

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Pija CAR

**VPLIV BAKROVIH IONOV NA FERMENTACIJSKO
KINETIKO RAZLIČNIH SEVOV KVASOVK IN
KAKOVOST PRIDELANIH MLADIH VIN SORTE
LAŠKI RIZLING**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Pija CAR

**VPLIV BAKROVIH IONOV NA FERMENTACIJSKO KINETIKO
RAZLIČNIH SEVOV KVASOVK IN KAKOVOST PRIDELANIH
MLADIH VIN SORTE LAŠKI RIZLING**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IMPACT OF THE COPPER IONS ON FERMENTATION KINETICS
OF DIFFERENT YEAST STAINS AND QUALITY OF YOUNG WINE
OF WELSHRIESLING VARIETY**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Raziskava in vsi poskusi so bili opravljeni na Univerzi v Ljubljani, Biotehniški fakulteti, oddelku za živilstvo, na Katedri za tehnologije, prehrano in vino.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Tatjana Košmerl, za somentorja doc. dr. Vojmir Francetič, za recenzentko pa doc. dr. Neža Čadež.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Košmerl

Somentor: doc. dr. Vojmir Francetič

Recenzentka: doc. dr. Neža Čadež

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Pija Car

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 663.251/.253:663.221:543.2/.9(043)=163.6
KG	vino/ belo vino/ laški rizling/ alkoholna fermentacija/ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> / starter kulture/ hranilo za kvasovke/ bakrovi ioni/ fizikalno-kemijske lastnosti/ mošt
AV	CAR, Pija
SA	KOŠMERL, Tatjana (mentorica)/FRANCETIČ, Vojmir (somentor)/ČADEŽ, Neža (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2015
IN	VPLIV BAKROVIH IONOV NA FERMENTACIJSKO KINETIKO RAZLIČNIH SEVOV KVASOVK IN KAKOVOST PRIDELANIH MLADIH VIN SORTE LAŠKI RIZLING
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XIII, 76 str., 4 preg., 31 sl., 11 pril., 40 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Namen diplomske naloge je bilo ugotoviti kako različni sevi kvasovk in različni dodatki kvasovkam vplivajo na kinetiko fermentacije. Za poskus smo izbrali mošt sorte laški rizling s Ptuja, letnik 2010. Izvedli smo tri fermentacije, s tremi različnimi sevi kvasovk. V vse vzorce, razen kontrole, smo inokulirali kvasovke. Določenim vzorcem smo dodali tudi hranilo za kvasovke in bakrove ione. Opravili smo osnovne fizikalno-kemijske meritve mošta in mladega vina. Merili smo pH, skupne (titrabilne) kisline, vsebnost reducirajočih sladkorjev, motnost, sladkorno stopnjo, prosti aminokislinski dušik ter prosti, skupni in vezan žveplov dioksid. V mladem vinu smo dodatno merili še relativno gostoto, ekstrakt in alkohol v vinu ter hlapne kisline. Vse vzorce smo tudi mikroskopirali. Iz fermentacijskih krivulj lahko ugotovimo, da je najhitreje in najbolj intenzivno potekla tretja fermentacija (C), najpočasneje pa prva (A). Pri vseh treh fermentacijah je v vzorcih, katerim smo dodali vire hranil, nastalo največ alkohola (>8 vol.%) ter ostalo najmanj reducirajočih sladkorjev (<2 g/L). Drugače pa je pri vzorcih, katerim smo dodali 2 mg/L Cu^{2+} . Tukaj je ostalo največ nepovretega sladkorja (3,5-6,5 g/L). Na fermentacijo so vplivali tako dodatki kot izbira seva kvasovke. Pozorni moramo biti torej na obeh področjih, če želimo izvesti najbolj optimalno fermentacijo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
 DC UDK 663.251/.253:663.221:543.2/.9(043)=163.6
 CX wine/ white wine/ Welschriesling/ alcoholic fermentation/ *Saccharomyces cerevisiae*/ starter culture/ nutrients for yeasts/ copper ions/ physico-chemical properties/ must
 AU CAR, Pija
 AA KOŠMERL, Tatjana (supervisor)/ FRANCETIČ, Vojmir (co-advisor)/ČADEŽ, Neža (reviewer)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
 PY 2015
 TI IMPACT OF THE COPPER IONS ON FERMENTATION KINETICS OF DIFFERENT YEAST STRAINS AND QUALITY OF YOUNG WINE OF WELSHRIESLING VARIETY
 DT Graduation Thesis (University studies)
 NO XIII, 76 p., 4 tab., 31 fig., 11 ann., 40 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The purpose of the thesis was to determine how different yeast strains and various additives for yeast affect the fermentation. For the experiment we used Welschriesling must from Ptuj, year 2010. We performed three fermentations with three different yeast strains. In all samples, except the control, we inoculated yeasts. To certain samples we added nutrients for yeasts and copper ions. Must and young wine were analysed by basic physico-chemical measurements. We measured pH, total (titratable) acid, constant reducing sugars, turbidity, sugar level, free amino nitrogen and free, bound and total sulfur dioxide. In young wines we additionally measured relative density, extract and alcohol in the wine and volatile acidity. All samples were also microscopied. From the fermentation curves, we can see that the fastest was the third fermentation (C) and the slowest was the first fermentation (A). In all three fermentations to which the nutrients were added, contained the highest level of alcohol (>8 vol. %) and the lowest level of reducing sugars (<2 g/L). The samples to which were added 2 mg/L Cu²⁺ were different from others. The level of reducing sugars is the highest here (3,5-6,5 g/L). The fermentation was affected by the choice of additives as well as by the yeast strain. Therefore we must carefully select both aspects when we are trying to implement the most optimal fermentation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PREGLEDNIC	XI
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 O VINU	3
2.1.1 Laški rizling	3
2.1.1.1 Ampelografske značilnosti.....	3
2.1.1.2 Gospodarska vrednost sorte	4
2.2 OD GROZDJA DO VINA	4
2.2.1 Trgatev.....	4
2.2.2 Ekstrakcija soka	4
2.2.3 Bistrenje.....	5
2.2.4 Alkoholna fermentacija vina	5
2.2.4.1 Sekundarni produkti.....	6
2.2.4.2 Prisotnost bakrovih ionov med fermentacijo	7
2.2.5 Fermentacijske operacije.....	7
2.2.5.1 Polnjenje.....	7
2.2.5.2 Inokulacija kvasovk	7
2.2.5.3 Dodajanje amonijevih soli in prezračevanje mošta.....	8
2.2.5.4 Kontrola temperature	9
2.2.5.5 Zaključek alkoholne fermentacije.....	9
2.2.5.6 Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija	9

2.2.6 Tipi fermentacij	10
2.3 STARTER KULTURE KVASOVK.....	10
2.3.1 Izbor kvasovk.....	10
2.3.2 Osnovne lastnosti starterskih kultur vinskih kvasovk	11
2.3.3 Zahteve za industrijsko produkcijo starterskih kultur	12
2.3.3.1 Osnovne zahteve	12
2.3.3.2 Dodatne zahteve	12
2.3.3.3 Priprava vitalne starterske kulture.....	12
2.3.3.4 Faza rehidracije	13
2.4 MIKROOGANIZMI V VINU IN MOŠTU	13
2.4.1 Kvasovke	14
2.4.1.1 Splošne značilnosti vinskih kvasovk.....	14
2.4.1.2 Citologija kvasovk	16
2.4.1.3 Rast kvasovk	16
2.4.1.3.1 Vegetativna rast	16
2.4.1.3.2 Spolna rast	17
2.4.2 Mlečnokislinske bakterije	17
2.4.3 Ocetnokislinske bakterije	19
2.5 KEMIJSKA IN BIOLOŠKA SESTAVA GROZDJA, MOŠTA IN VINA	20
2.5.1 Sestava grozdja	20
2.5.1.1 Sestava peclja.....	20
2.5.1.2 Sestava pečk.....	20
2.5.1.3 Sestava kože	20
2.5.1.4 Sestava jagodnega mesa.....	21
2.5.2 Sestava mošta	21
2.5.2.1 Sladkorji	22
2.5.2.2 Organske kisline.....	22
2.5.2.3 Dušikove spojine.....	22
2.5.2.4 Minerali	23
2.5.2.5 Polifenoli	23
2.5.2.6 Vitamini	24
2.5.2.7 Aromatske spojine.....	24

2.5.3 Sestava vina	24
2.5.3.1 Voda	24
2.5.3.2 Sladkorji	24
2.5.3.3 Organske kisline	25
2.5.3.4 Fenolne spojine	26
2.5.3.5 Mineralne snovi	26
2.5.3.6 Dušikove spojine	27
2.5.3.7 Vitamini	27
2.5.3.8 Aromatične spojine	27
2.5.3.9 Alkoholi	28
3 METODE DELA IN MATERIALI	29
3.1 MATERIALI	29
3.1.1 Mošt	29
3.1.2 Kvasovke – starterska kultura	29
3.1.2.1 UVAFERM SLO	29
3.1.2.2 LALVIN ICV D 47	29
3.1.2.3 LALVIN QA 23	30
3.1.3 Hranila	30
3.1.4 Bakrovi ioni	30
3.1.5 Kemikalije in reagenti	30
3.1.6 Pribor in oprema	31
3.2 METODE DELA	31
3.2.1 Postavitev poskusa	31
3.2.2 Mikroskopiranje	33
3.2.3 Kemijske analize vina in mošta	33
3.2.3.1 Določanje skupnih (titrabilnih) kislin	33
3.2.3.3 Določanje pH vina in mošta	35
3.2.3.4 Določanje reducirajočih sladkorjev v vinu	35
3.2.3.5 Določanje hlapnih kislin v vinu	36
3.2.3.6 Določanje prostega aminokislinskega dušika v vinu	37
3.2.3.7 Določanje motnosti vina in mošta	38
3.2.3.8 Določanje sladkorja v vinu in moštu	38

3.2.3.9 Določanje relativne gostote, ekstrakta in alkohola v vinu	38
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	40
4.1 REZULTATI ANALIZE MOŠTA	40
4.1.1 Mikroskopiranje mošta.....	40
4.1.2 Motnost mošta.....	42
4.1.3 pH mošta.....	43
4.1.4 Skupne (titrabilne) kisline	43
4.1.5 Žveplov dioksid	44
4.1.6 Prosti aminokislinski dušik (FAN).....	45
4.2 REZULTATI ANALIZE VINA	46
4.2.1 Fermentacijska kinetika	46
4.2.2 Kvasna biomasa	50
4.2.3 Mikroskopiranje	53
4.2.4 Motnost vina.....	56
4.2.5 pH vina	57
4.2.6 Skupne (titrabilne) kisline vina	58
4.2.7 Žveplov dioksid v vinu	60
4.2.8 Reducirajoči sladkorji v vinu	61
4.2.9 Relativna gostota vzorca vina.....	62
4.2.10 Skupni suhi ekstrakt vina	63
4.2.11 Sladkorja prosti ekstrakt	64
4.2.12 Alkohol v vinu	65
4.2.13 Hlapne kisline v vinu	66
4.2.14 Prosti aminokislinski dušik (FAN) v vinu	68
5 SKLEPI	69
6 POVZETEK.....	71
7 VIRI	73
ZAHVALA	1
PRILOGE.....	2

KAZALO SLIK

Slika 1: Celice kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pod vrstičnim elektronskim mikroskopom. Na sliki se vidijo tudi brazgotine od brstenja (Vir: Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).....	17
Slika 2: Shematski prikaz postavitve poskusa.....	32
Slika 3: Kristal vinskega kamna vzorca odvzetega iz sredine gošče mošta pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi.....	41
Slika 4: Kristali vinskega kamna vzorca odvzetega iz dna gošče mošta pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi.....	41
Slika 5: Vrednost motnosti v NTU v moštu pred začetkom fermentacije.....	42
Slika 6: Vrednost pH mošta pred začetkom fermentacije.....	43
Slika 7: Skupne (titrabilne) kisline v moštu pred začetkom fermentacije.....	44
Slika 8: Vsebnost žveplovega dioksida v moštu pred začetkom fermentacije.....	45
Slika 9: Vsebnost prostega aminokislinskega dušika v moštu pred začetkom fermentacije.....	46
Slika 10: Kinetika fermentacije pri fermentaciji A.....	47
Slika 11: Kinetika fermentacije pri fermentaciji B.....	48
Slika 12: Kinetika fermentacije pri fermentaciji C.....	49
Slika 13: Masa proizvedene mokre kvasne biomase pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).....	51
Slika 14: Masa proizvedene suhe kvasne biomase pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).....	53
Slika 15: Kvasne celice z dna fermentacijske posode, pri spontani fermentaciji pod mikroskopom pri 400x povečavi.....	54
Slika 16: Skupki celic v bistrem mladem vinu iz fermentacijskih posod, kjer smo moštu dodali kvasovke, pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi.....	54
Slika 17: Kvasne celice v mladem vinu z dna fermentacijske posode, kjer smo moštu dodali kvasovke, pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi.....	55

Slika 18: Kvasne celice v mladem vinu z dna fermentacijske posode, kjer smo moštu dodali kvasovke in hrano, pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi	55
Slika 19: Kvasne celice v mladem vinu z dna fermentacijske posode, kjer smo moštu dodali kvasovke in 1 mg/L bakrovih ionov, pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi.....	56
Slika 20: Kvasne celice v mladem vinu z dna fermentacijske posode, kjer smo moštu dodali kvasovke in 2 mg/L bakrovih ionov, pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi.....	56
Slika 21: Motnost mladega vina (NTU) v vzorcih pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).....	57
Slika 22: Vrednost pH v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).	58
Slika 23: Skupne (titrabilne) kisline (g/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).	59
Slika 24: Prosti, vezani in skupni žveplov dioksid (mg/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).....	60
Slika 25: Koncentracija reducirajočih sladkorjev (g/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).....	62
Slika 26: Relativna gostota v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).....	63
Slika 27: Skupni ekstrakt (g/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).....	64
Slika 28: Vrednost sladkorja prostega ekstrakta (g/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).....	65
Slika 29: Koncentracija alkohola (vol.%) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).	66
Slika 30: Koncentracija hlapnih kislin (g očetne kisline/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).....	67
Slika 31: Koncentracija prostega aminokislinskega dušika (mg N/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).....	68

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Želene značilnosti starterskih kultur vinskih kvasovk (Pretorius, 2000).....	11
Preglednica 2: Okvirne vrednosti spojin, ki sestavljajo mošt (Moreno in Peinado, 2012) .	22
Preglednica 3: Oznake vzorcev in uporabljene kvasovke pri fermentacijah.....	40
Preglednica 4: Oznake vzorcev in dodatki, ki smo jih dodali določenemu vzorcu.....	40

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mošta pred vsako izmed treh fermentacij.
- Priloga B: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina v kontrolnih vzorcih (0) pri vseh treh fermentacijah (spontane fermentacije).
- Priloga C: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina v vzorcih (1-3), katerim smo dodali kvasovke, pri vseh treh fermentacijah.
- Priloga D: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina v vzorcih (4-6), katerim smo dodali kvasovke in hrano, pri vseh treh fermentacijah.
- Priloga E: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina v vzorcih (7-9), katerim smo dodali kvasovke in 1 mg/L Cu^{2+} , pri vseh treh fermentacijah.
- Priloga F: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina v vzorcih (10-12), katerim smo dodali kvasovke in 2 mg/L Cu^{2+} , pri vseh treh fermentacijah.
- Priloga G: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina pri fermentaciji A, v vseh vzorcih.
- Priloga H: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina pri fermentaciji B, v vseh vzorcih.
- Priloga I: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina pri fermentaciji C, v vseh vzorcih.
- Priloga J: Umeritvena krivulja za določanje prostega aminokislinskega dušika (FAN) za datum 4.3.2011.
- Priloga K: Umeritvena krivulja za določanje prostega aminokislinskega dušika (FAN) za datum 8.3.2011.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin trifosfat
CFU	mikrobna celica, iz katere se razvije posamezna kolonija; število kolonijskih enot (<i>ang. colony forming unit</i>)
LR	laški rizling
NTU	nefelometrična turbidimetrična enota (<i>ang. Nephelometric turbidity unit</i>)

1 UVOD

Beseda »vino« se nanaša na pridelek, ki je nastal z alkoholno fermentacijo grozdnega soka v prisotnosti kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*) in kateri sledi določen čas staranja proizvoda. Vino je že od nekdaj navduševalo človeka zaradi svoje kompleksnosti in ker se njegovo telo vedno spreminja. Dandanes že vemo, da v vinu prihaja do interakcij med več kot petsto spojinami, katere prispevajo h končnemu okusu, aromi in strukturi same pijače. Vendarle pa je izjemno težko ocenjevati vpliv vsake spojine posebej (Hornsey, 2007). Sodobna pridelava vina je skoraj neprepoznavna v primerjavi tisto, staro 7500 let. Za vinarstvo sta bili pomembni dve veliki prelomnici. Prva je bila v letih 1600, ko je izjemno napredovala proizvodnja stekla in plutovinastih zamaškov. Zaradi tega napredka so lahko pričeli s staranjem vina, prav tako pa so lahko začeli dosledno delati peneča vina. Druga prelomnica je bila v letih 1800, ko je Pasteur začel s preučevanjem mikroorganizmov, ki sodelujejo v procesu fermentacije. S tem so lahko boljše razumeli njihovo izjemno pomembno vlogo za potek same fermentacije (Jackson, 2014).

Kemijsko gledano je fermentacija metabolični proces, pri katerem se sprošča energija. Tako substrat (začetni donator elektronov) kot tudi končni produkt (končni prejemnik elektronov) sta organski spojini. Obstaja mnogo fermentacijskih poti, vendar kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* sledijo najbolj razširjeni – alkoholni fermentaciji. Pri alkoholni fermentaciji je etanol končni prejemnik elektronov (končni produkt), glukoza pa je začetni donator elektronov (substrat). Nastanek vina je zaprt fermentacijski proces, kar pomeni, da je hranil največ na začetku procesa in njihova koncentracija s časom pada. Na koncu fermentacije torej ostane zelo malo sladkorjev, saj se jih večina metabolizira (Jackson, 2014).

Različne študije kvasne populacije med spontano fermentacijo so pokazale, da so kvasovke, ki niso rodu *Saccharomyces*, prisotne v prvih fazah fermentacije, dokler se ne doseže 5 vol.% nastalega alkohola. Nasledijo jih sevi kvasovk rodu *Saccharomyces*, ki so bolj fermentativne in so tudi bolj tolerantne na alkohol (Blanco in sod., 2013b). Pri nadaljnjih študijah je bilo dokazano, da se zaradi izbire dodanih kvasovk razlikuje koncentracija kar 65-70 % kemijskih spojin v vinu. Razlike so bile opazne pri osnovnih kemijskih parametrih (pH, titrabilne kisline, glicerol, organske kisline), prav tako pa pri koncentraciji fenolov, vključno s koncentracije taninov, pigmentiranih polimerov in antocianov ter hlapnih spojin. Edina ne-*Saccharomyces cerevisiae* kvasovka, ki je bila uporabljena v tej raziskavi, je bila vrsta *Saccharomyces bayanus*. Vino, pridelano s to kvasovko, se je tudi najbolj razlikovalo od drugih, vendar pa so se tudi vina, pridelana s kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae*, precej razlikovala med seboj (Holt in sod., 2013). Ravno zaradi takšnih vplivov kvasovk je pomembno, da poznamo seve kvasovk in njihov vpliv na fermentacijo.

1.1 CILJI DIPLOMSKE NALOGE

Želeli smo ugotoviti, kako različni sevi kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* vplivajo na kakovostne parametre in kateri sev je najbolj primeren za fermentacijo belega mošta, natančneje sorte laški rizling. Prav tako pa smo tudi želeli ugotoviti, kakšen vpliv imajo na rast kvasovk različni dodatki, kot sta hrana in bakrovi ioni.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Pričakujemo, da uporabljeni sevi kvasovk različno vplivajo na večino fizikalno-kemijskih parametrov vina.
- Pričakujemo, da različni dodatki vplivajo na potek fermentacije. Pri vzorcih, kjer bomo dodali vire hranil, pričakujemo hitrejšo in bolj intenzivno fermentacijo, pri vzorcih kjer bomo dodali bakrove ione, pa pričakujemo ravno obraten odziv kvasovk.

2 PREGLED OBJAV

2.1 O VINU

Vino je eno izmed najstarejših fermentiranih živil, ki je postalo skomercializirano, se masovno proizvaja in je zelo proučevano. Pravzaprav se je mnogo prvih mikrobiologov in kemikov ukvarjalo prav z nastankom vina in znanostjo povezano z vinom. Manj kot 150 let nazaj, ko so še razpravljali o obstoju mikroorganizmov, je Pasteur dokazal ne samo obstoj mikroorganizmov, ampak tudi, da so prav mikroorganizmi odgovorni tako za nastanek kot tudi kvar vina. Seveda so bila sredstva za preprečevanje kvara vina pomembna že v antičnih časih, ko so Egipčanski in Rimljanski vinarji začeli uporabljati žveplov dioksid (v obliki gorečih žveplovih trakov) kot prvo znano protimikrobno sredstvo (Hutkins, 2006).

2.1.1 Laški rizling

2.1.1.1 Ampelografske značilnosti

Laški rizling je v tujini poznan kot graševina, Welshriesling, Riesling italien blanc. Izvira iz Francije, po ekološko-geografski razvrstitvi sort glede na poreklo po Nergulju pa spada laški rizling v zahodnoevropsko skupino – *Proles occidentalis*. V vinorodni deželi Podravje je to najbolj razširjena sorta. Precej ga je tudi v posavskem in nekaj tudi v primorskem vinorodnem rajonu. Razširjen je tudi v Nemčiji, Avstriji, na Madžarskem, v Bolgariji, Romuniji in Rusiji. Kot italijanski rizling je sorta razširjena v Srbiji, kot graševina pa na Hrvaškem (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

Vršiček mladike je svetlozelen in dlakav. List je srednje velik, okroglast in tridelen. Gornja stran lista je svetlozelena, gladka in gola; spodnja stran lista je blede zelenkasta in posuta z redkimi dlačicami. Listni pecelj je kratek, tanek, gol in zelene barve. Grozd je majhen ali srednje velik, zbit, valjast in pogosto nekoliko vejnat. Grozdni pecelj je dolg in tanek. Jagoda je majhna, okrogla, v zbitem grozdu pa nekoliko podolgovata. Jagodna kožica je precej debela, prozorna, pretkana z drobnimi žilicami, zelenkasto rumena, na sončni strani opečena ter posuta z oprhom. Za sorto je zelo značilen močno izražen jagodni popek. Sok je brezbarven, sladek in prijetnega okusa (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

Za to sorte je značilno, da je pozna sorta, bujnost pridelka pa je srednje močna. Masa grozdja je v razponu od 60 do 150 g. Pridelek je velik, zaradi česar jo mnogi štejejo med »masovnice«. Je srednje odporna na bolezni, vendar dobro odporna proti pozebi (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

2.1.1.2 Gospodarska vrednost sorte

Vsebnost sladkorja dosega povprečno 71 do 75 °Oe sladkorja v moštu. Na dobrih legah in pri dobri dozorelosti grozdja daje laški rizling kakovostna vina z izrazitimi sortnimi lastnostmi; prijetno svežega okusa in prijetnega vonja (Hrček in Korošec-Koruza, 1996). V uradnem sortimentu je kot priporočena sorta predviden v vseh treh vinorodnih deželah in sicer v vinorodni deželi Podravje, Posavje in Primorska. V vinorodni deželi Podravje je priporočena sorta v naslednjih okoliših: vinorodnem okolišu Štajerska Slovenija in Prekmurje. V vinorodni deželi Posavje je priporočena sorta v vseh treh okoliših; Bizeljsko Sremič, Dolenjska, Bela krajina. V vinorodni deželi Primorje pa je priporočena samo v vinorodnem okolišu Kras (Pravilnik o seznamu geografskih označb..., 2007).

2.2 OD GROZDJA DO VINA

2.2.1 Trgatev

Že dolgo je znano, da je trgatev grozdja za kakovostno belo vino težja in zahteva več previdnosti kot za rdeče vino. Belo vino ima bolj nežen vonj kot rdeče, saj je tudi bolj občutljivo na oksidacijo in se tako lažje prikrijejo napake v vonju. Aromo lahko delno izgubimo ali pa se spremeni že zelo zgodaj pri sami trgatvi, če ne upoštevamo določenih pravil. Pogoji trgatve morajo biti takšni, da je grozdje, ki ga trgamo, zdravo in da je doseglo tehnološko zrelost (koncentracija sladkorja, kisline in aroma). Poskušamo se izogniti trganju listja, pecljev, umazanije in ostalih odpadkov. Od trganja do prevzema grozdja v vinski kleti mora biti grozdje čim bolj ohranjeno, saj želimo kar se da omejiti oksidacijo in stebelno maceracijo. Grozdje bi naj bilo trgano pri temperaturi nižji od 20 °C. V bolj toplih krajih trgatev poteka ponoči ali zgodaj zjutraj, vendar se je potrebno izogniti vlagi na površini grozda, saj tako prihaja kasneje do razredčevanja. Okuženo grozdje izločimo že v vinogradu. Večkratno selektivno trganje izboljšuje kakovost grozdja. Mehansko trgano grozdje moramo zaščititi pred oksidacijo. Izogniti se moramo žveplanju, saj spodbuja ekstrakcijo fenolnih spojin. Boljša izbira je tako dodajanje suhega ledu (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

2.2.2 Ekstrakcija soka

Pri pridelavi suhega belega vina so odločilni dejavnik za kakovosten končni pridelek predfermentacijske operacije (obdelava in ravnanje z grozdje in sokom). Imajo več vlog. Sem spada ekstrakcija in bistrenje soka v relativno omejem času, z minimalno izguba soka. Spodbuja se difuzija določenih snovi iz kože grozda v sok, natančneje, sadnih arom. Hkrati moramo preprečiti raztapljanje vonja po zelenem in grenkega okusa v sok, ki so posledica trdih delov grozda. Prav tako moramo preprečiti nastanek snovi, ki zmanjšujejo stabilnost ekstrahiranih sadnih arom. Oksidirane fenolne spojine lahko vežejo takšne

arome. Pri fermentaciji soka, ki vsebuje preveč suspendiranih trdnih delcev (rezultat ekstrakcije soka), ne more nastati kakovostno suho belo vino. Pravzaprav ima velika koncentracija suspendiranih trdnih delcev v soku škodljiv učinek na kakovost vina. Prvi kriterij ekstrakcije soka je tako ustvariti čist sok z zeleno bistrostjo (200 NTU). Pridelava vina je niz osnovnih procesov in vsak mora biti zasnovan tako, da olajša delo naslednjemu. Nižja kot je koncentracija suspendiranih trdnih delcev v soku po stiskanju, lažje je doseči bistrost mošta; nasprotno, nemogoče je doseči bistrost po slabo izvedenem stiskanju, kjer ostane dosti suspendiranih trdnih delcev (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

2.2.3 Bistrenje

Sveže ekstrahiran grozdni sok je bolj ali manj moten. Vsebuje suspendirane trdne delce različnega izvora: zemlja, deli kože in stebela, razbite celice iz grozdne kaše, netopni ostanki pri obdelavi vinograda, itd. Makromolekule v raztopini tudi vplivajo na motnost soka. Poleg njih pa imajo bistveno vlogo tudi pektinske snovi iz grozdja. Naravne pektinaze v grozdju (ali tiste, ki jih doda vinar) delujejo na koloidno strukturo soka, kar olajša naravno usedanje. V razmaku nekaj ur se sok loči v dve fazi: bolj ali manj bister sok in ostanki različne gostote. Bistrenje je ločevanje bistrrega soka iz droži pred alkoholno fermentacijo. Količina nastale usedline med ekstrakcijo soka in hitrost posedanja je odvisna od sorte, zdravstvenega stanja grozdja, zrelosti in predvsem od metod, ki jih uporablja vinar (pecljanje-drozganje, stiskanje, itd.). Bister mošt veliko bolj izboljšuje kakovost vina v primerjavi z motnim moštom, saj le-ta vsebuje veliko suspendiranih trdnih delcev. Vina, ki nastanejo iz mošta, kjer je veliko trdnih delcev, imajo težko in zeleno aromo ter so grenkega okusa. Prav tako so tudi bolj obarvana, bogata s fenolnimi snovmi in njihova barva je manj stabilna pri oksidaciji. Na koncu fermentacije pogosto vsebujejo neprijetne vonjave, ki jih je bolj ali manj težko odstraniti s prezračevanjem. Obratno pa iz bistrrega mošta nastanejo vina, ki imajo bolj izrazit saden karakter sorte in so bolj stabilna. Posledici bistrenja sta lahko počasna fermentacija ali celo njena ustavitev. Bistrenje osiromaši mikrofloro mošta. Najbolj preprosta in učinkovita metoda bistrenja soka je naravno usedanje suspendiranih trdnih delcev, ki ji sledi previdno pretakanje (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

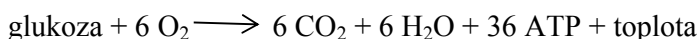
2.2.4 Alkoholna fermentacija vina

Nastanek vina je kompleksni proces, ne samo z mikrobiološkega vidika, ampak tudi iz biokemijskega. Gre za pretvorbo mošta v vino z metabolno aktivnostjo kvasovk, predvsem *Saccharomyces cerevisiae*. Ključni metabolni proces je katabolna pot alkoholne fermentacije, ki vključuje pretvorbo heksoze, prisotne v grozdnem soku, v etanol in ogljikov dioksid. Poleg tega, druge spojine sprožijo pomembne spremembe organoleptičnih lastnosti vina. Alkoholni fermentaciji v vinu sledi jabolčno-mlečnokislinska fermentacija. Ta druga fermentacija zmanjša kislost in prilagodi

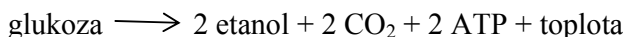
senzoričen profil vina, kar naredi ta proces nepogrešljiv v pridelavi mnogih vin, še posebej rdečih (Rodríguez-Bencomo in sod., 2012).

Najpomembnejši izvor energije pri kvasovkah vrste *Saccharomyces cerevisiae*, je glukoza. Glavna metabolna pot za pretvorbo glukoze do piruvata je glikoliza, pri kateri vzporedno nastaja energija v obliki ATP in se tvorijo intermediati. Ločimo dva osnovna metabolna modela nadaljnje razgradnje piruvata za produkcijo energije:

1. aerobni proces – dihanje ali respiracija: nastajanje biomase, pri tem procesu gre za popolno oksidacijo



2. anaerobni proces – vrenje ali fermentacija: nastajanje etanola, pri tem procesu je acetaldehid končni akceptor elektronov



Razgradnja glukoze do piruvata poteka po enaki poti v anaerobnih in aerobnih razmerah, preko fruktoza-1,6-difosfata in 3-fosfoglicerata. Med alkoholno fermentacijo grozdnega mošta se sladkor (točneje reducirajoči sladkorji) presnavlja v bioprocesu glikolize. Končni produkt glikolize je piruvat oziroma piruvična kislina, ki predstavlja pomembno stopnjo v procesu alkoholne fermentacije. V nadaljnjih reakcijah sledi dekarboksilacija piruvične kisline in to je trenutek, ko se v procesu alkoholne fermentacije pojavi ogljikov dioksid, pri tem pa se tvori acetaldehid, ki se v zadnji encimski stopnji reducira do etanola (Košmerl, 2013).

2.2.4.1 Sekundarni produkti

Kvasna biomasa – med 0,8-1,3 % sladkorja se porabi za kvasno biomaso, droži po končani alkoholni fermentaciji (vključno z 2/3 motnih delcev) predstavljajo med 1,5-3 % fermentirajočega volumna. Metabolni produkti (Košmerl, 2013):

- partnerji vezave SO₂ (porabniki SO₂) = acetaldehid, piruvat, α-ketoglutarat
- glicerol (4-14 g/L)
- mlečna kislina
- očetna kislina (0,2-0,5 g/L), oksidacija acetaldehida v očetno kislino
- citronska kislina
- 2,3-butandiol, acetoin, diacetil
- višji alkoholi: fermentacijski produkti iz aminokislin valin, levcin, izolevcin
- žveplove spojine (SO₂, H₂S, merkaptani, itd.)

2.2.4.2 Prisotnost bakrovih ionov med fermentacijo

Na kinetiko alkoholne fermentacije mošta v povezavi s fermentacijskimi lastnostmi vinskih kvasovk vplivajo številni dejavniki, med katerim se najpogosteje omenjajo ostanki zaščitnih sredstev za varstvo vinske trte, motnost mošta, sev kvasovke, pomanjkanje dušikovih spojin in drugih hranil za kvasovke, visoka temperatura, velikost, oblika fermentorjev ter drugi. Velika vsebnost bakra na grozdju ob trgatvi lahko inhibira rast kvasovk, vpliva na upočasnjeno ali zaustavljeno alkoholno fermentacijo in lahko prispeva k slabši kakovosti vina (Košmerl in sod., 2011). Glede na zakonodajo je največja dovoljena koncentracija bakra v vinu 1 mg/L (Pravilnik o pogojih..., 2004). Mošt običajno vsebuje precej velike koncentracije bakra (5 mg/L). Po končani alkoholni fermentaciji pa je v vinu povprečna koncentracija bakra med 0,3 in 0,4 mg/L (Čuš, 2009).

Rezultati raziskave kažejo, da čeprav je baker esencialen element za kvasne vrste *Saccharomyces cerevisiae*, njegovo dodajanje fermentaciji privede do upočasnjene rasti kvasovk in negativno vpliva na nastajanje etanola. Ta dva učinka prideta najbolj do izraza v mediju, kjer prevladuje glukoza ali saharoza. Tak medij je tudi vino. Že pri manjši dodani koncentraciji Cu^{2+} se v statičnih pogojih zmanjša rast kvasovk za 5 % in za 1,5 % v dinamičnih pogojih (Mrvčič in sod., 2007). Študije so pokazale tudi, da je v vinih, kjer je bila prisotna večja koncentracija bakrovih ionov med fermentacijo, nastalo tudi več očetne kisline in žveplovega dioksida. Kljub temu, da je baker pomemben za preprečevanje bolezni trte, moramo z njim ravnati izjemno previdno. Baker velja za eno izmed najstarejših metod preprečevanja bolezni vinske trte. Zadnje čase se beleži porast uporabe bakra, saj sta baker in žveplo eni izmed redkih snovi, ki jih ekološki vinarji lahko uporabijo pri preprečevanju bolezni (Cavazza in sod., 2013).

2.2.5 Fermentacijske operacije

2.2.5.1 Polnjenje

Fermentorje se napolni z bistrim moštom. Približno 10 % posode pustimo prazne, da ne pride do polivanja, saj med procesom alkoholne fermentacije nastaja pena (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

2.2.5.2 Inokulacija kvasovk

V zadnjih 20 letih ali več se je znatno povečala uporaba suhih aktivnih kvasovk v vinarstvu. To je nadomestilo tradicionalen pristop s starterskimi kvasovkami v številnih vinskih kletah. Pri metodah, razširjenih v preteklosti, je bil mošt zelo žveplan (10 g/hL), saj so tako odpravili škodljive kvasovke in spodbudili rast vinskih kvasovk. Po nekaj dneh spontane fermentacije je tako žveplan mošt z mikroorganizmi inokuliran v na novo

napolnjene fermentorje, pri koncentraciji 2-5 % inokuluma. Kinetika pri spontani fermentaciji belega vina je dokaj naključna. Končna stopnja prevretosti in njena hitrost se spreminjata in sta odvisni od prisotnih avtohtonih sevov. Bistrenje dodatno zmanjšuje število mikroorganizmov v moštu. Majhna koncentracija kvasovk lahko povzroči počasno fermentacijo. Včasih lahko divja mikrobiota izvede spontano fermentacijo z odličnimi rezultati. Izbor sevov vinske kvasovke se je začel z izolacijo sevov pri uspešni spontani fermentaciji. Dandanes se pri pridelavi belega vina uporablja približno 30 sevov aktivnih suhih kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Za pridelavo belega vina ima izbrani sev aktivne suhe kvasovke izrazit pomen na fermentacijsko kinetiko in razvoj različnih arom. Težke fermentacije povzročajo nastanek dolgočasnih in pustih vin, saj ni takšne aromatične izrazitosti in intenzivnosti. Najbolj pomembna lastnost seva kvasovke za pridelavo belega vina je sposobnost popolnoma prefermentirati mošt z gostoto 100-200 NTU, ki vsebuje do 220 g sladkorja na liter, brez pretiranega nastanka hlapnih kislin. Te sposobnosti fermentacije bistrega mošta ni med divjimi kvasovkami. Vinar mora razumeti tako fermentacijsko obnašanje sevov kvasov kot tudi njihov specifičen učinek na aromo vina. Sestava grozdja je odgovorna za aromatično intenzivnost vina. Naloga kvasovk je spremeniti ta aromatski potencial grozdja v proste arome. V beli mošt bi naj inokulirali aktivne suhe kvasovke pri koncentraciji 10-15 g/hL ali 10^6 celic/mL mošta, takoj po bistrenju. Celice se predhodno ponovno aktivira z rehidracijo v mešanici vode in mošta (1:1) na 40 °C za 20 minut. Če je bil mošt zbistren pri nizki temperaturi (10-20 °C) ni potrebno čakati, da se dvigne njegova temperatura pred inokulacijo, saj zgodnja inokulacija zagotavlja implantacijo starterskih kultur (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

2.2.5.3 Dodajanje amonijevih soli in prezračevanje mošta

Splošen mehanizem, ki povezuje potrebo kvasovk po dušiku in kisiku med alkoholno fermentacijo, daje smiselnost dodajanja amonijevih soli in potrebo po zračenju med pridelavo suhega belega vina. Mošt iz belega grozdja, ki ima koncentracijo nižjo kot 25 mg amonijevih kationov ali 160 mg asimilativnega dušika na liter, moramo dopolniti z amonijevim sulfatom. Na sortno aroma belega vina vpliva oksidacija med stiskanjem, vendar pretok zraka med prvo polovico fermentacije nima nobenega vpliva na sadno aromo sorte. Na tej stopnji se aroma zelo uspešno obvaruje pred oksidacijo z zmanjšanjem delovanja kvasovk. Tveganje počasne ali prekinjene fermentacije, kar povzročijo striktno anaerobni pogoji, je bolj resno kot pa minimalna izguba prehodnih fermentacijskih arom. Kisik omogoča sintezo sterolov, to je esencialna komponenta celične stene, potrebna za preživetje kvasovk med stacionarno fazo (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

2.2.5.4 Kontrola temperature

Pri tradicionalni pridelavi belega vina se je fermentacija odvijala v manjših sodih, ki so se nahajali v hladnih kletih s temperaturo med 12 in 16 °C. Med najbolj aktivno fazo fermentacije redkokdaj preseže 22-25 °C. Temperatura v velikih fermentacijskih posodah se mora kontrolirati, da se izognemo povišani temperaturi med fermentacijo. Tako kot pri rdečih vinih, pretirano visoka temperatura (višja kot 30 °C) lahko povzroči prekinitev fermentacije. Ta problem se sicer dandanes redko pojavi, saj imajo vinarji sredstva, s katerimi ohladijo mošt pred začetkom fermentacije. Vpliv temperature na sortno aromo vina je veliko manj znan. Pri zelo visokih temperaturah (28-30 °C) hitro sproščanje ogljikovega dioksida povzroča kopičenje določenih snovi, kar privede do izgube arome. Ni nujno, da fermentacija pri nižjih temperaturah, 18 °C ali 23-24 °C, vodi do izrazito sortne arome vina. Fermentacije pri 18 °C ali manj, nam torej ne zagotavljajo okrepitev sadnega značaja sorte. Večji vpliv imajo procesi pred fermentacijo in izbira seva kvasovk (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

2.2.5.5 Zaključek alkoholne fermentacije

Dolžina fermentacije je pri pridelavi belega vina odvisna od nekaterih parametrov: pogojev ekstrakcije mošta, koncentracije sladkorja in dušika, motnosti, seva kvasovk, pretoka zraka in temperature fermentacije. Vinar lahko prilagaja in kontrolira vse prej naštete parametre. Počasna ali prekinjena fermentacija je odraz brezbržnosti, kar vpliva na kakovost vina. Alkoholna fermentacija belega vina naj ne bi presegala 12 dni. Daljša fermentacija ni zaželena, razen v primeru izjemno velike koncentracije sladkorja. Gostota mošta se meri dnevno, saj se tako spremlja kinetika alkoholne fermentacije. Ko relativna gostota pade na približno 0,994-0,993, se začne dnevno meriti koncentracija sladkorja, da se potrdi zaključek fermentacije. Fermentacija se smatra za zaključeno, ko ostane manj kot 2 g reducirajočih sladkorjev na liter (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

2.2.5.6 Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija

Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija je vedno zaželena pri rdečih vinih, vendar se uporablja manj pogosto pri belih. Njena uporaba je odvisna od sorte vina in vinorodnega okoliša. Glavni cilj te transformacije je razkis vina, prav tako pa poveča biološko stabilnost vina. Ko se enkrat jabolčna kislina razgradi, se vina žvepla z 4-5 g/hL in ostanejo na drožeh do stekleničenja (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

2.2.6 Tipi fermentacij

Fermentacije živil lahko razdelimo v različne tipe glede na; prisotne mikroorganizme, glavni končni produkt, spremembe pH (kislost ali bazičnost) in deležu vlage v živilu. Fermentacija lahko poteče s pomočjo mikroorganizmov, ki so naravno prisotni v surovini (to so tako imenovane naravne, spontane ali divje fermentacije). Dandanes industrijska proizvodnja fermentirane hrane pomeni inokulacijo surovin s starterskimi kulturami, saj se tako zagotovi boljša kontrola in primerna konsistenca produkta (Liu, 2012).

Mikroorganizmi, ki so vključeni v fermentacijo živil, so bakterije, kvasovke in glive (plesni). Glede na vrsto mikroorganizmov poznamo štiri tipe fermentacij: z bakterijami, s kvasovkami, z glivami ter fermentacija z mešanimi kulturami. Produkti fermentacije z bakterijami so različne vrste sirov, fermentirana mleka, fermentirana zelenjava, natto (fermentirana soja) in fermentirane klobase. Pri fermentaciji s kvasovkami je najbolj pogosta transformacija moke v kruh oz. testo, ali pa s sladkorjem bogatih surovin v alkoholne pijače. Fermentacije samo z glivami so redke, sem spadajo na primer nekateri načini fermentacije soje. Večina fermentiranih živil, sploh tistih tradicionalnih ali avtohtonih, je proizvedena s pomočjo mešanih kultur bakterij, kvasovk ali gliv. Na tak način nastanejo siri, zorjeni s plesnijo (plesen in mlečnokislinske bakterije ali bakterije in kvasovke), kefir (mlečnokislinske bakterije in kvasovke), sojina omaka (plesen, mlečnokislinske bakterije in kvasovke), vino (kvasovke in mlečnokislinske bakterije) in kruh (kvasovke in mlečnokislinske bakterije). Glede na glavni končni produkt ali glede na spremembo pH fermentacije živil lahko delimo tudi na alkoholne, kislinske in alkalne. Alkoholne pijače, kjer je etanol glavni končni produkt razgradnje sladkorja, spadajo pod alkoholno fermentacijo, ki jo povzročajo kvasovke. Mlečna fermentacija, ki vključuje mlečnokislinske bakterije, spada v kategorijo kislinskih fermentacij (znižanje pH). Glavni končni produkt pri razgradnji sladkorja je mlečna kislina. Alkalna fermentacija večinoma vključuje nastanek amonijaka zaradi deaminacije aminokislin (zvišanje pH). To se dogaja pri fermentaciji soje. Fermentacije živil lahko potečejo v tekočem, trdnem ali mešanem stanju. V tekočem stanju poteka fermentacija alkoholnih pijač (vino, pivo), fermentacija mleka in jogurta. Primeri fermentacije v trdnem stanju so fermentacija kruha, kakava in kavni zrn ter neke fermentacije soje. Nekatere fermentacije pa med procesom spreminjajo stanje iz tekočega v trdnega (mleko v sir) ali iz trdnega v tekoče (soja v sojino omako) (Liu, 2012).

2.3 STARTER KULTURE KVASOVK

2.3.1 Izbor kvasovk

V modernih vinskih kletah z velikimi kapacitetami večinoma uporabljajo selekcionirane seve *S. cerevisiae*, ki so jamstvo za hitro, učinkovito in predvidljivo alkoholno

fermentacijo in dajejo skladnost okusa in vonja vina po zaključeni fermentaciji. Čisto kulturo *S. cerevisiae* dodajo v mošt po opravljenem žveplanju, katerega namen je zavrtje rasti naravne mikrobne združbe mošta (Pretorius, 2002). Samo na način, da moštu dodamo suhe aktivne kvasovke, lahko zagotovimo nadaljnje razmnoževanje kvasovk oziroma njihovo nadvlado nad avtohtono mikrobiote, kar je pogoj za boljše vodenje fermentacije in za izboljšanje ter standardizacijo kakovosti vina. Avtohtonih kvasovk je običajno v moštu premalo, da bi bile sposobne zagotoviti dober potek fermentacije tudi zaradi tega, ker se kletni higieni danes povsem upravičeno posveča večjo pozornost kot nekoč. Dodatek selekcioniranih kvasovk je torej tudi s tega vidika nujno potreben. Količina kvasovk *S. cerevisiae* v moštu je običajno glede na količino ostalih mikroorganizmov premajhna. In ravno zaradi tega dejstva so bile vinarjem v zadnjih tridesetih letih ponujene različne tehnologije vinifikacije, ki temeljijo na visoki stopnji higijene v kleti in na učinkovitem razsluzevanju moštov (belih in rose) z uporabo pektolitičnih encimov, kieselsola in želatine. S takšnim učinkovitim (toda ne prehudim) bistrenjem iz mošta odstranimo poleg »divjih« mikroorganizmov tudi nekatere nezaželenne polifenole. Razsluzenemu moštu je torej potrebno čim prej dodati suhe aktivne kvasovke rodu *S. cerevisiae* v odmerku, ki zagotavlja vsaj 1.000.000 živih celic na mililiter mošta (Klenar, 2002).

2.3.2 Osnovne lastnosti starterskih kultur vinskih kvasovk

Velika večina vinarjev uporablja za fermentacijo belih in rdečih moštov komercialne starterske kulture, ki so selekcionirane glede na štiri osnovne kriterije: fermentacijske lastnosti, senzorične značilnosti, tehnološke lastnosti in metabolne lastnosti z zdravstvenega stališča (Košmerl, 2013).

Preglednica 1: Želene značilnosti starterskih kultur vinskih kvasovk (Pretorius, 2000)

Fermentacijske lastnosti	Aromatične značilnosti	Tehnološke lastnosti	Metabolne lastnosti (zdravstveno stališče)
- hiter začetek fermentacije - visoka učinkovitost - visoka toleranca na etanol - visoka osmotolerantnost - nizek temperaturni optimum - zmerna produkcija biomase	- majhna tvorba sulfidov/DMS/tiolov - majhna tvorba hlapnih kislin - majhna tvorba višjih alkoholov - sprostitvev prekurzorjev aromatskih snovi - velika tvorba glicerolov - hidrolitska aktivnost - povečana avtoliza - prilagojena esterazna aktivnost	- visoka genetska stabilnost - visoka toleranca na sulfid (SO_2) - nizka sposobnost vezave sulfita - majhna tvorba pene - flokulacijske lastnosti - kompaktnost usedline - odpornost na sušenje - zimocidna (killer) aktivnost - genetska označitev - proteolitična aktivnost - majhna potreba po dušiku	- majhna tvorba sulfita - majhna tvorba biogenih aminov - nizek potencial tvorbe etilkarbamata

2.3.3 Zahteve za industrijsko produkcijo starterskih kultur

Za izboljšanje kemijske in senzorične kakovosti vina in obenem zmanjšanje koncentracije neželenih spojin, ki jih običajno tvorijo ne-*Saccharomyces* kvasovk, je bila na podlagi rezultatov številnih raziskav predlagana uporaba mešanih starterskih kultur *Saccharomyces*/ne-*Saccharomyces*. Inokulacija obojih lahko poteka na različne načine, najpogosteje hkratno ali zaporedno (najprej ne-*Saccharomyces*, čez nekaj dni še *Saccharomyces*). V večini primerov se je kot boljša izkazala hkratna inokulacija (koinokulacija), saj je zaporedna (sekvenčna) inokulacija vodila v upočasnitev ali zaustavljeno alkoholno fermentacijo, kar je posledica pomanjkanja hranil za kvasovke vrste *S. cerevisiae*. Na tvorbo aromatičnih spojin med alkoholno fermentacijo z mešano startersko kulturo v veliki meri vpliva tudi razmerje med *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* kvasovkami v inokulumu (Jenko in sod., 2012). Alkoholna fermentacija z inokulacijo mešanih starterskih kultur z ne-*Saccharomyces* kvasovka je dokaj nezanesljiva in tvegana, v smislu zaustavljenih alkoholnih fermentacij in tvorbe negativnih aromatičnih spojin, ter zahteva za uspešno izvedbo precej znanja o mikrobioloških procesih med alkoholno fermentacijo (Jenko in sod., 2011).

2.3.3.1 Osnovne zahteve

Osnovne zahteve, ki bi jih naj izpolnjevale starterske kulture so: dokončana fermentacija (toleranca na alkohol), toleranca na visoke sladkorne stopnje mošta, na SO₂, na visoke in nizke temperature, na visok tlak (pri penečih vinih), tvorba majhnih količin očetne kisline, acetaldehida, H₂S, merkaptanov, diacetila, SO₂ in omejena tvorba višjih alkoholov, majhno penjenje, flokulativnost po končani alkoholni fermentaciji (izboljšanje bistrenja) in sposobnost sušenja (Košmerl, 2013).

2.3.3.2 Dodatne zahteve

Dodatne zahteve, ki jih prav tako morajo izpolnjevati industrijske starterske kulture so: tvorba zelenih sortnih arom, razgradnja jabolčne kisline, tvorba glicerola, β-glukozidazna aktivnost, zimocidna ali killer aktivnost, majhno izločanje uree, aglomeracija, tvorba estrov, proteazna aktivnost in tvorba inhibitornih snovi za druge kvarljive mikroorganizme (Košmerl, 2013).

2.3.3.3 Priprava vitalne starterske kulture

Za pripravo vitalne starterske kulture moramo slediti navodilom proizvajalca za rehidracijo kvasovk. V inokulumu mora biti vsaj 2-5 milijonov aktivnih kvasnih celic v 1 mL, to odgovarja 1-3 vol.% inokuluma. Odvisno od mošta je potrebno dodati 15-40 g/hL suhih

kvasovk. V primeru slabšega zdravstvenega stanja grozdja (gniloba) potrebujemo večji inokulum, med 20-40 g/hL. V belih moštih iz zdravega grozdja in opravljenem bistrenju je običajni dodatek inokuluma med 15-25 g/hL (Košmerl, 2013).

2.3.3.4 Faza rehidracije

Za rehidracijo suhih starterskih kultur uporabimo neklorirano vodo, ki ima temperaturo 35-40 °C. V prvi fazi rehidracije ne dodamo v vodo niti sladkorja niti mošta, saj bi osmotski stres povzročil zmanjšano živost kvasne populacije, nato previdno premešamo in pustimo nabrekati 20-30 minut. Med »stresne« parametre, ki zahtevajo specifično adaptacijo za zagotovitev celične rasti in preživetja, prištevamo: temperaturo (visoka ali nizka), razpoložljivost esencialnih hranilnih snovi, osmotski tlak (hipo- ali hiperosmotski stres), pH in prisotnost inhibitorjev rasti ali drugih toksičnih komponent (alkohol, kovine, soli) (Košmerl, 2013).

2.4 MIKROOGANIZMI V VINU IN MOŠTU

Kvasovke, bakterije in nitaste glive prispevajo k mikrobni ekologiji pri pridelavi vina in h kemijski sestavi vina, čeprav imajo kvasovke največji vpliv zaradi njihove vloge med alkoholno fermentacijo (Fleet in Heard, 1993). Mnogo dejavnikov vpliva na mikrobno ekologijo pri pridelavi vina, najpomembnejša pa sta kemijska sestava mošta in fermentacijski proces. V kompleksnih mikrobnih ekosistemih, ki vsebujejo mešanice različnih vrst in rodov, lahko pride do interakcij med mikroorganizmi, kar pa tudi določa končno ekologijo (Guillamón in Mas, 2009). Splošno znano je, da mošt predstavlja ekstremne razmere za rast mikroorganizmov, kot sta nizek pH in visoka vsebnost sladkorja. Med alkoholno fermentacijo kvasovke ta delež sladkorja spremenijo v etanol, kar predstavlja še dodatno prepreko za rast mikroorganizmov. Takšne okoljske spremembe so vzrok za spreminjanje mikrobne ekologije skozi celoten proces. Dejavnika, ki torej najbolj vplivata na vrsto mikroorganizmov, ki se pojavljajo v ekosistemu vina, sta toleranca na visoko koncentracijo etanola in toleranca na nizek pH (Fleet in Heard, 1993). Pristnost različnih mikroorganizmov v mediju pa še dodatno ustvari tekmovalnost za hranila. Zgodnja rast kvasovk v moštu zmanjša delež hranil in tako postane vino manj ugodno za rast ostalih mikroorganizmov. Poleg tega se pri rasti mikroorganizmov v medij sproščajo metaboliti, ki so lahko tudi toksični za druge mikroorganizme. Drugi dejavnik, od katerega je odvisna rast nekaterih mikroorganizmov, je nastajanje ogljikovega dioksida, ki zmanjšuje prisotnost kisika in tako torej tudi zmanjša prisotnost aerobnih mikroorganizmov, kot so očetno-kislinske bakterije. Če pa se rast kvasovk zamakne, se lahko bolj razmnožujejo mlečno- ali očetno-kislinske bakterije, ter s tem popolno zavrejo rast kvasov in s tem povzročijo upočasnitev ali celo prekinitev fermentacije (Guillamón in Mas, 2009).

Parameter, ki lahko vpliva na rast mikroorganizmov med alkoholno fermentacijo, je temperatura. Zadnje čase je vedno bolj priljubljena fermentacija belih vin pri kontrolirani temperaturi (med 13 in 18 °C), saj naj bi se tako povečala tvorba in ohranitev hlapnih aromatičnih snovi. Pri rdečih vinih temperatura ni tako kontrolirana in lahko doseže med 25 do 30 °C. Znano je, da temperatura fermentacije vpliva na stopnjo rasti kvasovk in posledično na trajanje fermentacije. Zakasnjena rast kvasovk, ki se pojavi pri nizki temperaturi fermentacije, privede do povišane rasti avtohtone kvasovke in tako se fermentacija upočasni. Vendar pa so bakterije vina bolj občutljive na nižjo temperaturo. Dodajanje žveplovega dioksida moštu in vinu je stalna praksa, ki jo izvajajo vinarji, da kontrolirajo oksidacijske reakcije in preprečijo rast avtohtone mikroflore, kot so kvasovke, ki niso rodu *Saccharomyces* ali očetno- in mlečnokislinske bakterije. Protimikrobna učinkovitost SO₂ je zelo odvisna od vrednosti pH in od prisotnosti reaktivnih molekul, ki se lahko vežejo na SO₂. Pri nizkem pH mošta ali vina je več prostega SO₂, ki je takšna aktivna oblika s protimikrobnim učinkom (Guillamón in Mas, 2009).

2.4.1 Kvasovke

2.4.1.1 Splošne značilnosti vinskih kvasovk

Vrsta *Saccharomyces cerevisiae* je znana kot »vinska kvasovka«. Znano je tudi, da z različnimi sevi kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* pridelamo po kakovosti zelo različna vina. Čeprav je ta vrsta prevladujoča na koncu sleherne alkoholne fermentacije, pa je na površini grozdne jagode in v moštu prisotna le v zelo majhnem številu. Prevladujejo namreč avtohtoni ali endogeni rodovi ne-*Saccharomyces* nesporogenih kvasovk, zlasti vrste *Hanseniaspora uvarum*, *Candida zemplinina*, *Torulospira delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* in *Saccharomycodes ludwigii*, ki so prisotne v začetnih fazah fermentacije in dosežejo končno koncentracijo celo 10⁶-10⁸ CFU/mL (prve tri vrste), preden odmrejo. Delež kvasovk rodov *Hanseniaspora* in *Candida zemplinina* je lahko relativno velik v primerjavi s kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae* tudi v mladem vinu po končani fermentaciji (Košmerl, 2013). Po taksonomiji znanost definira kvasovke kot enocelične glive, ki se razmnožujejo s cepitvijo in celično delitvijo. Kvasovke tvorijo kompleksno in heterogeno skupino, ki se pojavlja v treh razredih gliv, različnih glede na način razmnoževanja: Ascomycetes, Basidiomycetes in Deuteromycetes (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

Končno kakovost vina določajo (Košmerl, 2007b):

- kakovost grozdja (sorta, okolje, vinogradniška tehnologija, zrelost, zdravstveno stanje)
- ekstrakcija grozdnega soka (mehanska ali ročna trgatev, zgoščevanje soka ali koncentriranje, stiskanje celega grozdja ali razpecljanega in zdrozganega, vrsta stiskalnic, maceracija, temperatura, čas)
- fermentacija (rodovi, vrste in sevi kvasovk ter mlečnokislinskih bakterij, temperatura, pH, SO₂, vrsta fermentacijske posode, podaljšan čas kontakta z jagodno kožico, stiskanje, dodatek/dodatki enoloških sredstev, idr.)
- stekleničenje in zorenje (steklenice ali lesena posoda, vrsta zamaškov ali pokrovcov, bag-in-box, mikrobiološke spremembe)

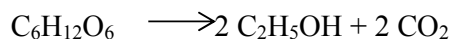
Dolgo se je smatralo, da z dodatkom določenih sevov kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* v mošt dosežemo njihovo prevlado nekje v sredini in/ali proti koncu fermentacije. Z raziskavami zadnjih nekaj let je dokazano, da ni nujno, da je dodan sev kvasovke tudi prevladujoči sev na koncu. Tudi dodatek visokega inokuluma kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* ne zatre popolnoma rasti avtohtonih kvasovk rodov ne-*Saccharomyces* s specifično biokemijsko aktivnostjo, ki s svojim razmnoževanjem vplivajo ne samo na kemijsko sestavo vina, verjetno tudi poznejšo rast in metabolizem kvasov vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Njihov prispevek h končni kakovosti vina vsekakor ni zanemarljiv s senzoričnega stališča, saj njihov metabolizem v prvih dneh fermentacije značilno prispeva k tvorbi hlapnih kislin. Tako npr. čista kultura kvasovk vrste *Candida zemplinina* tvori večje koncentracije glicerola, kvasovke vrste *Torulaspora delbrueckii* pa majhne koncentracije očetne kisline, etil acetata in acetaldehida (Košmerl, 2013).

Kvasovke so kemoheterotrofni organizmi, to pomeni, da črpajo za življenje pomembno energijo iz organskih spojin, kjer je ta energija vezana. V katabolizmu vseh kemoheterotrofnih organizmov je osnovnega pomena dihanje. To so procesi oksidativno-reduktivne disimilacije energetske hrane, tj. organskih sestavin hrane, iz katerih organizmi črpajo energijo. Glavna energetska hrana kvasovk so sladkorji, ki imajo isto vlogo v katabolizmu mnogih drugih kemoheterotrofnih organizmov (Konjajev, 1974).

Pri kvasovkah poznamo dva glavna tipa dihanja:

- oksidativno dihanje, pri čem so organske spojine oksidirane večinoma maksimalno, tj. do CO₂ in vode
- neoksidativno dihanje: alkoholno vrenje sladkorjev

Za večino kvasovk značilen način dihanja je alkoholno (etanolovo) vrenje heksoz (Konjajev, 1974):



2.4.1.2 Citologija kvasovk

Kvasovke so bile prvi mikrorganizmi, ki so jih obširno preučevali v znanstvene namene, predvsem zaradi njihove velikosti in velikega gospodarskega pomena. Kvasovke so med mikroskopsko majhnimi glivami tudi najbolj enostavne (Hornsey, 2007). Kvasovke uvrščamo med evkarionte, torej med celičarje z oblikovanim jedrom (Konjajev, 1974). Celice *Saccharomyces cerevisiae* so v splošnem elipsoidne oblike in po daljšem premeru merijo od 5 do 10 μm , po krajšem pa od 1 do 7 μm . Celica s časom raste (Hornsey, 2007).

2.4.1.3 Rast kvasovk

Splošno znan način rasti pri kvasovkah je brstenje, vendar se razmnožujejo kvasovke še na različne druge načine, in sicer vegetativno (nespolno) ter generativno (spolno, povezano s kopulacijo). Različni načini razmnoževanja so značilni za posamezne taksone kvasovk (Konjajev, 1974).

2.4.1.3.1 Vegetativna rast

Kvasovke se vegetativno oziroma nesporno razmnožujejo z brstenjem, z delitvijo ali z nastankom konidijev (Boekhout in Phaff, 2003).

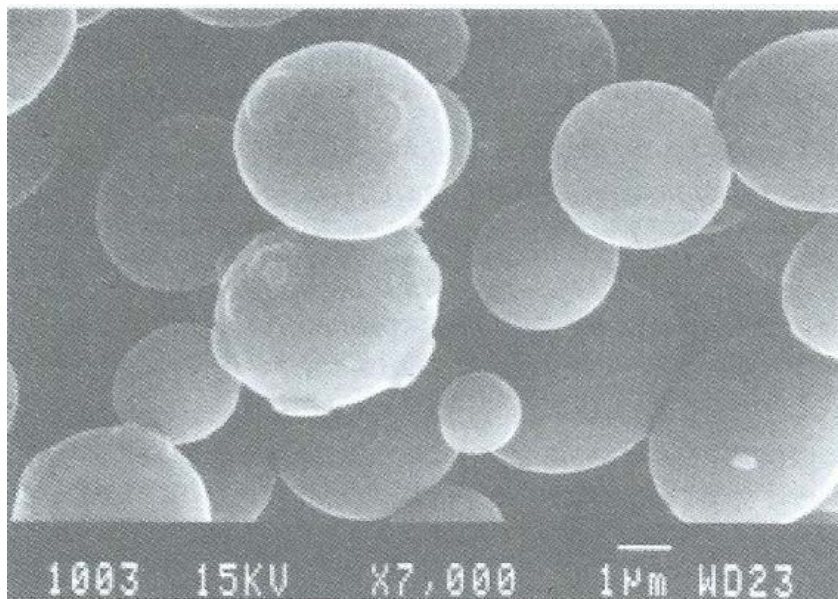
Brstenje je način nespornega razmnoževanja, pri katerem se hčerinska celica razvije kot izrastek starševske celice. Med brstenjem se starševska celica mitotično deli in hčerinska celica dobi eno od jeder (Likar, 1987). Brst se lahko pojavi tako na kvasnih celicah, kot na celicah hif. Brstenje je lahko holoblastično ali enteroblastično. Pri nastanku holoblastičnega brsta so vključene vse plasti celične stene starševske celice. Pri tem načinu se brst ponavadi odcepi na ožjem delu celice. Za enteroblastično brstenje je značilno, da notranja plast celične stene pretrga celično steno na mestu, kjer se tvori brst. Na mestu, kjer poteka brstenje, nastane značilna brazgotina in na tem mestu ne more več nastati brst. Brstenje lahko ločimo tudi glede na lokacijo nastajanja brsta. Brstenje, ki poteka izključno na enem polu celice, se imenuje monopolarno brstenje. Takšno, ki poteka na dveh polih, pa je dipolarno brstenje. Brstenje lahko poteka na različnih delih celice; tak način se imenuje multipolarno ali multilaterarno brstenje in je značilno za kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* (Boekhout in Phaff, 2003). Pri dobri prehrani in v ugodnih razmerah, traja vegetativni cikel od začetka brstenja celice matere do začetka brstenja nastale hčerinske celice približno dve uri (Konjajev, 1974).

Delitev je podvajanje vegetativnih celic, kjer se jedro razdeli, novi jedri se oddaljita drugo od drugega in med jedri se v sredini celice oblikuje prečna dvojna stena. Nastaneta dve

enaki celici, ki raste in ko dozorita, se proces ponovi (Boekhout in Phaff, 2003). Tak način je značilen za kvasovke vrste *Schizosaccharomyces pombe*.

2.4.1.3.2 Spolna rast

Pri samooploditvenih askomicetah z diploidno vegetativno fazo, lahko ena diploidna vegetativna celica izvede mejozo in tako postane nekonjugiran askus. Lahko se povrne v diploidno stanje s konjugacijo askospor v askusu ali z delitvijo hčerinskega jedra. Konjugacija poteče na enega od naslednjih načinov, konjugacija starševske celice preko brsta, konjugacija gametangijev, konjugacija med dvema celicama in konjugacija med hifami (Boekhout in Phaff, 2003). Naraščanje števila kvasovk kot posledica sporuliranja, je mnogokrat počasnejša kot pri brstenju. Za sporulacijo so potrebne aerobne razmere (Konjajev, 1974).



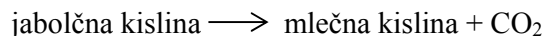
Slika 1: Celice kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* pod vrstičnim elektronskim mikroskopom. Na sliki se vidijo tudi brazgotine od brstenja (Vir: Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

2.4.2 Mlečnokislinske bakterije

Tipična mlečnokislinska bakterija raste v standardnih pogojih (neomejena koncentracija glukoze, rastnih faktorjev in omejen kisik), je gram pozitivna, nesporogena, katalaza-negativna v odsotnosti porfirinoidov, aerotolerantna, tolerantna na kislino, organotrofna in je striktno fermentativen bacil ali kok, ki proizvaja mlečno kislino kot glavni produkt. Nima citokromov in ne more sintetizirati porfirinov. Za mlečnokislinske bakterije je torej značilno, da iz katabolizma glukoze nastaja mlečna kislina kot primarni končni produkt.

Homofermentativna vrsta proizvaja mlečno kislino (<85 %) kot edini končni produkt, medtem ko heterofermentativna vrsta proizvaja mlečno kislino, CO₂ in etanol/acetat (König in Fröhlich, 2009). Glede na to, da so mlečnokislinske bakterije tolerantne na etanol in kisle pogoje, lahko rastejo tudi v moštu. Na splošno se rast zavre pri koncentraciji etanola nad 8 vol.%, čeprav lahko nekatere bakterije najdemo tudi pri 20 vol.% koncentraciji etanola. Mlečnokislinske bakterije, izolirane iz vina, rastejo v temperaturnem območju med 15 °C do 45 °C, optimalno območje pa je od 20 °C do 37 °C. V prvih dneh fermentacije se CFU poveča iz 10² na 10⁴-10⁵ na mL. Po alkoholni fermentaciji in med jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo lahko število celic doseže 10⁷-10⁸ na mL (Ribéreau-Gayon in sod. 2006a). Mlečnokislinske bakterije dobivajo energijo predvsem iz fermentacije sladkorja. Uporabijo lahko obe glavni heksozi v vinu, glukozo in fruktozo kot energijo in kot vir ogljika. V tem tekmujejo s kvasovko, ki proizvaja etanol, *Saccharomyces cerevisiae*. Te bakterije prav tako sodelujejo pri presnavljanju treh glavnih kislin v moštu: tartrat, malat in citrat. Mlečnokislinske bakterije, ki so povezane z vinom, pripadajo rodovom *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* in *Weissella* (König in Fröhlich, 2009).

Mlečnokislinske bakterije so prisotne v vsakem vinu in moštu. Glede na stopnjo procesa predelave vina, okoljski dejavniki določajo sposobnost razmnoževanja. Mlečnokislinske bakterije tako igrajo pomembno vlogo pri pretvorbi mošta v vino. Njihov vpliv na kakovost vina ni odvisen samo od okoljskih dejavnikov, ki delujejo na celični ravni, ampak tudi od izbora najbolj prilagojenih vrst in sevov bakterij. Vsi sevi imajo podobno celično organiziranost, ampak njihove fiziološke razlike so zaslužne za njihove specifične lastnosti in različnim vplivom na kakovost vina. Bakterije so prokariontske celice z zelo preprosto organiziranostjo. Od evkariontov (kamor spadajo kvasovke) jih lahko ločimo, ker so manjše in nimajo jedrne membrane oziroma posledično nimajo jedra. Bakterije v glavnem razgradijo dve organski kislini v vinu: jabolčno in citronsko kislino. Seveda se lahko razgradijo tudi druge kisline, vendar so manj zanimive za enologijo – z izjemo vinske kisline, ki pa je niso pogosto preučevali. Razgradnja teh dveh kislin je očitno vir mnogih organoleptičnih sprememb, zaznanih po njihovem nastanku. Enologi menijo, da je transformacija jabolčne kisline najbolj pomemben fenomen v fazi jabolčno-mlečnokislinske fermentacije, prav tako pa je dobro biti pozoren na transformacijo citronske kisline (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).



Tako kot vsi mikroorganizmi, se tudi celice mlečnokislinskih bakterij razmnožujejo oziroma delijo, če so primerni pogoji: prisotnost hranilnih faktorjev, odsotnost toksičnih faktorjev in ustrezna temperatura. Vse glavne reakcije metabolizma so usmerjene v biosintezo celičnih komponent: nukleinskih kislin za prenos dednega zapisa, ogljikovih hidratov, lipidov, strukturnih proteinov in seveda biološko aktivnih proteinov. Za

zagotovitev teh sintez mora celica prvo najti primerne kemijske elemente v mediju: ogljik, dušik in minerale – v obliki, ki jo lahko uporabijo. Večina energije pride iz asimilacije številnih organskih substratov, sladkorjev, aminokislin in organskih kislin. Rast mlečnokislinskih bakterij v vinu izrazito določajo štirje parametri: pH, temperatura, vsebnost alkohola in koncentracija SO_2 . Vplivajo še drugi dejavniki, vendar le do določene meje. Nobenega od teh štirih dejavnikov ne moremo obravnavati posamično: skupaj se obnašajo kot eno. Ugodna raven enega izravna neugodno vrednost drugega ali več drugih. Prav tako je precej težko določiti točen limit pri katerem koli faktorju. Tako na primer bakterije tolerirajo večjo vsebnost alkohola in večjo koncentracijo SO_2 pri vinih, kjer je vrednost pH bolj ugodna (višja), kot pri vinih z nižjim pH (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

2.4.3 Ocetnokislinske bakterije

Ocetnokislinske bakterije so skupina mikroorganizmov, ki sodi v družino *Acetobacteraceae*, ki ima zelo edinstvene značilnosti pri oksidaciji alkohola v ocetno kislino. V prehranski industriji so ocetno kislinske bakterije zelo pomembne pri proizvodnji nekaterih živil in pijač, kot so kis, kakav, kombuča in podobne fermentirane pijače, vendar pa lahko njihova prisotnost kaj hitro pripelje tudi do kvara živil ali pijač kot so vino, pivo, sladke pijače ali sadje (Guillamón in Mas, 2009). Ocetnokislinske bakterije se zelo pogosto pojavljajo v naravi in so dobro prilagojene, da se razmnožujejo v sladkorno in alkoholno bogatem okolju. Vino, pivo in jabolčno vino lahko postanejo naraven habitat za te bakterije, če pogoji pri proizvodnji in skladiščenju niso pravilno kontrolirani. S tem se seveda zmanjša kvaliteta proizvoda, razen pri nekaterih izbranih pivih. Tako kot mlečnokislinske bakterije, so tudi te nesporogene. Njihov metabolizem je striktno aeroben. Celična oksidacija sladkorja, etanola in drugih substratov, je povezana z mehanizmom transporta elektronov v dihalni verigi. Kisik je končni akceptor elektronov in protonov (ki prihajajo iz oksidacijskih reakcij). Ocetno kislinske bakterije so Gram negativne, medtem ko so mlečnokislinske bakterije Gram pozitivne. Bakterije te družine delimo na dva rodova: *Acetobacter* in *Gluconobacter* (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a). Njihov optimalni pH je 5,5-6,3, vendar pa lahko preživijo in se razmnožujejo tudi pri pH vina, ki je lahko tudi nizek, kot 3,0-4,0. Optimalna temperatura za rast je 25-30 °C, nekateri sevi pa lahko zelo počasi rastejo tudi pri 10 °C. Ocetnokislinske bakterije so prisotne na zrelem grozdju. Njihovo število zelo variira glede na zdravje grozdja. Na zdravem grozdju je njihovo število nizko – okoli 10^2 CFU/mL in skoraj v celoti je to rod *Gluconobacter*. Gnilo grozdje je pa zelo kontaminirano: število bakterij lahko doseže vrednost 10^5 - 10^6 CFU/mL in je mešanica obeh rodov, tako *Gluconobacter* kot *Acetobacter* (Guillamón in Mas, 2009).

2.5 KEMIJSKA IN BIOLOŠKA SESTAVA GROZDJA, MOŠTA IN VINA

2.5.1 Sestava grozdja

Grozdje je sestavljeno iz peclja, pečk, kože in jagodnega mesa.

2.5.1.1 Sestava peclja

Kemijska sestava peclja je podobna sestavi listov in vitic, čeprav je steblo bolj bogato s polifenoli. Vsebuje malo sladkorja in neko srednjo koncentracijo kislinskih soli, zaradi obilice mineralov in celična vsebina pa ima visok pH (>4). Pepel peclja vsebuje 5-6 % suhe mase in obsega približno 50 % kalijevih soli. Po kaliju, sta najbolj zastopana kationa kalcij in magnezij, sledijo natrij, železo, baker, mangan in cink v veliko manjši koncentraciji. Peclji so bogati s fenolnimi spojinami (še posebej sorte rdečega grozdja) in koncentracija teh snovi v vinu posledično naraste, če so pri pridelavi vina prisotni ostanki peclja. Polifenolne spojine prisotne v peclju imajo grenak okus, torej zmanjšujejo kakovost vina. Pecelj predstavlja komaj 4,5 % mase grozdja, pa vendarle izhaja iz njega 20 % skupnih fenolnih spojin, 15 % taninov, 26 % levkoantocianov, 15 % katehinov, 16 % galne kisline in 9 % skupne kavne kisline (Moreno in Peinado, 2012).

2.5.1.2 Sestava pečk

Zunanji sloj (oleseneli del) pečk je bogat s tanini in glede na letino vsebuje 22-56 % skupnih polifenolov grozdja. Oleseneli del je obdan s tankim filmom, ki je tudi bogat s tanini. Endosperm vsebuje lipidno frakcijo, ki ima, povprečno, 50 % linolne kisline, 30 % oleinske kisline in 10 % nasičenih maščobnih kislin. To olje lahko dobimo pri stiskanju semen grozdja z uporabo ustreznega topila. Kar pol litra olja lahko ekstrahiramo iz hektolitra vina. Čeprav so snovi, ki so prisotne v plašču pečke, lahko koristne (fenolne spojine, nitrogenirane snovi in fosfati, ki se delno raztopijo med proizvodnjo rdečih vin), bi tiste znotraj nje imele negativen vpliv na kakovost vina, če bi se raztopile, zato se je bolje izogniti poškodbi pečk med stiskanjem. Minerali, prisotni v pečki, predstavljajo 4-5 % celotne mase. Za razliko od ostalih delov grozda, je najbolj zastopan kation kalcij, sledijo mu kalij, magnezij in natrij, v veliko manjši količini pa se pojavljajo še železo, mangan, cink in baker (Moreno in Peinado, 2012).

2.5.1.3 Sestava kože

V vinarstvu igra pomembno vlogo kožica grozda, saj tip vina (rdeče ali belo) določajo različni deli grozdja, ki se uporabljajo pri pridelavi vina. Kožica vsebuje skoraj vse snovi, ki so odgovorne za barvo in vonj grozdja in so tako ključnega pomena za barvo, vonj in

okus mošta ter vina. Grozdna kožica vsebuje občutno količino jabolčne kisline, ampak koncentracija kisline pada med zorenjem. Kožica zrelega grozda tako vsebuje večinoma vinsko, jabolčno in citronsko kislino, v takšnem vrstnem redu. Najbolj značilni snovi zrele grozdne kožice sta rumeni in rdeči pigment ter aromatične spojine. Vsebnost fenolnih spojin je zelo različna in je odvisna predvsem od vrste grozdja. Grozdna kožica vsebuje 12-61 % skupnih polifenolnih spojin sadja, 14-50 % taninov, 17-47 % procianidinov in, pri rdečem grozdju, skoraj vse antociane. Bogata je s celulozo, netopnimi pektini in proteini. Pri zelenem grozdu so v znatni količini prisotni klorofil, ksantofil in karotenoidi, vendar je pri zrelem grozdu njihova koncentracija majhna. Vsebnost mineralov v kožici je skoraj enaka tisti v peclju. Kalij predstavlja več kot 30 % vseh mineralov, sledita kalcij in mangan, v veliko manjši količini pa so na koncu še natrij, železo, baker, magnezij in cink (Moreno in Peinado, 2012).

2.5.1.4 Sestava jagodnega mesa

Komponente v jagodnem mesu prevladujejo v grozdnem soku in moštu. Trdni del jagodnega mesa vsebuje celične stene ter splete žil in predstavlja 0,5 % mase. Glukoza in fruktoza sta glavna sladkorja v grozdnem mesu. Na začetku je glukoze dvakrat več kot fruktoze, pri zrelem grozdu pa sta oba sladkorja zastopana v približno enaki količini. V sledeh je prisotna tudi saharoza, ki se sintetizira v listih kot glavni sladkor, vendar se hidrolizira, ko grozdje odtrgamo. Poleg glukoze, fruktoze in saharoze se v grozdju pojavljajo tudi arabinoza, ksiloza, ramnoza, maltoza in rafinoza. Ostale komponente, ki so še prisotne v večjem številu so organske kisline, največ je vinske in jabolčne kisline. Prisotna je tudi citronska kislina, vendar v veliko manjši koncentraciji (Moreno in Peinado, 2012).

2.5.2 Sestava mošta

Mošt je tekočina, ki jo dobimo z nežnim stiskanjem grozdja. Sestava mošta se, kljub istim vinorodnim območjem, razlikuje glede na (Moreno in Peinado, 2012):

- sorto in klon grozdja
- zrelost in zdravstveno stanje grozdja (zrelost je odvisna od klimatskih razmer, tipa zemlje in uporabljenih gnojil)
- uporabljenega tlaka pri stiskanju grozdja

V moštu so prisotne naslednje snovi oziroma skupine (sledijo si od najbolj zastopane do najmanj) (Moreno in Peinado, 2012):

- voda,
- sladkorji,
- organske kisline,
- dušikove spojine,
- minerali,

- polifenoli,
- vitamini,
- aromatske spojine

Preglednica 2: Okvirne vrednosti spojin, ki sestavljajo mošt (Moreno in Peinado, 2012)

Komponente:	Vrednosti:
Voda	700-850 g/L
Sladkorji	140-250 g/L
Organske kisline	4-17 g/L
Dušikove spojine	4-7 g/L
Polisaharidi	3-5 g/L
Minerali	0,8-2,8 g/L
Polifenoli	0,5 g/L
Vitamini	0,25-0,8 g/L
Aromatske spojine	<0,5 g/L
pH	3-4,5

2.5.2.1 Sladkorji

Sladkorji, prisotni v moštu so polialkoholi s karbonilno skupino. To so organske spojine, ki vsebujejo več –OH skupin skupaj z aldehydno ali ketonalno skupino. Najbolj pogosta sladkorja v moštu sta monosaharida s šestimi ogljikovimi atomi (Moreno in Peinado, 2012):

- glukoza
- fruktoza

Ko se združita dva monosaharida z α - ali β -glikozidno vezjo, dobimo disaharid. V moštu sta, kot disaharida, prisotna saharoza in maltoza (Moreno in Peinado, 2012).

2.4.2.2 Organske kisline

Organske kisline imajo –COOH funkcionalno skupino. Organske skupine v moštu imajo tudi druge skupine, kot so –OH skupine ali alkoholi. Najbolj so zastopane vinska, jabolčna in citronska kislina. Ostale prisotne kisline so še galakturonska, ki je glavna komponenta pektina v grozdju ter glukonska kislina, ki je v veliki meri prisotna v gnilem grozdju (Moreno in Peinado, 2012).

2.5.2.3 Dušikove spojine

Glavne dušikove spojine v moštu so aminokisline, v prosti obliki ali kot polipeptidi ali proteini. Dušik v obliki amonijevih ionov je najbolj primeren za kvasovke in njegovo pomanjkanje lahko povzroči, da se fermentacija prekine (Moreno in Peinado, 2012).

2.5.2.4 Minerali

Koncentracija in razmerje med minerali v moštu sta odvisni predvsem od privzema s koreninskim sistemom vinske trte, akumulacije v grozdni jagodi ter klimatskih razmer. Lahko so tudi posledica slučajnih kontaminacij. Takšni primeri so večje koncentracije bakra in železa zaradi stika s korodirano enološko opremo, več žvepla zaradi uporabe fungicidov v vinogradu, več svineca zaradi bližine avtoceste in več aluminija zaradi uporabe neustreznega bentonita (Bavčar, 2008).

Mošt vsebuje dosti mineralnih snovi, ki jih lahko razvrstimo v skupine glede na njihov električni naboj in glede na njihovo številčnost (Moreno in Peinado, 2012):

- kationi:
 Zelo številčni: K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Si^{4+} (makrohranila rastlini)
 Manj številčni: Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Li^+ , Mo^{4+} , Co^{2+} , V^{3+} (mikrohranila)
 V sledovih: Pb^{2+} , As^{3+} , Cd^{2+} , Se^{4+} , Hg^{2+} , Pt^{2+} (mg/L)
- anioni:
 Zelo številčni: PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , Cl^-
 Manj številčni: Br^- , I^-

2.5.2.5 Polifenoli

Grozdje dobi barvo iz različnih spojin, ki so prisotne v grozdni jagodi. Najbolj omembe vredne so (Moreno in Peinado, 2012):

- klorofil,
- karotenoidi,
- betalanini,
- polifenoli,
 Antociani → rdeča barva
 Rumeni flavonoidi → rumena barva
 Tanini → rjava barva

Tako v vinu kot v grozdju igrajo polifenoli bistveno vlogo pri senzoričnih lastnostih, saj so odgovorni za videz (barva), okus (trpkost, grenkoba) in vonj (hlapni fenoli). Lahko jih klasificiramo tako (Moreno in Peinado, 2012):

- enostavni (ne-flavonoidni) polifenoli
- flavonoidi
- tanini
- ostali

2.5.2.6 Vitamini

Grozdje vsebuje približno 90 mg vitamina C (askorbinske kisline) na kilogram, pa tudi manjše količine vitaminov skupine B. Vitamini so zelo pomembni pri pridelavi vina, saj so koristni za kvasovke, torej so bistveni za uspešno alkoholno fermentacijo (Moreno in Peinado, 2012).

2.5.2.7 Aromatske spojine

Moštu dajeta aromo dve skupini spojin: spojine, ki izhajajo iz grozdja (terpeni, karotenoidi in pirazini) in spojine, ki se pojavijo med ekstrakcijo okusov in obdelavo pred fermentacijo (alkoholi in C₆-aldehidi) (Moreno in Peinado, 2012).

2.5.3 Sestava vina

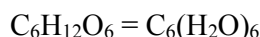
Kemijsko gledano vino vsebuje vodo (86,8 %), etanol (11,2 %), sestavne dele (1 %) - sladkor, vitamini, dušikove spojine, anione in katione, hlapne spojine (0,5 %) in kisline (0,5 %) (Jackson, 2014).

2.5.3.1 Voda

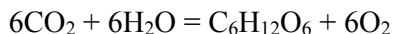
Voda je najbolj zastopana spojina v vinu. Zaradi vode se vino obnaša kot tekočina. Deluje kot topilo in kot reagent v kemijskih reakcijah v celotnem procesu pridelave, od zorenja grozdja do zorenja vina (Bavčar, 2008).

2.5.3.2 Sladkorji

Sladkorji so znani tudi kot ogljikovi hidrati. Iz spodnje kemijske formule je razvidno, da, na primer, v heksozi kot sta glukoza in fruktoza, vsak ogljikov atom lahko reagira z molekulo vode (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b):



Ime »ogljikovi hidrati« lahko tudi upravičimo zaradi načina kako so ti sladkorji proizvedeni s fotosintezo v listih trte, kar kaže, kako pomembna je voda pri zorenju grozdja. Enačba je naslednja (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b):



V vinu se nahajajo monosaharidi, disaharidi in polisaharidi. Koncentracija sladkorjev v vinu je pomembna za mikrobiološko stabilnost vin, za delitev vina v kategorije in predvsem za senzoriko vina. Heksoze so monosaharidi ter so najpomembnejši in tudi količinsko najbolj zastopani ogljikovi hidrati v vinu. So produkti fotosinteze vinske trte in so glavni substrat za kvasovke pri alkoholni fermentaciji kot vir energije za tvorbo etanola, višjih alkoholov, estrov maščobnih kislin in aldehydov. Pomembni heksozi v vinu sta glukoza in fruktoza. Kvasovke so sposobne fermentirati oba monosaharida, vendar enostavneje izkoriščajo glukozo in jo tako tudi najprej porabijo, nato pa fermentirajo še fruktozo. V preostanku sladkorja v vinu tako prevladuje fruktoza, ki je tudi dvakrat slajša od glukoze. Oba monosaharida reducirata Fehlingovo raztopino in ju zato imenujemo tudi reducirajoča sladkorja. Njun ostanek skupaj s pentozami v vinu po alkoholni fermentaciji imenujemo reducirajoči sladkorji. Koncentracija reducirajočih sladkorjev je odločilna za senzorične lastnosti vina, za zaznavo sladkega okusa pa so pomembne tudi ostale spojine, kot so etanol, kisline in fenoli. Med disaharide spada saharoza. Saharoze kvasovke same po sebi ne uporabljajo direktno, prevzemajo pa produkte njene hidrolize, glukozo in fruktozo, ki jih kvasovke pridobijo s pomočjo encima invertaze. Ta sposobnost kvasovk omogoča, da se za povečanje sladkorne stopnje v moštu uporablja kar saharozo (Bavčar, 2008). Koncentracija reducirajočih sladkorjev pade iz 150-250 g/L, koliko ga je v moštu, na <5 g/L (povprečno 1,2-3 g/L) v suhih vinih in na 60-90 g/L v polsuih in sladkih vinih (Moreno in Peinado, 2012).

2.5.3.3 Organske kisline

Organske kisline imajo ogromen vpliv na sestavo, stabilnost in organoleptične lastnosti vina, posebej belega vina. Njihova sposobnost konzerviranja prav tako poveča mikrobiološko in fizikalno-kemijsko stabilnost (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b). Organske kisline v vinu so različnega izvora. Vinska in jabolčna kislina sta rezultat nepopolne oksidacije sladkorjev in iz grozdne jagode prehajajo v mošt. Njuna koncentracija je odvisna od sorte, klime, vzgoje in nege trte ter dozorelosti grozdja. Kot posledica delovanja plesni *Botrytis cinerea* se lahko izrazito poveča koncentracija citronske in glukonske kisline. Med alkoholno fermentacijo nastajajo še druge organske kisline. To so mlečna, očetna, jantarna kislina ter v zelo majhnih količinah še ostale kisline iz cikla trikarboksilnih kislin. Bakterije tvorijo znatne količine mlečne in očetne kisline. V vinu so količinsko najbolj zastopane vinska, jabolčna, mlečna in citronska kislina (Bavčar, 2008).

Vinska kislina je običajno najbolj zastopana kislina v vinu. Mikroorganizmi v vinu je ne uporabljajo kot substrat, zato jo uporabljamo za dokisovanje. Ker je slabo topna, se izloča kot sol tartrat, ki jo pogovorno imenujemo vinski kamen. Jabolčna kislina je mikrobiološko nestabilna, mlečnokislinske bakterije jo spreminjajo v mlečno kislino v procesu biološkega razkisa. Delno se izloča tudi kot kalcijeva sol oziroma malat. Mlečna kislina nastane predvsem z dekarboksilacijo jabolčne kisline pod vplivom mlečnokislinskih bakterij. Njene

solni laktati so dobro topne in stabilne. Citronska kislina prehaja iz grozdne jagode v mošt, lahko pa se tvori tudi pod vplivom plesni vrste *Botrytis cinerea*. V vinu je stabilna, neobstoja je le v primeru aktivnosti mlečnokislinskih bakterij. Ocetna kislina je najpomembnejša hlapna kislina. V normalnih koncentracijah ima v vinu pomembno vlogo kot aromatična spojina in pri tvorbi estrov (Bavčar, 2008).

2.5.3.4 Fenolne spojine

Fenolne spojine so velika in zelo kompleksna skupina, ki so še posebej pomembne za kvaliteto rdečega vina. So pomembne tudi pri belih vinih, vendar se tukaj pojavljajo v dosti manjši koncentraciji. Fenolne spojine so odgovorne za videz, okus, občutek v ustih, vonj in mikrobiološko stabilnost vina. Kemijska zgradba fenolov je benzenski obroč, ki vsebuje eno ali več hidroksilnih skupin, ki so vezana direktno na ogljik v obroču. Fenolne spojine delimo na dve večji skupini (Jackson, 2014):

- flavonoidi
 - antociani
 - flavonoli
 - flavanoli
- neflavonoidi

Imajo bakteriocidne, antioksidativne in vitaminom podobne lastnosti, ki varujejo potrošnika pred kardiovaskularnimi boleznimi (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b).

2.5.3.5 Mineralne snovi

Uspešna fermentacija je, med drugim, odvisna tudi od vsebnosti kalija, magnezija, bakra, železa, kalcija, kobalta in cinka. Po navadi so ti minerali, v zadostni količini, prisotni v moštu (Moreno in Peinado, 2012). Minerali imajo naslednje vloge (Bavčar, 2008):

- so sestavni deli vitaminov in encimov,
- sodelujejo pri izmenjavi hranil med kvasovkami in okoljem ter
- reagirajo z drugimi sestavinami, npr. tvorba soli.

Izjemoma lahko nekatere težke kovine kot so svinec, živo srebro, kadmij in selen, delujejo tudi toksično. Večina težkih kovin se izloči na dno posod pri alkoholni fermentaciji, zato so prisotne v vinih le v sledovih. V nekaterih izrednih razmerah pa lahko predvsem baker in železo povzročata napake vin, ki se odražajo v t.i. lomih vina, spremembi okusa, oksidacijskih reakcijah in porjavitvah (Bavčar, 2008).

2.5.3.6 Dušikove spojine

V vinu in grozdju je dosti dušikovih spojin. Pojavljajo se v anorganskih oblikah, kot sta amonijak in nitrati, ter v različnih organskih oblikah, kot so amini, amidi, aminokisline, piridini, dušikove baze, pirimidini, proteini in nukleinske kisline. Kompleksne dušikove spojine (pirimidini, proteini in nukleinske kisline) so bistvene za rast in metabolizem grozdja ter kvasnih celic, ampak so redko neposredno pomembne za senzorične lastnosti vina. Nekateri proteini sicer lahko sestavljajo koloide (Jackson, 2014). Najbolj primeren vir dušika za kvasovke je dušik v obliki amonija in v moštu ga more biti vsaj 50 mg/L, da lahko fermentacija poteka gladko (Moreno in Peinado, 2012). Aminokisline so izjemno pomembne, saj sodelujejo pri biosintezi encimov in drugih proteinov. Lahko so tudi vir energije za kvasovke in bakterije. Najpogosteje uporabljena aminokislina, s strani kvasovk, je arginin. Najbolj zastopana aminokislina v moštu in vinu je prolin, saj ga kvasovke, v anaerobnih pogojih, ne uporabijo (Jackson, 2014).

2.5.3.7 Vitamini

Vitamini so v soku, grozdju in vinu prisotni le v majhnih količinah, njihova koncentracija pa načeloma s fermentacijo in staranjem še pada. Askorbinska kislina (vitamin C) se zelo hitro oksidira med stiskanjem, če je tiamin (vitamin B₁) izpostavljen visoki temperaturi ali pri absorpciji bentonita, se razgradi v reakciji s SO₂. Riboflavin (vitamin B₂) se oksidira, če je izpostavljen svetlobi. Včasih se vitamini dodajo grozdnemu soku, da se poveča intenzivnost fermentacije, tako da ne pride do predčasne prekinitve fermentacije, ter da se zmanjša uporaba žveplovega dioksida. Vendarle pa se vitamini dodajajo samo, če je to res nujno potrebno, saj povečujejo možnost nastanka večjih količin očetne kisline med fermentacijo (Jackson, 2014).

2.5.3.8 Aromatične spojine

Vino je kompleksna mešanica s 600-800 spojinami, ki določajo organoleptične lastnosti vina (Blanco in sod., 2013a). Na naše receptorje delujejo hkrati. Tako je za določen vonj vina odgovornih več spojin in ne ena sama. Kemijsko so spojine odgovorne za vonj, predvsem alkoholi, kisline, aldehidi, ketoni, terpeni, norizoprenoidi, pirazini in merkaptani (Bavčar, 2008). Aromatične spojine lahko glede na njihov izvor razdelimo v štiri skupine (Blanco in sod., 2013a):

- Sortne spojine: Spojine, ki so tipične za določeno sorto grozdja in so torej posredno odvisne od prsti, klime, vinogradniških navad, higienskih pogojev in stopnje zrelosti
- Pred-fermentacijske spojine: Nastanejo med obdelavo grozdja in med vinarskimi operacijami
- Fermentacijske spojine: Med fermentacijo jih tvorijo kvasovke in bakterije

- Post-fermentacijske spojine: So posledica kemijskih reakcij, ki se zgodijo med skladiščenjem in staranjem vina

2.5.3.9 Alkoholi

Etanol je nedvomno najpomembnejši alkohol v vinu. Nastane kot posledica delovanja kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* v času alkoholne fermentacije in je z ogljikovim dioksidom glavni produkt fermentacije. Deluje inhibitorno, kar pomeni, da na koncu fermentacije omeji rast in razmnoževanje kvasovk ter drugih mikroorganizmov. Vinu daje stabilnost, saj deluje kot topilo in zagotavlja posebne senzorične lastnosti. Vinu tako senzorično doda svoj specifičen vonj in okus, stopnjuje zasnovo sladkosti in grenkobe, v večjih količinah pa deluje pekoče (Bavčar, 2008).

Metanol ni proizvod alkoholne fermentacije. Je posledica hidrolize pektinskih snovi pod vplivom encima. V pektinu so karboksilne skupine esterificirane z metanolom. Ta se po hidrolizi odcepi. Vina iz grozdja, okuženega s plesnijo vrste *Botrytis cinerea*, imajo na splošno večjo koncentracijo metanola. Metanol ne vpliva na senzorične lastnosti vina in minimalno reagira z ostalimi spojinami v vinu. V prevelikih koncentracijah je toksičen. Alkohole z več hidroksilnimi skupinami lahko opišemo kot sladke alkohole, zaradi sladkega okusa. Vinu dajejo uravnoteženost in poudarjajo telo. Najpomembnejši predstavnik je **glicerol**. Je stranski produkt alkoholne fermentacije, kjer ga nastane tudi največ, saj je lahko v majhnih količinah prisoten že v samem grozdju. V suhih vinih ga je poleg vode in etanola največ (Bavčar, 2008).

3 METODE DELA IN MATERIALI

3.1 MATERIALI

3.1.1 Mošt

Za poskus smo uporabili 12 L mošta Laški rizling, letnik 2010, s Ptuja. Približno 1 L mošta smo uporabili za analizo mošta pred vsako fermentacijo. Za vsako izmed treh fermentacij smo uporabili 3 L tega mošta. Pri vsakem poskusu smo v 15 fermentacijskih bučkah nalili 200 mL mošta. Pred poskusom je bil shranjen na hladnem, za analize in poskus smo ga ogreli na sobno temperaturo.

3.1.2 Kvasovke – starterska kultura

Uporabili smo tri različne seve vinskih kvasovk, ki so selekcionirane iz narave. To so UVAFERM SLO, LALVIN ICV D 47 in LALVIN QA 23. Za rehidracijo kvasovk in količino kvasovk dodano moštu, smo upoštevali navodila in priporočila na embalaži. Priporočilo pravi, da dodamo 30 g kvasovk/100 L mošta. Našim vzorcem smo tako dodali 60 mg kvasovk/200 mL mošta.

3.1.2.1 UVAFERM SLO

Ta sev kvasovke je bil selekcioniran na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Gre za izrazito močno kvasovko, ki je hitra in zanesljiva, saj z lahkoto eliminira divjo mikrofloro. Je zelo dobra za posebne trgateve, najbolj se uporablja za Laški rizling, Kerner, itd. Najboljša je za bela vina, saj poudarja sortne arome. Temperaturno območje je od 15-32 °C, hitrost vrenja je hitra, ima malo potrebo po dušiku in je tolerantna na do 16 vol.% alkohola. (Jurana d.o.o., 2011).

3.1.2.2 LALVIN ICV D 47

Ta sev kvasovke je bil selekcioniran na inštitutu ICV Montpellier v Franciji. Velja za najbolj popularen sev za Chardonnay po vsem svetu. Zelo poudarja sortne arome, torej sadnost in kompleksnost. Ustvarja odlično strukturo vina zaradi polisaharidov, ki prihajajo iz tega seva. Je priporočena kvasovka za vina zorjena na drožeh. Najboljša je za bela in rose vina. Temperaturno območje je od 15-20 °C, hitrost vrenja je srednja, ima malo potrebo po dušiku in je tolerantna na do 14 vol.% alkohola (Jurana d.o.o., 2011).

3.1.2.3 LALVIN QA 23

Ta sev kvasovke je bil selekcioniran na inštitutu UTAD na Portugalskem. Je ena najbolj popularnih kvasovk za bela vina. Daje izrazito sadna, odprta in sveža vina. Je tudi zelo zanesljiva, ni zahtevna glede vira hranila in lahko vre tudi pri nizkih temperaturah. Najbolj primerna za vsa bela vina. Temperaturno območje je od 15-32 °C, hitrost vrenja je hitra, ima malo potrebo po dušiku in je tolerantna na do 16 vol.% alkohola (Jurana d.o.o., 2011).

3.1.3 Hranila

Pri vsaki fermentaciji trem vzorcem mošta, razen določenega seva kvasovk, dodali tudi hranilo. Te vzorce smo označili s številkami 4, 5 in 6. Dodali smo 200 mg hrane/1 L vzorca oziroma pri nas konkretno 40 mg hrane/200 mL vzorca. Uporabili smo hranilo Fermaid E (Lallemand).

3.1.4 Bakrovi ioni

Pri vsaki izmed treh fermentacij smo nekaterim fermentacijskim bučkam dodali različno koncentracijo raztopine CuSO_4 . Tako smo pri vsaki fermentaciji trem bučkam dodali 1 mg/L te raztopine in drugim trem 2 mg/L. Po izračunih to pomeni, da smo pri koncentraciji 1 mg/L raztopine CuSO_4 v 200 mL mošta dodali 0,051 mg Cu^{2+} ter pri koncentraciji 2 mg/L 0,102 mg Cu^{2+} .

3.1.5 Kemikalije in reagenti

Za analize mošta in vina smo uporabili naslednje kemikalije in reagente:

- komercialna pufrna raztopina s pH 4,00
- komercialna pufrna raztopina s pH 7,02
- standardna raztopina (nasičena raztopina kalijevega hidrogentartrata)
- 0,1 M raztopina natrijevega hidroksida
- 0,1 M raztopina klorovodikove kisline
- izhodna raztopina joda
- 0,01 M raztopina joda
- raztopina natrijevega tiosulfata (za standardizacijo 0,01 M raztopine joda)
- 1 M raztopina natrijevega hidroksida
- raztopina žveplove (VI) kisline
- 1 % raztopina škrobovice
- glukoza
- S1 = raztopina bakrovega sulfata (CuSO_4)
- S2 = raztopina kalijevega-natrijevega tartrata ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$)
- S3 = raztopina kalijevega jodida (KI)
- S4 = 16 % raztopina žveplove (VI) kisline (H_2SO_4)
- S5 = raztopina škrobovice
- S6 = raztopina natrijevega tiosulfata

- 0,5 M raztopina žveplove (VI) kisline (H_2SO_4)
- 1 % alkoholna raztopina fenolftaleina
- 50 % raztopina vinske kisline
- 20 % raztopina protipenilca
- osnovna raztopina L(-)-treonina
- acetatni pufer
- barvni reagent
- raztopina za razredčevanje
- 12 % raztopina kalcijevega oksida (CaO)

3.1.6 Pribor in oprema

Pri analizah mošta in vina smo uporabili naslednji laboratorijski pribor in opremo:

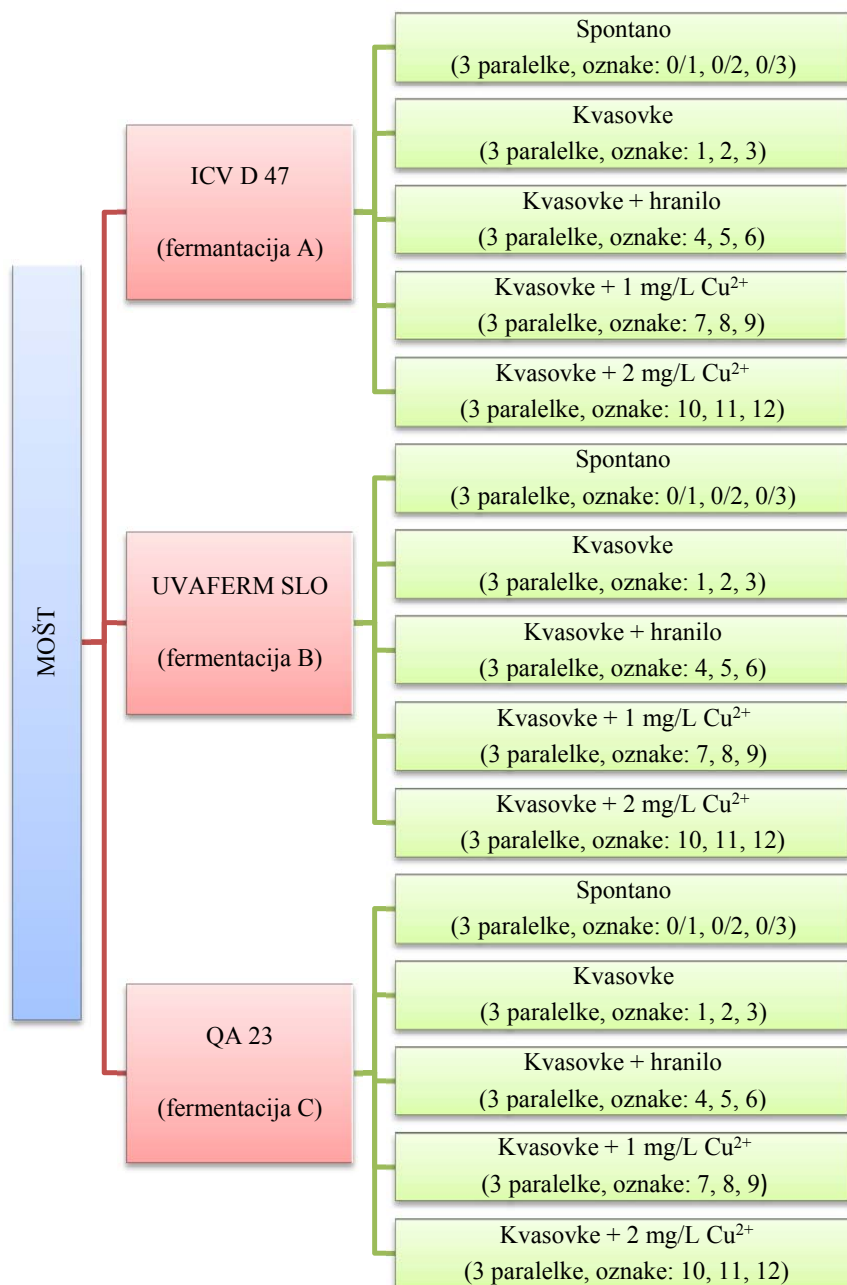
- pH meter s kombinirano stekleno elektrodo (Mettler Toledo DL50 Graphix)
- magnetno mešalo
- polnilna pipeta
- čaše
- birete (različen volumen)
- puhalka z deionizirano vodo
- pipete (različen volumen)
- erlenmajerica (s širokim vratom)
- merilna bučka
- vir svetlobe
- laboratorijska ura
- stojalo
- električni vrelec
- generator pare (VADE, Gibertini)
- destilacijska naprava (D.E.E. Gibertini)
- kapalka
- UV-VIS spektrofotometer
- kivete
- epruvete
- denzimeter Mettler Toledo DE45 Density Meter

3.2 METODE DELA

3.2.1 Postavitev poskusa

V poskusu smo izvedli tri fermentacije z istim moštom, vendar vsakič z drugimi kvasovkami. V vsaki fermentaciji smo imeli 15 vrelnih steklenic. Tri steklenice so bile kontrolne steklenice, kamor nismo dodajali ničesar. V druge tri smo dodali samo kvasovke, v naslednje tri pa smo dodali kvasovke in hranila. V tri steklenice smo dodali kvasovke in

1 mg/L CuSO_4 , v zadnje tri pa kvasovke in 2 mg/L CuSO_4 . V vsaki steklenički je bilo 200 mL mošta.



Slika 2: Shematski prikaz postavitve poskusa

3.2.2 Mikroskopiranje

Pod mikroskopom smo pogledali vzorec mošta, preden smo začeli z vsako od fermentacij. Mikroskopirali smo na 100- in 400-kratni povečavi. Vzorce za mikroskopiranje smo vzeli s površine mošta, sredine in dna.

Prav tako smo mikroskopirali vino. Pri vsaki fermentaciji smo mikroskopirali kontrolo, vino brez hrane, vino z dodatkom hranila, vino z dodanim 1 mg/L CuSO₄ in vino z dodanim 2 mg/L CuSO₄. Vzorce smo mikroskopirali na 100- in 400-kratni povečavi. Vzorce smo vzeli s površine vina in sredine.

3.2.3 Kemijske analize vina in mošta

3.2.3.1 Določanje skupnih (titrabilnih) kislin

Pri kislinsko-bazni potenciometrični titraciji merimo razliko v potencialu med elektrodama, ki sta potopljene direktno v vzorec mošta ali vina. Ena elektroda (referenčna) ima stalen (znan) potencial, druga, steklena elektroda (merilna), pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H₃O⁺ ionov v raztopini. Titracija z 0,1 M raztopino NaOH poteka na avtomatskem titratorju do končne točke titracije pH = 7,0 oziroma pH = 8,2 (Košmerl in Kač, 2007).

Z dodajanjem baze poteka naslednja reakcija: $\text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^- \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O}$

Najprej smo umerili pH meter, nato smo v termostatisiran vzorec mošta in vina potopili elektrodo in odčitali začetno vrednost pH. Na pH metru smo izbrali »Dvotočkovno titracijo pH 7 in pH 8,2«. Titriramo z 0,1 M raztopino NaOH do pH = 7 in odčitamo porabo baze. Nadaljujemo titracijo do pH = 8,2 in ponovno odčitamo porabo baze. Za izračun masne koncentracije skupnih (titrabilnih) kislin (g vinske kisline/L) uporabimo naslednji formuli:

$$TK_1\left(\frac{g}{L}\right) = \frac{a_1(mL) \cdot c \cdot M\left(\frac{g}{mol}\right)}{v(mL) \cdot n} \cong a_1(mL) \cdot 0,3 \quad \dots(1)$$

$$TK_2\left(\frac{g}{L}\right) = \frac{a_3(mL) \cdot c \cdot M\left(\frac{g}{mol}\right)}{v(mL) \cdot n} \cong a_3(mL) \cdot 0,3 \quad \dots(2)$$

a₁...volumen porabljene baze pri titraciji do pH 7,00 (mL)

a₃...volumen porabljene baze pri titraciji do pH 8,20 (mL)

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

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

v...volumen vzorca (25 mL)

n...molsko razmerje kemijske reakcije med NaOH in vinsko kislino (n=2)

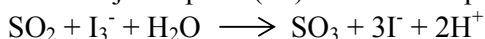
TK₁...koncentracija (g vinske kisline/L); »titrabilne kisline«

TK₂...koncentracija (g vinske kisline/L); »skupne kisline«

3.2.3.2 Določanje žveplovega dioksida v vinu in moštu

Določanje prostega in skupnega žveplovega dioksida (SO₂) po Ripperjevi metodi temelji na oksidacijsko-redukcijski reakciji z raztopino joda (I₂). Za določitev koncentracije prostega SO₂, vzorec vina najprej nakisamo z dodatkom žveplove(VI) kisline (s tem zmanjšamo oksidativni vpliv vina, predvsem polifenolnih spojin pri titraciji z raztopino joda), dodamo indikator (škrobovico) in titriramo s standardno raztopino joda. Jod oksidira žveplove(IV) kislino v žveplove(VI) kislino in v končni točki titraciji (tj. tik po ekvivalentni točki) prebitna količina joda obarva raztopino modro. Za določitev koncentracije skupnega SO₂, pa vzorcu vina najprej dodamo 1 M raztopino NaOH, da dosežemo hidrolizo vezanega SO₂. Nato sledi dodatek ostalih reagentov in jodometrična titracija, kot pri določanju prostega SO₂ (Košmerl in Kač, 2007).

Oksidacija žveplove(VI) kisline v žveplove(IV) kislino poteče tako:



Za določanje prostega SO₂ smo odpipetirali vzorec vina oz. mošta, kateremu smo dodali škrobovico. Nato smo dodali raztopino žveplove(VI) kisline in takoj titrirali s standardizirano raztopino joda do modre barve, ki je morala biti obstojna približno 20 sekund. Koncentracijo prostega SO₂ v mg/L izračunamo po naslednji formuli:

$$c_{\text{SO}_2} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{a \text{ (mL)} \cdot c_{\text{I}_2} \cdot M \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \cdot 1000}{n \cdot v \text{ (mL)}} \quad \dots(3)$$

c_{SO₂}...koncentracija prostega SO₂ (mg/L)

a...volumen standardne raztopine joda (mL)

c_{I₂}...koncentracija joda (0,01 M)

M...molska masa SO₂ (64,06 g/mol)

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

v...volumen vzorca vina (25 mL)

Za določanje skupnega SO₂ smo odpipetirali vzorec vina oz. mošta, kateremu smo dodali 1 M raztopino NaOH. Erlenmajerico smo pokrili in počakali točno 10 minut (da poteče reakcija hidrolize vezanega žveplovega dioksida). Potem smo dodali škrobovico ter raztopino žveplove(VI) kisline in takoj titrirali s standardizirano raztopino joda do modre barve, ki mora biti obstojna vsaj 20 sekund. Koncentracijo skupnega SO₂ izračunamo po naslednji formuli (enaka formula kot za izračun prostega SO₂):

$$c_{\text{SO}_2} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{a \text{ (mL)} \cdot c_{\text{I}_2} \cdot M \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \cdot 1000}{n \cdot v \text{ (mL)}} \quad \dots(4)$$

Koncentracija vezanega SO₂ je razlika med skupnim in vezanim SO₂:

$$c_{SO_2}(\text{vezani}) = c_{SO_2}(\text{skupni}) - c_{SO_2}(\text{prosti}) \quad \dots(5)$$

3.2.3.3 Določanje pH vina in mošta

Merimo razliko v potencialu med dvema elektrodama, ki sta potopljene direktno v vzorec mošta ali vina. Ena elektroda (referenčna) ima stalen (znan) potencial, druga, steklena elektroda (merilna), pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H₃O⁺ ionov v raztopini (Košmerl in Kač, 2007). Navadno sta obe elektrodi v enem kosu.

Najprej smo pH meter umerili pri delovni temperaturi s pufrnima raztopinama s pH 4,00 in 7,02 (dvotočkovna kalibracija). Za tem smo preverili pH standardne raztopine. Vzorec smo segreli na 20 °C. Prefiltriran vzorec vina ali mošta smo nalili v čašo in vanj potopili elektrodi, vrednost pH smo odčitali z aparata. Uporabili smo pH meter oznake DL50 Graphix s kombinirano stekleno elektrodo oznake DG 114-SC proizvajalca Mettler Toledo. Točnost meritve aparata je bila najmanj ± 0,02 pH enot. Meritve z istim vzorcem smo ponovili dva ali trikrat.

3.2.3.4 Določanje reducirajočih sladkorjev v vinu

Številni reagenti kvantitativno oksidirajo reducirajoče sladkorje v karboksilne kisline. Oksidacija je odvisna od uporabljenega reagenta in od pogojev (razmer) oksidacije. S segrevanjem do vrenja sprožimo potek reakcij, kjer poteče oksidacija reducirajočih sladkorjev v kisline, divalentni bakrovi ioni pa se reducirajo do bakrovega(I) oksida. Oborina netopnega bakrovega(I) oksida se izloči, preostali Cu²⁺ ioni v raztopini pa se v raztopini kalijevega jodida v kislem reducirajo in nastali jod titrimetrično določimo (Košmerl in Kač, 2007).

V erlenmajerico odpipetiramo raztopino S1, S2 in vzorec vina. Erlenmajerico postavimo na grelnik in segrevamo do vrenja raztopine. Erlenmajerico takoj za tem ohladimo pod tekočo vodo in k ohlajeni raztopini dodamo raztopine S3, S4 in S5 ter premešamo. Erlenmajerico postavimo na osvetljeno magnetno mešalo in titriramo z raztopino S6, do prehoda iz temno modre barve v slamnato rumeno barvo. Koncentracijo reducirajočih sladkorjev odčitamo direktno z birete.

3.2.3.5 Določanje hlapnih kislin v vinu

Za določanje hlapnih kislin v vinu najprej izvedemo destilacijo vzorca z vodno paro, nato pa sledi titracija vzorca s standardno vodno raztopino natrijevega hidroksida.

Za destilacijo vina z vodno paro, v destilacijsko bučko odpipetiramo vzorec vina, dodamo 50 % vinsko kislino in nekaj kapljic protipenilca. Z deionizirano vodo speremo stene bučke ter začnemo z destilacijo. Tako dobljenemu destilatu dodamo par kapljic raztopine fenoltaleina in takoj titriramo s standardizirano 0,1 M raztopino natrijevega hidroksida do spremembe barve. Iz odčitane porabe titranta lahko po naslednji formuli izračunamo koncentracijo hlapnih kislin:

$$HK_1 \left(\frac{g}{L} \right) = a_1 (mL) \cdot c \cdot M \left(\frac{g}{mol} \right) \cdot \left(\frac{50}{1000} \right) \quad \dots(6)$$

HK₁...koncentracija hlapnih kislin, izraženih kot očetna kislina (g/L)

a₁...poraba titranta (mL)

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

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

Zgornja meja vsebnosti hlapnih kislin je zakonsko določena, vendar pa lahko v destilat preide tudi SO₂ (kar ni upoštevano). V primeru, ko je zakonsko določena vrednost presežena, je tako potrebno obvezno narediti tudi korekcijo rezultata za prispevek SO₂.

Korekcijo na prosti SO₂ naredimo tako, da po končani prvi titraciji hlapnih kislin dodamo v erlenmajerico žveplovo(VI) kislino ter škrobovico in titriramo z raztopino joda do prehoda barve. Korekcijo izračunamo po naslednji formuli:

$$HK_2 \left(\frac{g}{L} \right) = a_2 \cdot 0,06 \quad \dots(7)$$

HK₂...korekcija koncentracije hlapnih kislin zaradi prostega SO₂ v destilatu, izražena kot očetna kislina (g/L)

a₂...poraba titranta (mL)

Korekcijo na vezani SO₂ naredimo tako, da po končani drugi titraciji dodamo v raztopino NaOH, segrevamo do vrenja, ohladimo na sobno temperaturo ter dodamo raztopino žveplove(VI) kisline, raztopino škrobovice in titriramo z raztopino joda do preskoka barve. Korekcijo izračunamo po naslednji formuli:

$$HK_3 \left(\frac{g}{L} \right) = a_3 \cdot 0,03 \quad \dots(8)$$

HK₃...korekcija koncentracije hlapnih kislin zaradi preostalega (vezanega) SO₂ v destilatu, izražena kot očetna kislina (g/L)

a₃...poraba titranta (mL)

Ob upoštevanju obeh korekcij, tako na prosti kot na vezani SO₂, dejansko koncentracijo hlapnih kislin dobimo:

$$HK = HK_1 - (HK_2 + HK_3) \quad \dots(9)$$

HK...dejanska koncentracija hlapnih kislin (g/L)

3.2.3.6 Določanje prostega aminokislinskega dušika v vinu

Razredčenemu vzorcu vina in mošta dodamo razvijalec barve (ninhidrin, fruktoza in acetatni pufer), segrevamo, po ohladitvi dodamo raztopino za razredčevanje, dobro premešamo, posnamemo absorpcijski spekter v območju valovne dolžine od 450 nm do 700 nm. Koncentracijo prostega aminokislinskega dušika (oz. FAN) odčitamo iz umeritvene krivulje, ki jo po enakem postopku kot analiziramo vzorec, pripravimo z raztopinami L(-)-treonina znane koncentracije ali pa koncentracijo izračunamo primerjalno iz maksimalne absorbance analiziranega vzorca in maksimalne absorbance standardnega vzorca, ki ju analiziramo na enak način (Košmerl in Kač, 2007)..

Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da pripravimo standardne raztopine z ustreznim razredčevanjem osnovne raztopine z deionizirano vodo. Premešamo in iz vsake bučke odpipetiramo določen volumen standardne raztopine v epruveto. Dodamo razvijalec barve, epruveto zapremo z zamaškom in segrevamo v vodni kopeli točno 20 minut. Ohladimo in dodamo raztopino za razredčevanje. Po 10 minutam vzorec prelijemo v kiveto in na spektrofotometru izberemo absorpcijski spekter v območju valovne dolžine med 450 nm in 700 nm (Košmerl in Kač, 2007). Absorbanco merimo glede na slepi vzorec, ki ga pripravimo enako kot standardno raztopino, le da namesto treonina uporabimo deionizirano vodo. Absorbanco izračunamo po naslednji formuli ter narišemo umeritveno krivuljo:

$$A = \frac{x}{y} \cdot z \quad \dots(10)$$

A...absorbanca

x...delovno območje

y...višina grafa (cm)

z...navpična razdalja (cm) med absorpcijskim maksimumom in narisano bazno linijo

Določitev prostega aminokislinskega dušika v vinu ali moštu glede na umeritveno krivuljo: Vzorec vina ali mošta ustrezno razredčimo z deionizirano vodo ter ga filtriramo. Nato naredimo enako kot za umeritveno krivuljo, vendar namesto raztopine treonina uporabimo vzorec vina ali mošta. Če je vrednost absorbance na absorpcijskem spektru pri valovni dolžini 700 nm večja kot 0,03, pomeni, da smo vzorec premalo razredčili. Povečamo

razredčitev in postopek ponovimo. Absorbanco merimo glede na slepi vzorec. Končno koncentracijo prostega aminokislinskega dušika v vzorcu izračunamo iz enačbe umeritveni krivulje (ob upoštevanju razredčitve).

Določitev prostega aminokislinskega dušika v vzorcu vina ali mošta glede na standardno raztopino:

Postopek je enak kot pri določanju prostega aminokislinskega dušika v vinu ali moštu glede na umeritveno krivuljo. Za umeritveno krivuljo smo uporabili tudi standardno raztopino treonina s koncentracijo 1,0 mg N/L in glede na to koncentracijo izračunamo iskano koncentracijo v vzorcih. Računamo po naslednji formuli:

$$c_{vzorec} = \frac{A_{vzorec}}{A_{standard}} \cdot c_{standard} \cdot R \quad \dots(11)$$

c...koncentracija vzorca oziroma standarda (mg N/L)

A...absorbanca vzorca oziroma standarda

R...razredčitev vzorca

3.2.3.7 Določanje motnosti vina in mošta

Motnost vina in mošta smo merili s pomočjo turbidimetra (nefelometra) znamke HACH 2100AN TURBIDIMETER), ki opravlja meritve pri sipanju svetlobe pod kotom 90°, torej motnje potovanja svetlobe skozi tekočino, ki jih povzročijo delci v tekočini. V kiveto smo direktno dali vzorec ter odčitali vrednost NTU (nefelometrične enote, angl. Nephelometric Turbidity Units).

3.2.3.8 Določanje sladkorja v vinu in moštu

Sladkor v moštu in vinu smo izmerili s pomočjo digitalnega refraktometra znamke REF 520, 4 skale (0-35 % Brix, AP 0-22, *Oe 0-150, *KMW 0-25), proizvajalca Silverado Trading Company, China. Točnost meritve aparata je bila najmanj ± 1 °Oe. Na merilni del refraktometra smo kapnili nekaj kapljic vzorca in odčitali vsebnost sladkorja °Brix.

3.2.3.9 Določanje relativne gostote, ekstrakta in alkohola v vinu

Termostatiranemu vzorcu (20 °C) izmerimo relativno gostoto z denzimetrom. Nato točno določen vzorec (100 mL) ponovno termostatiranega vzorca predestiliramo z destilacijsko napravo v 100 mL merilno bučko. Po destilaciji vzorca dobljeni alkoholni destilat termostatiramo in izmerimo njegovo relativno gostoto z denzimetrom. Poleg relativne gostote odčitamo tudi koncentracijo (volumski delež) alkohola (Košmerl in Kač, 2007).

Merjenje relativne gostote vzorca vina:

Pred začetkom merjenja je najprej potrebno umeriti denzimeter z deionizirano vodo ali s komercialno dostopnim standardom. Vzorec vina prefiltriramo ter z njim nekajkrat speremo resonančno U-cevko v denzimetru. Cevko nato napolnimo zelo previdno in počasi ter brez zračnih mehurčkov. S pritiskom na gumb začne denzimeter z meritvijo. Čas merjenja je odvisen od temperature vzorca v celici in od naše nastavljene temperature za meritev, tako se mora vzorec prvo segreti ali ohladiti na želeno temperaturo. Relativna gostota je podana kot povprečje desetih meritev. Rezultat odčitamo na zaslonu denzimetra. Meritve lahko pospešimo tako, da sami po filtraciji segrejemo ali ohladimo vzorec do želene temperature za merjenje.

Priprava umeritvene krivulje:

Za umeritveno krivuljo pripravimo standardne raztopine etanola z ustreznim razredčevanjem absolutnega etanola z deionizirano vodo. Tako pripravimo pet standardnih raztopin, ter jim izmerimo relativno gostoto, kot je opisano zgoraj. Odčitamo tudi koncentracijo alkohola ter narišemo umeritveno krivuljo odvisnosti določene ali izmerjene koncentracije alkohola od točne koncentracije alkohola v standardni raztopini in izračunamo enačbo premice.

Destilacija vina in merjenja relativne gostote alkoholnega destilata:

Določen volumen vzorca vina segrejemo na 20 °C v vodni kopeli. Nato točno določen volumen vzorca vina kvantitativno prenesemo v destilacijsko posodo in bučko speremo z deionizirano vodo. V destilacijsko posodo dodamo 12 % raztopino kalijevega oksida (boljša električna prevodnost) in nekaj kapljic protipenilca. Stene destilacijske posode speremo z deionizirano vodo. Izvedemo destilacijo tako, da dobimo nekje 75-80 mL destilata. Dodamo nekaj deionizirane vode ter destilat ponovno termostatiramo v vodni kopeli do 20 °C. Vzorcju dodamo še toliko deionizirane vode, da dosežemo točno določen volumen. Z denzimetrom izmerimo relativno gostoto alkoholnega destilata ter koncentracijo alkohola. Iz izmerjene koncentracije alkohola in enačbe premice umeritvene krivulje izračunamo točno ali dejansko koncentracijo alkohola v vzorcu vina.

Izračun relativne gostote in vsebnosti skupnega ekstrakta:

Relativno gostoto skupnega ekstrakta vina izračunamo s pomočjo Tabariéjevega obrazca:

$$d_{SE} = d_V - d_A + 1,0000 \quad \dots(12)$$

d_{SE} ...relativna gostota skupnega ekstrakta vina

d_V ...relativna gostota vzorca vina

d_A ...relativna gostota alkoholnega destilata

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Izvedli smo tri sklope fermentacij z istim moštom v katere smo dodali različne seve kvasovk. Pri prvi in tretji fermentaciji smo imeli 15 vzorcev, pri drugi pa 13, saj je pri dveh spontanah fermentacijah prišlo do zaustavitve fermentacije. V teh dveh paralelkah je bilo prisotno veliko drugih mikroorganizmov, predvsem plesni, zato ti dve paralelki nismo analizirali.

Zaradi lažjega razumevanja smo fermentacijam in vzorcem nadeli oznake, katere smo potem uporabljali pri razpravah in rezultatih.

Preglednica 3: Oznake vzorcev in uporabljene kvasovke pri fermentacijah

Oznaka fermentacije	Zaporedje fermentacij	Uporabljena kvasovka	Število vzorcev po fermentaciji
A	1.	ICV D 47	15
B	2.	UVAFERM SLO	13
C	3.	QA 23	15

Preglednica 4: Oznake vzorcev in dodatki, ki smo jih dodali določenemu vzorcu

Oznaka vzorca:	Dodatki fermentaciji:
0/1, 0/2, 0/3	spontana fermentacija
1, 2, 3	fermentacija brez dodatkov (mošt + kvasovke)
4, 5, 6	fermentacija z dodatkom hranila (mošt + kvasovke + hranilo)
7, 8, 9	fermentacija z dodatkom CuSO_4 , koncentracija 1 mg/L (mošt + kvasovke + CuSO_4)
10, 11, 12	fermentacija z dodatkom CuSO_4 , koncentracija 2 mg/L, (mošt + kvasovke + CuSO_4)

4.1 REZULTATI ANALIZE MOŠTA

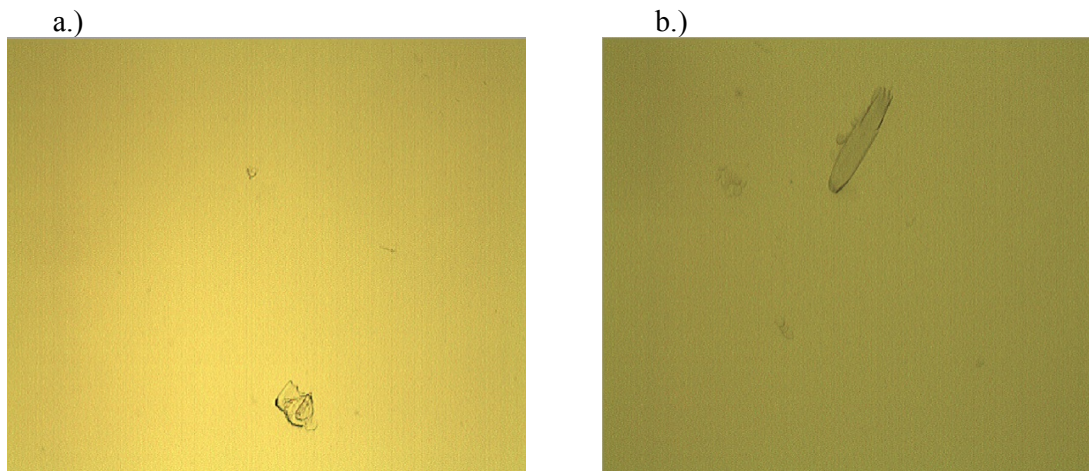
Preden smo izvedli vsako od treh fermentacij, smo analizirali mošt. Mošt smo hranili v tehnološkem hladilniku. Prvo analizo mošta smo izvedli 25.1.2011, druga analiza je bila izvedena 1.2.2011 in tretja 15.2.2011. Najprej smo izmerili motnost, nato smo mošt prefiltrirali skozi filter papir ter nadaljevali z analizami.

4.1.1 Mikroskopiranje mošta

Mikroskopirali smo vse tri vzorce mošta. Vzorce smo odvzeli na štirih različnih mestih. Dva vzorca smo vzeli na sredini in dnu bistremu moštu po filtriranju. Druga dva smo odvzeli iz sredine in dna gošče. Vzorci, odvzeti na enakih mestih različnih moštov, so pod mikroskopom bili skoraj enaki, zato so slike združene.

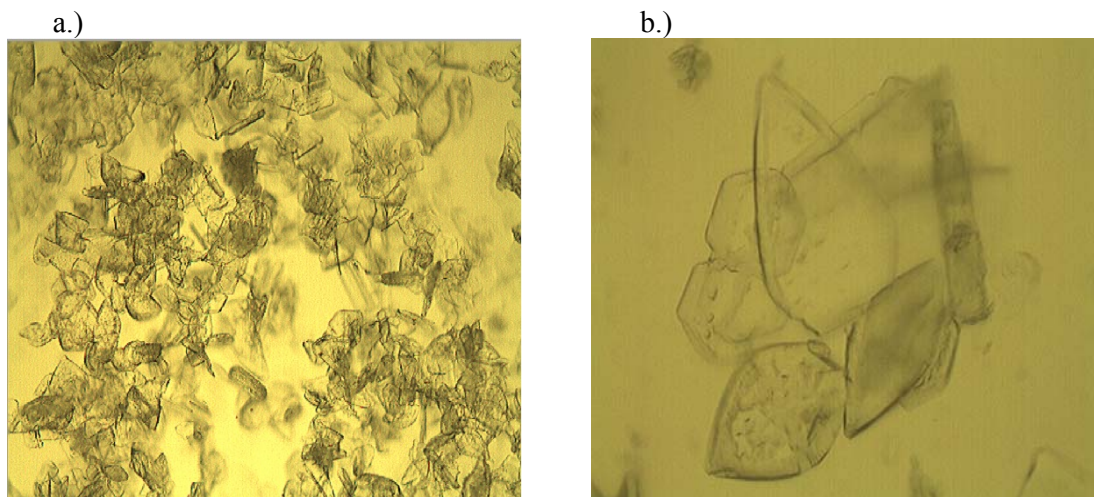
Po filtriranju v moštu ne ostane ravno dosti delcev, vidnih pod mikroskopom. V vzorcih, odvzetih na sredini, smo tu in tam našli kakšno kvasno celico. Na dnu mošta je videti več

celic, kot smo jih opazili v vzorcih odvzetih iz sredine. To nekako dokazuje, da se celice večinoma posedajo na dno.



Slika 3: Kristal vinskega kamna vzorca odvzetega iz sredine gošče mošta pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi.

Na sredini gošče ni bilo dosti delcev, ki bi bili zanimivi za videti. Tu in tam se je pojavil kak kristal vinskega kamna. Na sliki 3 lahko tako vidimo kristal vinskega kamna pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi. Pri 400x (b.) povečavi, lahko vidimo tudi nekaj kvasnih celic, čeprav je bilo videti več kristalov.



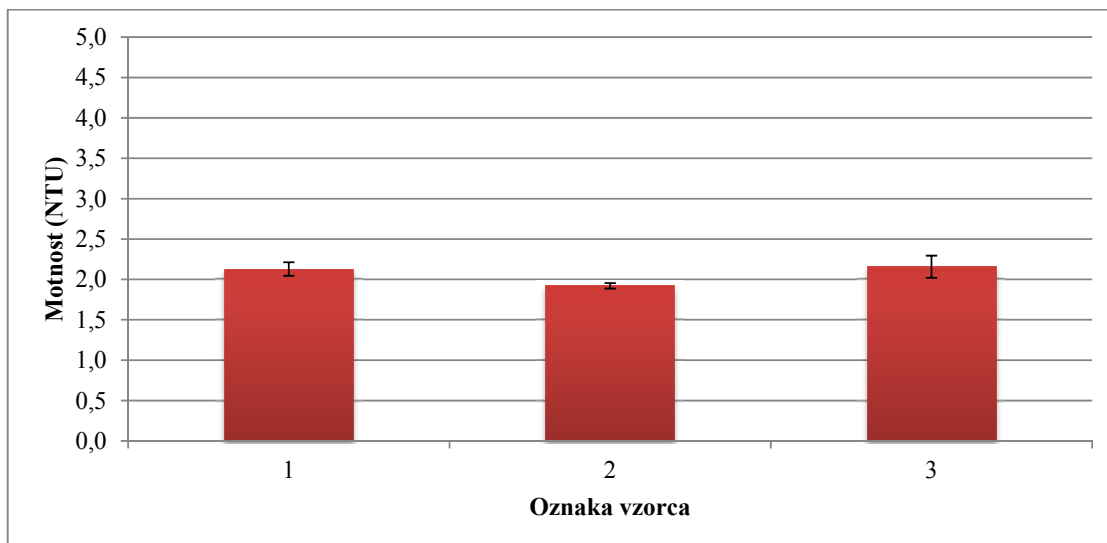
Slika 4: Kristali vinskega kamna vzorca odvzetega iz dna gošče mošta pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi

S slike 4 lahko že takoj vidimo, da je na dnu gošče ogromno kristalov vinskega kamna. Pri 100x (a.) povečavi lahko vidimo njihovo razsežnost in pogostost, saj prekrivajo skoraj

celotno dno. Pri 400x (b.) povečavi pa vidimo enake kristale, kako so pravzaprav videti, saj jih je pri manjši povečavi bilo enostavno preveč.

4.1.2 Motnost mošta

S čiščenjem oziroma bistrenjem mošta odstranimo del avtohtone mikroflore in s tem njihov vpliv in prispevek k alkoholni fermentaciji. Čiščenje mošta povzroči nadalje veliko zmanjšanje (40-100 %) maščobnih kislin (C_{12} - C_{18}) in makromolekul (15-50 %), kar je pogosto povezano tudi s prekinitvijo fermentacije kristalno bistrega mošta. Pomanjkanje maščobnih kislin in sterolov se kaže v zmanjšanju sposobnosti sinteze membrane kvasovk. Znano je, da lahko netopni delci adsorbirajo maščobne kisline in hkrati celo stimulirajo rast kvasovk preko boljšega odvajanja ogljikovega dioksida. Trajanje alkoholne fermentacije je v obratnem razmerju s trajanjem jabolčno-mlečnokislinske fermentacije (Košmerl, 2007a).

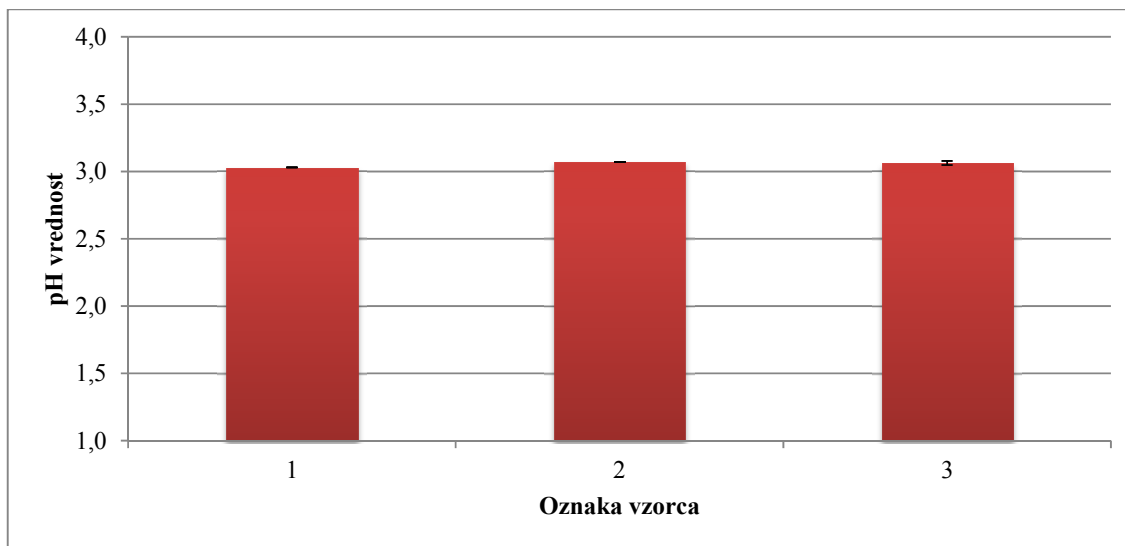


Slika 5: Vrednost motnosti v NTU v moštu pred začetkom fermentacije.

Meritve smo izvedli v treh paralelkah ter izračunali povprečno vrednost pri vseh treh vzorcih mošta. S slike 5 lahko vidimo, da je motnost mošta najnižja pri drugem vzorcu (1,92 NTU) ter najvišja pri tretjem (2,16 NTU). Razlogi za to razliko so lahko v slabo premešanem vzorcu mošta ali slabo očiščeni kivet. Morda se motnost spreminja tudi s časom, saj so bile meritve izvedene v nekaj tedenskem razmiku, vendar je bil mošt hranjen pri nizki temperaturi, tako da je to malo verjetno. Sicer so razlike zelo majhne. Pravilniki drugače ne navajajo, kolikšna je minimalna oz. maksimalna vrednost motnosti mošta, vendar pa so priporočila, da naj bi bila motnost belega mošta manj kot 50 NTU, definitivno pa manj kot 200 NTU, preden začnemo z alkoholno fermentacijo.

4.1.3 pH mošta

V bioloških sistemih je pH pogosto pomembnejši kot vrednost skupnih kislin. Zelo je pomemben vpliv pH na mikroorganizme, barvo, okus, oksidacijsko-redukcijskem potencial in na razmerje med prostim in vezanim žveplovim dioksidom (Ough in Amerine, 1988).



Slika 6: Vrednost pH mošta pred začetkom fermentacije

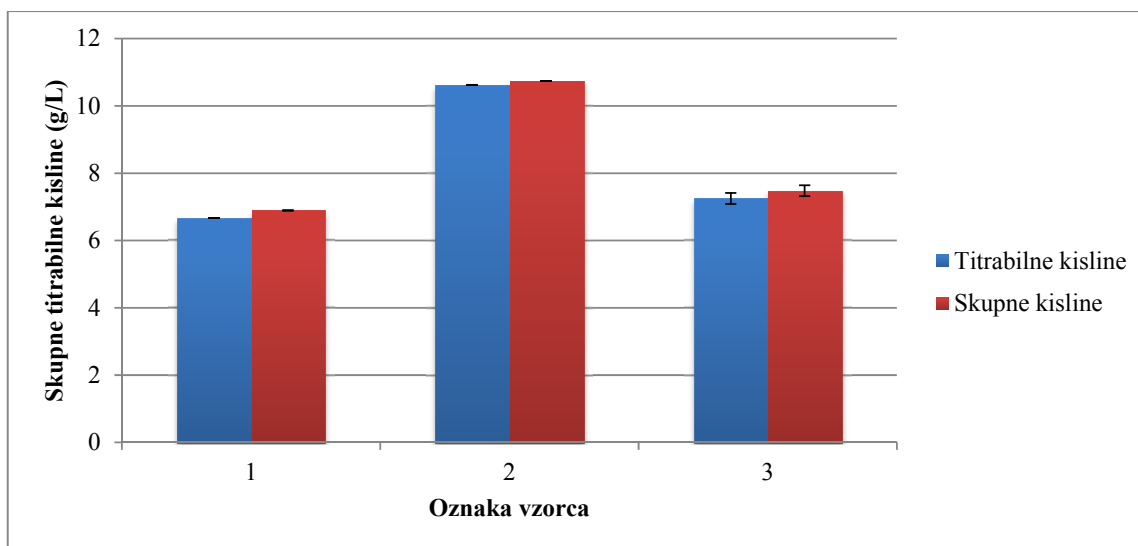
Meritve vrednosti pH smo izvedli v treh ponovitvah za vsak vzorec mošta. Izračunali smo povprečno vrednost ter jo vnesli v graf. S slike 6 je vidno, da se vrednost pH mošta zelo malo razlikuje med različnimi vzorci. Največja razlika je 0,04 pH enot, točnost naprave pa je najmanj $\pm 0,05$ pH enot.

pH vrednost mošta za namizna vina se giblje med 3,1 in 3,6, za desertna vina pa se lahko razteza med 3,4 in 3,8 pH enot (Ough in Amerine, 1988).

Kot je videti s slike 6 imajo vsi trije vzorci mošta pH vrednost pod 3,1. Vzorec številka 2 (3,07) se najbolj približa tej vrednosti, medtem ko je vzorec številka 1 (3,03) najbolj oddaljen od tega.

4.1.4 Skupne (titrabilne) kisline

Grozdni sok in vino sta razredčeni kislinski raztopini. Brez kislin bi imeli sokovi pust okus in bi se z lahkoto pokvarili, fermentacija bi proizvedla nezadovoljiv pridelek, posledično bi se vino hitro pokvarilo, imelo bi blede barvo in pust neprijeten okus. Pridelovalec vina mora poznati vrednost titrabilnih kislin mošta, da lahko določi ustrezno vrednost žveplovega dioksida, ki ga mora dodati, ter da se odloči, če je potrebna kakšna korekcija kislosti (Ough in Amerine, 1988).



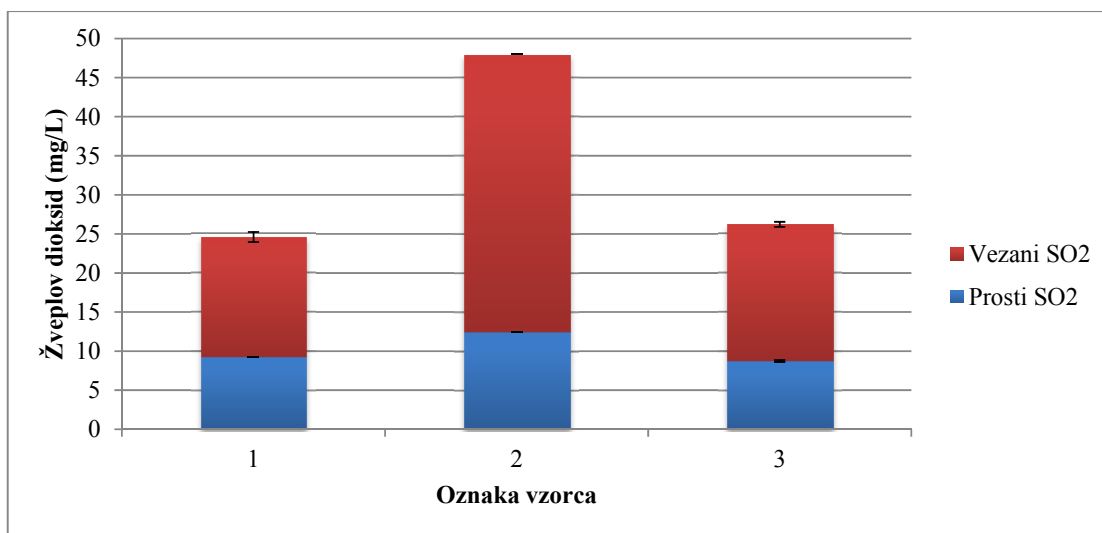
Slika 7: Skupne (titrabilne) kisline v moštu pred začetkom fermentacije

Skupna vsebnost karboksilnih kislin v grozdnem soku, moštu in vinu, če jo izrazimo kot g vinske kisline/L vzorca, je med 6 in 9 g/L, pri sladkih in desertnih vinih med 4 in 6,5 g/L, za botriticidna vina (vina, pridelana iz grozdja, okužena s plesnijo vrste *Botrytis cinerea*) pa okrog 10 g/L (Košmerl in Kač, 2007).

Na sliki 7 vidimo, da imata vzorca številka 1 in 3 vrednost titrabilnih kislin v predvideni vrednosti (6-9g/L), vzorec številka 2 (10,62 in 10,75 g/L) pa od tega odstopa. Vsi vzorci pa zadoščajo pogoju, da razlika med titrabilnimi in skupnimi kislinami znaša med 0,3-1,0 g/L. Zakaj vzorec številka 2 tako izstopa, ni mogoče pojasniti, saj izstopa tudi pri večini drugih meritev. Na podlagi tega, lahko torej rečemo, da je možnost napake človeka ali naprave pri meritvah zelo majhna.

4.1.5 Žveplov dioksid

Žveplo kot 5-6 % vodna raztopina SO_2 ali kot kalijev metabisulfit uporabljamo v vinarstvu zaradi antioksidativnega (preprečevanje oksidacije) in protimikrobnega delovanja (preprečevanje rasti in neželenih kvasovk in bakterij) (Košmerl in Kač, 2007).

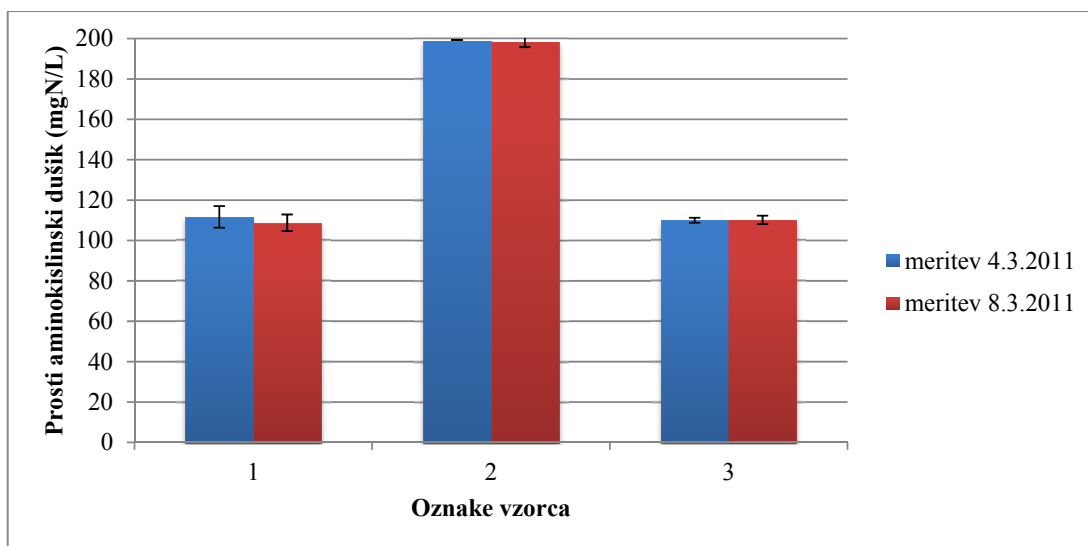


Slika 8: Vsebnost žveplovega dioksida v moštu pred začetkom fermentacije

Na podlagi grafov na sliki 8 lahko rečemo, da sta si vzorca 1 in 3 relativno blizu glede na prosti in vezani SO₂, vzorec 2 pa od te vrednosti očitno odstopa. Sicer noben od vzorcev ne presega meje 40 mg SO₂/L vzorca, kar je zgornja vrednost prostega SO₂ v vinu (Pravilnik o pogojih,.. 2004). Ponovno ne moremo razložiti zakaj je vzorec 2 tako drugačen, saj vendarle gre za isti mošt.

4.1.6 Prosti aminokislinski dušik (FAN)

V moštu in vinu se najde veliko število spojin, ki vsebujejo dušik, kot so amonijak, aminokisline, proteini, vitamini, amini in nitrati. Dušikove spojine so zelo pomembne pri rasti kvasovk in v nekaterih primerih lahko predstavljajo omejitveni faktor (Ough in Amerine, 1988). Vsebnost FAN-a v grozdju in groznem soku je odvisna od številnih naravnih dejavnikov, pa tudi od sorte in tehnologije pridelave, njegovo vsebnost pa je težko izmeriti. Potrebna količina dušika za vrenje je odvisna od seva kvasovk, temperature vrenja, vsebnosti sladkorja – minimalno 150 mg N/L, zaželeno 200-250 mg N/L, ob večji vsebnosti sladkorja in težjih razmerah vrenja pa še več. Premalo dušika lahko vodi do prekinitve vrenja in nastanka H₂S preveč dušika povzroči večjo tvorbo hlapnih kislin, etil karbamata, biogenih aminov in mikrobiološko nestabilnost (Jug in sod., 2014). Fermentacija je najintenzivnejša pri skupni koncentraciji FAN 800-900 mg N/L, delež metabolnega dušika v tej vrednosti je 400-500 mg N/L (Košmerl in Kač, 2007).



Slika 9: Vsebnost prostega aminokislinskega dušika v moštu pred začetkom fermentacije

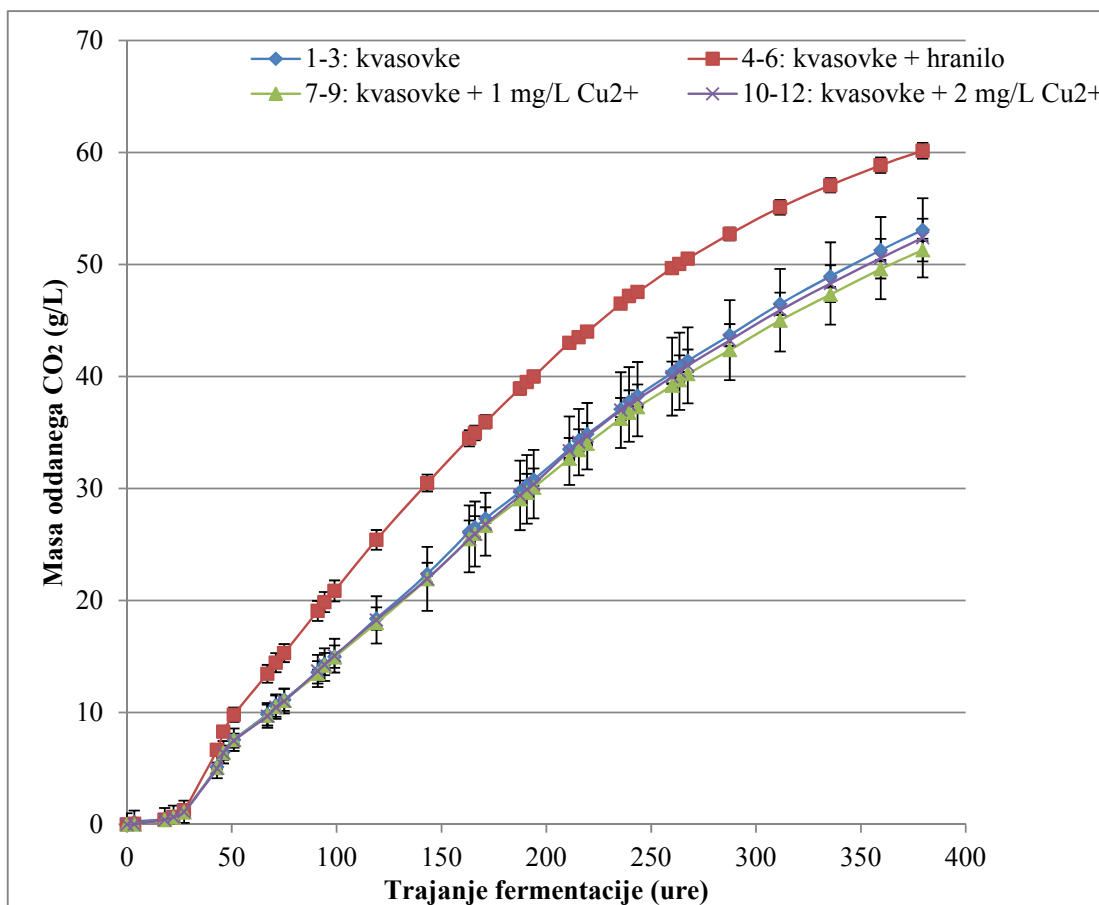
Na sliki 9 vidimo, da sta si vzorca 1 in 3 zelo blizu glede na vsebnost prostega aminokislinskega dušika. Tudi tukaj vzorec številka 2 odstopa od njiju in to za skoraj dvakrat. Zakaj je temu tako, ni jasno. Sicer pa so vrednosti pri posameznem vzorcu, glede na različen datum analize, ne razlikujejo preveč.

4.2 REZULTATI ANALIZE VINA

Izvedli smo tri fermentacije s tremi različnimi sevi kvasovk. Fermentacijo A smo začeli 24.1.2011 in jo zaključili 9.2.2011. B smo začeli 31.1.2011, končala pa se je 15.2.2011. Zadnjo fermentacijo, C, smo začeli 14.2.2011 ter jo zaključili 28.2.2011. Vse meritve smo opravili v dveh ali več ponovitvah.

4.2.1 Fermentacijska kinetika

V zaprtem bioprocesu se mikroorganizmi razmnožujejo do trenutka, ko se pogoji za rast omejijo in prične koncentracija hranil padati. Spremljanje koncentracije oz. števila celic ali biomase v gojišču daje značilno krivuljo, ki jo imenujemo rastna krivulja. Sestavljena je iz več zaporednih faz. Prva je lag faza ali faza prilagajanja, sledi faza pospešene rasti, ki se zvezno prevesi v logaritemsko ali eksponentno, ta se nadaljuje v fazo pojemajoče rasti, ki pri maksimalni koncentraciji biomase preide v stacionarno in se po določenem času obrne v fazo odmiranja kulture (Raspor in Smole-Možina, 1993). Mi smo v našem poskusu merili maso oddanega ogljikovega dioksida, saj kvasovke s fermentacijo izločajo ogljikov dioksid.



Slika 10: Kinetika fermentacije pri fermentaciji A.

Kvasovke pri fermentaciji proizvajajo CO₂, večja kot je vrednost CO₂, bolj so kvasovke metabolno aktivne. Na podlagi metabolne aktivnosti kvasovk pa lahko sklepamo tudi na kinetiko fermentacije. Krivulja je podobna tudi rasti krivulji mikroorganizmov v zaprtem bioprocesu, kot je bil naš.

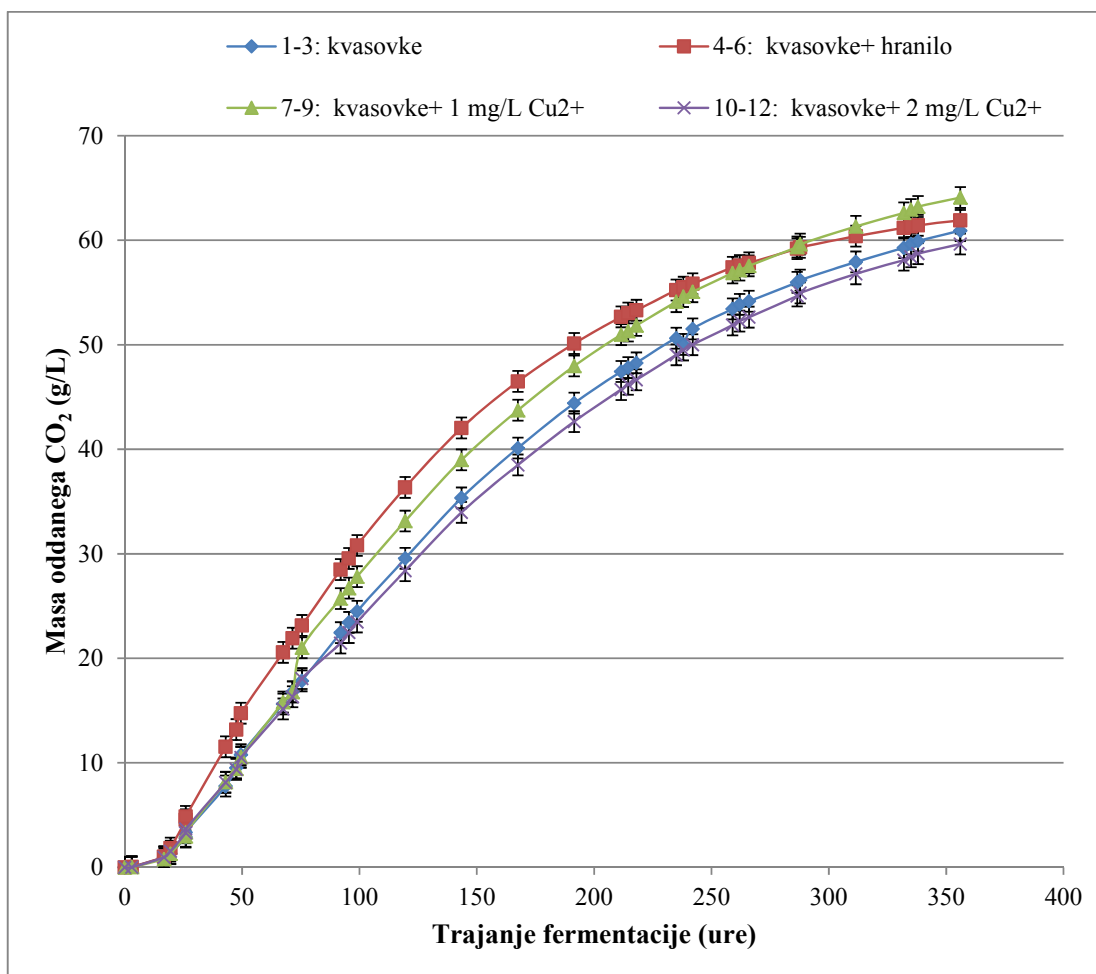
Na sliki 10 lahko vidimo nekoliko daljšo lag fazo, oziroma fazo prilagajanja. Kvasovke so se postale bolj metabolno aktivne komaj po kakšnem dnevu in pol. Sledi faza eksponentne rasti, ki je precej linearna in zelo podobna rasti krivulji. Krivulje pa so se malo pred zaustavitvijo fermentacije začele obračati v stacionarno fazo.

Paralelke 1, 2 in 3 se skoraj prekrivajo 60 ur, potem pa paralelka 1 proizvaja manj CO₂. Tem paralelkam smo dodali kvasovke. Glede na metabolno aktivnost kvasovk zasedajo drugo mesto in so tako za paralelkami 4, 5 in 6.

Opazimo lahko, da se je v paralelkah 4, 5 in 6 proizvedlo največ CO₂, kar torej pomeni, da je so bile v teh paralelkah kvasovke najbolj metabolno aktivne. V te tri paralelke smo dodali kvasovke in hranilo za kvasovke.

Paralelke 7, 8 in 9 so skozi celotno fermentacijo precej enaki, glede na maso oddanega CO₂. Pri teh paralelkah so bile kvasovke najmanj metabolno aktivne, saj so proizvedle najmanj CO₂. Tem paralelkam smo dodali kvasovke in 1 mg/L Cu²⁺.

Vrednosti proizvedenega CO₂ pri paralelke 10, 11 in 12 so malenkost manjše kot vrednostim pri paralelkah 1, 2 in 3, vendar so si med seboj vseeno zelo podobne. Tem paralelkam smo dodali kvasovke in 2 mg/L Cu²⁺.



Slika 11: Kinetika fermentacije pri fermentaciji B.

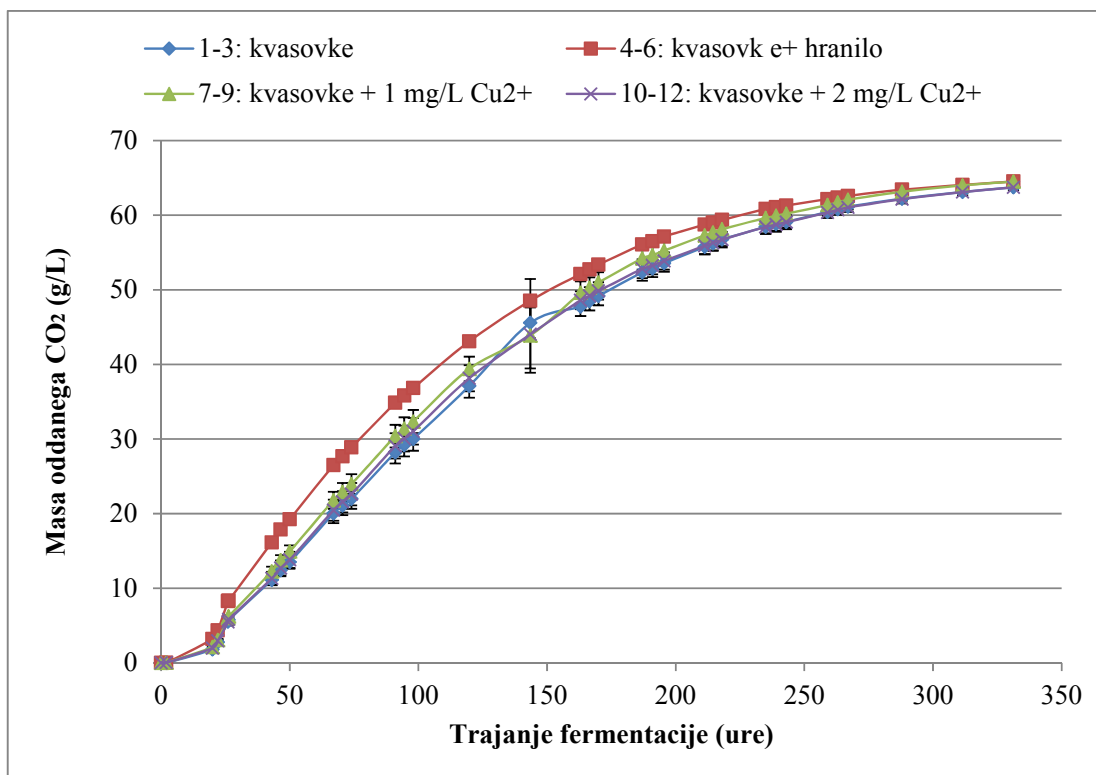
S slike 11 lahko posredno sklepamo, da je tukaj lag faza trajala približno en dan in je nekoliko krajša kot v prvem poizkusu (slika 10). Faza eksponentne rasti ni tako linearna kot na prvem grafu. Tudi prehodi med fazami so tukaj manj jasni in pravzaprav pri nekaterih še raste masa oddanega CO₂, po tem ko smo prekinili fermentacijo. Pri tem drugem poizkusu so si vzorci med seboj na koncu bližje, glede na oddan CO₂. Celoten graf je sicer nekoliko manj položen kot prvi.

Pri paralelke 1, 2 in 3 je standardni odklon nekoliko večji, saj je paralelka 3 precej odstopala. Imela je več proizvedenega CO_2 kot paralelki 1 in 2. Tem paralelkam smo dodali samo kvasovke.

Večji del fermentacije proizvajajo največ CO_2 paralelke 4, 5 in 6. Tukaj je bila metabolna aktivnost večji del najbolj intenzivna. Tem paralelkam smo dodali kvasovke in hranilo.

Od zaključku fermentacije so bile najbolj metabolno aktivne paralelke 7, 8 in 9. Tem paralelkam smo dodali kvasovke in 1 mg/L Cu^{2+} , zato takšen rezultat kar nekoliko preseneča in je nepričakovan. Predvidevali smo namreč, da bakrovi ioni negativno vplivajo na metabolno aktivnost in rast kvasovk.

Paralelke 10, 11 in 12 skozi celotno fermentacijo oddal najmanj CO_2 , tukaj so kvasovke torej najmanj metabolno aktivne. Tem paralelkam smo dodali kvasovke in 2 mg/L Cu^{2+} .



Slika 12: Kinetika fermentacije pri fermentaciji C.

S slike 12 lahko posredno sklepamo, da je faza prilagajanja dolga približno en dan, približno tako kot pri drugem preizkusu in krajše kot pri prvem. Graf ni tako položen kot prva dva (sliki 10 in 11), kar pomeni, da so se bile kvasovke bolj metabolno aktivne in hitreje dosegle vrednost oddanega CO_2 kot pri prvih dveh poizkusih. Čisto vsi vzorci na

koncu dosežejo skoraj enako vrednost mase oddanega CO₂, vendar njihova kinetika skozi fermentacijo ni enaka.

Pri paralelkah 1, 2 in 3 so kvasovke skozi celotno fermentacije nekako najmanj metabolno aktivne. Tem paralelkam smo dodali kvasovke.

Metabolne aktivnost kvasovk je bila največja pri paralelkah 4, 5 in 6. Že po kakšnih dveh dneh se vidi odstopanje od ostalih paralelek glede količine oddanega CO₂. Po kakšnem tednu in pol, pa jih druge paralelke dohitijo.

Paralelke 7, 8 in 9 zasedajo drugo mesto glede na maso oddanega CO₂. Tem paralelkam smo dodali kvasovke in 1 mg/L Cu²⁺. Sicer so si glede vrednosti proizvedenega CO₂ zelo blizu s paralelkami 10, 11 in 12.

Pri sklopu paralelek 10, 11 in 12 so vrednosti proizvedenega CO₂ zelo podobne tako vrednosti paralelkam 1, 2 in 3, kot tudi vrednostni paralelkam 7, 8 in 9. Temu sklopu smo dodali kvasovke in 2 mg/L Cu²⁺.

Glede na podlagi slik 10, 11 in 12 lahko rečemo, da na metabolno aktivnost kvasovk najbolj ugodno vpliva dodatek hranila za kvasovke. Krivulje paralelek, katerim smo dodali hranilo, so skoraj vedno dosegale najvišje vrednosti. Najmanj ugodno na metabolno aktivnost kvasovk vpliva dodatek 2 mg/L Cu²⁺. Tako kot smo predvideli, lahko sedaj tudi potrdimo, da večje koncentracije bakrovih ionov neugodno vplivajo na kvasovke.

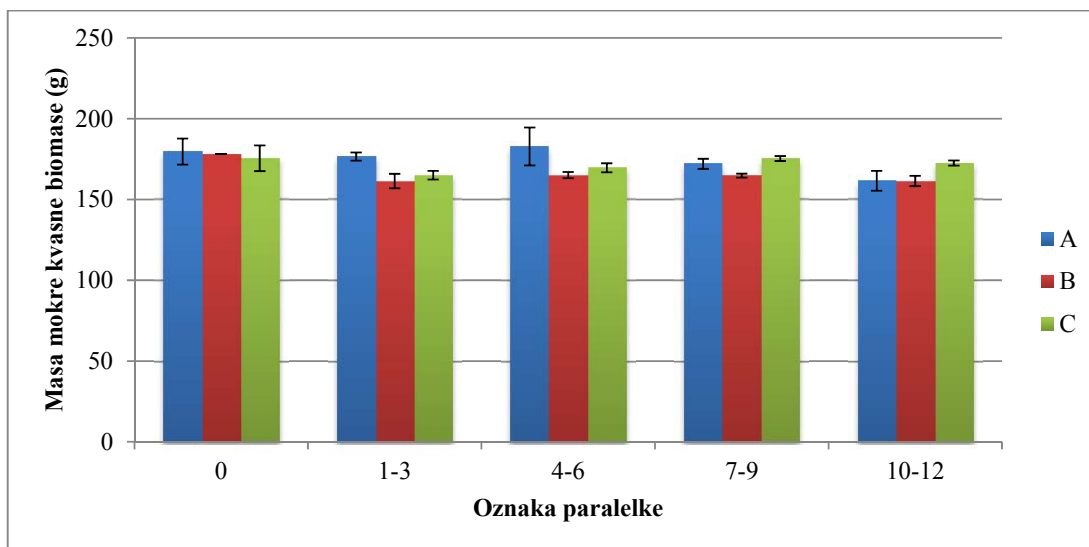
Dodane kvasovke pri fermentaciji A so bile najmanj metabolno aktivne, sklopi paralelek med sabo se zelo razlikujejo glede na maso oddanega CO₂. Pri fermentaciji C so bile kvasovke najbolj metabolno aktivne, masa končnega oddanega CO₂ je tukaj najvišja. Vzorci na koncu fermentacije dosežejo skoraj enake vrednosti. Fermentacija B je glede na metabolno aktivnost kvasovk in končni oddan CO₂ med fermentacijama A in C.

4.2.2 Kvasna biomasa

Alkoholna fermentacija je pretvorba mošta v vino oziroma pretvorba grozdnega sladkorja v alkohol z delovanjem kvasovk. V okviru ciljev alkoholne fermentacije je pomembno, da je pretvorba sladkorjev celotna, fermentacija enakomerna in relativno hitra (ne preburna). Istočasno pa mora preprečiti nastanek večjih količin vzporedno nastalih produktov, t.j. hlapnih kislin v prvi tretjini fermentacije, nadalje neprijetno dišečih žveplovih spojin med celotno fermentacijo in optimizirano tvorbo višjih alkoholov, s končno željo doseči in ohraniti zelene vonje in okuse z izbiro selekcioniranih kvasovk (Košmerl, 2007).

Za normalno rast potrebujejo vinske kvasovke ogljikove hidrate (to so sladkorji mošta), molekularni kisik, ki je potreben za sintezo preživelostnih faktorjev (nenasičenih maščobnih kislin in sterolov) ter dušikove spojine. V primeru pomanjkanja hranilnih snovi, ki služijo za optimalno rast in razmnoževanje kvasovk, govorimo o stresnih razmerah za kvasovke, ki se odražajo v njihovi zmanjšani metabolni aktivnosti in poškodbah celične membrane, kar vodi v upočasnen in nazadnje prekinjen aktivni transport sladkorjev, ki ga prepoznamo po upočasneni ali prekinjeni alkoholni fermentaciji. Če je dušikovih spojin v moštu dovolj, potem lahko pričakujemo zadostno količino kvasne biomase, ki nemoteno med tem procesom tvori tudi pozitivne aromatične spojine (višji alkoholi, višje maščobne kisline in njihovi estri), v primeru njihovega pomanjkanja pa se srečamo s tvorbo negativnih aromatičnih snovi, od katerih je najbolj poznan bekser ali H_2S (Košmerl, 2007).

Na koncu fermentacije smo merili oziroma tehtali smo tako mokro kot suho kvasno biomaso. Suho smo dobili s sušenjem v sušilniku, kamor smo položili petrijevke z mokro kvasno biomaso. Najprej smo tehtali prazne petrijevke, v katere smo nato dali mokro biomaso, ponovno tehtali, dali sušiti in nato še enkrat tehtali.



Slika 13: Masa proizvedene mokre kvasne biomase pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).

Iz slike 13 lahko vidimo odstopanja med maso mokre kvasne biomase pri različnih fermentacijah, vendar enakih vzorcih.

Pri paralelkah 0, je v vseh treh poskusih nastala približno enaka količina mokre kvasne biomase, največja razlika znaša manj kot 5 g. Kakorkoli, največ jo je nastalo pri fermentaciji A, najmanj pa pri C. V primerjavi z drugimi sklopi paralelk lahko opazimo, da je nastalo precej več biomase, če bi gledali povprečje, celo največ. Ti grafi oziroma masa

kvasne biomase predstavlja vso mikrobioto vina in ne samo »dobrih« mikroorganizmov za fermentacijo vina.

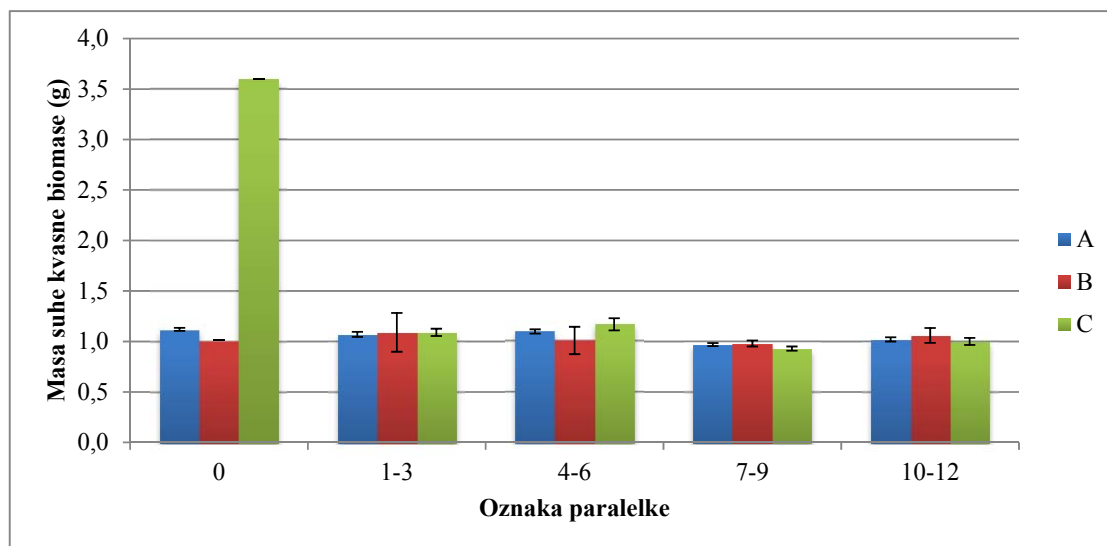
Naslednji so bile paralelke 1-3. Na sliki 14 vidimo, da je vrednost stolpa A precej višji. Razlika znaša nekaj več kot 10 g v primerjavi z nastalo maso pri C in okoli 15 g v primerjavi s B. Opazimo lahko, da je tukaj, na splošno, nastalo manj biomase v primerjavi tako s spontano fermentacijo, kot tudi z drugimi sklopi paralelk. Izstopa torej edino fermentacija A.

Tudi paralelkah 4-6 precej izstopa stolp fermentacije A, kjer je vrednost najvišji na celotnem grafu. Razlika s stolpom fermentacije B je nekaj manj kot 20 g in s C nekaj manj kot 15 g. Razen pri sklopu paralelk 0, ima v tem sklopu paralelk fermentacija C najvišjo vrednost v primerjavi z drugimi sklopi paralelk iste fermentacije.

Pri naslednjih paralelkah, 7-9, je najvišja vrednost pri fermentacije C, vendar ni tako velikih razlik kot pri prejšnjima dvema sklopoma paralelk. Razlika med fermentacijami C in A znaša okoli 3 g, v primerjavi z B pa okoli 11 g. Omenimo lahko tudi padec v masi kvasne biomase pri fermentaciji A, saj je v primerjavi s paralelkami 4-6, le-te manj za okoli 11g.

Zadnje paralelke so paralelke 10-12. Še vedno ima tukaj najvišjo vrednost fermentacija C, vendar je nekoliko nižji kot pri paralelkah 7-9. Ponovno lahko vidimo padec v masi pri obeh drugih fermentacijah, kjer je ponovno najbolj drastičen padec pri fermentaciji A. Če primerjamo vrednost pri paralelkah 4-6 in tole pri 10-12, je razlika kar dobrih 20 g. Fermentaciji B in C imata pri tem sklopu skoraj enako vrednost.

Kvasovke vsebujejo od 68 do 83 % vode. Preostalih 17 do 32 % sušine sestavljajo dušikove organske snovi, ogljikovi hidrati, lipidi, vitamini in nekatere druge snovi. Dušika je v suhi snovi kvasovk najpogostejše 7-9 %, variira pa med 2,5-14 %. Večji del skupnega dušika (64 do 76 %) je v beljakovinah, le teh je torej povprečno 30 do 40 % v suhi snovi (Konjajev, 1974).



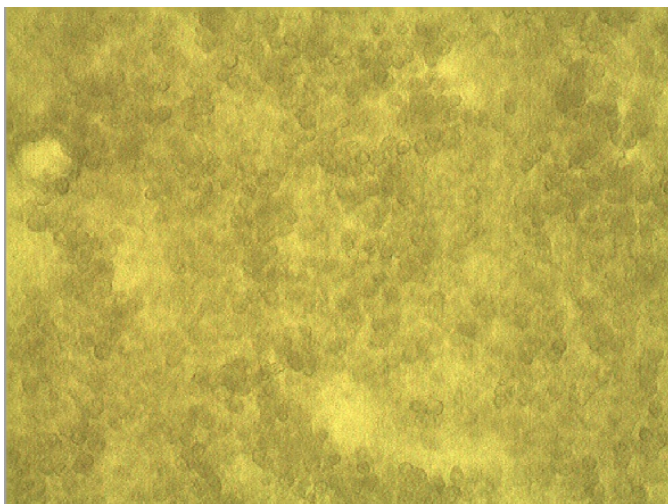
Slika 14: Masa proizvedene suhe kvasne biomase pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).

Iz slike 14 lahko opazimo, da so si vrednosti precej podobne, kar je nekako tudi pričakovano. Močno pa izstopa vrednost fermentacije B pri paralelkah 0, kjer je potekla spontana fermentacija. Zakaj je takšna razlika, ne moremo pojasniti. Ne gre za neko napako v merjenju ali sami izvedbi, saj se je vse delalo v več ponovitvah. Morda so tukaj prisotni kakšni mikroorganizmi, ki vsebujejo več beljakovin in se to pozna na sami masi suhe snovi. Najmanj suhe snovi je pri paralelkah 7-9, pri vseh treh fermentacijah.

4.2.3 Mikroskopiranje

Mikroskopirali smo vsa tri mlada vina. Vzorce za mikroskopiranje smo vzeli na štirih različnih mestih, in sicer bistro vino na sredini in proti dnu ter goščo na sredini in na dnu. Vzorci odvzeti na enakih mestih različnih vin so pod mikroskopom bili skoraj enaki, zato so slike združene.

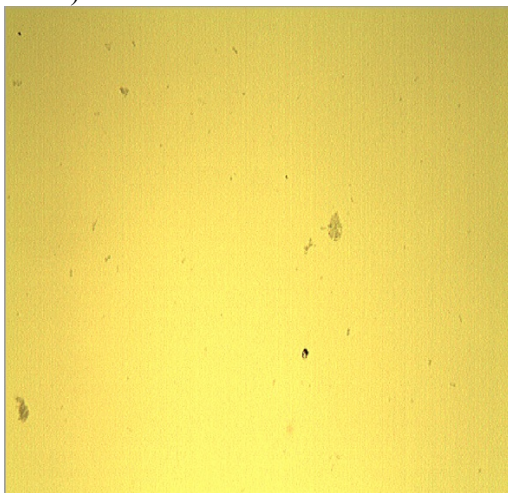
Pri vzorcih odvzetih iz bistrega vina, ni videti posebnega dogajanja, samo tu in tam kakšen skupek celic. Pri vseh vzorcih je skoraj enako, zato so slike samo pri enem vzorcu.



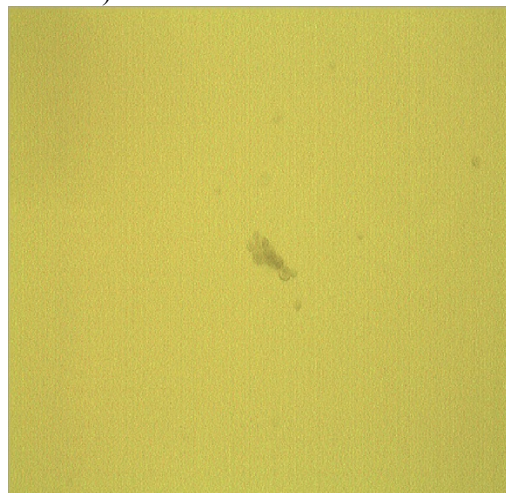
Slika 15: Kvasne celice z dna fermentacijske posode, pri spontani fermentaciji pod mikroskopom pri 400x povečavi

Na dnu posode je bila kvasna biomasa. Na sliki 15 vidimo ogromno število kvasnih celic, ki so se namnožile med fermentacijo. Celic je toliko, da skoraj ni praznega prostora. Takšno sliko smo tudi pričakovali.

a.)

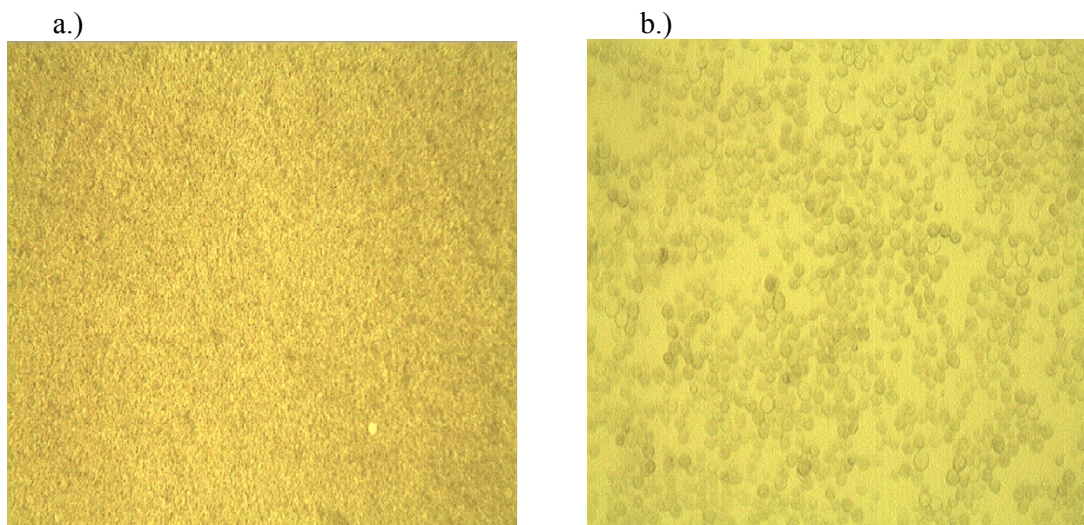


b.)



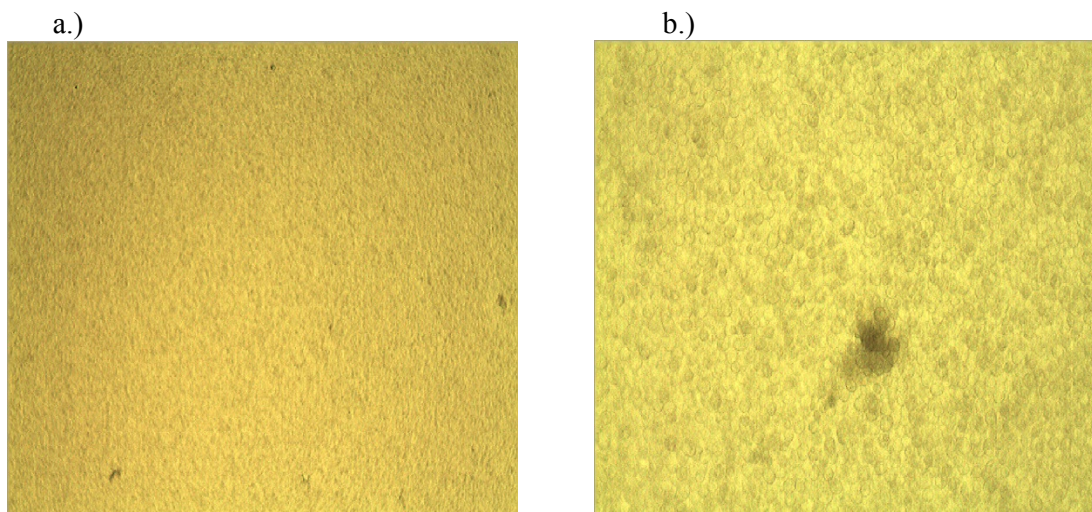
Slika 16: Skupke celic v bistrem mladem vinu iz fermentacijskih posod, kjer smo moštu dodali kvasovke, pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi

Kot vidimo na sliki 16, v bistrem mladem vinu ni kaj dosti delcev. Tu in tam lahko vidimo kakšne skupke celic (a.), ampak šele pri večji povečavi vidimo, da gre za kvasne celice (b.).



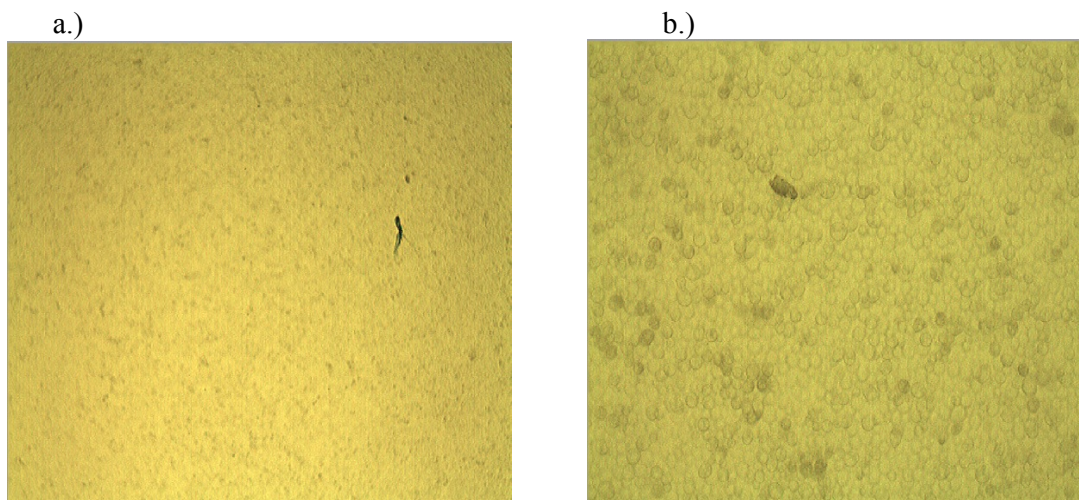
Slika 17: Kvasne celice v mladem vinu z dna fermentacijske posode, kjer smo moštu dodali kvasovke, pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi

Na dnu posode, kjer se je kopičila kvasna biomasa, je seveda tudi ogromno kvasnih celic, kar lahko vidimo s slike 17. Že na majhni povečavi (a.) lahko opazimo »zrnato« podobo. Seveda še ne moremo videti samih celic, vendar jih zato vidimo pri večji povečavi (b.). Spet lahko opazimo veliko število kvasnih celic, ki so nastale rasti med fermentacijo.



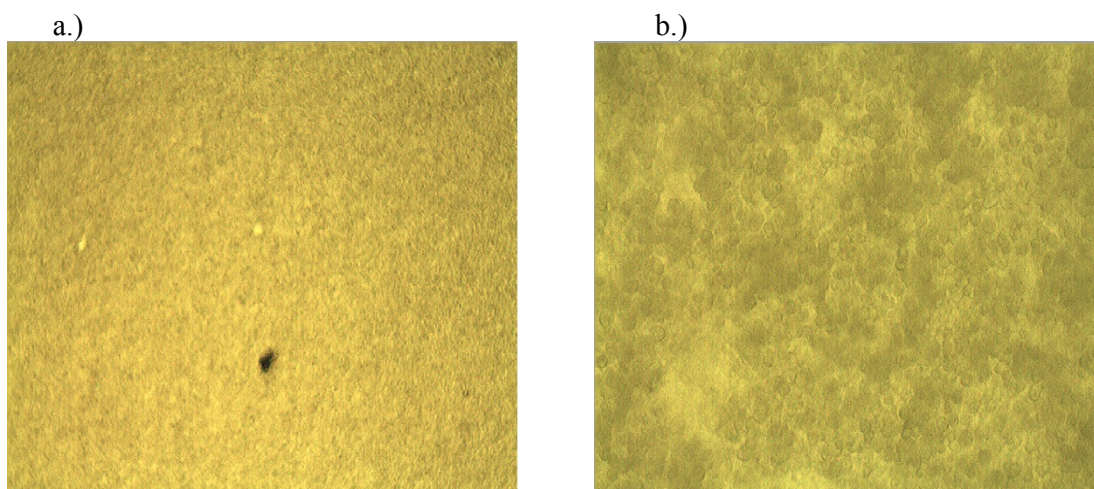
Slika 18: Kvasne celice v mladem vinu z dna fermentacijske posode, kjer smo moštu dodali kvasovke in hrano, pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi

Zrnasta slika 18 ponovno kaže na množično prisotnost kvasnih celic (a.), kar lahko z gotovostjo potrdimo pri večji povečavi (b.). Vidno polje je popolnoma prekrito s celicami, ki so tudi v več slojih.



Slika 19: Kvasne celice v mladem vinu z dna fermentacijske posode, kjer smo moštu dodali kvasovke in 1 mg/L bakrovih ionov, pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi

Kot lahko vidimo na sliki 19, na dnu ponovno najdemo veliko število kvasnih celic. Vse oziroma velika večina celic se namreč poseda na dno, zato jih je tam ogromno, v samem bistrem vinu pa jih ni skoraj nič.



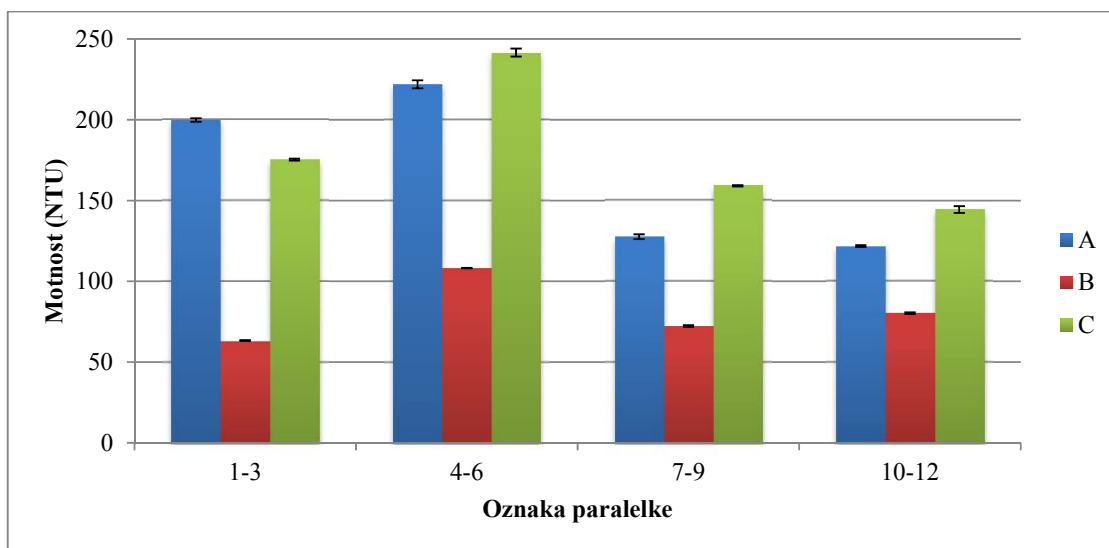
Slika 20: Kvasne celice v mladem vinu z dna fermentacijske posode, kjer smo moštu dodali kvasovke in 2 mg/L bakrovih ionov, pod mikroskopom pri 100x (a.) in 400x (b.) povečavi

Pri vseh vzorcih kvasne biomase smo dobili zelo podobne slike, tudi tukaj pri zadnji. Na sliki 19 tako vidimo veliko kvasnih celic pri manjši (a.) in večji (b.) povečavi.

4.2.4 Motnost vina

Poznamo več stopenj bistrosti vina, ki v osnovi pri današnji tehnologiji vina ne predstavljajo večje težave, vsekakor pa že manjša motnost prispeva k neobjektivni

senzorični oceni barve vina. Tako sta npr. bistrenje in čiščenje tehnološka postopka, namenjena preprečevanju in/ali odpravi motnosti ter usedanju motnih delcev, medtem ko je stabilizacija vina namenjena stekleničenju vina. Današnja tehnologija pridelave belih vin omogoča ustrezno bistrost, ki pa ni vedno in samo v povezavi z njihovo kakovostjo. Motnost vina povzroča več dejavnikov, ki jih uvrščamo med kemijske pomanjkljivosti ali napake vina. Najpogostejše so vzroki termolabilne beljakovine v belih vinih. Po pogostosti sledijo koloidi, kovinski ioni in kristali vinskega kamna, ne glede na barvo vina (Košmerl in Wondra, 2007).



Slika 21: Motnost mladega vina (NTU) v vzorcih pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).

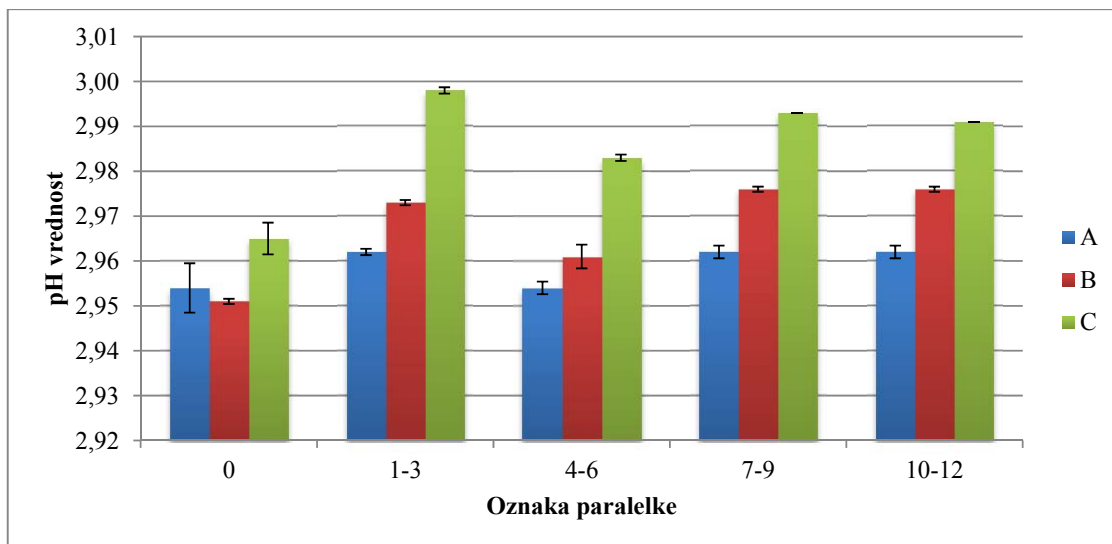
Nobene paralelke nismo prefiltrirali, zato so bili precej motni, saj so vsebovali še veliko mikroorganizmov, ki precej vplivajo na motnost. S slike 21 lahko razberemo, da so najmanj motne bile paralelke pri fermentaciji B. Najbolj motne pa so bile paralelke pri C. Na splošno bi lahko rekli, da so bili nekoliko manj motne paralelke, kjer smo pred fermentacijo dodali bakrove ione (paralelke 7-12).

Z našim najnovejšim veljavnim pravilnikom imamo predpisano kar nekaj dodatnih obveznih testov, katerim mora vino v prometu ustrezati oziroma zadostiti. Nimamo pa žal predpisanih metod, metodologije oziroma pogojev za izvajanje teh testov, ki nam lahko dajo različne rezultate o ustrezni stabilnosti vina. Na primer, v Kanadi imajo predpisano največjo dovoljeno motnost belih in rdečih vin do 5 oziroma 10 NTU (Košmerl in Wondra, 2007).

4.2.5 pH vina

Določiti pH vina je za vinarje veliko bolj pomembno, kot je splošno znano. pH je povezan z odpornostjo proti boleznim, barvnim odtenkom, okusom, odstotkom skupnega žveplovega

dioksida, predstavljenega kot prosti žveplov dioksid, občutljivostjo na železov fosfat, motnostjo itd. Od tega je najbolj pomembna prav dovzetnost za bolezen. Namizna vina ne smejo imeti pH večji kot 3,6, desertna vina pa ne več kot 3,8 (Ough in Amerine, 1988).



Slika 22: Vrednost pH v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).

Na sliki 22 vidimo, da imajo štiri sklopi paralel največjo vrednost pH pri fermentaciji C. Razlike v pH sicer niso zelo velike, saj se načeloma spreminja druga decimalka. V štirih sklopih ima najmanjši pH vino pri fermentaciji A. Nobena vrednost pa ne presega pH 3,6.

Pri paralelkah 0, ima najvišjo vrednost pH tretja fermentacija. Najmanjšo vrednost pH ima fermentacija B, vendar ima le malo večjo vrednost pH fermentacija A. Vse tri vrednosti pH so pod 2,98 in višji od 2,95.

Med paralelkami 1-3 je najvišja vrednost pri fermentaciji C, ki je tudi največja vrednost na sliki 22, vendar vseeno ne doseže vrednosti 3. Razlika med najvišjim pH in tistim na drugem mestu, je tukaj največja. Vse vrednosti so večje kot pri paralelkah 0. Najmanjša vrednost pH ima fermentacija A.

Vrednosti pri paralelkah 4-6, če seveda ne upoštevamo vrednosti pri paralelkah 0, imajo najnižji pH. Vse tri fermentacije imajo tukaj najmanjšo vrednost pH.

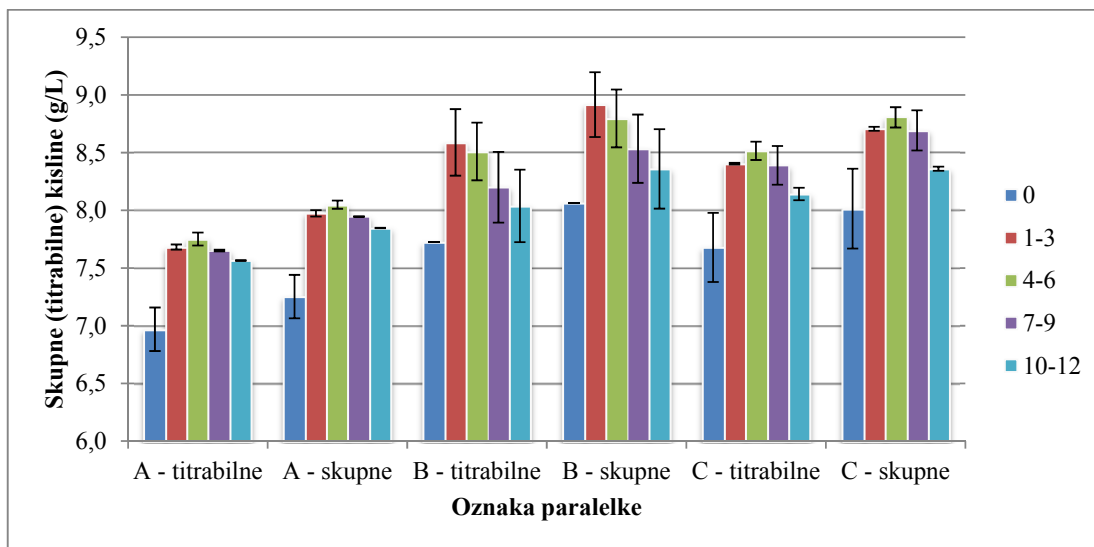
Pri paralelkah 7-9 je pH na splošno nekoliko višji kot pri paralelkah 4-6, vendar nižji kot pri paralelkah 1-3. Vrednosti so sicer precej podobne vrednostim pri paralelkah 1-3.

Zadnji sklop paralel, 10-12, je skoraj enak kot pri paralelkah 7-9, razlika je res minimalna pri fermentaciji C.

4.2.6 Skupne (titrabilne) kisline vina

Titribilna kislost se uporablja med procesom in zaključnimi operacijami za standardizacijo vina ter sledenje neželenih sprememb zaradi bakterij, plesni itd. Kisline v vinu in moštu,

kot so vinska, jabolčna, mlečna in očetna,... kislina, so relativno šibke organske kisline. Zaradi tega je pri titriranju vina ali mošta z močno bazo, dejanska končna točka večja kot pH 7,0, (po navadi med 7,8 in 8,3 pH vrednosti) (Ough in Amerine, 1988). Skupna vsebnost karboksilnih kislin je v grozdnem soku, moštu in vinu, če jo izrazimo kot g vinske kisline/L vzorca, med 6 in 9 g/L, pri sladkih in desertnih vinih med 4 in 6,5 g/L, za botriticidna vina pa okrog 10 g/L (Košmerl in Kač, 2007).



Slika 23: Skupne (titrabilne) kisline (g/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).

Kot vidimo s slike 23, so imele vse paralelke vrednost vinske kisline na liter mladega vina v predpisanih vrednostih, torej med 6 in 9 g/L. Pri nekaterih paralelkah je vrednost višja in pri drugih spet nižja. Nekako splošno imajo najvišjo vrednost skupne kisline paralelke 4-6. Najnižjo vrednost imajo paralelke 0. Najvišja vrednost skupnih kislin je bila pri fermentaciji B. Sledi ji fermentacija C in najmanjše vrednosti ima A fermentacija. Razlike med skupnimi in titrabilnimi kisljinami so najmanjše pri paralelkah fermentacije A, sledi C, največje razlike pa so pri B.

Po pričakovanjih, imajo paralelke 0 pri vseh treh fermentacijah, najnižjo vrednost tako skupnih kot titrabilnih kislin. Sicer vsi dosežejo vrednost med 6 in 9 g/L. Najnižjo vrednost skupnih kislin ima paralelka 0 pri A, najvišjo vrednost pa ima pri B fermentaciji.

Paralelke 1-3 dosežejo najvišjo vrednost skupne kisline pri fermentaciji B, malo pod to vrednostjo je C in najnižjo vrednost ima pri A. Medtem, ko je med prvima dvema zelo majhna razlika (0,2 g/L), pa je razlika med najvišjo in najnižjo vrednosti skoraj 1 g/L. Pri fermentaciji B je za te paralelke to tudi najvišja vrednost v primerjavi z vsemi ostalimi paralelkami.

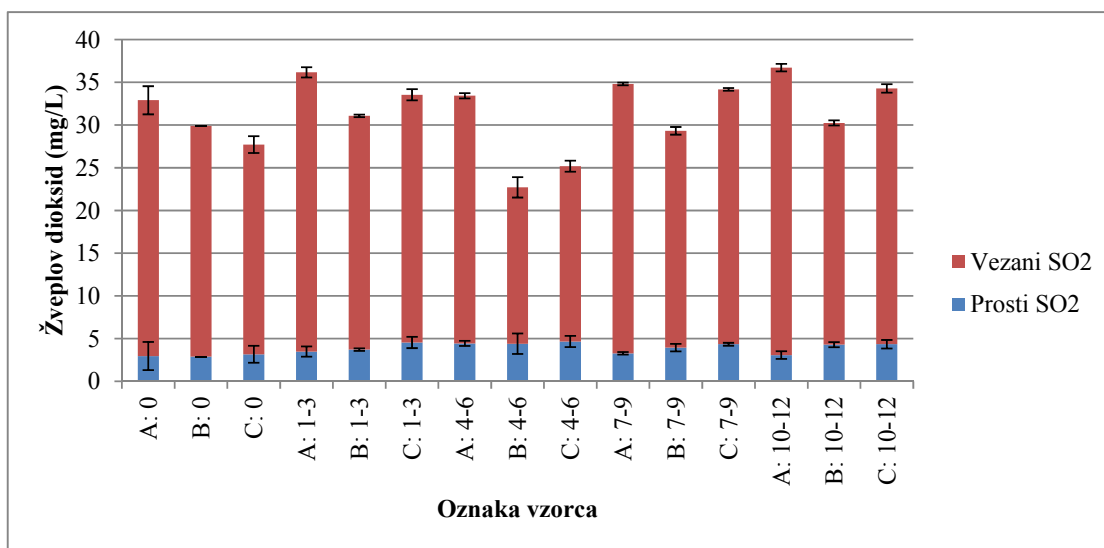
Paralelke 4-6 imajo pri vseh, razen pri fermentaciji B, najvišjo vrednost. Najvišjo vrednost dosežejo vzorci stolpa C, takoj za njo (0,01 g/L) je vrednost pri B in ponovno je malo večja razlika (0,8 g/L) s paralelko pri A.

Pri paralelkah 7-9 ponovno doseže najvišjo vrednost pri fermentaciji C, vendar je takoj za njo (0,2 g/L) B. Vrednost pri fermentaciji A je ponovno najnižja, vendar razlika več ni tako velika (0,7 g/L) kot je bila pri prejšnjih paralelkah.

Paralelke 10-12 ima na splošno najnižje vrednosti skupne kisline na liter mladega vina. Paralelki pri B in C imata skoraj isto vrednost, ki se razlikuje komaj na tretji decimali. Prav tako je razlika s paralelko pri A najmanjša in znaša 0,5 g/L.

4.2.7 Žveplov dioksid v vinu

Žveplov dioksid se v vinu pojavlja v dveh oblikah, kot vezani in kot prosti SO_2 . Seštevek vrednosti obeh nam daje skupni SO_2 . Izraz »vezani SO_2 « se nanaša na oblike, kjer se med seboj veže bisulfitni ion z drugimi spojinami kot so aldehidi, antocianini, proteini in aldosladorji. Količina in hitrost vezanja SO_2 je odvisna od vrednosti pH. Nižji kot je pH, počasneje se bo vezal SO_2 . Najbolj pomembno protimikrobno sredstvo je ne-disociirana molekulska oblika prostega SO_2 . Vrednost prostega SO_2 v molekularni obliki znatno variira, glede na vrednost pH mošta ali vina (Zoecklein in sod., 1995).



Slika 24: Prosti, vezani in skupni žveplov dioksid (mg/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).

Koncentracija prostega žveplovega dioksida med 20-30 mg/L za stekleničena vina po navadi zadostuje in če je mogoče, je lahko tudi nižja (Ough in Amerine, 1988). Koncentracija 35 mg prostega SO_2 /L vina popolnoma onemogoči delovanje polifenoloksidaz. Vina običajno vsebujejo 5-40 mg prostega SO_2 /L vina (Košmerl in Kač, 2007).

Glede na Pravilnik o pogojih..., 2004 imajo bela vina, ki imajo reducirajoče sladkorje do 5 g/L, največjo dovoljeno koncentracijo skupnega SO₂ 210 mg/L in bela vina, ki imajo reducirajoče sladkorje nad 5 g/L, 260 mg/L.

S slike 24 vidimo, da je največ vezanega (in tudi skupnega) SO₂ se pojavlja pri fermentaciji A, na drugem mestu je fermentacija C in najmanj vezanega (ter skupnega) SO₂ je pri fermentaciji B. Največ prostega SO₂ je nastalo pri fermentaciji C, na drugem mestu je fermentacija B, najmanj prostega SO₂ pa je nastalo pri fermentaciji A. Vrednosti prostega SO₂ se gibljejo med 3 in 4 mg/L. Vrednosti skupnega SO₂ pa ne presegajo dovoljene vrednosti, saj ne presegajo niti vrednosti 35 mg/L.

Paralelke 0 imajo pri vseh treh fermentacijah najnižjo vrednost prostega SO₂ (2,90 mg/L). Najnižja je sicer pri B, vendar so si vrednosti res tesno skupaj. Pri A je vrednost skupnega SO₂, pri paralelka 0, najvišja. Zanimivo je, da je sicer pri A med vsemi drugimi paralelkami, paralelka 0 najnižja, pri drugih fermentacijah pa ni tako, vsaj ena od drugih paralelk ima nižjo vrednost.

Paralelke 1-3 imajo precej visoke vrednosti skupnega SO₂ v primerjavi z drugimi paralelkami. Pri prostem SO₂, so si vrednosti precej blizu, nekoliko višja je pri C.

Pri paralelkah 4-6 je zanimivo to, da imajo tukaj vse fermentacije najvišjo vrednost prostega SO₂ (A: 4,44 mg/L, B: 4,40 mg/L in C: 4,66 mg/L). Prav tako pa imajo vse fermentacije pri tej paralelki najnižjo vrednost skupnega SO₂. To torej pomeni, da je v teh vzorcih tudi najmanj vezanega SO₂. Skupni SO₂ je pri B in C fermentaciji precej nižji kot je pri drugih vzorcih, pri A fermentaciji ta razlika ni tako izrazita.

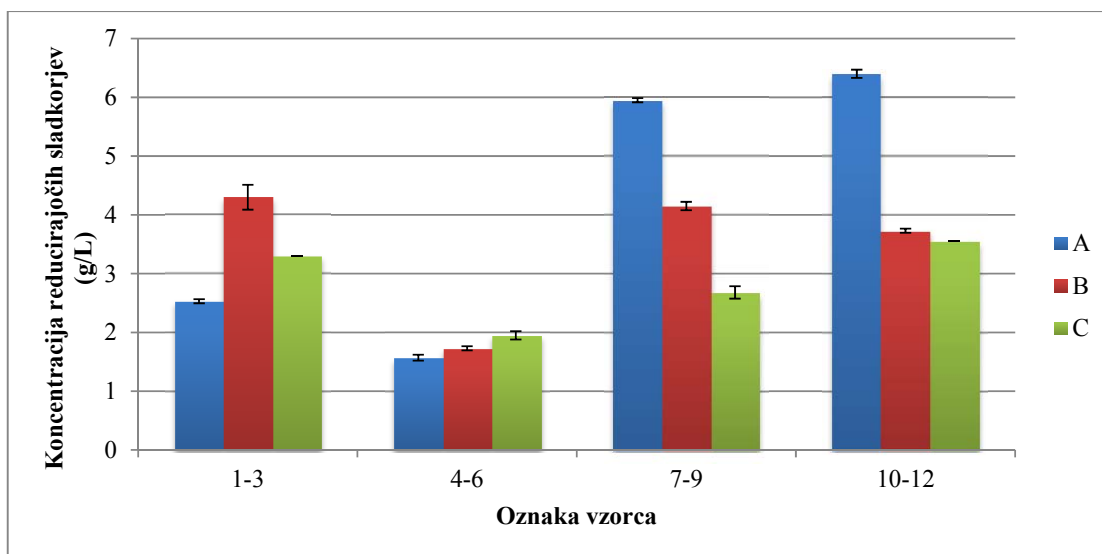
Vrednost skupnega SO₂ pri paralelki 7-9 je najnižji pri B fermentaciji, medtem, ko sta si vrednosti pri A in C precej podobni. Pri prostem SO₂ so te vrednosti nekoliko nižje kot pri drugih paralelkah, vendar ponovno, vrednosti so si precej blizu skupaj.

Skupni SO₂ za paralelke 10-12 je najvišji tako pri A kot tudi C fermentaciji. Tukaj so sicer tudi vrednosti prostega SO₂ nekoliko višje kot pri paralelki 7-9.

4.2.8 Reducirajoči sladkorji v vinu

Na podlagi vsebnosti ne povrelih reducirajočih sladkorjev v vinu, se mirna vina delijo na naslednje kategorije (Jug in sod., 2014):

- Suho vino: največja dovoljena vsebnost reducirajočih sladkorjev je 9 g/L, največja dovoljena razlika med vsebnostjo reducirajočih sladkorjev in skupnih kislin, izraženih v gramih vinske kisline na liter, ni več kot 2 g/L
- Polsuha vina: največja dovoljena vsebnost reducirajočih sladkorjev je 18 g/L, največja dovoljena razlika med vsebnostjo reducirajočih sladkorjev in skupnih kislin, izraženih v gramih vinske kisline na liter, ni več kot 10 g/L
- Polsladko vino: največja dovoljena vsebnost reducirajočih sladkorjev je 45 g/L
- Sladko vino: vina z vsebnostjo reducirajočih sladkorjev nad 45 g/L



Slika 25: Koncentracija reducirajočih sladkorjev (g/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).

Pri vseh sklopih lahko vidimo na sliki 25, da imajo najmanjšo vrednosti paralelke pri fermentaciji C. Na splošno je najmanj sladkorja povrelo pri A fermentaciji.

Najvišjo vrednost pri paralelkah 1-3 doseže vzorec pri B (4,3 g/L), najnižjo pa pri A (2,5 g/L). Glede na predpise gre torej za suho vino v vseh treh primerih.

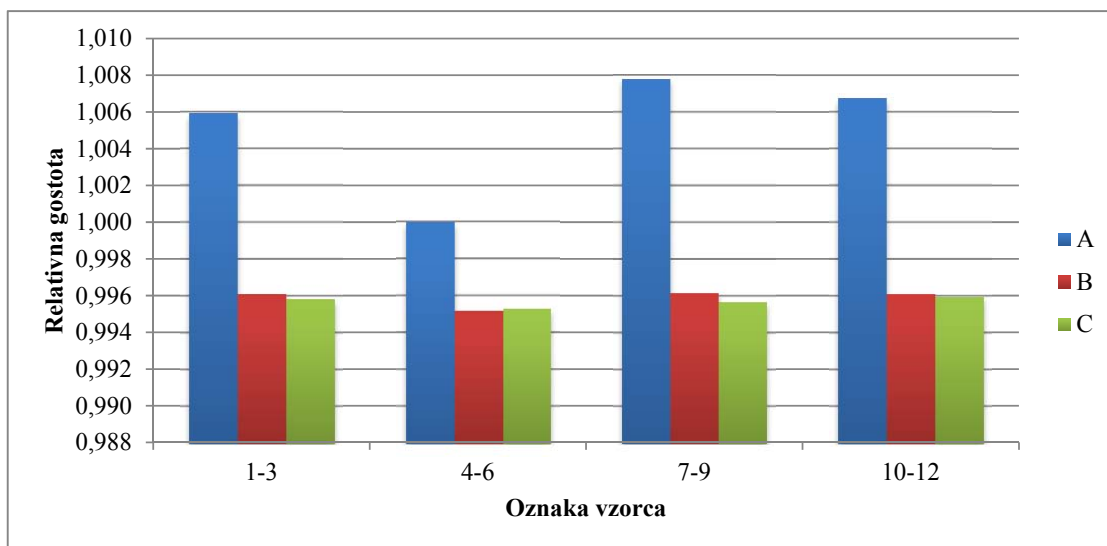
Pri paralelkah 4-6 dosežejo reducirajoči sladkorji najnižje vrednosti. Najnižjo vrednost ponovno doseže vzorec pri A in najvišjo pri fermentaciji C. S temi vrednostmi je tudi to vino, suho vino.

Vrednosti reducirajočih sladkorjev pri paralelkah 7-9 so podobni vrednostim paralelkam 10-12, vendar je tukaj ena velika razlika, da je pri fermentaciji C povrelo več sladkorja kot pri A. Najnižjo vrednost doseže fermentacija C, vsa tri vina pa spadajo pod suha vina.

Pri paralelkah 10-12 je ponovno najmanjšo vrednosti dosegla fermentacija C (3,6 g/L), najvišjo pa A (6,4 g/L). Vsa tri vina, tudi tukaj, spadajo pod suha vina.

4.2.9 Relativna gostota vzorca vina

Suha vina imajo relativno gostoto blizu 1; izjema so le suha in hkrati alkoholno zelo bogata vina, ki imajo relativno gostoto občutno manjšo od 1. Mošt in vina s preostankom sladkorja imajo praviloma relativno gostot večjo od 1. Na gostoto vzorca mošta in vina vplivajo vse raztopljene snovi. Te so bodisi specifično težje (sladkorji, kisline, glicerol) ali specifično lažje od vode (alkohol) (Košmerl in Kač, 2007).



Slika 26: Relativna gostota v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).

Na sliki 26 vidimo, da imajo pri vseh paralelkah najvišjo relativno gostoto vzorci fermentacije A (1,00784). Pri nekaterih paralelkah je vrednost nad 1, kar pomeni, da fermentacija ni potekla v celoti, ostalo je še kar nekaj ne povretega sladkorja.

Pri paralelkah 1-3 sta si vrednosti B in C fermentacije zelo podobni in nobena ne presega vrednosti 1. Najvišja vrednost je pri fermentaciji A, ki sicer presega vrednost 1.

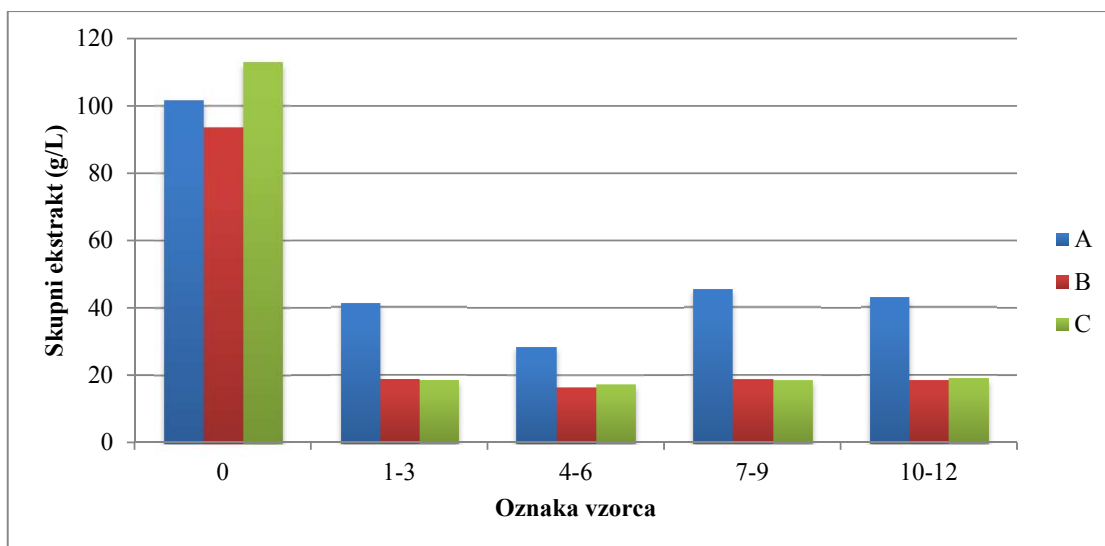
Pri paralelkah 4-6 imajo vse tri fermentacije najnižjo vrednost relativne gostote (najnižja 0,99518). Sicer so vrednosti fermentacij B in C podobne vrednostim istih fermentacij pri drugih paralelkah, je pa nekoliko večja razlika pri fermentaciji A. Edino pri tej paralelkah ne preseže vrednosti 1, ampak je pod njo. Pri vseh treh fermentacijah je torej tukaj ostalo najmanj sladkorja.

Vrednosti pri paralelkah 7-9 so spet nekoliko višje. Vrednosti fermentacij B in C se spreminjata zelo malo, spet pa je malo večja sprememba pri fermentaciji A, kjer vrednost ponovno preseže 1.

Pri zadnjih paralelkah 10-12 so vrednosti zelo podobne vrednostim paralelk 7-9, razlike so izjemno majhne in se dogajajo komaj na tretji ali četrti decimalki.

4.2.10 Skupni suhi ekstrakt vina

Skupni suhi ekstrakt vina (oz. krajše skupni ekstrakt) sestavljajo po definiciji O.I.V. pri 100 °C nehlapne komponente vina (sladkorji, fiksne kisline, organske soli idr.). Na osnovi vsebnosti ekstrakta vina lahko sklepamo na začetno vsebnost sladkorja v moštu, iz katerega je bilo vino pridelano (Košmerl in Kač, 2007).



Slika 27: Skupni ekstrakt (g/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).

S slike 27 ugotovimo, da so največje vrednosti med paralelkah, kjer smo dodali kvasovke, pri fermentaciji A. Pri reducirajočih sladkorjih je sicer malo drugače, te velike razlike med fermentacijama A in C tam ni. Je pa res, da je tudi reducirajočih sladkorjev najmanj pri vzorcih B fermentacije, tako kot je tudi skupnega prostega ekstrakta najmanj pri teh vzorcih.

Najvišjo vrednosti pri paralelkah 0 dosega fermentacija C (113,17 g/L), sledi A in najmanjša vrednost pripada fermentaciji B. Razmerje vrednosti pri teh treh fermentacijah je skoraj enako kot pri reducirajočih sladkorjih.

Pri paralelkah 1-3 ima najvišjo vrednost fermentacija A. Vrednosti drugih dveh fermentacij sta si precej blizu, malenkost manjša je vrednosti pri B.

Pri paralelkah 4-6 vse tri fermentacije dosežejo najnižje vrednosti (najnižja 16,46 g/L). Tako je tudi pri reducirajočih sladkorjih. Vrednosti pri fermentacijah B in C sta si ponovno precej blizu, nekoliko večjo vrednost doseže A.

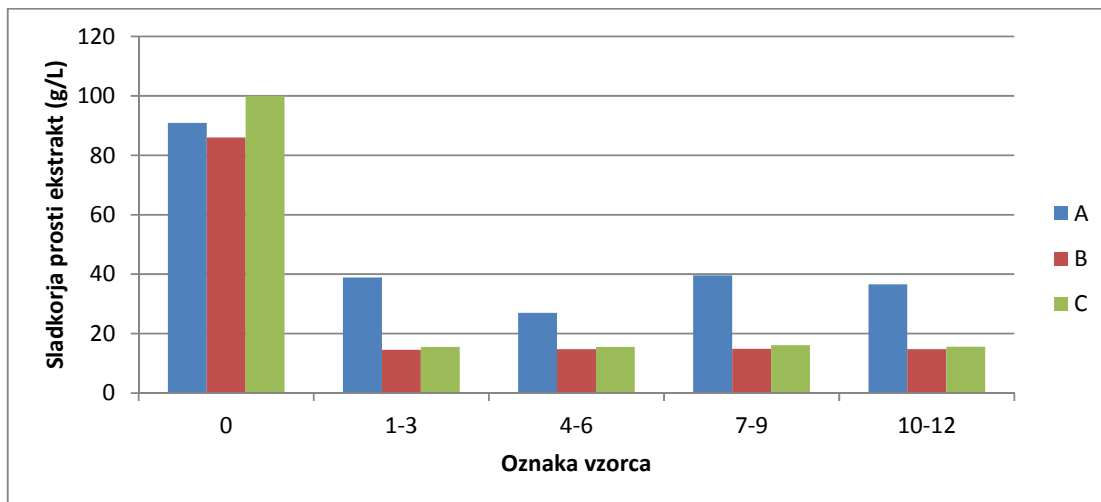
Pri paralelkah 7-9 dosežeta fermentaciji A in B največjo vrednost.

Med paralelkami C fermentacije je največ skupnega suhega ekstrakta ravno pri paralelkah 10-12. Tudi tukaj je precej višja vrednost pri fermentaciji A, kot pri drugih dveh.

4.2.11 Sladkorja prosti ekstrakt

Po definiciji je to razlika med (skupnim) ekstraktom in reducirajočimi sladkorji. Rdeča vina imajo več sladkorja prostega ekstrakta (oz. ekstrakta brez sladkorja), v primerjavi z rdečkastimi, rosé in belimi vini. Vsebnost ekstrakta je odvisna od sorte, zrelosti, načina trgatve in razmer ali pogojev vinifikacije. Vpliv različnih sevov čiste kulture kvasovk v

primerjavi s spontano fermentacijo po literaturnih podatkih ni statistično značilen. Vsebnost sladkorja prostega ekstrakta je 7-30 g/L (Košmerl in Kač, 2007).



Slika 28: Vrednost sladkorja prostega ekstrakta (g/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).

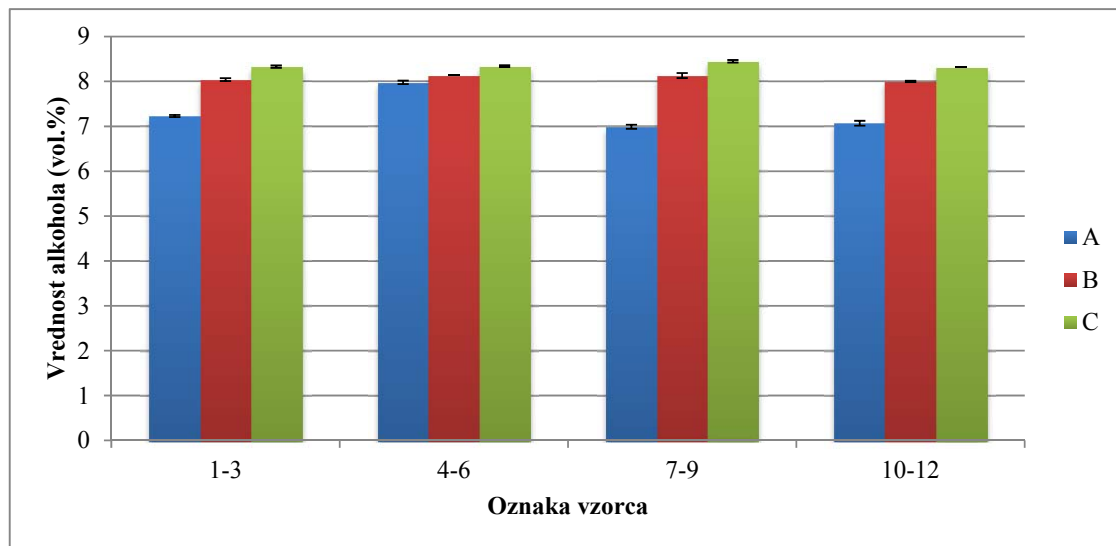
Vse vrednosti so nekako sorazmerne z vrednostmi skupnega ekstrakta in reducirajočimi sladkorji (slika 27 in slika 25). Če ne upoštevamo spontane fermentacije (paralelke 0), imajo najvišjo vrednost vse paralelke fermentacije A (najvišja 39,59 g/L), drugi dve fermentaciji sta si po vrednostih zelo blizu. Vrednosti so tudi precej manjše kot pri fermentaciji A.

Najvišjo vrednosti pri paralelkah 0 dosega fermentacija C (100,02 g/L), najmanjšo pa fermentaciji B (86,03 g/L).

Pri vseh ostalih paralelkah, torej 1-3, 4-6, 7-9 in 10-12, ima precej višje vrednost fermentacija A. Vrednosti pri fermentacijah B in C so si precej blizu, malenkost nižje vrednosti imajo paralelke pri B.

4.2.12 Alkohol v vinu

Alkoholna fermentacija je anaerobna biološka razgradnja glukoze in fruktoze do etanola in ogljikovega dioksida (CO_2), s številnimi stranskimi produkti. Proces ni bistveno drugačen od glikolize, procesa, kjer žive celice razbijajo glikogen v mlečno kislino ter zagotavlja glavni vir energije za celice. Razlika je v začetnem substratu in v končnih produktih. Glavna izguba alkohola, razen izhlapevanja, se zgodijo pri aerobnem procesu mlečnokislinskih bakterij. Vendar to danes več ni problem zaradi tehnologije, ki je prisotna pri pridelavi vina (Ough in Amerine, 1988).



Slika 29: Koncentracija alkohola (vol.%) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).

S slike 29 ugotovimo, da je največ alkohola nastalo pri fermentaciji C (8,45 vol.%), najmanj ga je nastalo pri fermentaciji A (6,99 vol.%). To vse skupaj tudi sovpadajo z reducirajočimi sladkorji (slika 25), kjer je so vrednosti ravno obratno.

Pri paralelkah 1-3 nastane največ alkohola pri fermentaciji C (8,33 vol.%), tudi pri B ga je nastalo malenkost več kot 8 vol.% (8,03 vol.%), pri A pa nekaj več kot 7 vol.% (7,23 vol.%).

Pri paralelkah 4-6 je nastalo največ alkohola. Tukaj fermentaciji A in B dosežeta svoj maksimum, fermentacija A ne preseže vrednosti 8 vol.% alkohola.

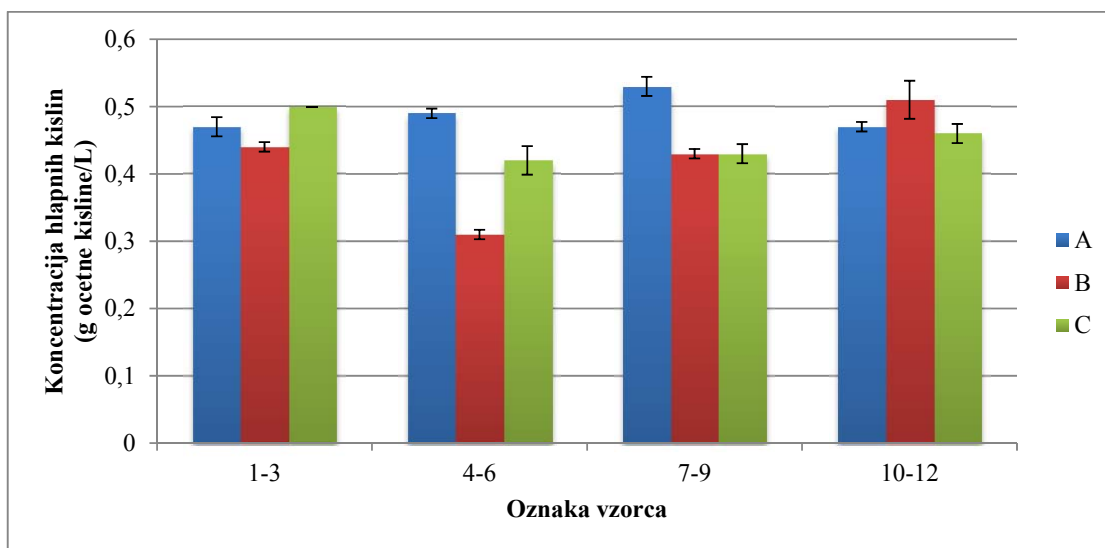
Pri paralelkah 7-9 doseže svoj maksimum fermentacija C s 8,45 vol.%. To je hkrati tudi najvišja vrednost nastalega alkohola v celotnem poizkusu.

Vrednosti zadnjih paralelek 10-12 so, po razmerju podobni vsem ostalim paralelkam in ni nobenih posebnosti.

4.2.13 Hlapne kisline v vinu

Hlapne kisline sestavljajo maščobne kisline, ki jih najdemo v vinu, kot so mravljinčna, očetna, maslena kislina, itd. Ne vsebuje pa s paro destiliranih kislin, torej mlečne, jantarne in sorbinske kisline, kot tudi ne ogljikovega dioksida in žveplovih kislin. Točno določanje hlapnih kislin v vinu je pomemben podatek, ki ga po navadi pridobi vinar. Dovoljene meje hlapnih kislin v vinu so bile postavljene zato, ker vina z visoko vsebnostjo hlapnih kislin kažejo na prisotnosti slabih oz. kvarljivih organizmov, še posebej oetnokislinskih bakterij rodu *Acetobacter*. Takšno vino se lahko pretvori tudi v kis. Majhna, ampak vseeno merljiva količina očetne kisline nastane med normalno, brez prisotnosti bakterij alkoholno

fermentacijo in navadno ne presega vrednosti 0,030 g/100 mL. Bakterije, ki so prisotne pri mlečnokislinski fermentaciji, lahko proizvedejo majhno količino očetne kisline, predvidimo z razgradnjo citronske kisline. V resnici lahko kvar postane viden že pred to mejo, ki jo določa pravilnik, po navadi že pri 0,070 g/100 mL. Pravzaprav ni samo očetna kislina ta, ki je v prvi vrsti odgovorna za pokvarjene vonjave, ampak precej visoka vrednost etil acetata in očetne kisline ter majhna vrednost drugih kvarljivih produktov (Ough in Amerine, 1988).



Slika 30: Koncentracija hlapnih kislin (g očetne kisline/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).

Na sliki 30 vidimo, da v treh različnih paralelkah dosežejo najmanjšo vsebnost hlapnih kislin pri fermentaciji C. Noben vzorec ne presega oziroma niti ne dosega vrednosti 1 g hlapnih kislin/L, izraženih kot očetnih kislin, kolikor je dovoljeno po pravilniku za bela vina (Pravilnik o pogojih..., 2004).

Pri paralelkah 1-3 doseže najvišjo vrednost fermentacija C, najmanjšo vrednosti pa B.

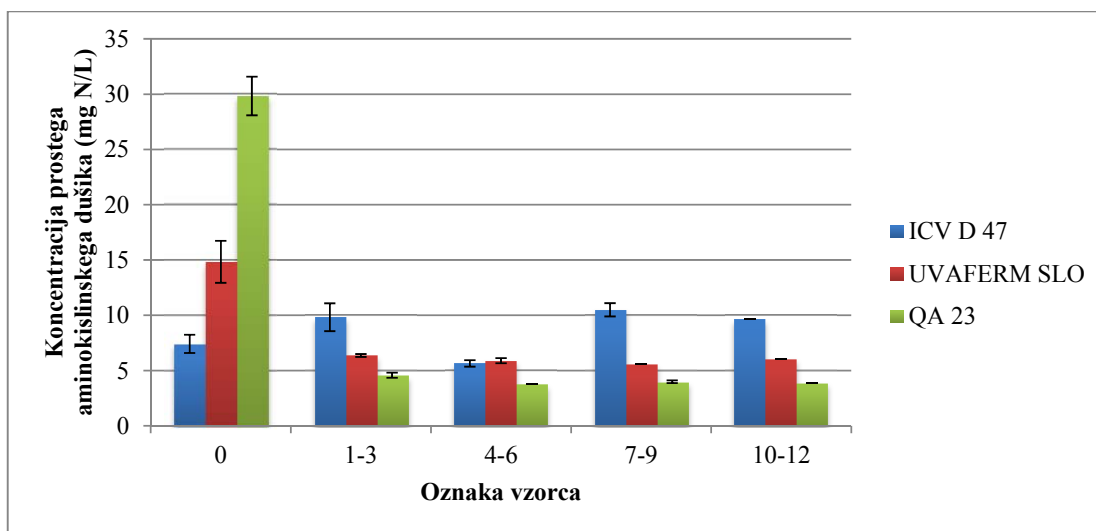
V paralelkah 4-6 doseže fermentacija B najnižjo vrednost med vsemi paralelkami in znaša 0,31 g očetne kisline/L.

Pri paralelki 7-9 doseže fermentacije A najvišjo vrednost med vsemi vzorci in znaša 0,53 g očetne kisline/L.

Pri zadnjih paralelkah 10-12 ima najvišjo vrednot fermentacija B, ki pri drugih paralelkah dosega najnižje vrednosti.

4.2.14 Prosti aminokislinski dušik (FAN) v vinu

Kratica FAN izhaja iz angleškega poimenovanja kvasovkam dostopen prosti aminokislinski dušik (free amino nitrogen), ki je poleg sladkorjev in mikrohranil ključno hranilo kvasovk. Kvasovke namreč potrebujejo dušik za izgradnjo beljakovin, potrebnih za povečanje kvasne biomase, in tvorbo encimov, potrebnih za uspešno pretvorbo sladkorjev v alkohol (dokončanje fermentacije). Dušik ima pomembno vlogo tudi pri tvorbi aromatičnih snovi, tako zelenih (fermentacijske arome) kot neželenih (žveplove spojine) (Jug in sod., 2014).



Slika 31: Koncentracija prostega aminokislinskega dušika (mg N/L) v vzorcih mladega vina pri fermentacijah z različnimi sevi kvasovk (A, B, C).

S slike 31 je razvidno, da je najmanj FAN-a ostalo pri fermentaciji C, največ pa ga je ostalo pri fermentaciji A. Če primerjamo te vrednosti z izmerjenim FAN pri moštu (slika 9), pravzaprav ugotovimo, da se je daleč največ dušika porabilo pri fermentaciji B, kjer ga je že v začetku bilo skoraj dvakrat več kot pri drugih dveh fermentacijah.

Pri paralelkah 0, je največ FAN-a ostalo pri fermentaciji C (29,84 mg N/L), najmanj pa pri prvi (7,41 mg N/L).

Pri paralelkah 1-3 je največ FAN ostalo pri fermentaciji A in najmanj pri C.

Pri paralelkah 4-6 dosežeta svoj minimum fermentacija A (5,64 mg N/L) in C (3,74 mg N/L). Največ FAN je tukaj ostalo pri fermentaciji B.

Pri paralelkah 7-9 je dosežena najvišja vrednost FAN med vsemi paralelkami, ki smo jim dodali vsaj kvasovke in to je pri fermentaciji A (10,50 mg N/L). Med vsemi paralelkami doseže tukaj B svojo najmanjšo vrednost (5,55 mg N/L).

Pri paralelkah 10-12 imata ponovno najvišjo vrednost fermentacija A in najnižjo C.

5 SKLEPI

Na osnovi raziskave, ki smo jo opravili za to diplomsko nalogo, smo želeli ugotoviti, ali različni sevi kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* in različni dodatki kvasovkam vplivajo na fermentacijo. Ugotovili smo naslednje:

- Nobeno izmed pridelanih mladih vin ni bilo primerno za promet. Že začetna stopnja sladkorja v moštu je bila prenizka (63 °Oe), da bi lahko iz takšnega mošta pridelali kvalitetno vino. Zaradi takšne nizke stopnje sladkorja, je posledično nastala tudi prenizka stopnja alkohola (< 8,5 vol. %).

Pri fermentacijah, katerim smo dodali hranilo ali bakrove ione smo ugotovili naslednje:

- Pri vseh treh fermentacijah se je največ CO₂ (60-65 g/L) sprostilo v vzorcih, katerim smo dodali kvasovke in hranilo, to torej pomeni, da so bile tukaj kvasovke najbolj metabolno aktivne. Vse tri fermentacije dosežejo najvišjo motnost pri vzorcih, kjer smo dodali kvasovke in hranilo.
- pH je najnižji (2,95-2,98) pri vzorcih, kjer smo kvasovkam dodali hranilo, prav tako je tukaj tudi najmanj skupnega SO₂ (22-32 mg/L). V teh vzorcih je povrelo največ sladkorja, vsebnost reducirajočih sladkorjev je manjše kot 2 g/L.
- V vzorcih, kjer smo dodali kvasovke in hranilo je tudi najnižja relativna gostota. To tudi sovпада s tem, da je tam tudi najmanj reducirajočih sladkorjev. V teh vzorcih so tudi najnižje vrednosti skupnega suhega ekstrakta ter najmanjše vrednosti sladkorja prostega ekstrakta.
- Najmanjše vrednosti FAN dosegaajo vzorci, katerim smo dodali kvasovke in hranilo. Vse vrednosti so pod 6 mg N/L. Nastalo je tudi najmanj hlapnih kislin, vse vrednosti so pod 0,5 g očetne kisline/L, najnižja je celo 0,31.
- Najmanj CO₂ (50-60 g/L) se je sprostilo pri tistih vzorcih, kjer smo dodali kvasovke in 2 mg/L Cu²⁺, torej so bile tukaj kvasovke najmanj metabolno aktivne. Najmanjšo motnost imajo vzorci, katerim smo dodali Cu²⁺ in to nekako potrjuje, da večja količina bakrovih ionov negativno vpliva na rast kvasovk.
- Več kot smo dodali bakrovih ionov, manjša je bila vrednost skupnih kislin. Največ skupnega SO₂ smo izmerili v vzorcih, kjer smo dodali kvasovke in 2 mg/L Cu²⁺. V teh vzorcih je tudi povrelo najmanj sladkorja in tako nekako potrjuje, da bakrovi ioni zavirajo fermentacijo. Ostalo ga je 3,5-6,5 g/L, odvisno od fermentacije.
- Tam kjer je ostalo največ reducirajočih sladkorjev, je tudi nastalo najmanj alkohola. To je pri fermentaciji A, v obeh sklopih vzorcev, kjer smo dodali Cu²⁺. Vrednosti pri bolj uspešnih fermentacijah komaj dosežejo vrednost 8 vol. % alkohola, najmanj uspešna fermentacija A, pa ne doseže niti 7 vol. % alkohola.

- Velika razlika je med spontanimi fermentacijami in bolj nadzorovanimi fermentacijami. Večje razlike lahko opazimo pri skupnih (titrabilnih) kislinah. Pri spontani fermentaciji je lahko tudi do 1 g/L manj skupnih (titrabilnih) kislin kot pri inokulirani fermentaciji. Razlike so tudi pri reducirajočih sladkorjih (lahko tudi več kot 100 g/L), sladkorju prostem ekstraktu (več kot 50 g/L) in alkoholu (okoli 5 vol.%). Vse to kaže na to, da je fermentacija komaj začela potekati in je to še pravzaprav bolj mošt kot mlado vino.
- Kontrolni vzorci se med seboj zelo razlikujejo, kar je posledica tega, da v moštu brez dodanih selekcioniranih kvasovk prevlada naključna mikrobiota tistega vzorca.

Pri fermentacijah, katerim smo dodali različne seve kvasovk smo ugotovili naslednje:

- Skupno gledano se je največ CO₂ sprostilo med fermentacijo C. Pri vseh vzorci najmanjšo motnost dosega fermentacija B.
- Vrednost pH nobenega vzorca ni presegla vrednosti 3,6, ki je predpisana najvišja vrednost za namizna vina. Pri vseh vzorcih je najnižji pH pri fermentaciji A in najvišji pri fermentaciji C. Skupne kisline v vseh vzorcih so v predpisanem območju, med 6-9 g/L, najvišje pa so pri fermentaciji B. Prosti SO₂ pri nobenem vzorcu ne preseže 5 mg/L, spodnja meja tukaj ni določena. Skupni SO₂ ne presega 40 mg/L in je tako v nekem priporočljivem razponu (Pravilnik o pogojih...2004). Reducirajoči sladkorji so pri vseh vzorci pod vrednostjo 9 g/L, kar pomeni, da smo v vseh treh fermentacijah pridelali suha vina.
- Relativna gostota pri fermentaciji A v skoraj vseh primerih, presega vrednost 1. Vrednosti fermentacij B in C nikjer ne presegata vrednosti 1. Vrednosti sorazmerno sovpadajo z relativno gostoto vzorcev. Reducirajoči sladkorji sicer pri fermentaciji A niso sorazmerni suhemu ekstraktu, tako da verjetno ne gre za sladkor, ampak za več kislin, organskih soli,... . Predpisano vrednost sladkorja prostega ekstrakta, ki znaša 7-30 g/L, presegajo skoraj vsi vzorci fermentacije A. Vsi ostali vzorci fermentacij B in C so med to vrednostjo.
- Deželno vino mora imeti vsebnost alkohola med 8,5-15 vol.% (Pravilnik o pogojih...2004). Pri vseh naših fermentacijah je vrednost alkohola pod 8,5 vol.%. Sladkorna stopnja mošta je bila 63 °Oe. S tako nizko začetno sladkorno stopnjo, pravzaprav ni moglo nastati več alkohola, kot ga je nastalo. Pri isti fermentaciji in različnih vzorcih se vrednosti zelo malo razlikujejo. Lahko rečemo, da so vse tri fermentacije potekle do konca, vendar pri nobeni ni nastalo toliko alkohola, kot ga zahteva pravilnik.
- Noben vzorec ne preseže vrednosti 1 g hlapnih kislin/L. Največje vrednosti FAN so pri fermentaciji A (5,64-10,05 mg N/L), najmanjše pa pri fermentaciji C (3,74-4,57 mg N/L). Manjša kot je vrednost, več prostega dušika so porabile kvasovke in nekako pomeni, da je bila fermentacija bolj intenzivna. Vrednosti so sorazmerne skupnemu suhemu ekstraktu, relativni gostoti in sladkorja prostemu ekstraktu.

6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti, kako različni sevi kvasovk vplivajo na fermentacijo ter kako na fermentacijo vplivajo različni dodatki h kvasovkam.

Za poskus smo izbrali mošt laški rizlinga s Ptuja, letnik 2010. Letnik 2010 sicer ni bil optimalen za doseganje zelo kakovostnega vina. To leto so bile temperature nižje od povprečja, prav tako pa je padla večja količina padavin, oboje v času dozorevanja.

Trgatev in začetna predelava grozdja je bila izvedena v Ptujski kleti. Bister mošt je bil nato prepeljan v prostore Biotehniške fakultete v Ljubljani. Mošt je bil skladiščen v plastični posodi pri 17 °C. Mošt smo, zaradi lažjega rokovanja pri polnjenju vrelnih steklenic ter analizah mošta, pretočili v plastenke. Pri vsaki od treh fermentacij smo z moštom napolnili 15 vrelnih steklenic. V vse vzorce, razen kontrole, smo inokulirali tri seve kvasovk, te sklope fermentacij smo označili s črkami A, B in C. Določenim vzorcem smo dodali tudi hranilo ali bakrove ione. Tako napolnjene vrelnice smo pustili stati približno 24 ur na sobni temperaturi, nato pa smo jih prestavili v prostor, kjer je bila temperatura med 13-14 °C.

Na moštu in po zaključeni alkoholni fermentaciji tudi na mladem vinu, smo opravili osnovne fizikalno-kemijske meritve. Mošt in vino smo pred analizami segreli na sobno temperaturo.

Najhitreje in najbolj intenzivno je potekla fermentacija C, najpočasneje pa fermentacija A. Razlike med fermentacijama B in C so zelo majhne, med seboj sta si zelo podobni. Tudi fermentacijske krivulje kažejo na tak potek vrenja. Pri vseh treh fermentacijah so le-to najboljše izvedli vzorci 4, 5 in 6 (dodatek hrana) najslabše pa 10, 11 in 12 (dodatek 2 mg/L Cu^{2+}).

Pri vzorcih 0 (kontroli) se pojavljajo največja odstopanja in največje napake. Pri kontrolnih vzorcih smo to tudi pričakovali. Tukaj je fermentacija komaj začela potekati, nastalo je zelo malo alkohola (povprečno 2,5 vol.%), ostalo pa je veliko ne povretega sladkorja (povprečno nad 100 g/L). pH je pri teh vzorcih tudi nekoliko nižji kot pri drugih. Razlika znaša okoli 0,02.

Vzorcem 1, 2 in 3 smo dodali kvasovke. Vrednosti teh analiz so neko povprečje vseh vrednosti. Vrednost pH je tukaj nekoliko višja (>0,01 razlike) kot pri drugih vzorcih, katerim smo dodali kvasovke. Zanimivost tukaj je, da je samo pri tem vzorcu, pri fermentaciji B, ostalo več reducirajočih sladkorjev kot pri drugih dveh fermentacijah. Pri teh vzorcih je tudi nastalo precej več skupnega SO_2 , v primerjavi z vzorci katerim smo dodali kvasovke in hrano. Povprečno je nastalo 6 mg/L več skupne SO_2 . Glede ostalih meritev so vrednosti sorazmerne med seboj in ni nekih posebnosti.

V vzorce 4, 5 in 6 smo dodali kvasovke in hranilo. Pri teh vzorcih je alkoholna fermentacija potekla najboljše. To se vidi tako iz fermentacijskih krivulj, kot tudi iz drugih analiz. Tu je ostalo najmanj reducirajočih sladkorjev (okoli 1,75 g/L), najmanj je hlapnih kislin (okoli 0,41 g očetne kisline/L), pH (2,966), prostega aminokislinskega dušika (5,09 mg N/L), skupnega SO₂ (okoli 27 mg/L), ... Kljub temu pa ni nastalo dovolj alkohola. Z gotovostjo lahko trdimo, da dodatek hranil pozitivno vpliva na potek fermentacije in tudi samo kakovost mladega vina.

Pri vzorcih 7, 8 in 9 smo moštu dodali kvasovke in 1 mg/L Cu²⁺. Predvidevali smo, da bodo bakrovi ioni zavirali rast kvasovk, kar se je izkazalo za resnično. Kljub temu pa ta koncentracija ionov ni tako velika in zato ni tako velikih razlik, če primerjamo z vzorci 1-3, kjer so bile samo kvasovke. Pri vzorcih z dodanim 1 mg/L Cu²⁺ je ostalo več reducirajočih sladkorjev (približno 1 g/L več) v primerjavi z vzorci, kjer so bile samo kvasovke, ostale vrednosti pa so si zelo podobne med seboj.

V zadnjem sklopu so bili vzorci 10, 11 in 12. Tukaj smo moštu dodali kvasovke in 2 mg/L Cu²⁺. Za te vzorce lahko rečemo, da so imeli najpočasnejšo fermentacijo. Tukaj je ostalo največ reducirajočih sladkorjev (4,5 g/L), nastalo je najmanj alkohola (povprečno 7,80 vol.%), največ je skupnega SO₂ (povprečno 34 mg/L) in najmanj je skupnih kislin (8,20 g/L). Takšna koncentracija bakrovih ionov sicer ni škodljiva, saj je fermentacija vseeno normalno potekla, vendar lahko predvidevamo, da če bi bila koncentracija bakrovih ionov večja bi prišlo do zaustavitve fermentacije.

Na fermentacijo vplivajo tako dodatki, kot izbira seva kvasovke. Pozorni moramo biti torej na obeh področjih, če želimo izvesti najbolj optimalno fermentacijo, da dobimo najbolj kakovostno vino.

7 VIRI

Bavčar D. 2008. Sestavine vina. V: Priročnik za vinarje. Hudoklin S. (ur.). Novo mesto, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod: 27-41

Blanco P., Mirás-Avalos J. M., Pereira E., Orriols I. 2013a. Fermentative aroma compounds and sensory profiles of Godello and Albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast stains. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 93: 2849-2857

Blanco P., Mirás-Avalos J. M., Suárez V., Orriols I. 2013b. Inoculation of Treixadura musts with autochthonous *Saccharomyces cerevisiae* strains: Fermentative performance and influence on the wine characteristics. *Food Science and Technology International* 19: 177-186

Boekhout T., Phaff H. J. 2003. Yeast biodiversity. V: *Yeasts in food: Beneficial and detrimental aspects*. Boekhout T., Robert V. (eds.). Cambridge, Woodhead Publishing Ltd: 1-38

Cavazza A., Guzzon R., Malacarne M., Larcher R. 2013. The influence of the copper content in grape must on alcoholic fermentation kinetics and wine quality. A survey on the performance of 50 commercial Active Dry Yeasts. *Vitis*, 52, 3: 149-155

Čuš F. 2009. Ocena stanja za ostanke bakra v slovenskih vinih in priporočila za njihovo zmanjšanje. Ljubljana, Kmetijski inštitut: 3 str. (interno gradivo)

Fleet G. H., Heard G. M. 1993. Yeasts-growing during fermentation. V: *Wine microbiology and biotechnology*. Fleet G. H. (ed.). Sydney, Harwood Academic Publishers: 27-54

Guillamón J. M., Mas A. 2009. Acetic acid bacteria. V: *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. König H., Uden G., Fröhlich J. (eds.). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 31-46

Holt H., Cozzolino D., McCarthy J., Abrahamse C., Holt S., Solomon M., Smith P., Chamber P. J., Curtin C. 2013. Influence of yeast strain on Shiraz wine quality indicators. *International Journal of Food Microbiology*, 165: 302-311

Hornsey I. 2007. *The chemistry and biology of winemaking*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 457 str.

Hrček L., Korošec-Koruza Z. 1996. Sorte in podlage vinske trte. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas: 191 str.

Hutkins R. W. 2006. Microbiology and technology of fermented foods. Ames, Blackwell Publishing: 473 str.

Jackson R. S. 2014. Wine science principles and applications. 4th ed. San Diego, Elsevier: 960 str.

Jenko M., Baša Česnik H., Vanzo A., Janeš L., Pelengić R., Rusjan D., Čuš F. 2011. Vpliv sevov kvasovk na sestavo in senzorično kakovost vina sorte traminec. V: Vinarski dan 2011. Čuš F. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 25-36

Jenko M., Čuš F., Košmerl T. 2012. Starterske kulture kvasovk kot možnost za izboljšanje senzorične kakovosti vina. V: Vinarski dan 2012. Čuš F. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 15-32

Jug T., Košuta M., Rojc Polanec A., Rusjan D. 2014. Analize grozdja in vina: Analisi dell' uva e del vino. Nova Gorica, KGZS-Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica: 46 str.

Jurana d.o.o. 2011. Lallemend: Selekcionirano iz narave. Katalog podjetja Jurana d.o.o., Maribor: 12 str.

Klenar I. 2002. Ali lahko starterske kulture kvasovk pripomorejo h kakovostni fermentaciji?. V: Pomen mikrobiologije in biotehnologije v proizvodnji vina. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21-28

König H., Fröhlich J. 2009. Lactic acid bacteria. V: Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine. König H., Uden G., Fröhlich J. (eds.). Berlin Heidelberg, Springer-Verlag: 3-30

Konjajev A. 1974. Kvasovke. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 147 str.

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

Košmerl T. 2007b. Vloga vinskih kvasovk med fermentacijo mošta. SAD: Revija za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo, 10: 19-21

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

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

Košmerl T., Francetič V., Prosen H., Gašperlin L. 2011. Fermentacijske lastnosti kvasovk v prisotnosti večjih koncentracij bakrovih ionov v moštu. V: Vinarski dan 2011. Čuš F. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 59-70

Košmerl T. 2013. Vinske kvasovke, hranila in tanini. Košmerl T. Maribor, JURANA d.o.o.: 67 str.

Likar M. 1987. Mikrobiologija (Leksikoni Cankarjeve založbe). Ljubljana, Cankarjeva založba: 390 str.

Liu S. Q. 2012. Flavors and Food Fermentation. V: Handbook of plant-based fermented food and beverage technology. 2nd ed. Hui Y. H. (ed.). Boca Raton, CRC Press Taylor & Francis Group: 23-34

Moreno J., Peinado R. 2012. Enological chemistry. San Diego, Academic Press Elsevier: 429 str.

Mrvčić J., Stanzer D., Stehlik-Tomas V., Škevin D., Grba S. 2007. Optimization of Bioprocess for Production of Copper-Enriched Biomass of Industrially Important Microorganism *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 103, 4: 331-337

Ough C. S., Amerine M. A. 1988. Methods for analysis of must and wine. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons: 377 str.

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

Pravilnik o seznamu geografskih označb za vina in trsnem izboru. 2007. Uradni list Republike Slovenije, 17, 49:6732-6739

Pretorius I. S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast. 16, 8: 675-729

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

Raspor P., Smole-Možina S. 1993. Praktikum iz biotehnologije. Ljubljana, BIA d.o.o.: 148 str.

Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Don`eche B., Lonvaud A. 2006a. Handbook of enology. 2nd ed. Vol. 1: The microbiology of wine and vinifications. Chichester, John Wiley & Sons Ltd: 497 str.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2006b. Handbook of enology. 2nd ed. Vol. 2: The chemistry of wine stabilization and threatments. Chichester, John Wiley & Sons Ltd: 441 str.

Rodríguez-Bencomo J. J., Pozo-Bayón A. M., Moreno-Arribas V. M. 2012. Wine fermentation and production. V: Handbook of plant-based fermented food and beverage technology. 2nd ed. Hui Y. H. (ed.). Boca Raton, CRC Press Taylor & Francis Group: 179-200

Zoecklein B. W., Fugelsang K. C., Gump B. H., Nury F. S. 1995. Wine analysis and production. New York, Chapman & Hall: 179-191

ZAHVALA

Za neverjetno potrpežljivost, hitro odzivnost in veliko pomoč, gre največja zahvala mentorici, prof. dr. Tatjani Košmerl. S svojim strokovnim znanjem, nasveti in veliko mero razumevanja ter podpore je ogromno pripomogla k nastajanju diplomskega dela, za kar se ji iskreno zahvaljujem.

Zahvala gre tudi recenzentki doc. dr. Neža Čadež za strokoven pregled diplome. Posebej bi se tudi zahvalila ga. Zdenki Zupančič, ki je bila v veliko pomoč pri izvedbi vseh analizah v laboratoriju.

Hvala ga. Lini Burka za pomoč pri urejanju in iskanju strokovne literature.

Posebna zahvala pa gre mojima staršema, ki sta mi omogočila študij in me skozi ves čas neverjetno podpirala in mi nudila moralno podporo. Hvala tudi moji sestri, ki me zna vsakič postaviti na realna tla.

PRILOGE

Priloga A: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mošta pred vsako izmed treh fermentacij.

Parameter	Enota	Oznaka vzorca		
		1	2	3
Motnost	NTU	2,129	1,921	2,158
pH	/	3,030	3,072	3,063
Titribilne kisline	g/L	6,66	10,62	7,25
Skupne kisline	g/L	6,89	10,75	7,48
Prosti SO ₂	mg/L	9,31	12,48	8,74
Vezani SO ₂	mg/L	15,30	35,54	17,49
Skupni SO ₂	mg/L	24,61	48,02	26,23
Sladkorna stopnja	°Oe	63,7	114,5	63,0
FAN (4.3.2011)	mg N/L	111,69	199,10	110,01
FAN (8.3.2011)	mg N/L	108,77	198,71	110,20

Priloga B: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina v kontrolnih vzorcih (0) pri vseh treh fermentacijah (spontane fermentacije).

Parameter	Enota	Oznaka fermentacije		
		A	B	C
Masa oddanega CO ₂	g/L	14,48	17,45	6,78
Masa mokre kvasne biomase	g	179,62	178,17	175,55
Masa suhe kvasne biomase	g	1,12	1,01	3,60
Motnost	NTU	1720,09	1462,74	2047,26
pH	/	2,954	2,951	2,965
Titribilne kisline	g/L	6,97	7,72	7,68
Skupne kisline	g/L	7,25	8,06	8,01
Prosti SO ₂	mg/L	2,96	2,90	3,17
Vezani SO ₂	mg/L	29,94	27,00	24,54
Skupni SO ₂	mg/L	32,90	29,90	27,71
Reducirajoči sladkorji	g/L	125,42	78,25	123,67
Relativna gostota	/	1,04398	1,03622	1,05215
Skupni ekstrakt	g/L	101,81	93,86	113,17
Sladkorja prosti ekstrakt	g/L	90,87	86,03	100,02
Alkohol	vol. %	2,63	3,14	1,99
FAN	mg N/L	7,41	14,83	29,84

Priloga C: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina v vzorcih (1-3), katerim smo dodali kvasovke, pri vseh treh fermentacijah.

Parameter	Enota	Oznaka fermentacije		
		A	B	C
Masa oddanega CO ₂	g/L	53,08	60,92	63,75
Masa mokre kvasne biomase	g	176,62	161,43	165,08
Masa suhe kvasne biomase	g	1,07	1,09	1,09
Motnost	NTU	199,84	63,35	175,34
pH	/	2,962	2,973	2,998
Titribilne kisline	g/L	7,68	8,59	8,40
Skupne kisline	g/L	7,97	8,92	8,71
Prosti SO ₂	mg/L	3,49	3,71	4,55
Vezani SO ₂	mg/L	32,67	27,36	28,99
Skupni SO ₂	mg/L	36,16	31,07	33,54
Reducirajoči sladkorji	g/L	2,53	4,30	3,30
Relativna gostota	/	1,00595	0,99614	0,99582
Skupni ekstrakt	g/L	41,42	18,84	18,80
Sladkorja prosti ekstrakt	g/L	38,89	14,54	15,50
Alkohol	vol. %	7,23	8,04	8,33
Hlapne kisline	g/L	0,47	0,44	0,50
FAN	mg N/L	9,82	6,36	4,57

Priloga D: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina v vzorcih (4-6), katerim smo dodali kvasovke in hrano, pri vseh treh fermentacijah.

Parameter	Enota	Oznaka fermentacije		
		A	B	C
Masa oddanega CO ₂	g/L	60,15	61,90	64,53
Masa mokre kvasne biomase	g	182,85	165,06	169,65
Masa suhe kvasne biomase	g	1,10	1,01	1,17
Motnost	NTU	221,96	108,17	241,58
pH	/	2,954	2,961	2,983
Titribilne kisline	g/L	7,75	8,51	8,52
Skupne kisline	g/L	8,05	8,80	8,81
Prosti SO ₂	mg/L	4,44	4,40	4,66
Vezani SO ₂	mg/L	28,99	18,31	20,52
Skupni SO ₂	mg/L	33,43	22,71	25,18
Reducirajoči sladkorji	g/L	1,57	1,73	1,95
Relativna gostota	/	1,00000	0,99518	0,99529
Skupni ekstrakt	g/L	28,58	16,46	17,44
Sladkorja prosti ekstrakt	g/L	27,01	14,73	15,49
Alkohol	vol. %	7,98	8,14	8,34
Hlapne kisline	g/L	0,49	0,31	0,42
FAN	mg N/L	5,64	5,89	3,74

Priloga E: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina v vzorcih (7-9), katerim smo dodali kvasovke in 1 mg/L Cu^{2+} , pri vseh treh fermentacijah.

Parameter	Enota	Oznaka fermentacije		
		A	B	C
Masa oddanega CO_2	g/L	51,28	64,08	64,52
Masa mokre kvasne biomase	g	172,09	164,75	175,35
Masa suhe kvasne biomase	g	0,97	0,98	0,93
Motnost	NTU	127,60	72,32	159,10
pH	/	2,962	2,976	2,993
Titribilne kisline	g/L	7,65	8,20	8,39
Skupne kisline	g/L	7,95	8,53	8,69
Prosti SO_2	mg/L	3,28	3,94	4,34
Vezani SO_2	mg/L	31,53	25,38	29,83
Skupni SO_2	mg/L	34,81	29,32	34,17
Reducirajoči sladkorji	g/L	5,95	4,15	2,68
Relativna gostota	/	1,00784	0,99619	0,99568
Skupni ekstrakt	g/L	45,54	19,06	18,80
Sladkorja prosti ekstrakt	g/L	39,59	14,91	16,12
Alkohol	vol. %	6,99	8,13	8,45
Hlapne kisline	g/L	0,53	0,43	0,43
FAN	mg N/L	10,50	5,55	3,99

Priloga F: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina v vzorcih (10-12), katerim smo dodali kvasovke in 2 mg/L Cu^{2+} , pri vseh treh fermentacijah.

Parameter	Enota	Oznaka fermentacije		
		A	B	C
Masa oddanega CO_2	g/L	52,38	59,63	63,73
Masa mokre kvasne biomase	g	161,62	161,47	172,56
Masa suhe kvasne biomase	g	1,02	1,06	1,00
Motnost	NTU	121,81	80,27	144,44
pH	/	2,962	2,976	2,991
Titribilne kisline	g/L	7,57	8,04	8,14
Skupne kisline	g/L	7,85	8,36	8,36
Prosti SO_2	mg/L	3,07	4,29	4,34
Vezani SO_2	mg/L	33,64	25,96	29,94
Skupni SO_2	mg/L	36,71	30,25	34,29
Reducirajoči sladkorji	g/L	6,40	3,73	3,55
Relativna gostota	/	1,00676	0,99614	0,99597
Skupni ekstrakt	g/L	42,96	18,53	19,12
Sladkorja prosti ekstrakt	g/L	36,56	14,80	15,57
Alkohol	vol. %	7,07	8,00	8,32
Hlapne kisline	g/L	0,47	0,51	0,46
FAN	mg N/L	9,65	6,05	3,90

Priloga G: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina pri fermentaciji A, v vseh paralelkah.

0: kontrola, 1-3: dodane kvasovke, 4-6: dodane kvasovke in hrana, 7-9: dodane kvasovke in 1 mg/L Cu^{2+} , 10-12: dodane kvasovke in 2 mg/L Cu^{2+}

Parameter	Enota	Oznaka paralelke				
		0	1-3	4-6	7-9	10-12
Masa oddanega CO_2	g/L	14,48	53,08	60,15	51,28	52,38
Masa mokre kvasne biomase	g	179,62	176,62	182,85	172,09	161,62
Masa suhe kvasne biomase	g	1,12	1,07	1,10	0,97	1,02
Motnost	NTU	1720,09	199,84	221,96	127,60	121,81
pH	/	2,954	2,962	2,954	2,962	2,962
Titribilne kisline	g/L	6,97	7,68	7,75	7,65	7,57
Skupne kisline	g/L	7,25	7,97	8,05	7,95	7,85
Prosti SO_2	mg/L	2,96	3,49	4,44	3,28	3,07
Vezani SO_2	mg/L	29,94	32,67	28,99	31,53	33,64
Skupni SO_2	mg/L	32,90	36,16	33,43	34,81	36,71
Reducirajoči sladkorji	g/L	125,42	2,53	1,57	5,95	6,40
Relativna gostota	/	1,04398	1,00595	1,00000	1,00784	1,00676
Skupni ekstrakt	g/L	101,81	41,42	28,58	45,54	42,96
Sladkorja prosti ekstrakt	g/L	90,87	38,89	27,01	39,59	36,56
Alkohol	vol. %	2,63	7,23	7,98	6,99	7,07
Hlapne kisline	g/L	/	0,47	0,49	0,53	0,47
FAN	mg N/L	7,41	9,82	5,64	10,50	9,65

Priloga H: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina pri fermentaciji B, v vseh paralelkah.

0: kontrola, 1-3: dodane kvasovke, 4-6: dodane kvasovke in hrana, 7-9: dodane kvasovke in 1 mg/L Cu^{2+} , 10-12: dodane kvasovke in 2 mg/L Cu^{2+}

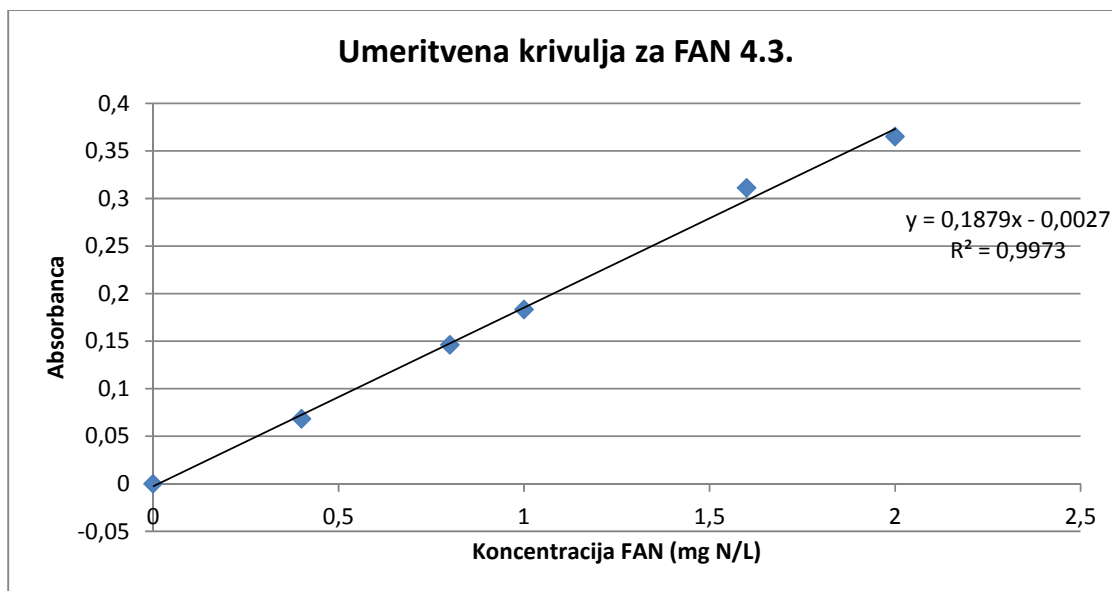
Parameter	Enota	Oznaka paralelke				
		0	1-3	4-6	7-9	10-12
Masa oddanega CO_2	g/L	17,45	60,92	61,90	64,08	59,63
Masa mokre kvasne biomase	g	178,17	161,43	165,06	164,75	161,47
Masa suhe kvasne biomase	g	1,01	1,09	1,01	0,98	1,06
Motnost	NTU	1462,74	63,35	108,17	72,32	80,27
pH	/	2,951	2,973	2,961	2,976	2,976
Titribilne kisline	g/L	7,72	8,59	8,51	8,20	8,04
Skupne kisline	g/L	8,06	8,92	8,80	8,53	8,36
Prosti SO_2	mg/L	2,90	3,71	4,40	3,94	4,29
Vezani SO_2	mg/L	27,00	27,36	18,31	25,38	25,96
Skupni SO_2	mg/L	29,90	31,07	22,71	29,32	30,25
Reducirajoči sladkorji	g/L	78,25	4,30	1,73	4,15	3,73
Relativna gostota	/	1,03622	0,99614	0,99518	0,99619	0,99614
Skupni ekstrakt	g/L	93,86	18,84	16,46	19,06	18,53
Sladkorja prosti ekstrakt	g/L	86,03	14,54	14,73	14,91	14,80
Alkohol	vol. %	3,14	8,04	8,14	8,13	8,00
Hlapne kisline	g/L	/	0,44	0,31	0,43	0,51
FAN	mg N/L	14,83	6,36	5,89	5,55	6,05

Priloga I: Rezultati fizikalno-kemijskih analiz mladega vina pri fermentaciji C, v vseh paralelkah.

0: kontrola, 1-3: dodane kvasovke, 4-6: dodane kvasovke in hrana, 7-9: dodane kvasovke in 1 mg/L Cu^{2+} , 10-12: dodane kvasovke in 2 mg/L Cu^{2+}

Parameter	Enota	Oznaka paralelke				
		0	1-3	4-6	7-9	10-12
Masa oddanega CO_2	g/L	6,78	63,75	64,53	64,52	63,73
Masa mokre kvasne biomase	g	175,55	165,08	169,65	175,35	172,56
Masa suhe kvasne biomase	g	3,60	1,09	1,17	0,93	1,00
Motnost	NTU	2047,26	175,34	241,58	159,10	144,44
pH	/	2,965	2,998	2,983	2,993	2,991
Titribilne kisline	g/L	7,68	8,40	8,52	8,39	8,14
Skupne kisline	g/L	8,01	8,71	8,81	8,69	8,36
Prosti SO_2	mg/L	3,17	4,55	4,66	4,34	4,34
Vezani SO_2	mg/L	24,54	28,99	20,52	29,83	29,94
Skupni SO_2	mg/L	27,71	33,54	25,18	34,17	34,29
Reducirajoči sladkorji	g/L	123,67	3,30	1,95	2,68	3,55
Relativna gostota	/	1,05215	0,99582	0,99529	0,99568	0,99597
Skupni ekstrakt	g/L	113,17	18,80	17,44	18,80	19,12
Sladkorja prosti ekstrakt	g/L	100,02	15,50	15,49	16,12	15,57
Alkohol	vol. %	1,99	8,33	8,34	8,45	8,32
Hlapne kisline	g/L	/	0,50	0,42	0,43	0,46
FAN	mg N/L	29,84	4,57	3,74	3,99	3,90

Priloga J: Umeritvena krivulja za določanje prostega aminokislinskega dušika (FAN) za datum 4.3.2011.



Priloga K: Umeritvena krivulja za določanje prostega aminokislinskega dušika (FAN) za datum 8.3.2011.

