

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Eva LESKOVŠEK

**POTEK JABOLČNO-MLEČNOKISLINSKE
FERMENTACIJE BELEGA MOŠTA IN VINA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Eva LESKOVŠEK

**POTEK JABOLČNO-MLEČNOKISLINSKE FERMENTACIJE
BELEGA MOŠTA IN VINA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE COURSE OF MALOLACTIC FERMENTATION
IN GRAPE MUST AND WINE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo v laboratorijih Katedre za tehnologije, prehrano in vino, Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Tatjana Košmerl in za recenzentko izr. prof. dr. Barbara Jeršek.

Mentorica: prof. dr. Tatjana Košmerl

Recenzentka: izr. prof. dr. Barbara Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga 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.

Eva Leskovšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 663.252/.256:663.221:543.2/.9(043)=163.6
KG	mošt / vino / belo vino / jabolčno-mlečnokislinska fermentacija / mlečnokislinske bakterije / vinifikacija / fizikalno-kemijske lastnosti / senzorične lastnosti
AV	LESKOVŠEK, Eva
SA	KOŠMERL, Tatjana (mentorica) / JERŠEK, Barbara (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	POTEK JABOLČNO-MLEČNOKISLINSKE FERMENTACIJE BELEGA MOŠTA IN VINA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 62 str., 2 pregl., 29 sl., 34 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen poskusa je bil ugotoviti vpliv jabolčno-mlečnokislinske fermentacije (JMKF) na kakovost vina sorte laški rizling. Ugotavljali smo, kako različni časovni dodatek dveh različnih sevov mlečno-kislinskih bakterij (MKB) vpliva na fizikalno-kemijske in senzorične lastnosti pridelanega vina. Za izvedbo poskusa smo izbrali sorto laški rizling iz vinorodnega okoliša Štajerska Slovenija. Vinifikacije so potekale v 28 L fermentacijskih posodah in v 600 mL fermentacijskih steklenicah. V vzorcih smo opravili fizikalno-kemijske analize vrednosti pH in pufrne kapacitete, vsebnosti titrabilnih in skupnih kislin, skupnega ekstrakta, alkohola, hlapnih kislin, prostega in skupnega žveplovega dioksida, reducirajočih sladkorjev, s HPLC smo analizirali vsebnosti posameznih organskih kislin (jabolčne, mlečne, vinske, jantarne, očetne in citronske), spremljali nastanek CO ₂ in senzorično ocenili vzorce vina. Vzorce smo primerjalno obravnavali med sabo. Na kakovost vina in na popolnejše dokončanje JMKF izraziteje vpliva inokulacija MKB v vino po končani alkoholni fermentaciji v primerjavi z vrsto uporabljene startrske kulture MKB. Na kinetiko kvasovk čas dodatka in uporabljena startrska kultura MKB ne vplivata. Senzorična ocena po Bauxbaumovi metodi med posameznimi vzorci ni pokazala značilnih razlik, katere smo vendarle dokazali z opisno senzorično analizo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 663.252/.256:663.221:543.2/.9(043)=163.6
CX	musts / wines / white wines / malolactic fermentation / lactic acid bacteria / vinification / psysico-chemical properties / sensory properties
AU	LESKOVŠEK, Eva
AA	KOŠMERL, Tatjana (supervisor) / JERŠEK, Barbka (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY	2016
TI	THE COURSE OF MALOLACTIC FERMENTATION IN GRAPE MUST AND WINE
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	X, 62 p., 2 tab., 29 fig., 34 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The goal of our experiment was to find out how did the malolactic fermentation (MLF) influence on the quality of wine Welschriesling. We found out how different time addition of two different strains of lactic acid bacteria (LAB) have an impact on the physico-chemical and sensory characteristics of produced wine. For an experiment we have chosen Welschriesling from wine growing hills in Styria Slovenia. Vinification took place in fermentation containers (28 L) and in fermentation bottles (600 mL). On samples we have done chemical-physical values of pH and buffer capacity, content of titratable and total acid, total extract, alcohol, volatile acidity, free and total sulphur dioxide, reducing sugars, with HPLC we analysed the contents of organic acids (malic, lactic, tartaric, succinic, acetic and citric) and watched the formation of CO ₂ and sensory evaluate wine samples. Samples were comparatively discussed. On the quality of wine and on fuller completion of MLF, the LAB inoculation in wine has a pronounced impact after the completion of the alcoholic fermentation in comparison with used LAB starter cultur. On the kinetics of yeasts, time addition and used LAB starter cultur, typically has no affect. Sensory evaluation by Bauxbaum method showed insignificant differences between individual samples. Despite small differences, they are mainly related to a descriptive sensory analysis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 OPIS SORTE LAŠKI RIZLING	4
2.2 JABOLČNO-MLEČNOKISLINSKA FERMENTACIJA	6
2.2.1 Znižanje koncentracije kislin	7
2.2.2 Aroma vina	7
2.2.3 Vpliv na mikrobiološko stabilnost	8
2.2.4 Mlečnokislinske bakterije vina	8
2.2.4.1 Bakterije vrste <i>Oenococcus oeni</i>	9
2.2.5 Dejavniki, ki vplivajo na mlečnokislinsko fermentacijo	9
2.2.5.1 Temperatura	10
2.2.5.2 Alkohol	10
2.2.5.3 Vrednost pH	10
2.2.5.4 Vsebnost SO ₂	10
2.2.5.5 Hranilne snovi	10
2.2.5.6 Prisotnost O ₂ in CO ₂	11
2.2.5.7 Organske kisline	11
2.2.5.8 Mikrobne interakcije	11
2.2.5.9 Lizocim	12
2.2.5.10 Bakteriofagi	12
2.2.6 Organske kisline	12
2.2.6.1 Jabolčna kislina	13
2.2.6.2 Vinska kislina	14

2.2.6.3	Mlečna kislina	14
2.2.6.4	Citronska kislina	15
2.2.6.5	Jantarna kislina	16
2.2.6.6	Ocetna kislina	16
3	MATERIAL IN METODE	17
3.1	MATERIAL	17
3.1.1	Mošt	17
3.1.2	Startrske kulture	17
3.1.3	Enološka sredstva	18
3.2	ZASNOVA POSKUSA	18
3.3	FIZIKALNE IN KEMIJSKE ANALIZE	21
3.3.1	Določanje vrednosti pH v vinu	22
3.3.2	Določanje pufrne kapacitete v vinu	22
3.3.3	Določanje skupnih (titrabilnih) kislin v vinu	23
3.3.4	Določanje relativne gostote, skupnega ekstrakta in alkohola v vinu	24
3.3.5	Določanje vsebnosti sladkorjev v vinu	25
3.3.6	Določanje žveplovega dioksida v vinu	25
3.3.7	Določanje hlapnih kislin v vinu	26
3.3.8	Določanje vsebnosti organskih kislin z metodo HPLC	27
3.3.9	Spremljanje nastanka CO ₂ med fermentacijo	29
3.4	SENZORIČNA ANALIZA	29
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	31
5	SKLEPI	56
6	POVZETEK	57
7	VIRI	59
ZAHVALA		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Koncentracije organskih kislin v pripravljenih standardih	28
Preglednica 2: Kemijski parametri mošta sorte laški rizling letnika 2006	31

KAZALO SLIK

Slika 1:	Sorta laški rizling (Hrček in Korošec-Koruza, 1996)	5
Slika 2:	Vrenje v 600 mL fermentacijskih steklenicah	18
Slika 3:	Vrenje v 28 L fermentacijskih posodah	20
Slika 4:	Shema poteka eksperimentalnega dela	21
Slika 5:	Spreminjanje vrednosti pH med vinifikacijami vina sorte laški rizling	32
Slika 6:	Spreminjanje pufrne kapacitete med vinifikacijami vina sorte laški rizling	33
Slika 7:	Spreminjanje vsebnosti titrabilnih kislin med vinifikacijami vina sorte laški rizling	34
Slika 8:	Spreminjanje vsebnosti skupnih kislin med vinifikacijami vina sorte laški rizling	35
Slika 9:	Spreminjanje relativne gostote med vinifikacijami vina sorte laški rizling	36
Slika 10:	Spreminjanje vsebnosti skupnega ekstrakta med vinifikacijami vina sorte laški rizling	37
Slika 11:	Spreminjanje vsebnosti etanola med vinifikacijami vina sorte laški rizling	38
Slika 12:	Spreminjanje sladkorne stopnje med vinifikacijo vina sorte laški rizling	39
Slika 13:	Spreminjanje vsebnosti reducirajočih sladkorjev med vinifikacijo vina sorte laški rizling	40
Slika 14:	Vsebnosti skupnega žveplovega dioksida po Ripperju	41
Slika 15:	Vsebnosti prostega žveplovega dioksida po Ripperju	42
Slika 16:	Spreminjanje vsebnosti hlapnih kislin med vinifikacijo vin sorte laški rizling	43
Slika 17:	Spremljanje vsebnosti jabolčne (JBK) in mlečne kisline (MK) med vinifikacijo kontrolnega vzorca vina sorte laški rizling	44

Slika 18:	Spremljanje vsebnosti jabolčne (JBK) in mlečne kisline (MK) med vinifikacijo koinokuliranega vzorca vina (MKB1) sorte laški rizling	45
Slika 19:	Spremljanje vsebnosti jabolčne (JBK) in mlečne kisline (MK) med vinifikacijo koinokuliranega vzorca vina (MKB2) sorte laški rizling	46
Slika 20:	Spremljanje vsebnosti jabolčne (JBK) in mlečne kisline (MK) med vinifikacijo inokuliranega vzorca vina (MKB1) sorte laški rizling	47
Slika 21:	Spremljanje vsebnosti jabolčne (JBK) in mlečne kisline (MK) med vinifikacijo inokuliranega vzorca vina (MKB2) sorte laški rizling	48
Slika 22:	Spremljanje vsebnosti vinske (VK), jantarne (JK), očetne (OK) in citronske kisline (CK) med vinifikacijo kontrolnega vzorca vina sorte laški rizling	49
Slika 23:	Spremljanje vsebnosti vinske (VK), jantarne (JK), očetne (OK) in citronske kisline (CK) med vinifikacijo koinokuliranega vzorca vina (MKB1) sorte laški rizling	49
Slika 24:	Spremljanje vsebnosti vinske (VK), jantarne (JK), očetne (OK) in citronske kisline (CK) med vinifikacijo koinokuliranega vzorca vina (MKB2) sorte laški rizling	50
Slika 25:	Spremljanje vsebnosti vinske (VK), jantarne (JK), očetne (OK) in citronske kisline (CK) med vinifikacijo inokuliranega vzorca vina (MKB1) sorte laški rizling	50
Slika 26:	Spremljanje vsebnosti vinske (VK), jantarne (JK), očetne (OK) in citronske kisline (CK) med vinifikacijo inokuliranega vzorca vina (MKB2) sorte laški rizling	51
Slika 27:	Fermentacijska krivulja med vinifikacijami vina sorte laški rizling	52
Slika 28:	Vrelna krivulja med vinifikacijami vina sorte laški rizling	53
Slika 29:	Senzorična ocena vzorcev vina sorte laški rizling	54

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AF	alkoholna fermentacija
CO ₂	ogljikov dioksid
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Pressure Liquid Chromatography)
JMKF	jabolčno-mlečnokislinska fermentacija
MKB	mlečnokislinske bakterije
°Oe	Oechslejeva stopinja (enota za sladkorno stopnjo mošta)
SO ₂	žveplov dioksid
SK	skupne kisline
TK	titrabilne kisline

1 UVOD

Pridelava vina je posledica kompleksnega ekološkega in biokemijskega procesa, za katerega so odgovorni mnogi mikroorganizmi, najpomembnejše med njimi so kvasovke in mlečnokislinske bakterije (MKB).

V vinarstvu poznamo primarno fermentacijo, to je alkoholna fermentacija (AF), ki jo vodijo kvasovke. Za potek sekundarne, jabolčno-mlečnokislinske fermentacije (JMKF) so odgovorne mlečnokislinske bakterije. JMKF je biološki način zmanjšanja količine kislin v vinu, poimenujemo ga tudi biološki razkis vina. Močnejša, agresivnejša jabolčna kislina se pretvori v milejšo mlečno kislino in CO₂, pri čemer nastane vrsta značilnih aromatskih spojin. JMKF je torej zaželena in koristna pri vinih z visoko skupno kislino in tam, kjer prevladuje jabolčna kislina. JMKF je pomembna v vinarstvu zaradi zmanjšanja kislosti vina, izboljšanja senzoričnih lastnosti in za doseganje mikrobiološke stabilnosti vina (Krieger, 2002).

Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija se bistveno pogosteje izvaja v rdečih vinih. Zanja se vse bolj odločajo tudi pridelovalci belih vin iz hladnejših vinorodnih območij, ki v slabših letnikih vina opažajo neugodno razmerje kislin in pomanjkljivosti aromatičnosti vina (Krieger, 2002).

Po podatkih za leto 2006 se v Sloveniji največ belega vina, to je 54 %, pridelava v vinorodni deželi Podravje, kjer se v primerjavi z vinorodnima deželama Posavje in Primorska, pridelava tudi največ vina sorte laški rizling in sicer 77 % (Vodovnik Plevnik in Vodovnik, 2007).

Za vina vinorodne dežele Podravje, vinorodni okoliš Štajerska Slovenija, so glede na naravne danosti značilne višje skupne kisline. Količina jabolčne kisline pogosto prevlada nad vinsko kislino, kar poveča neharmoničnost v vinu. Skupaj z nižjo vsebnostjo aromatičnih spojin se te lastnosti še posebej močno izražajo pri belih vinih (Vodovnik in Vodovnik, 1999). V slabih letih, ko grozdje slabo dozoreva in ko vsebnost skupnih kislin ostaja visoka, se vinarji vinorodne dežele Podravje vse pogosteje zatekajo k biološkemu postopku za zniževanje kislin v vinu. V preteklosti so se vinarji

izogibali JMKF v belih vinih, saj je niso znali uspešno uporabljati. Prav zaradi neznanja pri vodenju razkisa in doseganja neželenih rezultatov, se nekateri pridelovalci belih vin sprašujejo, ali je smiselno uporabljati JMKF pri belih vinih (Bavčar, 2006).

Kljub slabi predispoziciji mošta (nizka sladkorna stopnja, višja vsebnost skupnih kislin, nizek pH), bi s poskusom radi dokazali, da lahko z uporabo JMKF izboljšamo kakovost vina sorte laški rizling, uravnovesimo razmerje kislin in vino obogatimo na novih aromatičnih spojinah.

V diplomski nalogi smo se osredinili na vrsto uporabljenega seva startrske kulture in časa dodatka kulture v medij. Želimo ugotoviti, kako dejavniki med JMKF vplivajo na končno kakovost vina, na fizikalno-kemijske in tudi na senzorične lastnosti vina.

1.1 NAMEN DELA

V poskusu nas je zanimalo, kako jabolčno-mlečnokislinska fermentacija vpliva na fizikalno-kemijsko in senzorično kakovost vina sorte laški rizling vinorodne dežele Podravje. Izvedli smo pet ločenih poskusov glede na različen časovni dodatek startrske kulture dveh različnih sevov mlečnokislinskih bakterij. Hkrati z merjenjem oddanega CO₂ smo spremljali kinetiko kvasovk med alkoholno fermentacijo.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Po postopku jabolčno-mlečnokislinske fermentacije pričakujemo pozitiven vpliv na kakovost vina sorte laški rizling, kar naj bi se odrazilo v kompleksnejši aromi, polnosti okusa, kislinskem ravnotežju in mikrobiološki stabilnosti vina.

Glede na različen časovni dodatek dveh različnih sevov MKB v mošt ali vino pričakujemo:

- spremembe fizikalno-kemijskih lastnosti pridelanega vina med posameznimi vzorci,

- različen potek JMKF od časa dodatka in uporabljenega seva startrske kulture MKB,
- da dodatek startrske kulture MKB ne bo značilno vplival na kinetiko kvasovk med alkoholno fermentacijo,
- hitrejši začetek in krajše trajanje JMKF pri koinokulaciji v mošt v primerjavi z inokulacijo v mlado vino,
- popolnejše dokončanje JMKF pri koinokulaciji v mošt in zato večjo kakovost vina,
- spremembe senzoričnih lastnosti pridelanega vina med posameznimi vzorci.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OPIS SORTE LAŠKI RIZLING

Po ekološko – geografski razvrstitvi sort glede na poreklo spada sorta laški rizling v zahodnoevropsko skupino – *Proles occidentalis*. Izvira iz Francije. V vinorodni deželi Podravje je laški rizling najbolj razširjena sorta. Precej ga je tudi v posavski in nekaj tudi v primorski vinorodni deželi.

Grozd sorte laški rizling je valjaste oblike, majhen ali srednje velik in zelo zbit. Pogosto ima poleg glavnega grozda še značilen prigrzod. Kot vidimo na sliki 1 so jagode majhne in okrogle, navadno zelene do zeleno-rumene barve, pikčaste z rjavimi lisami tam, kjer so izpostavljene soncu. Masa grozda je v razponu od 60 do 150 gramov. Laški rizling je srednje bujna sorta. Pridelek je velik, tako da mnogi štejejo to sorto med “masovnice”. Zahteva najodličnejše lege, rodovitna in srednje vlažna tla. Odporna je proti večini bolezni. Sodi med pozne sorte in v slabih letih ne more dobro dozoreti, vendar kljub temu daje tudi ob slabših letnikih vino dobre kakovosti (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

Sorta dosega povprečno 71–75 °Oe sladkorja v moštu. Vino ima dokaj visoko stopnjo kisline (7–7,6 g/L) in nižjo alkoholno stopnjo (9,5–10,5 vol.%). Ob pravem času trgatve doseže primerno kislino, ki daje vinu svežino, živahnost in harmoničnost. V dobrih legah in pri dobri dozorelosti grozdja daje laški rizling kakovostna vina z izrazitimi sortnimi lastnostmi, prijetno svežega okusa in prijetnega vonja (Hrček in Korošec-Koruza, 1996).

Mnogi avtorji navajajo, da daje ta sorta srednje kakovostna, nevtralna vina, ki naj bi bila primerna za rezanje z močnejšimi vini. Slovenske izkušnje z vini sorte laški rizling so dobre, zato vidimo v tej sorti več kot le prijetno nevtrarno vino, ki je sposobno izraziti sortnost s tako razpoznavnimi in enkratnimi značilnostmi (Nemanič, 1996a).

Laški rizling je primeren tudi za vina posebne kakovosti, kot so pozna trgatev, izbor, jagodni izbor, ledeno vino ali suhi jagodni izbor. Ob izjemnih letnikih dosega zavidljivo

kakovost. Pogosto ga dodajajo v mešana vina z geografskim poreklom (cviček, belokranjec) predvsem tam, kjer lege in zemlja niso najbolj primerne (Nemanič, 1996a).

Pri mladih kakovostnih vinih so barve od svetlo rumenozelene do zlatorumene in zlate pri vinih posebne kakovosti, pridelanih iz prezrelega grozdja (Nemanič, 1996a).

V vinu najdemo različne vonjave, enostavne, ki se pojavijo pri slabših letnikih in sestavljene v dobrih letnikih. V vinih najdemo vonj po limoni, kar kažejo vina s poudarjeno svežino, vonj po dozorevajočih jabolkih, pa tudi vonjave, ki nas spominjajo na različno cvetje z lažjimi vonjavami. V zrelih vinih nas spremljajo vonjave, ki nas spominjajo na vonje po suhem listju, čajih, marelici ali breskvi (Nemanič, 1996a).

Vino sorte laški rizling je uvrščeno med prijetna, pitna vina. Kakovostna vina nam dajejo vtis lahкости, živahnosti. V vinih odličnih letnikov se takoj ob požirku začuti njihova polnost, pojavijo se zaznave ekstraktnega vina z veliko elementi enkratne harmonije (Nemanič, 1996a).



Slika 1: Sorta laški rizling (Hrček in Korošec-Koruza, 1996)

2.2 JABOLČNO-MLEČNOKISLINSKA FERMENTACIJA

Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija (JMKF) je biokemični proces encimske dekarboksilacije L-jabolčne kisline v L-mlečno kislino in CO₂. Pri tem iz 1 g jabolčne kisline nastane 0,67 g mlečne kisline in 0,33 g ogljikovega dioksida (Fugelsang, 1997; Fleet, 1993; Gockowiak in Henschke, 2003; Rosi, 2003; Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

Konverzija dikarboksilne jabolčne kisline v monokarboksilno mlečno kislino ob izgubi CO₂ zmanjša kislost v vinu in poveča njegov pH. Ta zveza je zelo pomembna za vina pridelana na severnih, hladnejših območjih. Za takšna vina so značilne visoke vsebnosti jabolčne in vinske kisline ter nizke pH vrednosti (Fleet, 1993).

Glavni namen jabolčno-mlečnokislinske fermentacije sta znižanje koncentracije kislin in značilna sprememba vonja in okusa. Postopek fermentacije je primeren za rdeča vina z višjo koncentracijo jabolčne kisline, za alkoholno bogata vina, namenjena daljšemu zorenju, za bela vina pridelana z maceracijo bele drozge, namenjena daljšemu zorenju in staranju z namenom tvorbe novih aromatičnih snovi, in za bela vina, ki jih pripravimo za mešanje v zvrsti ali poenotenje letnikov. JMKF ni zaželena v vinih z manjšo vsebnostjo kislin, v vinih z večjim ostankom reducirajočih sladkorjev in v belih svežih, sadnih vinih. V takšnih vinih znižanje koncentracije kislin, višji pH in spremembe vonja ter okusa niso zaželeni in poslabšajo njihovo kakovost (Bavčar, 2006).

JMKF, ki običajno nastopi po alkoholni fermentaciji, se lahko zaključi spontano z endogeno mikrofloro, katere izvor iščemo na grozdju in kletarski opremi, ali pa inducirano z dodatkom startrskih kultur mlečnokislinskih bakterij (MKB). Vinarji se pogosto odločajo za uporabo startrske kulture, saj se tako izognejo nepredvidljivemu poteku fermentacije, nepopolni konverziji malata v laktat in nezaželenim aromam. Po navedbah avtorja se 25 % vinarjev odloči za sočasno inokulacijo MKB in kvasovk, za dodatek startrske kulture v beli mošt takoj po začetku AF se odloči 15 % vinarjev in 48 % vseh vinarjev izvede naknadno inokulacijo, dodatek startrske kulture po končani alkoholni fermentaciji (Fugelsang, 1997).

Rezultati spontane JMKF se pogosto izražajo v visokih vrednostih vzporednih produktov kot so hlapne kisline, reduktivne arome v povezavi z večjimi koncentracijami mlečnokislinskih bakterij rodu *Pediococcus* in v tvorbi biogenih aminov (Krieger, 2002).

2.2.1 Znižanje koncentracije kislin

Po končani JMKF se zmanjša koncentracija skupnih kislin. S povečanjem količine mlečne kisline, se količina jabolčne kisline zniža za približno 50 %. Količina vinske kisline se zniža zaradi izločanja soli vinske kisline, medtem ko se med alkoholnim vrenjem in JMKF poveča koncentracija nekaterih drugih organskih kislin, kot so jantarna, citronska, galakturonska. Spremembe se kažejo v povečani vrednosti pH (do 0,3 enote) in v hkratnem zmanjševanju skupnih kislin (1–3 g/L) (Fugelsang, 1997).

2.2.2 Aroma vina

JMKF vpliva na spremenjene senzorične lastnosti vina. Glede na uporabo različnih sevov MKB, razmer JMKF in sorte vina se tvorijo različne aromatične snovi, ki lahko pozitivno ali negativno vplivajo na aromatiko vina. Če je bila ta sprememba pozitivna, smo vinu dodali kompleksnost, s čimer smo izboljšali kakovost vina. Pomemben stranski produkt je zagotovo diacetil z vonjem po maslu, ki v manjših koncentracijah pripeva k polnosti arome vina. Značilen je tudi nastanek acetaldehida, očetne kisline, acetoina, dietilsukcinata, etil acetata, etil laktata in heksanola. Med fermentacijo namreč nastajajo različni stranski produkti, ki spremenijo stil vina (Bavčar, 2006; Fugelsang, 1997).

Estri, kot je etil acetat in etilni estri maščobnih kislin so močno odgovorni za sadno noto vina. Znano je, da so kvasovke med alkoholno fermentacijo sposobne tvorbe estrov z encimi esterazami in alkohol acetiltransferazami. Za mlečnokislinske bakterije prisotnost tega encima še ni potrjena, kljub temu da raziskave kažejo povečanje vsebnosti etil acetata, etil laktata, etil heksanoata in etil oktanoata (Liu, 2002).

MKB so sposobne razgraditi tudi nekatere aldehide. Acetaldehid, ki je najpomembnejši aldehyd v vinu, daje neprijeten okus po zelenem. Dokazano je bilo, da so nekatere MKB

sposobne razgraditi acetaldehid v etanol in acetat, kar pomembno prispeva k boljši aromi in manjši porabi SO₂ v vinu (Liu, 2002).

Z voden in nadzorovano JMKF se lahko odpravijo pomanjkljivosti vina. Postopek JMKF se ne uporablja primarno samo za znižanje kislosti vina in povečanja stabilnosti, ampak jo vinarji vse pogosteje uporabljajo za izboljšanje oziroma spreminjanje arome vina. Poveča se harmoničnost vina, polnost, do izraza pride sadni karakter, medtem ko se rastlinske note prekrijejo oziroma izgubijo (Nemanič, 1996a).

2.2.3 Vpliv na mikrobiološko stabilnost

JMKF v splošnem ugodno vpliva na mikrobiološko stabilnost, ker se zmanjša vsebnost hranilnih snovi za ostale mikroorganizme. Nastala mlečna in preostala vinska kislina sta v primerjavi z jabolčno kislino, bolj stabilni in manj dovzetni za razkroj, saj ne predstavljata dodatnega vira ogljika za mikroorganizme, hkrati pa MKB porabijo večino vitaminov in aminokislin. Sočasno se v vinih poveča pH, kar onemogoča nadaljevanje rasti MKB in celo drugim nezaželenim mikroorganizmom. Zato dajejo pravo stabilnost vinu enološki postopki po koncu JMKF, kot so hlajenje, žveplanje, čiščenje in filtracija (Bavčar, 2006).

2.2.4 Mlečnokislinske bakterije vina

Mlečnokislinske bakterije vina (MKB) (ang. lactic acid bacteria, LAB) pripadajo trem rodovom: *Lactobacillus*, *Pediococcus* in *Oenococcus*. Rod *Lactobacillus* vključuje homofermentativne (npr. *L. casei*, *L. plantarum*, *L. sake*,) in heterofermentativne (npr. *L. brevis*, *L. hilgardi*, *L. fermentum*) vrste. V rod *Pediococcus* uvrščamo homofermentativne vrste (npr. *P. parvulus*, *P. damnosus* in *P. pentosaceus*), medtem ko vrsta *Oenococcus oeni* kaže značilnosti fakultativno heterofermentativnega organizma (Fugelsang, 1997; Ribéreau-Gayon in sod., 2000)

Homofermentativni organizmi izkoriščajo heksoze po EMP (Embden-Meyerhoff-Parnasova pot), kjer se D-mlečna kislina tvori z redukcijo piruvata; iz ene molekule heksoze se tvorita dve molekuli mlečne kisline. Heterofermentativne vrste MKB zaradi izgube encima fruktoza difosfaldolaza pridobivajo energijo po 6-fosfoglukonatni poti

do mlečne kisline in ogljikovega dioksida ter različnih koncentracij etanola in očetne kisline; vsebnost končnih produktov je odvisna od stopnje aeracije ter prisotnosti drugih protonov in akceptorjev elektronov (Fugelsang, 1997; Veber, 2006; Košmerl, 2005).

MKB najdemo na površini grozdnih jagod, na listih vinske trte, tudi na kletarski opremi. Različne bakterije prehajajo iz izvirnega (endogenega) okolja v vino, kjer pa zaradi močno selektivnega okolja uspeva le nekaj vrst MKB. Tako v vinu prevladujejo MKB rodu *Oenococcus*, medtem ko so MKB rodov *Pediococcus* in *Lactobacillus* pogostejše na grozdju in kletarski opremi (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

Najbolj zaželeni so MKB vrste *Oenococcus oeni*, saj kažejo največjo prilagodljivost na spremembe v rastnem mediju (nižji pH in T, višja alkoholna stopnja). Prav zaradi večje tolerance na višje kisline, bakterije vrste *Oenococcus oeni* prevladujejo v vinih s pH pod 3,5, medtem ko sta v vinu s pH nad 3,5 prisotna predvsem rodova *Pediococcus* in *Lactobacillus*. *Oenococcus oeni* tolerira do 14 vol.% alkohola, medtem ko se rast *Lactobacillus plantarum* zaustavi že pri 5–6 % alkohola. Močnejša rast pediokokov ni zaželena, saj vodi v oljno konsistenco vina (Fleet, 1993).

2.2.4.1 Bakterije vrste *Oenococcus oeni*

Mlečnokislinske bakterije vrste *Oenococcus oeni* so grampozitivni negibljivi koki, nesporogeni, elipsoidne do kroglaste oblike, navadno se pojavljajo v parih in verižicah. So acidofilne bakterije, saj jim ustreza medij s pH manjšim od 4,8 celo do 3,0. Uspevajo tudi v prisotnosti 10 vol.% etanola. Rast v gojišču je počasna in navadno konstantna. Najbolje uspevajo pri temperaturah od 20 do 30 °C. Optimalna temperatura je 22 °C, medtem ko je pri nižjih temperaturah (<15 °C) rast upočasnjena. Zahtevajo prehransko bogat medij s kompleksnimi rastnimi dejavniki in aminokislinami (Vrščaj Vodošek, 2007).

2.2.5 Dejavniki, ki vplivajo na mlečnokislinsko fermentacijo

Z ustreznimi razmerami za delovanje mlečnokislinskih bakterij odločilno vplivamo na potek JMKE. Na rast MKB v moštu in vinu najbolj selektivno vplivajo temperatura, vsebnost alkohola, vrednost pH in vsebnost SO₂. Na potek JMKE vplivajo tudi vsebnost

hranilnih snovi, vsebnost O₂ in CO₂, prisotnost organskih in maščobnih kislin, bakteriofagov in interakcije med kvasovkami in bakterijami (Košmerl, 2010).

2.2.5.1 Temperatura

Optimalna temperatura za rast in razmnoževanje MKB vrste *Oenococcus oeni* ob 0–4 vol.% vsebnosti alkohola je okoli 30 °C in ob 10–14 vol.% vsebnosti alkohola, med 18 in 20 °C. Temperature nad 22 °C zmanjšajo toleranco na alkohol, temperature nad 25 °C ob visoki vsebnosti alkohola ovirajo rast bakterij. Z nižjimi temperaturami, od 15 do 18 °C, podaljšamo fazo lag MKB in upočasnimo pretvorbo malata, s čimer se podaljša trajanje JMKF (Fleet, 1993; Boulton in sod., 1996). Za hiter in popoln potek JMKF je najugodnejša temperatura 20 °C (Miltenerberger in sod., 2003).

2.2.5.2 Alkohol

Etanol v koncentraciji nad 10 vol.% inhibitorno deluje na MKB, zato je priporočljivo speljati JMKF šele v 2/3 AF, da se bakterije počasi prilagodijo na etanol (Fugelsang, 1997). Pri nižjih koncentracijah lahko etanol stimulira rast MKB (Boulton in sod., 1996).

2.2.5.3 Vrednost pH

Vrednost pH močno vpliva na obseg rasti in preživelost MKB, ki začnejo odmirati pri dalj časa trajajočem nizkem pH in hkrati povišani vsebnosti alkohola (Comitini in sod., 2005). Acidofilen značaj bakterij vrste *Oenococcus oeni* omogoča rast v vinu s pH od 3,0 do 3,2, medtem ko pri višjih pH vrednostih prevladujejo kvarljivci. Pri pretvorbi malata nad pH 3,5 nastane več očetne kisline in diacetila. Avtorji navajajo, da se pri višjem pH potek JMKF hitreje zaključi (Fleet, 1993; Fugelsang, 1997).

2.2.5.4 Vsebnost SO₂

V primerjavi s kvasovkami so MKB občutljivejše na povišano vsebnost SO₂, ki v koncentracijah nad 10 mg/L prostega in nad 30 mg/L vezanega SO₂ zavira rast, pri vsebnosti nad 50 mg/L skupnega SO₂ pa popolnoma ustavi rast in aktivnost MKB (Košmerl, 2010).

2.2.5.5 Hranilne snovi

MKB so prehransko zahtevne glede dušikovih snovi, še posebej na začetku rasti. Bakterije vrste *Oenococcus oeni* potrebujejo za rast aminokisline arginin, cistin,

glutaminsko kislino, izolevcin, tirozin in valin (Tracey in Britz, 1989). Po alkoholni fermentaciji, ko poteče avtoliza kvasovk, se začnejo v vino sproščati peptidi, aminokisline in vitamini, ki služijo kot rastni faktorji za mlečnokislinske bakterije (Boulton in sod., 1996). Med AF in avtolizo celic kvasovk se v vino sproščajo manoproteini, ki kažejo vrsto pozitivnih enoloških lastnosti. Spodbujajo rast MKB in pozitivno vplivajo na potek JMKF (Gonzalez-Ramos in Gonzalez, 2006).

2.2.5.6 Prisotnost O₂ in CO₂

Znano je, da O₂ v majhnih koncentracijah na začetku spodbudi rast MKB, čeprav vpliva na nastanek acetata. Podoben učinek ima CO₂ (Boulton in sod., 1996; Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

2.2.5.7 Organske kisline

Malat spodbuja rast bakterij vrste *Oenococcus oeni*, medtem ko mlečna in fumarna kislina, ki nastajata kot vzporedna produkta kvasovk, delujeta kot inhibitor (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

2.2.5.8 Mikrobne interakcije

Mikrobne interakcije med kvasovkami in mlečnokislinskimi bakterijami so še eden od dejavnikov, ki največkrat negativno vplivajo na potek JMKF. Medsebojen vpliv je odvisen predvsem od izbranih parov posameznih sevov kvasovk in bakterij. Inhibitoren učinek kvasovk na MKB lahko pripišemo tekmovanju za hranljive snovi na začetku AF, nezanemarljiva je tudi prisotnost SO₂ (10–30 mg/L), katerega tvorijo kvasovke. (Mildenberger in sod., 2003). Naraščanje vsebnosti alkohola in srednje dolgih maščobnih kislin, ki jih sintetizirajo nekateri sevi kvasovk, prav tako negativno vpliva na rast MKB. Dekanojska maščobna kislina že v vrednosti do 5 mg/L ovira transportni sistem na celični membrani MKB, kar podaljša potek JMKF (Fugelsang, 1997; Comitini in sod., 2005).

Ugotavljajo, da inokulacija MKB pred ali takoj ob začetku AF, ko je vsebnost reducirajočih sladkorjev še visoka, zavira delovanje kvasovk in onemogoči dokončanje AF (Boulton in sod., 1996).

Inhibicija je prisotna tudi med različnimi sevi in vrstami MKB. Najbolj opazen je antagonizem pri pH nad 3,5, ko MKB rodov *Pediococcus* in *Lactobacillus* prevladajo nad bakterijami rodu *Oenococcus* (Fugelsang, 1997).

2.2.5.9 Lizocim

Kvasovke vsebujejo beljakovine s protibakterijskim učinkom kot je lizocim, na katerega so bolj občutljive bakterije rodu *Oenococcus*. Lizocim se uporablja za kontrolo oziroma preprečitev JMKF in za zaščito vina pred nezaželenimi MKB. Maksimalna dovoljena količina lizocima v vinu je 500 mg/L (Delfini in sod., 2004; Comitini in sod., 2005).

2.2.5.10 Bakteriofagi

Mlečnokislinske bakterije so občutljive na bakterijske viruse ali bakteriofage. Litični fagi so najbolj virulentni, saj tudi uničijo celico gostitelja, potem ko jo inficirajo. Različni sevi MKB so različno odporni na bakteriofage (Fugelsang, 1997).

2.2.6 Organske kisline

Med organskimi kislinami v grozdju in moštu prevladujeta vinska in jabolčna kislina, manj je citronske, številne druge kisline najdemo le v sledovih. Med alkoholnim vrenjem in po njem nastajajo še: očetna, propionska, pirogrozdna, mlečna, jantarna, glikolna, galakturonska, glikonska, oksalna in fumarna kislina. V primerjavi z moštom se kislinsko stanje vina precej razlikuje. Koncentracija kislin se zmanjša že med alkoholnim vrenjem in zorenjem vina zaradi izločanja vinskega kamna in po končanju jabolčno-mlečnokislinske fermentacije, kjer se iz jabolčne kisline tvori mlečna kislina (Fleet, 1993).

Kisel okus vseh naštetih kislin v vinu je prekrit zaradi vsebnosti alkohola, reducirajočih sladkorjev in različnih kationov (Košmerl in Kač, 2003). Odvisen je od koncentracije prisotnih titrabilnih kislin, stopnje disociacije kislin ali vrednosti pH, razmerja med vinsko in jabolčno kislino v titrabilnih kislinah in od koncentracije mineralnih snovi, zlasti kalija, ki prisotne kisline omili in jih zaokroži v aromi. (Šikovec, 1985). Kislost mošta in vina je kompleksen pojem, saj so kisle snovi prisotne v različnih oblikah. Pojavljajo se kot proste kisline ali soli, disociirane ali nedisociirane.

Previsoke vsebnosti kislin dobimo, če je bilo grozdje nedozorelo in se določen delež kislin še ni uspel pretvoriti v sladkorje. V dozorelih letnikih sta vinska in jabolčna kislina približno enako zastopani. V nezrelem grozdju je razmerje kislin v prid jabolčne kisline, ki je veliko bolj kislja od vinske. Soli jabolčne kisline (malati) se ne izločajo z vinskim kamnom, oziroma se njihovo izločanje začne šele po izločanju tartratov (Šikovec, 1985).

2.2.6.1 Jabolčna kislina

Jabolčna kislina predstavlja eno od glavnih organskih kislin prisotnih v grozdju, moštu in v vinu. Mošt lahko vsebuje od 1 do 8 g/L jabolčne kisline, ta vsebnost med zorenjem grozdja upada, vendar lahko v hladnejših območjih vsebnost jabolčne kisline ostane visoka (Fleet, 1993).

Kot produkt nepopolne oksidacije, jabolčna kislina prehaja iz listja v jagodo, kjer se oksidira do vode in ogljikovega dioksida. V grozdnem soku jo najdemo v obliki L-jabolčne kisline. Če je grozdje slabo dozorelo, je vrednost jabolčne kisline v sklopu titrabilnih kislin večja od vinske. Koncentracija jabolčne kisline se spreminja bolj sunkovito kot koncentracija vinske. Po začetni intenzivni sintezi se koncentracija jabolčne kisline povečuje, proti koncu dozorevanja pa manjša. Jabolčna kislina predstavlja rezervno energijo, ki jo v slabih vremenskih razmerah trta uporabi za tvorbo sladkorja. Oksidira se pri temperaturi 27–30 °C, kar pomeni, da se pogosto jabolčna kislina v toplih klimatskih razmerah razgradi že pred trgatvijo (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Nemanič, 1996b; Šikovec, 1993).

MKB transformirajo L-jabolčno kislino izključno v L-mlečno kislino. To je pot dekarboksilacije malata brez vmesnega produkta piruvične kisline, ki bi se vključeval v druge metabolne poti. Raziskave so odkrile, da heterofermentativni koki (*Oenococcus*) iz glukoze tvorijo izključno v D-mlečno kislino in iz L-jabolčne kisline izključno L-mlečno kislino. Edini encim, ki je vključen v proces pretvorbe malata v laktat je jabolčno-mlečnokislinski encim. Prisotnost tega encima so dokazali pri MKB sevih rodu *Oenococcus* ter določenih vrstah rodu *Lactobacillus*. Jabolčno-mlečnokislinski encim deluje le v prisotnosti kofaktorja NAD^+ in dvovalentnih ionov (Mn^{2+}). Maksimalno aktivnost doseže ob prisotnosti malata, aktivnost spodbudi tudi prisotnost

fermentirajočih sladkorjev. Čeprav je optimalna vrednost aktivnosti jabolčno-mlečnokislinskega encima okrog 6,0, je pH medija med 3,0 in 3,5. Pri tem pH malat lažje prehaja v MKB kot pri višjem pH. V vinu poteka torej reakcija daleč od optimalnih razmer. Pretvorba malata poteka v celici MKB, torej v zavarovanem mediju pred inhibitorji, kot so karboksilne kisline vina, jantarna, citronska in L-vinska kislina. JMKEF je zaključena, ko v vinu preostane jabolčne kisline med 0,2 in 0,5 g/L (Bartowsky, 2005; Ribéreau-Gayon in sod., 2000). Medtem ko ima vinska kislina kisel okus, daje jabolčna kislina v ustih občutek nezrelosti (Šikovec, 1993).

2.2.6.2 Vinska kislina

Vinska kislina je zaradi svojega vpliva na kemijsko stabilnost vina, na barvo in okus vina, ena najpomembnejših organskih kislin v vinu. Naravna oblika vinske kisline je L-vinska kislina. V grozdju, moštu in vinu se nahaja v ravnotežju z mineralnimi snovmi, zlasti s kalijem in kalcijem. Pojavlja se v prosti in vezani obliki (Fleet, 1993).

Delež vinske kisline niha v odvisnosti od stopnje zrelosti in sorte. Vino jo vsebuje od 2 do 10 g/L, kar predstavlja od 20 do 70 % celotne koncentracije skupnih kislin (Fleet, 1993).

Koncentracija vinske kisline se med alkoholno fermentacijo in zorenjem vina zniža zaradi tvorbe kalijevih in delno kalcijevih soli vinske kisline. Z izločanjem vinske kisline v obliki vinskega kamna (kalijev tartrat) se lahko zniža koncentracija titrabilnih kislin za 2 do 3 g/L.

Vinska kislina nima pomembne vloge pri jabolčno-mlečnokislinski fermentaciji. Razgradnja vinske kisline je bolezen vina, pri čemer se zniža kislost vina in poveča vsebnost očetne in jantarne kisline ter CO₂ (Fugelsang, 1997; Boulton in sod., 1996).

2.2.6.3 Mlečna kislina

V moštu iz zdravega grozdja praviloma ni prisotna. Koncentracija mlečne kisline v vinu (nad 0,1 g/L do 7 g/L) se poveča po končanju jabolčno-mlečnokislinske fermentacije, kar je posledica dekarboksilacije jabolčne kisline pod vplivom mlečnokislinskih bakterij. V takšnem vinu lahko najdemo okus po medu, maslu, kvasu, vaniliji, sadju in zelenjavi. Napake, ki lahko nastanejo pri JMKEF, ne izhajajo iz mlečne kisline, temveč iz drugih vzporedno nastalih produktov (hlapne kisline, diacetil). Po vonju in okusu se

mlečna kislina težko loči od jabolčne, čeprav učinkuje milejše in manj ostro. Vinu prispeva mehak, nežnejši okus z daljšo zaznavo (Bavčar, 2006)

2.2.6.4 Citronska kislina

V zdravem moštu je najdemo zelo malo, od 100 do 200 mg/L. Večje koncentracije vsebuje mošt iz gnilega grozdja, saj se tvori tudi pod vplivom plesni vrste *Botrytis cinerea*, ki del glukoze pretvarja v citronsko kislino. Čeprav je v grozdni jagodi vezana na celične opne in je mnogo zaostane v tropinah, prehaja tudi v mošt (Bavčar, 2006).

V vinu je stabilna, neobstoja je le v primeru aktivnosti mlečnokislinskih bakterij. MKB s, ki predstavljajo endogeno mikrofloro v vinu, kot so bakterije vrst *O. oeni*, *L. casei*, *L. plantarum* in *L. mesenteroides*, hitro koristijo citrat, medtem ko ga MKB rodu *Pediococcus* in vrst *L. hilgardii* in *L. brevis* ne morejo (Liu, 2002).

MKB vina razgradijo citrat s citrat liazo v acetat in oksalacetat, ki se nadalje dekarboksilira v piruvat. Iz piruvata se v nadaljevanju razgradnje citronske kisline tvorijo spojine diacetil, acetoin in 2,3-butandiol. Najbolj znana je tvorba diacetila, ki je zelo aromatična spojina v primerjavi z acetoinom in 2,3-butandiolom. Opišemo ga lahko s senzoričnimi deskriptorji: po maslu, po jogurtu, po mleku. Splošno med JMKF nastanejo male količine diacetila, ki lahko do 3 g/L pozitivno vplivajo na kompleksnost arome vina. Nezaželene in zelo intenzivne vonjave diacetila, ki v koncentraciji nad 7 mg/L postane moteč in prevlada nad ostalimi vonji, so posledica delovanja kvarljivcev JMKF v vinih s pH nad 3,5. Na končno koncentracijo diacetila v vinu vplivajo mnogi dejavniki: vrsta uporabljenega seva MKB, vrsta vina, vsebnost SO₂ in citronske kisline, temperatura JMKF, začetni pH vina ali mošta in vsebnost sladkorjev. Citronska kislina predstavlja MKB dodaten vir energije. V prisotnosti preostanka sladkorjev se v vinu izboljša rast in preživetje MKB, kar vodi do nastanka acetata in ATP (Vrščaj Vodošek, 2007; Liu, 2002).

V Sloveniji je zgornja meja vsebnosti citronske kisline v vinih omejena na 1g/L (Pravilnik o pogojih..., 2004).

Kvasovke med AF ne asimilirajo ali sintetizirajo citronske kisline (Delaquis in sod., 2000).

2.2.6.5 Jantarna kislina

Jantarna kislina predstavlja enega glavnih sekundarnih metabolitov kvasovk med alkoholno fermentacijo. Nastaja s pretvorbo malata in aspartata ali iz sladkorja preko piruvične kisline z encimi v Krebsovem ciklu. Nastanek jantarne kisline je odvisen tudi od izbranega seva kvasovk in od prisotnosti glutamata v vinu. Jantarna kislina z vezavo na druge molekule tvori estre, pomembne aromatične spojine v vinu. Vinu daje tudi slano-grenak okus, zato je treba spremljati njeno vsebnost. V vinu je prisotna v koncentraciji od 0,5 do 2 g/L. MKB je med jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo ne metabolizirajo (Fleet, 1993).

2.2.6.6 Ocetna kislina

Ocetna kislina se tvori na začetku alkoholne fermentacije (do 0,3 g/L), njena tvorba pa se ustavi, kakor hitro sladkor prefermentira. Na sintezo očetne kisline s kvasovkami vrste *S. cerevisiae* vplivajo vsebnost sladkorjev, dušikovih snovi in vrednost pH. Večje koncentracije očetne kisline se tvorijo pri pH pod 3,2 in nad 4 in v bolj ozmofilnih razmerah. V vinu ima pri nižjih koncentracijah pomembno vlogo kot aromatična spojina, sodeluje pri tvorbi estrov. Njene povečane koncentracije, to je nad 0,8 g/L, so posledica delovanja nezaželenih očetnokislinskih bakterij. Vsebnost očetne kisline se poveča tudi med JMKF kot posledica metabolizma citronske kisline. Za tvorbo očetne kisline pa mlečnokislinske bakterije izkoriščajo tudi sladkorje, posebej pentoze. (Fleet, 1993; Bavčar, 2006).

Maksimalno dovoljena koncentracija hlapnih kislin v vinu, izraženih kot očetna kislina, je za bela vina omejena na 1 g/L (Pravilnik o pogojih..., 2004).

3 MATERIAL IN METODE

V diplomskem delu bomo predstavili dvomesečni eksperimentalni poskus jabolčno-mlečnokislinske fermentacije, ki je potekal v kletnih prostorih Biotehniške fakultete, Oddelka za živilstvo.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Mošt

Pri poskusu smo uporabili mošt bele sorte laški rizling iz slovenske vinorodne dežele Podravje, vinorodni okoliš Štajerska Slovenija. Grozdje je bilo predelano septembra 2006 v Ptujski kleti, Ptujška Klet Vinarstvo d.o.o., po klasični predelovalni shemi.

3.1.2 Startrske kulture

Uporabili smo startrske kulture kvasovk in mlečnokislinskih bakterij proizvajalca Lallemand (Montreal, Kanada). Uporabili smo kvasovke Lalvin ICV D47 *Saccharomyces cerevisiae* v priporočeni količini 25 g/hL in mlečnokislinske bakterije *Oenococcus oeni* Uvaferm alfa (MKB1) in 49A1 (MKB2) v priporočeni količini 1 g/hL.

Startrsko kulturo kvasovk smo rehidrirali v vodi s temperaturo 35 °C, tako pripravljen inokulum smo po 45 minutah dodali rehidracijski raztopini z raztopljenim hranilom Go-Ferm (30 g/hL), ki smo ga predhodno 10 minut rehidrirali v vodi s temperaturo 35 °C. Rehidracijsko raztopino s hranilom in kulturo kvasovk, ki smo ji dodali enako količino mošta, smo temperirali na 21 °C in hkrati vmešali v vse fermentacijske posode, da je potekla alkoholna fermentacija.

Startrsko kulturo MKB smo 15 minut rehidrirali v vodi s temperaturo 21°C. Nato smo jo hkrati s startrsko kulturo kvasovk dodali v fermentacijsko posodo 2 in 3 (1. dan), v fermentacijsko posodo 4 in 5 pa smo startrsko kulturo MKB dodali šele po koncu

alkoholne fermentacije (11. dan). V fermentacijsko posodo 1, ki predstavlja kontrolni vzorec, nismo dodali startrske kulture MKB.

3.1.3 Enološka sredstva

Za doseganje optimalnih razmer rasti smo pri vseh vzorcih uporabili dve prehranski sredstvi za kvasovke proizvajalca Lallemend, Go-Ferm v priporočeni količini 30 g/hL na začetku vinifikacije in Fermaid E v priporočeni količini 25 g/hL po $\frac{1}{3}$ alkoholne fermentacije.

3.2 ZASNOVA POSKUSA

Poskusi so potekali pri temperaturi 18 °C v petih fermentacijskih posodah iz nerjavnega jekla (tankih) s prostornino 28 L (slika 3) in v 15 fermentacijskih steklenicah s 600 mL fermentacijsko prostornino (slika 2) pri temperaturi 18 °C. V steklenicah smo izvedli poskus v treh paralelkah.



Slika 2: Vrenje v 600 mL fermentacijskih steklenicah

V poskusu smo v tankih glede na dodatke startskih kultur izpeljali pet različnih postopkov vinifikacije:

- tank (vinifikacija) 1: KONT- kontrola; dodatek startske kulture kvasovk
- tank (vinifikacija) 2: KOIN1- koinokulacija startskih kultur kvasovk in MKB1
- tank (vinifikacija) 3: KOIN2- koinokulacija startskih kultur kvasovk in MKB2
- tank (vinifikacija) 4: IN1- inokulacija MKB1 po končani alkoholni fermentaciji
- tank (vinifikacija) 5: IN2- inokulacija MKB2 po končani alkoholni fermentaciji

Vinifikacija v 28 L fermentacijskih posodah je do žveplanja s pretokom pri KONT, KOIN1 in KOIN2 trajala 42 dni in pri IN1, IN2 60 dni. JMKF je od inokulacije MKB v mošt pri vzorcih KONT, KOIN1 KOIN2 trajala 42 dni, medtem ko se je pri vzorcih IN1 in IN2 ob inokulaciji MKB v vino JMKF zaključila v 49 dneh.



Slika 3: Vrenje v 28 L fermentacijskih posodah

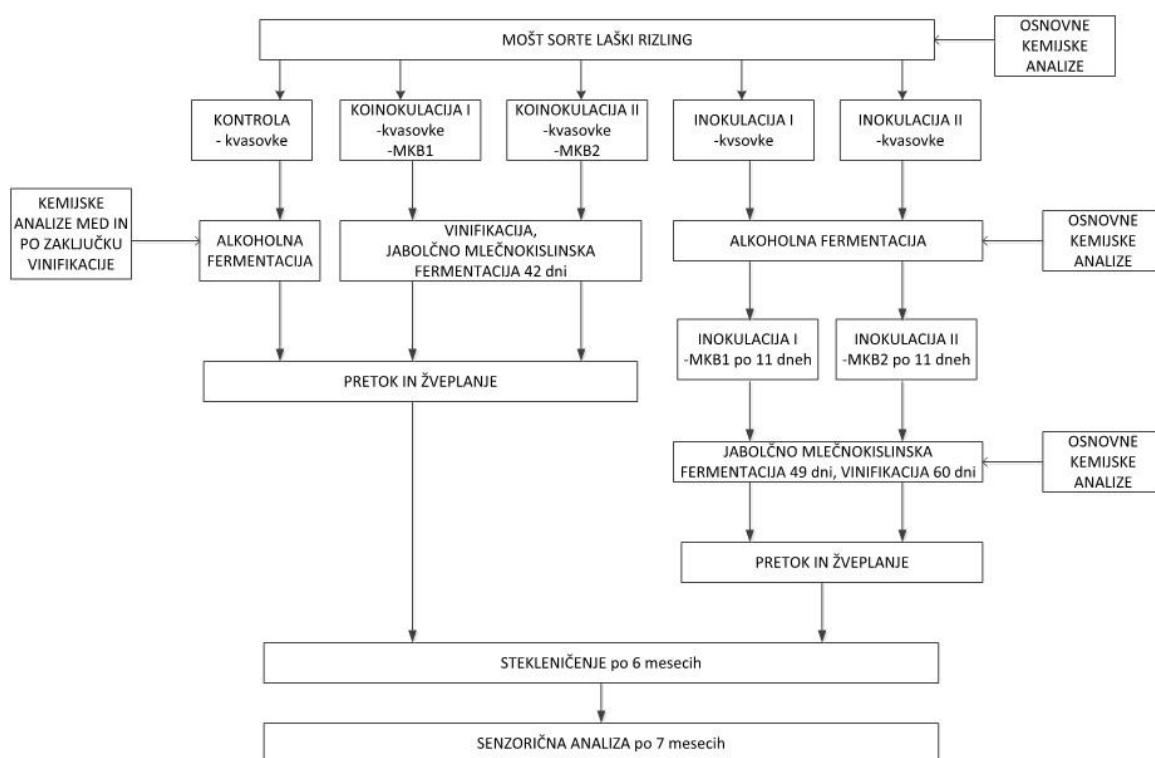
Potek JMKF smo trikrat tedensko spremljali s kemijskimi analizami vrednosti pH, titrabilnih in skupnih kislin, refraktometrično določali sladkorno stopnjo in hkrati vzorčili za analizo organskih kislin s HPLC.

Med vinifikacijo in po končani JMKF smo opravili naslednje kemijske analize: vrednosti pH in pufrne kapacitete, vsebnost titrabilnih in skupnih kislin, vsebnost skupnega ekstrakta in alkohola, vsebnost hlapnih kislin, vsebnost prostega in skupnega žveplovega dioksida, vsebnost reducirajočih sladkorjev.

Po končanem poskusu smo vzorce vin žveplali in pretočili. Vina so po žveplanju s kalijevim metabisulfitom ($K_2S_2O_5$) vsebovala 30 mg/L prostega SO_2 . Po pretoku vin v 5 L in 10 L steklene vinske posode je sledilo zorenje vin pri konstantni temperaturi 8

°C. Po šestih mesecih smo vino stekleničili in po enem mesecu opravili senzorično analizo vzorcev vin.

Kinetiko alkoholne fermentacije smo v vrelnih steklenicah spremljali z dnevnim tehtanjem mase oddanega CO₂ (g/L) in izračunom hitrosti oddanega CO₂ (g/L na h). Vzorce vin iz vrelnih steklenic smo po končanem poskusu zavrgli.



Slika 4: Shema poteka eksperimentalnega dela

3.3 FIZIKALNE IN KEMIJSKE ANALIZE

Fizikalne in kemijske analize mošta in vina so bile opravljene na Katedri za tehnologije, prehrano in vino Biotehniške fakultete v Ljubljani. Vse meritve in analize so bile opravljene v treh ponovitvah, pri rezultatih smo upoštevali aritmetično sredino in standardni odklon vseh treh meritev.

Med fermentacijo smo spremljali vsebnost sladkorja, sproščanje ogljikovega dioksida (zmanjšanje mase vrelnih steklenic), vrednosti pH, pufrno kapaciteto, vsebnost titrabilnih in skupnih kislin. V moštu in mlademu vinu smo med vinifikacijo in po končani JMKF poleg že navedenih parametrov spremljali še naslednje fizikalno-kemijske parametre: vsebnost alkohola, relativno gostoto, skupni ekstrakt, hlapne kisline, skupni in prosti žveplov dioksid in vsebnost organskih kislin. Vzorce mošta smo pred analizami filtrirali skozi filter papir, termostatirali pri 20 °C in po potrebi degazirali 15 minut v ultrazvočni kopeli.

3.3.1 Določanje vrednosti pH v vinu

Merjenje vrednosti pH temelji na merjenju razlike v potencialu med dvema elektrodama, ki sta potopljene v vzorec mošta ali vina. Referenčna elektroda ima stalni potencial, druga, steklena elektroda pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H_3O^+ ionov v raztopini. Uporabljali smo kombinirano stekleno elektrodo. Uporabili smo pH meter znamke Mettler Toledo DL50 Graphix, ki smo ga predhodno umerili z dvema pufrnima raztopinama in nato izmerili vzorcu vrednost pH natančno na 3 decimalke (Košmerl in Kač, 2003).

3.3.2 Določanje pufrne kapacitete v vinu

Pufrno kapaciteto mošta ali vina opišemo kot lastnost mošta ali vina, da se njegov pH ob dodatku znatnih količin kislin ali baz bistveno ne spremeni. Definirana je kot množina H_3O^+ ali OH^- ionov, ki jih moramo dodati 1 L vzorca, da se njegov pH spremeni za eno enoto. Metoda temelji na merjenju potenciala med dvema elektrodama, ki sta potopljene neposredno v vzorec mošta ali vina. Referenčna elektroda ima stalen potencial, druga, steklena elektroda pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H_3O^+ ionov v raztopini (Košmerl in Kač, 2003). Iz podatkov o pH in točnih volumnih dodanega titranta (0,1 M raztopina NaOH) in 0,1 M raztopina HCl) narišemo krivuljo pufrne kapacitete ter izračunamo enačbi premice ob dodajanju baze in ob dodajanju kisline, s katerima določimo dejansko pufrno kapaciteto vzorca. Podatek o pufrni kapaciteti je pomemben za razumevanje sprememb pH mošta ali vina. Uporabljali smo

kombinirano stekleno elektrodo. Uporabili smo pH meter znamke Mettler Toledo DL50 Graphix, ki smo ga predhodno umerili z dvema pufrnima raztopinama.

Navadne vrednosti pufrne kapacitete so od 35 do 50 mmol/L/pH, v ekstremnih primerih pa tudi od 25 do 60 mmol/L/pH.

Pufrno kapaciteto, izraženo v mmol/L/pH, izračunamo po naslednji formuli:

$$PK \text{ (mmol / L / pH)} = \frac{a \cdot c \cdot 1000}{v} \quad \dots(1)$$

kjer je:

a ... volumen porabljenega titranta (mL)

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

v ... volumen vzorca (50 mL)

3.3.3 Določanje skupnih (titrabilnih) kislin v vinu

Metoda temelji na potenciometrični titraciji skupnih kislin z močno bazo do končne točke pH 7,00 kot jo definira Mednarodni urad za trto in vino (O.I.V.) ali do končne točke pH 8,20 kot jo definira AOAC (The Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists). Uporabili smo pH meter znamke Mettler Toledo DL50 Graphix, ki smo ga predhodno umerili z dvema pufrnima raztopinama.

Titracijo z 0,1 M raztopino NaOH smo izvedli na samodejnim titratorju s kombinirano stekleno elektrodo do končne točke pH 7,00 oziroma pH 8,20 (Košmerl in Kač, 2003).

Masno koncentracijo skupnih titrabilnih kislin, izraženo v g vinske kisline/L, izračunamo po naslednji formuli:

$$TK \text{ (g-L)} = \frac{a \cdot c \cdot M}{v \cdot n} \quad \dots(2)$$

kjer je:

a ... volumen porabljenega titranta (mL)

- c ... koncentracija baze (0,1 M)
- M ... molska masa vinske kisline (150,09 g/mol)
- v ... volumen vzorca (25 mL)
- n ... molsko razmerje kemijske reakcije med NaOH in vinsko kislino (n = 2)

3.3.4 Določanje relativne gostote, skupnega ekstrakta in alkohola v vinu

Relativna gostota je razmerje med gostoto vina pri 20 °C in gostoto vode pri enaki temperaturi. Nato točno določen volumen (100 mL) ponovno termostatisiranega vzorca predestiliramo z destilacijsko napravo v 100 mL merilno bučko. Po destilaciji vzorca termostatisiramo alkoholni destilat in izmerimo njegovo relativno gostoto s hidrostatsko tehniko. Poleg relativne gostote odčitamo tudi koncentracijo (volumenski delež) alkohola. Skupni suhi ekstrakt vina sestavljajo po definiciji O.I.V. pri 100 °C nehlapne komponente vina (sladkorji, fiksne kisline, organske soli idr.). Na osnovi vsebnosti ekstrakta vina lahko sklepamo na začetno vsebnost sladkorja v moštu, iz katerega je bilo vino pridelano. Prevladujoči alkohol v vinu je etanol, ki nastane kot glavni produkt alkoholne fermentacije s kvasovkami iz glukoze in fruktoze v moštu (Košmerl in Kač, 2003).

Meritve smo opravili na aparaturi znamke Mettler Toledo DE45 Density Meter, kjer smo odčitali relativno gostoto vzorca vina in alkoholnega destilata ter vsebnost alkohola. Alkoholni destilat smo dobili z destilacijo vzorca vina na destilacijski napravi (D.E.E. Gibertini).

Relativno gostoto skupnega ekstrakta (d_{SE}) izračunamo po AOAC s pomočjo Tabariéjevega obrazca:

$$d_{SE} = d_V - d_A + 1,0000 \quad \dots(3)$$

kjer je:

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

Na podlagi znane relativne gostote d_{SE} iz tabele odčitamo masno koncentracijo skupnega ekstrakta v vinu (g skupnega ekstrakta /L vina). Rezultat izrazimo na eno decimalno mesto.

3.3.5 Določanje vsebnosti sladkorjev v vinu

Sladkorno stopnjo mošta in mladega vina med fermentacijo smo določali z digitalnim refraktometrom. Refraktometer deluje na principu določanja lomnega količnika, ki je odvisen od vsebnosti suhe snovi, ki jo največ sestavljajo sladkorji. Rezultat odčitamo v stopinjah Oechsle ($^{\circ}\text{Oe}$) (Košmerl in Kač, 2003).

Za določanje vsebnosti reducirajočih sladkorjev v vinu smo uporabili titracijsko metodo po Rebeleinu (Košmerl in Kač, 2003). Prevladujoča sladkorja v grozdju, moštu in vinu sta glukoza in fruktoza. Popolnoma suha vina vsebujejo približno 1 g/L reducirajočih sladkorjev. Fehlingov reagent kvantitativno oksidira reducirajoče sladkorje v karboksilne kisline. S segrevanjem do vrenja poteče v reakcijski zmesi oksidacija reducirajočih sladkorjev v kisline, dvovalentni bakrov ion iz reakcijske zmesi pa se reducira do enovalentnega bakrovega oksida, ki se izloči iz raztopine kot oborina. Preostali Cu^{2+} ioni se v raztopini kalijevega jodida v kislem reducirajo, nastali jod pa titrimetrično določimo z raztopino natrijevega tiosulfata v prisotnosti škrobovice kot indikatorja. Koncentracijo reducirajočih sladkorjev (g/L) odčitamo neposredno iz birete ob upoštevanju slepega vzorca (to vrednost odštejemo od rezultata) (Košmerl in Kač, 2003).

3.3.6 Določanje žveplovega dioksida v vinu

Določanje prostega in skupnega žveplovega dioksida (SO_2) po Ripperjevi metodi temelji na oksidacijsko-redukcijski reakciji z raztopino joda. Za določitev prostega SO_2 vzorec vina najprej nakisamo z dodatkom žveplove(VI) kisline; s tem zmanjšamo oksidativni vpliv vina pri titraciji z raztopino joda in dodamo indikator. Jod oksidira žveplovo(IV) kislino v žveplovo(VI) kislino in v končni točki titracije prebitna količina

joda obarva raztopino modro. Za določitev koncentracije skupnega SO₂ pa vzorcu vina najprej dodamo 1M raztopino NaOH, da dosežemo hidrolizo vezanega SO₂. Nato sledi dodatek ostalih reagentov in jodometrična titracija kot pri določanju prostega SO₂ (Košmerl in Kač, 2003).

Koncentracijo prostega SO₂ izračunamo po naslednji formuli:

$$C_{SO_2} \text{ (mg / L)} = \frac{a \cdot c \cdot M \cdot 1000}{v \cdot n} \quad \dots(4)$$

kjer je:

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

a ... volumen standardizirane raztopine joda (mL)

c ... koncentracija joda (0,01 M)

M ... molska masa SO₂ (64 g/mol)

v ... volumen vzorca (25 mL)

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

Koncentracijo skupnega SO₂ (mg/L) izračunamo na enak način kot koncentracijo prostega SO₂.

3.3.7 Določanje hlapnih kislin v vinu

Hlapne kisline v vinu so predvsem mravljinčna, očetna in butanojska kislina. Te določimo titrimetrično s standardizirano vodno raztopino NaOH v destilatu vina po destilaciji z vodno paro (destilacijska naprava D.E.E. Gibertini). Rezultat izrazimo kot očetno kislino (g/L). V destilat ne preidejo mlečna, jantarna ali sorbinska kislina, niti ogljikov dioksid ali žveplova(IV) kislina. Manjše količine hlapnih kislin nastajajo kot stranski produkti med alkoholnim vrenjem vina in pri biološkem razkisu, kjer nastaja predvsem očetna kislina kot posledica razgradnje citronske kisline. Napaka in bolezen vina (očetnokislinski ton in cik) sta senzorično zaznavna v vonju že pri koncentraciji

okrog 0,6–0,9 g očetne kisline/L, kar je manj kot zakonsko dovoljena maksimalna koncentracija (Košmerl in Kač, 2003).

Koncentracijo hlapnih kislin, izraženo kot masno koncentracijo očetne kisline (g/L), izračunamo po naslednji formuli:

$$HK (g / L) = a \cdot c \cdot M \cdot \left(\frac{50}{1000} \right) \quad \dots(5)$$

kjer je:

HK ... koncentracija hlapnih kislin, izražena kot očetna kislina (g/L)

a ... poraba titranta (mL)

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

50 ... razredčitveni faktor

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

3.3.8 Določanje vsebnosti organskih kislin z metodo HPLC

Kromatografija je učinkovita separacijska metoda s številnimi aplikacijami na različnih področjih znanosti in tehnologij. Osnova ločevanja v kromatografskem sistemu temelji na porazdelitvi topnjence med mobilno fazo, ki je lahko tekoča ali plinasta, in med stacionarno fazo, ki je lahko trdna snov ali tekočina (Rudan-Tasič in Klofutar, 2007). Do porazdelitve pride zaradi različnih fizikalnih in kemijskih interakcij med vzorcem ter mobilno in stacionarno fazo. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) se je razvila v najbolj pogosto in najbolj široko uporabljano kromatografsko tehniko, ki se uporablja za preparativne in tudi za kvalitativne in kvantitativne analitske separacije (Kregar, 1996).

Zaradi učinkovitosti in enostavne priprave vzorcev je tudi hitra metoda, ki omogoča kvantitativno določitev organskih kislin (vinske, jabolčne, mlečne, očetne, citronske in jantarjeve kisline) v belih vinih (Kordiš–Krapež in sod., 2001). Meritve analiz se samodejno shranjujejo v računalniku, ki nam za vsak vzorec posebej izriše kromatogram krivuljo, ki opiše odvisnost merjene količine od časa. Nadaljujemo z identifikacijo komponent. Spojine pri znanih kromatografskih pogojih in pri dobri

kromatografski ločbi lahko identificiramo z retenzijskim časom – to je čas zadrževanja komponente v koloni. Ko spojine identificiramo, določimo še njihove koncentracije z merjenjem površine pod krivuljo oz. merjenjem višine krivulje. S pomočjo teh vrednosti in vrednosti izmerjenih pri standardih (vzorci z znanimi koncentracijami merjenih komponent) lahko izračunamo vsebnosti iskane komponente v vzorcu (Žorž, 1991).

Pripravili smo si pet standardov z različnimi koncentracijami vinske, jabolčne, mlečne, citronske in jantarjeve kisline za pripravo umeritvene krivulje. Različne koncentracije organskih kislin so podane v preglednici 1. Odmerke organskih kislin smo raztopili v 10 mL 96 % etanola, ki smo ga dolili v 100 mL bučko in dopolnili z deionizirano vodo do oznake. Vzorce smo predhodno centrifugirali 10 min na 4000 min^{-1} in jih filtrirali skozi membranski filter velikosti $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

Preglednica 1: Koncentracije organskih kislin v pripravljenih standardih

	S1 (g/100 mL)	S2 (g/100 mL)	S3 (g/100 mL)
Vinska kislina	0,200	0,400	0,600
Jabolčna kislina	0,100	0,200	0,400
Mlečna kislina	0,100	0,200	0,300
Citronska kislina	0,030	0,050	0,080
Jantarna kislina	0,060	0,100	0,160

Kromatografski pogoji so bili: razplinjevalnik: JourResearch, X-Act, črpalka: Knauer, Maxi star K-1000, kolona: Bio-Rad, Aminex, HPX- 87H, izmere $300\text{ mm} \times 7,8\text{ mm}$, mobilna faza: $0,0125\text{ M H}_2\text{SO}_4$, pretok mobilne faze: $0,5\text{ mL/min}$, temperatura: $65\text{ }^\circ\text{C}$, volumen injiciranja: $20\text{ }\mu\text{L}$, detektor: UV-VIS, Knauer, avtomatski podajalec vzorcev: Spark Holland, Marathon-XT, zapis signala: programska oprema Eurochrom 2000.

3.3.9 Spremljanje nastanka CO₂ med fermentacijo

Tvorbo oddanega CO₂ smo spremljali v 600 mL fermentacijskih steklenicah, in sicer tako, da smo steklenice dvakrat dnevno tehtali na tehtnici z natančnostjo 0,01g. Iz rezultatov o izgubi mase v določenem času smo dobili podatek o hitrosti oddanega CO₂ (g/L na h) med fermentacijo.

3.4 SENZORIČNA ANALIZA

Senzorična analiza je znanstvena disciplina o merjenju in vrednotenju lastnosti živil s čutili. Izkušeni strokovnjaki z izšolanimi čutili so sposobni zaznave mnogih kompleksnih sestavin v vinu. Senzorična analiza nam daje celoten vtis za vrednotenje kakovosti in prav zaradi tega je tako pomembna za razvrstitev vina v različne kakovostne razrede (Košmerl, 2005b). Senzorična analiza je bila opravljena na Biotehniški fakulteti, Oddelku za živilstvo, Katedre za tehnologijo vina v juniju 2007. Uporabili smo 20-točkovno Bauxbaumova metodo, ki jo predpisuje slovenska zakonodaja. Vzorce je ocenjevalo 10 ocenjevalcev. Pred organoleptičnim ocenjevanjem vsakega vzorca vina je bil poskusovalec seznanjen z letnikom in sorto vzorca. Senzorično oceno smo določili s povprečno vrednostjo 10 ocen, z neupoštevanjem najnižje in najvišje ocene.

Po Bauxbaumovi metodi pozitivnih točk se za vsak parameter upošteva naslednje število točk:

- bistrost: 0 do 2 točki
- barvo: 0 do 2 točki
- vonj: 0 do 4 točke
- okus: 0 do 6 točk
- harmoničnost: 0 do 6 točk

Ocenjuje se na eno decimalno mesto natančno, pri čemer se drugo decimalno mesto zaokroži.

Če dobi vino pri senzoričnem ocenjevanju manj kot 12,1 točke, ni primerno za promet. Glede na zbrano število točk pri organoleptični oceni lahko vino pridobi naslednje oznake (Pravilnik o postopku ..., 2000):

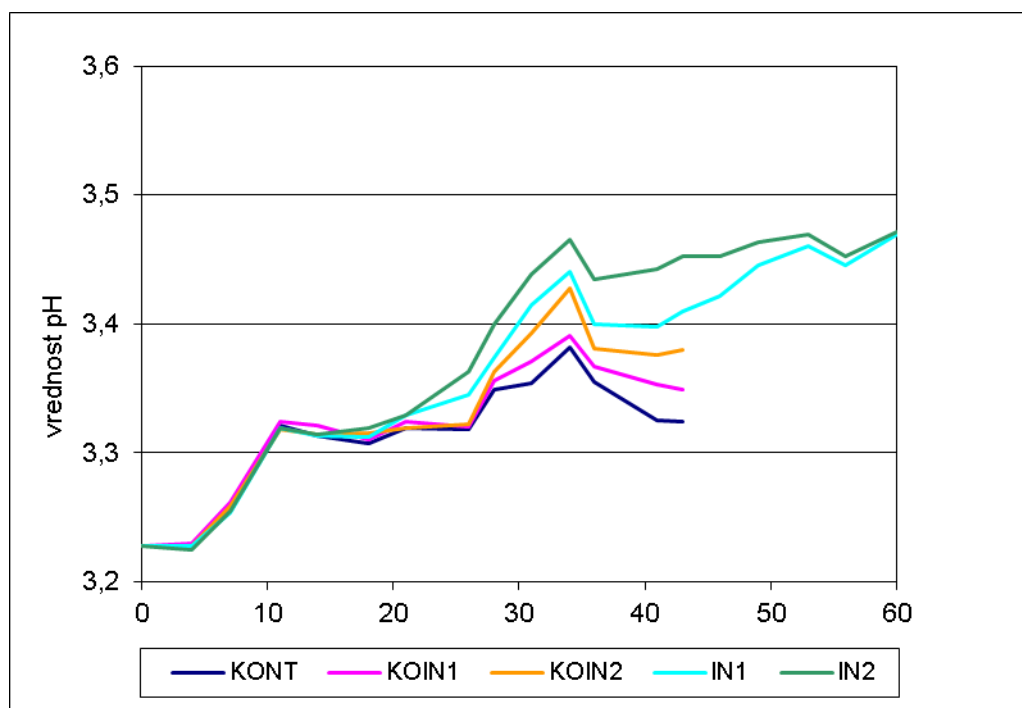
- vino, ocenjeno z najmanj 12,1 točke: namizno vino z nekontroliranim geografskim poreklom;
- vino, ocenjeno z najmanj 14,1 točke: namizno vino z geografsko oznako oziroma deželno vino – PGO;
- vino, ocenjeno z najmanj 16,1 točke: kakovostno vino z zaščitenim geografskim poreklom oziroma kakovostno vino ZGP ali kakovostno vino;
- vino, ocenjeno z najmanj 18,1 točke: vino, ki ima zaradi ocene v prometu lahko oznako vrhunsko vino ZGP oziroma za uvožena vina ekvivalentno oznako najvišje kakovosti.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

Mošt sorte laški rizling letnika 2006 smo pred postopki vinifikacije analizirali s kemijskimi analizami. Rezultati so predstavljeni v preglednici 2.

Preglednica 2: Kemijski parametri mošta sorte laški rizling letnika 2006

parameter (enota)	mošt l.2006
vrednost pH	$3,23 \pm 0,01$
titrabilne kisline 1 (g/L)	$6,21 \pm 0,07$
titrabilne kisline 2 (g/L)	$6,42 \pm 0,08$
pufna kapaciteta (mmol/L na pH)	$45,70 \pm 0,01$
hlapne kisline (g/L)	$0,13 \pm 0,01$
vinska kislina (g/L)	$2,72 \pm 0,0$
jabolčna kislina (g/L)	$6,58 \pm 0,0$
mlečna kislina (g/L)	$0,00 \pm 0,0$
citronska kislina (g/L)	$0,18 \pm 0,0$
jantarna kislina (g/L)	$1,58 \pm 0,0$
ocetna kislina (g/L)	$0,00 \pm 0,0$
sladkorna stopnja (°Oe)	$73 \pm 0,0$
prosti SO ₂ (mg/L)	$7,34 \pm 0,37$
skupni SO ₂ (mg/L)	$24,13 \pm 0,43$

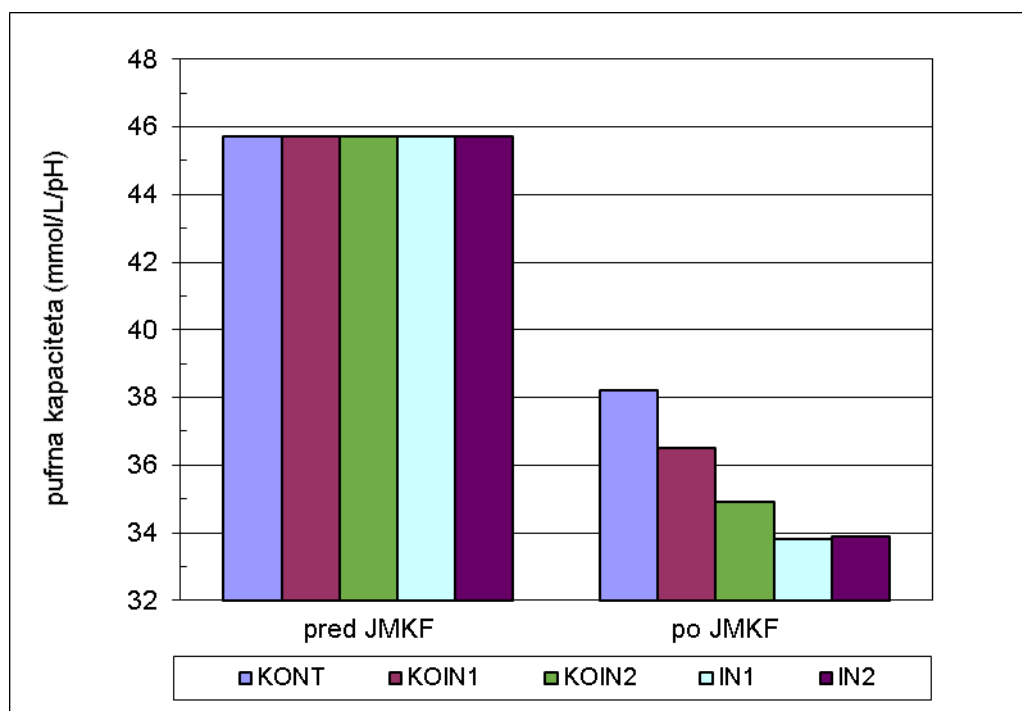


Slika 5: Spreminjanje vrednosti pH med vinifikacijami vina sorte laški rizling

KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

Slika 5 prikazuje spreminjanje vrednosti pH med petimi vinifikacijami vin sorte laški rizling. Opazili smo trend naraščanja vrednosti pH pri vseh vzorcih, tudi pri kontrolnem vzorcu. Primerjava sprememb vrednosti pH med posameznimi vinifikacijami je pokazala razlike med koinokulacijo z MKB in inokulacijo z MKB, saj so končne vrednosti pH pri IN1 in IN2 za 0,12 in 0,09 višje od končnih vrednosti pH pri KOIN1 in KOIN2. Če primerjamo spremembo vrednosti pH med posameznimi vinifikacijami, se je vrednost pH najbolj povečala do 3,4 pri IN2 in najmanj do vrednosti pH 3,32 pri KONT. Nepričakovano se je vrednost pH bolj povečevala že med AF pri IN1 in IN2, še preden smo vzorce inokulirali z MKB. Po inokulaciji z MKB se je trend povečanja vrednosti pH pri IN1 in IN2 konstantno nadaljeval. Vrednost pH se je bolj povečala pri vinifikacijah, kjer smo uporabili MKB seva 2 v primerjavi s sevom 1. Pri vseh vinifikacijah smo opazili strmo naraščanje vrednosti pH do 34. dneva in nato padec v vrednosti pH, kar lahko pripišemo nenadnemu večjemu nihanju vinske in drugih organskih kislin med vinifikacijo.

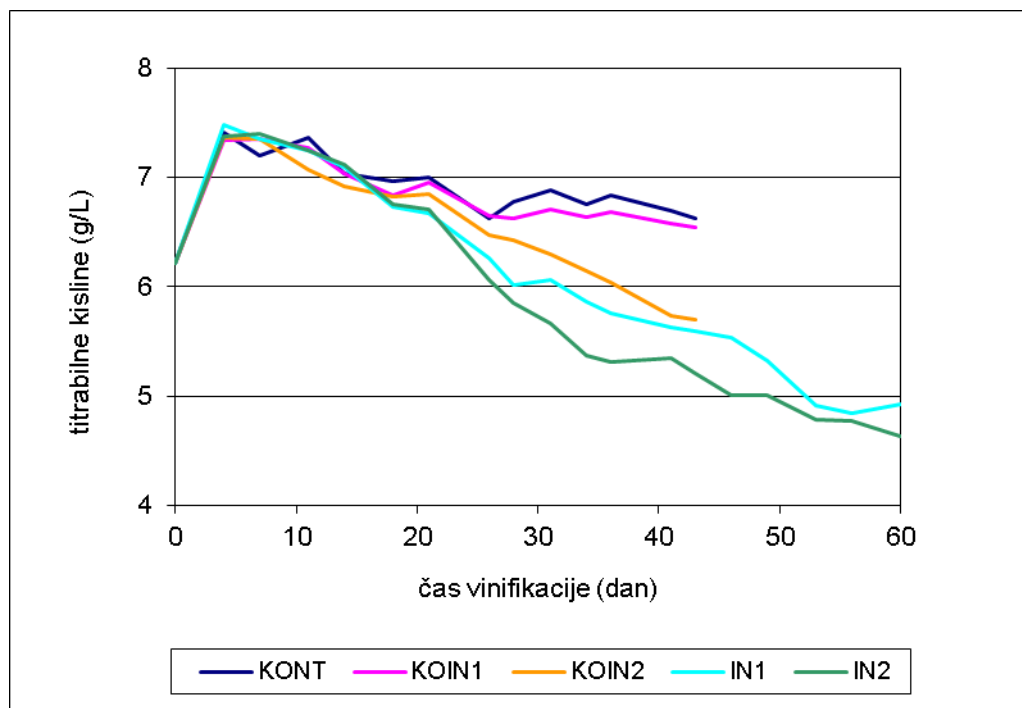
Spremembe v vrednosti pH so bile povezane s potekom JMKF, torej z razgradnjo jabolčne kisline. Končne vrednosti pH so se pričakovano povečale, delno tudi zaradi zmanjšanja vsebnosti vinske in citronske kisline (Vrščaj Vodošek, 2007).



Slika 6: Spreminjanje pufrne kapacitete med vinifikacijami vina sorte laški rizling

KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

Slika 6 prikazuje spreminjanje vrednosti pufrne kapacitete v vinu sorte laški rizling. Pufna kapaciteta se je z začetne vrednosti 45,7 mmol/L/pH v moštu znižala za 7,5 mmol/L/pH pri kontrolnem vzorcu, za 9,2 mmol/L/pH pri KOIN1, za 10,8 mmol/L/pH pri KOIN2, za 11,9 mmol/L/pH pri IN1 in za 11,8 mmol/L/pH pri IN2. Največje zmanjšanje smo opazili pri inokulaciji z MKB, vendar o razliki med njima ne moremo govoriti, saj gre za razliko 0,1 mmol/L/pH. Pričakovano se je vrednost pufrne kapacitete najmanj zmanjšala pri kontrolnem vzorcu.

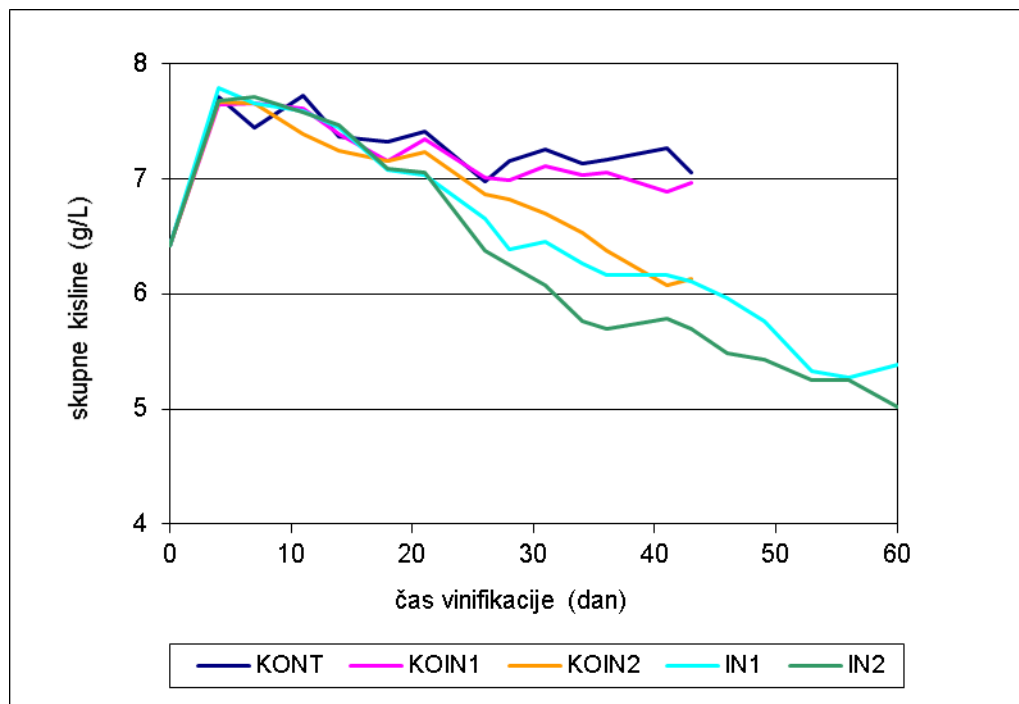


Slika 7: Spreminjanje vsebnosti titrabilnih kislin med vinifikacijami vina sorte laški rizling
 KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

Slika 7 prikazuje trend spreminjanja vsebnosti TK (titracija do pH = 7,0) v vinu sorte laški rizling. Po začetnem dvigu vsebnosti TK okoli 4. dne smo opazili pri vseh vzorcih v nadaljevanju trend zmanjševanja vsebnosti TK. V kontrolnem vzorcu se je vsebnost po zaključnem poskusu povečala, in sicer z začetne vrednosti 6,21 g/L na končno vrednost 6,63g/L. Pri KOIN1 se je vsebnost TK prav tako povečala z začetne vrednosti 6,21 g/L na končno vrednost 6,54g/L, pri KOIN2 pa se je vsebnost znižala za začetne 6,21 g/L na končno 5,70 g/L. Pri vinifikacijah z inokulacijo MKB se je vsebnost TK pri IN1 znižala z začetne 6,21 g/L na končno 4,93 g/L in pri IN2 se je vsebnost TK z začetne vsebnosti 6,21 g/L znižala na končno vsebnost 4,63 g/L.

Po končanih vinifikacijah smo opazili precejšnje razlike v vsebnosti TK med vzorci. Največjo vsebnost TK po končanem poskusu je imel kontrolni vzorec, najmanjšo pa vzorec IN2. Razlika med njima je znašala 2,0 g/L. Pri vinifikacijah koinokulacije z MKB je znašala razlika v vsebnosti TK 0,84g/L, med vzorcema, kjer smo opravili inokulacijo z MKB pa je znašala razlika le 0,3 g/L. Vzorci so bili precej izenačeni do

18. dne, nato so se začele pojavljati razlike v smislu, da so pri KONT in pri KOIN1 ostale vsebnosti TK precej nespremenjene, v ostalih vzorcih pa so se začele zniževati.



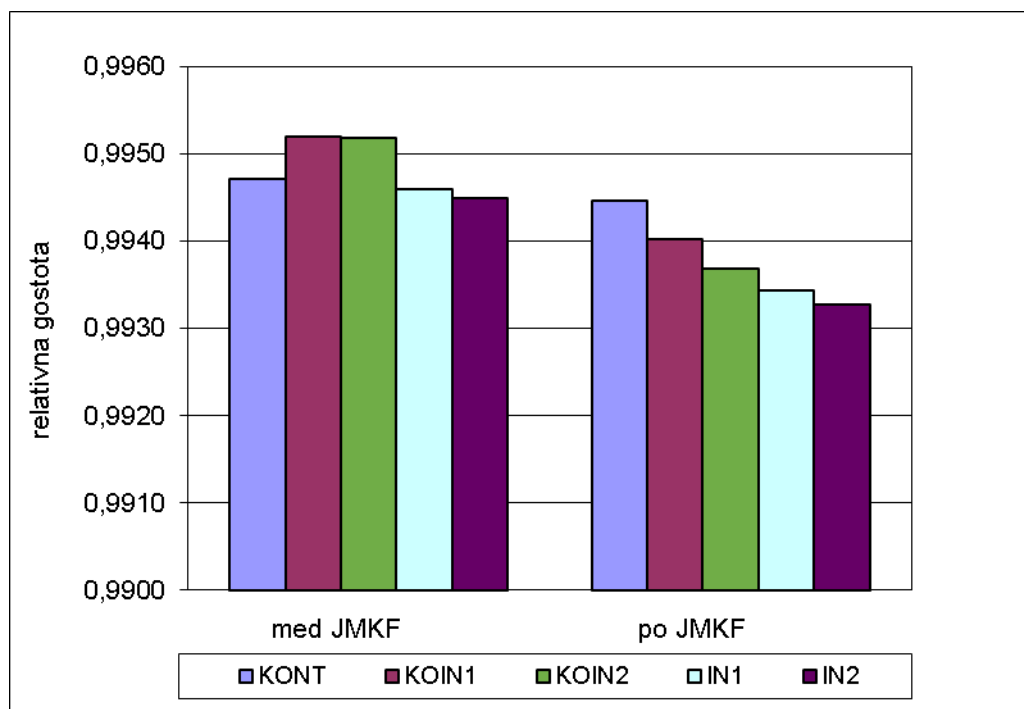
Slika 8: Spreminjanje vsebnosti skupnih kislin med vinifikacijami vina sorte laški rizling

KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

Slika 8 prikazuje trend spreminjanja vsebnosti SK (titracija do pH = 8,2) med vinifikacijami vina sorte laški rizling, ki je bil precej podoben trendu spreminjanja vsebnosti TK. V kontrolnem vzorcu se je vsebnost po zaključnem poskusu povečala, in sicer z začetne vrednosti 6,42 g/L na končno vrednost 7,06 g/L. Pri KOIN1 se je vsebnost SK prav tako povečala z začetne vrednosti 6,42 g/L na končno vrednost 6,97 g/L, pri KOIN2 pa se je vsebnost znižala za začetne 6,42 g/L na končno 6,13 g/L. Pri vinifikacijah z inokulacijo MKB se je vsebnost SK pri IN1 znižala z začetne 6,42 g/L na končno 5,39 g/L in pri IN2 se je vsebnost SK z začetne vsebnosti 6,42 g/L znižala na končno vsebnost 5,02 g/L.

Največjo vsebnost SK smo zaznali pri KONT, najnižjo pa pri IN2, razlika je znašala 2,04 g/L. Vsebnost skupnih kislin se je pri koinokulacijah z MKB znižala od 0,55 do

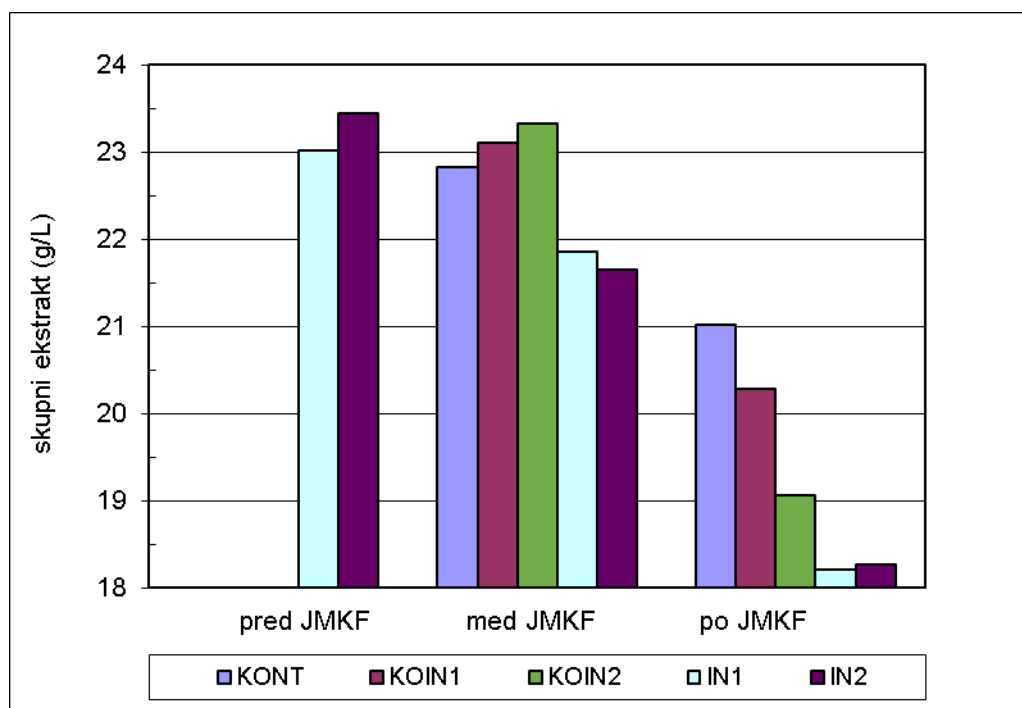
0,29 g/L, najbolj so se vsebnosti znižale pri inokulacijah z MKB, in sicer od 1,03 do 1,40 g/L.



Slika 9: Spreminjanje relativne gostote med vinifikacijami vina sorte laški rizling

KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

Slika 9 prikazuje spreminjanje vsebnosti relativne gostote med vinifikacijami vin sorte laški rizling. Vsebnost relativne gostote smo v posameznem vzorcu izmerili med vinifikacijo in po končani vinifikaciji. V kontrolnem vzorcu se je relativna gostota najmanj znižala, in sicer za 0,00026, pri KOIN1 se je znižala za 0,00117 in pri KOIN2 za 0,00151. Vrednost relativne gostote se je po končani JMKF pri IN1 znižala prav tako za 0,00117 in pri IN2 za 0,00122. Če povzamemo, imata vzorca, IN1 in IN2, kjer je JMKF potekala intenzivneje res nižje končne vrednosti relativne gostote v primerjavi z vzorcema KOIN1 in KOIN2, vendar se je vrednost relativne gostote najbolj znižala pri uporabi startrske kulture MKB2. Največje znižanje vrednosti smo opazili pri KOIN2 in IN2.



Slika 10: Spreminjanje vsebnosti skupnega ekstrakta med vinifikacijami vina sorte laški rizling
 KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

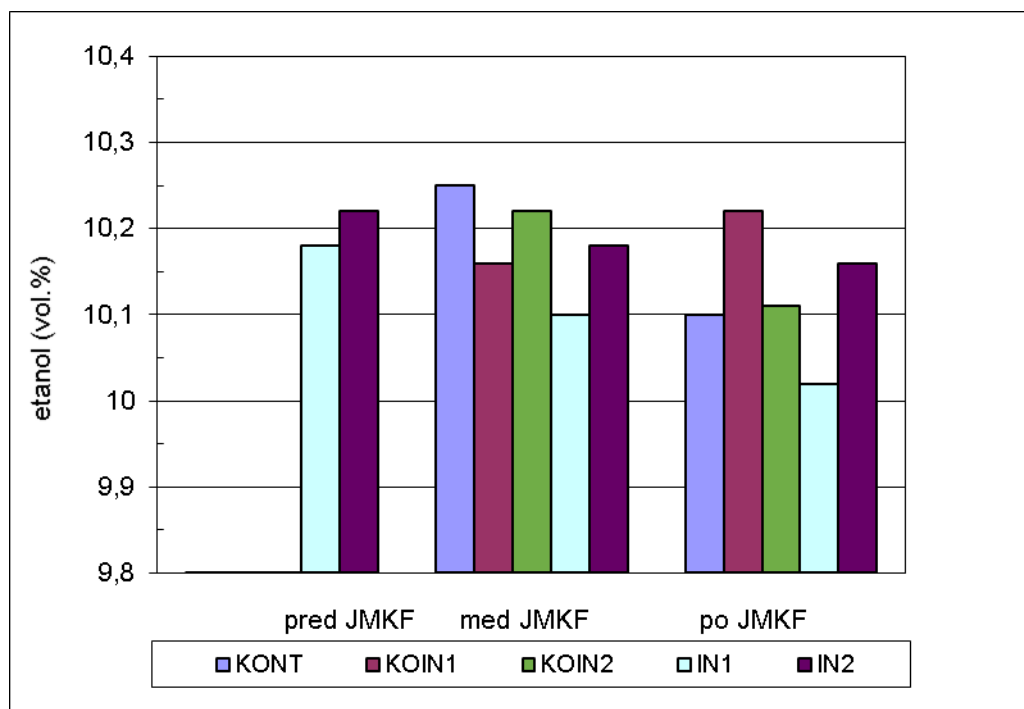
Slika 10 prikazuje spreminjanje vsebnosti SE (g/L) med vinifikacijami vina sorte laški rizling. Pri vseh vzorcih vina smo merili vsebnost SE med vinifikacijo in po končani vinifikaciji. Pri inokulaciji z MKB smo izmerili vsebnost SE v vinu tudi pred potekom JMCF.

Pri kontrolnem vzorcu se je vsebnost SE po končani vinifikaciji znižala za 1,8 g/L. Pri KOIN1 se je vsebnost SE znižala za 2,8 g/L, pri KOIN2 se je vsebnost SE znižala za 4,3 g/L, pri IN1 se je vsebnost SE znižala za 3,7 g/L in pri IN2 se je vsebnost SE znižala za 3,4 g/L.

Najnižjo končno vrednost SE smo opazili pri IN1 18,20 g/L in najvišjo vrednost SE pri KONT 21,02 g/L. Razlika med njima je 2,8 g/L.

Pričakovano najnižje vsebnosti SE pri IN1 in IN2 pripisujemo aktivnosti mlečnokislinskih bakterij, ki so pomembno komponento SE, to je jabolčna kislina, porabile v celoti. Prav tako so bile pri teh dveh vzorcih vsebnosti reducirajočih sladkorjev najnižje. Razlika med začetno in končno vrednostjo SE je bila najmanjša pri

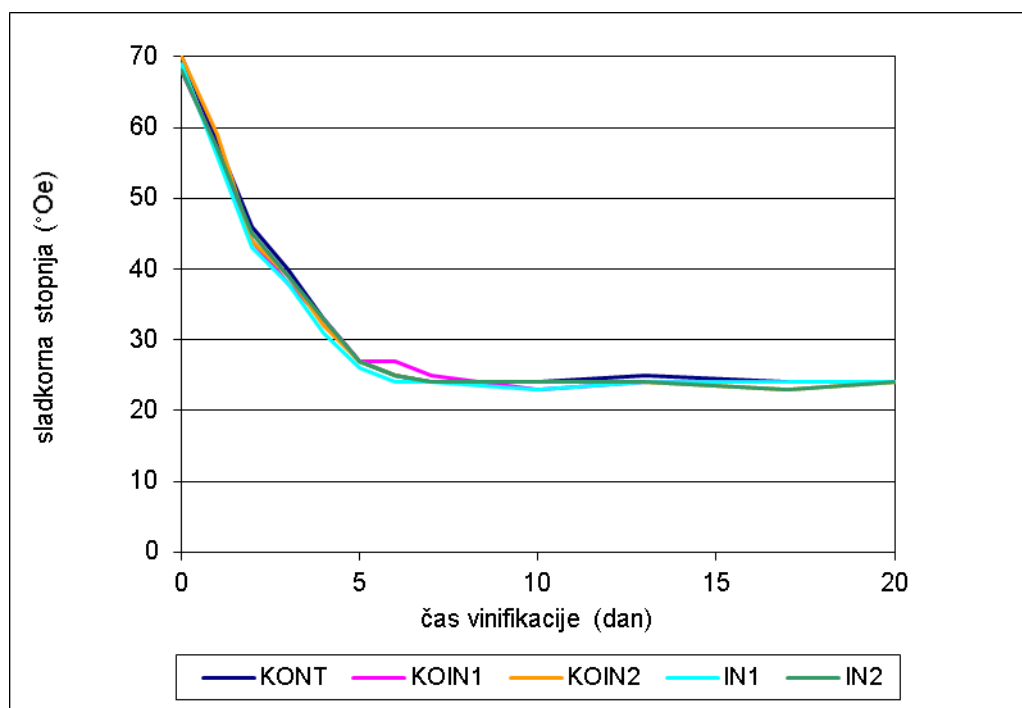
kontrolnem vzorcu, kjer JMKF ni potekla. Vpliv časa inokulacije je izrazitejši kot uporabljena startrska kultura MKB.



Slika 11: Spreminjanje vsebnosti etanola med vinifikacijami vina sorte laški rizling
KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

Slika 11 prikazuje spreminjanje vsebnosti etanola med vinifikacijami vina sorte laški rizling. Vsebnost etanola se je po končani vinifikaciji pri KONT znižala za 0,15 vol.%. Vsebnost etanola se je po končani vinifikaciji pri KOIN1 povežala za 0,06 vol.%, pri KOIN2 pa znižala za 0,11 vol.%. Vsebnost etanola se je pri IN1 zmanjšala za 0,08 vol.% in pri IN2 za 0,02 vol. % .

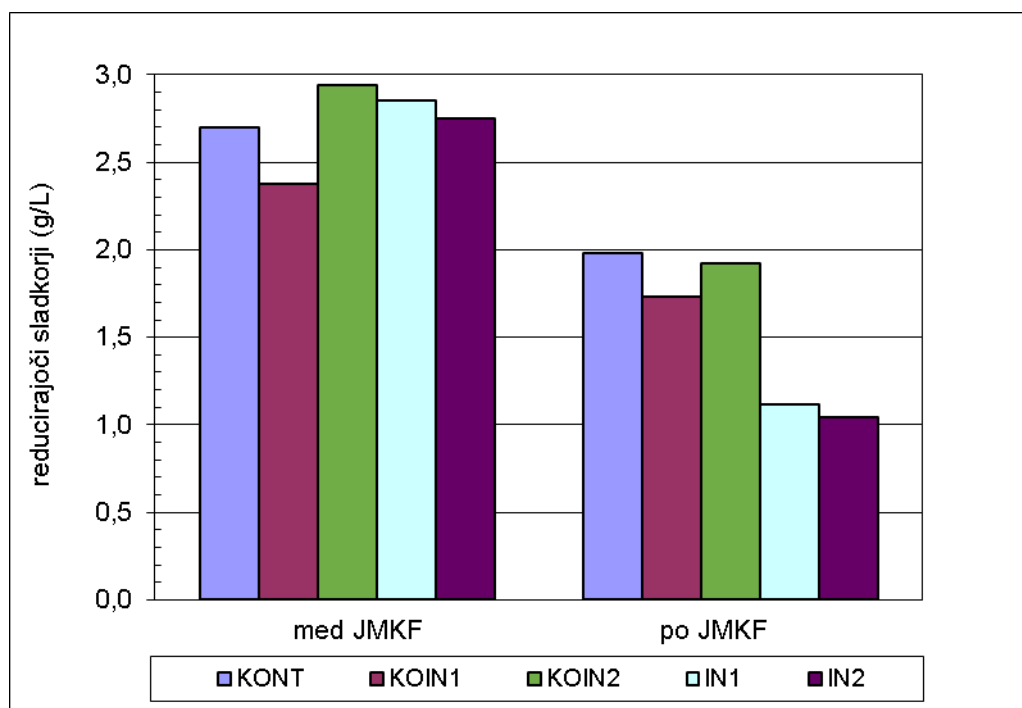
Večje vsebnosti etanola po končani JMKF so bile pričakovane zaradi etanola kot stranskega produkta metabolizma sladkorjev pri mlečnokislinskih bakterijah (Ribéreau-Gayon in sod., 2000)



Slika 12: Spreminjanje sladkorne stopnje med vinifikacijo vina sorte laški rizling

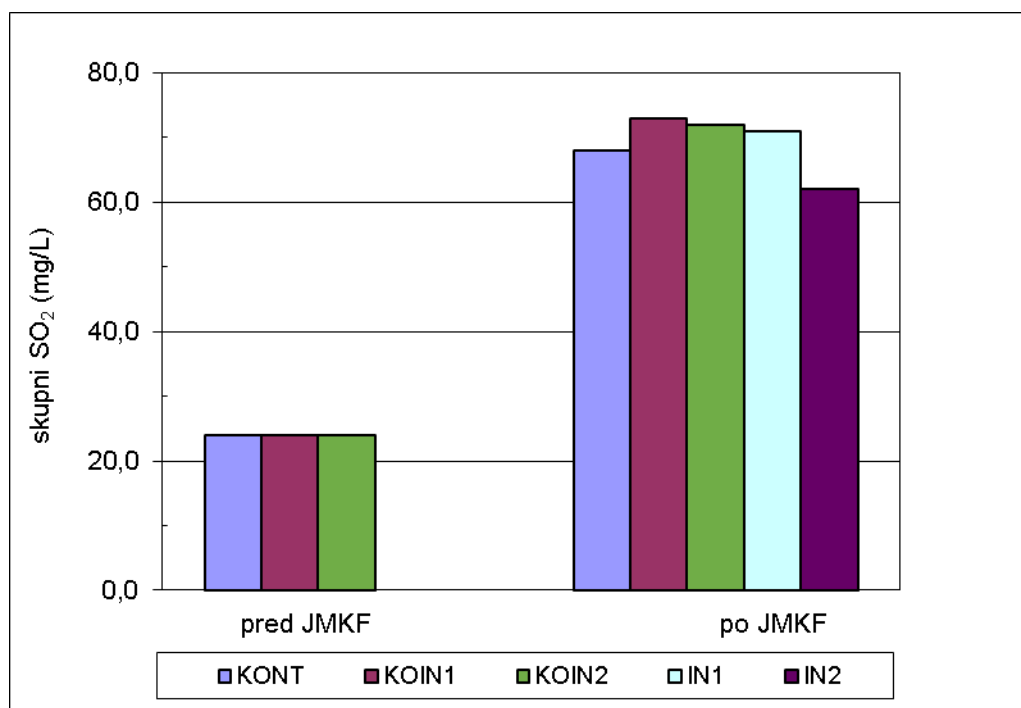
KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

Slika 12 prikazuje vrednosti sladkorne stopnje med vinifikacijo vina sorte laški rizling. Pri vseh vzorcih smo opazili primerljiv padec sladkorne stopnje do 5. dneva vinifikacije iz 73 °Oe na 27 °Oe in nato ustalitev vrednosti na 24 °Oe. Med posameznimi vinifikacijami nismo opazili razlik pri zniževanju sladkorne stopnje, razen manjšega odstopanja pri KOIN1 med 6. in 7. dnem.



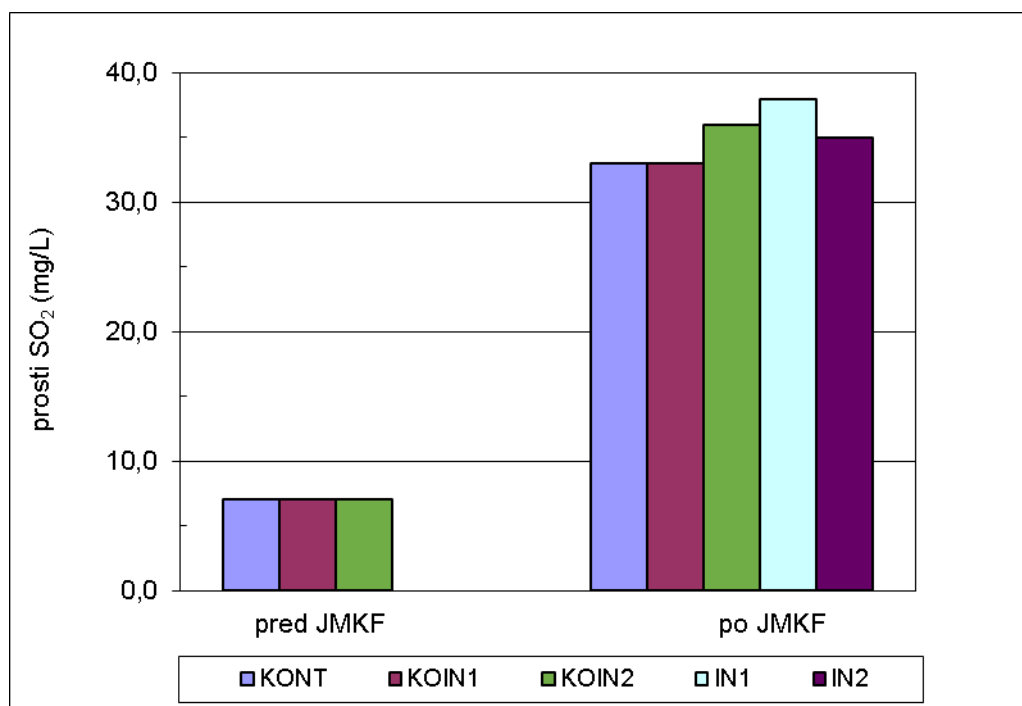
Slika 13: Spreminjanje vsebnosti reducirajočih sladkorjev med vinifikacijo vina sorte laški rizling
 KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

Slika 13 prikazuje spreminjanje vsebnosti reducirajočih sladkorjev med vinifikacijo vina sorte laški rizling. Pričakovano je opazen trend padanja vrednosti reducirajočih sladkorjev pri vseh vzorcih med trajanjem AF. Mošt je vseboval začetno sladkorno stopnjo 73 °Oe, kar je odgovarjalo koncentraciji reducirajočih sladkorjev 164,8 g/L (Pravilnik o pogojih..., 2004). Po končani vinifikaciji smo najmanjšo vsebnost izmerili pri inokulaciji IN2 1,04g/L in pri IN1 1,12 g/L. Višji vsebnosti reducirajočih sladkorjev smo izmerili pri koinokulacijah KOIN1 1,73 g/L in pri KOIN2 1,92 g/L. Najvišjo vsebnost reducirajočih sladkorjev je vseboval kontrolni vzorec 1,98 g/L. Vsa vina so se uvrstila v razred suhih vin.



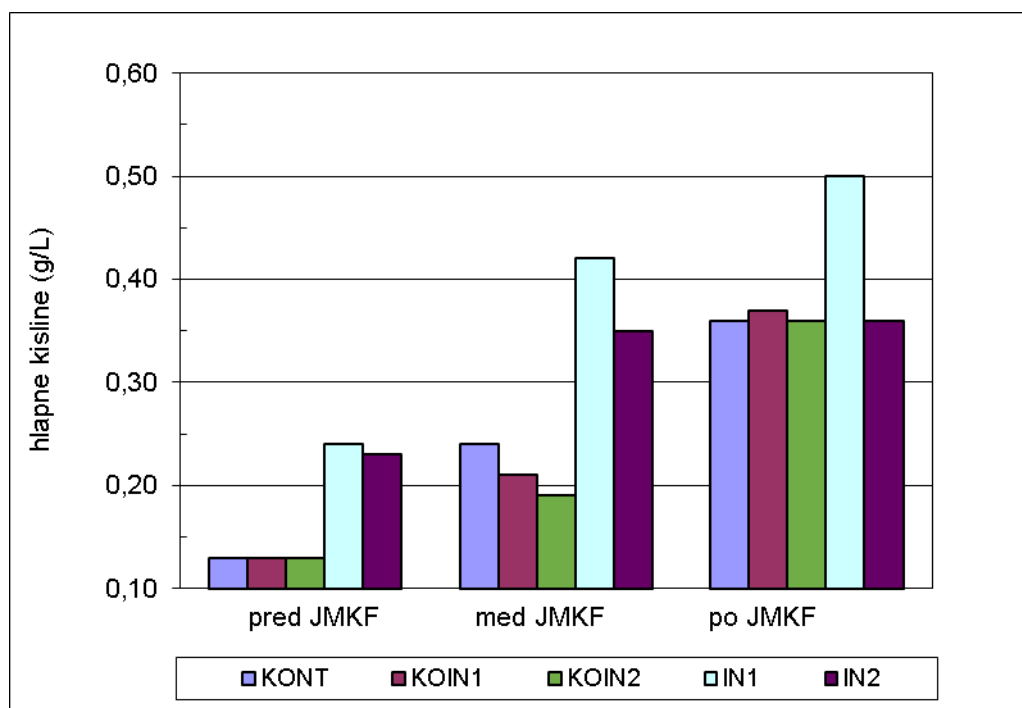
Slika 14: Vsebnosti skupnega žveplovega dioksida po Ripperju med vinifikacijo vina sorte laški rizling
 KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

Slika 14 prikazuje vrednosti skupnega žveplovega dioksida (SO_2) med vinifikacijo vina sorte laški rizling. Po končani JMCF je bila končna vrednost skupnega SO_2 najvišja pri KOIN1 73 mg/L, najnižja pa pri IN2 62 mg/L.



Slika 15: Vsebnosti prostega žveplovega dioksida po Ripperju med vinifikacijo vina sorte laški rizling
 KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

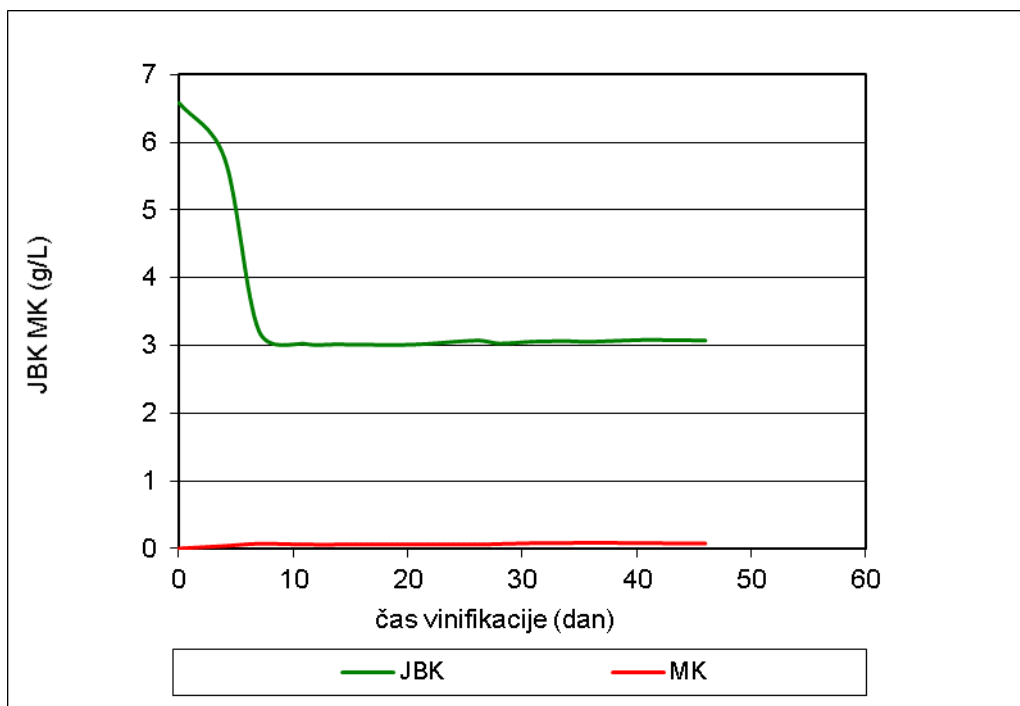
Slika 15 prikazuje vrednosti prostega žveplovega dioksida (SO_2) med vinifikacijo vina sorte laški rizling. Po končani JMKF je bila končna vrednost prostega SO_2 najvišja pri IN1 38 mg/L, najnižja pa pri KONT in KOIN1 33 mg/L.



Slika 16: Spreminjanje vsebnosti hlapnih kislin med vinifikacijo vin sorte laški rizling
 KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

Na sliki 16 je razvidno povečanje hlapnih kislin po končani JMKF. Končna vsebnost hlapnih kislin je bila najvišja pri inokulaciji z MKB, in sicer se je pri IN1 povečala za 0,26 g/L in pri IN2 za 0,13 g/L. Končne vsebnosti hlapnih kislin so pri KOIN1 in KOIN2 ter pri kontrolnem vzorcu primerljive med sabo, razlika med njimi je le 0,01 g/L. Koncentracija hlapnih kislin ni presegala zakonsko določene meje za bela vina 1 g/L (Pravilnik o pogojih..., 2004).

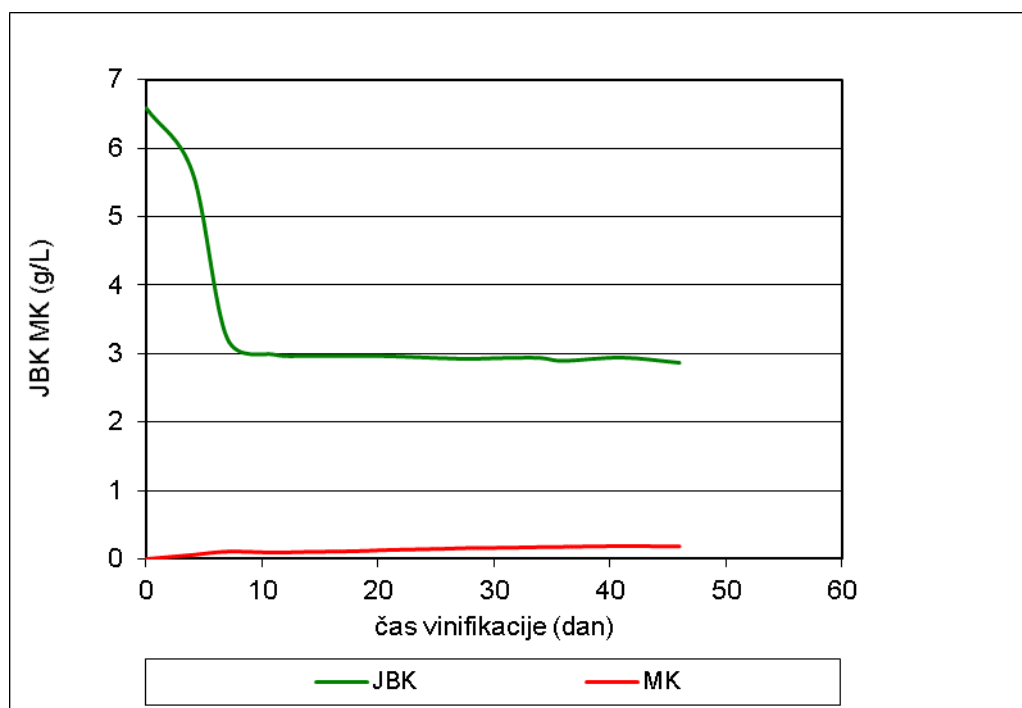
Večji vpliv na povečanje vsebnosti hlapnih kislin ima torej čas dodatka kulture MKB kot izbira vrste uporabljene MKB.



Slika 17: Spremljanje vsebnosti jabolčne (JBK) in mlečne kisline (MK) med vinifikacijo kontrolnega vzorca vina sorte laški rizling

JBK = jabolčna kislina, MK = mlečna kislina

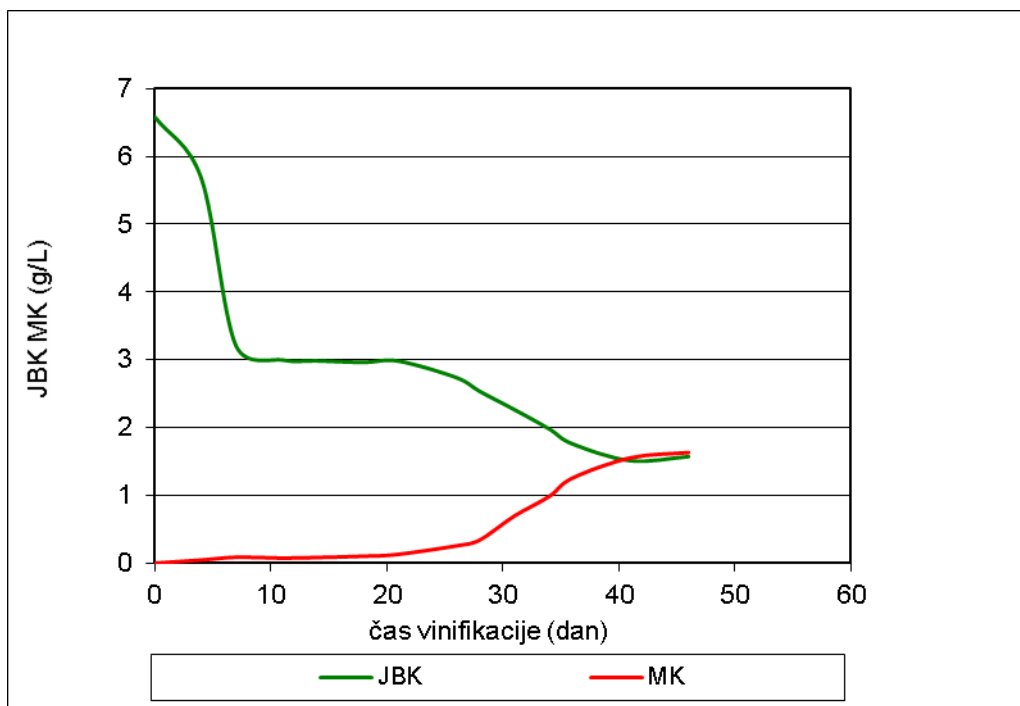
Slika 17 prikazuje spreminjanje vsebnosti jabolčne in mlečne kisline pri vinifikaciji kontrolnega vzorca KONT. Največje znižanje v vsebnosti jabolčne kisline smo opazili že do 7. dne, in sicer se vsebnost zniža iz začetne 6,6 g/L na končno 3,1 g/L. Vsebnost mlečne kisline se je pri kontrolnem vzorcu med celotnim časom vinifikacije zvišala le za 0,1 g/L.



Slika 18: Spremljanje vsebnosti jabolčne (JBK) in mlečne kisline (MK) med vinifikacijo koinokuliranega vzorca vina (MKB1) sorte laški rizling

JBK = jabolčna kislina, MK = mlečna kislina

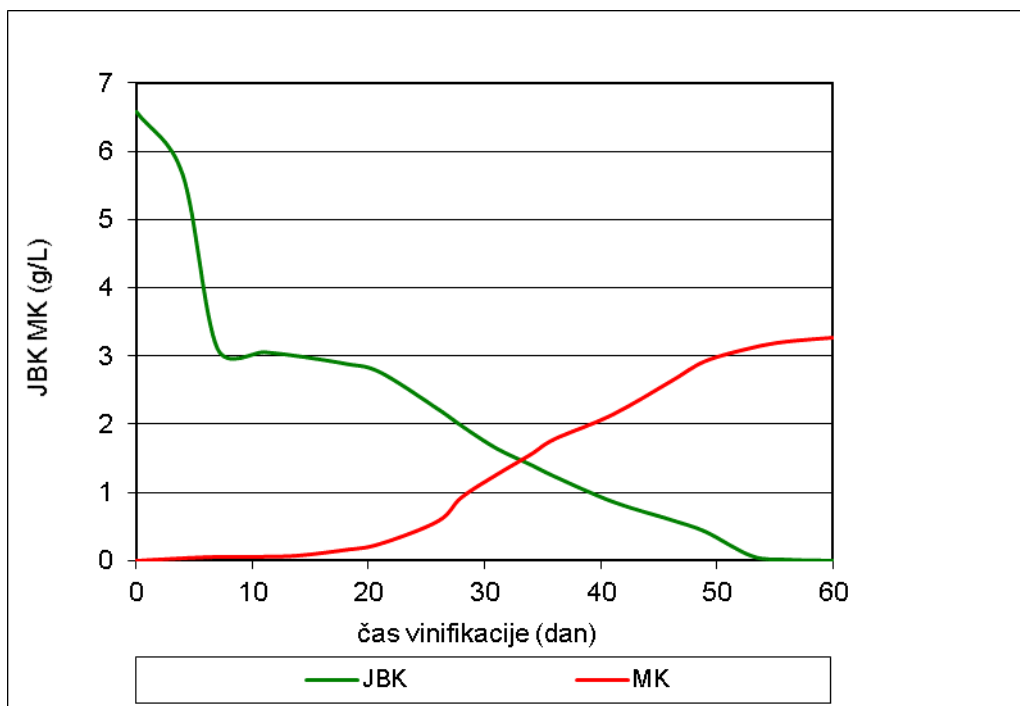
Slika 18 prikazuje spreminjanje vsebnosti jabolčne in mlečne kisline pri vinifikaciji KOIN1. Zelo podobno kot pri KONT na sliki 17 se je vsebnost jabolčne kisline najbolj znižala do 7. dne, in sicer z začetne 6,6 g/L na končno vsebnost 2,9 g/L. Vsebnost mlečne kisline se pri koinokulaciji KOIN1 med celotnim časom vinifikacije zvišala le za 0,2 g/L. V opazovanem obdobju se razgradnja jabolčne kisline ni zaključila. Pri KOIN1 je ostala končna vsebnost jabolčne kisline višja v primerjavi s KOIN2, IN1 in IN2, kar potrjuje tudi dejstvo, da je imela KOIN1 tudi najvišje vsebnosti titrabilnih in skupnih kislin.



Slika 19: Spremljanje vsebnosti jabolčne (JBK) in mlečne kisline (MK) med vinifikacijo koinokuliranega vzorca vina (MKB2) sorte laški rizling

JBK = jabolčna kislina, MK = mlečna kislina

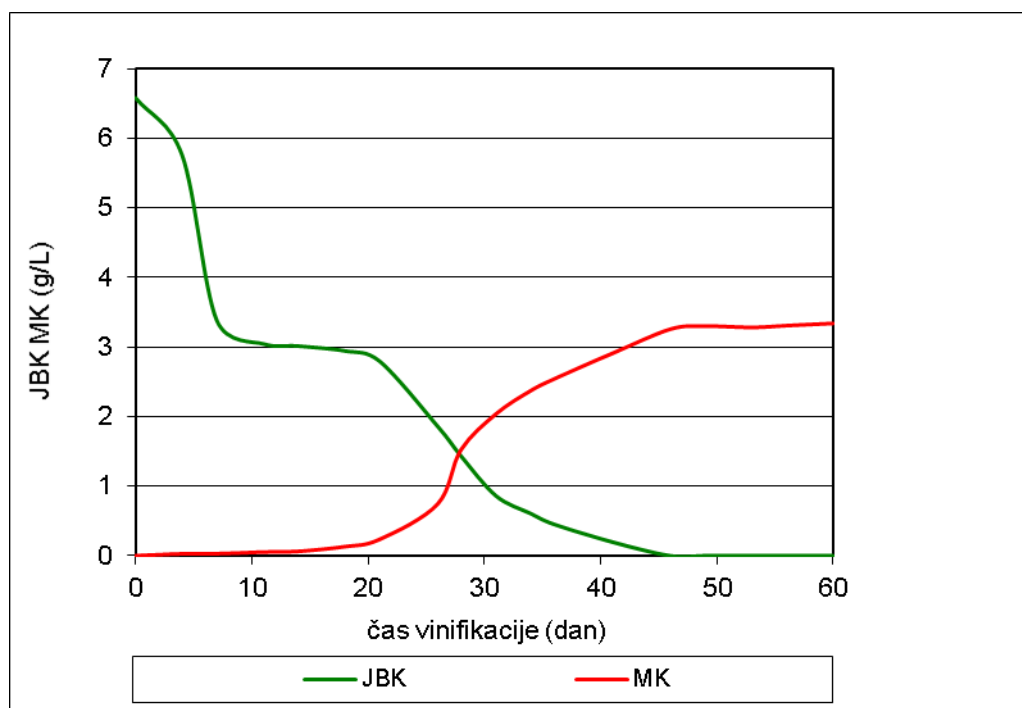
Slika 19 prikazuje spreminjanje vsebnosti jabolčne in mlečne kisline pri vinifikaciji KOIN2. Vsebnost jabolčne kisline se je najhitreje znižala do 7. dne in nato se je po 20. dnevu vinifikacije vsebnost začela ponovno zniževati do končne vsebnosti 1,6 g/L. Sočasno se je z zniževanjem vsebnosti jabolčne kisline po 20. dnevu začela zviševati vsebnost mlečne kisline na končno vsebnost 1,6 g/L.



Slika 20: Spremljanje vsebnosti jabolčne (JBK) in mlečne kisline (MK) med vinifikacijo inokuliranega vzorca vina (MKB1) sorte laški rizling

JBK = jabolčna kislina, MK = mlečna kislina

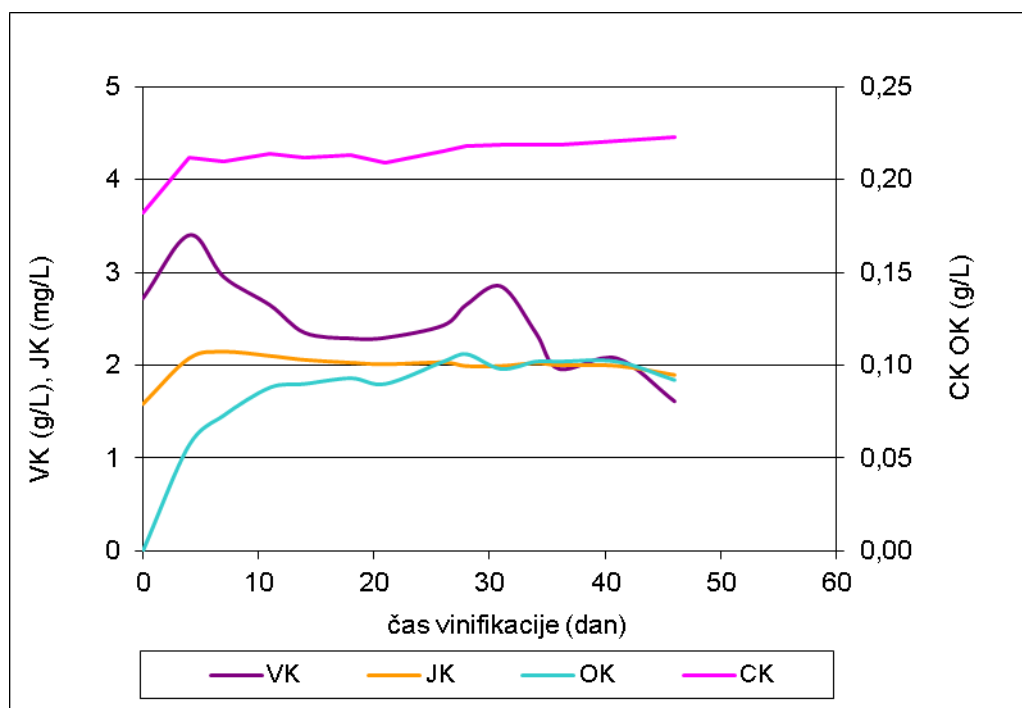
Slika 20 prikazuje spreminjanje vsebnosti jabolčne in mlečne kisline pri vinifikaciji IN1. Kot pri ostalih vinifikacijah smo opazili najhitrejšo razgradnjo jabolčne kisline do 7. dneva vinifikacije in nato postopno zniževanje vsebnosti jabolčne kisline, dokler se ni jabolčna kislina popolnoma razgradila pri 56. dnevu poskusa. Sočasno je ob razgradnji jabolčne kisline nastajala mlečna kislina, končna vsebnost je 3,3 g/L.



Slika 21: Spremljanje vsebnosti jabolčne (JBK) in mlečne kisline (MK) med vinifikacijo inokuliranega vzorca vina (MKB2) sorte laški rizling

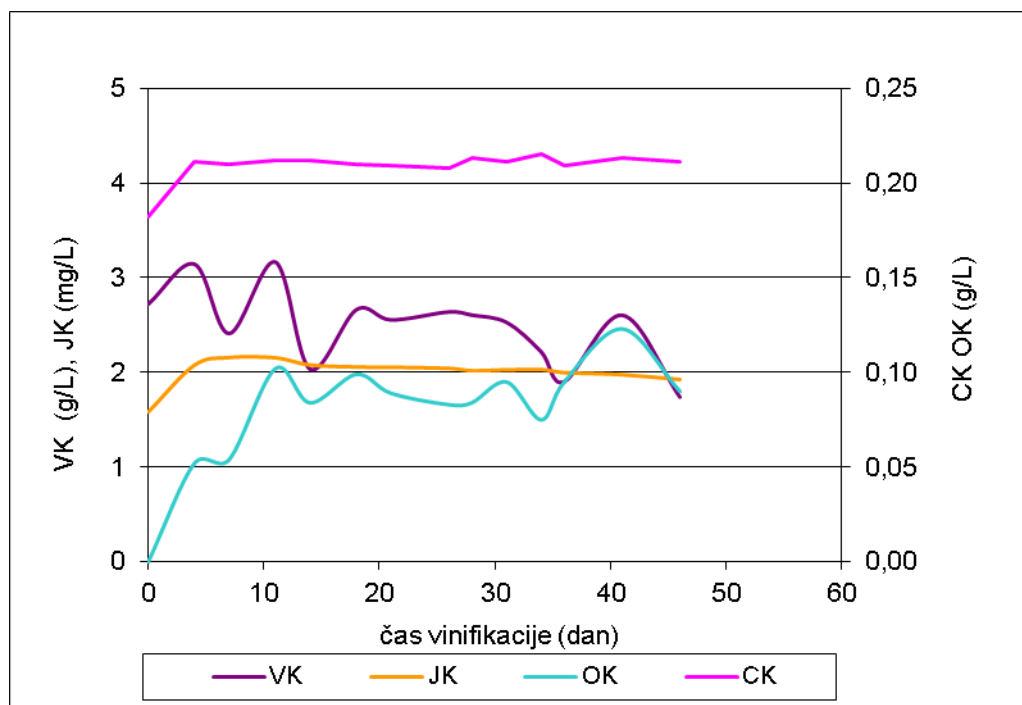
JBK = jabolčna kislina, MK = mlečna kislina

Slika 21 prikazuje spreminjanje vsebnosti jabolčne in mlečne kisline pri vinifikaciji IN2. Trend zniževanja vsebnosti jabolčne kisline je zelo podoben kot pri IN1, le da se je jabolčna kislina pri IN2 razgradila že pri 41. dnevu vinifikacije. Končna vsebnost mlečne kisline je 3,3 g/L.



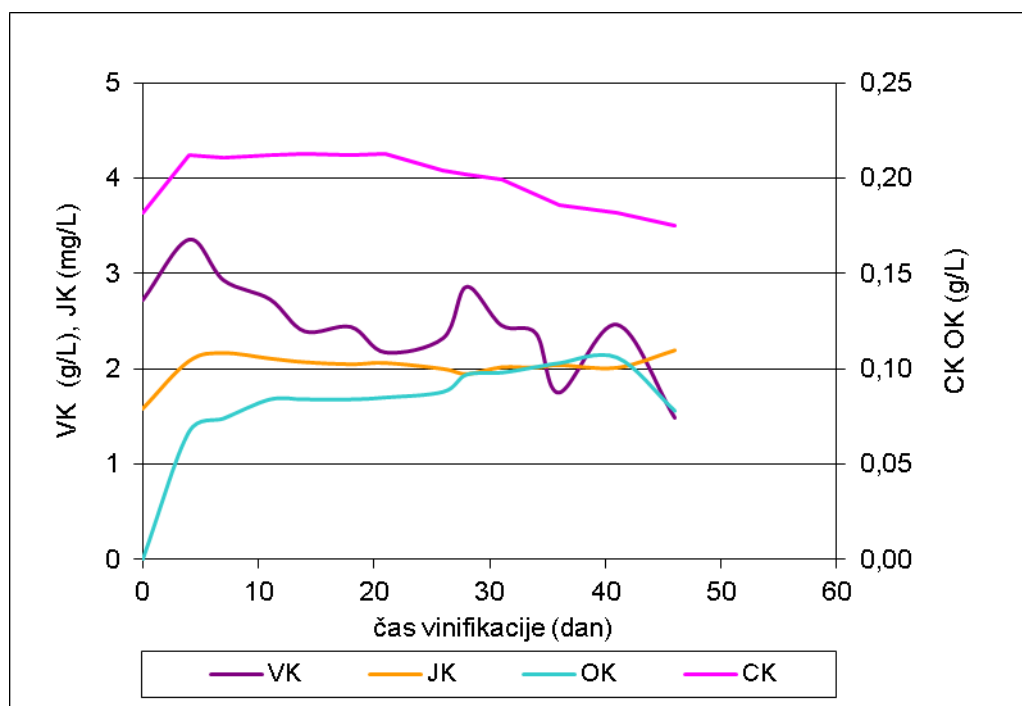
Slika 22: Spremljanje vsebnosti vinske (VK), jantarne (JK), oetne (OK) in citronske kisline (CK) med vinifikacijo kontrolnega vzorca vina sorte laški rizling

VK = vinska kislina, JK = jantarna kislina, OK = oetna kislina, CK = citronska kislina



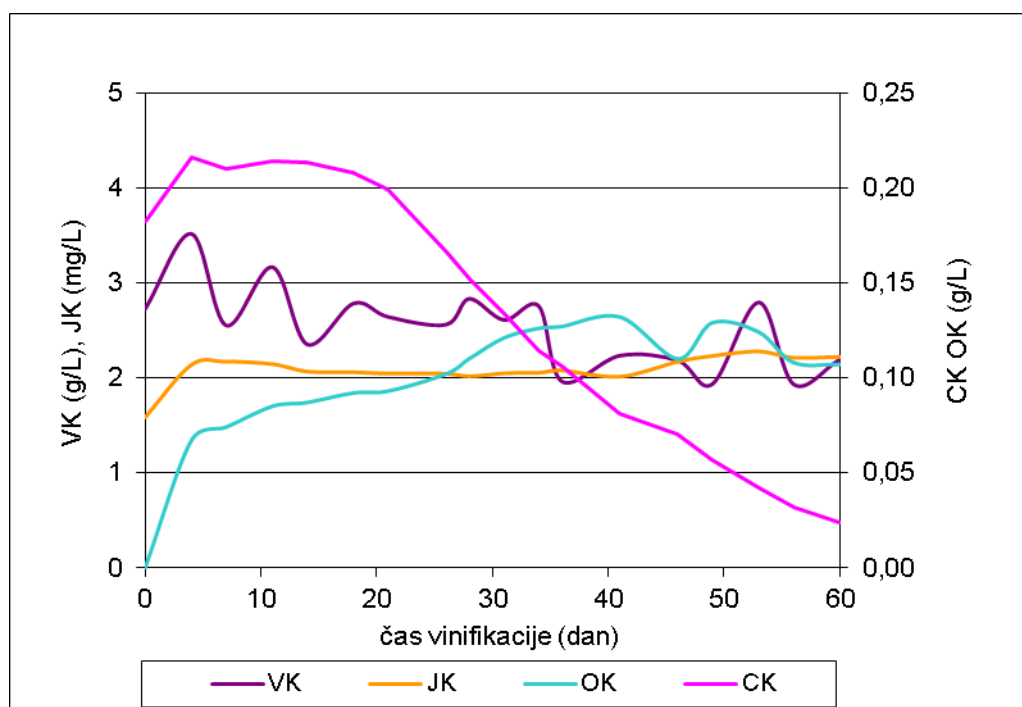
Slika 23: Spremljanje vsebnosti vinske (VK), jantarne (JK), oetne (OK) in citronske kisline (CK) med vinifikacijo koinokuliranega vzorca vina (MKB1) sorte laški rizling

VK = vinska kislina, JK = jantarna kislina, OK = oetna kislina, CK = citronska kislina



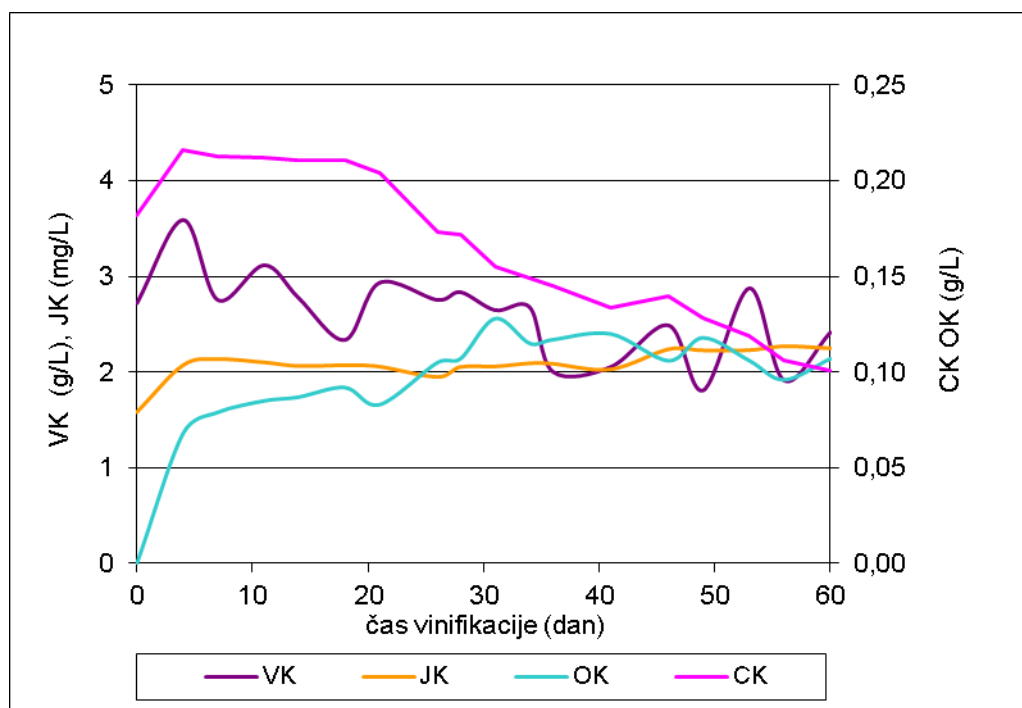
Slika 24: Spremljanje vsebnosti vinske (VK), jantarne (JK), oetne (OK) in citronske kisline (CK) med vinifikacijo koinokuliranega vzorca vina (MKB2) sorte laški rizling

VK = vinska kislina, JK = jantarna kislina, OK = oetna kislina, CK = citronska kislina



Slika 25: Spremljanje vsebnosti vinske (VK), jantarne (JK), oetne (OK) in citronske kisline (CK) med vinifikacijo inokuliranega vzorca vina (MKB1) sorte laški rizling

VK = vinska kislina, JK = jantarna kislina, OK = oetna kislina, CK = citronska kislina



Slika 26: Spremljanje vsebnosti vinske (VK), jantarne (JK), očetne (OK) in citronske kisline (CK) med vinifikacijo inokuliranega vzorca vina (MKB2) sorte laški rizling

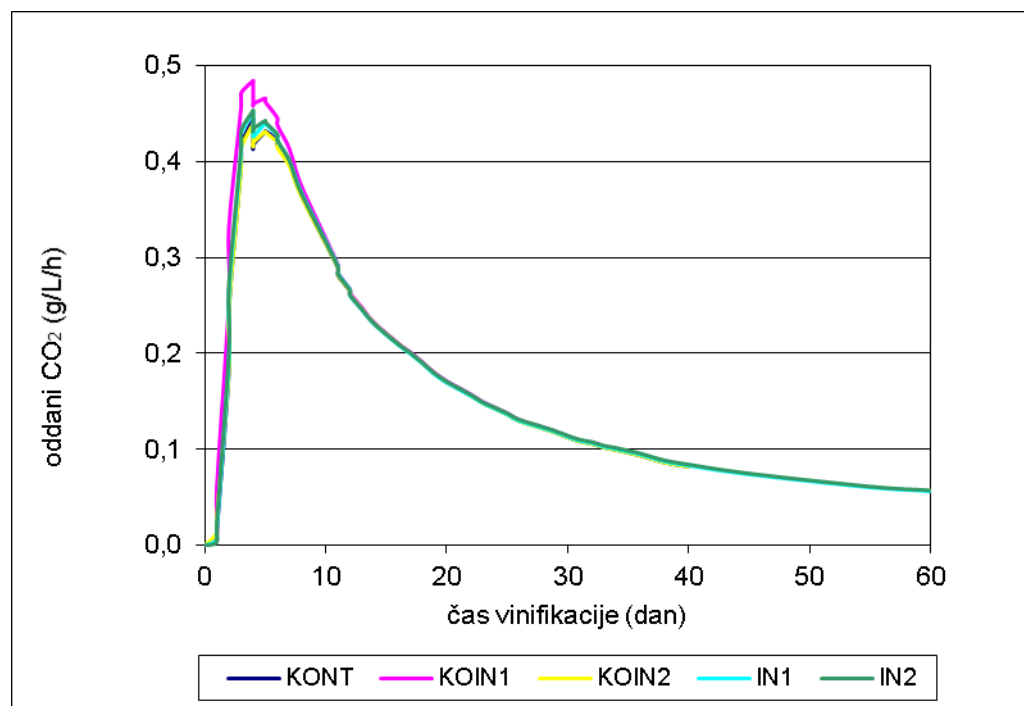
VK = vinska kislina, JK = jantarna kislina, OK = očetna kislina, CK = citronska kislina

Slike 22–26 prikazujejo spreminjanje vsebnosti vinske, jantarne, očetne in citronske kisline pri vinifikaciji vin sorte laški rizling. Vsebnost vinske kisline se je med vinifikacijami, z vmesnimi nihanji, znižala pri vseh vzorcih, kar lahko pripišemo izločanju vinskega kamna, nastal je kalijev hidrogentartrat.

Med vinifikacijami se vsebnost jantarne kisline ni močno spreminjala. Pričakovali bi celo padec vsebnosti zaradi vezave na druge molekule. Najvišje vsebnosti jantarne kisline vsebujeta vzorca pri inokulaciji z MKB. Končne vrednosti se gibljejo med 1,90 mg/L in 2,25 mg/L. Jabolčno-mlečnokislinska fermentacija ni vplivala na vsebnost jantarne kisline, saj je MKB ne metabolizirajo.

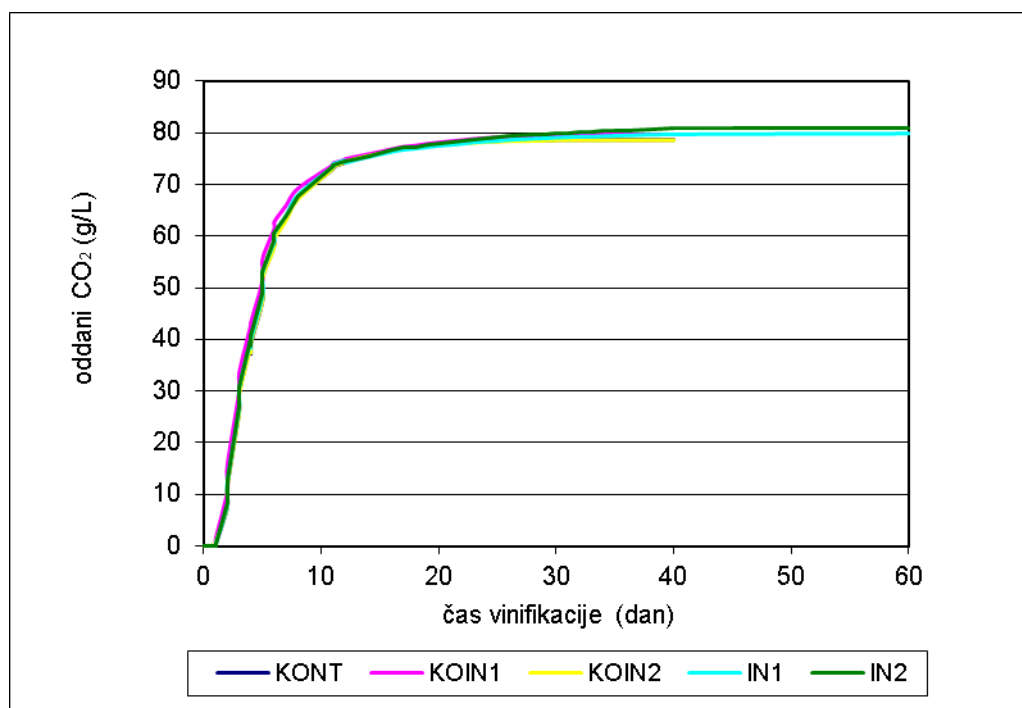
Pri vseh vzorcih smo opazili, da se je vsebnost očetne kisline najbolj povečala na začetku AF in nato postopoma povečevala do najvišje vrednosti 0,107 g/L pri IN1 in IN2. Med JMKF se je kot posledica metabolizma citronske kisline povečala vsebnost očetne kisline, zato smo pri vzorcu IN1, pri katerem se je razgradilo več citronske kisline, določili večjo vsebnost očetne kisline. Vzorec IN1 je imel tudi najvišjo vsebnost hlapnih kislin.

S potekom razgradnje jabolčne kisline je sovpadala razgradnja citronske kisline, ki se ni zaključila pri nobeni vinifikaciji. Najvišjo končno vsebnost citronske kisline 0,223 g/L smo določili kontrolnemu vzorcu, najnižjo 0,024 g/L pa IN1. Nižje vsebnosti citronske kisline imata vzorca pri inokulaciji z MKB v primerjavi s koinokulacijo z MKB.



Slika 27: Fermentacijska krivulja med vinifikacijami vina sorte laški rizling

KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2



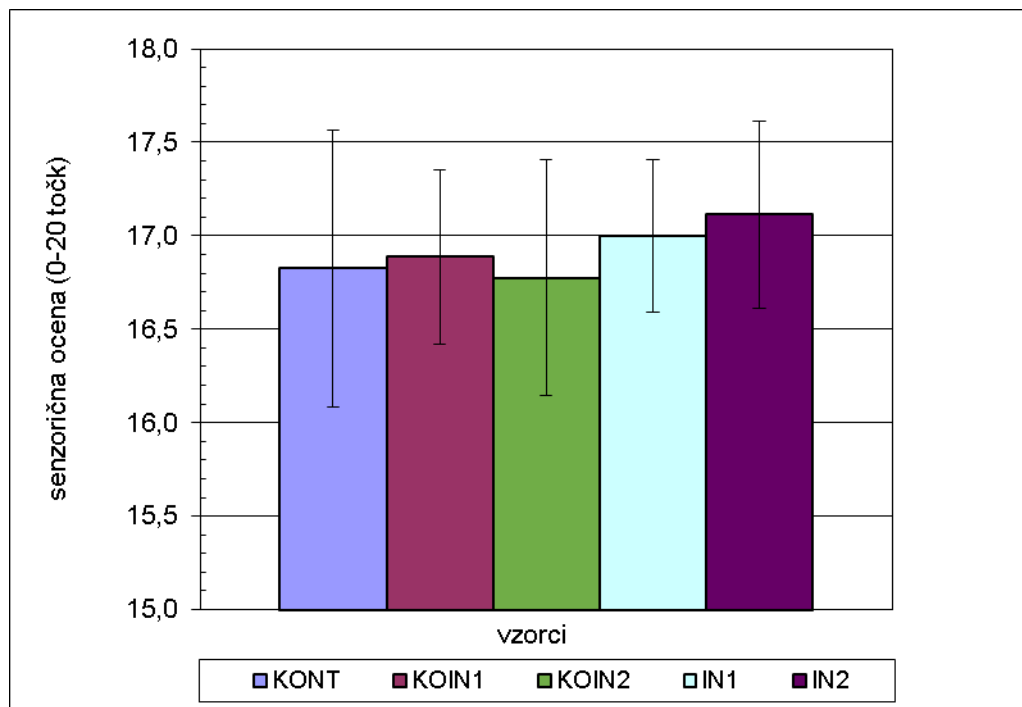
Slika 28: Vrelna krivulja med vinifikacijami vina sorte laški rizling

KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

Zanimale so nas razlike med posameznimi vinifikacijami zaradi vpliva časa dodatka in uporabljene startrske kulture MKB, ki pa jih nismo zaznali. V končni količini oddanega CO₂ med vinifikacijami vina sorte laški rizling ni bilo značilnih razlik. Največjo končno količino oddanega CO₂ je imel vzorec IN2 81,05 g/L, sledili so mu IN1 79,89 g/L, KOIN1 79,71 g/L, KONT 78,67 g/L. Pri KOIN2 smo ugotovili najmanjšo količino 78,60 g/L. Razlika v končni količini med vzorci je znašala le 2,45 g/L oddanega CO₂. Naraščanje količin oddanega CO₂ je sovpadalo z zniževanjem koncentracije reducirajočih sladkorjev. Ugotovili smo, da imata vzorca z več oddanega CO₂ IN2 in IN1 nižjo vrednost reducirajočih sladkorjev in obratno, vzorca z manj oddanega CO₂ KOIN2 in KONT imata višje vrednosti reducirajočih sladkorjev. Največ CO₂ je nastalo v času najintenzivnejše AF, torej med 3. in 8. dnem. V vseh primerih se je količina oddanega CO₂ do 7. dne zelo povečevala. Najvišjo vrednost oddanega CO₂ smo zaznali pri vinifikaciji KOIN1 0,482 g/L/h, sledile so IN2, KONT, IN1 in KOIN2. V nadaljevanju se je količina oddanega CO₂ zmanjševala do 0,057 g/L/h (slika 27). V okviru vrelnih krivulj (slika 28), ki prikazujejo časovno odvisnost koncentracije

oddanega CO₂ (g/L), nismo opazili praktično nobenih razlik med petimi fermentacijskimi poskusi.

Ugotovili smo, da dodatek startrske kulture MKB ne vpliva na kinetiko kvasovk med alkoholno fermentacijo. To nam potrjuje tudi slika 12.



Slika 29: Senzorična ocena vzorcev vina sorte laški rizling

KONT = kontrolni vzorec, KOIN1 = koinokuliran vzorec z MKB1, KOIN2 = koinokuliran vzorec z MKB2, IN1 = inokuliran vzorec z MKB1, IN2 = inokuliran vzorec z MKB2

Slika 29 prikazuje razlike v senzorični oceni med posameznimi vinifikacijami vin sorte laški rizling. Najvišjo oceno je prejelo vino pri vinifikaciji IN2 17,1 točke, najnižjo pa vino pri vinifikaciji KOIN2 16,8 točke. Razlika med njima je majhna, znaša le 0,3 točke, kar smo potrdili tudi s standardnim odklonom, ki nam ponazarja, kako so vrednosti razpršene okoli povprečnih ocen. Ugotovili smo, da so med posameznimi vzorci le majhne razlike v senzorični oceni. Z upoštevanjem standardnega odklona smo pri senzorični oceni ugotovili, da sta najboljše ocenjena vzorca IN1 in IN2, najslabše ocenjena vzorca pa KONT in KOIN2

Ocenjevalcem je vzorec IN2 deloval bolj sadno, s prijetnejšim vonjem, vino je bilo bistro, vendar svetlejšje kot vzorec IN1, pri katerem je bilo zaznati rahlo maslen pookus. Pri najslabše ocenjenem vzorcu KOIN2 je bilo zaznati krajši pookus, vendar je bil ta prazen, neizrazit z zaprtim, manj intenzivnim vonjem. Zaznali smo mehkoben, manj kislinski okus. V vzorcu KOIN1 smo zaznali izstopajočo kislino, kar je pričakovano, saj je vsebnost jabolčne kisline ostala visoka zaradi ustavitve JMKF. V vzorcu je bilo zato, v nasprotju z ostalimi vzorci, kjer je potekala JMKF, mogoče zaznati tudi svež, sorten vonj. Vzorec je bil moten s prisotnim CO₂. Kontrolni vzorec je bil bister z rahlo meglico, z zaprtim, vendar sortnim vonjem in z izstopajočo kislino.

Vsi vzorci se uvrščajo v razred kakovostnih vin ZGP.

5 SKLEPI

V diplomski nalogi smo ugotavljali, kako čas dodatka dveh različnih starterskih kultur MKB vpliva na kakovost vina sorte laški rizling. Na osnovi opravljenega dela sklepamo:

- da so se pri vzorcih, kjer je potekla JMKF, znižale vsebnosti skupnih in titrabilnih kislin, vrednosti pH so se povečale,
- da čas dodatka MKB ni vplival na kinetiko kvasovk med alkoholno fermentacijo, vrednost sladkorne stopnje in hitrost oddajanja CO₂ sta se pri vseh vinifikacijah enakomerno spreminjale,
- da inokulacija MKB v vino po končani alkoholni fermentaciji, in sicer 11. dan vinifikacije, značilno vpliva na potek JMKF in na kakovost vina v primerjavi z uporabljenim sevom startrske kulture MKB
- da je pri inokulaciji z MKB v vino opazno popolnejše dokončanje JMKF, saj se je jabolčna kislina razgradila v celoti,
- da so vsi vzorci senzorično sprejemljivi in jih uvrščamo v razred kakovostnih vin ZGP,
- da je senzorična ocena po Bauxbaumovi metodi med posameznimi vzorci pokazala neznačilne razlike in da so le-te vezane predvsem na opisno senzorično analizo.

6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil proučiti vpliv JMKF na kakovost vina sorte laški rizling. Ugotavljali smo, kako različni časovni dodatek dveh različnih sevov MKB vpliva na fizikalno-kemijske in senzorične lastnosti pridelanega vina med posameznimi vzorci. Za izvedbo poskusa smo izbrali sorto laški rizling iz vinorodnega okoliša Štajerska Slovenija. Vinifikacije so potekale v 28 L fermentacijskih posodah iz nerjavnega jekla (tankih) in v 600 mL vrelnih steklenicah. V poskusu smo izvedli pet različnih vinifikacij, ki so vključevale koinokulacijo mošta in inokulacijo vina po zaključeni alkoholni fermentaciji z dvema različnima startorskima kulturama mlečno-kislinskih bakterij vrste *Oenococcus oeni*. Kontrolno vinifikacijo smo izvedli z inokulacijo startrske kulture kvasovk. V moštu, kakor pozneje v vinu, smo izvedli več kemijskih analiz. Trikrat tedensko smo spremljali potek JMKF s kemijskimi analizami vrednosti pH, titrabilnih in skupnih kislin, refraktometrično smo določali sladkorno stopnjo in hkrati vzorčili za analizo organskih kislin (jabolčne, mlečne, vinske, jantarne, očetne in citronske) s HPLC. Med vinifikacijo in po končani JMKF smo opravili naslednje kemijske analize: vrednosti pH in pufrne kapacitete, vsebnost titrabilnih in skupnih kislin, vsebnost skupnega ekstrakta in alkohola, vsebnost hlapnih kislin, vsebnost prostega in skupnega žveplovega dioksida, vsebnost reducirajočih sladkorjev. Vzorce vina smo tudi senzorično ocenili. Z dnevnim tehtanjem mase oddanega CO₂ smo spremljali kinetiko alkoholne fermentacije. Primerjalno smo obravnavali kontrolni vzorec z vzorci koinokulacije s sevom 1 in 2 in inokulacije s sevom 1 in 2.

Spremembe v vrednosti pH so povezane s potekom JMKF, torej z razgradnjo jabolčne kisline. Končne vrednosti pH so se pričakovano povečale. Po končanih vinifikacijah smo opazili precejšnje razlike tudi v vsebnosti titrabilnih in skupnih kislin. Nižje vsebnosti smo opazili pri vzorcih inokulacije z MKB, in sicer bolj pri vinifikacijah s sevom 2. Razlike med vzorci smo ugotovili tudi pri določanju relativne gostote, reducirajočih sladkorjev, hlapnih kislin in skupnega ekstrakta v vzorcih, kjer je bil vpliv časa inokulacije izrazitejši kot uporabljena startrska kultura MKB.

Popolnejše dokončanje JMKF opazimo pri inokulaciji z MKB v vino, saj se je jabolčna kislina razgradila v celoti. Hitrejšo razgradnjo opazimo pri uporabi seva 2. Sočasno se je ob razgradnji jabolčne kisline tvorila mlečna kislina, in sicer do enake končne vrednosti pri inokulaciji z MKB v vino. Razgradnja jabolčne kisline se ni zaključila pri koinokulaciji z MKB in pri kontrolnem vzorcu. Razgradnja citronske kisline se ni zaključila pri nobeni vinifikaciji. V vzorcu IN1, kjer se je razgradilo več citronske kisline, smo določili tudi višjo vsebnost očetne in jantarne kisline. Vsebnost vinske kisline se je med vinifikacijami enako znižala pri vseh vzorcih, ne glede na potek JMKF.

Med posameznimi vinifikacijami nismo zaznali razlike zaradi vpliva časa dodatka in uporabljene startrske kulture MKB na kinetiko kvasovk med alkoholno fermentacijo. Med celotnim trajanjem vinifikacije se hitrost oddanega CO₂ med posameznimi vzorci ni značilno razlikovala. Neznatno večjo končno količino oddanega CO₂ ima vzorec pri inokulaciji MKB v vino. Prav tako različen časovni dodatek dveh različnih uporabljenih starter kultur MKB ne vpliva na zniževanje sladkorne stopnje med posameznimi vzorci.

Senzorična ocena po Bauxbaumovi metodi je med posameznimi vzorci pokazala majhne razlike, ki so bile vezane predvsem na opisno senzorično analizo. Med poskusom nismo mogli potrditi, da bi kateri koli izbran postopek vinifikacije močno vplival na izrazito boljšo senzorično sprejemljivost vzorcev. Višjo oceno sta prejela vzorca pri inokulaciji z MKB, nižjo pa kontrolni vzorec in vzorec s koinokulacijo z MKB2.

7 VIRI

- Bartowsky E.J. 2005. *Oenococcus oeni* and malolactic fermentation – moving into the molecular arena. Australian Journal of Grape and Wine Research, 11: 174-187
- Bavčar D. 2006. Kletarjenje danes. Ljubljana, Kmečki glas: 286 str.
- Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, The Chapman & Hall Enology Library: 604 str.
- Comitini R., Ferretti F., Clementi I., Mannazzu I., Ciani M. 2005. Interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and malolactic bacteria: preliminary characterization of a yeast proteinaceous compound(s) active against *Oenococcus oeni*. Journal of Applied Microbiology, 99: 105–111
- Delaquis P., Cliff M., King M., Girard B., Hall J., Reynolds A. 2000. Effect of two commercial malolactic cultures on the chemical and sensory properties of Chancellor wines vinified with different yeasts and fermentation temperatures. American Journal of Enology and Viticulture, 51: 42-48
- Delfini C., Cersosimo M., Prete V. del, Strano M., Gaetano G., Pagliara A., Ambro S. 2004. Resistance screening essay of wine lactic acidbacteria on lysozyme: efficacy of lysozyme in unclarified grape musts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 1861-1866
- Fleet G.H. 1993. Wine microbiology and biotechnology. London, Taylor & Francis: 507 str.
- Fugelsang K.C. 1997. Wine microbiology. New York, The Chapman & Hall Enology Library: 241 str.
- Gockowiak H., Henschke P.A. 2003. Interaction of pH, ethanol concentration and winematrix on induction of malolactic fermentation with commercial "direct inoculation" startercultures. Australian Journal of Grape and Wine Research, 9: 200-209

- Gonzalez-Ramos D., Gonzalez R. 2006. Genetic determinants of the release of mannoproteins of enological interest by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 9411-9416
- Hrček L., Korošec-Koruza Z. 1996. Sorte in podlage vinske trte. Ptuj, Slovenska vinarska akademija Veritas: 40-41
- Kordiš-Krapež M., Abram V., Kač M., Ferjančič S. 2001. Determination of organic acids in white wines by RP-HPLC. Food Technology and Biotechnology, 39: 93-99
- Košmerl T. 2005. Senzorične lastnosti mošta in vina: Študijsko gradivo za pokuševalce vina, mošta in drugih proizvodov iz grozdja in vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 str.
- Košmerl T. 2010. Biološki razkis vina: Permanentno podiplomsko izobraževanje s področja vinarstva za kmetijske svetovalce. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11 str.
- Košmerl T., Kač M. 2003. Osnovne kemijske analize mošta in vina: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 87 str.
- Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 609- 632
- Krieger S. 2002. Management of malolactic fermentation (MLF)- newstrains. V: 2. slovenski vinogradniško-vinarski kongres z mednarodno udeležbo, Otočec, 31. 1.-2. 2. 2002. Ljubljana, Strokovno društvo vinogradnikov in vinarjev Slovenije, Zveza društev vinogradnikov in vinarjev Slovenije, Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 392-401
- Liu S.-Q. 2002. Malolactic fermentation in wine – beyond deacidification. Journal of Applied Microbiology, 92: 589–601
- Miltenberger R., Maier C., Schindler E. 2003. Säureabbau: Bacteriell mit Starterkulturen. Deutsche Weinmagazin, 21: 10-13

- Nemanič J. 1996a. Spoznajmo vino. Ljubljana, Kmečki glas: 165 str.
- Nemanič J. 1996b. Zorenje grozdja in trgatev. Kmečki glas, 53,37: 11-11
- Pravilnik o postopku in načinu ocenjevanja mošta, vina in drugih proizvodov iz grozdja in vina. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 32: 3857-3862
- Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za predelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 43: 5336-5358
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Convaud A. 2000. Handbook of enology. Vol.1: The microbiology of wine and vinifications. Chichester, John Wiley & Sons: 454 str.
- Rosi J., Fia G., Canuti V. 2003. Influence of different pH values and inoculation time on the growth and malolactic activity of a strain of *Oenococcus oeni*. Australian Journal of Grape and Wine Research, 9: 194-199
- Rudan-Tasič D., Klofutar C. 2007. Fizikalno kemijske metode v živilstvu. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 376 str.
- Šikovec S. 1985. Sodobno kletarjenje. Ljubljana, Kmečki glas: 280 str.
- Šikovec S. 1993. Vinarstvo od grozdja do vina. Ljubljana, Kmečki glas: 284 str.
- Tracey R.P., Britz T.J. 1989. The effect of amino acids on malolactic fermentation by *Leuconostoc oenos*. Journal of Applied Bacteriology, 67: 589-595
- Veber G. 2006. Tehnološki listi iz vinarstva. 1. del Maribor, Jurana: 72 str.
- Vodovnik Plevnik T., Vodovnik A., Rusjan T., Hudoklin S. 2007. Vinarstvo na Slovenskem danes V: 3. slovenski vinogradniško-vinarski kongres, Maribor, 15.-16. 11. 2007. Maribor, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod Maribor: 27-44
- Vodovnik T., Vodovnik A. 1999. Nasveti za vinarje. Ljubljana, Kmečki glas: 265 str.

Vrščaj Vodošek T. 2007. Vpliv sorte, letnika in dodatka starterske kulture v mošt ali vino na potek jabolčno-mlečnokislinske fermentacije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 166 str.

Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 151 str.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Tatjani Košmerl za prijazne nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi diplomskega dela.

Za končni pregled diplomskega dela hvala recenzentki izr. prof. dr. Barbari Jeršek in gospe Zdenki Zupančič za pomoč pri laboratorijskem delu.

Najlepša hvala gospe Cvetki Lumbar za jezikovni pregled diplomskega dela.

Zahvaljujem se mojim prijateljicam in sošolkam Valeriji, Sandi in Maji, zaradi katerih se bom študijskih let spominjala vsak trenutek svojega življenja.

Mami in ati, hvala vama za vso potrpežljivost in materialno pomoč ves čas študija. Hvala, da sta verjela vame!

Brat Gregor, hvala za tehnično pomoč in še slišim tvoje spodbudne besede ob pisanju diplomskega dela.

Damijan, tvoja podpora in zaupanje vame sta neprecenljiva.