

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Božo ČEH

**FERMENTACIJSKE LASTNOSTI *Saccharomyces* IN
NE-*Saccharomyces* VINSKIH KVASOVK**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**FERMENTATION CHARACTERISTICS OF *Saccharomyces* AND
NON- *Saccharomyces* WINE YEASTS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

POPRAVKI (Corrigenda/Errata)

-str. 34, vrstica 1: namesto **4 REZULTATI** beri **4 REZULTATI Z DISKUSIJO**

-str. 54, manjka:
4.4 DISKUSIJA

Glede na to, ali je bila uporabljena kvasovka rodu *Saccharomyces* ali ne-*Saccharomyces*, so opazne razlike predvsem pri senzorični analizi vzorcev vina, kjer se je pokazalo, da je kombinirana uporaba kvasovk rodu *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces*, kot tudi uporaba samostojne starterske kulture kvasovk ne-*Saccharomyces*, doprinesla k boljši skupni senzorični oceni kot pri vzorcih vina, ki sta bila pridelana samo z dodatkom kvasovke vrste *Saccharomyces*. Od te ugotovitve odstopa vzorec vina, ki je bil pridelan s kombinacijo vrst kvasovk *Saccharomyces* in ne-*Saccharomyces* v posodi iz nerjavnega jekla, ki je dobil najnižjo skupno senzorično oceno. Ta vzorec je proti koncu fermentacije postal reduktiven (prisotnost H₂S), kar je negativno vplivalo na senzorične lastnosti vina; to je tudi razlog za slabšo skupno senzorično oceno.

Pri primerjanju vpliva fermentacijske posode na dobljene rezultate smo opazili razlike v vrednosti pH, ki je bila v vzorcih vina, pridelanih v posodi iz nerjavnega jekla, višja kot v lesenem sodu. Obratne, vendar manj značilne razlike, smo opazili pri vsebnosti skupnih in titrabilnih kislin, kjer je bila vsebnost kislin v posodi iz nerjavnega jekla nižja kot v leseni posodi. Opazna je bila nižja motnost vzorcev vina iz lesene posode v primerjavi z vzorcema vina, pridelanima v posodi iz nerjavnega jekla. Pozitiven vpliv lesene posode se kaže pri skupni senzorični oceni vzorcev vina, še bolj pride do izraza ta pozitiven trend ocen pri senzoričnem ocenjevanju z opisno metodo.

Z rezultati poskusa smo uspeli potrditi naše delovne hipoteze o vplivu uporabe različnih vrst kvasovk na kinetiko fermentacije, oblikovanje, kakovost in kvantiteto fermentacijskih arom, na osnovne fizikalno-kemijske parametre in sintezo aromatičnih snovi, kar skupaj vodi do zaznavnih razlik pri senzorični analizi.

Predvidevali smo, da v moštu, kjer je bila dodana čista kultura kvasovke vrste *Torulaspora delbrueckii*, fermentacija ne bo potekla do konca, zaradi njene manjše fermentacijske sposobnosti v primerjavi s kvasovkami rodu *Saccharomyces*. Rezultati analize kažejo, da je fermentacija potekla praktično do konca, saj je ostalo le 4,3 g/L reducirajočih sladkorjev.

Rezultati senzorične analize so potrdili tudi delovno hipotezo, da bo fermentacijska posoda imela vpliv na karakter vina in s tem na razlike pri senzorični analizi.

-str. 56, manjka sklep:

- Uporaba lesene fermentacijske posode je v kombinaciji z uporabo kvasovk vrst ne-*Saccharomyces* prispevala k boljši skupni senzorični oceni tako pridelanega vina.

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v vinski kleti P&F Jeruzalem Ormož d.o.o. in v laboratorijih Katedre za tehnologije, prehrano in vino na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Tatjana Košmerl in za recenzentko izr. prof. dr. Polona Jamnik.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Košmerl

Recenzentka: izr. prof. dr. Polona Jamnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Podpisani izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Božo Čeh

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 663.221:582.282.23:663.252.4:543.92(043)=163.6
KG	šipon / mošt / vinske kvasovke / <i>Saccharomyces</i> / ne- <i>Saccharomcyes</i> / alkoholna fermentacija / vino / fizikalnokemijske lastnosti / senzorične lastnosti
AV	ČEH, Božo
SA	KOŠMERL, Tatjana (mentorica) / JAMNIK, Polona (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	FERMENTACIJSKE LASTNOSTI <i>Saccharomyces</i> IN NE- <i>Saccharomyces</i> VINSKIH KVASOVK
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 60 str., 2 pregl., 19 sl., 1 pril., 32 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Kot tradicionalno vinsko kvasovko poznamo vrsto <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , ki je tudi ena od mnogih naravno prisotnih vrst na sami grozdni jagodi. Dejstvo je, da je kvasovka vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na grozdju v manjšini ali je celo odsotna, saj tam prevladujejo kvasovke rodov ne- <i>Saccharomyces</i> , t.im. divje kvasovke, ki tudi vedno začnejo spontano alkoholno fermentacijo mošta. Namen diplomskega dela je bil ugotoviti, kako izbira vrste/rodu kvasovke ter fermentacijske posode vpliva na fizikalno-kemijske parametre in predvsem na senzorično kakovost pridelanega vina. Za poskus smo uporabili komplet kvasovk s komercialnim imenom LEVEL 2TD, ki vsebuje dve različni kvasovk. Najprej se uporabi kvasovka vrste <i>Torulaspora delbrueckii</i> , najkasneje v roku 72 ur pa se doda še kvasovka vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , ki je sposobna zaključiti fermentacijo. S tem v bistvu nadzorovano posnemamo spontano alkoholno fermentacijo. Za primerjavo smo fermentirali enak mošt s kvasovko Zymaflore VL3 in čisto kulturo kvasovke vrste <i>Torulaspora delbrueckii</i> . Dva meseca po končani alkoholni fermentaciji smo opravili fizikalno-kemijske in tudi senzorične analize. Pri rezultatih fizikalno-kemijskih analiz nismo zasledili značilnih odstopanj. Pričakovano več razlik se je pokazalo pri senzorični analizi, kjer sta po kakovosti izstopala dva vzorca, prvi je bil pridelan s kombinacijo kvasovk, pri drugem pa je bila uporabljena samo kvasovka vrste <i>Torulaspora delbrueckii</i> .

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 663.221:582.282.23:663.252.4:543.92(043)=163.6

CX Šipon / musts / wine yeasts / *Saccharomyces* / non-*Saccharomcyes* / alcoholic fermentation / wines / physico-chemical properties / sensory properties

AU ČEH, Božo

AA KOŠMERL, Tatjana (supervisor) / JAMNIK, Polona (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology

PY 2016

TI FERMENTATION CHARACTERISTICS OF *Saccharomyces* AND NON-*Saccharomyces* WINE YEASTS

DT Graduation thesis (University studies)

NO XI, 60 p., 2 tab., 19 fig., 1 ann., 32 ref.

LA si

AL si/en

AB *Saccharomyces cerevisiae* is known as traditional wine yeast, which is also one of many naturally present yeasts on grapes, but present in minority or even absence. That is why the majority - non-*Saccharomyces* yeast, known also as wild yeast, always set-off sponateous alcoholic fermentation of grape must. The aim of graduation thesis was to investigate how different wine yeast starter cultures and fermentation cask affect the physico-chemical parameters and mostly the sensoric properties of produced wine. In the experiment we used a mixture of wine yeast, commercially known as LEVEL 2TD, which contains two strains of wine yeast. First we used *Torulaspora delbrueckii*, and in the next 72 hours, we added *Saccharomyces cerevisiae*, which is capable of finishing the fermentation. That is how we mimic spontaneous alcoholic fermentation in controlled circumstances. For comparison we seperatedly fermented the must with Zymaflore VL3 yeast and pure culture of *Torulaspora delbrueckii*. Two months after the completion of alcoholic fermentation we conducted physico-chemical and sensory analysis of the wine samples. There were no significant differences in physico-chemical parameters among the wine samples. In sensory analysis there were significant differences in favour of two added yeast starters. First was the yeast LEVEL 2TD and the second was the non-*Saccharomyces* yeast *Torulaspora delbrueckii*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	4
2 PREGLED OBJAV	5
2.1 SORTA ŠIPON	5
2.2 GROZDJE IN GROZDNI MOŠT	7
2.2.1 Sladkorji	8
2.2.2 Kisline	8
2.2.3 Dušikove spojine	9
2.2.4 Vitamini in minerali	10
2.3 ALKOHOLNA FERMENTACIJA	11
2.3.1 Metabolizem sladkorjev	12
2.3.2 Metabolizem dušika	13
2.4 LASTNOSTI VINSKIH KVASOVK	15
2.4.1 Splošno o kvasovkah	15
2.4.2 Vinska kvasovka vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2.4.2.1 Ekološke in metabolne lastnosti kvasovk	16
2.4.3 Kvasovka <i>Torulaspora delbrueckii</i>	17
2.5 DODATEK KVASNEGA NASTAVKA	18
2.5.1 Priprava aktivne starterske kulture	19
2.5.2 Faza rehidracije	19
2.5.3 Inokulacija starterskih kultur	19

2.5.3.1	Preprečitev temperaturnega šoka.....	19
2.5.3.2	Zagotovitev potrebnih hranil	20
2.5.3.3	Dodatne zahteve oziroma priporočila.....	20
2.6	AROMATIČNE SNOVI V VINU	21
2.6.1	Klasifikacija aromatičnih spojin	22
2.6.1.1	Primarna aroma vina.....	22
2.6.1.2	Fermentacijska aroma.....	24
3	MATERIAL IN METODE DELA.....	27
3.1	ZASNOVA POSKUSA.....	27
3.2	MATERIAL	28
3.2.1	Mošt	28
3.2.2	Starterske kulture.....	28
3.2.3	Hranila za kvasovke	29
3.3	METODE DELA.....	29
3.3.1	Nastavitev fermentacijskega poskusa	29
3.3.2	Fizikalno-kemijske analize mošta in vina.....	29
3.3.2.1	Določanje žveplovega dioksida v vinu po Ripperju.....	30
3.3.2.2	Določanje pH mošta in vina	30
3.3.2.3	Določanje skupnih (titrabilnih) kislin v vinu.....	30
3.3.2.4	Določanje reducirajočih sladkorjev v vinu po Rebeleinu.....	31
3.3.2.5	Določanje relativne gostote, ekstrakta in alkohola v vinu.....	31
3.3.2.6	Določanje hlapnih kislin v vinu.....	32
3.3.2.7	Določanje sladkorja prostega ekstrakta	32
3.3.2.8	Določanje motnosti.....	32
3.3.3	Senzorična analiza	33
3.3.3.1	Organoleptično ocenjevanje vina	33
4	REZULTATI.....	34
4.1	REZULTATI ANALIZ MOŠTA	34
4.2	REZULTATI ANALIZ VINA	34
4.2.1	Rezultati merjenja žveplovega dioksida (SO₂).....	35
4.2.2	Rezultati merjenja vrednosti pH.....	36
4.2.3	Rezultat merjenja skupnih kislin	37

4.2.4	Rezultati merjenja hlapnih kislin.....	39
4.2.5	Rezultati merjenja reducirajočih sladkorjev	40
4.2.6	Rezultati merjenja alkohola	41
4.2.7	Rezultati merjenja relativne gostote vina.....	43
4.2.8	Rezultati merjenja relativne gostote alkoholnega destilata.....	44
4.2.9	Rezultati merjenja skupnega ekstrakta.....	44
4.2.10	Rezultati merjenja sladkorja prostega ekstrakta.....	45
4.2.11	Rezultati merjenja motnosti	46
4.2.12	Vpliv fermentacijske posode na dobljene rezultate fizikalno-kemijskih analiz vina.....	47
4.3	REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE VINA	48
4.3.1	Rezultati senzoričnega ocenjevanje po Buxbaumovi metodi.....	49
4.3.2	Rezultati senzoričnega ocenjevanje z opisno metodo.....	51
5	SKLEPI IN POVZETEK.....	55
5.1	SKLEPI.....	55
5.2	POVZETEK	56
6	VIRI	58
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk (Košmerl, 2007).....	16
Preglednica 2: Rezultati analiz mošta pred fermentacijo	34

KAZALO SLIK

Slika 1: Število trsov prvih petih sort oziroma vin v vinorodnem okolišu Štajerska Slovenija (RPGV, 2015).....	6
Slika 2: Površina vinogradov (ha), zasajenih s prvimi petimi sortami v vinorodnem okolišu Štajerska Slovenija (RPGV, 2015)	6
Slika 3: Shematski prikaz poteka poskusa.....	27
Slika 4a: Primerjava vsebnosti prostega in skupnega SO ₂ (mg/L) v vinih sorte šipon	35
Slika 4b: Razmerje med vsebnostjo prostega in vezanega SO ₂ (mg/L) v vinih sorte šipon	36
Slika 5: Vrednosti pH v vinih sorte šipon	37
Slika 6a: Vsebnost titrabilnih kislin (g/L) v vinih sorte šipon.....	38
Slika 6b: Vsebnost skupnih kislin (g/L) v vinih sorte šipon	38
Slika 7: Vsebnost hlapnih kislin (g/L) v vinih sorte šipon	40
Slika 8: Vsebnost reducirajočih sladkorjev (g/L) v vinih sorte šipon	41
Slika 9a: Vsebnost dejanskega alkohola (vol. %) v vinih sorte šipon.....	42
Slika 9b: Vsebnost potencialnega alkohola (vol. %) v vinih sorte šipon	42
Slika 10: Relativna gostota vin sorte šipon	43
Slika 11: Relativna gostota alkoholnih destilatov vin sorte šipon.....	44
Slika 12: Vsebnost skupnega ekstrakta (g/L) v vinih sorte šipon	45
Slika 13: Vsebnosti sladkorja prostega ekstrakta (g/L) v vinih sorte šipon	46
Slika 14: Motnost (NTU) vzorcev vin sorte šipon	47
Slika 15: Senzorična ocena vzorcev vin sorte šipon po Buxbaumovi metodi, z ločenim prikazom ovrednotenja posameznega parametra.....	49
Slika 16: Skupna senzorična ocena vin sorte šipon, ocenjenih po Buxbaumovi metodi	51
Slika 17: Prikaz intenzivnosti sadnega vonja vina z ocenami 1 do 5, kjer 1 pomeni najmanj in 5 najbolj sadno intenzivno.....	52
Slika 18: Prikaz kompleksnosti aromatičnosti vina z ocenami 1 do 5 točk, kjer 1 pomeni najmanj in 5 najbolj kompleksno aromatičnost	53
Slika 19: Prikaz polnosti vina od 1 do 5 točk, kjer 1 pomeni najmanjšo in 5 največjo polnost	54

KAZALO PRILOG

Priloga A: Izračun masne koncentracije skupnega suhega ekstrakta (g/L) iz relativne gostote dSE pri 20 °C (Košmerl in Kač, 2007)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

°Oe	Oechslejeva stopinja (enota sladkorne stopinje mošta)
AF	alkoholna fermentacija
FAN	prosti aminokislinski dušik (ang. Free Amino Nitrogen)
s.o.	standardni odklon
SPE	sladkorja prosti ekstrakt
SE	skupni ekstrakt

1 UVOD

Kako pridelati kakovostno vino? To je vprašanje in vsakoletni izziv, pred katerega so postavljeni pridelovalci vina. Če jim je dano, da posedujejo enkratne vinogradniške lege, na katerih imajo posajene pravilno izbrane sorte in klone, imajo srečo s pomladansko pozebo, primernim vremenom v času cvetenja in dozorevanja, da jih je toča zaobšla in jim je do trgatve uspelo ohraniti zdravo grozdje, ga ročno pobrati v optimalni zrelosti, ki jo potrebujejo za njihov stil vina in so to grozdje čim hitreje pripeljali do kleti, ga kakovostno predelati do grozdnega mošta, so šele na dobri poti, da bodo pridelali kakovostno vino. Velja namreč, da vino ne more biti boljše, kot je samo grozdje, ker se samo iz odličnega grozdja da pridelati odlično vino. Odločilen proces v pridelavi vina, ki se odvija v vinski kleti in je odgovoren za nastanek in pretvorbo cele množice spojin, ki nam kot celota dajo vino, je alkoholna fermentacija grozdnega mošta (Nemanič, 2006).

Osnovna, glavna pot alkoholne fermentacije, je pretvorba grozdnega sladkorja v alkohol in ogljikov dioksid, kar nam omogočijo kvasovke (Košmerl, 2007).

Fermentacija je lahko spontana ali vodena. Spontana fermentacija pomeni, da mikroflori, ki je bila prisotna na grozdju in je posledično prisotna tudi v moštu, dovolimo, da začne fermentacijo, kar je lahko za vinarja zelo tvegana poteza, ker ne more zagotovo vedeti, katere kvasovke in v kakšnih koncentracijah so prisotne in katere bodo dejansko zaključile, če sploh, samo fermentacijo. Grozdje namreč prinese s sabo zelo pestro mikrofloro, ki je odvisna tudi od zrelosti, uporabe fungicidov v času rasti, dozorevanja in tik pred trgatvijo, zdravstvenega stanja grozdja, podnebja in drugih vinogradniških praks (Bavčar, 2013).

Med temi avtohtono prisotnimi kvasovkami prevladujejo rodovi ne-*Saccharomyces* t.i. divjih kvasovk, ki so jih do nedavnega šteli tudi med kvarljivce. Sem spadajo zlasti vrste iz rodov *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia* in *Torulaspora* (Bisson, 1999). Te kvasovke, razen rod *Torulaspora*, lahko dosežejo končno koncentracijo celo 10^6 - 10^8 CFU/mL, preden odmrejo zaradi njihove občutljivosti na povečano koncentracijo alkohola. Najdemo tudi takšne z oksidativnim metabolizmom (rod *Rhodotorula*) in druge. Njihova sposobnost fermentacije je omejena s koncentracijo

alkohola, ko le-ta doseže 4 do 5 vol.%, te kvasovke niso več zmožne nadaljevati fermentacije. Potem začnejo glavno vlogo prevzemati kvasovke rodu *Saccharomyces*, ki so sposobne zaključiti fermentacijo, to pomeni, da praktično vse fermentabilne sladkorje, ki so na razpolago, tudi izkoristijo, vendar to ni nujno. Zanimivo je to, da je prisotnost glavne vinske kvasovke (vrste *Saccharomyces cerevisiae*) na grozdju in posledično v moštu zelo majhna, včasih je celo odsotna. Njihovo število je običajno manjše kot 10 CFU/mL. Po naravni poti pride v mošt preko stika s kletarsko opremo, kjer je najbolj dominantna vrsta kvasovk, ki kolonizira površine v kleti (Pretorius, 2000).

Pri idealnem poteku spontane fermentacije, ko pozneje prevzamejo vodilno vlogo vinske kvasovke in fermentacijo tudi dokončajo, lahko dobimo zelo kompleksna, polna, bogata, sadna in zaokrožena vina (Soden in sod., 2000; Magyar in Tóth 2011; Fia in sod., 2005; Moreira in sod., 2005), vendar je veliko več možnosti, da gre fermentacija v neželeno smer in tvorbo povečanih koncentracij očetne kisline, etilnih estrov očetne kisline, žveplovodikov, vinil in etilfenolov, priokusov, lahko pa pride celo do zaustavitve fermentacije (Ciani in sod., 2010; Romano in sod., 1995).

Zaradi preveč neznank in tveganj, ki so prisotna pri spontanah fermentacijah, zaradi večjega vpliva, lažjega predvidevanja in boljšega nadzora nad potekom fermentacije in standardizacijo kakovosti vina, se v praksi močno priporoča in tudi uporablja dodatek čiste kulture ali čistih kultur preizkušenih, selekcioniranih kvasovk, ki imajo dobre fermentacijske lastnosti, za katere je znano, da tvorijo majhne količine neželenih snovi in so splošno znane kot varne za uporabo v živilski industriji. Najpogosteje se uporabljajo suhe aktivne kvasovke, ki so enostavne za uporabo in s katerimi lahko dosežemo prevlado nad avtohtonimi kvasovkami (Bavčar, 2013).

Kvasovke poleg glavnih dveh produktov, etanola in ogljikovega dioksida, preko svojega metabolizma sintetizirajo in pretvarjajo še veliko drugih spojin, ki pomembno prispevajo k vonju, aromi in okusu vina. Med te sekundarne metabolite, ki vinarje še posebej zanimajo, sodijo tioli, estri, glicerol, višji alkoholi, dioli, razne kisline, aldehidi in ketoni. Glede na to, da imajo različne kvasovke zelo različen potencial tvorbe sekundarnih metabolitov ter encimski potencial za pretvorbo in sproščanje aromatičnih snovi iz grozdnega mošta, je

zelo pomembna izbira kvasovk za fermentacijo. Na izbiro kvasovke najbolj vpliva stil vina, ki ga želimo poudariti, seveda pa tudi sorta in zrelost grozdja. Za bolj kompleksna vina s stališča hlapnih aromatičnih spojin, je morda smiselno, da uporabimo mešano kulturo kvasovk, kjer ima vsaka zelo različno razmerje končnih sekundarnih produktov (Košmerl, 2007).

Zaradi tako velike pomembnosti izbire kvasovk na skupno kakovost vina, smo naredili fermentacijski poskus, kjer smo uporabili mošt sorte šipon. Pozorni smo bili na kinetiko fermentacije, osnovne fizikalno-kemijske parametre in na končno senzorično kakovost mladega vina, ki smo ga tako pridelali. Grozdje za poskus prihaja iz vinorodne dežele Podravje, okoliša Štajerska Slovenija, natančneje iz podokoliša Ljutomer-Ormož. Praktični del poskusa je potekal v vinski kleti P&F Jeruzalem Ormož d.o.o..

1.1 NAMEN DELA

Za pridelavo vina z določenimi senzoričnimi lastnostmi je poznavanje delovanja določene kvasovke in s tem pogojena izbira prave kvasovke izrednega pomena. S primerjalnim fermentacijskim poskusom smo želeli raziskati, kako bo uporaba različnih kvasovk in fermentacijske posode vplivala na kinetiko fermentacije, osnovne fizikalno-kemijske parametre, sintezo in sproščanje aromatičnih spojin in predvsem na končno senzorično kakovost tako pridelanega vina.

S pomočjo fizikalno-kemijskih parametrov in senzorične analize smo ugotavljali vplive različnih kvasovk in kombinacij na kakovostne parametre pridelanega vina. Ugotavljali smo, kako se razlikuje vino pridelano s kompletom kvasovk LEVEL 2 (*Torulaspora delbrueckii* in *Saccharomyces cerevisiae*) od vina pridelanega s kvasovko VL3 (*Saccharomyces cerevisiae*) in vina, ki je pridelano samo z dodatkom čiste kulture kvasovk vrste *Torulaspora delbrueckii*.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da bo uporaba različnih kvasovk različno vplivala na kinetiko fermentacije, oblikovanje, kakovost in kvantiteto fermentacijskih arom, na osnovne fizikalno-kemijske parametre in sintezo aromatičnih snovi, kar bo skupaj doprineslo do zaznavnih razlik, ki se bodo odražale pri senzorični analizi.

Menimo, da pri moštu, kjer bomo dodali čisto kulturo kvasovk vrste *Torulaspora delbrueckii*, fermentacija ne bo potekla do konca.

Prav tako pričakujemo vpliv fermentacijske posode na karakter vina in s tem na razlike pri senzorični analizi.

2 PREGLED OBJAV

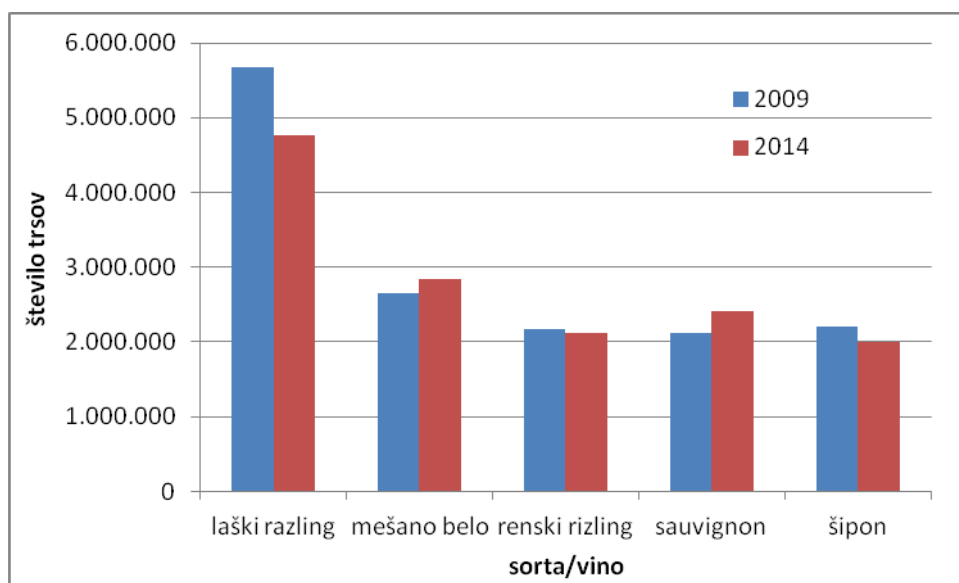
2.1 SORTA ŠIPON

Sinonimi za šipon so Moslavac in Pošip na Hrvaškem, Furmint na Madžarskem, v Avstriji ga imenujejo Malnik (Nemanič, 2006). Pravijo mu tudi Mehlweis, Zapfner, Luttenberger, pošip, moslavec, mozler, mozlec, stari mozel ...

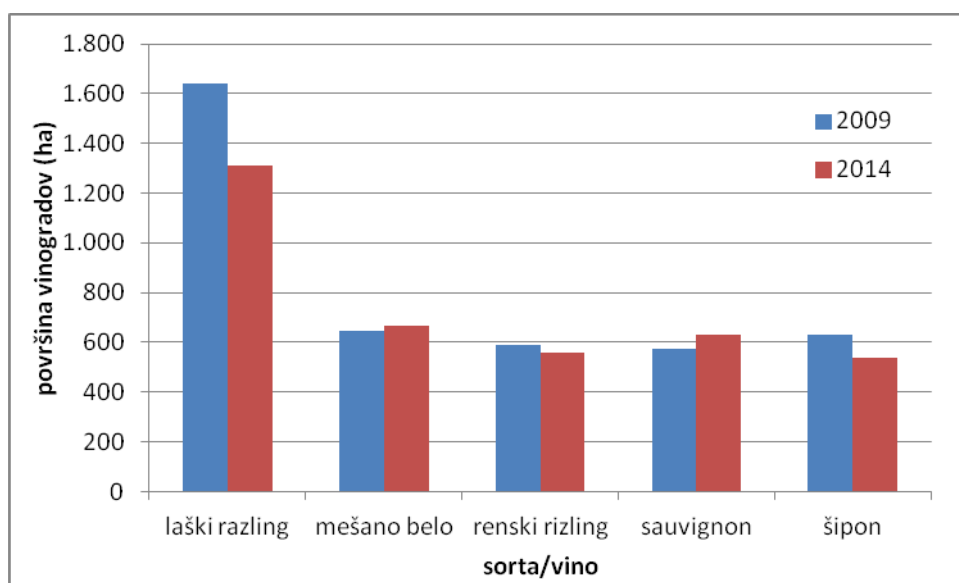
Številna in različna imena za današnjo vinsko trto sorte 'Šipon' potrjujejo, da je bila ta trta razširjena že v daljni preteklosti v naših in sosednjih pokrajinah. Spada v zahodnoevropsko skupino sort Proles pontica. Teorij o nastanku imena je več, ena od njih pravi, da je prvotno ime za šipon bilo »Fiore monti«, od tod tudi ime Furmint, kakor ga danes imenujejo na Madžarskem (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

Pred več sto leti je bila sorta 'Šipon' najbolj razširjena sorta na Štajerskem in je že takrat dajala prvovrstna vina. Vina sorte šipon so hvalili kot najzlahtnejšo kapljico na Slovenskem že leta 1678 (Zafošnik, 1995).

V okolišu Štajerska Slovenija je posajenih okoli 2.000.000 trsov sorte 'Šipon', kar jo uvršča na peto mesto po zastopanosti (RPGV, 2015). V zadnjih letih opazimo, da se zmanjšuje število trsov sorte 'Šipon' (slika 1). Trend upadanja se kaže tudi pri površinah vinogradov, zasajenih s sorto 'Šipon' (slika 2).



Slika 1: Število trsov prvih petih sort oziroma vin v vinorodnem okolišu Štajerska Slovenija (RPGV, 2015)



Slika 2: Površina vinogradov (ha), zasajenih s prvimi petimi sortami v vinorodnem okolišu Štajerska Slovenija (RPGV, 2015)

List je velik, okroglast, tridelen ali celo cel. Listni sinus ima obliko lire ali pa je preklopljen. Površina lista je gladka, spodnja stran je kosmata, kar je najznačilnejši znak porekla sorte. List je na zgornji strani temnozeleno barve, na spodnji strani pa sivkasto zelen. Listne žile so zelene, zobci pa kar precej ostri. Listni pecelj je srednje dolg in

rdečkaste barve. Grozd je največkrat srednje velik, tudi velik in podolgovat, neenako nabit in velikokrat vejnat. Grozdni pecelj je kratek in olesenel. Jagoda je srednje velika in nekoliko eliptična, pogosto deformirana zaradi zbitosti grozdja. Kožica je debela, rumenkasto zelena in s sončne strani rjavo lisasta. Jagodno meso je sočno, sok pa kiselkast in brezbarven (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

Sorta 'Šipon' je zelo bujna sorta z močnim lesom, a v polni rodnosti bujnost oslabi. Manj je odporen proti mrazu, zato ga ni pametno saditi na nizkih in mrazu izpostavljenih legah, saj lahko pozebejo očesa. Šipon si želi tople in zračne lege. Zanj so najbolj primerna lahka, zračna, in do srednje težka tla. Ne ustrezajo mu težja, mokra in hladna tla. Oplodnja ni zanesljiva, saj pride večkrat do osipanja v cvetenju, kar se kaže s tem, da so pozneje med popolnoma razvitimi jagodami drobne in slabo razvite jagode. Rodi veliko in redno, kakovost je odvisna od vremena v jeseni. Glede na dozorevanje grozdja je pozna sorta. Ustrezajo mu tople in suhe jeseni. Proti boleznim je slabo odporna sorta in spada med naše na bolezni najbolj občutljive sorte (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

2.2 GROZDJE IN GROZDNI MOŠT

Grozdje je osnova, iz njega izhajamo. Kar nam grozdje prinese v klet, to je naš kapital in naša naloga je, da ga čim bolj izkoristimo. Od kemijske sestave grozdja je odvisna tudi kemijska sestava mošta, saj mošt pridobimo direktno iz grozdja z mehanskimi postopki. Grozdje najprej razpecljamo, to je postopek, kjer ločimo peclje od jagod. Pecljev je od 2 do 7 %, odvisno od zrelosti grozdja, zdravstvenega stanja in načina pridelave (gnojenje). Peclje ločimo zato, ker nam lahko prisotnost pecljev v nadaljnji predelavi negativno vpliva na kakovost tako pridobljenega mošta in pozneje vina. Grozdne jagode gredo naprej v drozgalnik, kjer mlin jagodo nežno stisne in tako pridobimo mešanico jagodnega soka, kožic, jagodnega mesa in pečk, ki ji pravimo drozga. Paziti moramo na nastavitev mlina, ker pri drozganju ne smemo poškodovati pečk (v jagodah je 2 do 5 % pečk), ki vsebujejo grenke in trpke snovi, ki so senzorično moteče, poleg tega pa endosperm pečke vsebuje tudi precejšnjo količino olja, kar nam pozneje v vinu lahko da okus po milu. Če je možno in potrebno, drozga potuje skozi toplotni izmenjevalnik, kjer se ohladi. Z ohladitvijo drozge se vpliva na upočasnitev bioloških procesov, v prvi vrsti encimskih reakcij, ki

začnejo teči samostojno in nenadzorovano takoj po drozganju, hkrati z ohladitvijo drozge vplivamo na zmanjšanje aktivnosti avtohtone mikroflore s površine jagodne kožice, ki je z drozganjem prišla v stik s hranili, ki jih je v grozdnem moštu, vsaj v prvi fazi, v izobilju (Bavčar, 2013).

2.2.1 Sladkorji

Največji delež hranil v grozdnem moštu predstavljajo sladkorji, ki nudijo tudi glavni vir energije in ogljika za kvasovke pri alkoholnem vrenju. Koncentracija sladkorja v moštu je lahko zelo različna, v povprečju, pri moštu pridobljenem iz dozorelega grozdja, pa se giba v območju med 180 in 220 g/L. Največji delež pripada monosaharidoma glukozi in fruktozi, ki spadata med heksoze, katerih razmerje je pri polni zrelosti 1:1, pred polno zrelostjo je razmerje nagnjeno v prid glukoze, po polni zrelosti pa imamo več fruktoze kot glukoze. V moštu najdemo tudi monosaharide pentoze, ki so prisotne v mnogo manjših koncentracijah. Glavni predstavniki pentoz so arabinoza, ksiloza in ramnoza, ki pa skupaj običajno ne presegajo koncentracije 1,5 g/L. Pentoze štejemo med nefermentabilne sladkorje, kar pomeni, da jih vinske kvasovke niso zmožne uporabiti kot substrat oziroma vir energije, zato jih najdemo tudi v vinu. Izmed pentoz največjo koncentracijo v belem vinu dosega arabinoza, od 0,2 do 0,8 g/L (Bavčar, 2013).

Med disaharidi je najpomembnejša saharoza, ki pa se ob prehodu v grozдно jagodo hidrolizira na heksozi glukozo in fruktozo in zato saharozo v moštu najdemo le v sledovih. Kvasovke preostale saharoze ne uporabljajo direktno, privzemajo pa produkte njene hidrolize, glukozo in fruktozo, ki jih pridobijo s pomočjo encima invertaze, ki saharozo cepi v glukozo in fruktozo (Bavčar, 2013).

2.2.2 Kisline

Najpomembnejše in tudi najbolj zastopane organske kisline v zreli grozdni jagodi in pozneje v moštu so: vinska, jabolčna in citronska kislina. Vinska in jabolčna kislina predstavljata od 70 do 90 % vseh kislin v moštu. Koncentracije in razmerja kislin, zlasti vinske in jabolčne kisline, so zelo različne, kar je posledica različnih dejavnikov, kot so

sorta, stopnjo zrelosti, zdravstveno stanje, podnebje in značilnost letnika. Razpon skupnih kislin znaša od 5 do 16 g/L. Poleg zgoraj omenjenih kislin, najdemo v moštu v manjših količinah še askorbinsko, α -ketoglutarano, fumarno, galakturonsko, glukonsko, glukuronsko, oksalno, oksalocetno in druge (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

V moštu je lahko v manjših ali večjih količinah prisotna tudi očetna kislina, ki je najpomembnejša hlapna kislina. V normalnih koncentracijah ima pomembno vlogo kot aromatična spojina in pri tvorbi estrov. Povečane koncentracije, nad 0,8 g/L, so posledica delovanja škodljivih mikroorganizmov, predvsem očetnokislinskih bakterij. Nekaj očetne kisline lahko nastane tudi s kemijski hidrolizo hemiceluloze med zorenjem vina v leseni posodi. V novih sodih tako lahko nastane do 0,2 g/L očetne kisline (Bavčar, 2013).

Večje koncentracije očetne kisline so senzorično nezaželeni, ker lahko to zaznamo kot bolezen vina, ki se imenuje očetni cik (Košmerl, 2007).

Manjše koncentracije očetne kisline, nekateri sevi tudi večje, kvasovka Anchor VIN 7 tudi do 1,8 g/L, pa lahko kvasovke tvorijo tudi med fermentacijo (Oenobrand SAS, 2016).

Če je v vinu potekel biološki razkis, oziroma jabolčno-mlečnokislinska fermentacija, pri katerem so mlečnokislinske bakterije pretvorile jabolčno kislino do mlečne kisline, imamo lahko v vinu tudi znatne koncentracije mlečne kisline, kar je odvisno od začetne koncentracije jabolčne kisline in tega, če je biološki razkis potekel do konca. Stehiometrično iz 1 g jabolčne kisline nastane 0,67 g mlečne kisline in 0,33 g ogljikovega dioksida, a je v praksi izkoristek okoli 80 % (Bavčar, 2013).

2.2.3 Dušikove spojine

Dušikove spojine, tako organske (posamezne aminokisline, peptidi in beljakovine) kot anorganske (amonijak in amonijeve soli), so zelo pomemben del hranil za kvasovke, ki vplivajo na vsebnost biomase, kvasovke jih med fermentacijo uporabljajo kot gradnike strukturnih in funkcijskih proteinov in so odločilni faktor za uspešno dokončanje

fermentacije (tok vira ogljika skozi glikolizo), med drugim pa aminokisline sodelujejo tudi kot prekursorji pri tvorbi aromatičnih snovi (Košmerl, 2007).

Koncentracija skupnega dušika v moštu znaša od 1,0 do 2,0 g/L, vendar je le del tega dušika dostopen kvasovkam. Količina anorganskih dušikovih spojin dosega koncentracijo do 300 mg/l, to je tudi najlažje in najhitreje dostopen vir dušika za kvasovke, ostali del predstavljajo organske spojine. Med njim so najpomembnejše proste aminokisline, ki dosegajo od 50 do 90 % koncentracije skupnega dušika (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Košmerl, 2007).

V moštu so zastopane tudi praktično vse aminokisline. 75 do 85 % aminokislin v moštu zastopajo arginin, prolin, glutamin, serin, treonin, glutamat in alanin. V moštu, pridobljenem iz polno zrelega grozdja, je ponavadi prevladujoča aminokislina arginin. V hladnejših območjih je koncentracija prostih aminokislin večja, ker je zaradi nizkih temperatur zmanjšana sinteza beljakovin in obratno. V vročih območjih imajo veliko beljakovin in posledično manj prostih aminokislin (Bavčar, 2013).

2.2.4 Vitamini in minerali

Vitamini se v manjših koncentracijah nahajajo v moštu in vinu. Njihova koncentracija upada z alkoholno fermentacijo in zorenjem vina kot posledica reakcij z žveplovim dioksidom, vezave s čistili ali pa zaradi svetlobe in višje temperature. Prisotni so predvsem askorbinska kislina (vitamin C), tiamin (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2), biotin (vitamin H) in nikotinska kislina (Bavčar, 2013).

Minerali imajo vlogo kot sestavni deli vitaminov in encimov, sodelujejo pri izmenjavi hranil med kvasovkami in okoljem ter reagirajo z drugimi sestavinami v moštu, na primer tvorba soli. Koncentracija in razmerje med minerali v moštu je odvisno predvsem od privzema s koreninskim sistemom vinske trte, akumulacije v grozdni jagodi ter klimatskih razmer. Več kalija je v moštih iz toplejših pridelovalnih območij. Lahko so tudi posledica slučajnih kontaminacij. Takšni primeri so večje koncentracije bakra in železa zaradi stika s korodirano enološko opremo, več žvepla in bakra zaradi uporabe v vinogradu. Lahko so

prisotne tudi težke kovine, kot so svinec, živo srebro, kadmij, selen. Večina teh se izloči na dno posode pri alkoholni fermentaciji, zato so v vinu prisotne le v sledovih. V nekaterih izrednih razmerah pa lahko predvsem baker in železo povzročata napake vina, ki se odražajo v tako imenovanih lomih vina (beli, črni in bakreni), spremembi okusa, oksidacijskih reakcijah in porjavitvah (Bavčar, 2013).

2.3 ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Ključni trenutek v samem procesu pridelave vina. Ko pridejo jagodne kožice v stik z moštom to pomeni, da je tudi mikroflora, ki je prisotna na kožici, dobila prosti dostop do hranil in spontana fermentacija se lahko začne. Na grozdju in posledično v moštu, najdemo številne rodove mikroorganizmov. Od plesni so prisotni predvsem rodovi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* in *Botrytis*. Med predstavniki bakterij so najštevilčnejši rodovi *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Oenococcus*, *Pediococcus* in *Lactobacillus*. Od kvasovk je največ tako imenovanih »divjih« kvasovk rodov *Kloekera*, *Metschnikowia*, *Hansenula*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia* in tudi *Torulaspora*. Kvasovka vrste *Saccharomyces cerevisiae* je zastopana le redko oziroma v zelo majhnem številu, a je stalno prisotna v kletah in na vinarski opremi. Zaradi specifičnih lastnosti grozdnega mošta, kot so relativno visoka vsebnost sladkorjev in posledično velik osmotski tlak, visoka kislost, nizka vrednost pH, nizek oksidacijsko-redukcijski potencial, nizke temperature in prisotnost žveplovega dioksida, le-ta deluje precej selektivno na prisotne mikroorganizme. Glede na razmere, ki vladajo v grozdnem moštu, imajo vodilno vlogo kvasovke. Čeprav je prava vinska kvasovka, kot imenujemo vrsto *Saccharomyces cerevisiae*, v manjšini glede na začetno število ostalih mikroorganizmov, v času fermentacije počasi prevzame dominantno vlogo zaradi svojih številnih prilagoditev, še posebej zaradi odpornosti na večje koncentracije alkohola (Pretorius, 2000).

Glavna pot, po kateri poteka anaerobna pretvorba sladkorjev glukoze in fruktoze do piruvata, je glikoliza. V zelo okrnjenem delu lahko na začetku poteče tudi aerobni del, kjer kvasovke porabijo raztopljeni kisik in intenzivno povečujejo svoje število, vendar je njihov metabolizem tudi ob prisotnosti kisika nagnjen v smer alkoholne fermentacije. V aerobnih

razmerah gre za popolno oksidacijo (enačba 1), medtem ko je za anaerobne razmere značilno nastajanje etanola (enačba 2).

Aerobni proces – dihanje ali respiracija: nastajanje biomase:



Anaerobni proces – vrenje ali fermentacija: nastajanje etanola, kjer je acetaldehid končni akceptor elektronov:



Zelo pomemben stranski produkt alkoholne fermentacije je ogljikov dioksid. Iz enega litra mošta, ki ima koncentracijo sladkorja 180 g/L, ga nastane 44,8 L. Med fermentacijo se sprosti tudi precej toplote. Na splošno velja, da se tekom fermentacije 10 g/L sladkorja, temperatura poveča za 1,3 °C. Količina nastalega etanola, proizvedena iz enote sladkorja med fermentacijo je teoretičnih 51,1 %. Tako se teoretično 180 g sladkorja pretvori v 88 g CO₂ in 92 g etanola, vendar je praktični izkoristek nekoliko manjši in znaša okoli 47 %. Takšen je zato, ker se 95 % sladkorjev pretvori v etanol, 1 % sladkorja se porabi za izgradnjo celičnega materiala, 4 % sladkorja se pretvori v druge končne produkte (metabolite), nekaj alkohola pa se izgubi v atmosfero z izhlapevanjem (Košmerl, 2007).

2.3.1 Metabolizem sladkorjev

Sladkor vstopa v kvasno celico po treh poteh. Z enostavno difuzijo, posredno oz. olajšano difuzijo in z aktivnim transportom. Kvasovke vrste *S. cerevisiae* posedujejo kompleksen multi-encimski sistem za transport sladkorjev v celico, ki je podoben kot pri višjih organizmih npr. sesalcih (Boyer, 2005).

Razgradnja glukoze do piruvata poteka po enaki poti v aerobnih in anaerobnih razmerah. Z energijskega stališča delimo glikolizo na dve stopnji: pripravljalno in donosno. V pripravljalni fazi poteka pretvorba glukoze preko glukoze-6-fosfata do fruktozo-6-fosfata. Fruktoza običajno vstopi v glikolizo s pomočjo heksokinaze, ki jo pretvori v fruktozo-6-fosfat. Naprej poteka pretvorba preko fruktozo-1,6-bifosfata do dihidroksi-acetonfosfata in

gliceraldehid-3-fosfata. Dihidroksi-acetonfosfat se encimsko pretvori v gliceraldehid-3-fosfat, tako da sta rezultat prve stopnje glikolize 2 molekuli gliceraldehid-3-fosfata (Boyer, 2005).

V drugi, donosni fazi, poteka sprememba gliceraldehid-3-fosfata do 1,3-bifosfoglicerata in naprej v 3-fosfoglicerat, ki se pretvori v 2-fosfoglicerat. Nadalje poteka pretvorba do fosfoenolpiruvata in končno do piruvata, ki je končni produkt glikolize. Naprej sledi dekarboksilacija piruvata, kjer dobimo CO₂ in acetaldehid, ki se v zadnji encimski stopnji reducira do etanola (Boyer, 2005).

2.3.2 Metabolizem dušika

Vinske kvasovke potrebujejo za nemoteno rast in razmnoževanje poleg ogljika kot oblike energije, tudi dušik v obliki amonijaka (anorganski dušik) in proste aminokisline (organski dušik) za sintezo strukturnih in funkcijskih beljakovin (Košmerl, 2007).

Transport aminokislin v kvasno celico zagotavljata dve različni skupini transporterjev (Ribéreau -Gayon in sod., 2000):

- splošna aminokislinska permeaza omogoča transport vseh aminokislin, a je njena aktivnost inhibirana v prisotnosti amonijevega iona
- številne druge specifične aminokislinske permeaze, ki omogočajo transport ene ali več aminokislin, ki jih ne omejuje prisotnost amonijevega iona, zato so aktivne od samega začetka alkoholne fermentacije.

Večina aminokislin mošta, je praktično porabljenih, ko je prevrelih prvih 30 g/L sladkorja, kar se običajno zgodi med drugim in tretjim dnevom, seveda odvisno od seva kvasovk in temperature fermentacije. Aminokisline se med alkoholno fermentacijo porabljajo v treh stopnjah:

- kot anorganski dušik amonijak, potem arginin, alanin, ter preostalih 17 aminokislin
- kot anorganski dušik amonijak, potem arginin, alanin in γ -aminomaslena kislina
- na koncu začnejo izkoriščati prolin (Košmerl, 2007).

V normalnih razmerah je koncentracija prolina med fermentacijo bolj ali manj konstantna oz. se lahko poveča po končani fermentaciji zaradi avtolize kvasovk. Med hranilnimi snovmi v grozdnem moštu, je neravnotežje med ogljikom in dušikom, zlasti pomanjkanje dušikovih spojin, eden glavnih vzrokov za slabšo kinetiko alkoholne fermentacije in učinkovitost kvasovk, kar lahko vodi do upočasnitve ali celo zaustavitve fermentacije, poleg tega se kot posledica pomanjkanja dušičnih snovi pojavlja tvorba reduciranih hlapnih žveplovih spojin (najbolj znan predstavnik je bekser ali H_2S), hlapnih kislin in tudi potencialna tvorba etil karbamata, idr. (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Košmerl, 2007). V grozdnem moštu so sladkorji, kot vir ogljika, običajno prisotni v presežku (20 ut.%), kar je bistveno nad potrebami kvasovk za maksimalno rast. Na drugi strani vsebnost skupnega dušika močno variira (od 60 do 2400 mg/L), kar pogosto predstavlja omejevalni ali zaviralni dejavnik. Pri koncentraciji prostega aminokislinskega dušika manj kot 150 mg/L, lahko z veliko verjetnostjo pričakujemo težave med samo fermentacijo. Optimalna koncentracija prostega aminokislinskega dušika (FAN) je za faktor 3- do 3,5-krat večja. V primeru pomanjkanja hranilnih snovi govorimo o stresnih razmerah za kvasovke, ki lahko privedejo do zgoraj omenjenih težav, zato je smiselno razmišljati o dodatku hrane za kvasovke. Zavedati se je treba, da je praktično vsak mošt oz. drozga, ustrezno oskrbljen z dušikovimi spojinami za začetek alkoholne fermentacije, primanjkljaj se pokaže najkasneje po štirih dneh, ko že imamo določeno koncentracijo alkohola in so kvasovke uspele porabiti naravno razpoložljive vire. Kot enostaven, običajen dodatek hrane za kvasovke se najpogosteje uporabljajo amoniakalne soli, običajno diamonijev hidrogenfosfat (DAP), vendar moramo pri uporabi anorganskega dušika upoštevati zakonske omejitve, ker njegova prevelika akumulacija vodi v mikrobiološko nestabilnost in morebitno tvorbo etil karbamata (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Košmerl, 2007). Dodatek amoniakalnega dušika je obvezen pri koncentraciji manj kot 25 mg NH_4^+ /L, oz. priporočljiv med 25-50 mg NH_4^+ /L v želji po zagotovitvi dobrih pogojev za kvasovke. Uporabljajo se tudi druge, kompleksne hranilne mešanice, ki so sestavljene iz mešanice kvasnega ekstrakta, avtoliziranih celičnih sten kvasovk, pomembnih vitaminov in prostih aminokislin. Moramo se zavedati, da te kompleksne mešanice hranil manj doprinesejo k povečanju vrednosti FAN kot DAP in v primeru velikega pomanjkanja dušičnih snovi je smiselno uporabiti kombinacije enostavne in kompleksne hrane (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Košmerl, 2007).

2.4 LASTNOSTI VINSKIH KVASOVK

2.4.1 Splošno o kvasovkah

Kvasovke so evkariontski mikroorganizmi, netaksonomska kategorija gliv, definirana z ozirom na morfološke in fiziološke značilnosti. So filogenetsko različna skupina organizmov in pripadajo dvema glavnima taksonoma, in sicer *Ascomycotina* in *Basidiomycotina* (Raspor, 1996). Kvasovke se razmnožujejo na spolni in nespolni ravni. Nespolno se praviloma množijo z brstenjem oziroma nekatere s cepljenjem. V aerobnih razmerah metabolizirajo številne sladkorje, medtem ko imajo v anaerobnih razmerah sposobnost fermentacije samo nekatere vrste. Številne kvasovke imajo preučeno spolno reprodukcijo ter razmnoževalni cikel in so tako razvrščene med askomicete ali bazidiomicete. V splošnem se s kopulacijo dveh kvasnih celic oziroma spor začne spolni krog, ki vodi v oblikovanje askospor oziroma bazidospor (Raspor, 1996).

2.4.2 Vinska kvasovka vrste *Saccharomyces cerevisiae*

Za tipične vinske kvasovke imenujemo kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*, ki spadajo v razred *Ascomycetes*, v kateri je več kot 2000 rodov. Spolno se razmnožujejo s sporami, vendar je ta način industrijsko nezanemljiv. Uporabnejše je vegetativno razmnoževanje z multipolarnim brstenjem, kjer v idealnih pogojih cikel traja 2 uri. Celice imajo ovalno obliko. Kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* so Crabtree pozitivne, kar pomeni, da tudi v aerobnih razmerah poteka alkoholna fermentacija zaradi velikega vnosa glukoze oz. fruktoze v celico, ki inhibitorno delujeta na respiratorne encime (Raspor, 1996).

Sinonimi za vinske kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* so: *Saccharomyces cerevisiae* (bayanus), *S. uvarum*, *S. oviformis*, *S. carlsbergiensis*, *S. logo*, *S. chevalieri*, *S. diastaticus*, *S. fructuum*, *S. italicus*, *S. hispanica*, *S. oxydans*, *S. pasteurianus*, *S. prostoserdovii*, *S. sake*, *S. sterineri* in *S. vini* (Košmerl, 2007). Za rast kvasovk med alkoholno fermentacijo (AF) je značilno, da so na začetku prisotni različni rodi in vrste vinskih kvasovk, značilna pa je tudi njihova hitra rast, dokler ni kisik porabljen. V

nadaljevanju naraščajoča vsebnost alkohola postaja inhibitorna, hranila so omejena, na koncu AF pa prevladajo kvasovke vrste *S. cerevisiae*. Spontana, naravna ali divja alkoholna fermentacija poteka z endogeno kvasno mikrofloro (naravno prisotna, divja). Izraz naravna fermentacija ni ustrezen, ker vse fermentacije potekajo z eno ali več vrstami kvasovk (bodisi da je uporabljena startrska kultura ali ne); tako ločimo le spontano AF in inokulirano (vzpodbujeno ali inducirano) AF. Z vinom povezane kvasovke so najprej kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* ki je splošno priznana kot vinska kvasovka, nadalje pa so prisotne v različnem številu še kvasovke rodov *Metchnikowia*, *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces/Dekkera*, ki jih običajno imenujemo kvasovke kvarljivke (Košmerl, 2007).

2.4.2.1 Ekološke in metabolne lastnosti kvasovk

Različni sevi kvasovk imajo tudi zelo različne lastnosti, tako želene kot tudi neželene. Zato se je porodila ideja o uporabi mešane kulture različnih sevov vrste *Sacharomyces cerevisiae*, od katerih ima posamezni sev zelo različno razmerje končnih sekundarnih produktov, kar privede do bistveno bolj kompleksnih vin s stališča hlapnih aromatičnih sestavin (Preglednica 1) (Košmerl, 2007).

Preglednica 1: Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk (Košmerl, 2007)

Želene lastnosti	Neželene lastnosti
Visoka odpornost na alkohol	Tvorba žveplovega dioksida
Poraba sladkorjev v celoti	Tvorba vodikovega sulfida (H ₂ S)
Odpornost na žveplov dioksid	Tvorba hlapnih kislin
Fermentacija pri nizkih temperaturah	Tvorba acetaldehida in piruvata
Minimalna faza prilagajanja	Sposobnost penjenja
Odpornost na višje tlake	Tvorba aprekurzorjev etilkarbamata
Tvorba glicerola	Tvorba polifenoloksidaze
β-glukozidazna aktivnost	
Zimocidna (killer) aktivnost	

Kvasovke so tiste, ki vplivajo na aromo vina predvsem s tvorbo različnih količin hlapnih snovi, vendar je nesmiselna delitev sevov kvasovk na aromatične in nevtralne, ker je aromatičen značaj določenega seva odvisen predvsem od gojišča (mošta) in razmer med fermentacijo. Res je, da na aromo vplivajo fermentacijske lastnosti kvasovk, vendar so zelo odvisne tudi od sorte, kjer so pri nekaterih v ospredju etilni estri, acetatni estri maščobnih kislin in višjih alkoholov, pri drugih pa predstavljajo specifične primarne aromatične snovi metoksipirazini, terpeni ali C₁₃-norizoprenoidi (Košmerl, 2007).

2.4.3 Kvasovka *Torulaspora delbrueckii*

So predstavniki skupine t.i. divjih kvasovk, ki prevladujejo na sami grozdni jagodi in posledično so najštevilčnejše tudi v moštu, kjer začnejo spontano fermentacijo (Košmerl, 2007).

Nekoč smo izpostavljali njihove slabe strani delovanja, jih klasificirali tudi kot kvarljivce, ker so bile pogosto izolirane iz počasnih ali zaustavljenih fermentacij ali iz vin, ki so imela analitične in senzorične pomanjkljivosti in napake. V zadnjem času pa ugotavljamo njihov potencial za pozitiven doprinos h kakovosti vina, saj lahko z njihovo uporabo dobimo širšo in bolj pestro aromatiko (Košmerl, 2007). To dejstvo navajajo tudi Sommer in sod. (2007), da so kvasovke te vrste sposobne povečati sortno značilno aromo in kompleksnost vina.

Kvasovke vrste *T. delbrueckii* so bile nekoč poimenovane *Saccharomyces roseii* in so bile priporočene za vinifikacijo moštov z majhno vsebnostjo sladkorjev in kislin (Castelli, 1955). Kvasovke vrste *T. delbrueckii* imajo slabšo sposobnost fermentacije v primerjavi s *S. cerevisiae* (Mauricio in sod., 1991). Zaradi slabše fermentativnosti in manjšega izkoristka pri pretvorbi sladkorja v alkohol, se običajno uporablja v paru z drugo, močnejšo kvasovko, ki je sposobna pripeljati fermentacijo do zelene stopnje. Kvasovka *T. delbrueckii* tvori manj hlapnih kislin med fermentacijo kot klasična vinska kvasovka *Saccharomyces cerevisiae*, torej pripomore k zmanjšanju hlapnih kislin v končnem proizvodu, hkrati pa tvori želeno aromatiko (Bely in sod., 2008).

2.5 DODATEK KVASNEGA NASTAVKA

Zaradi uspešnejšega postopka fermentacije se v praksi uporablja dodatek kvasovk v obliki vrelnega nastavka, s katerim v moštu dosežemo koncentracijo 10^5 do 10^6 CFU/mL. Vrelni nastavek dodamo takoj po bistrenju mošta, preden se začne spontana fermentacija z avtohtono mikrofloro (Bavčar, 2013).

Večina vinarjev uporablja selekcionirane kvasovke za pripravo vrelnega nastavka. Te kvasovke so vzgojene ob prisotnosti kisika, torej aerobno, in z višjo prisotnostjo hranil z izjemo glukoze. Tako se pospešuje tvorba biomase in tvorba sterolov ter nenasičenih maščobnih kislin, kar omogoča toleranco kvasovk na etanol. Najbolj praktične in tudi najbolj množično uporabne so liofilizirane kvasovke, ki jih najdemo pod izrazom aktivne suhe kvasovke (active dry yeasts, ADY) ali selekcionirane suhe kvasovke (Bavčar, 2013).

Vrelni nastavek ali inokulum se lahko načrtno vzgoji tudi iz mikroflоре, ki je prisotna na grozdju v vinogradu. Ker tako dodajamo kvasovke, ki niso načrtno selekcionirane, se močno poveča možnost negativnih vplivov. To so manjša toleranca na etanol in žveplov dioksid, večja produkcija vodikovega sulfida (H_2S) in očetne kisline ter prekinitev fermentacije pred povretjem do suhega. Pozorni moramo biti, da tako ne dodamo kvasovk, ki so rasle v moštu s pomanjkanjem hranil ali pri neprimerni temperaturi, saj v tem primeru niso dovolj vitalne. Še huje je, če s tako pripravljenim nastavkom vnesemo močan nastavek nezaželenih mikroorganizmov (npr. očetnokislinske bakterije) v glavnino mošta, ki imajo negativno delovanje na kakovost mošta in vina. Možnosti za zaustavitev ali prekinitev alkoholne fermentacije so veliko večje kot pri dodatku selekcioniranega vrelnega nastavka. Zavedati se moramo tudi, da so na grozdju vsako leto prisotni isti mikroorganizmi, vendar v precej drugačnih razmerjih. Če je bila fermentacija brez vrelnega nastavka eno leto uspešna, je lahko drugo leto z istimi postopki pravi polom, zato se takšen način alkoholne fermentacije odsvetuje (Bavčar, 2013).

2.5.1 Priprava aktivne starterske kulture

Najbolje je, da za rehidracijo kvasovk sledimo navodilom proizvajalca. Zelo pomembna je koncentracija aktivnih kvasnih celic v inokulumu, ki mora biti vsaj 2-5 milijonov aktivnih kvasnih celic v 1 mL (to odgovarja 1-3 vol.% inokuluma). Dodatek suhih kvasovk je odvisen od stanja mošta in se giblje med 15-40 g/hL suhih kvasovk. V primeru slabšega zdravstvenega stanja grozdja (gniloba) potrebujemo močnejši inokulum, kjer uporabimo 20-40 g/hL mošta. Pri belih moštih iz zdravega grozdja in opravljenem bistrenju je običajni dodatek kvasovk med 15-25 g/hL (Košmerl, 2007).

2.5.2 Faza rehidracije

Na prvem mestu je temperatura rehidracijske vode, ki mora imeti 35-40 °C, ravnamo se po navodilih proizvajalca. Za rehidracijo ne uporabljamo klorirane vode. V prvi fazi rehidracije ne dodajamo v vodo niti sladkorja niti mošta zaradi osmotskega stresa, ki povzroči manjšo preživelost kvasne populacije. Ko dodamo kvasovke, vse skupaj previdno premešamo in pustimo nabrekati 20-30 minut (Košmerl, 2007).

2.5.3 Inokulacija starterskih kultur

Pri inokulaciji mošta s starterskimi kulturami moramo biti pozorni na preprečitev temperaturnega šoka, zagotovitev ustreznih hranil za kvasovke, upoštevati pa je potrebna tudi dodatna priporočila oziroma zahteve v primeru manj ugodne fizikalno-kemijske sestave mošta (Košmerl, 2007).

2.5.3.1 Preprečitev temperaturnega šoka

Da preprečimo temperaturni šok, mora biti temperaturna razlika med moštom in rehidriranimi kvasovkami manj kot 10 °C (idealno med 5-7 °C). Zagotoviti moramo počasno zniževanje temperature kvasnega nastavka, priporočljivo je 5 °C/uro z dodajanjem manjših količin hladnejšega mošta (Košmerl, 2007).

2.5.3.2 Zagotovitev potrebnih hranil

Pomanjkanje kisika preprečimo z nepretiranim žveplanjem, pomanjkanje dušika pa z ustreznim dodatkom hrane za kvasovke. Priporoča se dodatek specialne, namenske, kompleksne mešanice hranil direktno v vodo za rehidracijo pred dodatkom suhih kvasovk. Dodatek drugih potrebnih hranil se priporoča v prvi polovici alkoholne fermentacije, še bolj optimalen je dvakratni zaporedni dodatek manjših količin v prvi tretjini alkoholne fermentacije. V primeru pomanjkanja kisika je proti koncu eksponentne faze rasti kvasovk in v stacionarni fazi zmanjšana sinteza lipidov in sterolov (ergosterol, zimosterol), zato je potrebno aerobno namnoževanje kvasovk, ki vodi v značilno večji delež nenasičenih maščobnih kislin in do trikrat večjo količino sterolov, kar pozitivno prispeva k večji preživelosti in fermentabilnosti. Brez začetnega kisika je razmnoževanje kvasovk omejeno le na 4 do 5 generacij (zavedati se je treba, da tudi CO₂, dušik in askorbinska kislina zmanjšajo vsebnost molekularnega kisika). Paziti je treba tudi pri uporabi SO₂, saj pri koncentraciji več kot 50 mg/L v predfermentativni fazi inaktivira vitamin B1 (tiamin), zato je takrat potreben ekstra dodatek tega vitamina (Košmerl, 2007).

2.5.3.3 Dodatne zahteve oziroma priporočila

Mošči z vrednostjo pH pod 3,1 potrebujejo večji inokulum kvasovk. Potrebno je predbistrenje ali razsluzenje moštov, da imamo v raztopini največ 0,5 % suspendiranih delcev. V večjih tankih je priporočljivo mešanje fermentirajočega mošta zaradi možnosti prezgodnjega odmrtja in avtolize kvasovk na dnu, poleg tega z mešanjem tudi izženemo CO₂ iz mošta in tako preprečimo prenasíčenje, kar škodi kvasovkam, saj CO₂ postane toksičen nad 0,2 atm. Zelo pomemben dejavnik je toksičnost alkohola, ki poškoduje celično membrano, kar ima najprej za posledico upočasnjeno in nato prekinjen transport dušikovih spojin in sladkorja v celico. Toksičnost alkohola se blaži oziroma potencira s številnimi sinergističnimi dejavniki: pH, visoko temperaturo, očetno kislino, kratkoverižnimi maščobnimi kislinami, pomanjkanju dušikovih spojin, sterolov in vitaminov. Če imamo okuženo grozdje in slabo higieno, je gotovo tudi velika prisotnost kompetitivnih mikroorganizmov (divjih kvasovk in bakterij), kar vodi k zmanjšanju hranil in potencialni tvorbi toksinov, zato je potreben dodatek večjega inokuluma in tudi večji

dodatek hranil. Problem so lahko tudi oacetnokislinske bakterije, ki zlahka tvorijo več kot 0,8 g/L očetne kisline, kar zraven senzorične oporečnosti, vodi tudi do zaustavitve alkoholne fermentacije. Če fermentiramo pri nizkih temperaturah je smiselno povečati inokulum in nasprotno, ga je smiselno zmanjšati pri nekontroliranih, višjih temperaturah, kjer tudi izberemo počasni fermentirajoči sev kvasovk. Upočasnitev alkoholne fermentacije je lahko tudi povezana s prevelikim ostankom fruktoze. Dodatek celičnih sten kvasovk med fermentacijo stimulira samo fermentacijo in pospeši sproščanje CO₂, vendar pozitiven učinek ni povezan z razstrupljanjem ali detoksifikacijo, ampak v povezavi z dodatkom nenasičenih maščobnih kislin (C₁₆-C₁₈), kot nadomestilo za kisik in preprečevanju pomanjkanja hranil (aminokislin). Problematični so lahko tudi ostanki pesticidov, ki vplivajo na tvorbo stresnih metabolitov. Vsebnost pesticidov lahko zmanjšamo z uporabo bentonita v fazi bistrenja belih moštov (Košmerl, 2007).

2.6 AROMATIČNE SNOVI V VINU

Za aromo vina je odgovornih več kot 800 (številka se zaradi vedno natančnejših tehnik povečuje) različnih hlapnih snovi. Koncentracija vseh aromatičnih snovi v vinu je približno 0,8-1,2 g/L, kar je približno enako vsebnosti 1 % koncentracije etanola. Višji alkoholi, ki nastajajo med alkoholno fermentacijo, predstavljajo 50 % te vrednosti. Ostale spojine so zastopane v bistveno manjših koncentracijah, med 10⁻⁴ in 10⁻⁹ g/L (Bavčar, 2013).

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

- neposredno z vohanjem, kar imenujemo vinska cvetica ali »buket«
- posredno z okušanjem, ko se zaradi višje temperature in mehničnega učinka v ustih sprostijo manj hlapne snovi vina in prehajajo retronazalno v nos do rumene pege v možganih, receptorja z veliko občutljivostjo za vonj.

Skupek obeh vtisov imenujemo aroma vina.

2.6.1 Klasifikacija aromatičnih spojin

Aromatične spojine razdelimo v štiri skupine (Bavčar, 2013; Košmerl, 2007):

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

2.6.1.1 Primarna aroma vina

Terpeni

Med pomembnejše predstavnike primarne aromatike sodijo terpeni, ki so tudi nosilci sortno prepoznavne arome pri vinih rumeni muškat in muškat ottonel, s svojim muškatnim tonom lahko pomembno vplivajo tudi na druge sorte vina, na primer traminec, renski rizling, sivi pinot, scheurebe in rizvanec. V grozdju so identificirali približno 40 terpenov. Skupna jim je značilna izoprenska enota iz petih ogljikovih atomov. Sestavljeni so iz dveh, treh, štirih ali šestih izoprenskih enot. Med najbolj aromatične uvrščamo monoterpene, ki so sestavljeni iz dveh izoprenskih enot, torej iz desetih ogljikovih atomov. Monoterpeni lahko vsebujejo različne funkcionalne skupine. V rastlinah se tako nahajajo v obliki sladkorjev, aldehydov, kislin in celo estrov. Najpomembnejši so monoterpenoli, katerih glavni predstavniki so linalool, geraniol, nerol, citronelol in α -terpineol, ki se med seboj razlikujejo po položaju hidroksilne (OH) skupine na sredinskem ogljikovodikovem obroču. Njihovi pragovi zaznave so zelo nizki od 18 do 400 $\mu\text{g/L}$, najbolj aromatična predstavnika sta citronelol z značilnim vonjem po vrtnici in citrusih s pragom zaznave 18 $\mu\text{g/L}$ in linalool, ki diši po vrtnicah s pragom zaznave 50 $\mu\text{g/L}$ (Bavčar, 2013).

Norizoprenoidi

C₁₃-norizoprenoidi, kamor uvrščamo β -damascenon, β -ionon, vitispiran in norizoprenoid TND, nastajajo z hidrolizo vmesnih produktov razgradnje karotenoidov. Nahajajo se v jagodni kožici, zato lahko na njihovo ekstrakcijo vplivamo z dolžino in temperaturo maceracije. β -damascenon ima vonj po tropskem sadju in kuhanem jabolku. Najprej je bil določen v sortah renski rizling, scheurebe in rumeni muškat. Na splošno njegova koncentracija precej niha pri belih sortah, bolj je stabilna pri rdečih sortah merlot, cabernet sauvignon in cabernet franc. β -ionon z vonjem po vijolicah je bil najprej določen v belih vinih, sedaj pa mu večjo senzorično vlogo pripisujejo v rdečih vinih. Norizoprenoid TND in vitispiran sta tipični spojini staranih vin. Prvi s svojim tipičnim vonjem po kerozinu oziroma petroleju daje značilen vonj staranim renskimi rizlingom. V grozdju in mlademu vinu ga v prosti obliki skoraj ni. Vitispiranu se pripisujejo zaznave po evkaliptusu, kafri in celo krizantemah. Verjetno ima negativno vlogo pri vonju prehitro staranih vinih (Bavčar, 2013).

Metokspirazini

Pirazini oziroma natančneje metokspirazini so heterociklične spojine z dušikom, ki nastanejo kot posledica metabolizma aminokislin vinske trte. Za aromatiske vina so najpomembnejši trije: 2-metoksi-3-izopropilpirazin (IPMP), 2-metoksi-3-sec-butilpirazin in 2-metoksi-3-izobutilpirazin (IBMP). Najpomembnejši je prav IBMP, ki ga je tudi količinsko največ in ga povezujemo z zelenimi, zeliščnimi ali rastlinskimi aromami (zelena paprika, pokošena trava in koprive). Prag zaznave metokspirazinov je izjemno nizek (1-2 ng/L), v senzorično dovolj visokih koncentracijah (1-20 ng/L) jih lahko potrdimo predvsem v vinih sorte sauvignon, kjer imajo vlogo pozitivne aromatične spojine. Njihova zaznava v rdečih vinih je znak pridelave vina iz nezrelega grozdja in ni zaželena. Največ metokspirazinov se nahaja v jagodni kožici. Med dozorevanjem grozdja njihova koncentracija upada. Če jih želimo ohraniti, je tehnološka zrelost takšnega grozdja pred polno zrelostjo, kar je tipično za grozdje sorte 'Sauvignon'. Vsebnost pirazinov se podobno kot vsebnost jabolčne kisline zmanjšuje počasneje, če je temperatura med dozorevanjem nižja, posledično se v hladnejših pridelovalnih okoliših ohrani več pirazinov (Bavčar, 2013).

Hlapni tioli

To so hlapne žveplove spojine, ki dajejo vinu sadne, rastlinske oziroma eterične nianse. Glavni predstavniki so (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Bavčar, 2013):

- (4-MMP) 4-merkapt-4-metilpentan-2-on, ki prispeva k aromi po pušpanu, pasijonki in črnemu ribezu
- (3-MH) 3-merkapt-heksan-1-ol in
- (3-MHA) 3-merkapt-heksil acetat, ki oba prispevata k aromi po pasijonki, grenivki, kosmuljah in guavi.

Hlapni tioli se v grozdju in moštu nahajajo predvsem v nehlapni obliki vezani na aminokislino cistein. Nahajajo se v kožici in jagodnem mesu, zato jih z uporabo maceracije pridobimo več. Hlapni tioli se iz vezanih oblik sprostijo šele pod vplivom delovanja kvasovk, ko s pomočjo delovanja encimskih kompleksov liaz odcepijo cistein. Različni sevi kvasovk imajo različno sposobnost sprostitve hlapnih tiolov v vino. Največji doprinos k aromatici imajo pri vinu sorte 'Sauvignon', pomembno pa prispevajo tudi k aromatici sortrenski rizling, traminec, sivi pinot in scheurebe (Bavčar, 2013).

Aldehidi

Večina aldehydov iz grozdja se v vinu ne ohrani zaradi redukcije v alkohole med alkoholno fermentacijo. Nespremenjeni ostanejo tako imenovani C6 aldehidi, torej heksanali in heksenali, ki vinu dajejo vonj po zelenem, po travi, lahko tudi grenak okus. So lahko znak pridelave iz nezrelega grozdja ali prisotnih zelenih delov trte med stiskanjem, saj tako v mošt preideta linolenska in linolna kislina, ki se pod vplivom oksidacijskih encimov pretvarjata v C6 alkohole in aldehide (Bavčar, 2013).

2.6.1.2 Fermentacijska aroma

Višji alkoholi

Alkohole z več kot dvema ogljikovima atomoma imenujemo višji alkoholi. Predstavljajo približno 50 % vseh aromatičnih snovi v vinu, če ne upoštevamo etanola. Zelo pomembni so tudi pri zorenju vina, saj se iz njih tvorijo estri. Njihova sinteza poteka med alkoholno fermentacijo vzporedno s sintezo etanola. Lahko nastajajo iz ustreznih aminokislin ali

sladkorjev. Ustrezne aminokisline se v encimskih reakcijah transaminirajo, dekarboksilirajo in reducirajo do ustreznega alkohola. Ker višji alkoholi nastajajo do konca fermentacije, so z raziskavami ugotovili, da vsebnost aminokislin v moštu ne zadostuje za vse skupne višje alkohole, ki nastanejo in kasneje ugotovili, da jih približno 35 % nastane iz sladkorjev (Bavčar, 2013).

Estri

Estri so izrednega pomena za aromatiko vina. V vinu jih najdemo več kot 160, vendar se jih velika večina nahaja v koncentracijah pod pragom zaznave ali pa so manj hlapni. Estri nastajajo z reakcijo med karboksilno skupino organskih kislin in hidroksilno skupino alkoholov (alifatski estri) ali fenolov (fenolni estri). Pomembnejši so alifatski, saj je fenolnih estrov manj in so tudi večinoma manj hlapni. Posledica reakcije med etanolom in nasičenimi maščobnimi kislinami so etil heksanoat, etil oktanoat in etil dekanat. Enako pomembni so tisti, ki nastanejo z reakcijo med očetno kislino in etanolom in višjimi alkoholi. Glavni predstavniki so etil acetat, izoamil acetat, izobutil acetat, 2-feniletil acetat in heksil acetat. Zadnjo skupino ponavadi povezujemo z aromatiko mladih, svežih, sadnih vin, ki imajo na splošno prijetne sadne arome, kjer sta zaznavni banana, jabolko in tudi cvetlične note. Kot opisna oznaka te skupine se uporablja kar izraz sadni estri. Tvorbo teh sadnih estrov pospešujejo nižje fermentacijske temperature, pod 15 °C. Med zorenjem vina, lahko sadni estri hidrolizirajo nazaj v alkohole in očetno kislino, kar ima za posledico izgubo teh vonjev. Proces se pospeši pri višji temperaturi (Bavčar, 2013).

Hlapne kisline

Hlapne kisline v vinu so predvsem očetna, propanojska in maslena ali butanojska kislina. V zdravem vinu jih je relativno malo, da bi prispevale k vonju vina. Z izjemo očetne kisline, dosežejo druge hlapne kisline navadno komaj prag zaznave (Košmerl, 2007). Hlapne kisline v vinu se običajno nahajajo v koncentracijah med 500-1000 mg/L. Največji delež, okoli 90 % zastopa očetna kislina. Ostale hlapne kisline nastanejo z delovanjem metabolizma maščobnih kislin pri kvasovkah in bakterijah. Očetna kislina lahko pomembno prispeva k pozitivni aromatici vina, vendar pri povečanih koncentracijah (običajno nad 0,8 g/L, odvisno od stila vina, lahko tudi prej) postane moteča, saj nam da vonj po kislu, kar je bolezen vina očetni cik (Erasmus in sod., 2004).

Acetaldehid

Acetaldehid je glavni aldehyd v vinu. Kvasovke ga tvorijo iz piruvata, ki nastaja v glikolizi in se lahko izloči v vino, če kvasovka v začetni fazi še nima dovolj encima alkohol dehidrogenaze, ki reducira acetaldehyd do etanola in ji ta uide skozi celično steno. Nastaja lahko tudi po končani fermentaciji s kemično ali mikrobiološko oksidacijo etanola do acetaldehyda. Za nevtralizacijo 1 mg acetaldehyda v vinu je potrebno 1,45 mg žveplovega dioksida (Košmerl, 2007). V vinu je prisoten v koncentracijah od 10-75 mg/L, kar je normalno, senzorično zaznaven postane pri koncentraciji 100 mg/L. Senzorično ga zaznamo kot vonj po naribanih jabolkih ali oreških (Regodón Mateos in sod., 2006).

Hlapni fenoli

Nastanejo med ali po fermentaciji pod vplivom nekaterih bakterij in kvasovk s pretvorbo estrov hidroksicimetnih kislin, predvsem estrov *p*-kumarne in ferulne kisline. Nastanejo vinil fenoli, ki jih je več v belih vinih: 4-vinil gvajakol in 4-vinil fenol. V rdečih vinih prevladujejo etil fenoli: 4-etilgvajakol in 4-etilfenol. Vinu dajejo vonj po začimbah, zdravilih, dimu, hlevu, konjih in imajo v večjih koncentracijah zelo negativen vpliv na kakovost vina. Čeprav imajo sposobnost tvorbe hlapnih fenolov tudi druge kvasovke in mlečnokislinske bakterije, imajo glavno vlogo kvasovke rodu *Brettanomyces* (Bavčar, 2013).

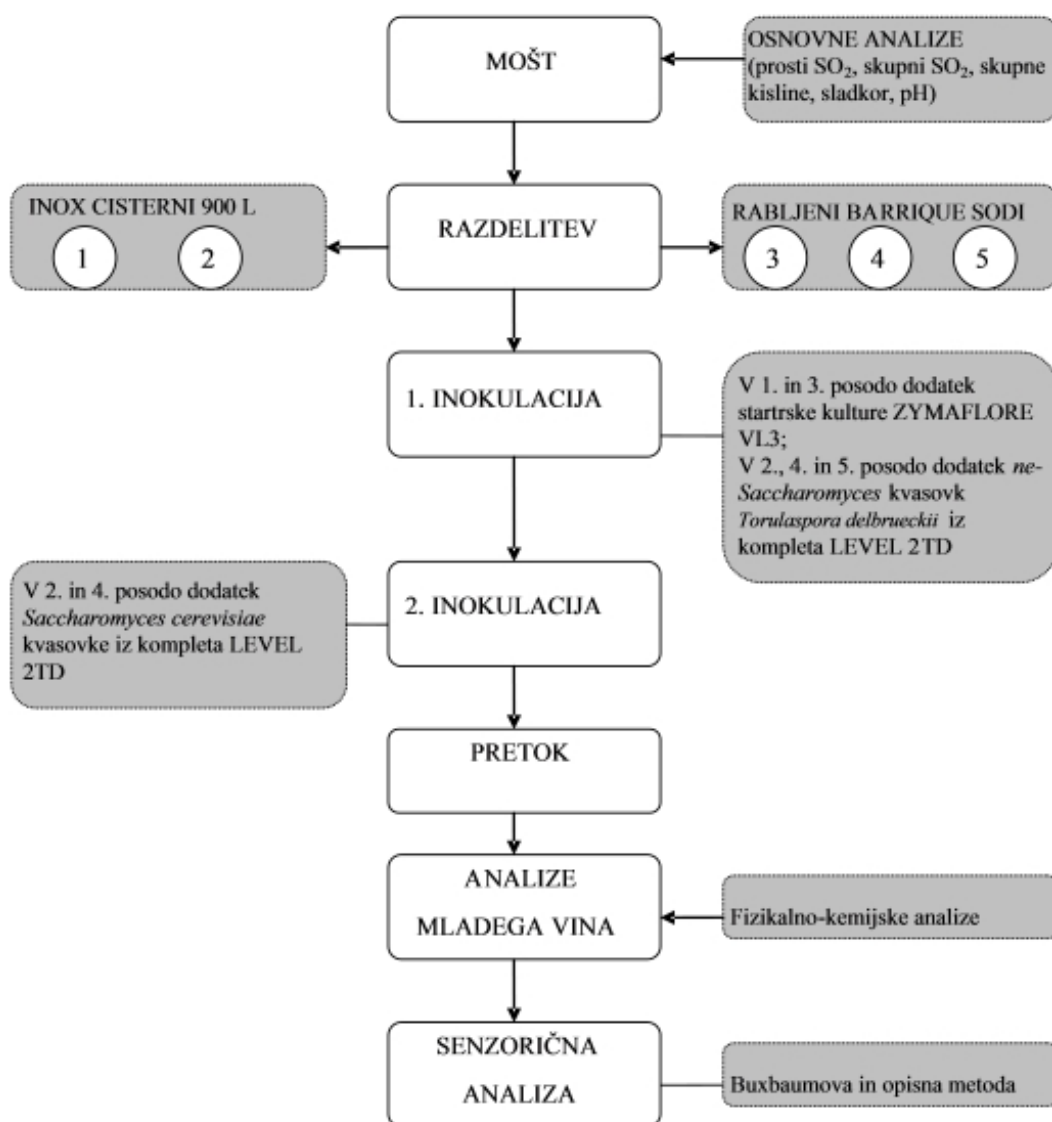
Žveplove spojine

Najpomembnejša spojina, ki ima negativen vpliv na kakovost vina je vodikov sulfid (H_2S) z vonjem po gnilih jajcih in zelo nizkim pragom zaznave (50-80 $\mu g/L$). Zaradi pogoste pojavnosti in nizkega praga zaznave je eden od najbolj pogostih problemov v vinski kleti, s katerimi se soočajo vinarji. Pri manjših koncentracijah (20-30 $\mu g/L$) lahko vodikov sulfid deluje celo pozitivno in doprinese h kompleksnosti vina. Če se vodikov sulfid veže preko kemijskih reakcij z acetaldehydom in metioninom, dobimo merkaptane, ki imajo še nižji prag zaznave. Etilmerkaptan ima vonj po gumi, kavčuku ali česnu in je zaznaven že pri koncentracijah okrog 1,1 $\mu g/L$, metilmerkaptan ima zaznavni prag še nižji, okrog 0,02 $\mu g/L$ in daje vonj po gnilih jajcih, kuhanem zelju in ohrovtu (Spiropoulos in Bisson, 2000; Košmerl, 2007).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 ZASNOVA POSKUSA

S primerjalnim fermentacijskim poskusom smo želeli raziskati, kako bo uporaba različnih rodov vinskih kvasovk in tudi fermentacijske posode vplivala na kinetiko fermentacije, osnovne fizikalno-kemijske parametre in predvsem na skupno senzorično kakovost tako pridelanega vina. S fizikalno-kemijskimi parametri in senzorično analizo smo ugotavljali vpliv različnih kvasovk in njihovih kombinacij na tako pridelano vino.



Slika 3: Shematski prikaz poteka poskusa

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mošt

Fermentacijski poskus smo izvedli na moštu sorte šipon. Grozdje za poskus prihaja iz vinorodne dežele Podravje, okoliša Štajerska Slovenija, natančneje iz podokoliša Ljutomer-Ormož. Mošt smo razdelili v dve 900 L fermentacijski posodi iz nerjavnega jekla in v tri rabljene 225 L barrique sode.

3.2.2 Starterske kulture

V poskusu smo za inokulacijo mošta uporabili sledeče kvasovke:

- komplet kvasovk LEVEL 2TD (*Saccharomyces cerevisiae* in *Torulaspora delbrueckii*),
- kvasovka Zymaflore VL3 (*Saccharomyces cerevisiae*),
- čista kultura *Torulaspora delbrueckii* iz kompleta LEVEL 2TD.

Kvasovke LEVEL 2TD

Komplet je sestavljen iz dveh ločenih, kompatibilnih vrst kvasovk: *Saccharomyces cerevisiae* in *Torulaspora delbrueckii*. Proizvajalec Lallemant priporoča zaporedno inokulacijo kvasovke vrste *Torulaspora delbrueckii* v roku 72 ur po dodatku kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*, da pridobimo intenzivnejšo aromatiko, večjo kompleksnost in polnejši okus vina.

Kvasovke Zymaflore VL3

Kvasovka je bila izolirana iz pokrajine Bordeaux v Franciji. Ima odlično sposobnost sproščanja tiolnih, sortnih fermentacijskih arom. Kvasovka je primerna za polna in zaokrožena vina z močno izraženo tiolno aromatiko (Laffort product data sheet Zymaflore VL3).

Kvasovka vrste *Torulaspora delbrueckii* (iz kompleta LEVEL 2TD) je bila samostojno uporabljena za izvedbo fermentacijskega poskusa (vzorec 5) v količini dodatka 25 g/hL, ne glede na priporočila proizvajalca, da naj bi po 72 urah sledil dodatek kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2.3 Hranila za kvasovke

Za rehidracijo kvasovk Zymaflore VL3 in *S. cerevisiae* iz kompleta Level 2TD smo uporabili kompleksno mešanico hranil za rehidracijo Oenostim, ki vsebuje kombinacijo vitaminov, mineralov, maščobnih kislin in sterolov. Pri rehidraciji kvasovk vrste *Torulaspora delbrueckii* nismo uporabili dodatka hranil v rehidracijsko vodo.

3.3 METODE DELA

3.3.1 Nastavitev fermentacijskega poskusa

V praktičnem – tehnološkem delu smo izpeljali fermentacijo mošta sorte šipon, za katerega grozdje je prihajalo iz Ljutomersko-Ormoških goric. Nastavili smo primerjalni fermentacijski poskus v barrique sodčkih s kvasovkami Zymaflore VL3, LEVEL 2TD in *Torulaspora delbrueckii*, med potekom alkoholne fermentacije pa smo nadzirali temperaturo. Sočasno z glavnim poskusom je potekal poskus tudi v dveh 900 L posodah iz nerjavnega jela, kjer smo uporabili kvasovke Zymaflore VL3 in LEVEL 2TD (slika 2).

3.3.2 Fizikalno-kemijske analize mošta in vina

Dnevne analize (merjenje sladkorja, skupnih kislin, temperature) in analize mošta smo opravljali v laboratoriju vinske kleti P&F Jeruzalem Ormož d.o.o..

3.3.2.1 Določanje žveplovega dioksida v vinu po Ripperju

Po Ripperjevi metodi jodometrične titracije smo določali prosti in skupni žveplov dioksid (SO_2) v vinu. Metoda temelji na oksidacijsko-redukcijski reakciji z raztopino joda (I_2) (Košmerl in Kač, 2004).

Prosti SO_2 določamo tako, da 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 standardizirano raztopino joda. Jod oksidira žveplovo(IV) kislino v žveplovo(VI) kislino in v končni točki titracije (t.j. tik po ekvivalentni točki) prebitna količina joda obarva raztopino modro.

Za določitev koncentracije skupnega SO_2 pa vzorcu vina najprej dodamo 1 M raztopino NaOH, da dosežemo hidrolizo vezanega SO_2 , t.j. acetaldehid- α -hidroksisulfonata in drugih bisulfitnih kompleksov. Nato sledi dodatek ostalih reagentov in jodometrična titracija kot pri določanju prostega SO_2 .

Reakcija oksidacije žveplove (IV) kisline v žveplovo (VI) kislino:



3.3.2.2 Določanje pH mošta in vina

S potenciometrično metodo merimo razliko v potencialu med dvema elektrodama, ki sta potopljeni direktno v vzorec mošta ali vina. Referenčna elektroda ima stalen (znan) potencial, druga, steklena (merilna) elektroda, pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H_3O^+ ionov v raztopini. Uporabljamo pH meter s skalo v pH enotah. Točnost meritev aparata mora biti najmanj $\pm 0,05$ pH enot (Košmerl in Kač, 2004).

3.3.2.3 Določanje skupnih (titrabilnih) kislin v vinu

Skupne kisline v vinu določamo s kislinsko-bazično potenciometrično titracijo. Pri tem merimo razliko v potencialu med dvema elektrodama, ki sta potopljeni direktno v vzorec mošta ali vina. Referenčna elektroda ima stalen (znan) potencial, druga, steklena (merilna)

elektroda, pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H_3O^+ ionov v raztopini. Uporabljamo pH meter s skalo v pH enotah. Točnost meritev aparata mora biti najmanj $\pm 0,05$ pH enot (Košmerl in Kač, 2004). Na avtomatskem titratorju je potekala titracija z znano raztopino NaOH, do končne točke titracije pri pH 7,0 in pH 8,2. Pri titraciji je potekala reakcija:



3.3.2.4 Določanje reducirajočih sladkorjev v vinu po Rebeleinu

Za določanje koncentracije sladkorjev v moštu in vinu smo uporabili titracijsko metodo po dr. Rebeleinu. Metoda temelji na kvantitativni oksidaciji reducirajočih sladkorjev v karboksilne kisline s pomočjo številnih reagentov (Luffov, Soxhletov, Fehlingov). Oksidacija je odvisna od uporabljenega reagenta in od pogojev oksidacije. S segrevanjem do vrenja poteče v reakcijski zmesi oksidacija reducirajočih sladkorjev v kisline, dovalentni bakrov ion iz reakcijske zmesi pa se reducira do bakrovega (I) oksida. Iz raztopine se izloči oborina netopnega bakrovega (I) oksida (Cu_2O). Preostali Cu^{2+} ioni se v raztopini kalijevega jodida v kislem (dodatek žveplove (VI) kisline) reducirajo, nastali jod (I_2) pa titrimetrično določimo z raztopino natrijevega tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) v prisotnosti škrobovice kot indikatorja. Koncentracijo reducirajočih sladkorjev (g/L) odčitamo direktno z birete ob upoštevanju slepega vzorca (to vrednost odštejemo od rezultata) (Košmerl in Kač, 2004).

3.3.2.5 Določanje relativne gostote, ekstrakta in alkohola v vinu

Termostatiranemu vzorcu vina (20 °C) smo izmerili relativno gostoto z denzimetrom. Nato smo točno določen volumen (100 mL) ponovno termostatiranega vzorca predestilirali z destilacijsko napravo v 100 mL merilno bučko. Po destilaciji vzorca smo dobljeni alkoholni destilat termostatirali in izmerili njegovo relativno gostoto z denzimetrom. Poleg relativne gostote smo odčitali tudi koncentracijo (volumski delež) alkohola. Relativno gostoto skupnega ekstrakta vina (d_{SE}) smo izračunali s pomočjo Tabariéjevega obrazca (enačba 5):

$$d_{\text{SE}} = d_{\text{V}} - d_{\text{A}} + 1,0000 \quad \dots(5)$$

kjer pomeni d_{SE} relativno gostoto skupnega ekstrakta, d_V relativno gostoto vzorca vina in d_A relativno gostoto alkoholnega destilata.

Na podlagi znane relativne gostote skupnega ekstrakta vina (d_{SE}) smo iz preglednice (priloga A; Košmerl in Kač, 2004) odčitali masno koncentracijo skupnega ekstrakta v vinu (g skupnega ekstrakta/L vina).

3.3.2.6 Določanje hlapnih kislin v vinu

Uporabili smo destilacijsko metodo (ang. Cash steam distillation, Markham steam distillation) (Košmerl in Kač, 2004). Po destilaciji vzorca z vodno paro je sledila titracija destilata s standardizirano vodno raztopino natrijevega hidroksida. Na podlagi odčitane porabe titranta (mL) izračunamo koncentracijo hlapnih kislin, ki jih izražamo kot masno koncentracijo očetne kisline (g/L):

$$HK = a \cdot c \cdot M \text{ (g/mol)} \cdot (50/1000) \quad \dots(6)$$

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

3.3.2.7 Določanje sladkorja prostega ekstrakta

Koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta (SPE) v g/L smo izračunali iz razlike masnih koncentracij skupnega ekstrakta in reducirajočih sladkorjev.

3.3.2.8 Določanje motnosti

Motnost vina smo določili s turbidimetrom in rezultat podali v enotah NTU (ang. nephelometric turbidity units). Meritev poteka tako, da turbidimeter, ki mu rečemo tudi nefelometer, pošlje pravokotni snop svetlobe skozi vzorec v kiveti in izmeri motnje v prehodu skozi vzorec, ki so posledica prisotnih delcev. Več izmerjenih enot NTU pomeni tudi večjo motnost.

3.3.3 Senzorična analiza

Senzorična analiza je definirana kot znanstvena disciplina prepoznavanja in opisovanja senzoričnih lastnosti, zaznanih s človekovimi čuti. Obsega zaznavanje prisotnosti ali intenzivnosti različnih senzoričnih lastnosti, razlikovanje v zaznavanju in kvantitativno ocenjevanje (Golob in sod., 2005).

Senzorična analiza meri, analizira in interpretira reakcije na tiste značilnosti živil, ki jih zaznamo s petimi osnovnimi čuti: z vidom, sluhom, vohom, okusom in tipom (Stone in Sidel, 1993).

3.3.3.1 Organoleptično ocenjevanje vina

Vzorci vina smo po opravljenih fizikalno-kemijskih analizah senzorično ocenili. Ocenjevanje je izvedel petčlanski panel ocenjevalcev, ki imajo opravljeni tečaj za pokuševalca vina, mošta in drugih proizvodov iz grozdja in vina. Vzorce vina smo ocenili po dveh metodah: uradni 20-točkovni Buxbaumovi metodi (Pravilnik o postopku ..., 2000) in opisni ali deskriptivni metodi (Košmerl in Kač, 2009).

Buxbaumova metoda

Po Buxbaumovi 20-točkovni metodi ocenjujemo bistrost (največ 2 točki), barvo (največ 2 točki), vonj (največ 4 točke), okus (največ 6 točk) in harmonijo (največ 6 točk). Ker vino ni bilo filtrirano, bistrosti nismo ocenjevali objektivno ampak smo vzorce ocenili tako, kot da bi bili kristalno bistri, torej z dvema točkama.

Opisna ali deskriptivna metoda

Uporaba opisne analize je široka, npr. ko želimo natančno specificirati senzorične lastnosti preskusnega izdelka. Podrobneje smo ocenjevali tri lastnosti vzorcev: intenzivnost vonja, kompleksnost aromatičnosti in polnost vina. Ocenjevali smo z ocenami od 1 do 5, kjer ocena 1 pomeni najmanj izraženo lastnost, ocena 5 pomeni najbolj izraženo lastnost.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI ANALIZ MOŠTA

V preglednici 2 so prikazani rezultati kemijske analize mošta šipon pred alkoholno fermentacijo. Analiza je bila opravljena po samobistrenju in pred izvedbo fermentacijskih poskusov (slika 3). Sladkorna stopnja (85 °Oe) in vsebnost kislin (9,75 g/L) sta bili pričakovani, prav tako tudi vrednost pH 3,36, ki je znotraj običajnih vrednosti mošta med 3,1-3,6. Preglednica 2 prikazuje tudi relativno majhno vsebnost vezanega in skupnega žveplovega dioksida (manj kot 60 mg/L), ki je bil dodan v okviru običajnih predfermentativnih dodatkov (žveplanje mošta).

Preglednica 2: Rezultati analiz mošta pred fermentacijo

Parameter	Vrednost
Prosti SO ₂	3 mg/L
Skupni SO ₂	58 mg/l
Vezani SO ₂	55 mg/l
Sladkorna stopnja	85 °Oe
Skupne kisline	9,75 g/L
pH	3,36

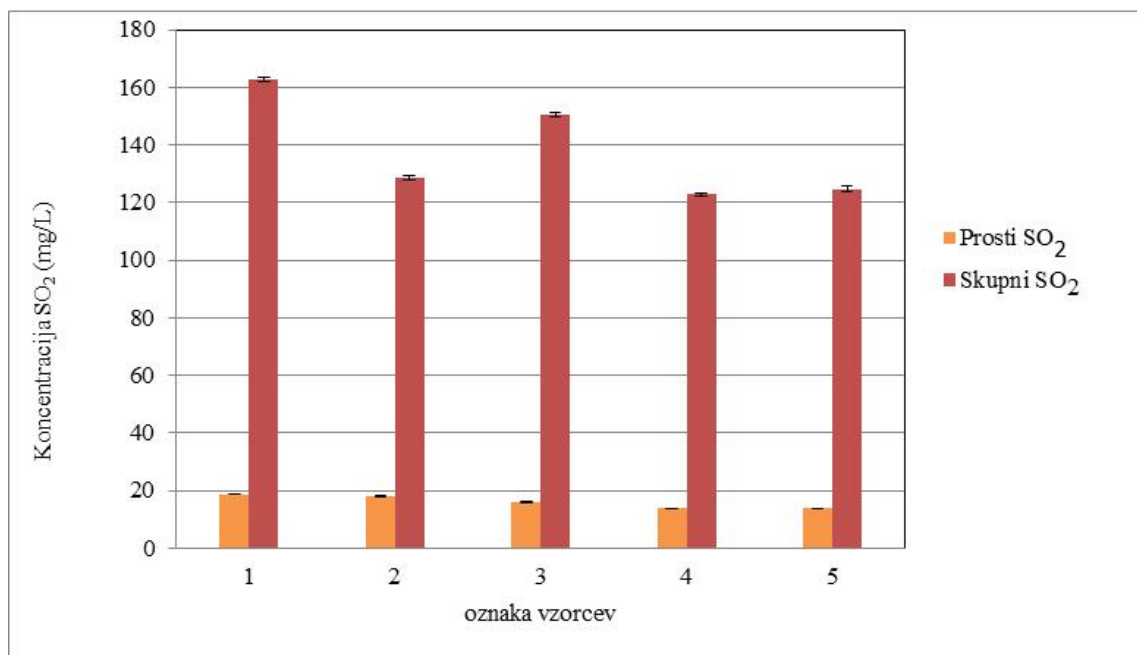
4.2 REZULTATI ANALIZ VINA

Alkoholna fermentacija (AF) vzorcev vina je trajala v povprečju tri tedne (razpon po posameznih vzorcih 1-5 je bil od 20 do 25 dni). Najkrajši čas fermentacije je ustrezal vzorcu 1, najdaljši pa po pričakovanjih v vzorcu 5. V vseh fermentacijskih posodah je bila kontrolirana temperatura, 17 ± 1 °C. Po zaključeni AF je iz tehnološkega stališča sledilo opravljanje prvega pretoka pridelanih mladih vin in žveplanje s kalijevim metabisulfitom v koncentraciji 8 g/hL. Do opravljanja fizikalno-kemijskih analiz so pridelani vzorci vin zoreli v enakih zorilnih posodah kot je potekala tudi AF (1 in 2 v inoxu ter 3-5 v rabljenih barrique sodih); kletna temperatura med zorenjem je bila med 10-13 °C. Vsi rezultati merjenja na slikah 4-19 so prikazani kot povprečje meritev s standardnim odklonom (s.o.).

Izjemi sta sliki 12 in 13, kjer smo rezultate prikazali le kot povprečne vrednosti, saj sta parametra skupni in sladkorja prosti ekstrakt izračunani vrednosti.

4.2.1 Rezultati merjenja žveplovega dioksida (SO_2)

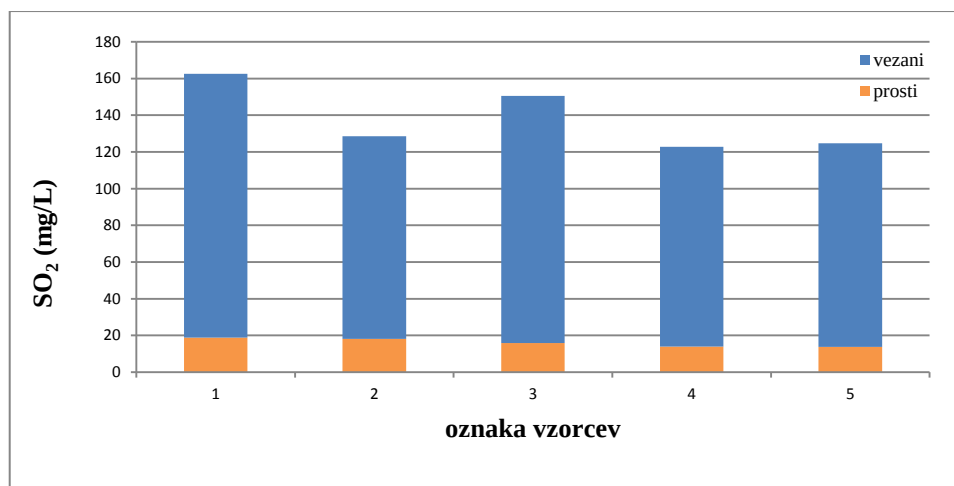
Vina običajno vsebujejo 5-40 mg prostega SO_2 /L vina. Prosti SO_2 je definiran kot nevezana oblika SO_2 v vinu, torej tisti žveplov dioksid, ki ni veza na acetaldehid, druge aldehyde ali organske spojine. V vinu ga najdemo v treh oblikah: molekularni (SO_2), bisulfitni (HSO_3^-) in sulfitni (SO_3^{2-}). Ravnotežje med oblikami je odvisno od pH in temperature vina. Glavni porabniki žvepla v vinu so: acetaldehid, piruvična kislina in α -ketoglutarina kislina (Košmerl in Kač, 2004).



Slika 4a: Primerjava vsebnosti prostega in skupnega SO_2 (mg/L) v vinih sorte šipon

Kot je razvidno s slike 4a imajo vina zelo različne koncentracije predvsem skupnega SO_2 ; lahko bi rekli, da vsebujejo preveč skupnega (od 123 do 163 mg/L) in hkrati premalo prostega SO_2 (od 14-19 mg/L). Zakonska meja 200 mg/L za skupni SO_2 še sicer ni presežena (Pravilnik o pogojih ..., 2004), ampak za trenutne smernice, kjer se trudimo pridelati vino s čim manjšo koncentracijo skupnega SO_2 , to niso vzpodbudni rezultati.

Ker razliko med skupnim in prostim SO_2 predstavlja vezana oblika, zato smo ločeno prikazali na sliki 4b razmerje med prosto in vezano obliko. Iz nje je razvidno predvsem zelo neugodno razmerje med obema oblikama SO_2 , ki je željeno 1 : 4 oziroma 25 %. V našem primeru je to razmerje bistveno manjše, in sicer od 10,6 % (vzorec 3) do 14,1 % (vzorec 2).

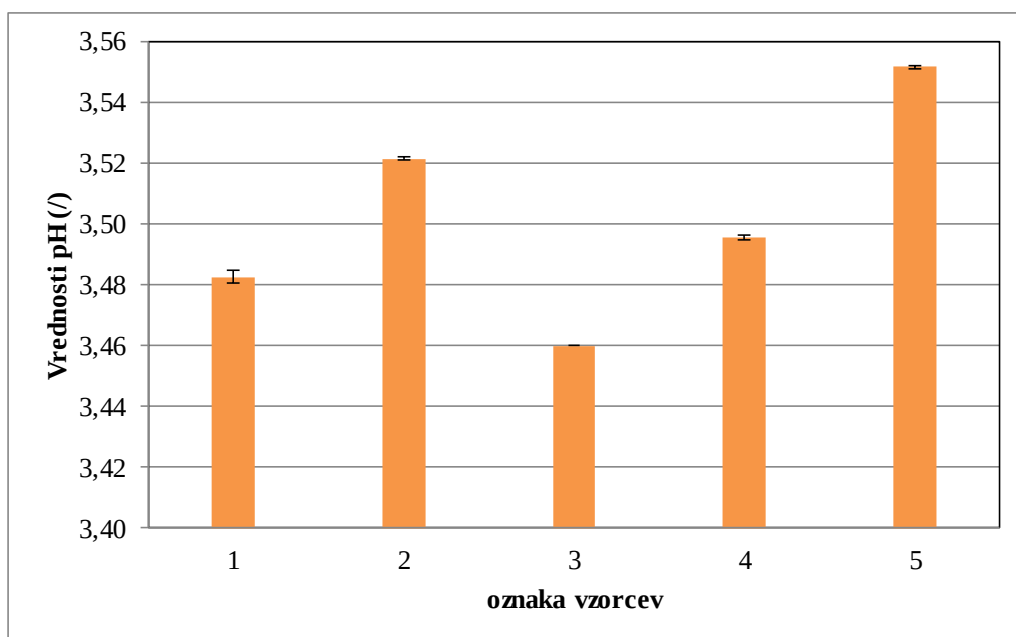


Slika 4b: Razmerje med vsebnostjo prostega in vezanega SO_2 (mg/L) v vinih sorte šipon

Glavni razlog za takšno sliko je najverjetneje zelo slabo zdravstveno stanje grozdja, ki je s tem prineslo že v mošt ogromno »porabnikov žvepla«, kar se posledično odraža v večjih koncentracijah skupnega SO_2 , ker se je dodano žveplo praktično takoj vezalo s »porabniki«. Po »porabnikih« izstopata vzorca 1 (144 mg/L) in 3 (135 mg/L) vezanega SO_2 . Zaradi zelo slabega zdravstvenega stanja grozdja ob trgatvi smo bili primorani uporabiti večje količine žvepla že na grozdju, v nadaljevanju pa še dodatno po zaključeni alkoholni fermentaciji v vino.

4.2.2 Rezultati merjenja vrednosti pH

Vrednost pH mošta normalnih trgatev je med 3,1 in 3,6; za desertna vina med 3,4 in 3,8. Običajno je pH vina manjši od 3,6. Praviloma je pH mladega vina (brez ogljikovega dioksida) večji od pH mošta, iz katerega je vino pridelano (Košmerl in Kač, 2004).



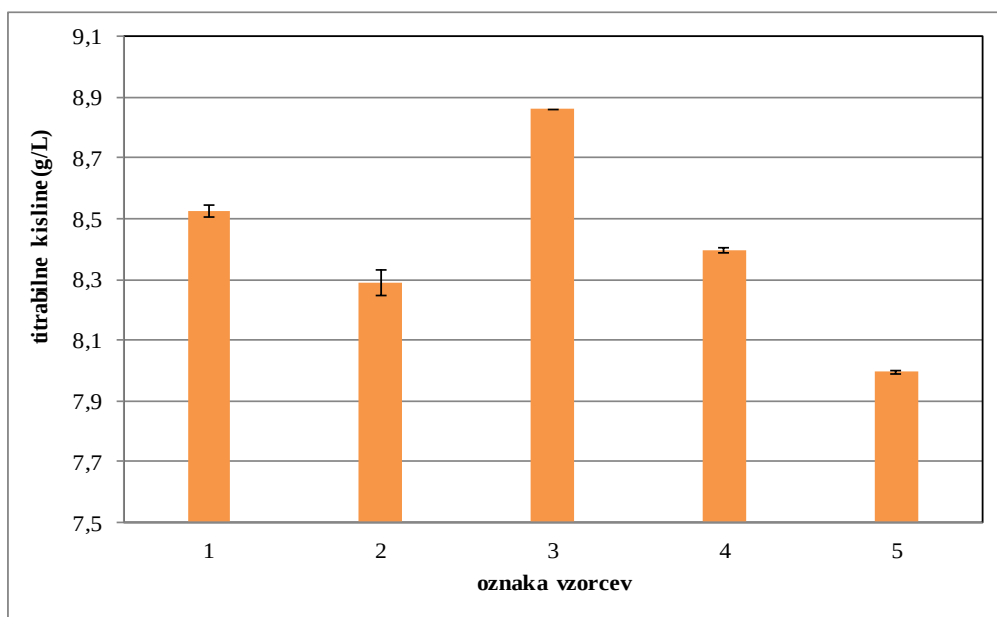
Slika 5: Vrednosti pH v vinih sorte šipon

Slika 5 nam predstavlja razlike v vrednosti pH v posameznih vzorcih vina. Vina imajo po pričakovanjih višji pH kot smo ga izmerili v moštu, kar je v večji meri posledica izločanja kislinskih soli med in po fermentaciji, s tem tudi zmanjšanje skupnih kislin v vinu, kar se odraža v spremembi oziroma povišanju vrednosti pH. Glede na izmerjene vrednosti pH imamo v vinih premajhne koncentracije prostega SO_2 (slika 4a), ki bi nam zagotavljale ustrezno mikrobiološko in fizikalno-kemijsko stabilnost vin. Najnižji pH ima vzorec številka 3 (3,46) in hkrati tudi največjo izmerjeno koncentracijo skupnih kislin, najvišji pH pa ima vzorec številka 5 (3,55), ki ima pričakovano tudi najmanjšo izmerjeno skupno kislost (slika 6b).

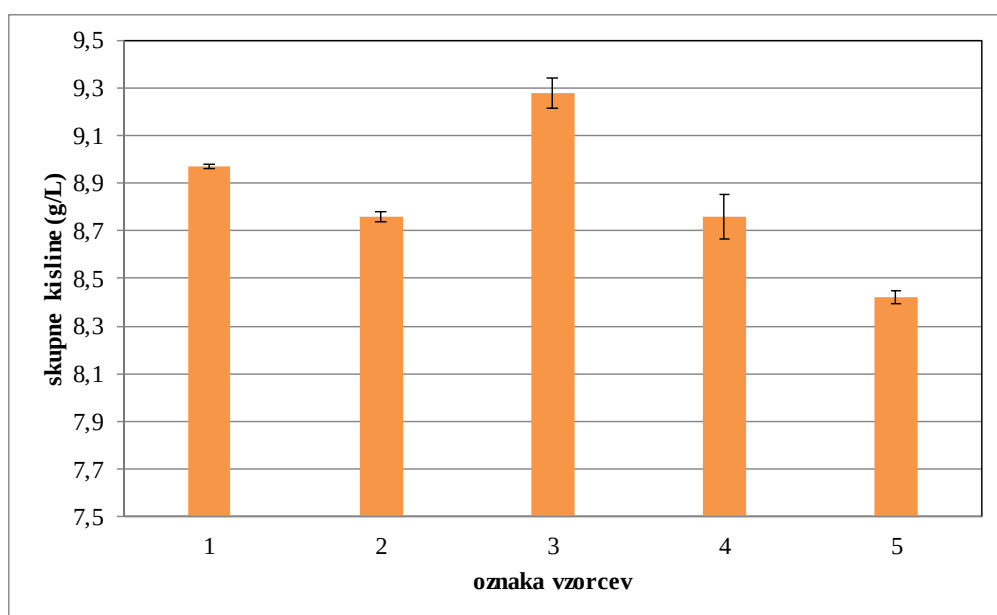
4.2.3 Rezultat merjenja skupnih kislin

Grozdje vsebuje znatne količine različnih šibkih karboksilnih kislin. Med dozorevanjem je značilno zmanjševanje kislin in s tem tudi večanje pH. Vsebnost karboksilnih kislin izražamo kot množino vinske kisline na liter mošta ali vina, glede na določanje (pH končne titracije), pa sta v uporabi izraza skupne kisline in titrabilne/titracijske kisline. Prevladujoče organske kisline mošta so vinska, jabolčna in citronska kislina.

Med alkoholno fermentacijo nastajajo še: očetna, propionska, piruvična, mlečna, jantarna, glikolna, galakturonska, glukonska, oksalna in fumarna kislina. Skupna vsebnost karboksilnih kislin v moštu in vinu je v povprečju med 6 in 9 g/L (Košmerl in Kač, 2004). Na slikah 6a in 6b je prikazana vsebnost titrabilnih in skupnih kislin, ki se nahaja v zgornjem koncentracijskem območju povprečnih vrednosti.



Slika 6a: Vsebnost titrabilnih kislin (g/L) v vinih sorte šipon



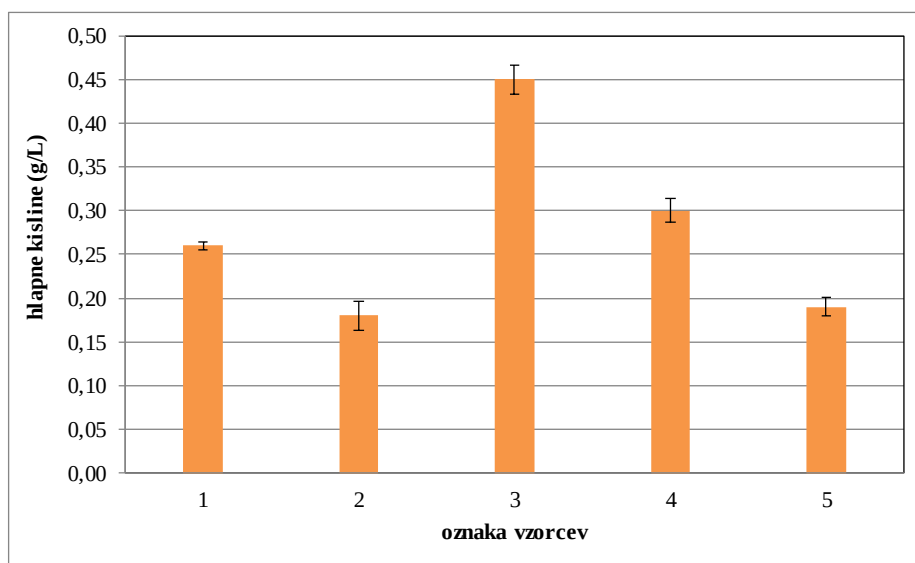
Slika 6b: Vsebnost skupnih kislin (g/L) v vinih sorte šipon

Razliko med skupnimi in titrabilnimi kislinami predstavljajo kislo delujoče snovi. V naših vzorcih je le-teh najmanj v vzorcu številka 4 (295 ± 35 mg/L) in največ v vzorcu številka 2 (480 ± 57 mg/L).

Koncentracije skupnih kislin so kljub izločanju kalijevega hidrogentartrata in netopnih soli drugih organskih kislin, ki je potekalo med in po fermentaciji, še vedno precej velike. Največjo skupno kislost (skoraj 9,3 g/L) ima vzorec številka 3 (ima tudi najnižji pH), najnižjo pa vzorec številka 5 (ima tudi najvišji pH). V primerjavi z moštom, ki je vseboval 9,75 g/L skupnih kislin, se je v povprečju ta vsebnost v pridelanih vinih zmanjšala za 0,93 g/L, oziroma v razponu od 0,52 g/L v vzorcu številka 2 do 1,31 g/L v vzorcu številka 5. Med alkoholno fermentacijo se na račun kristalizacije običajno zmanjša vsebnost kislin med 1-3 g/L kot posledica.

4.2.4 Rezultati merjenja hlapnih kislin

Koncentracijo hlapnih kislin podajamo kot koncentracijo očetne kisline v g/L. Določimo jih titrimetrično v destilatu vzorca, ki smo ga pridobili s parno destilacijo. Postopek poteka tako, da v destilat ne preidejo mlečna, jantarna ali sorbinska kislina, niti ogljikov dioksid ali žveplove(IV) kislina. Zdrava mlada vina običajno vsebujejo manj hlapnih kislin, kot stara. Prav tako je tvorba le teh bistveno manjša pri vinih, pridelanih iz mošta z manjšo oziroma normalno koncentracijo sladkorja, v primerjavi s poznimi trgatvami, pri katerih delujejo kvasovke na začetku alkoholne fermentacije v značilno bolj osmofilnih razmerah.



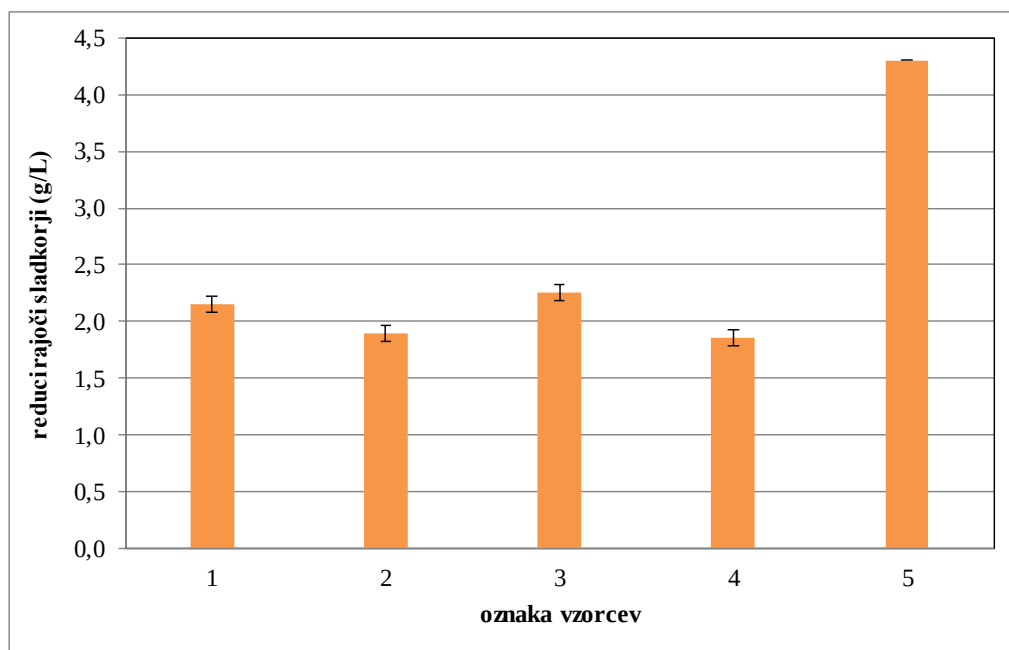
Slika 7: Vsebnost hlapnih kislin (g/L) v vinih sorte šipon

Manjše količine hlapnih kislin (do 0,3 g/L očetne kisline) nastajajo kot stranski produkt med čisto alkoholno fermentacijo vina s kvasovkami (Košmerl in Kač, 2004), v večjih koncentracijah pa jih tvorijo mlečno- in predvsem očetnokislinske bakterije.

Hlapne kisline so v vseh vzorcih v normalnih koncentracijah in pod zakonsko mejo za bela vina, ki znaša 1 g/L (Pravilnik o pogojih ..., 2004), v povprečju pa njihova vsebnost znaša idealnih 0,28 g/L. Napaka in bolezen vina (očetnokislinski ton in cik) sta sicer lahko zaznavna že pri manjših koncentracijah okrog 0,6-0,9 g očetne kisline/L vina. Rahlo povečana vsebnost, vendar še vedno v normalnih okvirih in senzorično povsem nemoteča, je pri vzorcu številka 3 (0,47 g/L), povprečje preostalih vzorcev pa je 0,23 g/L oziroma razpon od 0,17 do 0,31 g/L.

4.2.5 Rezultati merjenja reducirajočih sladkorjev

Glavna predstavnika sladkorjev v vinu sta glukoza in fruktoza, manj je saharoze in ostalih sladkorjev, posebno nefermentativnih pentoz. Popolnoma suha vina vsebujejo približno 1 g reducirajočih sladkorjev/L, kjer so zajeti zlasti nefermentativni reducirajoči sladkorji pentoze (arabinoza, ramnoza in ksiloza), medtem ko je skupna koncentracija nefermentativne glukoze in fruktoze minimalna (0,1-0,2 g/L).

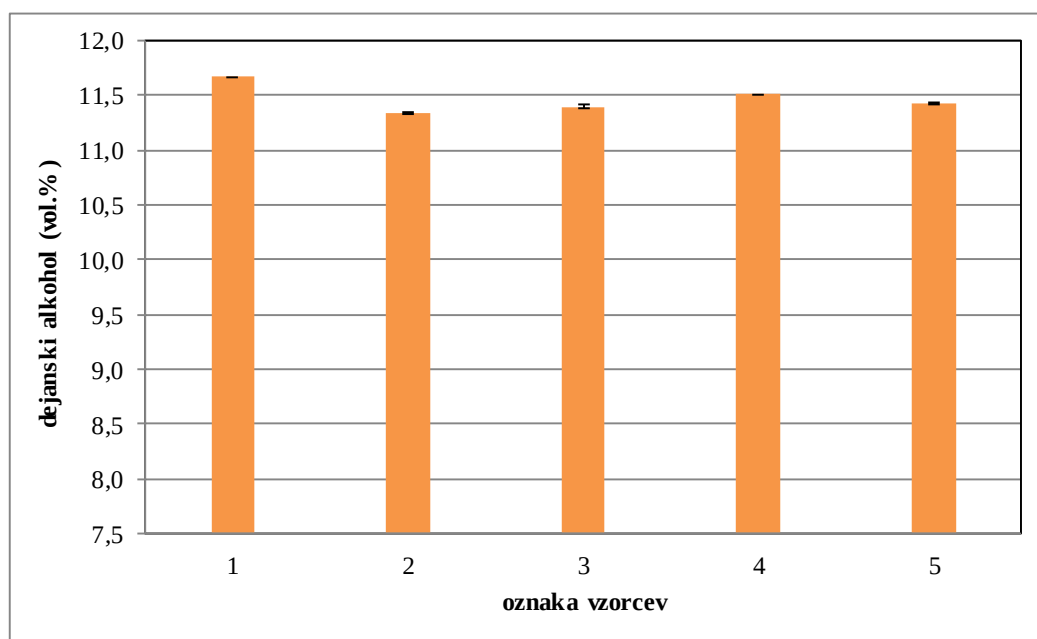


Slika 8: Vsebnost reducirajočih sladkorjev (g/L) v vinih sorte šipon

Kot je razvidno s slike 8, vsi vzorci sodijo v kategorijo suhih vin, kar pomeni, da je vsebnost reducirajočih sladkorjev pod 9 g/L in hkrati koncentracija skupnih kislin, izražena v g/L vinske kisline, ni več kot 2 g pod koncentracijo reducirajočih sladkorjev (Pravilnik o pogojih ..., 2004). Največji ostanek reducirajočih sladkorjev ima vzorec številka 5 (4,3 g/L), ki je dvakrat večji v primerjavi s preostalimi štirimi vzorci, ki vsebujejo okrog 2 g/L reducirajočih sladkorjev oziroma v razponu od 1,8 do 2,2 g/L.

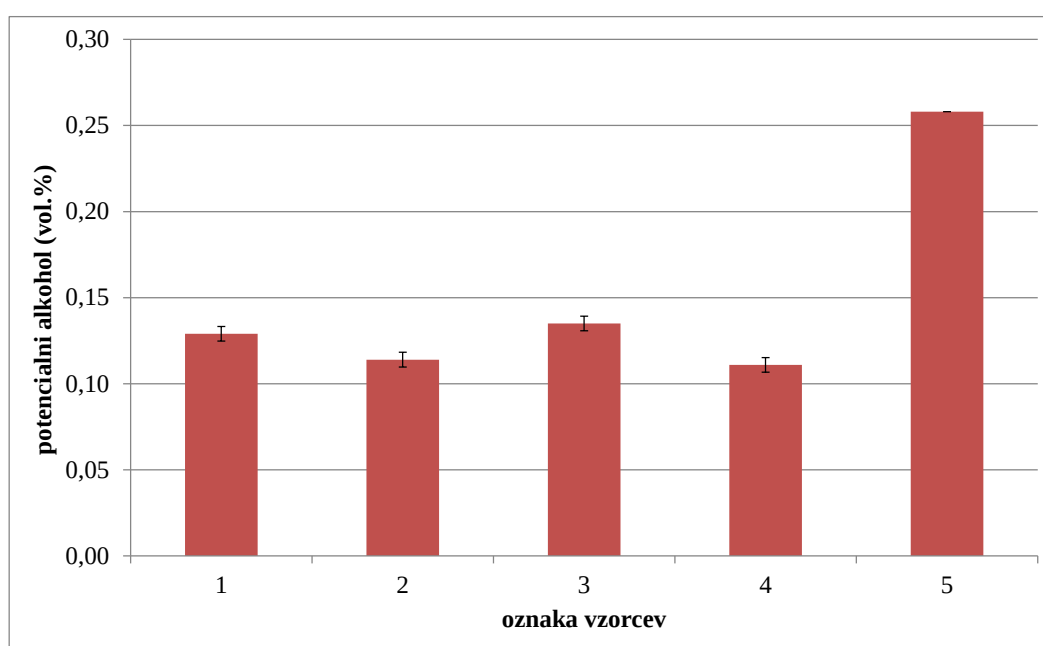
4.2.6 Rezultati merjenja alkohola

Veliko večino alkohola v vinu predstavlja etanol, ki nastane kot glavni produkt alkoholnega vrenja s kvasovkami iz glukoze in fruktoze v moštu. Vino vsebuje tudi manjše koncentracije drugih monohidroksialkoholov: metanol, 1-propanol, 1-butanol, izoamil alkohol, 2-feniletanol in nekatere poliole: glicerol, butandiol, manitol in sorbitol (Košmerl in Kač, 2004).



Slika 9a: Vsebnost dejanskega alkohola (vol. %) v vinih sorte šipon

S slike 9a so razvidne relativno majhne razlike v koncentraciji dejanskega alkohola (od 11,35 vol. % v vzorcu številka 2 do 11,67 vol. % v vzorcu številka 1), kar se sklada s tem, da je bil za poskus uporabljen poenoten mošt z enako začetno koncentracijo sladkorja. Povprečna vsebnost dejanskega alkohola v petih vzorcih znaša $11,47 \pm 0,01$ vol. %.

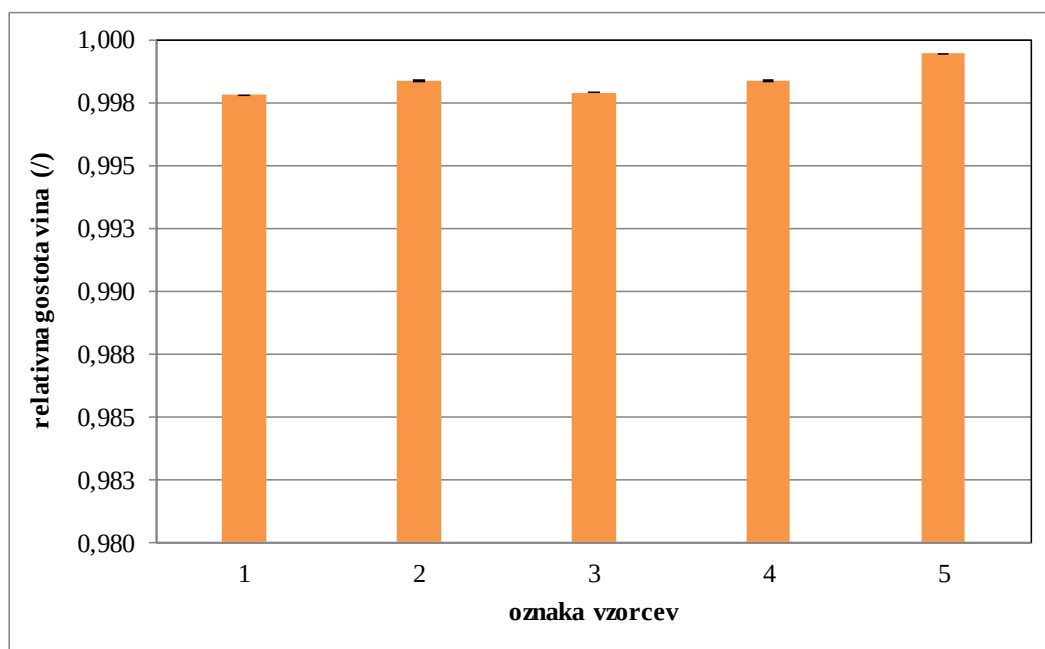


Slika 9b: Vsebnost potencialnega alkohola (vol. %) v vinih sorte šipon

Vsebnost potencialnega alkohola je po definiciji v alkohol preračunana količina reducirajočih sladkorjev, ki bi eventualno povreli v alkohol, pa niso; empirični faktor za preračun znaša 0,06 (Košmerl in Kač, 2010). V našem primeru je bila vsebnost potencialnega alkohola v razponu od 0,11 vol.% (vzorca 2 in 4) do 0,26 vol. % v vzorcu 5 (slika 9b).

4.2.7 Rezultati merjenja relativne gostote vina

Relativna gostota vina (d_{20}^{20}) je razmerje med gostoto vina pri 20 °C in gostoto vode pri enaki temperaturi (obvezna je temperaturna korekcija). Suha vina imajo relativno gostoto blizu 1, izjema so suha vina z veliko vsebnostjo alkohola, ki imajo relativno gostoto občutno manjšo od 1. Vina s preostankom sladkorja imajo praviloma relativno gostoto večjo od 1. Na gostoto vzorca vina vplivajo vse raztopljene snovi, ki so specifično težje (sladkorji, kisline, glicerol) ali specifično lažje od vode (alkohol) (Košmerl in Kač, 2004).



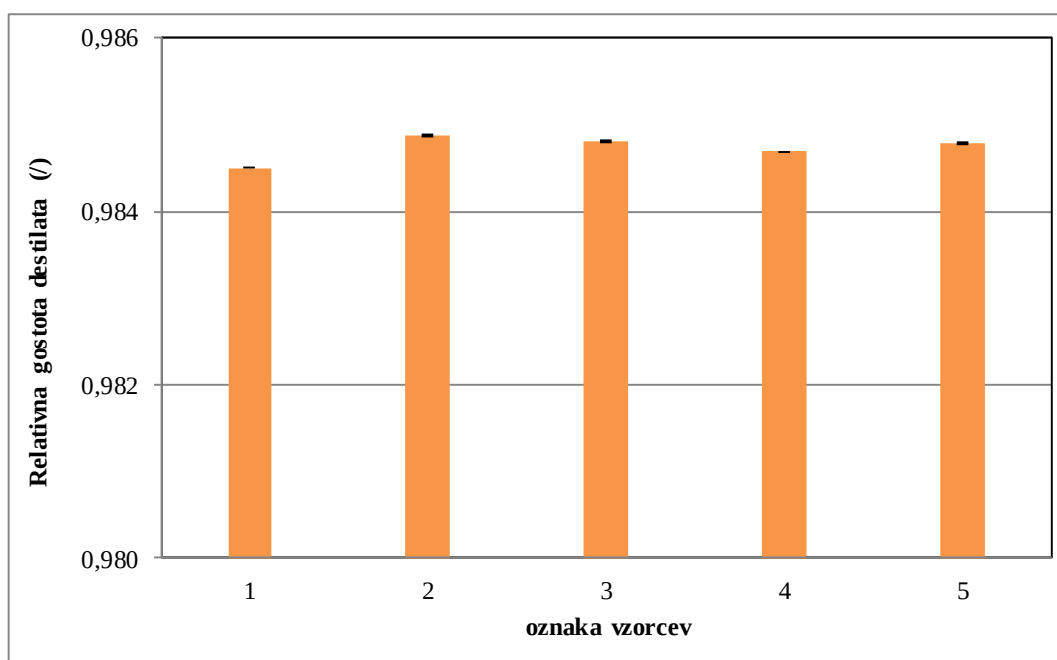
Slika 10: Relativna gostota vin sorte šipon

Vsi vzorci imajo pričakovano manjšo relativno gostoto od 1 in sicer je povprečna relativna gostota vseh vzorcev $0,99839 \pm 0,00001$. Največjo relativno gostoto ima vzorec številka 5 (0,99946), ki ima tudi največjo vsebnost reducirajočih sladkorjev (slika 8).

4.2.8 Rezultati merjenja relativne gostote alkoholnega destilata

Relativna gostota alkoholnega destilata je odvisna od koncentracije alkohola v vzorcu. Po vrednosti je manjša od relativne gostote vina in sicer so običajne vrednosti okrog 0,98. V našem primeru je znašala povprečna vrednost relativne gostote alkoholnega destilata vseh petih vzorcev $0,98473 \pm 0,00001$.

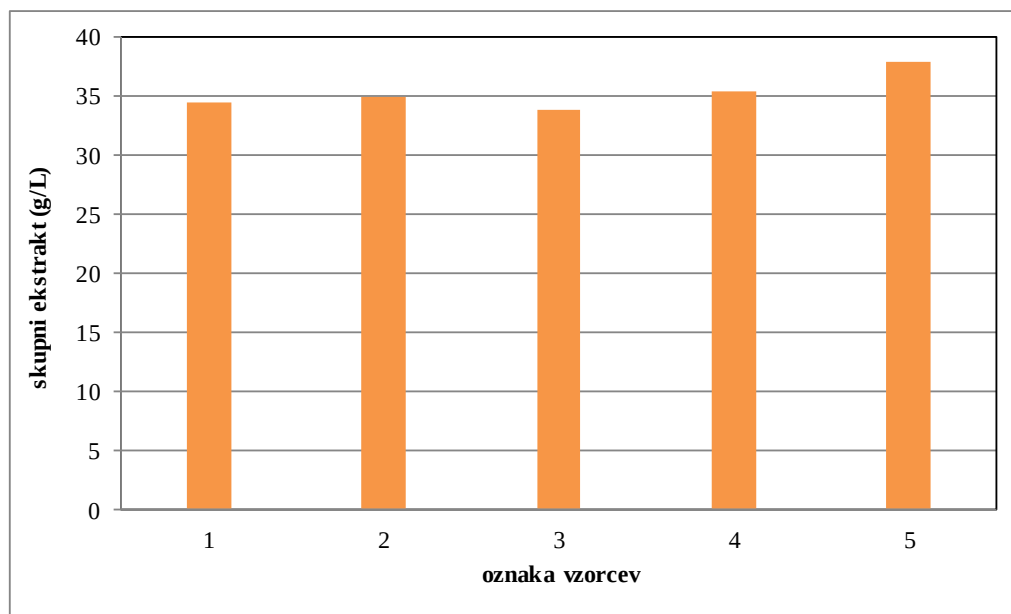
Na sliki 11 vidimo, da ima vzorec številka 1 najmanjšo relativno gostoto destilata (0,98450) in hkrati tudi največjo koncentracijo alkohola. Vzorec številka 2 ima največjo relativno gostoto destilata (0,98487) in hkrati tudi najmanjšo koncentracijo dejanskega alkohola (slika 9a).



Slika 11: Relativna gostota alkoholnih destilatov vin sorte šipon

4.2.9 Rezultati merjenja skupnega ekstrakta

Skupni ekstrakt vina (tudi skupni suhi ekstrakt), sestavljajo po definiciji O.I.V. pri 100 °C nehlapne komponente vina (sladkorji, fiksne kisline, organske soli, idr.) (Košmerl in Kač, 2004).

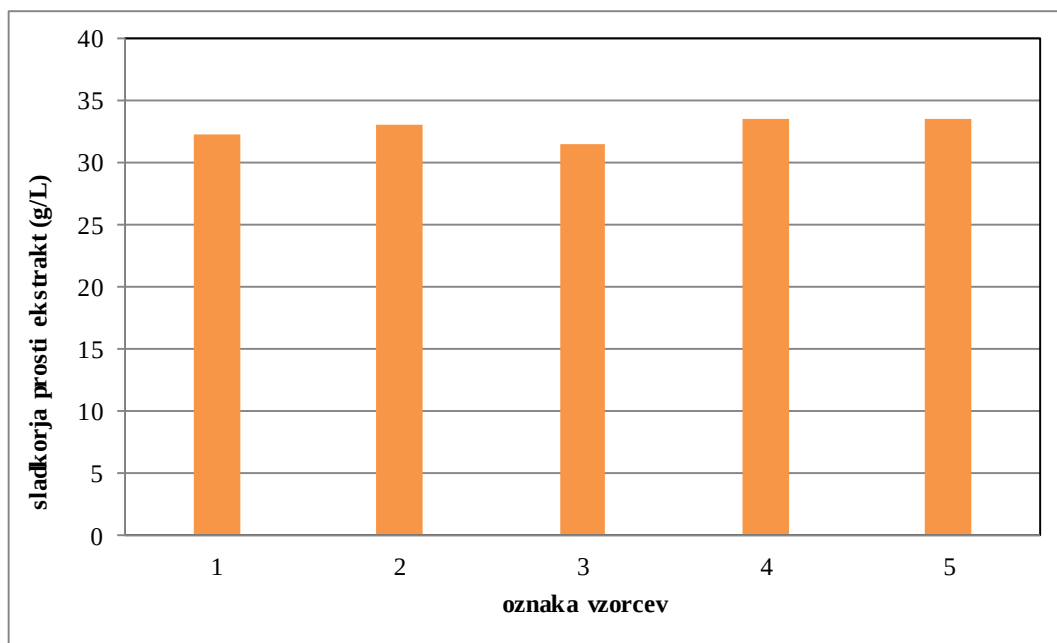


Slika 12: Vsebnost skupnega ekstrakta (g/L) v vinih sorte šipon

S slike 12 je razvidno, da ima največji skupni ekstrakt vzorec številka 5 (37,84 g/L), ki ima tudi največji ostanek reducirajočih sladkorjev v vinu (slika 8). Vsebnosti skupnega ekstrakta v preostalih vzorcih so bile v razponu od 33,87 g/L (vzorec 3) do 35,47 g/L (vzorec 4). Povprečna koncentracija vseh petih vzorcev znaša $35,30 \pm 1,54$ g/L.

4.2.10 Rezultati merjenja sladkorja prostega ekstrakta

Sladkorja prosti ekstrakt (SPE) je po definiciji razlika med skupnim ekstraktom in reducirajočimi sladkorji. Vsebnost je odvisna od sorte, zrelosti, načina trgatve in vinifikacije. Vpliv različnih sevov čiste kulture kvasovk v primerjavi s spontanim vrenjem po literaturnih podatkih ni statistično značilen (Košmerl in Kač, 2004).

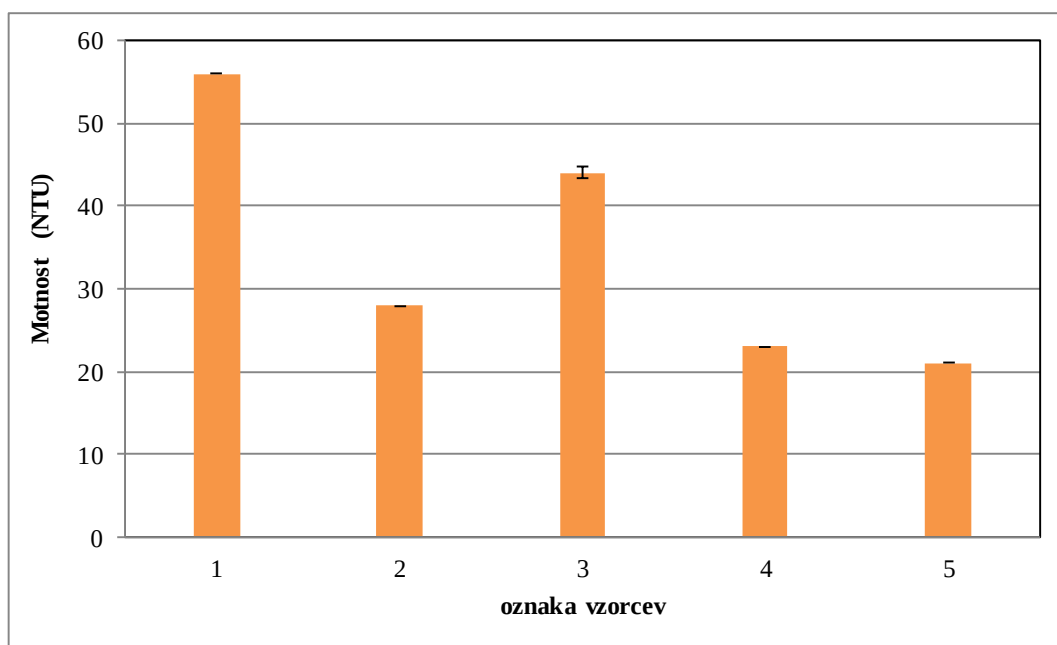


Slika 13: Vsebnosti sladkorja prostega ekstrakta (g/L) v vinih sorte šipon

Vsi vzorci imajo nadpovprečno vsebnost sladkorja prostega ekstrakta (slika 13). Po navedbah Košmerl in Kač (2004) znaša povprečje SPE okrog 20 g/L, v našem primeru pa je bistveno večje ($32,78 \pm 0,87$ g/L). Največjo vsebnost SPE smo določili v vzorcu številka 4 (33,57 g/L), najmanjšo pa v vzorcu 3 (31,57 g/L). Samo glede na ta parameter bi lahko vsa vina uvrstili v razred vrhunsko vino ZGP, za katerega velja najmanjša vsebnost SPE v belih vinih 20 g/L (Pravilnik o pogojih ..., 2004).

4.2.11 Rezultati merjenja motnosti

Po končanem fermentacijskem poskusu nismo uporabili nobenega čistilnega sredstva z namenom bistrenja ali čiščenja pridelanega vina. Vina tudi nismo filtrirali.



Slika 14: Motnost (NTU) vzorcev vin sorte šipon

Vzorci se po motnosti, izmerjeni pri 30 °C, med seboj precej razlikujejo. Najbolj moten je vzorec številka 1 (56 NTU), ki mu sledi vzorec številka 3 (43,5 NTU). Najmanj motna sta vzorca številka 5 (21 NTU) in 4 (23 NTU).

4.2.12 Vpliv fermentacijske posode na dobljene rezultate fizikalno-kemijskih analiz vina

Primerjali so dobljene rezultate vzorcev 1 in 3 (uporabljena kvasovka Zymaflore VL3) ter 2 in 4 (uporabljena komplet kvasovk LEVEL 2TD). Največje razlike so bile ugotovljene:

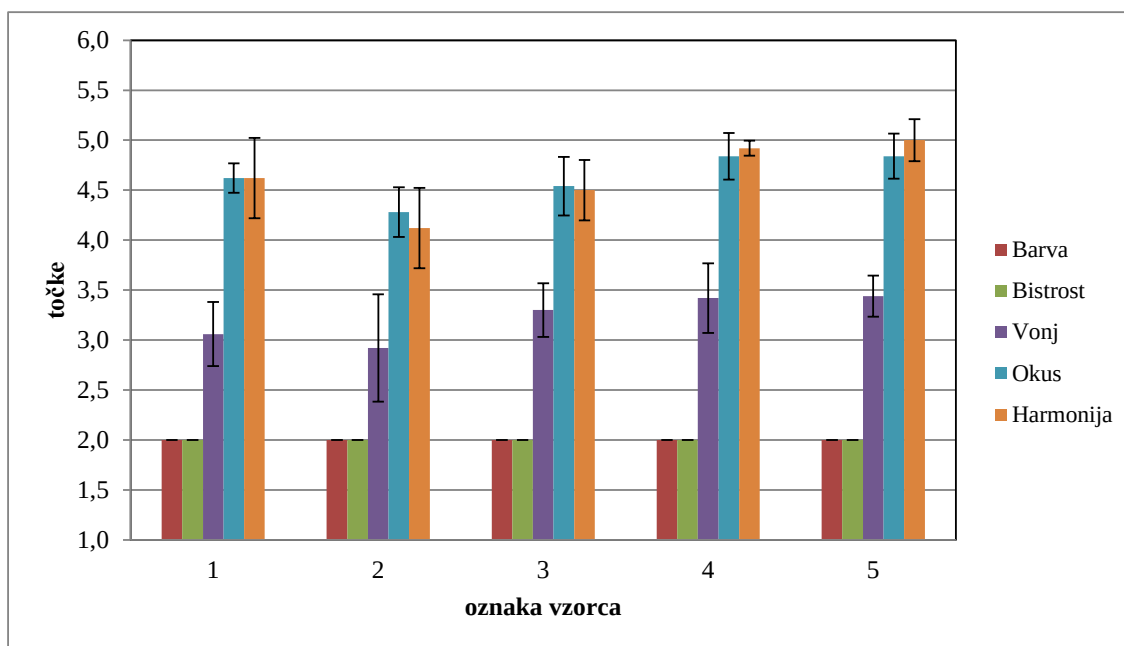
- v vsebnosti skupnega in vezanega SO₂ (značilno manj v vzorcu 3 v primerjavi z vzorcem 1), medtem ko ni bilo razlik v omenjenih parametrih med vzorcema 2 in 4;
- v višjem pH vzorcev 1 in 2 v primerjavi z vzorcema 3 in 4; torej lahko zaključimo, da je večja prostornina (900 L) in posoda iz nerjavnega jekla prispevala k povišanju pH v primerjavi z manjšo prostornino (225 L) in lesena posoda;
- ravno obratne in manj značilne razlike v primerjavi s pH smo dobili v vsebnostih titrabilnih in skupnih kislin med primerjanimi vzorci;
- v povečani vsebnosti skupnih kislin izstopata vzorca 3 in 4 (manjša prostornina in lesena posoda) v primerjavi z enakimi uporabljenima kvasovkama v večji prostornini in posodi iz nerjavnega jekla (vzorca 1 in 2);
- v vsebnostih reducirajočih sladkorjev in potencialnega alkohola so bile razlike zanemarljive, v vsebnosti dejanskega alkohola in relativne gostote alkoholnega destilata pa so omembe vredne razlike le v manjši vsebnosti vzorca 3 v primerjavi z vzorcem 1 pri dejanskem alkoholu in ravno obratno pri relativni gostoti alkoholnega destilata, ki je bila po vrednosti najmanjša v vzorcu 1;
- pričakovano so bile zanemarljive razlike med vzorci v vsebnostih skupnega in sladkorja prostega ekstrakta;
- za konec pa smo največje razlike dobili v motnosti vzorcev vin, pridelanih z obema uporabljenima starterskima kulturama kvasovk, ki je bila značilno večja v večji prostornini in posodi iz nerjavnega jekla v primerjavi z manjšo prostornino in leseno posodo; po razliki v motnosti, kot tudi v vrednosti NTU so predvsem izstopala pridelana vina s kvasovko Zymaflore VL3 (slika 14).

4.3 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE VINA

Senzorična analiza se je opravljala konec januarja leta 2011, v degustacijski sobi podjetja P&F Jeruzalem Ormož d.o.o.. Vzorce je ocenjevalo 5 šolanih preskuševalcev. Za prikaz rezultatov senzorične analize vin so se upoštevale vse ocene posameznih preskuševalcev. To sicer ni običajno, zlasti v primeru uradne modificirane 20-točkovne metode po Buxbaumu, kjer se izločita najmanjša in največja ocenam iz preostalih pa se izračuna povprečna vrednost (Pravilnik o postopku ..., 2000).

4.3.1 Rezultati senzoričnega ocenjevanje po Buxbaumovi metodi

Najprej smo vzorce ocenili po 20-točkovni Buxbaumovi metodi. Za bistrost lahko vzorec dobi največ 2 točki in enako za barvo. Za vonj se vzorcu lahko dodeli največ 4 točke, za okus in harmonijo vsakemu največ 6 točk.



Slika 15: Senzorična ocena vzorcev vin sorte šipon po Buxbaumovi metodi, z ločenim prikazom ovrednotenja posameznega parametra

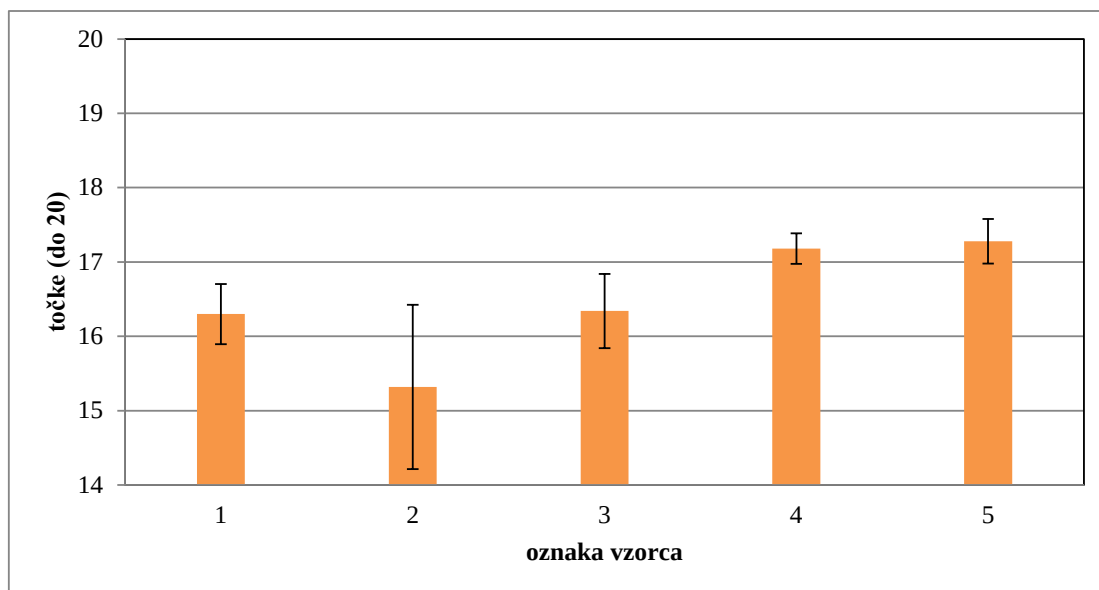
Bistrost: Bistrosti nismo ocenjevali objektivno, saj vzorci niso bili filtrirani in degustatorji so se dogovorili, da vsem vzorcem za bistrost dodelijo maksimalno možno število točk, torej 2 točki.

Barva: Pri ocenitvi barve se je opazoval odtenek barve (zeleni, rumenkasti, slamnati, zlati) in intenzivnost barve (bledikasta, vodena, srednje intenzivna, intenzivna). Vsi vzorci so imeli zelo lepo, intenzivno, rumeno zeleno barvo, ki so jo ocenjevalci nagradili z najvišjo možno oceno.

Vonj: Pri ocenitvi vonja so bili ocenjevalci pozorni na čistost, vrsto in intenzivnost vonja. Najbolje ocenjena vzorca sta bila vzorca številka 4 in 5.

Okus: Sledilo je okušanje vina, kjer so ocenjevalci posvetili pozornost časovni zakanavi posameznih okusov, njihovi intenzivnosti in obstojnosti. Vino v ustih z jezikom in nebom tudi tipno zaznamo in okusimo njegovo morebitno trpkost, polnost, ekstraktnost in toploto vina. Med pokušanjem se zaradi toplote v ustih začnejo še intenzivnejše sproščati vonji, ki jih primerjamo z vrsto in intenzivnostjo vonja, ki smo ga prej zaznali samo z vohanjem vina. Ko se vino izpljune ali popije, je potrebno biti pozoren še na dolžino in pookus vina, kjer ogrete hlapec izdahnemo skozi nos. Najbolje sta bila ocenjena vzorca številka 4 in 5, enako kot pri vonju.

Harmonija: Na koncu vino ocenimo glede na njegovo skladnost vonja in okusa, ocenimo njegov splošen vtis, kot celoto. Ponovno sta preskuševalce najbolj prepričala vzorca številka 4 in 5, kot že prej pri vonju in okusu.



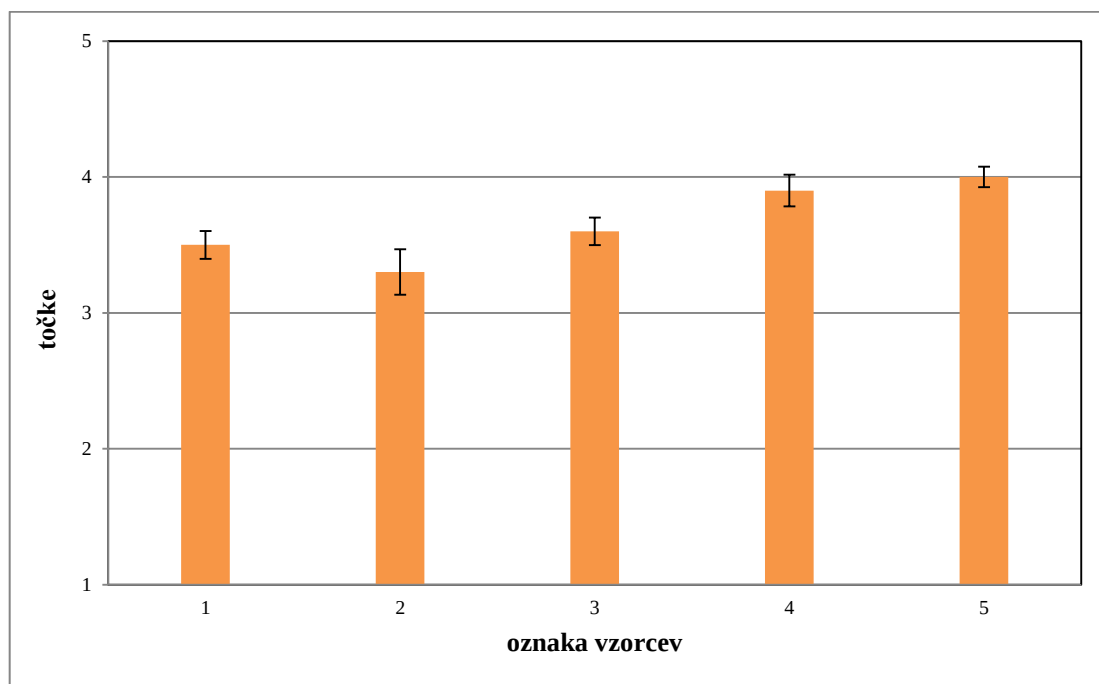
Slika 16: Skupna senzorična ocena vin sorte šipon, ocenjenih po Buxbaumovi metodi

Na sliki 16 so prikazani povprečni rezultati skupne ocene vzorcev po Buxbaumovi metodi (ocene vseh preskuševalcev), kjer sta najbolj ocenjena vzorca številka 4 in 5 z ocenama 17,2 in 17,3 točke, najslabšo skupno oceno pa je dobil vzorec številka 2, in sicer $15,3 \pm 1,1$ točke. Pri slednjem vzorcu je tudi razviden največji standardni odklon v oceni posameznih preskuševalcev, ki pa so bili bolj enotni pri preostalih vzorcih (s.o. je znašal od 0,2 točke pri vzorcu 4 do 0,5 točk pri vzorcu 3). Povprečna skupna senzorična ocena vseh petih vzorcev je bila kakovostna ($16,5 \pm 0,8$ točke). Zanimivo je dejstvo, da sta to povprečje presegle le vzorca 4 in 5, oba pridelana in zorena v leseni posodi, manjše prostornine.

4.3.2 Rezultati senzoričnega ocenjevanje z opisno metodo

S to metodo smo hoteli podrobneje opisati sadno intenzivnost vonja, kompleksnost aromatičnosti in polnost vina.

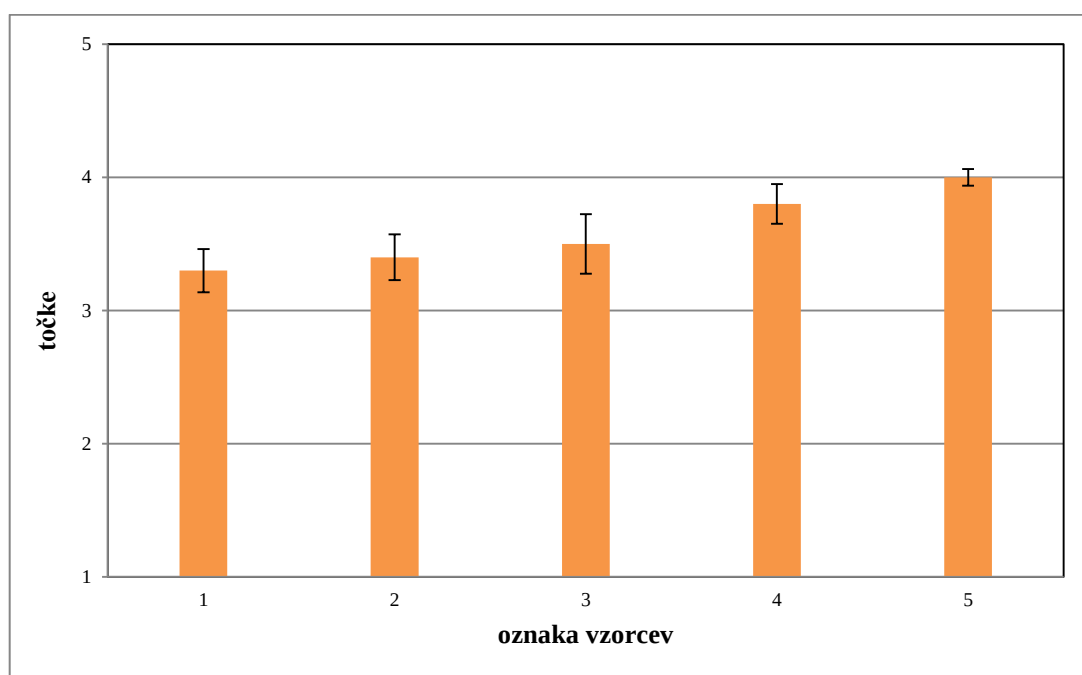
Intenzivnost sadnega vonja: Sadnost vonja vina je ena od želenih lastnosti, ki jo želi pridelovalec in ceni potrošnik, kupec. Ocenjevali smo sadnost vonja in njegovo intenzivnost.



Slika 17: Prikaz intenzivnosti sadnega vonja vina z ocenami 1 do 5, kjer 1 pomeni najmanj in 5 najbolj sadno intenzivno

Slika 17 kaže, da je imel vzorec številka 5 najbolj intenzivno izraženo sadnost. Ker je v njegovi oceni nekoliko večji standardni odklon lahko zaključimo, da mu je po intenzivnosti sadnosti enak tudi vzorec številka 4.

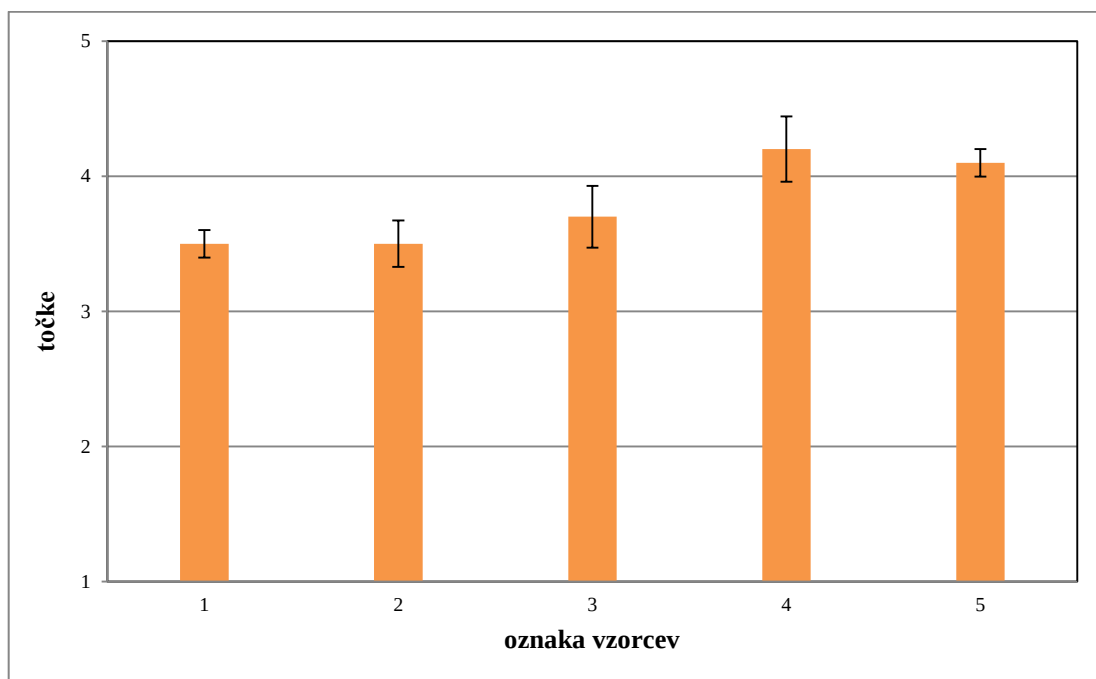
Kompleksnost aromatičnosti: Aromatika vina je odvisna od množice spojin, ki so v različno majhnih koncentracijah in lahko že posamezno ali v kombinaciji ponudijo značilne aromatične zaznave. Aromatika je lahko enostavna, omejena in ozka na eni strani ali izjemno široka, sestavljena, bogata in kompleksna na drugi.



Slika 18: Prikaz kompleksnosti aromatičnosti vina z ocenami 1 do 5 točk, kjer 1 pomeni najmanj in 5 najbolj kompleksno aromatičnost

Na sliki 18 je prikazana razlika v kompleksnosti aromatičnosti med posameznimi vzorci. Najbolj kompleksno aromatičnost ima vzorec številka 5.

Polnost vina: Polnost vina občutimo v ustih, kjer lahko nekatera vina delujejo lahkotno, vodeno in kratko, druga pa polno, bogato in trajajo. Za občutek polnosti vina je odgovornih več snovi od alkohola, višjih alkoholov, polisaharidov, idr.



Slika 19: Prikaz polnosti vina od 1 do 5 točk, kjer 1 pomeni najmanjšo in 5 največjo polnost

Na sliki 19 so prikazani rezultati ocenitve polnosti vzorcev vina, kjer je kot najbolj poln bil ocenjen vzorec številka 4. Konkretno je polnost vina najbolj v povezavi z vsebnostjo skupnega ekstrakta, ki je bila največja v vzorcu številka 5, sledil pa je vzorec 4.

5 SKLEPI IN POVZETEK

5.1 SKLEPI

V diplomski nalogi smo ugotavljali vpliv uporabe različnih tako vrst kot tudi rodov kvasovk na fizikalno-kemijske parametre in predvsem njihov vpliv na senzorične lastnosti pridelanega vina.

- V vseh vzorcih imamo velike vsebnosti skupnega SO₂, za kar je glavni razlog slabše zdravstveno stanje grozdja ob trgatvi, kar pomeni večje potrebe po žveplu skozi celoten proces predelave grozdja, pridelave in zorenja vina.
- Vrednosti pH so bile od mošta do vina povišane, ampak še vedno v mejah normale. Glede na večje vsebnosti skupnih kislin bi pričakovali nižje vrednosti pH. Razlog za neravnovesje lahko ponovno povezujemo z začetnim zdravstvenim stanjem grozdja, nikakor pa ne s fazami predelave grozdja, pridelave in/ali zorenja vina.
- Koncentracije tako titrabilnih in skupnih kislin so bile v pričakovanih območjih, ampak lahko rečemo, da je bilo vseh pet vzorcev kislinsko bogatih. Zmanjšanje skupnih kislin tekom alkoholne fermentacije (AF) in nadaljnjega dvomesečnega zorenja vina je bila v okviru pričakovane koncentracije (pod 1 g/L).
- Hlapne kisline so bile popolnoma v mejah normale, lahko rečemo celo, da glede na specifičnost vinifikacije vzorca številka 5, presenetljivo majhne. To še enkrat dokazuje izredno tehnološko dovršenost pridelave vina, ne oziraje se na fermentacijsko posodo ali uporabljeno startersko kulturo kvasovk, saj je povprečna vsebnost hlapnih kislin le $0,28 \pm 0,11$ g/L, kar je manj kot običajna koncentracija, ki jo tvorijo kvasovke kot sekundarni produkt AF.
- Vsi vzorci so prefermentirali do suhega, nekaj več ostanka reducirajočih sladkorjev ima samo vzorec številka 5 (4,3 g/L), kjer je bila dodana samo kvasovka rodu ne-*Saccharomyces*.
- Najslabši izkoristek pretvorbe sladkorja v alkohol je imel vzorec številka 2, ki je fermentiral v cisterni iz nerjavnega jekla z dodanimi kvasovkami iz kompleta LEVEL 2TD (11,3 vol. %). Najboljši izkoristek so imele kvasovke ZYMAFLORE VL3 (11,7 vol. %), prav tako iz nerjavnega jekla.

- Vrednosti relativne gostote vina in alkoholnega destilata so bile v pričakovanem območju.
- Vsa pridelana vina so imela nadpovprečno velike koncentracije skupnega ekstrakta in tudi sladkorja prostega ekstrakta (SPE), več kot 30 g/L. Samo po parametru SPE bi se vsa vina uvrstila v razred vrhunsko vino ZGP.
- Motnost vzorcev, ki smo jo določili, je bila pričakovana, saj nismo uporabili nobenih čistilnih in bistrilnih sredstev. Najbolj bistra sta bila vzorca številka 4 in 5.
- Pri senzorični analizi smo vzorce najprej ocenili po Buxbaumovi 20-točkovni metodi. Najbolje sta bila ocenjena vzorec številka 4 z oceno 17,2 in vzorec številka 5 z oceno 17,3. Najslabše ocenjeni vzorec je bil vzorec številka 2 z oceno 15,3.
- Pri ocenitvi vzorcev z opisno metodo, kjer smo ocenjevali intenzivnost sadnega vonja, je bil najbolje ocenjeni vzorec številka 5, takoj za njim pa vzorec številka 4. Popolnoma enak vrstni red omenjenih vzorcev je bil tudi pri ocenjevanju kompleksnosti aromatičnosti, medtem ko je bil pri polnosti vina najbolje ocenjen vzorec številka 4, takoj za njim pa vzorec številka 5.

5.2 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti vpliv različnih rodov in vrst kvasovk in njihovih kombinacij ter vpliv fermentacijske posode na fizikalno-kemijske in predvsem senzorične lastnosti tako pridelanih vin. Praktični del poskusa je potekal leta 2010 v kleti podjetja P&F Jeruzalem Ormož d.o.o. .

Fermentacijo smo izvedli na moštu iz sorte šipon. Leto 2010 je bilo zelo zahtevno za vinogradnike in posledično tudi za vinarje, saj je v ključnem času dozorevanja grozdja, en mesec pred trgatvijo, bilo izjemno deževno vreme, ki je trajalo vse do trgatve, kar je odločilno prispevalo k zelo slabemu zdravstvenemu stanju grozdja, še posebej sorte šipon, kar se je odražalo tudi na samem fermentacijskem poskusu.

Fermentacijski poskus smo izvedli v dveh 900 L zaprtih cisternah iz nerjavnega jekla in v treh rabljenih 225 L barrique sodih. V cisternah smo uporabili kvasovke Zymaflore VL3 v

eni in komplet kvasovk LEVEL 2TD v drugi cisterni. V barrique sodih smo uporabili kvasovke Zymaflore VL3 v enem, komplet kvasovk LEVEL 2TD v drugem in samo ne-*Saccharomyces* kvasovko iz kompleta LEVEL 2TD. Fermentacija je potekala pri temperaturi med 16 in 18 °C.

Pričakovali smo, da sod, kjer smo uporabili samo ne-*Saccharomyces* kvasovko, ne bo zaključil fermentacije. Fermentacija je tudi tu potekla praktično do konca, saj je ostalo samo 4,3 g/L reducirajočih sladkorjev. Da se je fermentacija iztekla tako pozitivno kot se je, je pripomoglo več stvari. Relativno nizka začetna koncentracija sladkorjev v moštu, močno okuženo grozdje, ki je prineslo s sabo tudi močan kvasni nastavek in uporaba rabljenega barrique soda z naseljeno svojo mikrofloro. Izkazalo se je, da je bil ta sod, vzorec številka 5, celo najboljše ocenjen oziroma podobno dobro kot vzorec številka 4, kjer se je uporabil komplet LEVEL 2TD.

Fermentacija je potekala umirjeno in dokaj čisto, nekaj težav se je pojavilo samo pri vzorcu številka 2 v 900 L cisterni, kjer smo uporabili komplet kvasovk LEVEL 2TD, kjer se je proti koncu fermentacije pojavila redukcija, ki je nismo uspeli popolnoma odpraviti, kar se je poznalo tudi na senzorični oceni.

S senzorično analizo smo uspeli pokazati pozitivne učinke delovanja ne-*Saccharomyces* kvasovk na skupno senzorično zaznavo pridelanega vina. Opazna je bila višja skupna ocena po Buxbaumovi metodi in tudi opazno boljše ocene pri opisni analizi za intenzivnost sadnega vonja, večji kompleksnosti aromatičnosti in večji polnosti pridelanega vina.

Rezultati poskusa kažejo, da bi uporaba ne-*Saccharomyces* kvasovk v kombinaciji z izbrani sevi *Saccharomyces* kvasovk, lahko bila primerna za vina, kjer iščemo večjo polnost in sadnost vina. Nenazadnje se tovrstna tehnologija pridelave vina tudi vse bolj uveljavlja med vinarji, ki hočejo dodati svojim vinom novo dimenzijo, ki jim s tem pomaga dosegati boljše tržne rezultate.

6 VIRI

- Bavčar, D. 2013. Kletarjenje danes. Ljubljana, Kmečki glas: 295 str.
- Bely M., Stoeckle P., Maaneuf-Pomarede I., Dubourdieu D. 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii* - *Saccharomyces cerevisiae* culture media on high sugar fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 3: 312-320
- Bisson L.F. 1999. Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 1: 107-119
- Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 394-411
- Castelli T. 1955. Yeast of wine fermentations from various regions of Italy. *American Journal of Enology and Viticulture*, 6: 18-20
- Ciani M., Comitini F., Mannazzu I., Dominizio P. 2010. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeast in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10, 2: 123-133
- Erasmus D.J., Cliff M., van Vuuren H.J.J. 2004. Impact of yeast strain on the production of acetic acid, glycerol, and the sensory attributes of icewine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 4: 371-378
- Fia G., Giovani G., Rosi I. 2005. Study of β -glucosidase production by wine-related yeasts during alcoholic fermentation: a new rapid fluorimetric method to determine enzymatic activity. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 3: 509-517
- Golob T., Jamnik M., Bertoneclj J., Doberšek U. 2005. Senzorična analiza: metode in preskuševalci. *Acta Agriculturae Slovenica*, 85, 1: 55-66
- Hrček L., Korošec-Koruza Z. 1996. Sorte in podlage vinske trte: ilustriran prikaz trsnega izbira za Slovenijo. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas: 40-44
- Košmerl T. 2007. Alkoholna fermentacija mošta: izbrana poglavja pri predmetu Tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 95 str.
- Košmerl T., Kač M. 2004. Osnovne kemijske analize mošta in vina: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. 2. izd. popravljena in dopolnjena. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 106 str.
- Mauricio J.C., Guijo S., Ortega J.M. 1991. Relationship between phospholipid and sterol contents in *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* and their fermentation activity in grape musts. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42: 301-308

- Magyar I., Tóth T. 2011. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains *Candida stellata*, *Candida zemplinina*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. Food Microbiology, 28, 1: 94-100
- Moreira N., Mendes F., How T., Vasconcelos I. 2005. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculated wine yeasts. International Journal of Food Microbiology, 103, 3: 285-294
- Nemanič J. 2006. Ali razumemo vino. Ljubljana, Kmečki glas: 279 str.
- Oenobrand SAS. 2016. Anchor VIN 7 – Product data sheet. Montpellier, Oenobrand: 2 str.
<http://oenobrand.com/en/our-brands/anchor/new-world-wine-yeast/product-data-sheets/vin-7> (april, 2016)
- Pravilnik o postopku in načinu ocenjevanja mošta, vina in drugih proizvodov iz grozdja in vina. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 32: 3857-3862
- Pretorius I.S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast, 16: 675– 729
- Raspor P. 1996. Kvasovke. V: Biotehnologija: osnovna znanja. Raspor P. (ur.) Ljubljana, BIA, d. o. o.: 70-80
- RPGV. 2015. Register pridelovalcev grozdja in vina. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: baza podatkov
www.mkgp.gov.si/si/delovna_podrocja/kmetijstvo/kmetijski_trgi/vino/ (september, 2016)
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B. in Lonvaud A. 2000. Handbook of enology. Vol.1: The microbiology of wine and vinification. Chichester, John Wiley & Sons Ltd: 454 str.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R.J. 1995. Higher alcohol and acetic acid production by apiculate wine yeasts. Journal of Applied Microbiology, 73: 126–130
- Sommer P., Bunte A., Stolpe E., Kaldahl P. 2007. Flavour enhancement by use of mixed yeast starter cultures of *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine. V: 8th International Symposium Innovations in Enology, 20-23 April 2007, Stuttgart. Stuttgart, Intervitis/Interfruct: 282-283
- Soden A., Francis I.L., Oakey H., Henschke P.A. 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. Australian Journal of Grape and Wine Research 6, 1: 21-30

- Spiropoulos A., Bisson L.F. 2000. MET17 and hydrogen sulfide formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 10: 4421-4426
- Stone H., Sidel J.L. 1993. Sensory evaluation practices. London, Academic Press: 311 str.
- Zafošnik T. 1995. Šipon - naša žlahtna posebnost. Gornja Radgona, Pomurski tisk: 25 str.
- Zott K., Thibon C., Bely M., Lonvaud-Funel A., Dubordieu D., Masneuf-Pomerade I. 2011. The grape must non-*Saccharomyces* microbial community: impact on volatile thiol release. *International Journal of Food Microbiology*, 151: 210-215

ZAHVALA

Najprej bi se rad zahvalil mentorici prof. dr. Tatjani Košmerl, da ni obupala nad mano in je s svojo energijo odločilno pripomogla k dokončanju diplomske naloge. Res hvala za vso pomoč, strokovno usmerjanje ter popravke v ekstremno kratkem roku.

Prav tako gre zahvala ga. Barbari Slemenik, univ. dipl. bibl., ki je potrpežljivo pregledala in popravila tehnično raven diplomske naloge. Vse to je opravila v izjemno kratkem roku in izven rednega delovnega časa. Res sem vam hvaležen.

Hvala tudi ga. Zdenki Zupančič za pomoč pri laboratorijskih analizah.

Jana, hvala za pomoč pri oblikovanju naloge.

Hvala staršem, da so mi omogočili študij in verjeli vame. Hvala Katji za vso razumevanje in podporo med študijem in ob pisanju diplomske naloge.

Hvala tudi vsem neimenovanim, ki so kakorkoli pripomogli k uspešnemu zaključku.

PRILOGE

Priloga A: Izračun masne koncentracije skupnega suhega ekstrakta (g/L) iz relativne gostote d_{SE} pri 20 °C
(Košmerl in Kač, 2007)

2. decimalno mesto	3. decimalno mesto																			
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9										
	Koncentracija SE (g/L)																			
1,00	0,0	2,6	5,1	7,7	10,03	12,9	15,4	18,0	20,6	23,2										
1,01	25,8	28,4	31,0	33,6	36,2	38,8	41,3	43,9	46,5	49,1										
1,02	51,7	54,3	56,9	59,5	62,1	64,7	67,3	69,9	72,5	75,1										
1,03	77,7	80,3	82,9	85,5	88,1	90,7	93,3	95,9	98,5	101,1										
1,04	103,7	106,3	109,0	111,6	114,2	116,8	119,4	122,0	124,6	127,2										
1,05	129,8	132,4	135,1	137,7	140,3	142,9	145,5	148,1	150,7	153,3										
Koncentracija SE (g/L)																				
											4. decimalno mesto									
											1	2	3	4	5	6	7	8	9	

Legenda: SE = skupni ekstrakt