vsebnost FAN (poskus 3) in HCK (poskusa 4, 5) v pridelanem vinu. Določene lastnosti posameznih starterskih kultur, kot so npr. tvorba HK, potrebe po dušiku, ohranjanje vsebnosti GSH v vinu in sproščanje hlapnih tiolov, so se izrazile ne glede na uporabljen delovni volumen fermentorja ali temperaturo AF, s čimer smo potrdili ponovljivost njihovih lastnosti tako v mikroviniifikacijskih kot v industrijskih merilih. Potrdili smo tudi vpliv letnika na končno vsebnost posameznih spojin, tako v moštu kot v vinu. Na osnovi končnih rezultatov vsebnosti glutaciona in aromatičnih spojin v vinih iz poskusov 2-4 smo znotraj našega izbora določili najbolj primerni starterski kulturi kvasovk za pridelavo vina sauvignon, ki smo ju v poskusu 5 tudi primerjali. Sklepi in potrditev hipotez v posameznih poskusih so predstavljeni v nadaljevanju.

V poskusu 1 smo s primerjavo vinifikacij mošta sauvignon letnik 2009 (z dodatkom glutaciona) s prečiščenimi in neprečiščenimi starterskimi kulturami SK1-SK5 prišli do naslednjih zaključkov:

- Čistost starterske kulture je vplivala na vsebnost GSH v vinu po zaključeni AF. Predvsem starterski kulturi SK1 in SK2 sta ohranili značilno več GSH v vinu v obliki prečiščenih kultur, starterska kultura SK3 pa v obliki neprečiščene kulture. Vsebnost GSH se je tekom AF postopno zmanjševala, ne glede na čistost starterskih kultur. Med tri in pol mesečnim zorenjem vina na drožeh (pri prečiščenih starterskih kulturah) se je vsebnost GSH še zmanjšala, razen v vinih SK3, v katerih se je vsebnost nekoliko povečala.

- Glede na vsebnost reducirajočih sladkorjev (RS) v vinih po končani AF smo potrdili boljšo fermentacijsko kinetiko starterskih kultur v prečiščeni obliki.
- Čistost starterske kulture je vplivala na tvorbo HK pri starterskih kulturah SK3 in SK4, ki sta jih tvorili več v neprečiščeni obliki. Starterska kultura SK1 je tvorila največje vsebnosti HK ne glede na obliko čistosti.
- Na porabo dušika med AF čistost starterskih kultur ni bistveno vplivala. Starterska kultura SK1 je imela najmanjše, starterska kultura SK4 pa največje potrebe po dušiku med AF ne glede na obliko čistosti.
- Vsebnost HCK se je med AF večinoma zmanjšala, z izjemo kavne kisline, katere vsebnost se je povečala. Vina, pridelana s startersko kulturo SK1, so imela največje vsebnosti skupnih HCK ne glede na obliko čistosti kulture.
- Večjo sposobnost sproščanja hlapnih tiolov 4-merkapt-4-metil-pentan-2-ona (4MMP) in 3-merkaptohexan-1-ola (3MH) med AF smo potrdili za startersko kulturo SK4, večjo sposobnost sproščanja 3-merkaptohexil acetata (3MHA) pa za starterski kulturi SK1 in SK4.
- Starterske kulture kvasovk (neprečiščene kulture) niso vplivale na vsebnost MPZ v vinu.

V poskusu 2 smo s primerjavo vinifikacij mošta sauvignon letnik 2009 z mešanimi starterskimi kulturami SK6-SK9 prišli do naslednjih zaključkov:

- Sev kvasovk vrste *T. delbrueckii* je izkazal značilno slabšo fermentacijsko kinetiko v primerjavi z ostalimi (*Saccharomyces* spp.) starterskimi kulturami.
- Starterska kultura SK6 je med AF tvorila značilno največje vsebnosti HK v vinu.
- Starterska kultura SK9 je izkazala najmanjše, starterska kultura SK8 pa največje potrebe po dušiku med AF.
- Vsebnost HCK se je med AF zmanjšala, z izjemo kavne kisline, katere vsebnost se je povečala. Vina, pridelana s startersko kulturo SK6 so imela značilno največje vsebnosti HCK, vina, pridelana s startersko kulturo SK8 pa najmanjše.
- Starterske kulture so pomembno vplivale na vsebnost GSH med AF in v pridelanem vinu. V eksponentni fazi rasti kvasovk se je vsebnost GSH značilno povečala, razen v vinifikacijah s sevom kvasovk vrste *T. delbrueckii* (SK9), v katerih se je vsebnost GSH bistveno zmanjšala. Do konca AF se je vsebnost GSH zmanjšala in je bila v vinih manjša kot v moštu, z izjemo vinifikacij SK9, pri katerih so se vsebnosti GSH po ko-inokulaciji s kvasovkami vrste *S. cerevisiae* nekoliko povečale, vendar so bile vseeno manjše kot v moštu. Po zaključeni AF smo največje vsebnosti GSH določili v vinih SK6, najmanjše pa v vinih SK8.

- Starterska kultura SK7 je sprostila največje vsebnosti 4MMP, starterska kultura SK9 pa najmanjše. Slabšo sposobnost sproščanja 3MH je izkazala le starterska kultura SK6. Starterski kulturi SK6 in SK9 sta izkazali najboljšo, starterska kultura SK8 pa najslabšo sposobnost sproščanja 3MHA.
- Starterske kulture kvasovk niso vplivale na vsebnost MPZ v vinu.
- Vini SK7 in SK8 sta bili višje rangirani za senzorični lastnosti tropska aroma in celokupna kakovost kot vini SK6 in SK9.

V poskusu 3 smo s primerjavo vinifikacij mošta sauvignon letnik 2010 pri dveh različnih temperaturah AF s starterskimi kulturami SK6, SK7 in SK10-SK13 prišli do naslednjih zaključkov:

- Starterske kulture so imele hitrejšo fermentacijsko kinetiko pri višji temperaturi AF. Sev kvasovk vrste *T. delbrueckii* je izkazal značilno slabšo fermentacijsko kinetiko v primerjavi z ostalimi (*Saccharomyces* spp.) starterskimi kulturami.
- Višja temperatura AF je vplivala na večjo tvorbo HK pri starterskih kulturah SK6 in SK7. Starterska kultura SK6 je tvorila značilno večje vsebnosti HK ne glede na temperaturo AF. Pri višji temperaturi je ta starterska kultura tvorila HK celo nad največjo zakonsko dovoljeno mejo.
- Vina, pridelana pri višji temperaturi AF, so imela večje vsebnosti FAN. Starterska kultura SK6 je imela najmanjše, starterska kultura SK12 pa največje potrebe po dušiku ne glede na temperaturo AF.
- Temperatura AF ni imela bistvenega vpliva na vsebnost HCK v pridelanih vinih. Ne glede na temperaturo AF smo največje vsebnosti HCK določili v vinih, pridelanih s startersko kulturo SK6, najmanjše pa v vinih SK11 in SK12.
- Pri nižji temperaturi AF smo pridelali vina z večjimi vsebnostmi GSH. Največje vsebnosti GSH smo določili v vinih SK10, najmanjše pa v vinih SK13 ne glede na temperaturo AF.
- Pri višji temperaturi AF smo večinoma pridelali vina z večjimi vsebnostmi 4MMP (razen SK7) in 3MH (razen SK10 in SK11) ter manjšimi vsebnostmi 3MHA (razen SK7). Pri nižji temperaturi AF sta največ 4MMP sprostili starterski kulturi SK11 in SK12, največ 3MH in 3MHA pa starterski kulturi SK10 in SK11. Pri višji temperaturi AF sta največ 4MMP sprostili prav tako starterski kulturi SK11 in SK12, največ 3MH starterski kulturi SK12 in SK13, največ 3MHA pa starterski kulturi SK7 in SK12.

- Vina, pridelana pri nižji temperaturi AF, so bila večinoma višje ocenjena za vse senzorične parametre kot vina, pridelana pri višji temperaturi. Senzorični lastnosti težja in sveža tropska aroma sta bili najvišje ocenjeni predvsem v vinih SK6, SK12 in SK13. Senzorična lastnost celokupna kakovost je bila najvišje ocenjena predvsem v vinih SK12 in SK13. Za senzorično lastnost fermentacijska aroma so bila višje ocenjena predvsem vina SK6, za zeleno aromo pa vina SK6 in SK10.

V poskusu 4 smo s primerjavo vinifikacij mošta sauvignon letnik 2010 pri dveh različnih temperaturah AF in delovnih volumnih fermentorjev s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11 prišli do naslednjih zaključkov:

- Z ozirom na večje vsebnosti RS v vinih SK11, pridelanih pri nižji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu, lahko potrdimo neprimernost nižjih temperatur za pridelavo vina s startersko kulturo SK11.
- Starterski kulturi SK6 in SK10 sta pri višji temperaturi in v večjem delovnem volumnu tvorili večje vsebnosti HK v vinu. Ne glede na temperaturo AF in delovni volumen fermentorjev je starterska kultura SK6 tvorila največ, starterska kultura SK10 pa najmanj HK v vinu.
- Večje vsebnosti HCK smo določili v vinih pridelanih pri nižji temperaturi oz. v manjšem delovnem volumnu. Starterske kulture kvasovk niso pomembno vplivale na vsebnost HCK v vinih, pridelanih pri posameznih temperaturah AF in delovnih volumnih fermentorjev.
- Vsebnost GSH je bila večja v vinih, pridelanih pri višji temperaturi AF in v večjem delovnem volumnu. Ne glede na temperaturo AF in delovni volumen fermentorjev pa je bila vsebnost GSH v vinih SK10 največja, v vinih SK11 pa najmanjša.
- Pri višji temperaturi AF in v večjem delovnem volumnu smo večinoma pridelali vina z večjimi vsebnostmi 4MMP (razen SK11) in 3MHA (razen SK11) ter manjšimi vsebnostmi 3MH. Starterska kultura SK6 je imela največjo sposobnost sproščanja 4MMP in 3MHA ne glede na temperaturo AF in delovni volumen fermentorja. Pri nižji temperaturi AF in v manjšem delovnem volumnu sta imeli največjo sposobnost sproščanja 3MH starterski kulturi SK10 in SK11, pri višji temperaturi AF in v večjem delovnem volumnu pa starterski kulturi SK6 in SK11.
- Starterska kultura kvasovk, temperatura AF in delovni volumen fermentorja niso vplivali na vsebnost MPZ v vinu.

- Vina SK6, pridelana pri nižji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu so bila najvišje ocenjena za senzorične lastnosti težja in sveža tropska aroma ter celokupna kakovost. Med vini, pridelanimi pri višji temperaturi AF in v večjem delovnem volumnu je bilo za senzorični lastnosti težja tropska aroma in celokupna kakovost najvišje ocenjeno vino SK10, za senzorično lastnost sveža tropska aroma pa vino SK6.

V poskusu 5 smo s primerjavo vinifikacij mošta sauvignon letnik 2011 pri dveh različnih temperaturah AF s starterskima kulturama SK6 in SK10 prišli do naslednjih zaključkov:

- Starterski kulturi sta imeli hitrejšo fermentacijsko kinetiko pri višji temperaturi AF. Sev kvasovk vrste *T. delbrueckii* (v SK10) je imel značilno slabšo fermentacijsko kinetiko v primerjavi s sevom kvasovk vrste *S. cerevisiae* (v SK6).
- Starterska kultura SK6 je tvorila dvakrat večje vsebnosti HK v vinu kot starterska kultura SK10. Pri nižji temperaturi AF je starterska kultura SK6 tvorila večje vsebnosti HK kot pri višji temperaturi AF in sicer v koncentracijah nad največjo zakonsko določeno mejo.
- Temperatura AF ni imela bistvenega vpliva na porabo dušika pri starterskih kulturah. Starterska kultura SK6 je med AF porabila manj dušika kot starterska kultura SK10, ne glede na temperaturo AF.
- Vina, pridelana pri nižji temperaturi AF so imela značilno manjše vsebnosti HCK in GSH kot vina, pridelana pri višji temperaturi. Starterski kulturi kvasovk nista značilno vplivali na vsebnost HCK. Starterska kultura SK10 je v vini ohranila večje vsebnosti GSH kot starterska kultura SK6, ne glede na temperaturo AF.
- Vina, pridelana pri nižji temperaturi, so imela manjše vsebnosti vseh treh hlapnih tiolov (razen 4MMP pri SK10) kot vina, pridelana pri višji temperaturi. Največje vsebnosti hlapnih tiolov 4MMP in 3MHA smo določili v vini SK6, pridelanih pri višji temperaturi. Starterska kultura SK10 je sprostil večje koncentracije 3MH kot starterska kultura SK6, ne glede na temperaturo AF.
- Za senzorične lastnosti težja in sveža tropska aroma ter celokupna kakovost so bila značilno nižje ocenjena le vina SK10, pridelana pri višji temperaturi. Sicer (statistično neznačilno) pa so bila za vse omenjene parametre najvišje ocenjena vina SK6, pridelana pri višji temperaturi.

Če povzamemo, je prečiščenost starterskih kultur kvasovk pozitivno vplivala na fermentacijsko kinetiko, v nekaterih primerih pa tudi na tvorbo manjših vsebnosti HK in ohranjanje večjih vsebnosti GSH v pridelanih vinih. Med preiskovanimi starterskimi

kulturami je SK6 značilno tvorila večje vsebnosti HK, izkazala najmanjše potrebe po dušiku in ohranila največje vsebnosti HCK v vinih. Starterska kultura SK10 je v vinih ohranila značilno največje vsebnosti GSH. Sposobnost sproščanja hlapnih tiolov pri posameznih starterskih kulturah je bila v veliki meri odvisna od temperature AF - pri višjih temperaturah so kvasovke večinoma sprostile več 4MMP in 3MH ter manj 3MHA. Vina z večjimi vsebnostmi hlapnih tiolov, predvsem 4MMP, so bila večinoma višje ocenjena za senzorični lastnosti tropska aroma in celokupna kakovost, kar smo potrdili predvsem pri vinih SK6, SK7, SK11, SK12, SK13. Višje temperature AF so se odrazile s hitrejšo fermentacijsko kinetiko kvasovk ter posledično manjšimi vsebnostmi GSH in HCK v pridelanih vinih. Znižanje temperature v začetni fazi AF je negativno vplivalo na presnovo starterskih kultur, kar se je odrazilo z zmanjšanjem vsebnosti HCK in GSH kot tudi vseh treh hlapnih tiolov v vinih. Na osnovi končnih rezultatov vsebnosti GSH in hlapnih tiolov smo znotraj našega izbora določili kot najbolj primerni starterski kulturi za pridelavo vina sauvignon SK6 in SK10. Z njuno primerjavo v vinifikacijah zadnjega dela poskusa smo v vinih SK6 določili predvsem večje vsebnosti 4MMP in 3MHA, kar se je odrazilo z intenzivnejšo tropsko aromo in boljšo celokupno kakovostjo teh vin.

6 POVZETEK

6.1 POVZETEK

Vinske kvasovke igrajo ključno vlogo pri vinifikaciji grozdnega mošta, saj v procesu alkoholne fermentacije (AF) anaerobno pretvorijo sladkorje v etanol in ogljikov dioksid, obenem pa tvorijo številne hlapne presnovke, ki oblikujejo senzorično kakovost pridelanega vina. Na tržišču so prisotne številne starterske kulture kvasovk, ki s svojimi genetsko pogojenimi lastnostmi različno vplivajo na kemijsko in senzorično kakovost pridelanega vina. Poleg klasičnih starterskih kultur kvasovk rodu *Saccharomyces*, ki se uporabljajo v vinarstvu, se daje vedno večji poudarek uporabi mešanih starterskih kultur kvasovk rodu *Saccharomyces* kot tudi kvasovk rodov *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces*. Številne prednosti so pokazali tudi hibridni sevi kvasovk ter sevi s prilagojenimi presnovnimi potmi (mutanti). Na delovanje kvasovk med AF pomembno vplivajo predvsem sestava mošta in pogoji AF. Starterske kulture kvasovk lahko pomembno vplivajo na vsebnosti glutaciona (GSH) v pridelanem vinu, ki je eden od najpomembnejših antioksidantov, saj veže oksidacijske produkte, ki se tvorijo med oksidacijo fenolnih spojin in na ta način omeji količino rjavih barvil, obenem pa zaščiti številne aromatične spojine v vinu pred oksidacijo. Značilne aromatične spojine v vinih sauvignon so predvsem metoksipirazini (MPZ), ki dajejo vinu bolj zelene arome in hlapni tioli, ki prispevajo k tropskim aromam vina. Obe vrsti spojin izvirata iz grozdja. Hlapni tioli se nahajajo v grozdju v obliki nehlapnih, nearomatičnih prekurzorjev in se sprostijo šele med AF s pomočjo liaz in alkohol acetiltransferaz vinskih kvasovk. Različne starterske kulture kvasovk imajo zelo različno sposobnost sproščanja hlapnih tiolov iz njihovih prekurzorjev, kar pomembno vpliva na končno senzorično kakovost vina. Izbira primerne starterske kulture za izvedbo AF je zato ključnega pomena za pridelavo vin z izboljšano kemijsko in senzorično kakovostjo.

Glavni namen raziskovalnega dela je bil ugotoviti vpliv čistosti starterske kulture, različnih komercialnih sevov kvasovk in njihovih kombinacij, ter pogojev AF (temperatura in delovni volumen fermentorjev) na vsebnosti GSH, hidroksicimetnih kislin (HCK) in glavnih aromatičnih spojin v vinih sauvignon (*Vitis vinifera* L.) ter s tem na njegovo senzorično kakovost. Vinifikacije smo izvedli na treh letnikih mošta sauvignon iz vinorodne dežele Podravje, pri različnih temperaturah AF in v različnih delovnih volumnih fermentorjev, kar nam je omogočilo preučevanje vpliva sestave mošta in pogojev AF na kemijsko in senzorično kakovost vina kot tudi prenosljivosti rezultatov iz mikroviniifikacijskega v industrijsko merilo. V poskusu 1 smo preverili vpliv prisotnosti bakterij v starterski kulturi kvasovk na vsebnost GSH in drugih kemijskih parametrov vina z izvedbo vinifikacij s prečiščenimi in neprečiščenimi starterskimi kulturami kvasovk. V poskusu 2 smo preverili vpliv štirih mešanih starterskih kultur kvasovk na kemijsko in senzorično kakovost vina. V poskusu 3 smo uporabili šest starterskih kultur kvasovk, od katerih smo dve uporabili že v poskusu 2,

vinifikacije pa smo izvedli pri dveh temperaturah AF – nižji (priporočeni za posamezen sev kvasovk) in višji (kletni). V poskus 4 smo vključili tri starterske kulture, uporabljene v poskusu 3, vinifikacije pa smo izvedli v mikrovinifikacijskem merilu pri temperaturi kleti (nižja temperatura) in v industrijskem merilu pri priporočeni temperaturi (višja temperatura). Na podlagi zbranih informacij o lastnostih starterskih kultur smo v poskus 5 vključili dve najbolj obetavni starterski kulturi, vinifikacije pa smo izvedli pri temperaturi kleti (višja temperatura) in kontrolirani (nižji) temperaturi, ki smo jo spreminjali/prilagajali med AF z namenom prilagoditve temperature AF za doseganje boljšega delovanja kvasovk. Med AF smo v različnih poskusih spremljali fermentacijsko kinetiko in vsebnost GSH v različnih fazah AF. V vinih smo po končani AF določili osnovne kemijske parametre, vsebnost prostega aminokislinskega dušika (FAN), HCK, GSH, hlapnih tiolov in MPZ ter opravili senzorično analizo pridelanih mladih vin. Pridobljene analize podatke smo statistično obdelali z uporabo metode glavnih komponent (PCA) in linearno diskriminantno analizo (LDA).

V poskusu 1 smo s primerjavo vinifikacij mošta sauvignon letnik 2009 s prečiščenimi in neprečiščenimi starterskimi kulturami SK1-SK5 ugotovili, da čistost starterske kulture pomembno vpliva na vsebnost GSH v vinu po zaključeni AF. Predvsem starterski kulturi SK1 in SK2 sta ohranili značilno več GSH v vinu v obliki prečiščenih kultur, starterska kultura SK3 pa v obliki neprečiščene kulture. Vsebnost GSH se je tekom AF postopno zmanjševala, ne glede na čistost starterskih kultur, kar je v nasprotju z literaturnimi podatki, po katerih naj bi se vsebnost GSH v začetni fazi AF zmanjšala, nato pa se z avtolizo kvasovk spet povečala v zaključni fazi AF in med zorenjem vina na drožeh. Tudi med tri in pol mesečnim zorenjem vina na drožeh (pri prečiščenih starterskih kulturah) se je v našem poskusu vsebnost GSH še zmanjšala, razen v vinih SK3, v katerih se je vsebnost nekoliko povečala kot posledica zgodnejše avtolize kvasnih celic. Zmanjševanje vsebnosti GSH tekom AF in zorenja vina na drožeh je mogoče lahko posledica različnega metabolizma GSH, ki je dodan v mošt (kot v našem poskusu) v primerjavi z GSH, ki je naravno prisoten v moštu. Glede na vsebnost reducirajočih sladkorjev (RS) v vinih po končani AF smo potrdili boljšo fermentacijsko kinetiko starterskih kultur v prečiščeni obliki. Čistost starterske kulture je vplivala na tvorbo hlapnih kislin (HK) pri starterskih kulturah SK3 in SK4, ki sta jih tvorili več v neprečiščeni obliki. Starterska kultura SK1 je tvorila največje vsebnosti HK ne glede na obliko čistosti. Na porabo dušika med AF čistost starterskih kultur ni bistveno vplivala. Starterska kultura SK1 je imela najmanjše, starterska kultura SK4 pa največje potrebe po dušiku med AF ne glede na obliko čistosti. Vsebnost HCK se je med AF večinoma zmanjšala, z izjemo kavne kisline, katere vsebnost se je nekoliko povečala. Vina, pridelana s startersko kulturo SK1, so imela največje vsebnosti skupnih HCK ne glede na obliko čistosti kulture. Večjo sposobnost sproščanja hlapnih tiolov 4-merkaptio-4-metil-pentan-2-ona (4MMP) in 3-merkaptioheksan-1-ola (3MH) med AF smo potrdili za startersko kulturo SK4, večjo sposobnost sproščanja 3-merkaptioheksil

acetata (3MHA) pa za starterski kulturi SK1 in SK4. Z ozirom na vsebnosti metokspirazinov v vinih, pridelanih z neprečiščenimi starterskimi kulturami kvasovk, smo ugotovili, da le-te ne vplivajo na njihovo vsebnost.

V poskusu 2 smo s primerjavo vinifikacij mošta sauvignon letnik 2009 z mešanimi starterskimi kulturami SK6-SK9 potrdili pomemben vpliv starterskih kultur na kemijsko in senzorično kakovost vina. Sev kvasovk vrste *Torulasporea delbrueckii* je izkazal značilno slabšo fermentacijsko kinetiko v primerjavi z ostalimi (*Saccharomyces* spp.) starterskimi kulturami. Starterska kultura SK6 je med AF tvorila značilno največje vsebnosti HK v vinu. Starterske kulture so imele značilno različne potrebe po dušiku in sicer je starterska kultura SK9 izkazala najmanjše, starterska kultura SK8 pa največje potrebe po dušiku med AF. Vsebnost HCK se je med AF zmanjšala, z izjemo kavne kisline, katere vsebnost se je nekoliko povečala. Potrdili smo vpliv starterskih kultur na vsebnost HCK v vinu, saj so imela vina, pridelana s startersko kulturo SK6 značilno največje vsebnosti HCK, vina, pridelana s startersko kulturo SK8 pa najmanjše. Starterske kulture so pomembno vplivale na vsebnost GSH med AF in v pridelanem vinu. V eksponentni fazi rasti kvasovk se je vsebnost GSH značilno povečala, razen v vinifikacijah s sevom kvasovk vrste *T. delbrueckii* (SK9), v katerih se je vsebnost GSH bistveno zmanjšala. Do konca AF se je vsebnost GSH zmanjšala in je bila v pridelanih vinih nižja kot v moštu, z izjemo vinifikacij SK9, pri katerih so se vsebnosti GSH po ko-inokulaciji s kvasovkami vrste *S. cerevisiae* nekoliko povečale, vendar so bile vseeno manjše kot v moštu. Po zaključeni AF smo največje vsebnosti GSH določili v vinih SK6, najmanjše pa v vinih SK8. Starterske kulture kvasovk so pomembno vplivale na vsebnost hlapnih tiolov v vinu, in sicer je starterska kultura SK7 sprostil največje vsebnosti 4MMP, starterska kultura SK9 pa najmanjše. Največjo sposobnost sproščanja 3MHA sta izkazali starterski kulturi SK6 in SK9, najslabšo pa starterska kultura SK8. Tudi v tem delu poskusa smo potrdili, da starterske kulture kvasovk ne vplivajo na vsebnost metokspirazinov v vinu. Vini SK7 in SK8 sta bili višje rangirani za senzorični lastnosti tropska aroma in celokupna kakovost kot vini SK6 in SK9.

V poskusu 3 smo s primerjavo vinifikacij mošta sauvignon letnik 2010 pri dveh različnih temperaturah AF s starterskimi kulturami SK6, SK7 in SK10-SK13 potrdili vpliv temperature na presnovo starterskih kultur kvasovk med AF in s tem na kemijsko in senzorično kakovost pridelanega vina. Starterske kulture so imele hitrejšo fermentacijsko kinetiko pri višji temperaturi AF. Tudi v tem poskusu je sev kvasovk vrste *T. delbrueckii* izkazal značilno slabšo fermentacijsko kinetiko v primerjavi z ostalimi (*Saccharomyces* spp.) starterskimi kulturami. Višja temperatura AF je vplivala na večjo tvorbo HK pri starterskih kulturah SK6 in SK7. Ne glede na temperaturo AF je starterska kultura SK6 tvorila značilno največje vsebnosti HK, pri višjih temperaturah celo nad največjo zakonsko dovoljeno mejo. Vina, pridelana pri višji temperaturi AF, so imela večje vsebnosti FAN, verjetno kot posledica zgodnejše avtolize kvasnih celic in s tem sproščanja dušika nazaj v vino. Ne glede na temperaturo AF pa je starterska kultura

SK6 izkazala najmanjše, starterska kultura SK12 pa največje potrebe po dušiku. Temperatura AF ni imela bistvenega vpliva na vsebnost HCK v pridelanih vinih. Ne glede na temperaturo AF smo največje vsebnosti HCK določili v vinih, pridelanih s startersko kulturo SK6, najmanjše pa v vinih SK11 in SK12. Pri nižji temperaturi AF smo pridelali vina z večjimi vsebnostmi GSH, verjetno na račun enakomernejše fermentacijske kinetike starterskih kultur. Največje vsebnosti GSH smo določili v vinih SK10, najmanjše pa v vinih SK13 ne glede na temperaturo AF. Potrdili smo tudi pomemben vpliv temperature AF na sproščanje hlapnih tiolov pri posameznih starterskih kulturah. Pri višji temperaturi AF smo večinoma pridelali vina z večjimi vsebnostmi 4MMP (razen SK7) in 3MH (razen SK10 in SK11) ter manjšimi vsebnostmi 3MHA (razen SK7). Pri nižji temperaturi AF sta največ 4MMP sprostil starterski kulturi SK11 in SK12, največ 3MH in 3MHA pa starterski kulturi SK10 in SK11. Pri višji temperaturi AF sta največ 4MMP sprostil ravno tako starterski kulturi SK11 in SK12, največ 3MH starterski kulturi SK12 in SK13, največ 3MHA pa starterski kulturi SK7 in SK12. Vina, pridelana pri nižji temperaturi AF, so bila večinoma višje ocenjena za vse senzorične parametre, kot vina, pridelana pri višji temperaturi. Senzorični lastnosti težja in sveža tropska aroma sta bili v povezavi z vsebnostjo hlapnih tiolov najvišje ocenjeni predvsem v vinih SK6, SK12 in SK13. Senzorična lastnost celokupna kakovost je bila najvišje ocenjena predvsem v vinih SK12 in SK13. Za senzorično lastnost fermentacijska aroma so bila višje ocenjena predvsem vina SK6, kar je verjetno posledica počasnejše fermentacijske kinetike te starterske kulture, za zeleno aromo pa so bila višje ocenjena vina SK6 in SK10.

V poskusu 4 smo s primerjavo vinifikacij mošta sauvignon letnik 2010 pri dveh različnih temperaturah AF in delovnih volumnih fermentorjev s starterskimi kulturami SK6, SK10 in SK11 potrdili vpliv starterskih kultur, temperature AF in delovnega volumna na posamezne parametre v vinu. Z ozirom na večje vsebnosti RS v vinih SK11, pridelanih pri nižji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu, lahko potrdimo neprimernost nižjih temperatur za pridelavo vina s startersko kulturo SK11. Starterski kulturi SK6 in SK10 sta pri višji temperaturi in v večjem delovnem volumnu tvorili večje vsebnosti HK v vinu. Ne glede na temperaturo in volumen AF pa je starterska kultura SK6 tvorila največ, starterska kultura SK10 pa najmanj HK v vinu. Večje vsebnosti HCK smo določili v vinih, pridelanih pri nižji temperaturi oz. v manjšem delovnem volumnu. Starterske kulture kvasovk pa v tem poskusu niso pomembno vplivale na vsebnost HCK v vinih, pridelanih pri posameznih temperaturah AF in delovnih volumnih. Vsebnost GSH je bila večja v vinih, pridelanih pri višji temperaturi AF in v večjem delovnem volumnu, verjetno kot posledica razmerja površina:volumen fermentorjev. Ne glede na temperaturo AF in delovni volumen fermentorjev pa je bila vsebnost GSH v vinih SK10 največja, v vinih SK11 pa najmanjša. Pri višji temperaturi AF in v večjem delovnem volumnu smo večinoma pridelali vina z večjimi vsebnostmi 4MMP (razen SK11) in 3MHA (razen SK11) ter manjšimi vsebnostmi 3MH. Starterska

kultura SK6 je imela največjo sposobnost sproščanja 4MMP in 3MHA ne glede na temperaturo AF. Pri nižji temperaturi AF in v manjšem delovnem volumnu sta imeli največjo sposobnost sproščanja 3MH starterski kulturi SK10 in SK11, pri višji temperaturi AF in v večjem delovnem volumnu pa starterski kulturi SK6 in SK11. Starterska kultura kvasovk, temperatura AF in delovni volumen fermentorja niso vplivali na vsebnost MPZ v vinu. Vina SK6, pridelana pri nižji temperaturi in v manjšem delovnem volumnu so bila najvišje ocenjena za senzorične lastnosti težja in sveža tropska aroma ter celokupna kakovost. Pri višji temperaturi AF in v večjem delovnem volumnu so bila za senzorični lastnosti težja tropska aroma in celokupna kakovost najvišje ocenjena vina SK10, za svežo tropsko aromo pa vina SK6.

V poskusu 5 smo s primerjavo vinifikacij mošta sauvignon letnik 2011 pri dveh različnih temperaturah AF s starterskima kulturama SK6 in SK10 potrdili vpliv temperature na presnovo starterskih kultur in s tem na vsebnost senzorično pomembnih parametrov vina. Obe starterski kulturi sta izkazali hitrejšo fermentacijsko kinetiko pri višji temperaturi AF. Sev kvasovk vrste *T. delbrueckii* (v SK10) se je tudi v tem poskusu izkazal z značilno slabšo fermentacijsko kinetiko v primerjavi s sevom kvasovk *S. cerevisiae* (v SK6). Starterska kultura SK6 je tvorila dvakrat večje vsebnosti HK v vinu kot starterska kultura SK10. Pri nižji temperaturi AF je starterska kultura SK6 tvorila večje vsebnosti HK kot pri višji temperaturi (nad največjo zakonsko določeno mejo), verjetno kot posledica stresa pri kvasovkah zaradi hitrega znižanja temperature v začetni fazi AF. Temperatura AF ni imela bistvenega vpliva na porabo dušika pri starterskih kulturah. Starterska kultura SK6 je med AF porabila manj dušika kot starterska kultura SK10, ne glede na temperaturo AF. Vina, pridelana pri nižji temperaturi AF so imela značilno manjše vsebnosti HCK in GSH kot vina, pridelana pri višji temperaturi. Zmanjšanje vsebnosti HCK in GSH v teh vinih je verjetno posledica oksidacije zaradi šibkejše fermentacijske kinetike in bistveno daljšega trajanja AF. Sami starterski kulturi kvasovk nista značilno vplivali na vsebnost HCK v vinu, medtem ko je starterska kultura SK10 v vinih ohranila večje vsebnosti GSH kot starterska kultura SK6, ne glede na temperaturo AF. Vina, pridelana pri nižji temperaturi, so imela manjše vsebnosti hlapnih tiolov (razen 4MMP pri SK10) kot vina, pridelana pri višji temperaturi. Največje vsebnosti hlapnih tiolov 4MMP in 3MHA smo določili v vinih SK6, pridelanih pri višji temperaturi. Starterska kultura SK10 je sprostila večje koncentracije 3MH kot starterska kultura SK6, ne glede na temperaturo AF. Za senzorične lastnosti težja in sveža tropska aroma ter celokupna kakovost so bila značilno nižje ocenjena le vina SK10, pridelana pri višji temperaturi. Sicer (statistično neznačilno) pa so bila za vse omenjene parametre najvišje ocenjena vina SK6, pridelana pri višji temperaturi.

Če povzamemo, je prečiščenost starterskih kultur kvasovk pozitivno vplivala na fermentacijsko kinetiko, v nekaterih primerih pa tudi na tvorbo manjših vsebnosti HK in ohranjanje večjih vsebnosti GSH v pridelanih vinih. Med preiskovanimi starterskimi

kulturami je SK6 značilno tvorila večje vsebnosti HK, izkazala najmanjše potrebe po dušiku in ohranila največje vsebnosti HCK v vinih. Starterska kultura SK10 je v vinih ohranila značilno največje vsebnosti GSH. Sposobnost sproščanja hlapnih tiolov pri posameznih starterskih kulturah je bila v veliki meri odvisna od temperature AF - pri višjih temperaturah so kvasovke večinoma sprostile več 4MMP in 3MH ter manj 3MHA. Vina z večjimi vsebnostmi hlapnih tiolov, predvsem 4MMP, so bila večinoma višje ocenjena za senzorični lastnosti tropska aroma in celokupna kakovost, kar smo potrdili predvsem pri vinih SK6, SK7, SK11, SK12 in SK13. Višje temperature AF so se odrazile s hitrejšo fermentacijsko kinetiko kvasovk ter posledično manjšimi vsebnostmi GSH in HCK v pridelanih vinih. Znižanje temperature v začetni fazi AF je negativno vplivalo na presnovo starterskih kultur, kar se je odrazilo z zmanjšanjem vsebnosti HCK in GSH kot tudi vseh treh hlapnih tiolov v vinih. Na osnovi končnih rezultatov vsebnosti GSH in hlapnih tiolov smo znotraj našega izbora določili kot najbolj primerni starterski kulturi za pridelavo vina sauvignon SK6 in SK10. Z njuno primerjavo v vinifikacijah zadnjega dela poskusa smo v vinih SK6 določili predvsem večje vsebnosti 4MMP in 3MHA, kar se je odrazilo z intenzivnejšo tropsko aromo in boljšo celokupno kakovostjo teh vin.

6.2 SUMMARY

Wine yeasts play a major role in the vinification of grape must by transforming the grape sugars into ethanol and carbon dioxide during the process of alcoholic fermentation (AF). Furthermore, the yeasts form many volatile metabolites which shape the sensory quality of the produced wine. The market offers numerous yeast starter cultures for the conduction of AF, which influence the chemical and sensory quality of the produced wine very differently due to their genetically driven properties. In addition to the classic yeast starter cultures, which are commonly used in winemaking, an even greater emphasis is given to the use of mixed yeast starter cultures of the *Saccharomyces* genera, and also to the mixed yeast starter cultures of the *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* genera. The hybrid yeast strains and the yeast strains with adjusted metabolic pathways (mutants) proved to possess many advantages. The performance of yeasts during AF is greatly influenced by the grape must composition and fermentation conditions. Yeast starter cultures can greatly influence the content of glutathione (GSH) in the produced wine, which is one of the most important antioxidants because it binds the oxidation products, which are formed during oxidation of phenolic compounds, and by that, it limits the quantity of brown pigments. In this manner, GSH also protects many aromatic compounds in wine against oxidation. One of the most typical aromatic compounds in sauvignon blanc wines are methoxypyrazines, which impart green aromas and volatile thiols and these contribute to the tropic wine aromas. Both types of the compounds originate from the grapes. Volatile thiols are present in the grapes in the form of non-volatile odorless precursors, which are released to become volatile only during AF by the action of yeast lyase and alcohol acetyltransferase. Various yeast starter cultures have a very different ability to release volatile thiols from their precursors, which greatly influences the final sensory quality of wine. The selection of an appropriate starter culture to conduct AF is therefore crucial for the production of wines with enhanced chemical and sensory quality.

The main goal of the performed research was to determine the influence of yeast starter culture purity, different commercial wine yeast strains and their combinations (mixed cultures), and also to examine the conditions of AF (temperature and working volume) on the content of GSH, hydroxycinnamic acids (HCK) and the main aromatic compounds in sauvignon blanc wines (*Vitis vinifera* L.) and by that, finally, on its sensory quality. Vinifications were conducted on three vintages of sauvignon blanc grape must from the winegrowing region of Podravje, at different fermentation temperatures and in different working volumes, which enabled us to study the influence of grape must composition and fermentation conditions on the chemical and sensory quality of wine, and also the transferability of the results from the microvinification to industrial scales. Experiment 1 was performed to evaluate the influence of the bacteria presence in yeast starter cultures on the content of GSH and other chemical parameters

of wine by conducting vinifications with purified and unpurified yeast starter cultures. In experiment 2, four mixed yeast starter cultures were evaluated for their influence on the chemical and sensory quality of wine. In experiment 3, six yeast starter cultures were used, two of which were already used in experiment 2, to conduct AF at two fermentation temperatures – lower (recommended for each yeast strain) and higher (cellar). In experiment 4, three previously used (in experiment 3) yeast starter cultures were included in microvinifications at cellar temperature (lower temperature) and on the industrial scale at recommended temperature (higher temperature). Based on the gathered information about each investigated yeast starter culture, experiment 5 was conducted with two of the most promising yeast starter cultures, in vinifications at cellar (higher) temperature and controlled (lower) temperature, which was regulated during AF in order to adjust fermentation temperature to achieve better yeast performance. During AF the fermentation kinetics and GSH content were monitored in some of the experiments. After the completion of AF the basic chemical parameters, content of free amino nitrogen (FAN), HCK, GSH, volatile thiols and methoxypyrazines were determined, and the sensory analyses of produced young wines were performed. The obtained analytical data were statistically processed with the use of principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA).

The comparison of vinifications of sauvignon blanc must vintage 2009 conducted with purified and unpurified yeast starter cultures SK1-SK5 in experiment 1 showed an important influence of yeast starter culture purity on the content of GSH in the produced wines. Especially the yeast starter cultures SK1 and SK2 preserved significantly more GSH in wine in the form of purified cultures, while the yeast starter culture SK3 preserved it more in the form of unpurified culture. The content of GSH progressively decreased during AF, irrespective of the yeast starter culture purity, which is contrary to the literature data describing a decrease of GSH content in the initial phase of AF and its increase with yeast cells autolysis in the later phases and during maturing wine on lees. During the three-and-a-half-month maturing of wine on lees (with purified starter cultures) the content of GSH in our experiment further decreased, with the exception of wines SK3, in which its content slightly increased due to early autolysis of yeast cells. The progressive decrease in GSH content during AF and maturing of wine on lees might be the consequence of different yeast metabolism of GSH which is added to the grape must (like in our experiment) and GSH naturally present in grape must. Focusing on the content of reducing sugars in wines, better fermentation kinetics was confirmed for purified yeast starter cultures. The purity of starter cultures influenced the formation of volatile acidity (HK) by the starter cultures SK3 and SK4 which formed higher contents of HK in unpurified form. Yeast starter culture SK1 formed higher contents of HK irrespective of the culture purity. Nitrogen consumption during AF was not significantly influenced by the purity of yeast starter cultures. Yeast starter culture SK1 had the lowest, and the yeast starter culture SK4 the highest nitrogen requirements

during AF irrespective of the culture purity. The content of HCK mainly decreased during AF, with the exception of caffeic acid of which content slightly increased. The wines produced with the starter culture SK1 had the highest contents of HCK irrespective of the culture purity. Higher ability to release 4MMP and 3MH during AF was confirmed for the starter culture SK4, while the highest ability to release 3MHA was confirmed for the starter cultures SK1 and SK4. Examining the methoxypyrazine contents in the wines produced with unpurified yeast starter cultures we confirmed that the yeast starter cultures do not influence their content.

The comparison of vinifications of sauvignon blanc must vintage 2009 conducted with the mixed yeast starter cultures SK6-SK9 in experiment 2 showed an important influence of yeast starter cultures on the chemical and sensory quality of wine. Yeast strain *Torulasporea delbrueckii* showed significantly weaker fermentation kinetics compared to other (*Saccharomyces* spp.) starter cultures. The east starter culture SK6 formed significantly the highest amounts of HK in wine. Yeast starter cultures showed significantly different nitrogen requirements, with the starter culture SK9 showing the lowest and starter culture SK8 the highest nitrogen requirements during AF. The content of HCK decreased during AF, with the exception of caffeic acid of which content slightly increased. We also confirmed the influence of yeast starter cultures on the content of HCK in wines, since the wines produced with starter culture SK6 contained significantly the highest, and the wines produced with the starter culture SK8 significantly the lowest amounts of HCK. Yeast starter cultures greatly influenced the content of GSH during AF and in the produced wines. The content of GSH significantly increased in the exponential phase of yeast growth, with the exception of vinifications conducted with yeast strain *T. delbrueckii* (SK9), in which its content significantly decreased. Towards the final stage of AF the GSH content decreased and was lower in produced wines than initially in the must. The exceptions were vinifications SK9 in which the contents of GSH increased after co-inoculation with *S. cerevisiae* yeast strain, but were still lower than initially in the must. At the completion of AF the highest contents of GSH were determined in wines SK6 and the lowest in wines SK8. Yeast starter cultures dramatically influenced the content of volatile thiols in wines. The yeast starter culture SK7 was confirmed to have had the highest and the starter culture SK9 the lowest ability to release 4MMP. The highest ability to release 3MHA was confirmed for the starter cultures SK6 and SK9, and the lowest for the starter culture SK8. Again, in this part of the experiment we confirmed that the yeast starter cultures do not influence the content of methoxypyrazines in the produced wines. Sensory attributes of tropical fruits aroma and overall wine quality were ranked higher in wines SK7 and SK8 than in wines SK6 and SK9.

The comparison of vinifications of sauvignon blanc must vintage 2010 at two different fermentation temperatures and conducted with the yeast starter cultures SK6, SK7 and SK10-SK13 in experiment 3 showed an important influence of temperature on yeast

metabolism and by that on the chemical and sensory quality of the produced wine. Yeast starter cultures showed faster fermentation kinetics at higher fermentation temperature. Once again this experiment confirmed weaker fermentation of yeast strain *T. delbrueckii* compared to other (*Saccharomyces* spp.) starter cultures. Higher fermentation temperature resulted in the formation of higher amounts of HK by the starter cultures SK6 and SK7. The yeast starter culture SK6 formed higher amounts of HK irrespective of the fermentation temperature. At higher fermentation temperatures this starter culture formed HK in amounts even higher than the maximum legal limit. The wines produced at higher fermentation temperature proved to contain higher amounts of FAN probably due to the earlier autolysis of the yeast cells releasing the nitrogen back into the wine. Regardless of the fermentation temperature the starter culture SK6 showed the lowest and the starter culture SK12 the highest nitrogen requirements. The content of HCK in wines was not significantly influenced by the fermentation temperature. Irrespective of the fermentation temperature the highest contents of HCK were determined in the wines produced with the starter culture SK6, and the lowest in the wines produced with the starter cultures SK11 in SK12. Lower fermentation temperatures resulted in the wines with higher contents of GSH probably due to steadier fermentation kinetics of the yeast starter cultures. The highest contents of GSH were determined in wines SK10, and the lowest in wines SK13 irrespective of the fermentation temperature. Fermentation temperature greatly influenced the yeast starter cultures' ability to release volatile thiols. The wines at higher fermentation temperature had higher contents of 4MMP (except SK7) and 3MH (except SK10 and SK11), and lower contents of 3MHA (except SK7). At lower fermentation temperature the highest amounts of 4MMP were released by the starter cultures SK11 and SK12, and the highest amounts of 3MH and 3MHA by the starter cultures SK10 and SK11. At higher fermentation temperature the highest amounts of 4MMP were also released by the starter cultures SK11 and SK12, the highest amounts of 3MH were released by the starter cultures SK12 and SK13, and the highest amounts of 3MHA by the starter cultures SK7 and SK12. The wines produced at lower fermentation temperature were determined to display higher ratings of all sensory attributes. In correlation with the content of volatile thiols, wines SK6, SK12 and SK13 were rated the highest for sensory attributes of heavy and fresh tropical fruits aroma. The sensory attribute of overall quality was rated the highest especially in wines SK12 and SK13. The sensory attribute of fermentation aroma was rated higher in wines SK6 probably due to slower fermentation kinetics of this starter culture. Wines SK6 and SK10 were rated higher for sensory attribute of green aroma.

The comparison of vinifications of sauvignon blanc must vintage 2010 at two different fermentation temperatures and working volumes, conducted with the yeast starter cultures SK6, SK10 and SK11 in experiment 4 showed an important influence yeast starter cultures, fermentation temperature and working volume on individual parameters

in wine. Regarding the highest contents of RS in wines SK11 produced at lower fermentation temperature and in smaller working volumes, the lower temperatures proved to be inappropriate for the conduction of AF with the starter culture SK11. At higher fermentation temperatures and in larger working volumes the starter cultures SK6 and SK10 generated higher content of HK. Irrespective of the fermentation temperature and working volume the starter culture SK6 formed the highest and starter culture SK10 the lowest amount of HK in wine. Higher contents of HCK were determined in the wines produced at lower fermentation temperatures and in smaller working volumes. In this experiment the yeast starter cultures did not significantly influence the content of HCK. The contents of GSH were higher in the wines produced at higher fermentation temperatures and in larger working volumes, probably as a consequence of the ratio between the surface and volume of larger fermentors. Regardless of the fermentation temperature and working volume the highest contents of GSH were determined in wines SK10 and the lowest in wines SK11. At higher fermentation temperatures and in larger working volumes the wines were produced with higher amounts of 4MMP (except SK11) and 3MHA (except SK11), and lower amounts of 3MH. The yeast starter culture SK6 was confirmed to have the highest ability to release 4MMP and 3MHA irrespective of the fermentation temperature and working volume. At lower fermentation temperature and in smaller working volumes the highest ability to release 3MH was determined for the starter cultures SK10 and SK11. On the contrary, at higher fermentation temperature and in larger working volumes the highest ability to release 3MH was confirmed for the starter cultures SK6 and SK11. Neither the yeast starter culture nor the fermentation temperature nor the working volume influenced the content of methoxypyrazines in wines. The wines SK6 produced at lower fermentation temperature and in smaller working volume were rated the highest for sensory attributes of heavy and fresh tropical fruits aroma, and also for overall wine quality. Amongst the wines produced at higher fermentation temperature and in larger working volume the wine SK10 was rated the highest for sensory attributes of heavy tropical fruits aroma and overall quality, while wines SK6 were rated the highest for the attribute of fresh tropical fruits aroma.

The comparison of vinifications of sauvignon blanc must vintage 2011 at two different fermentation temperatures and conducted with the yeast starter cultures SK6 and SK10 in experiment 5 showed an important influence of temperature on yeast metabolism and by that on chemical and sensory quality of the produced wine. Both starter cultures displayed faster fermentation kinetics at higher fermentation temperature. In this experiment we again confirmed weaker fermentation of yeast strain *T. delbrueckii* (SK10) compared to yeast strain *S. cerevisiae* (SK6). The yeast starter culture SK6 formed twice as much HK than the yeast starter culture SK10. The starter culture SK6 formed higher content of HK at lower fermentation temperature, even in concentrations above the maximum legal limit, probably due to the stress caused by the quick lowering

of the fermentation temperature in the initial phase of AF. Nitrogen consumption of yeast starter cultures was not influenced by fermentation temperature. Irrespective of the fermentation temperature the starter culture SK6 showed lower nitrogen requirements than the starter culture SK10. The wines produced at lower fermentation temperature had significantly lower contents of HCK and GSH than the wines produced at higher fermentation temperature. The decrease of HCK and GSH in these wines was probably due to weaker fermentation kinetics and longer duration of AF, and also due to the stress provoked by the quick lowering of the fermentation temperature in the initial phase of AF. While the starter cultures did not influence the content of HCK in wine, they influenced the content of GSH in the produced wine since the starter culture SK10 preserved higher contents of GSH in wine than the starter culture SK6, irrespective of the fermentation temperature. The wines with lower fermentation temperature displayed lower contents of all three volatile thiols (except 4MMP in SK10). The highest contents of volatile thiols 4MMP and 3MHA were determined in the wines SK6 produced at higher fermentation temperature. The yeast starter culture SK10 was confirmed to have higher ability of releasing 3MH than the starter culture SK6, irrespective of the fermentation temperature. Sensory attributes of heavy and fresh tropical fruits aroma, and also of overall quality, were rated significantly lower only in the wines SK10 produced at higher fermentation temperature. Otherwise, (statistically insignificant) the wines SK6 produced at higher fermentation temperature were rated highest for all three mentioned sensory attributes.

In summary, the purification of yeast starter cultures positively affected the fermentation kinetics and in some cases the formation of lower contents of HK and preservation of higher contents of GSH in produced wines. Amongst the investigated starter cultures the SK6 typically formed higher amounts of HK, showed lower nitrogen requirements and preserved the highest contents of HCK in wines. Starter culture SK10 preserved the highest contents of GSH in wines. The ability of individual starter culture to release volatile thiols was greatly dependent of the fermentation temperature – yeasts released more 4MMP and 3MH, but less 3MHA at higher fermentation temperatures. Wines with higher contents of volatile thiols, especially 4MMP, were mostly rated higher for sensory attributes tropical fruits aroma and overall quality, which was confirmed mostly for wines SK6, SK7, SK11, SK12 and SK13. Higher fermentation temperatures resulted with faster fermentation kinetics and consequently lower contents of GSH and HCK in produced wines. Lowering the fermentation temperature in the initial phase of AF negatively affected the yeast metabolism, which resulted in the decrease of HCK and GSH content and also in the decrease of all three volatile thiols in wines. Based on the final results of GSH and volatile thiols contents in wines the starter cultures SK6 and SK10 were, amongst the investigated starter cultures, proposed to be the most appropriate for sauvignon wine production. By comparing the two starter cultures in the vinifications of the last part of the experiment, wines SK6 contained the

highest amounts of 4MMP and 3MHA, which resulted in more intense tropical fruits aroma and better overall quality of these wines.

7 VIRI

- Adams D.O., Liyanage C. 1993. Glutathione increases in grape berries at the onset of ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 3: 333-338.
- Albers E., Larsson C., Liden G., Niklasson C., Gustafsson L. 1996. Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3187-3195.
- Allen M.S., Lacey M.J., Harris R.L.N., Brown W.V. 1991. Contribution of methoxypyrazines to sauvignon blanc wine aroma. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 2: 109-112.
- Anchor Alchemy II – Product Data Sheet. 2013. Cape Town, Anchor Wine Yeast: 1 str.
<http://www.oenobrand.com/files/PDF/Anchor/Alchemy/Anchor-Alchemy-11-Product-Data-Sheet-EN.pdf> (6. mar. 2013)
- Anchor Exotics SPH – Product Data Sheet. 2013. Cape Town, Anchor Wine Yeast: 1 str.
<http://www.oenobrand.com/files/PDF/Anchor/Exotics/Anchor-Exotics-SPH-White-Product-Data-Sheet-EN.pdf> (6. mar. 2013)
- Anchor VIN 7 – Product Data Sheet. 2013. Cape Town, Anchor Wine Yeast: 1 str.
<http://www.oenobrand.com/files/PDF/Anchor/Anchor-VIN-7-Product-Data-Sheet-EN.pdf> (6. mar. 2013)
- Anderson M.E. 1998. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*, 111-112: 1-14.
- Andorrà I., Berradre M., Mas A., Esteve-Zarzoso B., Guillamón J.M. 2012. Effect of mixed culture fermentations on yeast populations and aroma profile. *LWT-Food Science and Technology*, 49: 8-13.
- Andujar-Ortiz I., Pozo-Bayón M.Á., Moreno-Arribas M.V., Martín-Álvarez P.J., Rodríguez-Bencomo J.J. 2012. Reversed-phase high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the analysis of glutathione and its precursor γ -glutamyl cysteine in wines and model wines supplemented with oenological inactive dry yeast preparations. *Food Analytical Methods*, 5: 154-161
- Aranda A., Matallana E., del Olmo M. 2011. *Saccharomyces* yeasts I: Primary fermentation. V: Molecular wine microbiology. Carrascosa A.V., Munoz R., González R. (eds.). London, Elsevier: 1-31.

- Arroyo-López F.N., Pérez-Torrado R., Querol A., Barrio E. 2010. Modulation of the glycerol and ethanol syntheses in the yeast *Saccharomyces kudriavzevii* differs from that exhibited by *Saccharomyces cerevisiae* and their hybrid. *Food Microbiology*, 27: 628-637.
- Bakker J., Clarke R.J. 2012. Wine flavour chemistry. 2nd ed. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.: 418 str.
- Bavčar D. 2009. Kletarjenje danes. 2. izd. Ljubljana, Kmečki glas: 286 str.
- Belancic A., Agosin E. 2007. Methoxypyrazines in grapes and wines of *Vitis vinifera* cv. Carmenere. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 4: 462-469.
- Bell S.J., Henschke P.A. 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11: 242-295.
- Belloch C., Orlic S., Barrio E., Querol A. 2008. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 188-195.
- Bely M., Stoeckle P., Masneuf-Pomarède I., Dubourdieu D. 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 312-320.
- Betés-Saura C., Andrés-Lacueva C., Lamuela-Raventós R.M. 1996. Phenolics in white free run juices and wines from Penedès by high-performance liquid chromatography: Changes during vinification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 3040-3046.
- Borneman A.R., Desany B.A., Riches D., Affourtit J.P., Forgan A.H., Pretorius I.S., Egholm M., Chambers P.J. 2011. The genome sequence of the wine yeast VIN7 reveals an allotriploid hybrid genomewith *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* origins. *FEMS Yeast Research*, 12: 88-96.
- Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, Chapman and Hall: 604 str.
- Cadière A., Ortiz-Julien A., Camarasa C., Dequin S. 2011. Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased *in vivo* flux through the pentose phosphate pathway. *Metabolic Engineering*, 13: 263-271.
- Candelon N., Shinkaruk S., Bennetau B., Bennetau-Pelissero C., Dumartin M.L., Degueil M., Babin P. 2010. New approach to asymmetrically substituted methoxypyrazines, derivatives of wine flavors. *Tetrahedron*, 66: 2463-2469.

- Capone D.L., Sefton M.A., Jeffery D.W. 2011. Application of a modified method for 3-mercaptohexan-1-ol determination to investigate the relationship between free thiol and related conjugates in grape juice and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 4649-4658.
- Carrau F.M., Medina K., Farina L., Boido E., Henschke P.A., Dellacassa E. 2008. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: effects of yeast assimilable nitrogen in two model strains. *FEMS Yeast Research*, 8, 7: 1196-1207.
- Cheraiti N., Guezenec S., Salmon J.M. 2005. Redox interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 255-260.
- Cheynier V.F., Trousdale E.K., Singleton V.L., Salgues M.J., Wylde R. 1986. Characterization of 2-S-glutathionylcaftaric acid and its hydrolysis in relation to grape wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34, 2: 217-221.
- Cheynier V.F., Van Hulst M.W.J. 1988. Oxidation of *trans*-caftaric acid and 2-S-glutathionylcaftaric acid in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36: 10-15.
- Cheynier V., Souquet J.M., Moutounet M. 1989. Glutathione content and glutathione to hydroxycinnamic acid ratio in *Vitis vinifera* grapes and musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 4: 320-324.
- Ciani M., Beco L., Comitini F. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108: 239-245.
- Ciani M., Comitini F. 2011. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Annals of Microbiology*, 61: 25-32.
- Clemente-Jimenez J.M., Mingorance-Cazorla L., Martínez-Rodríguez S., Las Heras-Vázquez F.J., Rodríguez-Vico F. 2005. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 98: 301-308.
- Coetzee C., Du Toit W.J. 2012. A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with focus on certain positive volatile thiols. *Food Research International*, 45: 287-298.
- Comitini F., Gobbi M., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M. 2011. Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multi starter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 28: 873-882.

- Commission Regulation (EEC), No. 2676/90 of 17 September 1990 determining Community methods for the analysis of wines. 1990. Official Journal of the European Communities, 33, L272: 1-129.
- Commission Regulation (EC), No. 355/2005 of 28 February 2005 amending Regulation (EEC) N. 2676/90 determining Community methods for the analysis of wines. 2005. Official Journal of the European Union, 48, L 56: 3-7.
- Darriet P., Tominaga T., Lavigne V., Boidron J.N., Dubourdieu D. 1995. Identification of powerful aromatic component of *Vitis vinifera* L. var. sauvignon wines: 4-mercapto-4-methylpentan-2-one. Flavour and Fragrance Journal, 10, 6: 385-392.
- Dhaoui M., Auchère F., Blaiseau P.L., Lesuisse E., Landoulsi A., Camadro J.M., Haguenauer-Tsapis R., Belgareh-Touzé N. 2011. Gex1 is a yeast glutathione exchanger that interferes with pH and redox homeostasis. Molecular Biology of the Cell, 22: 2054-2067.
- Domizio P., Romani C., Lencioni L., Comitini F., Gobbi M., Mannazzu I., Ciani M. 2011. Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. International Journal of Food Microbiology, 147: 170-180.
- Dubourdieu D., Tominaga T., Masneuf J., Peyrot de Gachons C., Murat M.L. 2000. The role of yeasts in grape flavor development during fermentation: The example of Sauvignon Blanc. V: Proceedings of American Society of Enology and Viticulture 50th Anniversary Annual Meeting, Seattle, Washington, June 19-23, 2000. Rantz J.M. (ed.). CA, Davis, American Society of Enology and Viticulture: 196-203.
- Dubourdieu D., Lavigne-Cruege V. 2004. The role of glutathione on the aromatic evolution of dry white wine. Vinidea.net Wine Internet Technical Journal, 02, 2: 9 str. <http://www.infowine.com> (6. mar. 2013)
- Dubourdieu D., Marullo P., Bely M., Masneuf-Pomarède I., Aigle M. 2004. Inheritable nature of oenological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. FEMS Yeast Research, 4: 711-719
- Dubourdieu D., Tominaga T., Masneuf I., Des Gachons C.P., Murat M.L. 2006. The role of yeasts in grape flavor development during fermentation: the example of Sauvignon blanc. American Journal of Enology and Viticulture, 57, 1: 81-88.

- Dubourdieu D., Tominaga T. 2009. Polyfunctional thiol compounds. V: Wine chemistry and biochemistry. Moreno-Arribas M.V., Polo M.C. (eds.). New York, Springer: 275-290.
- Du Toit W.J., Lisjak K., Stander M., Prevo D. 2007. Using LC-MSMS to assess glutathione levels in South African white grape juices and wines made with different levels of oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8: 2765-2769.
- Du Toit W. 2007. Glutathione report of different yeast strains conducted for Anchor Yeast. Eppingdust, New World Wine Maker: 5 str.
<http://www.newworldwinemaker.com/articles/view?id=324> (17. feb. 2010)
- El-Sayed A.M. 2012. The Pherobase: Database of pheromones and semiochemicals: 2 str.
<http://www.pherobase.com> (6. mar. 2013)
- Erasmus D.J., Cliff M., Van Vuuren H.J.J. 2004. Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 4: 371-378.
- Fahey R.C. 2001. Novel thiols in prokaryotes. *Annual Review of Microbiology*, 55: 333-356.
- Favale S., Pietromarchi P., Ciolfi G. 2007. Metabolic activity and interactions between two strains, *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *bayanus* (SBC2) and *Saccharomyces cerevisiae* r.f. *uvarum* (S6u) in pure and mixed culture fermentations. *Vitis*, 46, 1: 39-43.
- Fedrizzi B., Versini G., Lavagnini I., Badocco D., Nicolini G., Magno F. 2008. Hyphenated gas chromatography-mass spectrometry analysis of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in wine: Comparison with results of other sampling procedures via robust regression. *Analytica Chimica Acta*, 621: 38-43.
- Fedrizzi B., Pardon K.H., Sefton M.A., Eelsey G.M., Jeffery D.W. 2009. First identification of 4-S-glutathionyl-4-methylpentan-2-one, a potential precursor of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one, in Sauvignon blanc juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 991-995.
- Fermol Sauvignon. 2013. Brescia, AEB group: 1 str.
<http://www.aeb-group.com/or4/or?uid=aeb.main.index&oid=76253> (6. mar. 2013)

- Ferreira V., Ortín N., Cacho J.F. 2007. Optimization of a procedure for the selective isolation of some powerful aroma thiols: Development and validation of a quantitative method for their determination in wine. *Journal of Chromatography A*, 1143: 190-198.
- Fleet G.H. 1999. Microorganisms in food ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 101-117.
- Fleet G.H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 11-22.
- Fracassetti D., Lawrence N., Tredoux A.G.J., Tirelli A., Nieuwoudt H.H., Du Toit W.J. 2011. Quantification of glutathione, catechin and caffeic acid in grape juice and wine by a novel ultra-performance liquid chromatography method. *Food Chemistry*, 128: 1136-1142.
- Freedman D., Pisani R., Purves R. 2007. *Statistics*. 4th ed. New York, W. W. Norton &Co.: 697 str.
- Gamero A., Hernández-Orte, Querol A., Ferreira V. 2011. Effect of aromatic precursor addition to wine fermentations carried out with different *Saccharomyces* species and their hybrids. *International Journal of Food Microbiology*, 147: 33-44.
- Gangl H., Batusic M., Tscheik G., Tiefenbrunner W., Hack C., Lopandic K. 2009. Exceptional fermentation characteristics of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *New Biotechnology*, 25: 244-251.
- Gasparič A., Komel R. 1996. Metode izboljšanja delovnih mikroorganizmov. V: *Biotehnologija, osnovna znanja*. Rapor P. (ur.). Ljubljana, BIA d.o.o.: 185-212.
- Giovani G., Rosi I. 2007. Release of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* thermosensitive autolytic mutants during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 116: 19-24.
- Giudici P., Solieri L., Pulvirenti A.M., Cassanelli S. 2005. Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66: 622-628.
- Glutathione. 2011. Houston, Bridgat.com: 2 str.
<http://www.bridgat.com/glutathione-o252142.html#.UazpR0A9MmY>
(6. mar. 2013)
- Gonzalez R., Martinez-Rodriguez A.J., Carrascosa A.V. 2003. Yeast autolytic mutants potentially useful for sparkling wine production. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 21-26.

- González R., Munoz R., Carrascosa A.V. Production of wine starter cultures. 2011. V: Molecular wine microbiology. Carrascosa A.V., Munoz R., González R. (eds.). London, Elsevier: 279-302.
- González S.S., Gallo L., Climent M.D., Barrio E., Querol A. 2007. Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. International Journal of Food Microbiology, 116: 11-18.
- Grossmann M., Linsenmeyer H., Muno H., Rapp A. 1996. Use of oligo-strain yeast cultures to increase complexity of wine aroma. Viticultural and Enological Science, 51, 3-4: 175-179.
- Guth H. 1997. Identification of character impact odorants of different white wine varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 3022-3026.
- Henschke P.A., Jiranek V. 1993. Yeast-growth during fermentation. V: Wine microbiology and biotechnology. Fleet G.H. (ed.). Chur, Harwood Academic: 27-54.
- Hernández-Orte P., Cersosimo M., Loscos N., Cacho J., Garcia-Moruno E., Ferreira V. 2008. The development of varietal aroma from non-floral grapes by yeasts of different genera. Food Chemistry, 107: 1064-1077.
- Howell K.S., Swiegers J.H., Elsey G.M., Siebert T.E., Bartowsky E.J., Fleet G.H., Pretorius I.S., De Barros Lopes M.A. 2004. Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. FEMS Microbiology Letters, 240: 125-129.
- Howell K.S., Klein M., Swiegers J.H., Hayasaka Y., Elsey G.M., Fleet G.H., Høj P.B., Pretorius I.S., De Barros Lopes M.A. 2005. Genetic determinants of volatile-thiol release by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. Applied and Environmental Microbiology, 71, 9: 5420-5426.
- Howell K.S., Cozzolino D., Bartowsky E., Fleet G.H., Henschke P.A. 2006. Metabolic profiling as a tool for revealing *Saccharomyces* interactions during wine fermentation. FEMS Yeast Research, 6: 91-101.
- Hybrid wine yeasts. 2013. Cape Town, Anchor Wine yeast: 3 str.
<http://www.oenobrand.com/en/our-innovation/hybrid-wine-yeasts> (6. mar. 2013)
- Jackson R.S. 2000. Wine science: Principles, practice, perception. 2nd ed. San Diego, Academic Press: 648 str.

- Janeš L., Lisjak K., Vanzo A. 2010. Determination of glutathione content in grape juice and wine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 674: 239-242.
- Jenko M., Čuš F., Baša-Česnik H., Vanzo A., Janeš L., Pelengić R., Rusjan D. 2011. Vpliv sevov kvasovk na sestavo in senzorično kakovost vina sorte Traminec. V: *Vinarski dan 2011*, Ljubljana, 30. november 2011. Čuš F. (ur.). Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije: 37-48.
- Jenko M., Lisjak K., Košmerl T., Čuš F. 2013. The influence of yeast strain combinations on the quality of Sauvignon blanc wine. *Food Science and Technology Research*, 19, 1: 7-15.
- Jolly N.P., Augustyn O.P.H., Pretorius I.S. 2006. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 1: 15-39.
- Jones D.P. 1995. Glutathione distribution in natural products: absorption and tissue distribution. *Methods in Enzymology*, 252: 3-13.
- Julien A., Roustan J.L., Dulau L. Sablayrolles J.M. 2000. Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts: Technological Consequences. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46: 215-222.
- Kastelec D., Košmelj K. 2008. Diskriminantna analiza in klasifikacija: osnove in primer. *Acta agriculturae Slovenica*, 9, 1: 167-190.
- King E.S., Swiegers J.H., Travis B., Francis I.L., Bastian S.E.P., Pretorius I.S. 2008. Coinoculated fermentations using *Saccharomyces* yeasts affect the volatile composition and sensory properties of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon Blanc wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 10829-10837.
- King E.S., Kievit R.L., Curtin C., Swiegers J.H., Pretorius I.S., Bastian S.E.P., Francis I.L. 2010. The effect of multiple yeasts co-inoculations on Sauvignon Blanc wine composition, sensory properties and consumer preference. *Food Chemistry*, 122, 3: 618-626.
- King E.S., Osidacz P., Curtin C., Bastian S.E.P., Francis I.L. 2011. Assessing desirable levels of sensory properties in Sauvignon Blanc wines – consumer preferences and contribution of key aroma compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17: 169-180.

- Kobayashi H., Takase H., Kaneko K., Tanzawa F., Takata R., Suzuki S. 2010. Analysis of S-3-(heksan-1-ol)-glutathione and S-3-(heksan-1-ol)-L-cysteine in *Vitis vinifera* L. cv. Koshu for aromatic wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61: 176-185.
- Košmelj K. 2007. Metoda glavnih komponent: osnove in primer. *Acta agriculturae Slovenica*, 89, 1: 159-172.
- Kotseridis Y., Baumes R.L., Bertrand A., Skouroumounis G.K. 1999. Quantitative determination of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay. *Journal of Chromatography A*, 841: 229-237.
- Krieger-Weber S. 2009. Application of yeast and bacteria as starter cultures. V: *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. König H., Uden G., Fröhlich J. (eds.). Berlin, Heidelberg, Springer: 489-511.
- Kritzinger E.C., Stander M.A., Du Toit W.J. 2013. Assessment of glutathione levels in model solution and grape ferments supplemented with glutathione-enriched inactive dry yeast preparations using a novel UPLC-MS/MS method. *Food Additives & Contaminants*, 30, 1: 80-92.
- Lacey M.J., Allen M.S., Harris R.L.N., Brown W.V. 1991. Methoxypyrazines in Sauvignon blanc grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 2: 103-108.
- Lacroux F., Tregoat O., Van Leeuwen C., Pons A., Tominaga T., Lavigne-Cruège V., Dubourdieu D. 2008. Effect of foliar nitrogen and sulphur application on aromatic expression of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 42, 3: 1-8.
- Lallemand. 2013. Level2™ TD: A breakthrough in winemaking. Blagnac Cedex, Lallemand: 2 str.
<http://www.lallemandwine.com/spip.php?article575> (6. mar. 2013)
- Lallemand Australia Pty Ltd. 2012. *Oenology Portfolio, Australia & New Zealand*. Edwardstown, Lallemand: 56 str.
<http://www.winebiz.com.au/pdf/CB4001.pdf> (6. mar. 2013)
- Lallemand catalogue: Lallemand® Level2 TD. 2013. Blagnac Cedex, Lallemand: 2 str.
<http://www.lallemandwine.com/catalog/products/view/2899> (6. mar. 2013)
- Lallemand catalogue: Lalvin QA23®. 2013. Blagnac Cedex, Lallemand: 2 str.
<http://www.lallemandwine.com/catalog/products/view/37> (6. mar. 2013)

- Lavigne V., Pons A., Dubourdiou D. 2007. Assay of glutathione in must and wines using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection: Changes in concentration in dry white wines during alcoholic fermentation and aging. *Journal of Chromatography A*, 1139: 130-135.
- Li Y., Wei G., Chen J. 2004. Glutathione: a review on biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66, 3: 233-242.
- Li H., Guo A., Wang H. 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108: 1-13.
- Lisjak K., Šuklje K., Baša Česnik H., Janeš L., Vanzo A., Pelengić R. 2010. Spremljanje sekundarnih metabolitov med dozorevanjem grozdja sorte sauvignon: vpliv foliarnega gnojenja in redčenja grozdja. V: *Vinarski dan 2010*, Ljubljana, 17. november 2010. Čuš F. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 71-84.
- Lisjak K., Šuklje K., Baša Česnik H., Janeš L., Bregar Z. 2011. Aromatski potencial slovenskih sauvignonov. V: *Vinarski dan 2011*, Ljubljana, 30. november 2011. Čuš F. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 83-96.
- Maggu M., Winz R., Kilmartin P.A., Trought M.C.T., Nicolau L. 2007. Effect of skin contact and pressure on the composition of Sauvignon blanc must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 25: 10281-10288.
- Manzanares P., Vallés S., Viana F. 2011. Non-*Saccharomyces* yeasts in the winemaking process. V: *Molecular wine microbiology*. Carrascosa A.V., Munoz R., González R. (eds.). London, Elsevier: 85-110.
- Marais J. 1994. Sauvignon blanc cultivar aroma – A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 15, 2: 41-45.
- Marchand S., de Revel G. 2010. A HPLC fluorescence-based method for glutathione derivatives quantification in must and wine. *Analytica Chimica Acta*, 660: 158-163.
- Masneuf-Pomarède I., Mansour C., Murat M.L., Tominaga T., Doubourdiou D. 2006. Influence of fermentation temperature on volatile thiols concentrations in Sauvignon blanc wines. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 3: 385-390.
- Mateo-Vivaracho L., Cacho J., Ferreira V. 2007. Quantitative determination of wine polyfunctional mercaptans at nanogram per liter level by gas chromatography-negative ion mass spectrometric analysis of their pentafluorobenzyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, 1146: 242-250.

- Mateo-Vivaracho L., Cacho J., Ferreira V. 2009. Selective preconcentration of volatile mercaptans in small SPE cartridges: Quantitative determination of trace odor-active polyfunctional mercaptans in wine. *Journal of Separation Science*, 32: 3845-3853.
- Mattivi F., Fedrizzi B., Zenato A., Tiefenthaler P., Tempesta S., Perenzoni D., Cantarella P., Simeoni F., Vrhovšek U. 2012. Development of reliable analytical tolos for evaluating the influence of reductive winemaking on the quality of Lugana wines. *Analytica Chimica Acta*, 732: 194-202.
- Maturano Y.P., Rodríguez Assaf L.A., Toro M.E., Nally M.C., Vallejo M., Castellanos de Figueroa L.I., Combina M., Vazquez F. 2012. Multi-enzyme production by pure and mixed cultures of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 155: 43-50.
- Mavrič Štrukelj M., Brdnik M., Hauptman S., Štabuc R., Novak E., Martinčič J., Škvarč A. 2012. Vinogradniške razmere v Sloveniji danes. V: 4. slovenski vinogradniško-vinarski kongres z mednarodno udeležbo, Nova Gorica, Slovenija, 25., 26. 1. 2012, zbornik referatov. Rusjan D. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 1-28.
- Medina K., Boido E., Dellacassa E., Carrau F. 2012. Growth of non-*Saccharomyces* yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 157: 245-250.
- Meilgaard M., Civille G.V., Carr B.T. 1999. Sensory evaluation techniques. 3rd ed. Boca Raton, CRC Press: 387 str.
- Miyake T., Hazu T., Yoshida S., Kanayama M., Tomochika K., Shinoda S., Ono B. 1998. Glutathione transport systems in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 10: 1858-1864.
- Molina A.M., Guadalupe V., Valera C., Swiegers J.H., Pretorius I.S., Agosin E. 2009. Differential synthesis of fermentative aroma compounds of two related wine yeast strains. *Food Chemistry*, 117: 189-195.
- Moreira N., Mendes F., Pereira O., Guedes de Pinho P., Hogg T., Vasconcelos I. 2002. Volatile sulphur compounds in wines related to yeast metabolism and nitrogen composition of grape musts. *Analytica Chimica Acta*, 458: 157-167.
- Moreira N., Mendes F., Hogg T., Vasconcelos I. 2005. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 103, 3: 285-294.

- Moreno J.J., Millan C., Ortega J.M., Medina M. 1991. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *Journal of Industrial Microbiology*, 7: 181-190.
- Murat M.L., Tominaga T., Dubourdieu D. 2001a. Assessing the aromatic potential of Cabernet Sauvignon and Merlot musts used to produce rose wine by assaying the cysteinylated precursor of 3-mercaptohexan-1-ol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:5412-5417.
- Murat M.L., Masneuf I., Darriet P., Lavigne V., Tominaga T., Dubourdieu D. 2001b. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains on the liberation of volatile thiols in Sauvignon blanc wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52: 136-139.
- Nicolini G., Larcher R., Versini G. 2004. Status of yeast assimilable nitrogen in Italian grape musts and effects of variety, ripening and vintage. *Vitis*, 43, 2: 89-96.
- Noctor G., Foyer C.H. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249-279.
- OIV. 2012. OIV-Oeno 329-2009. Active dry yeasts (A.D.Y.) *Saccharomyces* spp. V: International Oenological Codex. Paris, Organisation Internationale de la Vigne et du Vin: 4 str.
<http://www.oiv.int/oiv/info/enpublicationoiv> (6. mar. 2013)
- Okuda T., Yokotsuka K. 1999. Levels of glutathione and activities of related enzymes during ripening of Koshu and Cabernet Sauvignon grapes and during winemaking. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 3: 264-270.
- Oliviera C.M., Ferreira A.C.S., De Freitas V., Silva A.M.S. 2011. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44: 1115-1126.
- Ong B.Y., Nagel C.W. 1978. Hydroxycinnamic acid-tartaric acid ester content in mature grapes and during the maturation of white Riesling grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 29, 4: 277-281.
- Park S.K., Boulton R.B., Noble A.C. 2000a. Formation of hydrogen sulphide and glutathione during fermentation of white grape musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 2: 91-97.
- Park S.K., Boulton R.B., Noble A.C. 2000b. Automated HPLC analysis of glutathione and thiol-containing compounds in grape juice and wine using pre-column derivatization with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 68: 475-480.

- Parr W.V., Green A.J., White K.G., Sherlock R.R. 2007. The distinctive flavour of New Zealand Sauvignon Blanc: Sensory characterisation by wine professionals. *Food Quality and Preference*, 18, 6: 849-861.
- Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F. 2003. Analysis of glutathione: implication in redox detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 333: 19-39.
- Patel S., Shibamoto T. 2002. Effect of different strains of *Saccharomyces cerevisiae* on production of volatiles in Napa Gamay wine and Petite Sirah wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5649-5653.
- Patel P., Herbst-Johnstone M., Lee S.A., Gardner R.C., Weaver R., Nicolau L., Kilmartin P.A. 2010. Influence of juice pressing conditions on polyphenols, antioxidants, and varietal aroma of Sauvignon blanc microferments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12: 7280-7288.
- Penninckx M.J. 2002. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Research*, 2: 295-305.
- Pérez-Través L., Lopes C.A., Barrio E., Querol A. 2012. Evaluation of different genetic procedures for the generation of artificial hybrids in *Saccharomyces* genus for winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, 156: 102-111.
- Peyrot des Gachons C., Tominaga T., Dubourdieu D. 2002. Sulfur aroma precursor present in *S*-glutathione conjugate form: identification of *S*-3-(hexan-1-ol)-glutathione in must from *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4076-4079.
- Plata C., Millán C., Mauricio J.C., Ortega J.M. 2003. Formation of ethyl acetate and isoamyl acetate by various species of wine yeasts. *Food Microbiology*, 20: 217-224.
- Povhe Jemec K., Raspor P. 2005. Initial *Saccharomyces cerevisiae* concentration in single or composite cultures dictates bioprocess kinetics. *Food Microbiology*, 22: 293-300.
- Pócsi I., Prade R.A., Penninckx M.J. 2004. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 49: 1-76.
- Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 43: 5336-5357.
- Pretorius I.S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16: 675-729.

- Querol A., Bond U. 2009. The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 293: 1-10.
- Rauhut D. 1993. Yeasts-production of sulphur compounds. V: *Wine microbiology and biotechnology*. Fleet G.H. (ed.). Chur, Harwood Academic: 183-223.
- Renault P., Miot-Sertier C., Marullo P., Hernández-Orte P., Lagarrigue L., Lonvaud-Funel A., Bely M. 2009. Genetic characterization and phenotypic variability in *Torulasporea delbrueckii* species: Potential applications in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*, 134: 201-210.
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. 2006. *Handbook of enology. Volume 1: The microbiology of wine and vinifications*. 2nd ed. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.: 497 str.
- Rieger R., Michaelis A., Green M.M. 1976. *Glossary of genetics and cytogenetics: Classical and molecular*. Berlin, Springer Verlag: 647 str.
- Rigaud J., Cheynier V., Souquet J.M., Moutounet M. 1991. Influence of must composition on phenolic oxidation kinetics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57, 1: 55-63.
- Rodríguez M. E., Lopes C.A., Barbagelata R.J., Barda N.B., Caballero A.C. 2010. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. *International Journal of Food Microbiology*, 138: 19-25.
- Rodríguez-Bencomo J.J., Schneider R., Lepoutre J.P., Rigou P. 2009. Improved method to quantitatively determine powerful odorant volatile thiols in wine by headspace solid-phase microextraction after derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1216: 5640-5646.
- Rojas V., Gil J.V., Piñaga F., Manzanares P. 2003. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 86:181-188.
- Rollini M., Manzoni M. 2006. Influence of different fermentation parameters on glutathione volumetric productivity by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 41: 1501-1505.
- Rosenfeld E., Beauvoit B., Blondin B., Salmon J.M. 2003. Oxygen consumption by anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* in enological conditions: effect on fermentation kinetics. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 113-121.

- Rusjan T., Vodovnik Plevnik T., Hudoklin S. 2012. Razmere v slovenskem vinarstvu danes. V: 4. slovenski vinogradniško-vinarski kongres z mednarodno udeležbo, Nova Gorica, Slovenija, 25., 26. 1. 2012, zbornik referatov. Rusjan D. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani: 29-50.
- Sadoudi M., Tourdot-Maréchal R., Rousseaux S., Steyer D., Gallardo-Chacón J.J., Ballester J., Vichi S., Guérin-Schneider R., Caixach J., Alexandre H. 2012. Yeast-yeast interactions revealed by aromatic profile analysis of Sauvignon Blanc wine fermented by single or co-culture of non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces* yeasts. *Food Microbiology*, 32: 243-253.
- Sala C., Busto O., Guasch J., Zamora F. 2005. Contents of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts and wines from *Vitis vinifera* variety Cabernet Sauvignon: influence of irrigation and plantation density. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 1131-1136
- Salgues M., Cheynier V., Gunata Z., Wylde R. 1986. Oxidation of grape juice 2-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid by *Botrytis cinerea* laccase and characterization of a new substance: 2,5-di-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid. *Journal of Food Science*, 51, 5: 1191-1194.
- Scheiner J.J., Sacks G.L., Vanden Heuvel J.E. 2009. How viticultural factors affect methoxypyrazines. San Rafael, CA, *Wines & Vines*: 4 str.
<http://www.winesandvines.com/template.cfm?section=features&content=68769>
(6. mar. 2013)
- Schneider R., Kotseridis Y., Ray J.L., Augier C., Baumes R. 2003. Quantitative determination of sulfur-containing wine odorants at sub parts per billion levels. 2. Development and application of stable isotope dilution assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3243-3248.
- Singleton V.L., Salgues M., Zaya J., Trousdale E. 1985. Caffeoyl tartaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 1: 50-56.
- Singleton V.L. 1987. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model solutions: observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 1: 69-77.
- Singleton V.L., Cilliers J.J.L. 1995. Phenolic browning: A perspective from grape and wine research. V: Enzymatic browning and its prevention. Lee C.Y., Whitaker J.R. (eds.). Washington, D.C., American Chemical Society: 23-48.

- Sipiczki M. 2008. Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS Yeast Research*, 8: 996-1007.
- Spiropoulos A., Tanaka J., Flerianos I., Bisson L.F. 2000. Characterization of hydrogen sulphide formation in commercial and natural wine isolates of *Saccharomyces*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51: 131-175.
- Somers T.C., Vérette E., Pocock K.F. 1987. Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: Changes during white vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 40, 1: 67-78.
- Subileau M., Schneider R., Salmon J.M., Degryse E. 2008. New insights on 3-mercaptohexanol (3MH) biogenesis in Sauvignon blanc wines: Cys-3MH and (*E*)-hexen-2-al are not the major precursors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9230-9235.
- Swiegers J.H., Bartowsky E.J., Henschke P.A., Pretorius I.S. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11: 139-173.
- Swiegers J.H., Francis I.L., Pretorius H., Pretorius I.S. 2006. Meeting consumer expectations through management in vineyard and winery: the choice of yeast for fermentation offers great potential to adjust the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Wine Industry Journal*, 21, 1: 34-42.
- Swiegers J.H., Capone D.I., Pardon K.H., Elsey G.M., Sefton M.A., Francis I.L., Pretorius I.S. 2007. Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast*, 24: 561-574.
- Swiegers J.H., Kievit R.L., Siebert T., Lattey K.A., Bramley B.R., Francis I.L., King E.S., Pretorius I.S. 2009. The influence of yeast on the aroma of Sauvignon Blanc wine. *Food Microbiology*, 26, 2: 204-211.
- Šuklje K., Lisjak K., Baša Česnik H., Janeš L., Du Toit W., Coetzee Z., Vanzo A., Deloire A. 2012. Classification of grape berries according to diameter and total soluble solids to study the effect of light and temperature on methoxypyrazine, glutathione, and hydroxycinnamate evolution during ripening of Sauvignon blanc (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60: 9454-9461.
- Technical Information - SIHA WhiteArome. 2012. Langenlonsheim, E. Begerow GmbH & Co.: 2 str.
<http://bhftechnologies.com.au/wp-content/uploads/2013/02/Technical-Information-SIHA-WhiteArome.pdf> (6. mar. 2013)

- Technical sheet – Ceres B 201 YSEO. 2007. Bordeaux, Oenofrance: 2 str.
<http://sandbox.rjoenology.com/images/FT-CeresB201YSEO-US.pdf>
(6. mar. 2013)
- Thibon C., Dubourdiou D., Darriet P., Tominaga T. 2009. Impact of noble rot on the aroma precursor of 3-sulfanylhexasanol content in *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc and Semillon grape juice. *Food Chemistry*, 114: 1359-1364.
- Thibon C., Cluzet S., Mérillon J.M., Darriet P., Dubourdiou D. 2011. 3-Sulfanylhexasanol precursor biogenesis in grapevine cells: the stimulating effect of *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 1344-1351.
- Tominaga T., Masneuf I., Dubourdiou D. 1995. S-cysteine conjugate, precursor of aroma of white Sauvignon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 29: 227-232.
- Tominaga T., Darriet P., Dubourdiou D. 1996. Identification of 3-mercaptohexyl acetate in Sauvignon wine, a powerful aromatic compound exhibiting box-tree odor. *Vitis*, 35: 207-210.
- Tominaga T., Furrer A., Henry R., Dubourdiou D. 1998. Identification of new volatile thiols in the aroma of *Vitis vinifera* L. var. Sauvignon blanc wines. *Flavour and Fragrance Journal*, 13: 159-162.
- Tominaga T., Baltenweck-Guyot R., Des Gachons C.P., Dubourdiou D. 2000. Contribution of volatile thiols to the aromas of white wines made from several *Vitis vinifera* grape varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51: 178-181.
- Tominaga T., Dubourdiou D. 2006. A novel method for quantification of 2-methyl-3-furanthiol and 2-furanmethanethiol in wines made from *Vitis vinifera* grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 29-33.
- Tominaga T., Niclass Y., Frérot E., Dubourdiou D. 2006. Stereoisomeric distribution of 3-mercaptohexan-1-ol and 3-mercaptohexyl acetate in dry and sweet white wines made from *Vitis vinifera* (var. Sauvignon blanc and Semillon). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7251-7255.
- Torija M.J., Rozès N., Poblet M., Guillamón J.M., Mas A. 2003. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 1: 47-53.
- Torrens J., Urpí P., Riu-Aumatell M., Vichi S., López-Tamames E., Buxaderas S. 2008. Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 48-57.

- Ugliano M., Kwiatkowski M., Vidal S., Capone D., Siebert T., Dieval J.B., Aagaard O., Waters E.J. 2011. Evolution of 3-mercaptohexanol, hydrogen sulfide, and methyl mercaptan during bottle storage of Sauvignon blanc wines. Effect of glutathione, copper, oxygen exposure, and closure-derived oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 2564-2572.
- Vanzo A., Cecotti R., Vrhovšek U., Torres A.M., Mattivi F., Passamonti S. 2007. The fate of trans-caftaric acid administered into the rat stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4: 1604-1611.
- Verduyn C., Postma E., Scheffers W.A., Van Dijken J.P. 1990. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. *Journal of General Microbiology*, 136: 395-403.
- Viana F., Belloch C., Vallés S., Manzanares P. 2011. Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae* – *Saccharomyces cerevisiae* in natural must: Impact on 2-phenylethyl acetate production. *International Journal of Food Microbiology*, 151: 235-240.
- Vilanova M., Ugliano M., Varela C., Siebert T., Pretorius I.S., Henschke P.A. 2007. Assimilable nitrogen utilization and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77: 145-157.
- Villadsen J., Nielsen J., Lidén G. 2011. Scale-up of bioprocesses. V: Bioreaction engineering principles. 3rd ed. Villadsen J., Nielsen J., Lidén G. (eds.). New York, Springer: 497-546.
- Walker G.M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd.: 350 str.
- Wang Z., Tan T., Song J. 2007. Effect of amino acids addition and feedback control strategies on the high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* for glutathione production. *Process Biochemistry*, 42: 108-111.
- Waterhouse A.L. 2002. Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957: 21-36.
- Wu G., Fang Y.Z., Yang S., Lupton J.R., Turner N.D. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition*, 134, 3: 489-492.
- Zamora F. 2009. Biochemistry of alcoholic fermentation. V: Wine chemistry and biochemistry. Moreno-Arribas M.V., Polo M.C. (eds.). New York, Springer: 3-12.

Zymaflore[®] Alpha^{TD n. Sacch} – Product data sheet. 2013. Bordeaux Cedex, Laffort: 2 str.
<http://www.laffort.com/en/products/zymaflore-yeasts/470> (6. mar. 2013)

Zymaflore VL3[®] – Product data sheet. 2013. Bordeaux Cedex, Laffort: 2 str.
<http://www.laffort.com/en/quality-management/74> (6. mar. 2013)

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Tatjani Košmerl, ki mi je omogočila raziskovanje želenega področja, mi neizmerno veliko pomagala pri izvedbi in nastanku doktorske disertacije kot tudi drugih znanstvenih del ter me spodbujala in mi vedno stala ob strani.

Iskreno se zahvaljujem somentorju prof. dr. Francu Čušu, ki me je vodil skozi raziskovalno delo, mi nudil vso razpoložljivo pomoč in sredstva tako pri doktorski disertaciji kot tudi pri drugih znanstvenih delih ter mi v tem času predal ogromno dragocenega znanja.

Prof. dr. Poloni Jamnik in prof. dr. Marinu Beroviču se zahvaljujem za dobrosrčnost pri izpeljavi prvega zagovora ter za ves trud pri pregledu, popravi in oceni doktorske disertacije.

Bojanu Kobalu iz Ptujске kleti se zahvaljujem za podarjen mošt ter možnost izvedbe vinifikacij v industrijskem merilu.

Prof. dr. Lei Demšar se zahvaljujem za nasvete in pomoč pri statistični obdelavi podatkov ter Zdenki Zupančič za pomoč pri spremljanju nekaterih alkoholnih fermentacij.

Lini Burkan se zahvaljujem za pregled oblikovne ustreznosti doktorske disertacije.

Za pomoč pri izvedbi nekaterih kemijskih analiz se zahvaljujem Nadi Bizjak, Ivi Kmetič Ceglar, Katji Šuklje, doc. dr. Andreji Vanzo, Luciji Janeš in dr. Heleni Baša Česnik.

Za vse koristne in praktične nasvete ter podporo v času študija in izvedbe doktorske disertacije se zahvaljujem dr. Mitji Kocjančiču, dr. Dejanu Bavčarju, dr. Klemenu Lisjaku in mag. Zvonku Bregarju.

Za lektoriranje slovenščine in angleščine v doktorski disertaciji se zahvaljujem Tatjani Deželan Burkat, Hermini Videnič, Maruši Pogačnik in Barbari Plavač.

Za vso pomoč in podporo v času doktorskega študija se zahvaljujem moji družini, predvsem Boži & Co., mami in očitu, Špeli, Urošu in babici Mariji ter fantu Cirilu in njegovi družini ter vsem ostalim prijateljem, ki sem jih v tem času zapostavljala. Brez vseh vas mi ne bi uspelo! RADA VAS IMAM! ☺

PRILOGE

Priloga A: Lastnosti posameznih komercialnih sevov kvasovk, uporabljenih v poskusu

Annex A: Characteristics of commercial yeast strains used in experiment

Komercialno ime seva kvasovk	Izvor	Temperatura AF	Odpornost na etanol	Tvorba HK	Tvorba SO ₂	Potrebe po N	Fermentacijska kinetika	Uporaba	Posebne lastnosti
VIN7 ¹	Inštitut ARC Infruitec-Nietvoorbij, Stellenbosch, Južna Afrika	minimalna 12 °C, optimalna 13-16 °C	do 14,5 vol.% pri 15 °C	0,4-0,8 g/L	nič ali zelo majhna	manjše	močna pri nizkih temp., počasnejša proti koncu AF	za pridelavo aromatičnih belih vin pri nizki temperaturi, predvsem sauvignon, chenin blanc, colombard	večja sposobnost sproščanja hlapnih tiolov
Lalvin QA23 ^{®2}	Inštitut UTAD, Portugalska	minimalna 10 °C, optimalna 14-28 °C	do 16 vol.%	<0,2 g/L	srednja	manjše	močna	za pridelavo svežih, sadnih belih vin, predvsem chardonnay, sauvignon, chenin blanc, colombard, semillon	večja sposobnost sproščanja hlapnih tiolov in terpenov
Fermol Sauvignon ³	Inštitut univerze v Burgundiji, Dijon, Francija	np	visoka	manjša	np	np	močna	za pridelavo belih aromatičnih vin z uravnoteženim okusom in dolgotrajnim pookusom, predvsem sauvignon, sauvignonase, verdicchio, garganega	večja sposobnost sproščanja hlapnih tiolov in terpenov
SIHA WhiteArome ⁴	np	v razponu 13-25 °C, optimalna 18-20 °C	do 14 vol.%	np	manjša	srednje	močna na začetku AF	za pridelavo aromatičnih belih in rosé vin z izrazito sortno in sadno aromo, predvsem laški rizling, semillon, sauvignon, verdelho, sivi pinot, muškati	večja sposobnost tvorbe višjih alkoholov in njihovih estrov

se nadaljuje

nadaljevanje priloge A: Lastnosti posameznih komercialnih sevov kvasovk, uporabljenih v poskusu

Komercialno ime seva kvasovk	Izvor	Temperatura AF	Odpornost na etanol	Tvorba HK	Tvorba SO ₂	Potrebe po N	Fermentacijska kinetika	Uporaba	Posebne lastnosti
Ceres B 201 YSEO ⁵	Inštitut INRA, Colmar, Francija	v razponu 15-25 °C	do 14,5 vol. %	0,1 g/L	manjša	manjše	močna na začetku AF, srednje močna do konca AF	za pridelavo skladnih belih vin s cvetličnimi, sadnimi (ananas, citrusi, eksotično sadje) in medenimi aromami	np
Alchemy II ⁶	AWRI, Avstralija	minimalna 12 °C, optimalna 13-16 °C	do 15,5 vol. %	<0,5 g/L	nič ali zelo majhna	srednje	močna, priporočeno uravnavanje temperature	predvsem za sauvignon, colombard, chenin blanc in verdelho	mešana kultura sevov kvasovk z večjo sposobnostjo sproščanja hlapnih tiolov zaradi sinergizma med sevi, tvorba optimalne sestave aromatskih spojin v vinu
Zymaflore VL3 ^{®7}	Univerza Bordeaux, Francija	v razponu 15-21 °C	do 14,5 vol. %	manjša	np	večje	np	za pridelavo sortnih belih vin s polnim, zaokroženim okusom, za uporabo v tehnologiji zorenja vina na drožeh, predvsem sauvignon, colombard	odlična sposobnost sproščanja hlapnih tiolov
Zymaflore [®] Alpha ^{TD n. Sacch8}	np	v razponu 12-26 °C	do 10 vol. %	manjša	np	srednje	np	za pridelavo belih, rdečih in rosé vin, kompleksnih, polnih, zelo čista aromatika, dolgotrajen pookus	ne-Saccharomyces sev kvasovk z večjo sposobnostjo sproščanja hlapnih tiolov (3MH in 3MHA), potrebna zaporedna inokulacija s sevom kvasovk vrste <i>S. cerevisiae</i> 24-72 h po inokulaciji Zymaflore [®] Alpha ^{TD n. Sacch}

se nadaljuje

nadaljevanje priloge 1: Lastnosti posameznih komercialnih sevov kvasovk, uporabljenih v poskusu

Komercialno ime seva kvasovk	Izvor	Temperatura AF	Odpornost na etanol	Tvorba HK	Tvorba SO ₂	Potrebe po N	Fermentacijska kinetika	Uporaba	Posebne lastnosti
Level2™ TD ^{9,10}	np	np	do 14 vol. %	manjša	manjša	večje	np	za pridelavo kompleksnih, polnih vin z intenzivno svežo tropsko in cvetlično aromo, za pridelavo vin z višjimi vsebnostmi sladkorja, predvsem chardonnay, chenin, semillon, ugni blanc, melon, maccabeu	komplet dveh vrst kvasovk za zaporedno inokulacijo – <i>T. delbrueckii</i> (sev 291) in <i>S. cerevisiae</i> (sev 734), predvsem vrsta kvasovk <i>T. delbrueckii</i> tvori številne maščobne kisline in njihove estre
Exotics SPH ¹¹	Inštitut za biotehnologijo vina, Stellenbosch University, Južna Afrika	občutljiv na nizke temp. (<18 °C), optimalna 18-20 °C	do 15,5 vol. %	<0,4 g/L	manjša	srednje	np	za pridelavo belih vin z eksotično aromo in polnim okusom, predvsem chardonnay, chenin blanc in viognier v lesenih sodih	hibrid med vrstama kvasovk <i>S. cerevisiae</i> in <i>S. paradoxus</i> , pozitivne lastnosti obeh starševskih sevov kvasovk
ECA5 ^{12,13}	inštitut INRA, Colmar, Francija	np	np	np	np	np	np	za pridelavo nevtralnih belih, rosé in rdečih vin	na tržišču pod imenom Affinity ^{ECA5} v kompletu s specifičnimi hranili, ki povečajo tvorbo sekundarnih presnovkov kvasovk, sev ima izraženo lastnost sproščanja etilnih in acetatnih estrov, predvsem fermentacijskih estrov

¹ Anchor VIN7 – Product Data Sheet, 2013; ² Lallemand catalogue: Lalvin QA23[®], 2013; ³ Fermol Sauvignon, 2013; ⁴ Technical Information - SIHA WhiteArome, 2012; ⁵ Technical sheet – Ceres B 201 YSEO, 2007; ⁶ Anchor Alchemy II – Product Data Sheet, 2013; ⁷ Zymaflore VL3[®] – Product data sheet, 2013; ⁸ Zymaflore[®] Alpha^{TD n. Sacch} – Product data sheet, 2013; ⁹ Lallemand catalogue: Lallemand[®] Level2 TD, 2013; ¹⁰ Lallemand, 2013; ¹¹ Anchor Exotics SPH – Product Data Sheet, 2013; ¹² Lallemand Australia Pty Ltd, 2012; ¹³ Cadière in sod., 2011; np – ni podatka s strani proizvajalca

Priloga B: Osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih analiz 1. dela poskusa 1Annex B: Basic statistical parameters of the results of chemical analyses of the 1st part of the experiment 1

Parameter	n	X_{povpr}	X_{min}	X_{max}	SO	KV(%)
A reducirajoči sladkorji (g/L)	15	2,5	1,1	4,2	0,9	34,1
B hlapne kisline (g/L)	15	0,42	0,28	0,65	0,09	22,1
C prosti aminokislinski dušik (mg N/L)	15	18,6	10,5	28,0	5,2	28,3
D <i>cis</i> -kaftarna kislina (mg/L)	15	2,9	2,6	3,2	0,2	7,3
E kaftarna kislina (mg/L)	15	86,7	67,2	106,9	16,8	19,4
F GRP (mg/L)	15	17,9	13,2	22,6	4,2	23,4
G <i>cis</i> -kutarna kislina (mg/L)	15	9,8	7,4	13,1	2,1	21,3
H kutarna kislina (mg/L)	15	20,0	16,1	23,9	3,4	17,2
I <i>cis</i> -ferarna kislina (mg/L)	15	0,3	0,2	0,4	0,04	14,5
J fertarna kislina (mg/L)	15	2,9	2,1	3,7	0,7	23,9
K kavna kislina (mg/L)	15	4,0	2,5	5,4	1,1	27,3
L <i>p</i> -kumarna kislina (mg/L)	15	0,6	0,3	1,1	0,3	48,2
M ferulna kislina (mg/L)	15	0,1	0	0,2	0,1	148,5
N skupne hidroksicimne kisline (mg/L)	15	145,1	112,1	178,9	28,6	19,7
O glutation 1h po inokulaciji (mg/L)	15	36,7	30,7	50,9	5,5	15,1
P glutation 10. dan alkoholne fermentacije (mg/L)	15	18,4	4,3	30,0	8,3	45,1
R glutation po končani alkoholni fermentaciji (mg/L)	15	16,3	2,1	27,4	8,3	51,0
S glutation po 1,5 meseca zorenja vina na drožeh (mg/L)	15	14,8	6,4	20,8	4,9	32,9
T glutation po 2,5 meseca zorenja vina na drožeh (mg/L)	15	13,3	5,5	17,5	4,1	30,6
U glutation po 3,5 meseca zorenja vina na drožeh (mg/L)	15	10,7	5,3	15,3	3,2	29,6
V 4-merkaptio-4-metilpentan-2-on (ng/L)	15	5,2	2,0	13,2	3,6	69,5
Z 3-merkaptioheksil acetat (ng/L)	15	8,2	2,6	14,6	3,5	42,4
A1 3-merkaptioheksan-1-ol (ng/L)	15	269,6	138,1	379,6	69,0	25,6

n – število vseh vzorcev v poskusu, X_{povpr} – povprečne vrednosti, X_{min} – minimalne vrednosti, X_{max} – maksimalne vrednosti, SO – standardni odklon, KV(%) – koeficient variabilnosti

Priloga C: Korelacijski koeficienti med spremenljivkami 1. dela poskusa 1, uporabljenimi v LDA

Annex C: Correlation coefficients between variables of the 1st part of the experiment 1, used in LDA

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	R	S	T	U	V	Z	A1
A	0,10	-0,10	0,08	0,14	0,13	0,11	0,12	-0,49	0,10	0,19	0,46	-0,05	0,14	-0,09	0,27	0,20	0,25	0,25	0,37	0,12	-0,21	0,11
B	1,00	0,68	-0,04	0,59	0,59	0,55	0,59	-0,51	0,63	0,63	0,53	0,75	0,59	-0,10	0,56	0,58	0,51	0,25	0,25	-0,12	0,53	-0,10
C		1,00	0,50	0,85	0,85	0,81	0,86	-0,38	0,84	0,83	0,62	0,78	0,85	0,19	0,56	0,63	0,61	0,40	0,47	-0,62	0,22	-0,25
D			1,00	0,45	0,47	0,41	0,48	0,29	0,37	0,41	0,20	0,10	0,45	0,54	0,29	0,45	0,45	0,54	0,55	-0,37	-0,01	0,01
E				1,00	1,00	0,98	1,00	-0,55	1,00	0,98	0,89	0,76	1,00	0,44	0,83	0,82	0,87	0,69	0,79	-0,53	-0,01	-0,50
F					1,00	0,98	1,00	-0,52	0,99	0,98	0,89	0,77	1,00	0,45	0,84	0,85	0,89	0,71	0,81	-0,51	0,02	-0,50
G						1,00	0,98	-0,55	0,98	0,96	0,86	0,76	0,98	0,46	0,81	0,78	0,84	0,65	0,76	-0,55	-0,07	-0,60
H							1,00	-0,52	0,99	0,98	0,87	0,76	1,00	0,45	0,82	0,82	0,86	0,68	0,79	-0,54	-0,00	-0,50
I								1,00	-0,58	-0,56	-0,80	-0,54	-0,54	0,20	-0,43	-0,27	-0,36	-0,10	-0,30	0,35	0,23	0,32
J									1,00	0,98	0,89	0,79	0,99	0,42	0,82	0,81	0,85	0,65	0,76	-0,52	-0,00	-0,53
K										1,00	0,89	0,74	0,98	0,37	0,85	0,83	0,87	0,69	0,79	-0,46	0,04	-0,45
L											1,00	0,64	0,88	0,29	0,78	0,68	0,79	0,59	0,77	-0,38	-0,17	-0,45
M												1,00	0,76	0,17	0,64	0,60	0,63	0,38	0,42	-0,35	0,33	-0,35
N													1,00	0,44	0,83	0,83	0,87	0,69	0,80	-0,53	-0,01	-0,51
O														1,00	0,31	0,35	0,44	0,50	0,51	-0,26	-0,19	-0,38
P															1,00	0,95	0,97	0,90	0,90	-0,02	0,15	-0,46
R																1,00	0,96	0,91	0,88	-0,05	0,26	-0,35
S																	1,00	0,94	0,95	-0,08	0,18	-0,40
T																		1,00	0,96	0,11	0,15	-0,29
U																			1,00	-0,10	-0,05	-0,37
V																				1,00	0,47	0,41
Z																					1,00	0,52

Odebeljene številke pomenijo signifikantno korelacijo pri $p < 0,0001$

Priloga D: Osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih analiz 2. dela poskusa 1Annex D: Basic statistical parameters of the results of chemical analyses of the 2nd part of the experiment 1

Parameter	n	X_{povpr}	X_{min}	X_{max}	SO	KV(%)
A reducirajoči sladkorji (g/L)	15	5,4	1,9	10,9	2,3	42,4
B hlapne kisline (g/L)	15	0,46	0,34	0,65	0,09	19,2
C prosti aminokislinski dušik (mg N/L)	15	18,3	7,0	29,8	6,3	34,2
D <i>cis</i> -kaftarna kislina (mg/L)	15	6,0	5,4	6,6	0,4	6,2
E kaftarna kislina (mg/L)	15	142,7	137,3	159,3	5,4	3,8
F GRP (mg/L)	15	30,1	27,9	33,9	1,5	4,9
G <i>cis</i> -kutarna kislina (mg/L)	15	23,2	20,8	27,0	1,6	6,8
H kutarna kislina (mg/L)	15	35,9	32,2	41,2	2,3	6,3
I <i>cis</i> -ferarna kislina (mg/L)	15	1,1	0,9	1,5	0,2	13,8
J fertarna kislina (mg/L)	15	5,9	5,0	7,0	0,6	10,4
K kavna kislina (mg/L)	15	14,7	11,2	17,1	1,5	10,3
L <i>p</i> -kumarna kislina (mg/L)	15	4,9	0,3	15,8	4,9	100,1
M ferulna kislina (mg/L)	15	1,1	0,4	3,5	0,9	85,0
N skupne hidroksicimne kisline (mg/L)	15	265,7	252,8	309,6	15,3	5,7
O glutation 1h po inokulaciji (mg/L)	15	37,2	33,4	41,2	1,9	5,0
P glutation 10. dan alkoholne fermentacije (mg/L)	15	28,0	23,2	32,8	3,0	10,6
R glutation po končani alkoholni fermentaciji (mg/L)	15	15,8	13,7	18,1	1,6	10,1
S 3-izobutil-2-metoksipirazin (ng/L)	15	1,32	0	2,58	0,84	63,4
T 4-merkaptio-4-metilpentan-2-on (ng/L)	15	5,1	3,4	6,8	1,1	20,9
U 3-merkaptioheksil acetat (ng/L)	15	19,4	10,7	27,2	5,8	30,0
V 3-merkaptioheksan-1-ol (ng/L)	15	350,2	205,2	478,4	73,9	21,1

n – število vseh vzorcev poskusu, X_{povpr} – povprečne vrednosti, X_{min} – minimalne vrednosti, X_{max} – maksimalne vrednosti, SO – standardni odklon, KV(%) – koeficient variabilnosti

Priloga E: Korelacijski koeficienti med spremenljivkami 2. dela poskusa 1, uporabljenimi v LDA

Annex E: Correlation coefficients between variables of the 2nd part of the experiment 1, used in LDA

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	R	S	T	U	V
A	0,76	0,61	0,33	0,48	0,60	0,56	0,31	0,28	0,19	0,32	0,76	0,39	0,65	0,47	-0,48	-0,42	0,37	-0,53	-0,20	0,00
B	1,00	0,66	0,28	0,46	0,62	0,63	0,34	0,09	0,33	0,04	0,63	0,24	0,58	0,46	-0,44	-0,73	-0,01	-0,42	-0,30	-0,29
C		1,00	0,56	0,27	0,59	0,60	0,30	0,20	0,48	0,31	0,81	0,77	0,63	0,68	-0,77	-0,67	-0,08	-0,14	0,10	-0,22
D			1,00	0,59	0,68	0,55	0,32	0,33	0,36	0,39	0,73	0,53	0,72	0,73	-0,73	-0,36	-0,07	-0,16	0,64	-0,15
E				1,00	0,72	0,67	0,56	0,11	0,45	0,44	0,60	-0,06	0,84	0,42	-0,51	-0,38	0,03	-0,24	0,36	-0,07
F					1,00	0,89	0,74	0,37	0,68	0,62	0,81	0,35	0,94	0,63	-0,81	-0,62	-0,13	-0,47	0,38	-0,30
G						1,00	0,78	0,45	0,67	0,61	0,71	0,27	0,89	0,61	-0,69	-0,60	-0,30	-0,50	0,25	-0,46
H							1,00	0,36	0,78	0,64	0,39	-0,03	0,72	0,15	-0,47	-0,27	-0,52	-0,42	0,20	-0,55
I								1,00	0,38	0,43	0,30	0,26	0,36	0,25	-0,28	-0,01	-0,16	-0,35	0,39	-0,24
J									1,00	0,59	0,43	0,16	0,67	0,24	-0,64	-0,54	-0,44	0,06	0,36	-0,28
K										1,00	0,50	0,30	0,69	0,47	-0,51	-0,04	-0,02	-0,25	0,47	-0,09
L											1,00	0,66	0,87	0,81	-0,83	-0,59	0,23	-0,29	0,37	0,02
M												1,00	0,36	0,65	-0,67	-0,36	0,19	-0,05	0,26	0,06
N													1,00	0,67	-0,80	-0,54	-0,05	-0,37	0,43	-0,20
O														1,00	-0,61	-0,42	0,21	-0,23	0,44	0,02
P															1,00	0,72	0,08	0,11	-0,46	0,13
R																1,00	0,13	-0,03	-0,01	0,14
S																	1,00	0,12	-0,03	0,86
T																		1,00	0,19	0,56
U																			1,00	0,13

Odebeljene številke pomenijo signifikantno korelacijo pri $p < 0,0001$

Priloga F: Osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih in senzoričnih analiz poskusa 2

Annex F: Basic statistical parameters of the results of chemical and sensory analyses of the experiment 2

Parameter	n	X_{povpr}	X_{min}	X_{max}	SO	KV(%)
A reducirajoči sladkorji (g/L)	12	1,6	0,9	2,6	0,5	30,2
B alkohol (vol. %)	12	11,3	10,8	11,5	0,2	2,1
C skupne kisline (g/L)	12	6,5	6,3	6,6	0,1	1,8
D hlapne kisline (g/L)	12	0,58	0,36	0,86	0,15	25,7
E pH	12	3,25	3,22	3,28	0,02	0,7
F prosti aminokislinski dušik (mg N/L)	12	36,4	29,3	45,1	4,9	13,4
G <i>cis</i> -kaftarna kislina (mg/L)	12	2,1	2,1	2,2	0,04	2,1
H kaftarna kislina (mg/L)	12	39,3	36,3	40,8	1,5	3,8
I GRP (mg/L)	12	19,9	19,4	21,2	0,5	2,7
J <i>cis</i> -kutarna kislina (mg/L)	12	12,5	12,1	12,7	0,2	1,3
K kutarna kislina (mg/L)	12	13,6	13,2	13,9	0,3	1,9
L <i>cis</i> -ferarna kislina (mg/L)	12	0,2	0,2	0,2	0,01	5,3
M fertarna kislina (mg/L)	12	1,3	1,3	1,3	0,01	1,0
N kavna kislina (mg/L)	12	2,6	2,4	2,7	0,1	2,9
O <i>p</i> -kumarna kislina (mg/L)	12	1,4	0,9	2,1	0,5	33,3
P ferulna kislina (mg/L)	12	0,3	0,1	0,5	0,2	60,4
R skupne hidroksicimetne kisline (mg/L)	12	93,2	91,0	95,3	1,4	1,5
S glutation 1h po inokulaciji (mg/L)	12	5,3	4,5	6,6	0,6	12,1
T glutation 9. dan alkoholne fermentacije (mg/L)	12	6,0	1,5	8,4	2,6	42,7
U glutation po končani alkoholni fermentaciji (mg/L)	12	3,6	1,6	5,0	1,0	28,1
V 3-izobutil-2-metoksipirazin (ng/L)	12	3,41	2,73	4,21	0,46	13,6
Z 4-merkapt-4-metilpentan-2-on (ng/L)	12	4,1	1,7	7,4	1,7	40,2
A1 3-merkaptotioheksil acetat (ng/L)	12	113,0	49,7	167,8	41,7	36,9
B1 3-merkaptotioheksan-1-ol (ng/L)	12	1000,6	684,1	1202,6	175,6	17,5
C1 Tropska aroma	48	2,5	1,0	4,0	1,1	45,2
D1 Celokupna kakovost	48	2,5	1,0	4,0	1,1	45,2

n – število vseh vzorcev v poskusu, X_{povpr} – povprečne vrednosti, X_{min} – minimalne vrednosti, X_{max} – maksimalne vrednosti, SO – standardni odklon, KV(%) – koeficient variabilnosti

Priloga G: Korelacijski koeficienti med spremenljivkami poskusa 2, uporabljenimi v LDA

Annex G: Correlation coefficients between variables of the experiment 2, used in LDA

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	R	S	T	U	V	Z	A1	B1	C1	D1
A	-0,21	0,28	0,33	0,11	0,28	0,29	0,25	-0,06	0,31	0,08	0,52	0,20	0,41	-0,09	-0,02	0,30	-0,06	0,14	0,14	-0,14	-0,15	0,11	-0,37	-0,53	-0,03
B	1,00	-0,12	-0,16	0,04	-0,44	-0,59	-0,54	0,29	-0,52	0,54	-0,51	-0,41	-0,24	0,18	-0,03	-0,41	-0,01	0,48	-0,26	0,33	0,30	-0,60	0,26	0,05	0,18
C		1,00	0,79	0,22	-0,00	0,46	0,27	-0,08	0,64	0,27	0,79	0,76	0,11	-0,38	-0,24	0,26	0,25	0,03	0,09	0,02	-0,09	0,12	-0,71	-0,31	-0,10
D			1,00	0,45	0,42	0,55	0,54	-0,26	0,79	0,10	0,82	0,82	0,44	-0,17	0,05	0,59	0,01	-0,07	0,42	-0,13	-0,25	0,47	-0,83	-0,49	-0,36
E				1,00	-0,11	-0,31	0,08	0,12	-0,03	0,58	0,15	0,43	0,70	0,74	0,80	0,63	0,19	0,52	0,69	-0,58	0,46	0,29	-0,71	0,05	-0,19
F					1,00	0,74	0,76	-0,62	0,54	-0,69	0,49	0,21	0,30	-0,25	-0,01	0,48	-0,07	-0,71	0,37	0,06	-0,61	0,74	-0,14	-0,57	-0,42
G						1,00	0,83	-0,68	0,84	-0,57	0,71	0,41	0,17	-0,62	-0,36	0,42	-0,10	-0,68	0,21	0,09	-0,53	0,62	-0,30	-0,52	-0,32
H							1,00	-0,88	0,64	-0,42	0,53	0,27	0,56	-0,17	0,10	0,75	-0,10	-0,52	0,65	-0,21	-0,18	0,85	-0,38	-0,44	-0,39
I								1,00	-0,36	0,43	-0,22	0,09	-0,32	0,25	0,06	-0,47	0,15	0,52	-0,48	0,08	0,07	-0,63	0,01	0,36	0,30
J									1,00	-0,33	0,84	0,73	0,23	-0,53	-0,29	0,45	-0,28	-0,39	0,16	-0,01	-0,54	0,51	-0,60	-0,46	-0,30
K										1,00	-0,21	0,08	0,28	0,54	0,39	0,10	0,17	0,93	0,19	-0,36	0,69	-0,44	-0,39	0,26	0,12
L											1,00	0,80	0,25	-0,43	-0,19	0,43	0,16	-0,36	0,19	0,03	-0,43	0,50	-0,67	-0,51	-0,19
M												1,00	0,29	-0,14	0,05	0,44	0,14	-0,03	0,23	-0,26	-0,27	0,35	-0,82	-0,29	-0,40
N													1,00	0,61	0,77	0,93	-0,03	0,26	0,90	-0,61	0,40	0,63	-0,67	-0,28	-0,41
O														1,00	0,95	0,42	0,19	0,57	0,59	-0,52	0,69	0,12	-0,22	0,28	-0,09
P															1,00	0,66	0,21	0,39	0,77	-0,54	0,58	0,41	-0,41	0,15	-0,19
R																1,00	0,04	0,01	0,93	-0,55	0,21	0,81	-0,74	-0,26	-0,41
S																	1,00	-0,08	0,18	0,03	0,26	0,10	-0,10	0,15	0,09
T																		1,00	0,08	-0,45	0,62	-0,55	-0,26	0,28	0,09
U																			1,00	-0,63	0,42	0,74	-0,57	-0,07	-0,36
V																				1,00	-0,40	-0,20	0,40	-0,24	0,36
Z																					1,00	-0,09	-0,07	0,36	0,09
A1																						1,00	-0,43	-0,31	-0,36
B1																							1,00	0,24	0,27
C1																								1,00	0,53

Odebeljene številke pomenijo signifikantno korelacijo pri $p < 0,0001$

Priloga H: Osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih in senzoričnih analiz poskusa 3

Annex H: Basic statistical parameters of the results of chemical and sensory analyses of the experiment 3

Parameter	n	X_{povpr}	X_{min}	X_{max}	SO	KV(%)
A reducirajoči sladkorji (g/L)	36	1,6	1,1	2,3	0,3	20,2
B alkohol (vol. %)	36	10,8	10,6	11,1	0,1	1,1
C skupne kisline (g/L)	36	7,8	7,3	8,7	0,4	5,0
D hlapne kisline (g/L)	36	0,63	0,39	1,27	0,24	38,2
E pH	36	3,36	3,29	3,43	0,03	1,0
F prosti aminokislinski dušik (mg N/L)	36	54,7	35,3	77,2	10,4	19,0
G <i>cis</i> -kaftarna kislina (mg/L)	36	11,6	6,9	16,4	3,2	27,3
H kaftarna kislina (mg/L)	36	27,6	23,3	30,6	2,0	7,4
I GRP (mg/L)	36	9,5	7,7	11,0	0,8	8,8
J <i>cis</i> -kutarna kislina (mg/L)	36	5,4	3,8	7,4	0,9	15,8
K kutarna kislina (mg/L)	36	1,8	1,6	2,0	0,1	6,2
L <i>cis</i> -ferarna kislina (mg/L)	36	11,9	8,8	15,3	1,8	15,3
M fertarna kislina (mg/L)	36	0,9	0,6	1,5	0,2	28,8
N kavna kislina (mg/L)	36	1,7	0,9	2,4	0,5	26,8
O <i>p</i> -kumarna kislina (mg/L)	36	0,5	0,2	0,8	0,2	38,1
P ferulna kislina (mg/L)	36	1,1	0,9	1,2	0,1	8,1
R skupne hidroksicimetne kisline (mg/L)	36	72,0	57,3	79,9	6,5	9,1
S glutation 48h po inokulaciji (mg/L)	36	10,9	8,1	15,8	1,8	16,4
T glutation po končani alkoholni fermentaciji (mg/L)	36	12,8	9,9	16,5	2,1	16,6
U 4-merkaptio-4-metilpentan-2-on (ng/L)	36	14,7	0,5	46,9	12,5	85,0
V 3-merkaptioheksil acetat (ng/L)	36	99,8	36,3	236,2	49,0	49,1
Z 3-merkaptioheksan-1-ol (ng/L)	36	1116,2	755,9	1764,2	246,7	22,1
A1 težka tropska aroma	36	2,5	0,7	3,8	0,8	31,1
B1 sveža tropska aroma	36	2,4	1,0	3,7	0,7	29,3
C1 fermentacijska aroma	36	2,5	1,6	3,5	0,6	22,7
D1 zelena aroma	36	2,1	0,9	3,7	0,7	32,6
E1 celokupna kakovost	36	2,4	1,4	3,7	0,6	23,2

n – število določanj v poskusu, X_{povpr} – povprečne vrednosti, X_{min} – minimalne vrednosti, X_{max} – maksimalne vrednosti, SO – standardni odklon, KV(%) – koeficient variabilnosti

Priloga I: Korelacijski koeficienti med spremenljivkami poskusa 3, uporabljenimi v LDA

Annex I: Correlation coefficients between variables of the experiment 3, used in LDA

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	R	S	T	U	V	Z	A1	B1	C1	D1	E1
A	-0,17	-0,11	0,01	0,26	0,13	-0,75	-0,26	0,07	-0,73	-0,16	-0,49	-0,21	0,40	-0,54	-0,17	-0,67	0,15	-0,54	0,52	0,44	0,69	0,25	0,27	0,31	0,02	0,27
B	1,00	-0,14	0,10	0,49	0,33	0,42	0,02	0,40	0,22	0,50	0,39	-0,15	-0,34	0,10	-0,12	0,38	0,32	0,08	-0,31	-0,13	0,12	0,31	0,45	0,42	0,55	0,44
C		1,00	0,80	-0,07	0,52	0,47	-0,14	0,09	0,09	0,27	0,32	0,14	-0,48	0,28	-0,02	0,28	0,01	-0,11	-0,41	-0,03	-0,02	0,09	0,19	0,09	0,24	0,05
D			1,00	0,28	0,88	0,52	0,06	0,22	0,02	0,71	0,58	0,27	-0,49	0,40	0,01	0,46	0,10	-0,33	-0,36	-0,17	-0,07	0,04	0,17	0,16	0,21	-0,05
E				1,00	0,57	0,18	0,27	0,65	0,07	0,54	0,31	0,14	-0,07	0,27	0,05	0,36	0,08	0,01	0,07	0,03	0,23	0,53	0,48	0,72	0,58	0,45
F					1,00	0,48	0,06	0,22	-0,01	0,80	0,56	0,23	-0,46	0,45	-0,11	0,44	0,01	-0,35	-0,34	-0,03	0,10	0,05	0,17	0,27	0,28	-0,01
G						1,00	0,26	0,14	0,74	0,62	0,66	0,17	-0,75	0,63	0,10	0,85	-0,12	0,25	-0,57	-0,49	-0,48	-0,08	-0,03	0,02	0,25	-0,13
H							1,00	0,32	0,47	0,52	0,32	0,27	0,11	0,37	-0,28	0,66	-0,49	0,53	-0,06	-0,36	-0,62	0,13	0,09	0,12	0,16	0,00
I								1,00	0,09	0,38	0,24	0,25	-0,07	0,03	0,22	0,39	0,45	0,09	0,23	-0,27	-0,08	0,56	0,59	0,74	0,53	0,55
J									1,00	0,24	0,23	-0,07	-0,56	0,34	0,10	0,69	-0,35	0,55	-0,27	-0,60	-0,68	-0,04	-0,13	-0,05	0,17	-0,07
K										1,00	0,74	0,37	-0,36	0,55	-0,15	0,79	-0,06	-0,03	-0,38	-0,31	-0,29	0,09	0,24	0,31	0,33	0,02
L											1,00	0,34	-0,28	0,66	0,12	0,79	0,01	0,15	-0,66	-0,24	-0,28	0,17	0,24	0,17	0,38	0,08
M												1,00	0,30	0,70	0,12	0,37	0,03	0,21	-0,15	0,16	-0,39	-0,11	0,01	0,17	-0,03	-0,21
N													1,00	-0,05	-0,19	-0,42	-0,07	0,27	0,19	0,62	0,19	0,20	0,19	0,08	-0,04	0,18
O														1,00	-0,11	0,71	-0,36	0,47	-0,65	0,13	-0,38	-0,05	0,00	0,06	0,23	-0,17
P															1,00	0,03	0,58	-0,27	0,35	-0,47	-0,15	0,00	-0,13	0,06	-0,18	-0,11
R																1,00	-0,20	0,44	-0,50	-0,49	-0,63	0,13	0,15	0,20	0,37	0,02
S																	1,00	-0,46	0,31	-0,17	0,21	0,14	0,22	0,21	0,01	0,21
T																		1,00	-0,44	0,11	-0,45	0,29	0,25	0,11	0,41	0,30
U																			1,00	-0,22	0,16	-0,08	-0,21	0,05	-0,42	-0,12
V																				1,00	0,62	0,19	0,26	0,14	0,20	0,24
Z																					1,00	0,33	0,33	0,27	0,22	0,37
A1																						1,00	0,86	0,78	0,83	0,86
B1																							1,00	0,81	0,87	0,91
C1																								1,00	0,77	0,77
D1																									1,00	0,84

Odebeljene številke pomenijo signifikantno korelacijo pri $p < 0,0001$

Priloga J: Osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih in senzoričnih analiz poskusa 4

Annex J: Basic statistical parameters of the results of chemical and sensory analyses of the experiment 4

Parameter	n	X_{povpr}	X_{min}	X_{max}	SO	KV(%)
A reducirajoči sladkorji (g/L)	18	3,2	0,9	14,0	4,0	123,3
B alkohol (vol. %)	18	10,2	9,4	10,6	0,4	3,6
C skupne kisline (g/L)	18	7,3	7,0	7,7	0,2	3,4
D hlapne kisline (g/L)	18	0,58	0,31	0,94	0,19	33,2
E pH	18	3,33	3,28	3,40	0,03	0,9
F <i>cis</i> -kaftarna kislina (mg/L)	18	10,7	8,3	13,4	1,8	16,7
G kaftarna kislina (mg/L)	18	29,1	27,4	31,9	1,3	4,6
H GRP (mg/L)	18	8,2	7,3	9,2	0,6	6,9
I <i>cis</i> -kutarna kislina (mg/L)	18	6,6	4,8	7,7	0,9	13,9
J kutarna kislina (mg/L)	18	1,6	1,5	1,7	0,03	2,4
K <i>cis</i> -ferarna kislina (mg/L)	18	7,1	4,3	9,4	1,8	26,0
L fertarna kislina (mg/L)	18	0,9	0,7	1,2	0,1	16,9
M kavna kislina (mg/L)	18	2,0	1,1	2,8	0,6	29,2
N <i>p</i> -kumarna kislina (mg/L)	18	0,4	0,2	0,5	0,1	23,4
O ferulna kislina (mg/L)	18	0,9	0,6	1,2	0,2	18,8
P skupne hidroksicimetne kisline (mg/L)	18	67,5	58,6	72,3	3,7	5,5
R glutation po končani alkoholni fermentaciji (mg/L)	18	15,3	8,8	21,8	3,6	23,6
S 3-izobutil-2-metoksipirazin (ng/L)	18	2,73	1,83	3,26	0,46	16,9
T 4-merkapt-4-metilpentan-2-on (ng/L)	18	8,0	1,5	14,2	4,2	51,8
U 3-merkaptohexsil acetat (ng/L)	18	86,7	38,8	171,2	41,8	48,2
V 3-merkaptohexsan-1-ol (ng/L)	18	1195,4	859,9	1556,0	195,5	16,4
Z težka tropska aroma	18	2,8	1,7	4,1	0,7	25,0
A1 sveža tropska aroma	18	2,8	1,5	3,7	0,6	22,7
B1 fermentacijska aroma	18	2,9	1,8	3,8	0,6	19,3
C1 zelena aroma	18	2,2	1,0	3,2	0,7	33,7
D1 celokupna kakovost	18	3,0	2,0	3,8	0,6	18,7
E1 rangiranje	36	2,0	1,0	3,0	0,8	41,4

n – število določanj v poskusu, X_{povpr} – povprečne vrednosti, X_{min} – minimalne vrednosti, X_{max} – maksimalne vrednosti, SO – standardni odklon, KV(%) – koeficient variabilnosti

Priloga K: Korelacijski koeficienti med spremenljivkami poskusa 4, uporabljenimi v LDA

Annex K: Correlation coefficients between variables of the experiment 4, used in LDA

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	R	S	T	U	V	Z	A1	B1	C1	D1	E1	
A	-0,17	-0,48	0,02	0,11	0,50	-0,02	-0,29	0,01	0,29	0,51	-0,43	-0,64	0,09	0,90	0,37	-0,71	0,33	-0,10	-0,42	0,36	-0,36	-0,39	0,20	-0,19	-0,32	0,02	
B	1,00	-0,18	-0,01	0,36	0,10	-0,85	0,30	-0,21	0,27	0,25	0,09	0,01	0,55	0,17	-0,11	-0,02	0,29	-0,52	-0,70	0,16	0,40	0,14	0,10	0,06	0,31	-0,13	
C		1,00	0,59	-0,36	-0,34	0,49	0,38	0,10	0,05	-0,34	0,37	0,30	-0,25	-0,60	-0,04	0,22	-0,31	0,77	0,73	-0,35	0,22	0,32	-0,23	0,24	0,20	0,20	
D			1,00	0,01	0,10	0,06	0,27	-0,40	0,30	-0,03	0,19	-0,27	-0,27	-0,11	-0,04	-0,58	0,08	0,25	0,27	0,21	0,04	0,15	-0,19	0,10	0,10	0,33	
E				1,00	-0,24	-0,32	0,54	-0,65	0,04	-0,21	0,52	0,23	-0,23	0,14	-0,35	-0,18	0,33	-0,36	-0,46	0,08	0,29	0,20	0,53	0,33	0,39	-0,02	
F					1,00	-0,23	-0,14	0,44	0,64	0,95	-0,89	-0,94	0,69	0,66	0,82	-0,42	0,73	-0,30	-0,22	0,80	0,04	-0,00	0,05	-0,08	-0,06	-0,03	
G						1,00	0,09	0,32	-0,09	-0,28	0,09	0,15	-0,44	-0,29	0,20	0,23	-0,25	0,74	0,84	-0,23	-0,11	0,12	0,02	0,18	-0,07	0,06	
H							1,00	-0,07	0,43	-0,03	0,38	0,22	0,10	-0,20	0,13	0,22	0,48	0,25	0,15	0,07	0,77	0,71	0,51	0,69	0,75	0,03	
I								1,00	0,31	0,53	-0,66	-0,25	0,62	0,12	0,78	0,48	0,22	0,37	0,32	0,04	0,16	0,12	0,01	0,04	-0,02	-0,14	
J									1,00	0,68	-0,43	-0,60	0,60	0,47	0,68	-0,28	0,66	0,03	-0,04	0,56	0,32	0,24	0,11	0,16	0,21	0,01	
K											1,00	-0,87	-0,86	0,84	0,74	0,86	-0,32	0,76	-0,26	-0,34	0,73	0,16	0,05	0,17	-0,01	0,03	-0,10
L												1,00	0,83	-0,70	-0,55	-0,80	0,19	-0,50	0,23	0,11	-0,63	0,09	0,10	0,06	0,18	0,20	0,07
M													1,00	-0,51	-0,71	-0,71	0,66	-0,62	0,29	0,21	-0,84	0,13	0,11	0,02	0,15	0,17	-0,03
N														1,00	0,44	0,69	0,12	0,61	-0,29	-0,36	0,49	0,37	0,19	0,12	0,06	0,19	-0,19
O															1,00	0,50	-0,61	0,51	-0,33	-0,62	0,52	-0,19	-0,31	0,24	-0,18	-0,21	-0,11
P																1,00	-0,04	0,69	0,16	0,14	0,57	0,24	0,22	0,21	0,16	0,10	-0,09
R																	1,00	-0,22	0,30	0,36	-0,53	0,38	0,33	0,07	0,24	0,27	-0,17
S																		1,00	-0,28	-0,28	0,75	0,53	0,44	0,53	0,42	0,46	-0,03
T																			1,00	0,74	-0,54	0,07	0,16	-0,05	0,21	0,05	0,16
U																				1,00	-0,25	0,03	0,26	-0,21	0,18	0,03	0,15
V																					1,00	0,14	0,17	0,18	0,09	0,11	-0,04
Z																						1,00	0,92	0,67	0,88	0,95	-0,03
A1																							1,00	0,66	0,95	0,90	-0,09
B1																								1,00	0,81	0,72	-0,04
C1																									1,00	0,91	-0,05
D1																										1,00	0,09

Odebeljene številke pomenijo signifikantno korelacijo pri $p < 0,0001$

Priloga L: Osnovni statistični parametri rezultatov kemijskih in senzoričnih analiz poskusa 5

Annex L: Basic statistical parameters of the results of chemical and sensory analyses of the experiment 5

Parameter	n	X_{povpr}	X_{min}	X_{max}	SO	KV(%)
A reducirajoči sladkorji (g/L)	12	3,1	2,1	4,2	0,8	24,4
B alkohol (vol. %)	12	12,1	12,0	12,1	0,04	0,4
C skupne kisline (g/L)	12	6,3	5,3	6,9	0,4	6,3
D hlapne kisline (g/L)	12	0,78	0,50	1,11	0,28	35,3
E pH	12	3,37	3,29	3,43	0,04	1,3
F prosti aminokislinski dušik (mg N/L)	12	39,9	25,3	55,4	13,1	32,8
G <i>cis</i> -kaftarna kislina (mg/L)	12	2,5	2,0	2,9	0,2	10,1
H kaftarna kislina (mg/L)	12	10,2	6,0	16,7	3,6	35,5
I GRP (mg/L)	12	18,3	9,2	28,3	7,9	43,0
J <i>cis</i> -kutarna kislina (mg/L)	12	8,70	5,3	11,4	1,9	21,8
K kutarna kislina (mg/L)	12	2,7	1,2	5,1	1,2	45,2
L <i>cis</i> -ferarna kislina (mg/L)	12	0,6	0,1	1,1	0,4	70,6
M fertarna kislina (mg/L)	12	1,6	1,0	2,3	0,6	36,8
N kavna kislina (mg/L)	12	15,9	12,2	18,4	1,8	11,6
O <i>p</i> -kumarna kislina (mg/L)	12	9,4	3,5	14,5	3,9	41,7
P ferulna kislina (mg/L)	12	1,0	0,2	5,3	1,4	139,5
R skupne hidroksicimetne kisline (mg/L)	12	70,9	55,4	84,2	10,5	14,8
S glutation po končani alkoholni fermentaciji (mg/L)	12	4,2	0	9,1	3,8	90,7
T 4-merkaptio-4-metilpentan-2-on (ng/L)	12	21,7	11,4	39,6	10,6	48,9
U 3-merkaptioheksil acetat (ng/L)	12	486,3	250,4	945,1	290,8	59,8
V 3-merkaptioheksan-1-ol (ng/L)	12	1014,3	364,1	1870,7	525,2	51,8
Z težka tropska aroma	12	2,2	1,4	2,8	0,4	19,8
A1 sveža tropska aroma	12	2,0	1,0	2,5	0,5	22,8
B1 fermentacijska aroma	12	2,1	1,8	2,5	0,2	9,0
C1zelena aroma	12	1,3	0,9	1,6	0,3	22,6
D1 celokupna kakovost	12	2,5	1,6	3,0	0,5	20,0

n – število vseh vzorcev v poskusu, X_{povpr} – povprečne vrednosti, X_{min} – minimalne vrednosti, X_{max} – maksimalne vrednosti, SO – standardni odklon, KV(%) – koeficient variabilnosti

Priloga M: Korelacijski koeficienti med spremenljivkami poskusa 5, uporabljenimi v LDA

Annex M: Correlation coefficients between variables of the experiment 5, used in LDA

	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	R	S	T	U	V	Z	A1	B1	C1	D1
A	-0,69	-0,50	0,04	0,15	0,98	-0,65	0,17	0,52	-0,43	-0,68	-0,34	-0,55	0,06	0,41	0,31	0,44	0,36	0,42	0,58	0,28	0,17	0,16	-0,08	-0,09	0,19
B	1,00	0,13	-0,26	-0,07	-0,30	0,49	-0,28	-0,81	0,55	0,78	0,56	0,70	-0,41	-0,57	0,26	-0,69	-0,55	-0,74	-0,87	-0,29	-0,13	-0,12	0,16	-0,30	-0,19
C		1,00	-0,11	-0,66	-0,11	0,55	0,36	0,14	-0,05	-0,04	-0,11	-0,13	0,46	0,14	-0,74	0,25	0,25	-0,22	-0,05	0,23	-0,29	-0,42	-0,21	-0,06	-0,41
D			1,00	0,76	0,98	0,30	-0,39	-0,07	0,49	-0,16	0,12	0,16	0,14	0,61	-0,19	0,13	-0,25	0,42	0,30	-0,63	0,45	0,61	-0,06	0,69	0,63
E				1,00	0,75	0,06	-0,68	-0,36	0,56	0,16	0,37	0,44	-0,36	0,17	0,33	-0,30	-0,57	0,27	-0,00	-0,73	0,46	0,69	0,11	0,50	0,66
F					1,00	0,30	-0,37	-0,04	0,47	-0,13	0,06	0,15	0,19	0,62	-0,26	0,16	-0,24	0,46	0,33	-0,62	0,46	0,59	-0,06	0,70	0,63
G						1,00	-0,23	-0,45	0,61	0,39	0,48	0,51	-0,04	-0,00	-0,43	-0,26	-0,46	-0,48	-0,51	-0,37	-0,10	-0,04	-0,17	0,10	-0,10
H							1,00	0,77	-0,69	-0,57	-0,83	-0,86	0,78	0,17	-0,49	0,78	0,91	0,03	0,50	0,88	-0,44	-0,72	-0,38	-0,35	-0,54
I								1,00	-0,80	-0,85	-0,84	-0,97	0,70	0,42	-0,48	0,89	0,91	0,46	0,84	0,74	-0,26	-0,39	-0,38	-0,00	-0,25
J									1,00	0,63	0,62	0,81	-0,34	-0,03	0,17	-0,55	-0,81	-0,13	-0,49	-0,85	0,40	0,52	0,43	0,41	0,52
K										1,00	0,59	0,56	-0,53	-0,62	0,26	-0,81	-0,75	-0,38	-0,78	-0,55	0,15	0,15	0,40	-0,07	0,07
L											1,00	0,88	-0,87	-0,42	0,44	-0,89	-0,89	-0,51	-0,80	-0,65	0,05	0,33	0,18	0,02	0,11
M												1,00	-0,73	-0,42	0,39	-0,91	-0,96	-0,38	-0,81	-0,80	0,26	0,44	0,36	0,12	0,28
N													1,00	0,60	-0,70	0,90	0,78	0,42	0,72	0,44	0,00	-0,28	-0,22	0,15	-0,05
O														1,00	-0,32	0,69	0,36	0,56	0,68	-0,07	0,47	0,41	-0,15	0,44	0,49
P															1,00	-0,55	-0,41	-0,07	-0,32	-0,31	0,36	0,46	0,50	-0,09	0,36
R																1,00	0,88	0,52	0,88	0,57	-0,02	-0,23	-0,30	0,13	-0,03
S																	1,00	0,32	0,74	0,82	-0,24	-0,48	-0,32	-0,15	-0,32
T																		1,00	0,83	-0,15	0,62	0,52	0,40	0,66	0,66
U																			1,00	0,32	0,25	0,10	-0,05	0,38	0,28
V																				1,00	-0,65	-0,80	-0,47	-0,53	-0,72
Z																					1,00	0,88	0,61	0,52	0,90
A1																						1,00	0,54	0,67	0,95
B1																							1,00	0,45	0,60
C1																								1,00	0,77

Odebeljene številke pomenijo signifikantno korelacijo pri $p < 0,0001$