

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Helena DROLČ

**VPLIV HRANIL IN HRASTOVIH TRSK NA
FERMENTACIJSKE LASTNOSTI KVASOVK IN NA
ANTIOKSIDATIVNE ZNAČILNOSTI MLADIH VIN**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Prehrana

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Helena DROLČ

**VPLIV HRANIL IN HRASTOVIH TRSK NA FERMENTACIJSKE
LASTNOSTI KVASOVK IN NA ANTIOKSIDATIVNE ZNAČILNOSTI
MLADIH VIN**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

**THE EFFECT OF NUTRITION AND OAK CHIPS ON THE
FERMENTATION CHARACTERISTICS OF WINE YEASTS
AND ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF YOUNG WINES**

M. SC.THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science Technology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija druge stopnje Živilstva. Praktični del je bil opravljen na Katedri za tehnologije, prehrano in vino, na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani ter na Kmetijsko gozdarskem zavodu, Nova Gorica.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Heleno Abramovič, za somentorico dr. Tjašo Jug in za recenzentko prof. dr. Tatjano Košmerl.

Mentorica: prof. dr. Helena ABRAMOVIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Somentorica: dr. Tjaša JUG
Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Helena Drolc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 663.252/253:582.282.3:577.1:543.92(043)=163.6
KG	sauvignon/ mošt/ mlado vino/ starterske kulture/ vinske kvasovke/ alkoholna fermentacija/ hrastove trske/ fizikalnokemijske lastnosti/ senzorične lastnosti/ skupni fenoli/ antioksidativni potencial
AV	DROLC, Helena, dipl. inž. živ. in prehr. (UN)
SA	AMBRAMOVIČ, Helena (mentorica)/ JUG, Tjaša (somentorica)/ KOŠMERL, Tatjana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2014
IN	VPLIV HRANIL IN HRASTOVIH TRSK NA FERMENTACIJSKE LASTNOSTI KVASOVK IN NA ANTIOKSIDATIVNE ZNAČILNOSTI MLADIH VIN
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. Stopnja Živilstvo)
OP	X, 68 str., 16 pregl., 32 sl., 43 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Uporaba komercialnih sevov kvasovk in hranil zanje je zaradi svoje enostavne uporabe, vinarjevih želja po povečanju kinetike alkoholne fermentacije in boljših senzoričnih lastnosti pridelanega vina postala v zadnjih letih stalna praksa v večini vinarskih kleti. Pridelava vina z večjo vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in posledično s povečanim antioksidativnim potencialom (AOP), je vzrok, da vinarji posegajo tudi po dodatku hrastovih trsk v mošt. Namen diplomskega dela je ugotoviti, ali omenjeni dodatki, zlasti dodatek trsk iz hrastovega lesa, vplivajo na fermentacijsko kinetiko in na vsebnost pomembnih antioksidantov v vinu, to je fenolnih spojin ter s tem na ohranitev oziroma povečanje AOP pridelanega vina. V fermentacijskih poskusih smo uporabili mošt sauvignon, letnik 2013, iz vinorodnega okoliša Štajerska, Slovenija in različne dodatke: komercialne starterske kulture kvasovk, hranila zanje in trske iz hrastovega lesa, različnega botaničnega izvora in stopnje stopnje ožganosti. Po končani alkoholni fermentaciji smo z WineScan analizo določili fizikalno-kemijske parametre pridelanega vina, spektrofotometrično določili vsebnost skupnih fenolnih spojin in AOP pridelanega vina, prav tako pa tudi AOP droži. Izračunali smo fermentacijsko učinkovitost posameznih vzorcev, opravili senzorično ocenjevanje vzorcev pridelanih mladih vin po uradni 20-točkovni Buxbamovi lestvici, 5-točkovni ocenjevalni lestvici in po metodi rangiranja vzorcev. Rezultati so potrdili, da dodatek trsk iz hrastovega lesa v mošt vpliva na fermentacijske značilnosti kvasovk ter na fizikalno-kemijske parametre in antioksidativni potencial pridelanih mladih vin sauvignon, v manjši meri pa na senzorične lastnosti vina. Prav tako tudi dodatek hranila za kvasovke v mošt vpliva na fermentacijske značilnosti in antioksidativni potencial pridelanih mladih vin sauvignon, a je njegov vpliv pričakovano manjši od vpliva dodanih trsk iz hrastovega lesa.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
UDC UDC 663.252/253:582.282.3:577.1:543.92(043)=163.6
CX sauvignon/ musts/ young wines/ starter cultures/ wine yeasts/ alcoholic fermentation/ nutritions/ oak chips/ physicochemical properties/ sensory properties/ total phenolic compounds/ antioxidant potential
AU DROLČ, Helena, dipl. inž. živ. in prehr. (UN)
AA ABRAMOVIĆ, Helena (supervisor)/ JUG, Tjaša (co-advisor)/ KOŠMERL, Tatjana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2014
TI THE EFFECT OF NUTRITION AND OAK CHIPS ON THE FERMENTATION CHARACTERISTICS OF WINE YEASTS AND ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF YOUNG WINES
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)
NO X, 68 p., 16 tab., 32 fig., 43 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Ease of use combined with winemakers' desire to increase alcoholic fermentation kinetics and improve sensoric characteristics of young wine are all reasons why addition of commercial yeast starters and nutrients has become constant practice in the field of winemaking in recent years. Nowadays winemakers also add oak chips into grape must in order to achieve higher phenolic content and consequently a higher antioxidant (AOP) in produced wine. This Master's thesis's purpose was to determine whether the addition of different commercial yeast strains, yeast nutrients and oak chips with different botanical origin and toasted degree to the grape must affects the alcoholic fermentation kinetics and the phenolic content in produced wine and consequently its AOP. In the experiment we have used Sauvignon grape must, vintage 2013, from the growing region Styria, Slovenia. After completion of alcoholic fermentation the physical and chemical parameters were determined with WineScan analysis. Spectrophotometry was used to determine total phenolic content, AOP of wine and AOP of wine lees was also determined. Next, alcoholic fermentation efficiency was calculated and sensory analysis of produced young wine was conducted with different sensorial methods (official 20-points Buxham scale, 5-points grading scale, samples ranking method). The results obtained have confirmed that addition of oak chips to white grape must indeed influences fermentation characteristics of fermentation yeast and also affects the physical and chemical parameters of produced Sauvignon wine and its antioxidative potential as well. However, the influence on the sensoric characteristics is minimal. It is also shown that addition of yeast nutrients has influence too, but expected to a lesser extent when compared to oak chips addition effects.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ALKOHOLNA FERMENTACIJA	2
2.2 VINSKE KVASOVKE IN NJIHOVA VLOGA MED ALKOHOLNO FERMENTACIJO MOŠTA.....	2
2.2.1 Splošne značilnosti vinskih kvasovk	2
2.2.2 Vinske kvasovke vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
2.2.3 Starterske kulture vinskih kvasovk	4
2.2.3.1 Mešane starterske kulture kvasovk rodu <i>Saccharomyces</i> /ne- <i>Saccharomyces</i>	7
2.2.3.2 Posamezne in mešane starterske kulture kvasovk rodu <i>Saccharomyces</i> ...	7
2.2.3.3 Hibridni sevi kvasovk.....	8
2.2.3.4 Gensko spremenjene kvasovke.....	8
2.3 DODATEK HRANE ZA KVASOVKE.....	8
2.3.1 Enostavna hranila.....	9
2.3.2 Enostavnejša hranila	9
2.3.3 Kompleksna hranila	10
2.4 ANTIOKSIDANTI	11
2.4.1 Fenolne spojine kot antioksidanti v vinu	13
2.4.2 Razvrstitev fenolnih spojin	14
2.4.3 Tanini in enološki tanini	18
2.4.4 Trske iz hrastovega lesa	19
3 MATERIALI IN METODE DELA	21
3.2 ZASNOVA POSKUSA	21
3.2 MATERIAL.....	22
3.2.1 Mošt	22
3.2.2 Enološka sredstva	22

3.2.2.1	Suhe aktivne kvasovke	22
3.2.2.2	Hranila za kvasovke.....	23
3.2.2.3	Trske iz hrastovega lesa.....	24
3.2.3	Kemikalije in reagenti	24
3.2.4	Laboratorijska oprema in aparature.....	25
3.2.5	Nastavitev fermentacijskega poskusa	25
3.3	FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE	26
3.3.1	Analiza osnovne kemijske sestave mošta in vina z WineScan™ FOOS... 26	26
3.3.2	Določanje oddanega CO₂	27
3.3.3	Določanje skupnih fenolnih spojin vina s Folin-Ciocalteu reagentom 28	28
3.3.4	Določanje antioksidativnega potenciala vina	29
3.3.5	Določanje antioksidativnega potenciala droži	30
3.4	SENZORIČNA ANALIZA	31
3.4.1	20-točkovna Buxbamova metoda	31
3.4.2	5-točkovna ocenjevalna lestvica in rangiranje vzorcev.....	31
3.5	STATISTIČNA ANALIZA	32
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	33
4.1	FERMENTACIJSKE KRIVULJE.....	33
4.2	REZULTATI ANALIZ VINA	44
4.2.1	Fizikalno-kemijsko analize pridelanega vina.....	44
4.2.1.1	Fermentacijska učinkovitost.....	48
4.2.2	Skupne fenolne spojine.....	49
4.2.3	Antioksidativni potencial vina.....	51
4.2.4	Antioksidativni potencial droži	53
4.3.1	Senzorično ocenjevanje vina.....	55
5	SKLEPI	63
6	POVZETEK.....	64
7	VIRI	65

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk (Košmerl, 2013).....	4
Preglednica 2: Želene značilnosti starterskih kultur vinskih kvasovk (Pretorius, 2000).....	5
Preglednica 3: Osnovni selekcijski kriteriji vinskih kvasovk in cilji (Košmerl, 2013).....	5
Preglednica 4: Osnovne in dodatne zahteve za produkcijo starterskih kultur (Košmerl, 2013).	6
Preglednica 5: Primera enostavnejših hranil (enostavno hranilo z dodanimi vitamini) (Košmerl, 2013).	9
Preglednica 6: Vloga vitaminov oz. rastnih dejavnikov (Košmerl, 2003).	10
Preglednica 7: Minerali in njihove funkcije (Košmerl, 2013).....	11
Preglednica 8: Primeri kompleksnejših hranil (Košmerl, 2013).	11
Preglednica 9: Vsebnost fenolnih kislin in flavonoidov v belem vinu (De Beer in sod., 2002).	16
Preglednica 10: Razdelitev fenolnih spojin vina (Vrhovšek, 1996).....	17
Preglednica 11: Uporaba enoloških taninov kot čistilnega sredstva (Košmerl, 2013).....	19
Preglednica 12: Uporabljeni komercialni sevi kvasovk.	23
Preglednica 13: Uporabljena komercialna hranila za kvasovke.	24
Preglednica 14: Uporabljene trske iz hrastovega lesa.	24
Preglednica 15: Standardne raztopine galne kisline (Košmerl in Kač, 2009).	28
Preglednica 16: Ocenjevalni elementi deskriptivne senzorične analize mladega vina sauvignon (Smolnikar, 2012).	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000).....	17
Slika 2: Shematski prikaz poteka poskusa.....	21
Slika 3: Plastenke z moštom bele vinske sorte sauvignon, letnik 2013, iz vinorodnega okoliša Štajerska, , ki smo ga uporabili za naš fermentacijski poskus.....	22
Slika 4: Umeritvena krivulja z galno kislino.....	29
Slika 5: Videz mladih pridelanih vin po zaključku spremljanja poskusa alkoholne fermentacije.....	33
Slika 6: Fermentacijske krivulje vzorcev 1, 2, 3 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.....	34
Slika 7: Kinetika alkoholne fermentacije vzorcev 1, 2, 3 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.	35
Slika 8 : Fermentacijske krivulje vzorcev 4, 5, 6 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.....	36
Slika 9: Kinetika alkoholne fermentacije vzorcev 4, 5, 6 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.	37
Slika 10: Fermentacijske krivulje vzorcev 7, 8, 9 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.....	38
Slika 11: Kinetika alkoholne fermentacije vzorcev 7, 8, 9 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.	38
Slika 12: Fermentacijske krivulje vzorcev 10, 11, 12 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.	39
Slika 13: Kinetika alkoholne fermentacije vzorcev 10, 11, 12 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.	40
Slika 14: Fermentacijske krivulje vzorcev 13, 14, 15 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.	41
Slika 15: Kinetika alkoholne fermentacije vzorcev 13, 14, 15 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.	42
Slika 16: Fermentacijske krivulje vzorcev 16, 17, 18 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.	42
Slika 17: Kinetika alkoholne fermentacije vzorcev 16, 17, 18 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.	43
Slika 18: Vsebnost reducirajočih sladkorjev (g/L) in alkohola (vol. %) vzorcev v primerjavi s kontrolnim vzorcem.	44
Slika 19: Delež nastalega alkohola (%) v vzorcih mladega vina v primerjavi s kontrolnim vzorcem.	45

Slika 20: Porabljeni reducirajoči sladkorji za nastali etanol (g/L) v vzorcih mladega vina v primerjavi s kontrolnim vzorcem.	46
Slika 21: Oddani CO ₂ med alkoholne fermentacijo (g/L) v vzorcih mladega vina v primerjavi s kontrolnim vzorcem.	47
Slika 22: Fermentacijska učinkovitost mladih vin.	48
Slika 23: Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg/L) po zaključeni fermentaciji v vzorcih pridelanega mladega vina z različnimi dodatki v primerjavi s kontrolo (spontana fermentacija, oznaka 0).	50
Slika 24: Množina ulovljenega prostega radikala DPPH na L vina po zaključeni alkoholni fermentaciji v vzorcih mladih vin z različnimi dodatki v primerjavi s kontrolo (spontana fermentacija, oznaka 0).	52
Slika 25: Korelacija vsebnosti skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L) in AOP (mmol DPPH/L) vzorcev mladega vina.	53
Slika 26: Antioksidativni potencial droži v vzorcih 4, 5, 6, izražen kot razmerje med fluorescenco in optično gostoto.	54
Slika 27: Rezultati ocenjevanja težje tropske arome (točkovanje 1-5) v vzorcih mladega vina pridelanega z različnimi sevi kvasovk, dodatki hranil in trsk iz hrastovega lesa.	56
Slika 28: Rezultati ocenjevanja sveže tropske arome (točkovanje 1-5) v vzorcih mladega vina pridelanega z različnimi sevi kvasovk, dodatki hranil in trsk iz hrastovega lesa.	57
Slika 29: Ocenjevanje fermentacijske arome (točkovanje 1-5) v vzorcih mladega vina. ...	58
Slika 30: Ocenjevanje prekrivanja sortnih arome (točkovanje 1-5) v vzorcih mladega vina pridelanega z različnimi sevi kvasovk, dodatki hranil in trsk iz hrastovega lesa..	59
Slika 31: Ocenjevanje celokupne kakovosti (točkovanje 1-5) v vzorcih mladega vina pridelanega z različnimi sevi kvasovk, dodatki hranil in trsk iz hrastovega lesa..	59
Slika 32: Skupna ocena ocenjevanje z 20-točkovno Buxbamovo metodo vzorcev mladega vina pridelanega z različnimi sevi kvasovk, dodatki hranil in trsk iz hrastovega lesa.	60

KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Osnovni fizikalno-kemijski parametri mošta sorte sauvignon letnika 2013 dobljeni z WineScan (WSC) analizo na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica.
- PRILOGA B: Rezultati WineScan analize za vzorce mladih pridelanih vin in kontrole po programu SUHA VINA
- PRILOGA C: Rezultati WineScan analize za vzorce mladih pridelanih vin in kontrole po programu VINA V VRENJU.
- PRILOGA D: Degustacijski list uporabljen pri senzoričnem ocenjevanju vzorcev mladih vin z ocenjevalno lestvico (točkovanje 1-5).
- PRILOGA E: Degustacijski list uporabljen pri senzoričnem ocenjevanju vzorcev mladih vin po 20-točkovni metodi po Buxbaumu.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

°Brix	stopinja Brix (enota sladkorne stopnje mošta)
°Oe	Oechslejeva stopinja (enota sladkorne stopnje mošta)
A	absorbanca
AOP	antioksidativni potencial
CFU	kolonijska enota (ang. <i>Colony Forming Unit</i>)
DAP	diamonijev hidrogenfosfat
F/OD	flourescenca glede na optično gostoto droži
FAN	prosti aminokislinski dušik (ang. <i>Free Amino Nitrogen</i>)
FC	Folin-Ciocalteu reagent
GAE	ekvivalent galne kisline
KGZ NG	Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica
SFS	skupne fenolne spojine
WSC	WineSan analiza

1 UVOD

Vino je po slovenski zakonodaji pridelek, pridobljen s popolnim ali delnim alkoholnim vrenjem drozge ali mošta, pridelanega iz grozdja žlahtne vinske trte (Pravilnik o pogojih..., 2004). V slovenskem prostoru je že od nekdaj priljubljena pijača, ki igra pomembno mesto v naših prehrabnih in kulturnozgodovinskih navadah.

Uporaba dodatka suhih aktivnih kvasovk in hranil zanje je zaradi svoje enostavne uporabe, vinarjevih želja po povečanju kinetike alkoholne fermentacije in boljših senzoričnih lastnosti pridelanega mladega vina, postala v zadnjih letih stalna praksa v večini vinarskih kleti. Pridelava stabilnega in bistrega vina z ohranjenim oz. povečanim antioksidativnim potencialom, pa je vzrok, da vinarji posegajo tudi po dodatku trsk iz hrastovega lesa v mošt. Vprašanje pa je, ali res in v kolikšni meri omenjeni dodatki vplivajo na fermentacijsko kinetiko kvasovk in na vsebnost pomembnih antioksidantov v vinu, to je fenolnih spojin ter s tem na ohranitev oz. povečanje antioksidativnega potenciala vina.

1.1 NAMEN NALOGE

Z inokulacijo različnih sevov komercialnih kvasovk, dodatkov hrane za kvasovke in/ali hrastovih trsk v mošt sorte sauvignon želimo ugotoviti, kako bodo ti različni dodatki vplivali na značilnosti vina (fizikalno-kemijske parametre, vsebnost fenolnih spojin, antioksidativni potencial, senzorične lastnosti).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Hipoteza 1: Pričakujemo, da bodo uporabljene kombinacije sevov kvasovk, hranil za kvasovke in dodatek hrastovih trsk vplivali na fizikalno-kemijske parametre in fermentacijske značilnosti vina, prav tako pa tudi na oblikovanje senzoričnih lastnosti vina.

Hipoteza 2: V okviru petih različnih uporabljenih kvasovk pričakujemo razlike v kinetiki alkoholne fermentacije.

Hipoteza 3: Predpostavljamo tudi, da bomo iz vzorcev z dodatkom hrastovih trsk pridobili vino z največjo vsebnostjo fenolnih spojin in največjim antioksidativnim potencialom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ALKOHOLNA FERMENTACIJA

Alkoholna fermentacija pomeni pretvorbo sladkorjev v alkohol in ogljikov dioksid.

Med dejavnike, ki vplivajo na hitrost rasti kvasovk med alkoholno fermentacijo, štejemo:

- dodatek starterske kulture,
- temperaturo fermentacije,
- žveplanje,
- prisotnost ali uporabo kvasovk z zimocidno aktivnostjo,
- motnost oz. stopnjo bistrenja,
- fizikalno-kemijsko sestavo mošta,
- ostanke zaščitnih sredstev za varstvo vinske trte (fungicidi),
- vpliv mikroorganizmov, zlasti plesni in bakterij (mlečno- in oetnokislinskih) (Košmerl, 2007).

Poleg fermentacije k oblikovanju končne kakovosti vina prispevajo še:

- kakovost grozdja (sorta, okolje, vinogradniška tehnologija, zrelost, zdravstveno stanje),
- ekstrakcija grozdnega soka (mehanska ali ročna trgatev, zgoščevanje soka ali koncentriranje, stiskanje celega grozdja ali razpecljanega in zdrozganega, vrsta stiskalnic, maceracija, temperatura in čas maceracije),
- stekleničenje in zorenje (steklenice ali lesena posoda, vrsta zamaškov, mikrobiološke spremembe med stekleničenjem in zorenjem) (Košmerl, 2013).

2.2 VINSKE KVASOVKE IN NJIHOVA VLOGA MED ALKOHOLNO FERMENTACIJO MOŠTA

2.2.1 Splošne značilnosti vinskih kvasovk

Spontana alkoholna fermentacija je skupek mikrobnih interakcij, ki vključujejo različne in številne mikroorganizme, od katerih igrajo poglavitno vlogo ravno kvasovke. Kvasovke, sodelujoče pri spontani alkoholni fermentaciji, lahko izvirajo iz vinske posode ali pa pridejo v mošt iz grozdnih jagod. V skupino vinskih kvasovk prištevamo približno 18 rodov. Divje kvasovke so ne-*Saccharomyces* kvasovke, ki so prisotne na površini grozdnih jagod in na kletarski opremi. Sem prištevamo rodove *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Metschnikowia*, *Rhodotorula* in *Brettanomyces/Dekkera* (Košmerl, 2013).

Vrsta *Saccharomyces cerevisiae* je znana kot »vinska kvasovka«. Poznano je tudi, da z različnimi sevi kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* pridelamo po kakovosti

najrazličnejša vina. Ta vrsta je prevladujoča na koncu vsake alkoholne fermentacije, na površini grozdne jagode in v moštu pa je njena vsebnost zelo majhna. Prevladujejo namreč avtohtoni ali endogeni rodovi ne-*Saccharomyces* nesporogenih kvasovk, predvsem vrste *Kloeckera apiculata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida stellata*, *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* in *Saccharomycodes ludwigii*, ki so prisotne v začetnih fazah fermentacije in dosežejo koncentracijo do 10^6 - 10^8 CFU/mL preden odmrejo. Delež kvasovk rodov *Kloeckera* in *Torulopsis* je lahko relativno velik primerjalno s kvasovkami rodu *Saccharomyces* tudi v mladem vinu po končani fermentaciji (Košmerl, 2013).

Danes se v modernejših vinskih kletih uporablja zlasti selekcionirane seve kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*, ki so jamstvo za hitro, učinkovito in predvidljivo alkoholno fermentacijo. Le-te dajejo skladnost okusa in vonja po zaključeni fermentaciji. Vcepek ali inokulum kvasovk se dodaja v mošt po bistrenju in/ali žveplanju z namenom zmanjšanja ali zavrtja delovanja avtohtone mikroflore. Selekcioniran sev omogoča hitro in popolno pretvorbo sladkorjev v etanol v veliko krajšem času. Prav tako je opaziti manj razlik med vini različnih letnikov in večjo senzorično skladnost določenega vina v okviru geografskega okoliša (Pretorius, 2002).

Navadno spontano alkoholno fermentacijo navadno začnejo na površini grozdne jagode prisotne ne-*Saccharomyces* kvasovke, najpogosteje vrsta *Hanseniaspora uvarum* in *Candida stellata*, a le-te po 2-3 dneh alkoholne fermentacije izpodrinejo kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*, ki so močnejše fermentativne in tudi odpornejše na alkohol. Končna kakovost vina, pridelanega s spontano alkoholno fermentacijo, je v največji meri odvisna od mikrobne populacije (različni vrste in sevi kvasovk). Le-ti se med alkoholno fermentacijo pojavijo v določenem zaporedju in pretvarjajo sladkorje v hlapne in nehlapne končne produkte, ki vplivajo na senzorično kakovost vina, tako pozitivno kot negativno (Lambrechts in Pretorius, 2002; Košmerl, 2013).

2.2.2 Vinske kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*

Trend vinarjev v zadnjih letih je alkoholna fermentacija z avtohtonimi kvasovkami vrste *Saccharomyces cerevisiae*, saj se na ta način pridela raznovrstnejša vina z značilnejšo vinsko aromo. Pri tem pa je poglavitno vprašanje vinarja, kakšna je sposobnost prevlade kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* nad preostalo mikrofloro, saj je znano, da so nekatere izmed njih bolj prevladujoče kot druge ter lahko reagirajo in preživijo z naravno mikrofloro med alkoholno fermentacijo (Košmerl, 2013).

S pravilno izbiro kvasovk, tj. kvasovke z različnimi stopnjami prevlade v različnih časovnih obdobjih, lahko vinar pridela vino z želenim aromatičnim profilom (prispeva k sadni aromi vina), v nekaterih primerih tudi fenolnim profilom (prispeva k manjši trpkosti in grenkobi vina).

V preglednici 1 so prikazane osnovne želene in neželene lastnosti vinskih kvasovk, tako avtohtonih kot selekcioniranih sevov. Dejstvo je, da je vse navedene želene lastnosti

skoraj nemogoče popolnoma zagotoviti, zato se že nekaj let vinarji poslužujejo uporabe mešane kulture različnih sevov kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*, od katerih posamezni sev tvori različno razmerje končnih sekundarnih produktov. Na ta način pridelano vino je bistveno bolj kompleksno glede na sestavo hlapnih aromatičnih sestavin (Košmerl, 2013).

Tvorba različnih količin hlapnih snovi s strani kvasovk vpliva na aromo vina. Delitev kvasovk na aromatične in nevtralne je nesmiselna, saj je »aromatični« značaj kvasovk odvisen zlasti od gojišča (mošt s svojo fizikalno-kemijsko sestavo) in fermentacijskih razmer (Košmerl, 2013).

Preglednica 1: Ekološke in metabolne lastnosti vinskih kvasovk (Košmerl, 2013).

želene lastnosti	neželene lastnosti
visoka odpornost na etanol	tvorba žveplovega dioksida
poraba sladkorjev v celoti	tvorba vodikovega sulfida
odpornost na žveplov dioksid	tvorba hlapnih kislin
fermentacija pri nizkih temperaturah	tvorba acetaldehida in piruvata
zelo kratka faza prilagajanja	sposobnost penjenja
razgradnja jabolčne kisline	tvorba prekurzorjev etil karbamata
fermentacija pod tlakom	polifenoloksidazna aktivnost
tvorba glicerola	
β -glukozidazna aktivnost	
zimocidna aktivnost	

Pridelava najkakovostnejših vin z uporabo mešanih starterskih kultur zahteva veliko znanja in razumevanja poteka alkoholne fermentacije, zato vinarji posegajo po komercialnih sevih kvasovk rodu *Saccharomyces*, ki imajo dobro fermentacijsko sposobnost, sposobnost tvorbe aromatičnih spojin pa se med posameznimi sevi razlikuje. Izbira primerne seve za pridelavo zelenega aromatičnega profila vina je ključnega pomena. Naj omenim tudi to, da so v zadnjem času vedno bolj uporabljeni hibridni sevi kvasovk rodu *Saccharomyces*, ki med alkoholno fermentacijo izražajo pozitivne lastnosti obeh starševskih sevov, tvorijo večje koncentracije aromatičnih spojin in so boljše prilagojeni na fermentacijske razmere (Košmerl, 2013).

2.2.3 Starterske kulture vinskih kvasovk

Leto 1890 pomeni prelomnico, ko govorimo o začetku uporabe inokuluma v procesu alkoholne fermentacije. Omenjenega leta je švicarskemu raziskovalcu Hermann Müller, rojen v kraju Thurgau uspelo prepričati nemške vinarje o prednostih, ki jih ponuja hitra spodbujena fermentacija. Po 75-ih letih je bila speljana prva komercialna priprava dveh sevov vinskih kvasovk, danes pa že večina vinarjev pri pridelavi tako belih kot rdečih vin posega po dodatku komercialne starterske kulture (Pretorius, 2002). Le-te so selekcionirane glede na štiri osnovne kriterije in sicer fermentacijske lastnosti, senzorične značilnosti, tehnološke lastnosti in metabolne lastnosti z zdravstvenega stališča (Košmerl, 2013).

Preglednica 2: Želene značilnosti starterskih kultur vinskih kvasovk (Pretorius, 2000).

fermentacijske lastnosti	tehnološke zahteve
hiter začetek fermentacije	dobra genetska stabilnost
visoka učinkovitost	visoka odpornost na sulfit
visoka odpornost na alkohol	nizka sposobnost vezave sulfita
visoka osmotoleranca	majhno penjenje
nizek temperaturni optimum	flokulativnost ob koncu fermentacije
majhna akumulacija biomase kvasovk	tvorba kompaktne usedline
aromatične značilnosti	zimocidna aktivnost
majhna tvorba sulfidov, tiolov	nezahtevnost glede dušika
majhna tvorba višjih alkoholov	genetska označitev
majhna tvorba hlapnih kislin	proteolitična aktivnost
hidrolitska aktivnost	metabolne lastnosti z zdravstvenega stališča
povečana avtoliza	majhna tvorba sulfita
spremenjena aktivnost esteraz	majhna tvorba biogenih aminov
velika tvorba glicerola	nizek potencial za tvorbo etil karbamata iz prekurzorja (sečnine)

V spodnji preglednici so navedeni najpomembnejši cilji selekcije vinskih kvasovk. Časovno zaporedne prisotnosti različnih vrst in sevov kvasovk okarakterizirajo spontano alkoholno fermentacijo. V idealnih razmerah je rezultat mešane avtohtone populacije kvasovk lahko zelo kompleksno vino s sadnim značajem, polnostjo, zaokroženostjo in harmoničnostjo v okusu. V veliki večini primerov se med spontano alkoholno fermentacijo pojavijo problemi, zato se močno priporoča dodatek čiste starterske kulture. Najznačilnejša tehnološka prednost z vidika alkoholne fermentacije mošta je prav tržna dostopnost selekcioniranih kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* (Košmerl, 2013).

Preglednica 3: Osnovni selekcijski kriteriji vinskih kvasovk in cilji (Košmerl, 2013).

selekcijski kriteriji	cilji selekcije
fermentacijska sposobnost	majhna tvorba sulfidov in žveplo-vezujočih snovi
osmotoleranca	čim manjša tvorba hlapnih kislin in H ₂ S
odpornost na alkohol	majhna sposobnost penjenja
odpornost na sulfit	sposobnost tvorbe filma (sherry)

V naslednji preglednici so razvidne osnovne zahteve, ki jih morajo izpolnjevati industrijske starterske kulture in dodatne zahteve za produkcijo starterskih kultur.

Preglednica 4: Osnovne in dodatne zahteve za produkcijo starterskih kultur (Košmerl, 2013).

osnovne zahteve	dodatne zahteve
dokončanje fermentacije (odpornost na alkohol)	tvorba zelenih sortnih arom
odpornost na visoke sladkorne stopnje mošta	razgradnja jabolčne kisline
odpornost na SO ₂	tvorba glicerola
odpornost na visoke in nizke temperature	β-glukozidazna aktivnost
toleranca na visok tlak (pri penečih vinih)	zimocidna ali killer aktivnost
tvorba majhnih količin očetne kisline, acetaldehida, H ₂ S, merkaptanov, diacetila, SO ₂ in omejena tvorba višjih alkoholov	majhno izločanje uree
majhno penjenje	aglomerizacija
flokulativnost po končani alkoholni fermentaciji (izboljšanje bistrenja)	tvorba estrov
sposobnost sušenja	proteazna aktivnost
	tvorba inhibitornih snovi za druge kvarljive mikroorganizme

Današnje starterske kulture vsebujejo običajno en sam sev vrste *Saccharomyces cerevisiae*, vse bolj pa so v uporabi tudi starterske kulture sestavljene iz kombinacije različnih sevov iste vrste *Saccharomyces cerevisiae* ali vrst ali iz kombinacije vrst *Saccharomyces cerevisiae* in rodov ne-*Saccharomyces* kvasovk.

Nedolgo nazaj je bila predlagana uporaba mešanih starterskih kultur *Saccharomyces*/ne-*Saccharomyces* in sicer z namenom izboljšanja kemijske in senzorične kakovosti vina, obenem pa tudi zmanjšanja koncentracije neželenih spojin, ki jih navadno tvorijo ne-*Saccharomyces* kvasovke (Košmerl, 2013).

Pri pripravi zdrave starterske kulture moramo vedno slediti navodilom proizvajalca za rehidracijo kvasovk. V inokulumu mora biti vsaj 2-5 milijonov aktivnih celic v 1 mL, kar odgovarja 1-3 vol.% inokuluma. V odvisnosti od mošta je potreben dodatek suhih kvasovk 15-40 g/hL mošta. V primeru slabega zdravstvenega stanja grozdja (gniloba) potrebujemo večji inokulum in sicer med 20-40 g/hL. V belih moštih iz zdravega grozdja in opravljenem bistrenju je običajni dodatek inokuluma med 15-25 g/hL (Košmerl, 2013).

2.2.3.1 Mešane starterske kulture kvasovk rodu *Saccharomyces*/ne-*Saccharomyces*

Številne raziskave so bile podlaga za predlog uporabe mešanih starterskih kultur *Saccharomyces*/ne-*Saccharomyces* pri pridelavi različnih vin z namenom zmanjšanja koncentracije neželenih spojin, ki jih navadno tvorijo ne-*Saccharomyces* kvasovke. Inokulacija mešane starterske kulture poteka na različne načine, najpogosteje pa je v uporabi hkratna ali zaporedna inokulacija. Zaporedna inokulacija najpogosteje vodi v upočasnjeno ali zaustavljeno alkoholno fermentacijo zaradi pomanjkanja hranil za kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*, daje sicer več pozitivnih aromatičnih spojin, a hkrati tudi več negativnih. Zaradi omenjenih razlogov je vse bolj v uporabi hkratna inokulacija (Košmerl, 2013).

Za mešano kulturo kvasovk je značilna dobra encimsko aktivnost, poleg tega pa tudi tvorba več pomembnih aromatičnih spojin. V uporabi so različne mešane starterske kulture kvasovk in sicer:

- *Candida*/*Saccharomyces*,
- *Saccharomyces cerevisiae*/*Torulaspora delbrueckii*,
- *Saccharomyces cerevisiae*/*Pichia*,
- *Saccharomyces cerevisiae*/*Kluyveromyces thermotolerans*,
- druge mešane kulture *Saccharomyces*/ne-*Saccharomyces* kvasovk kot so: *K. apiculata*, *M. pulcherrima*, rodova *Saccharomycodes* in *Zygosaccharomyces* v kombinaciji s *S. cerevisiae* (Košmerl, 2013).

2.2.3.2 Posamezne in mešane starterske kulture kvasovk rodu *Saccharomyces*

Danes je na tržišču dostopnih že zelo veliko različnih sevov kvasovk rodu *Saccharomyces*, z najrazličnejšimi lastnostmi (različna sposobnost sinteze, sproščanja in pretvarjanja aromatičnih spojin med alkoholno fermentacijo), ki različno vplivajo na senzorično kakovost vina (Košmerl, 2013).

Z uporabo mešanih kultur *Saccharomyces*/*Saccharomyces* lahko dosežemo izražanje pozitivnih značilnosti obeh sevov kvasovk, hkrati pa lahko izboljšamo določene parametre, ki vplivajo na senzorično kakovost pridelanega vina. Pri sami uporabi mešanih kultur pa velja pravilo, da je zelo pomembno, katere seve kvasovk uporabimo za mešano kulturo in v kakšnem razmerju, kajti le pravilna izbira kombinacije kvasovk lahko bistveno pripomore k izboljšanju aromatičnega profila pridelanega vina (Košmerl, 2013).

2.2.3.3 Hibridni sevi kvasovk

Hibridizacija predstavlja uspešen način za izboljšanje in kombiniranje lastnosti s poligenskim nadzorom ter omogoča hitro vključitev ali odstranitev določenih lastnosti kvasovk. Njena slabost je v tem, da je možna le v primeru zelo sorodnih vrst kvasovk rodu *Saccharomyces*. Za hibride, nastale na omenjeni način, je značilna hitra in učinkovita prilagodljivost na razmere med alkoholno fermentacijo ter izkazovanje lastnosti obeh starševskih sevov. Za pridobitev hibridov so dandanes v uporabi številne hibridizacijske tehnike, od parjenja spor, naključnega parjenja do fuzije protoplastov. Številni hibridi, pridobljeni z naravnim pridobivanjem, kamor prištevamo hibridizacijo s parjenjem spor in naključno parjenje, so danes že dostopni na tržišču. S postopkom fuzije protoplastov pa pridobimo gensko spremenjene kvasovke, ki v EU zakonsko še niso dovoljene. Številne raziskave so pokazale, da je sicer parjenje spor enostavna, a hkrati časovno dolgotrajna metoda, katere slabost je ta, da lahko hibridom »manjkajo« katere izmed industrijsko pomembnih lastnosti, ki pa so sicer prisotne v sevih staršev (Košmerl, 2013).

Kakor navaja Jenko in sod. (2012), so naravne hibride do danes že izolirali in jih ovrednotili. Poznanih je več naravnih hibridov in sicer:

- *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii*,
- *S. cerevisiae* × *S. bayanus*,
- *S. cerevisiae* × *S. bayanus* × *S. kudriavzevii*.

Tudi pri izvedbi našega eksperimentalnega dela, smo med izbranimi starterskimi kulturami kvasovk, ki smo jih dodali v mošt, uporabili hibrid in sicer naravni hibrid Cross evolution.

2.2.3.4 Gensko spremenjene kvasovke

Z uporabo rekombinantne DNA so bile do sedaj uspešno spremenjenke že številne kvasovke, v katerih so izrazili tiste gene, ki nosijo lastnosti, ki pozitivno vplivajo zlasti na senzorično kakovost vina. Veliko raziskav je bilo tudi na področju odpravljanja tvorbe negativnih arom pri vinskih kvasovkah, a ker v večini držav uporaba gensko spremenjenih kvasovk trenutno še ni dovoljena, temeljijo obstoječe tehnike pridobivanja sevov kvasovk z izboljšanimi lastnostmi še vedno na klasičnih metodah (hibridizacija, sprožanje mutacij) (Košmerl, 2013).

2.3 DODATEK HRANE ZA KVASOVKE

Potek alkoholne fermentacije mošta je nesporno odvisen od hranil za vinske kvasovke, določenih že z osnovno fizikalno-kemijsko sestavo mošta in tudi od drugih dejavnikov (npr. ostanki fungicidov, prisotnost plesni in mlečno- ter očetno-kislinskih bakterij), ki pa so bistveno manj raziskani.

Kadar kvasovkam prične primanjkovati dušikovih spojin, lahko na njihovo fermentacijsko kinetiko, vplivamo s pravočasnim, a ne prevelikim in časovno prezgodnjim dodatkom ustreznega hranila. Načeloma je vsak mošt v začetni fazi zadostno oskrbljen z dušikovimi spojinami, pomanjkanje le-teh se pokaže najkasneje po štirih dneh. Kasnejši dodatek hranila za kvasovke z namenom povečanja fermentacijske kinetike se pokaže predvsem v boljših senzoričnih značilnostih pridelanega mladega vina in sicer manjši vsebnosti hlapnih kislin ter manjši vsebnosti »porabnikov žvepla«, ki nastajajo, ko prične primanjkovati vitaminov (le-ti so sestavina hranil).

2.3.1 Enostavna hranila

Vsebnost anorganskega dušika, ki je pomemben za hidrolizo ustreznih beljakovin, lahko povečamo z dodatkom enostavnega hranila za kvasovke, zlasti diamonijevega hidrogenfosfata (DAP). Dodatek amoniakalnega dušika je priporočljiv med 25-50 mg NH_4^+/L , kar se senzorično ne da ugotoviti. Običajno znaša dodatek DAP med 10-20 g/hL in sicer večina vinarjev uporablja dodatek hrane po začetku fermentacije ali pa večkratni dodatek manjših količin hranila. Omenjeno enostavno hranilo DAP je primerno za stimulacijo kvasne populacije, v primeru mlečnokislinskih bakterij pa je neučinkovito, saj le-te potrebujejo za rast kompleksnejšo mešanico vsaj z dodatkom vitaminov. V te namene uporabljamo enostavnejša oz. kompleksna hranila, ki so v opisana v nadaljevanju (Košmerl, 2013).

2.3.2 Enostavnejša hranila

Enostavnejša hranila so enostavna hranila z dodatkom vitaminov ali t.i. rastnih dejavnikov, ki so poleg dušikovih snovi potrebni za pravilno delovanje encimov kvasovk. V dovolj veliki količini zmanjšajo količino nastalih »porabnikov žvepla« ter pripomorejo k nastanku večjega deleža pozitivnih aromatičnih snovi.

Preglednica 5: Primera enostavnejših hranil (enostavno hranilo z dodanimi vitamini) (Košmerl, 2013).

Sestava	Namen uporabe	Priprava
deaktivirane kvasovke diamonijev fosfat amonijev sulfat tiamin hidroklorid silikagel	Je vzpodbujevalec alkoholnega vrenja, vpliva na razmnoževanje in vrelnost sposobnost kvasovk. Količina: 35-40 g/hL	Raztopimo v zadostni količini vode, mošta ali vina.
61,8 % amonijevega sulfata 33 % diamonijevega fosfata 5 % KHCO_3 0,2 % vitamin B_1	Je pospeševalec rasti in razmnoževanja mikroorganizmov, vpliva na normalen potek in dokončanje alkoholnega vrenja. Količina: 10-30 g/hL	Raztopimo v manjši količini vode in med stalnim mešanjem dodamo v mošt pred začetkom alkoholnega vrenja.

Pomembna vloga rastnih dejavnikov oz. vitaminov je razvidna iz spodnje preglednice.

Preglednica 6: Vloga vitaminov oz. rastnih dejavnikov (Košmerl, 2003).

Vitamin in njegovo ime	Delovanje
B1 tiamin	Potrebujemo ga dekarboksilaze. Deluje v sinergiji z vitaminom C ter pospeši rast in poveča biomaso.
B2 riboflavin	Aktivira oksidativno razgradnjo piruvične kisline, maščobnih kislin in aminokislin preko izmenjave elektronov.
PP niacin	Reducira tvorbo etil acetata in kontrolira tvorbo keto kislin. V primeru pomanjkanja tega vitamina pride do prekomerne porabe tiamina.
B5 pantotenska kislina, Ca-pantotenat	Aktivni del koencim A prenaša acilne skupine pri encimskih reakcijah, pri oksidaciji piruvične kisline in maščobnih kislin.
B6 piridoksin	Sodeluje pri transaminaciji in tvorbi α -ketoglutarjeve kisline.
B12 kobalamin, cianokobalamin	Vpliva na rast in hitrost razmnoževanja kvasovk ter sodeluje pri reakcijah karboksilacije in deaminacije.
H biotin	Vpliva na razmnoževanje kvasovk in sodeluje v encimskih reakcijah karboksilacije in deaminacije.
D2 ergosterol	Pomaga kvasovkam pri dokončnem povretju sladkorjev, stimulira tvorbo glicerola ter zmanjša tvorbo oetne kisline in acetaldehida.

2.3.3 Kompleksna hranila

Kompleksna hranila za kvasovke sestavljajo: DAP, kvasni ekstrakt in avtolizirane celične stene kvasovk (yeast hulls). Na tržišču pa se pojavljajo tudi hranila z različno sestavo in sicer: npr. zgolj celična jedra in citoplazma inaktiviranih kvasovk z veliko prostih aminokislin in vitaminov, ali pa so v večji meri dodane topne celične stene kvasovk, ki vežejo toksične maščobne kisline. Zaradi različne sestave kompleksnih hranil, je po njihovem dodatku v mošt ali vino tudi pričakovano manjše povečanje vsebnosti prostega aminokislinskega dušika (FAN) v primerjavi z dodatkom enostavnega hranila.

Polisaharidi so glavne sestavine celične stene kvasovk, njihova kemijska sestava pa je odvisna od seva kvasovk, starosti celic in razmer rasti. Celične stene kvasovk vplivajo na upočasnjeno sproščanje dušikovih spojin, ki jih kvasovke lahko asimilirajo, na stimulacijo celičnega metabolizma živih kvasovk, kar pa poveča obseg fermentacije in število celic v stacionarni fazi (Košmerl, 2013).

Kompleksna hranila lahko vsebujejo poleg dodatka vitaminov tudi minerale ali makroelemente, ki imajo vsak svojo pomembno vlogo.

Preglednica 7: Minerali in njihove funkcije (Košmerl, 2013).

Mineral	Delovanje
magnezij (Mg)	Vpliva na rast kvasovk (faze in čas celične delitve) ter jih ščiti pred negativnimi dejavniki (temperaturni šok, visoka vsebnost alkohola). Pri pomanjkanju se tvori večja vsebnost očetne kisline in zmanjša se odpornost kvasovk na alkohol.
mangan (Mn)	Prispeva k sintezi lastnih beljakovin in tiamina.
cink (Zn)	Je pomemben sodejavniki določenih encimov in pozitivno prispeva k sintezi riboflavina ter beljakovin.

V spodnji preglednici so navedeni nekateri primeri kompleksnejših hranil.

Preglednica 8: Primeri kompleksnejših hranil (Košmerl, 2013).

sestava	namen uporabe	priprava
Avtolizat biomase kvasovk, obogaten z vitamini (pantotenska kislina, biotin), minerali, mikroelementi (Mg, Zn, Mn) ter aminokislinami.	Omogoča nemoten metabolizem kvasovk in preprečuje tvorbo hlapnih kislin ter pojav neželenih vonjev. Uspešno preprečuje upočasnjeno in prekinjeno alkoholno vrenje.	Raztopimo v manjši količini rehidracijske vode za kvasovke.
	Količina: 30 g/hL	
Inaktivirane kvasne celice (celične membrane) na koncu faze razmnoževanja, α-aminokisline, vitamini, minerali.	Vpliva na dobro sproščanje polisaharidov, ki so sposobni vezave z reaktivnimi tanini, ki sicer tvorijo nestabilne makromolekule in povzročajo usedlino.	Dodajamo direktno v mošt ali v drozgo, ki jo maceriramo.
	Količina 30 g/hL.	
Celično jedro in citoplazma inaktiviranih kvasnih celic, proste aminokisline, vitamini, minerali, topne celične stene kvasovk.	Stimulator alkoholne fermentacije in vpliva na hitrejše razmnoževanje kvasovk.	Tik pred uporabo raztopimo v vodi v razmerju 1:10.
	Količina 5-40 g/hL.	

2.4 ANTIOKSIDANTI

Antioksidant je snov, ki prepreči ali zavira oksidacijo neke druge snovi tudi takrat, ko je koncentracija le-te precej večja od koncentracije antioksidanta (Halliwell in Gutteridge, 1989). Korošec (2000) pa antioksidant definira kot spojine, ki z lovljenjem prostih

radikalov, keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul preprečujejo porušeno ravnotežje med prostimi radikali in antioksidanti, kar imenujemo oksidativni stres.

Kot govori Abramovič (2011) so antioksidanti skupina naravno prisotnih ali dodanih strukturno raznolikih spojin, ki preko različnih kemijskih mehanizmov zmanjšujejo oksidativne spremembe živil.

Prosti radikali pa so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim elektronom brez para. So visoko reaktivne molekule, ki poškodujejo celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami in geni. Nastanejo kot rezultat normalne celične presnove oz. dihanja, kjer prihaja do prenosa elektrona, kot posledica različnih sevanj, ki privedejo do cepitve hidrolitske vezi (UV-, γ -žarki) ali nekaterih snovi in zdravil (alkoholna fermentacija, latoksini, alkohol, analgetiki, anestetiki, citostatiki) (Cigić in Rudan Tasić, 2006; Korošec, 2000).

Antioksidante lahko razdelimo v tri skupine in sicer:

- *pravi antioksidanti*: tisti, ki vežejo proste radikale in predstavljajo glavno znotrajcelično antioksidativno obrambo (katalaza, glutathion peroksidaza),
- *reducenti*, to so neencimski proteinski antioksidanti v plazmi (transferin, hemoglobin, albumin),
- *antioksidanti sinergisti*, ki povečujejo učinkovanje antioksidantov prve skupine in se nahajajo v plazmi, v celicah in celičnih membranah (vitamin C, glutathion, sečna kislina, vitamin E, betakaroten) (Korošec, 2000).

Abramovič (2011) pa antioksidante razdeli v dve skupini in sicer na primarne in sekundarne antioksidante:

- *Primarni antioksidanti*: reagirajo z radikali in prekinjajo verižno radikalsko reakcijo oksidacije lipidov, radikale pa pretvorijo v termodinamsko stabilnejše zvrsti. Take spojine vsebujejo hidroksilno skupino (fenolne spojine), sulfhidridno skupino (cistein, glutathion) ali aminske skupine (sečna kislina, spermin, proteini). V živilstvu se kot lovilce radikalov najpogosteje uporablja naslednje spojine: fenolne spojine, flavonoide, butiliran hidroksianizol, butiliran hidroksitoluen, terciarni butiliran hidroksikinon in tokoferole.
- *Sekundarni antioksidanti*: uporabljajo različne mehanizme kot so vezava kovinskih ionov v komplekse, lovljenje kisika, razgradnja hidroperoksidov v neradikalne zvrsti, absorpcija UV svetlobe, deaktivacija singlet kisika, s katerimi upočasnijo reakcije iniciacije in s tem zmanjšajo obseg reakcij lipidne oksidacije. Poimenujemo jih tudi kot sinergisti, saj zmanjšajo učinek prooksidantov in povečajo učinkovitost primarnih oksidantov. Sekundarni antioksidanti, ki vežejo kovinske ione v komplekse so EDTA (etilendiaminotetraacetna kislina) citronska kislina, vinska kislina, fitinska kislina, fosforjeva (V) kislina, polifosfati, fosfolipidi, aminokisline, peptidi, proteini in flavonoidi. Antioksidanti, ki z reakcijo s kisikom le-tega odstranijo iz sistema so poimenovani kot lovilci prostega kisika, to so: askorbinska kislina, askorbil palmitat, β -karoten.

Pri razvrstitvi antioksidantov ni poznana najboljša možna razdelitev. Tako je pogostokrat v uporabi tudi razvrstitev antioksidantov po slednjih kriterijih: izvor, način delovanja, fizikalno-kemijske lastnosti, struktura, mehanizem delovanja antioksidanta. Vrsta oksidanta določa njegov način delovanja pri preprečevanju oksidacije. Antioksidanti so lahko encimski ali neencimski sistemi, topni v vodi ali v maščobah (Korošec, 2000; Cigić in Rudan Tasić, 2006; Košmerl, 2011).

Fenolni antioksidanti so donorji vodika ali elektronov. Zaradi resonančne delokalizacije nesparjenih elektronov v aromatskem obroču, so njihovi radikali relativno stabilni (Shahidi in Naczk, 1995). Oksidacijo zavirajo z dvema različnima mehanizmoma reakcij, ki vedno potekata vzporedno, a z različno hitrostjo. Vsebnost prisotnih antioksidantov pa vpliva na antioksidativni potencial snovi. Raziskave so pokazale, da je le-ta v veliki večini odvisen od vsebnosti fenolnih spojin in vrste fenolnih spojin, saj nimajo vsi fenoli enake antioksidativne učinkovitosti. Velik vpliv na vsebnost antioksidantov pa predstavljata tudi tehnologija pridelave in način shranjevanja vina (Košmerl, 2013).

2.4.1 Fenolne spojine kot antioksidanti v vinu

Lovljenje prostih radikalov, sposobnost oksidacije (reducent), vezava kovinskih ionov v stabilne komplekse in deaktivacija prooksidativnih encimov lipoksigenaz (pretvorba encima v neaktivno obliko temelji na redukciji ione Fe^{3+} v Fe^{2+}), so lastnosti, ki fenolnim spojinam omogočajo antioksidativno učinkovanje. Poznamo dva glavna mehanizma reakcije fenolnih spojin z radikali:

- prenos vodikovega atoma in
- prenos elektrona (Abramovič, 2011).

a) Mehanizem prenosa vodikovega atoma poteka sledeče:



Zgornje enačbe (relacije 1, 2, 3) prikazujejo oddajanje vodikovega atoma fenolne spojine (AOH) radikal, pri čemer pride do cepitve vezi med kisikom in vodikom v -OH skupini fenolne spojine. Posledica tega je nastanek fenolnega radikala (AO•). Opisani mehanizem reakcije strokovna literatura poimenuje kot HAT (hydrogen atom transfer). Za fenolne spojine je značilno, da lahko reagirajo z različnimi radikalskimi zvrstmi in sicer lahko reagirajo z alkilnimi radikali pri čemer pride do podaljšanja stopnje iniciacije (relacija 1) ali pa reagirajo z alkilperoksilnimi in alkoksilnimi (relaciji 2, 3), ki povzročijo upočasnitev stopnje propagacije (Abramovič, 2011).

b) Mehanizem prenosa elektrona pa prikazujejo naslednje enačbe:



Zgornje enačbe prikazujejo reakcijski mehanizem SPLET (sequential proton less electron transfer), pri katerem gre za prenos elektrona s fenoksidnega aniona (AO^-), ki nastane pri deprotonizaciji $-\text{OH}$ skupine v molekuli fenolne spojine.

Možna je tudi drugačna reakcijska pot in sicer t.i. ETPT (electron transfer then proton transfer) pot. Pri omenjenem reakcijskem mehanizmu preide fenolna spojina po prenosu elektrona v kationski radikal (AOH^{++}), le-temu pa sledi reverzibilna deprotonacija.



V resnici gre tudi pri reakcijskem mehanizmu SPLET kot tudi ETPT za prenos vodikovega atoma oz. za cepitev vezi med kisikom in vodikom v $-\text{OH}$ skupini. Tip reakcijskega mehanizma antioksidanta pa je odvisen od različnih dejavnikov, predvsem od njegove strukture, okolja (topila) in lastnosti radikala, na katerega antioksidant deluje (Abramovič, 2011).

2.4.2 Razvrstitev fenolnih spojin

Večina poznanih spojin, ki jim pripisujemo antioksidativne učinke, spada v skupino fenolnih spojin (Abramovič, 2011).

Skupina fenolnih spojin je številčna in sestavljena iz strukturno raznolikih spojin, ki kot sekundarni metaboliti nastajajo v rastlinah in mikroorganizmih. V celici se nahajajo v vakuoli ali pa so vezane na strukturne elemente celične stene. Pomembne so pri rasti in reprodukciji rastlin, predstavljajo zaščito pred zunanjimi stresnimi dejavniki kot so UV, mikrobi, insekti ter učinkujejo kot vizualni markerji v cvetovih in sadežih. Poleg tega pa vplivajo na senzorične lastnosti (barva, okus, aroma) živil in imajo farmakološke učinke. Učinkovale naj bi protivirusno, protimikrobno, protivnetno in protitumorno (Abramovič, 2011).

Fenolne spojine vsebujejo vsaj en aromatski obroč, na katerem je ena ali več hidroksilnih skupin. Literatura jih razdeli na več različnih načinov in sicer Abramovič (2011) fenolne spojine razvrsti v slednje skupine:

- enostavni fenoli ali benzokinoni,
- fenolne kisline,
- naftokinoni,

- ksantoni,
- stilbeni,
- flavonoidi,
- lignani,
- biflavonoidi,
- lignini,
- kumarini
- kondenzirani tanini.

Od omenjenih skupin so prehransko najpomembnejši flavonoidi, fenolne spojine in tanini (Abramovič, 2011).

V skupino fenolnih spojin prištevamo zelo enostavne ali monomerne spojine, ki izvirajo iz jagodne kože, grozdnega soka oz. grozdne pečke, kakor tudi kompleksnejše fenole spojine ali tanine, ki izvirajo iz zorilne posode vina. Oboje vplivajo na barvo in stabilnost vina, v večjih koncentracijah pa prispevajo k trpkosti in grenkem okusu. V prisotnosti kisika se rade oksidirajo in povzročajo porjavitve vina (Košmerl, 2013).

Na vsebnost fenolnih spojin v vinu vpliva več dejavnikov: čas kontakta grozdnega soka s kožicami in pečkami oz. maceracija, vsebnost etanola, temperatura fermentacije, mešanja soka in kožic pri maceraciji, intenziteta stiskanja, sorta vinske trste in podobno (Košmerl, 2013). V prvi vrsti pa je fenolni profil močno sortno pogojen, zato je prav sorta vinske trte najpomembnejši dejavnik, ki odloča o profilu fenolov v vinu (Vrhovšek, 1996).

Vsebnost fenolov v vinu je pomembna, saj le-ti močno vplivajo na barvo in stabilnost vina ter zaznavo trpkosti in grenkega okusa. Zelo pomembni so v procesu spreminjanja barve vina, ki lahko nastane kot posledica oksidacije, porjavitve ali kopigmentacije v prisotnosti kisika (Košmerl, 2013).

Fenolne spojine imajo poleg vpliva na barvo in okus (trpkost, grenkoba) vina, tudi dokazano antioksidativno učinkovitost. Zaradi antioksidativnih lastnosti fenolnih spojin vina, ki so jih dokazali v *in vitro* in *in vivo* raziskavah, proti prostim radikalom in pozitivnega učinka na naše zdravje, je osnovna želja vseh vinarjev, da bi jih z ustreznimi tehnološkimi postopki in znanjem, kar se da ohranili oz. preprečili njihovo oksidacijo (Košmerl, 2013).

Preglednica 9: Vsebnost fenolnih kislin in flavonoidov v belem vinu (De Beer in sod., 2002).

Fenolne spojine	Koncentracija (mg/L)
	Belo vino
NEFLAVONOIDI	160-260
Hidroksibenzojske kisline	0-100
<i>p</i> -hidroksibenzojska kislina	- ^a
Galna kislina	6,4 (2,8-11)
Skupni galati	6,9 (6,8-7)
Siringična kislina	- ^a
Protokatehujška kislina	- ^a
Hidroksicimetne kisline	130-154
<i>p</i> -kutarna kislina	1,8
Kaftarna kislina	5 (3-7)
Kavna kislina	3,17 (1,5-5,2)
<i>p</i> -kumarna kislina	2,2 (1-3,2)
Ferulna kislina	- ^a
Stilbeni	1,8 (0,04-3,5)
Resveratrol	0,04 (0-0,1)
FLAVONOIDI	25-30
Flavonoli	Sledovi
Kvercetin	0,55 (0-1,2)
Miricetin	0,1 (0-0,3)
Kamferol	0,1
Rutin	0,3 (0-0,9)
Flavan-3-oli	11,5 (2-29)
Katehin	15,4 (1,5-46)
Epikatehin	8,7 (0,5-60)
Proantocianidini	0
Antocianini	0
Delfinidin-3-glukozid	0
Cianidin-3-glukozid	0
Petunidin-3-glukozid	0
Peonidin-3-glukozid	0
Malvidin-3-glukozid	0
Malvidin-3-glukozid-acetat	0
Malvidin-3glukozid-p-kumarat	0
Skupni polifenoli:	177,6 (96-331)

^ani podatka v literaturi.

Fenolne spojine v vinu lahko razdelimo v dve veliki skupini, na flavonoide in neflavonoide. Medtem ko so antioksidativne značilnosti flavonoidov znane in dokazane že dlje čase, se v zadnjem času več pozornosti namenja skupini neflavonoidov, ki je bila do sedaj manj raziskana (Vrhovšek, 1996).

Preglednica 10: Razdelitev fenolnih spojin vina (Vrhovšek, 1996).

Flavonoidi	Neflavonoidi
- flavan-3-oli (katehin, epikatehin), - proantocianidini (di- in trimeri katehina in epikatehina), - antocianidini (cianidin, peonidin, delphinidin, petunidin, malvidin), - flavonoli (kamferol, kvercetin, miricetin, izoramnetin).	- hidroksicimetne kisline (kaftarna, kutarna, fertarna, kavna, <i>p</i>-kumarna, ferulna), - hidroksibenzojske kisline (galna, vanilinska, siringična), - stilbeni (resveratrol).

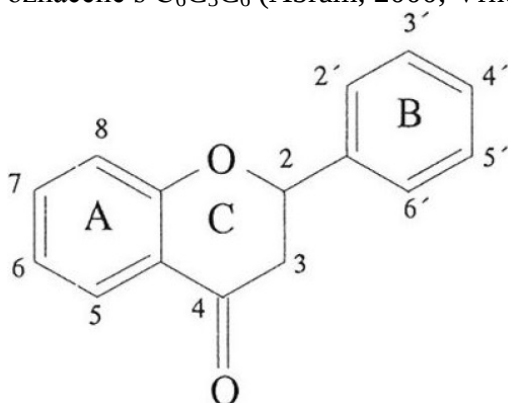
Flavonoidi so spojine značilne predvsem za rdeča vina in zavzemajo tudi do 85 % vseh prisotnih fenolov, v belih vinih pa zgolj 20 %, medtem ko spojine neflavonoidov predstavljajo večino fenolnih spojin v belih vinih. Nahajajo se zlasti v celičnih vakuolah kožice grozdne jagode, kjer so vezani oziroma zaestreni na sladkorje, alkohole in kisline, drugi vir neflavonoidov pa predstavlja ekstrakcija iz lesa (Bavčar, 2006).

Antioksidativne značilnosti fenolnih spojin so močno pogoje z njihovo kemijsko strukturo. Zaradi ene ali več hidroksilnih skupin na benzenovem obroču, ima večina fenolnih spojin vina antioksidativne lastnosti. Znano je celo, da so mnoge fenolne spojine vina boljši antioksidanti kot vitamin E (Vrhovšek, 1996).

Antioksidativno vlogo imata v vinu poleg fenolnih spojin tudi enološki sredstvi askorbinska kislina in žveplov dioksid, ki ščitita flavonoidne fenole pred oksidacijo, ker se sama oksidirata. Žveplov dioksid povzroči še dodatno inhibicijo oksidaz in mikrobov, prav tako pa se veže na aldehyde in druge vezalce žvepla (Plahuta, 2004).

Flavonoidi

Flavonoidi so najbolj razširjeni antioksidanti v človeški prehrani, saj se nahajajo v sadju, pijačah (sok, kava, čaj), pa tudi v čokoladi. Oksidacijo preprečujejo na različne načine, lahko delujejo kot lovilci prostih radikalov, vežejo kovinske ione ali pa zavirajo encimske sisteme, ki katalizirajo nastanek prostih radikalov. Omenjena skupina ima osnovni skelet zgrajen iz 15 C-atomov, osnovno spojino flavon pa sestavljajo strukture, označene s $C_6C_3C_6$ (Abram, 2000; Vrhovšek, 1996).



Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000).

2.4.3 Tanini in enološki tanini

Tanini ali čreslovine so polimeri flavonoidnih in neflavonoidnih fenolov z relativno visoko molsko maso. Razdelimo jih v dve skupini:

- hidrolizabilni, ki so estri galne ali elagične kisline z glukozo in
- kondenzirani tanini, ki so oligomerne in polimerne spojine flavan-3-olov (katehin, epikatehin) in jih poimenujemo tudi kot proantocianidini (Abramovič, 2011).

Tanine navadno povezujemo s spremembami senzorične kakovosti in reaktivnostjo, saj so fenolne spojine aktivnejše v primerjavi z beljakovinami. Nagnjene so k reakcijam oksidacije in polimerizacije, kar pa ima velik vpliv na aromatičnost in kakovost okusa pridelanega vina (Košmerl, 2013).

V povezavi z nacionalno in evropsko zakonodajo lahko preparate taninov definiramo kot enološka sredstva, ki so iz proizvajalčeve strani strokovno in korektno označeni ter priporočeni z namenom uporabe in količino dodatka (Košmerl, 2013). V spodnji preglednici so navedeni dovoljeni preparati enoloških taninov, ki so v uporabi kot čistilno sredstvo.

Preglednica 11: Uporaba enoloških taninov kot čistilnega sredstva (Košmerl, 2013).

sestava	namen uporabe	priprava	vsebnost
Tanin	Hidrolizabilni in kondenzirani tanini, ki so učinkoviti pri stabilizaciji barve, pospeševanju bistrenja in večanju strukture rdečih vin, ki so revnejša na taninih.	Raztopitev v 10-kratni količini vode s $T = 40-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ in med stalnim mešanje dodatek k celotni masi.	Med maceracijo: 10-20 g/hL Med čiščenjem: 5-15 g/hL
Elagotanin	Vsebuje elagovo kislino, ki reagira s stabilnimi tanini brez vpliva na telo vina in izboljša čiščenje vin ter uravnoteži arome.	Raztopitev v 10-kratni količini vode ali vina in med stalnim mešanje dodatek k celotni masi.	Bela vina: 4-8 g/hL Rdeča vina: 4-8 g/hL
Galotanin	Primeren za bela vina, kjer so potrebne izboljšave harmonije, strukture in okusa. Krepi antioksidacijski učinek SO_2 .	V razmerju 1:10 raztopitev v vodi ali vinu ter dodatek k masi.	Priprava vin: 3-10 g/hL Lepšanje vin: 4-8 g/hL
Hrastov tanin	Mešanica naravnih taninov, ekstrahiranih iz ožganih hrastovih dog za lesene sode, lahko podaljša trajanje barikom, saj količina taninov postopoma pade na 30-50% po 2-3 letih.	Raztopitev v 10-kratni količini vode ali vina in med stalnim mešanjem dodatek k celotni masi.	Bela vina: 2-8 g/hL Rdeča vina: 4-15 /hL

2.4.4 Trske iz hrastovega lesa

V tehnologiji pridelave vin kot lesene trske (pogovorno tudi čipse) imenujemo preproste fragmente lesa, pripravljene iz lesa, ki ga uporabljajo pri izdelavi sodov ali drugih lesenih posod za potrebe vinarjev. Gre za mešanico naravnih taninov, ekstrahiranih iz ožganih hrastovih dog za lesene sode, ki lahko podaljša trajanje barrique vinom in podpira delovanje SO_2 . Dodatek trsk iz hrastovega lesa je primeren za vina visoke kakovosti in za dolgo življenjsko dobo barrique vin, saj vino zmehča in uravnoteži njegovo taninsko strukturo ter mu doda nežen vonj po vanilji in začimbah (Košmerl, 2013).

Uredba komisije Evropskega Sveta (ES) št. 606/2009 z dne 10. julij 2009 med enološkimi postopki dovoljuje uporabo trsk iz hrastovega lesa pri proizvodnji in negi vina, kar pomeni tudi pri vrenju svežega grozdja in grozdnega mošta (Košmerl in sod., 2012b).

V odvisnosti od velikosti trsk ločimo:

- prah, pri katerem je velikost trsk $< 3\text{ mm}$,
- drobna zrna velikosti $3-10\text{ mm} \times 0,5-1\text{ mm}$ in
- groba zrna velikosti $5-10\text{ mm}$.

Poleg zgoraj omenjenih trsk se kot nadomestek uporabe lesenega soda v vinarstvu uporabljajo tudi lesene kroglice, kocke in doge (Bautista-Ortin in sod., 2008).

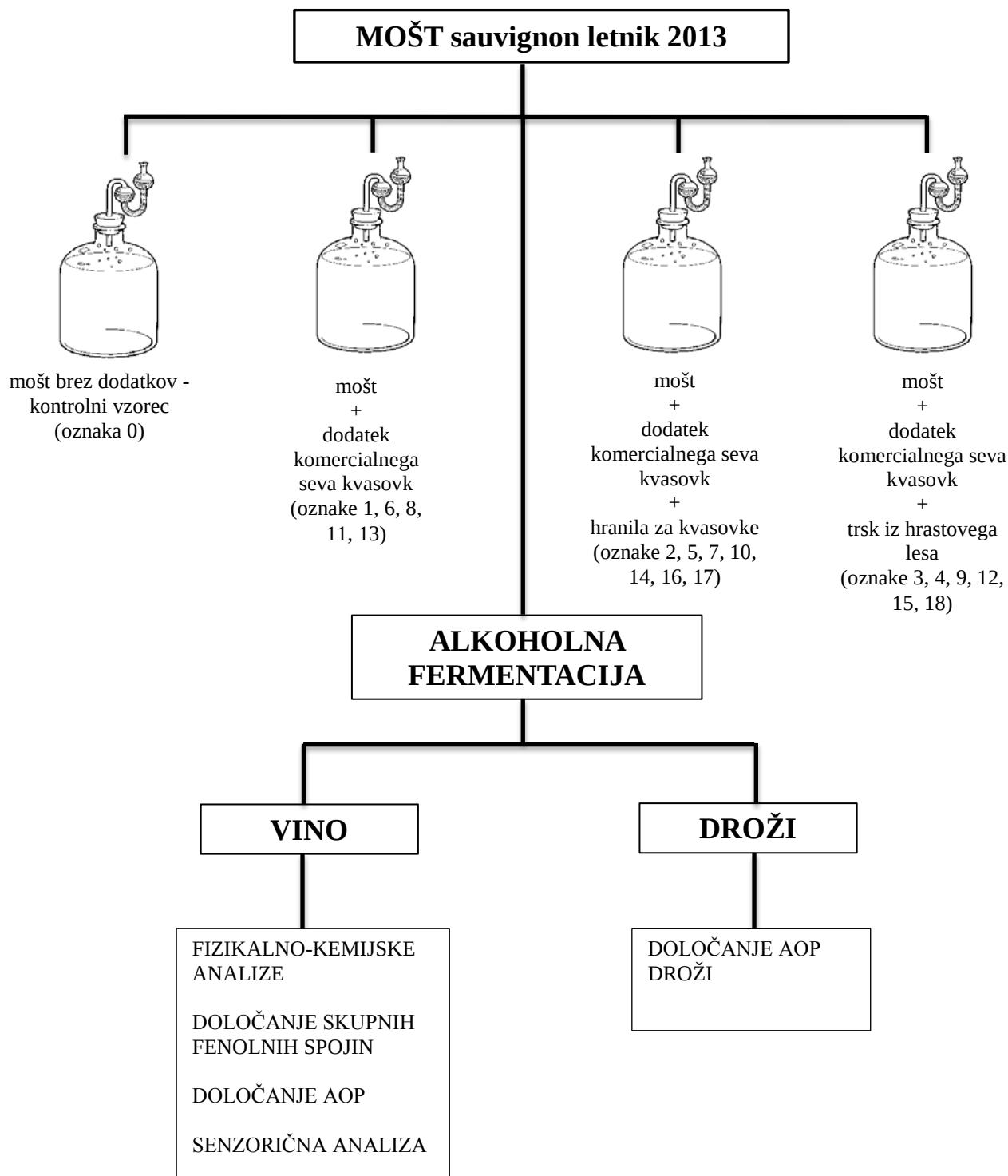
Ožgan les v odvisnosti od uporabljene temperature in trajanja žganja (stopnja ožganosti), delimo v 3 skupine:

- malo ožgan les (lightly toasted LT), do 5 min pri temperaturi 120-180 °C,
- srednje ožgan les (medium toasted MT), 10 min pri temperaturi $\approx$ 200 °C,
- močno ožgan les (heavily toasted HT), 15-20 min pri temperaturi 260-270 °C (Bautista-Ortin in sod., 2008).

Raziskav, kjer so proučevali vpliv dodatka trsk iz hrastovega lesa v sam most, ni veliko. Košmerl in sod. (2012b) so proučevali vpliv s strani EU dovoljenega omenjenega dodatka na fermentacijske, tehnološke, senzorične in aromatične značilnosti vina in potrdili pozitivno korelacijo dodanih trsk tekom celotnega trajanja alkoholne fermentacije na značilnosti pridelanega vina. V primeru uporabljenih trsk je bil opazen bolj enakomeren potek fermentacije, ki je posledica bolj enakomerne porazdelitve kvasovk po celotni fermentirajoči prostornini, saj le-te igrajo vlogo povečanja notranje površine.

3 MATERIALI IN METODE DELA

3.2 ZASNOVA POSKUSA



Slika 2: Shematski prikaz poteka poskusa.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mošt

V poskusu smo uporabili mošt bele vinske sorte sauvignon, letnika 2013, iz vinorodnega okoliša Štajerska, Slovenija, ki je bil do uporabe hranjen v zmrzovalniku. Na sliki 3 so prikazane platenke mošta, ki smo ga uporabili za naš fermentacijski poskus. V vseh platenkah smo izmerili začetno sladkorno stopnjo 87 °Oe. Vzorec mošta smo poslali na WineScan (WSC) analizo na Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica (KGZ NG), rezultati omenjene analize pa so prikazani v prilogi A.



Slika 3: Platenke z moštom bele vinske sorte sauvignon, letnik 2013, iz vinorodnega okoliša Štajerska, Slovenija, ki smo ga uporabili za naš fermentacijski poskus.

3.2.2 Enološka sredstva

3.2.2.1 Suhe aktivne kvasovke

Pri poskusu smo uporabili pet različnih komercialnih selekcioniranih kvasovk za bela vina. Vse uporabljene komercialne seve kvasovk smo pred uporabo rehidrirali v vodi s temperaturo 30-35 °C po navodilu proizvajalca in sicer v razmerju kvasovke : voda = 1 : 10. Po poteku 20-ih minut smo dodali še nekaj mošta iz fermentacijske steklenice z namenom aklimatizacije kvasovk na delovno okolje, kar pomeni iz temperature 35 °C na temperaturo 22-24 °C in iz okolja brez sladkorja na okolje z večjo vsebnostjo sladkorja.

Pri delu smo uporabili naslednje komercialne selekcionirane kvasovke:

- Fermicru 4F9,
- Lalvin EC 1118,
- Lalvin QA23,
- Cross Evolution in
- Uvaferm CM.

Preglednica 12: Uporabljeni komercialni sevi kvasovk.

oznaka vreln steklenice	komercialno ime seva kvasovk	vrsta kvasovk	proizvajalec	doziranje (g/hL)
1, 2, 3	Fermicru 4F9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Oenobrand, DSM, distributer Jurana d.o.o.	20
4, 5, 6 16, 17, 18	Lalvin EC 1118	<i>Saccharomyces cerevisiae bayanus</i>	Danstar Ferment, AG, EU, distributer Jurana d.o.o.	25-40
7, 8, 9,	Lalvin QA23	<i>Saccharomyces cerevisiae bayanus</i>	Lallemant, distributer Jurana d.o.o.	25-40
10, 11, 12	Cross Evolution	<i>Sacchyromyces cerevisiae cerevisiae</i>	Lallemant, distributer Jurana d.o.o.	25
13, 14, 15	Uvaferm CM	<i>Sacchyromyces cerevisiae cerevisiae</i>	Lallemant, distributer Jurana d.o.o.	25-40

3.2.2.2 Hranila za kvasovke

Pri poskusu smo uporabili naslednja komercialna hranila za kvasovke:

- V Activ,
- Fermaid O,
- Opti-White in
- Redules,

ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalca v razmerju hranilo za kvasovke : voda = 1 : 10.

Preglednica 13: Uporabljena komercialna hranila za kvasovke.

oznaka vrelna steklenice	komercialno ime hranila za kvasovke	proizvajalec	doziranje (g/hL)
2	V Active	Enologica Vason S.r.l.	10-30
5	Fermaid O	Lallemmand Inc. Europe	35-40
7, 14, 17	Opti-White	Lallemmand Inc. Europe	30-50
10, 16	Reduless	Lallemmand Inc. Europe	15-30

3.2.2.3 Trske iz hrastovega lesa

Pri poskusu smo uporabili slednje trske iz hrastovega lesa, ki smo jih po navodilih proizvajalca dodali direktno v fermentacijsko steklenico:

- Tanin Quercia AM HT,
- Tanin Quercia AM MT,
- Intanto French.

Preglednica 14: Uporabljene trske iz hrastovega lesa.

oznaka vrelna steklenice	komercialno ime trsk iz hrastovega lesa	proizvajalec	doziranje (g/L)
3, 4, 9, 15	Tanin Quercia AM HT	Enologica Vason S.r.l.	3-5 (fermentacija) 100-300 (vino)
12	Tanin Quercia AM MT	Enologica Vason S.r.l.	3-5 (fermentacija) 10-30 (vino)
18	Intanto French	Esseco Spa	1-4

3.2.3 Kemikalije in reagenti

Pri analizah mladega vina smo uporabili spodnje reagente:

- Galna kislina: za pripravo osnovne raztopine galne kisline pri določanju skupnih fenolnih spojin v vinu.
- DPPH• (2,2-difenil-1-piridil-hidrazil) (Sigma): zatehtali smo 4 mg DPPH v 100 mL bučko in dopolnili do oznake z metanolom.
- Natrijev karbonat (Na_2CO_3) (Merck): za pripravo 20 % raztopine natrijevega karbonata.

- Folin-Ciocalteu reagent: pred uporabo smo ga razredčili z deionizirano vodo v razmerju FC : deionizirana voda = 1 : 2
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4) (Merck) + kalijev hidrogenfosfat (KPO_4) (Merck) za pripravo 50 mM kalijevega fosfatnega pufra (pH = 7,8).
- Pufurna raztopina za umerjanje pH metra (pH = 4,00 in pH = 7,02).
- H_2DCFDA (2', 7'-karboksiflourescin diacetat) (Sigma): za pripravo 1 mM raztopine H_2DCFDA raztopimo 0,0046 g H_2DCFDA v 10 mL 96 % (v/v) etanola.

3.2.4 Laboratorijska oprema in aparature

Za poskus smo potrebovali:

- analitsko tehtnico (AEA-220 A),
- UV-VIS RECORDING spektrofotometer (Shimadzu UV-160 A),
- ultrazvočna kopel (Iskra, Sonis 2),
- pH meter s kombinirano stekleno elektrodo (Mettler Toledo DL50 Graphix),
- čitalnik mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan),
- kivete,
- avtomatske pipete,
- kapalke,
- erlenmajerice,
- stojalo za epruvete,
- centrifugo (Tehtnica Centric 2000),
- stresalnik (INFORMS Multitron),
- magnetno mešalo (Magnetic stirrer mod microvar),
- filter z velikostjo por 0,45 μm .

3.2.5 Nastavitev fermentacijskega poskusa

Nastavitev fermentacijskega poskusa je nazorneje prikazana na sliki 2, kjer je razvidno, da smo mošt razdelili v 19 fermentacijskih steklenic (18 vzorcev + kontrolni vzorec) in sicer po 550 mL mošta (sauvignon, letnik 2013) v vsako. V fermentacijsko steklenico z oznako 1 smo dodali samo startersko kulturo vinskih kvasovk, v steklenico z oznako 2 startersko kulturo vinskih kvasovk in hranilo za kvasovke, v steklenico z oznako 3 pa startersko kulturo vinskih kvasovk ter trske iz hrastovega lesa. Pri tem smo oblikovali 6 različnih skupin s po tremi različnimi vzorci, izmed katerih je bil en z dodatkom komercialnih selekcioniranih kvasovk, drugi z dodatkom kvasovk in hranil zanje, tretji pa z dodatkom vinskih kvasovk ter trsk iz hrastovega lesa. Pred samim dodatkom kvasovk oziroma hranila v mošt, smo kvasovke in hranila rehidrirali. Pripravljene, rehidrirane kvasovke in hranila smo dali v fermentacijske steklenice, na katere smo namestili vrelnе vehe. Le-te smo do 1/3 napolnili z vodo in zamašili s kosom vate ter tako omogočili izhajanje CO_2 , preprečili pa vstop kisika.

Prvi dan smo fermentacijske steklenice pustili na sobni temperaturi ($T = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$), da so se kvasovke aklimatizirale, nato pa smo jih prenesli v klet na temperaturo $17\text{ }^{\circ}\text{C}$, kjer je potekala alkoholna fermentacija. Fermentacijske steklenice smo tehtali vsakih 6 ur. Po koncu fermentacije smo pridelano mlado vino prefiltrirali skozi filter z velikostjo por $0,45\text{ }\mu\text{m}$, nato pa opravili še fizikalno-kemijske in senzorične analize vina.

3.3 FIZIKALNO-KEMIJSKE METODE

3.3.1 Analiza osnovne kemijske sestave mošta in vina z WineScan™ FOOS

V agroživilskem laboratoriju na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica smo opravili WineScan analizo mošta in vina. WineScan je sodobna naprava proizvajalca FOSS, ki omogoča hitre analize (približno 30 sekund) grozdja, mošta in vina. Omenjena analiza osnovne kemijske sestave vina zajema določitev:

- relativne gostote mošta in vina,
- masne koncentracije skupnega suhega ekstrakta,
- vsebnosti alkohola,
- vsebnosti reducirajočih sladkorjev,
- vrednost pH,
- masne koncentracije skupnih titrabilnih kislin,
- masne koncentracije hlapnih kislin,
- organskih kislin (vinska, citronska, jabolčna),
- vsebnosti CO_2 .

Poleg zgoraj navedenih fizikalno-kemijskih parametrov z WineScan analizo dobimo tudi podatek o informativni vsebnosti fenolnih spojin. Prednosti omenjene analize sta v tem, da vzorca za analizo ni potrebno predhodno segreti ali kemijsko obdelati, prav tako pa so stroški za uporabljene reagentne nizki (FOSS, 2014). Omenjena analiza je bila opravljena po dveh različnih programih in sicer po programu Suha vina in po programu Vina v vrenju.

WineScan analiza deluje na principu infrardeče spektroskopije, saj imajo fotoni infrardeče svetlobe (valovna dolžina $2,5\text{--}50\text{ }\mu\text{m}$), energijo, primerno za vzbujanje nihanj vezi med atomi v posameznih molekulah. Le-ti nihajo na različne načine, ki so značilni za posamezen tip vezi, zato jih lahko uporabimo za kvalitativno in kvantitativno določitev komponent v vzorcu. Posamezni spektri molekul so zelo kompleksni in velja, večja kot je molekula, večje je tudi število nihanj. Lega absorpcijskega vrha določene vezi je odvisna od okolice, v kateri se vez nahaja (npr. hibridizacija atomov, konjugacija z dvojnimi ali trojnimi vezmi iz okolice, elektronegativnost sosednjih). Za ugotavljanje prisotnosti posameznih funkcionalnih skupin infrardeče spektre navadno snemamo v območju $400\text{ cm}^{-1}\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ (Skvarč, 2007).

Navadno je bila šibka točka uporabe spektroskopskih metod dejstvo, da smo lahko spremljali intenziteto radiacije na eni oziroma le nekaj valovnih dolžinah. FTIR (»infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo«) inštrumenti pa omogočajo

sočasno spremljanje intenzitete svetlobe v celem infrardečem spektru in hkrati ohranjajo natančnost in stabilnost tradicionalnih instrumentov (Skvarč, 2007).

WineScan aparat je kalibiran za suha mirna vina s klasičnimi metodami, kalibracijske krivulje pa so redno potrjene z medlaboratorijsko primerjavo. Akreditirani parametri za vino so naslednji: relativna teža, alkohol, ekstrakt, skupne in hlapne kisline. Potrjeni parametri za vino pa so: reducirajoči sladkorji, vrednost pH, jabolčna, mlečna, citronska in vinska kislina, glicerol, CO₂ in FC indeks.

Zgoraj opisana metoda je ena izmed metod, ki se uporablja za fizikalno-kemijske analize v živilstvu, hkrati pa je doprinesla veliko izboljšav tudi na področju analize vina, saj omogoča časovno hitre, a hkrati natančne meritve za številne parametre vzorca (Moreira in Santos, 2004).

Priloga A, nam prikazuje rezultate fizikalno-kemijskih analiz mošta sorte sauvignon, letnik 2013, ki so bila opravljena pred začetkom poskusa oz. alkoholne fermentacije na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica (KGZ NG). V poglavju Rezultati z razpravo sem predstavila le tiste parametre, kjer je očitna in lepo razvidna razlika med posamezni vzorci vina.

3.3.2 Določanje oddanega CO₂

Iz rezultatov WineScan analize smo izračunali oddani CO₂ med alkoholno fermentacijo in delež teoretično nastalega CO₂ med alkoholno fermentacijo. Pri izračunu oddanega CO₂ smo uporabili naslednjo formulo:

oddani CO₂

delež teoretično nastalega CO₂
med alkoholno fermentacijo

3.3.3 Določanje skupnih fenolnih spojin vina s Folin-Ciocalteu reagentom

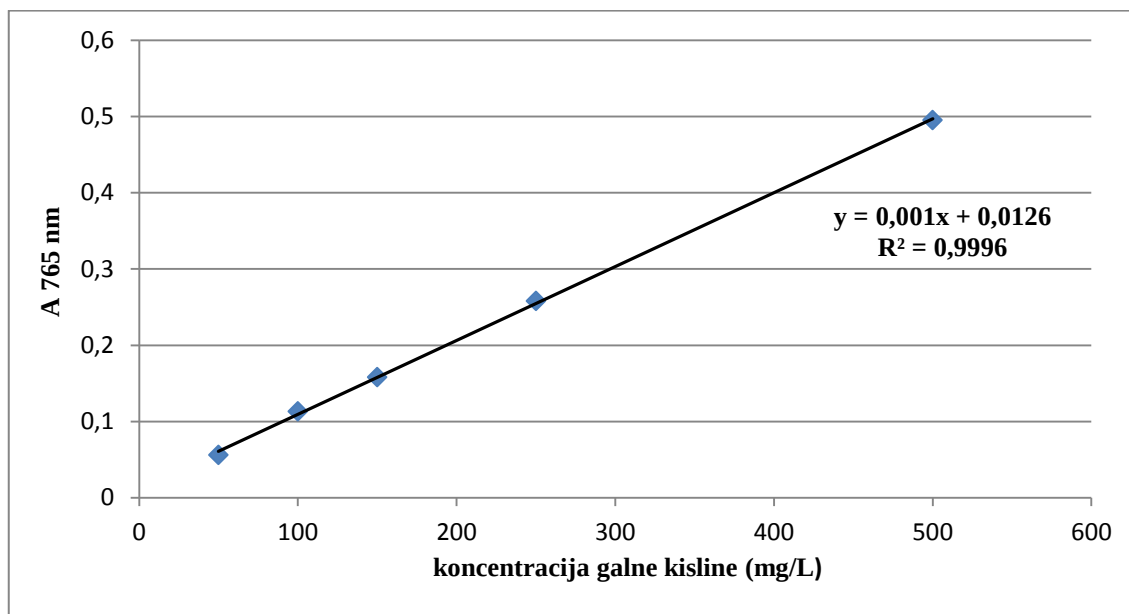
Določanje sposobnosti redukcije s Folin-Ciocalteu reagentom je metoda, ki se jo tradicionalno uporablja za določanje skupnih fenolnih spojin in temelji na sposobnosti preiskovalne spojine, da odda elektron, ki reducira molibden v kompleks fosfomolibden/fosfovolfram ter s tem omogoča opis redukcijske sposobnosti antioksidanta.



Nerazredčenemu vzorcu vina (0,5 mL) v 50 mL bučki smo dodali Folin-Ciocalteu reagent (2,5 mL), dobro premešali in nato dodali 20 % raztopino natrijevega karbonata (7,5 mL). Do oznake smo dopolnili z deionizirano vodo, premešali in vzorcem po 2 urah izmerili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm v kvarčni kiveti z dolžino optične poti 1 cm proti slepemu vzorcu. Umeritveno krivuljo, ki je prikazana na sliki 4, smo pripravili galno kislino s koncentracijami 0 do 500 mg/L (preglednica 15). Končno vsebnost skupnih fenolnih spojin smo izračunali iz enačbe umeritvene krivulje in rezultat izrazili kot mg galne kisline/L (Košmerl in Kač, 2007).

Preglednica 15: Standardne raztopine galne kisline (Košmerl in Kač, 2009).

oznaka bučke	volumen osnovne raztopine galne kisline (V _{g.k.} mL)	končna koncentracija galne kisline v standardni raztopini (γ mg/L)
0	0	0 (slepi vzorec)
1	1	50
2	2	100
3	3	150
4	5	250
5	10	500



Slika 4: Umeritvena krivulja z galno kislino.

Masno koncentracijo oziroma končno vsebnost skupnih fenolnih spojin smo izračunali iz enačbe umeritvene krivulje:

γ galna kislina

množino ulovljenega DPPH•/L vina (mmol/L) (Košmerl in Kač, 2009; Fernández-Pachón in sod. 2005).

Relacije, ki smo jih uporabili pri izračunu AOP vina:

488 nm, emisije pa 520 nm. Rezultat smo podali kot razmerje med fluorescence (F) in optično gostoto kvasnih celic (OD) (F/OD).

3.4 SENZORIČNA ANALIZA

3.4.1 20-točkovna Buxbamova metoda

Senzorična analiza pridelanih mladih vin je bila opravljena po uradni 20-točkovni Buxbamovi metodi (Pravilnik o postopku..., 2000) ali metodi pozitivnih točk. Sodelovalo je sedem pooblaščenih ocenjevalcev, za izračun povprečne ocene pa sta se izločili najnižja in najvišja ocena. Omenjena metoda je uradna metoda za določitev senzorične kakovosti vina v Sloveniji in se uporablja tudi na vseh ocenjevanjih na nivoju lokalnih društev in regij.

Vino lahko dobi od 0 do 20 točk, od tega za:

- bistrost 0 do 2,
- barvo 0 do 2,
- vonj 0 do 4,
- okus 0 do 6 in
- harmonijo 0 do 6 točk.

Z metodo najprej ocenimo bistrost in barvo, šele nato vonj in okus vina. Omenjena metoda nam da oceno splošnega skupnega vtisa. Končna ocena srednja vrednost vseh petih ocen in le-ta daje trdno in realno oceno o vinu (Košmerl in Kač, 2009).

3.4.2 5-točkovna ocenjevalna lestvica in rangiranje vzorcev

Preskusi z lestvicami spadajo med najpogostejše in vsestransko uporabne senzorične preskuse. Uporabni so za določanje stopnje, velikosti ali intenzivnosti razlik ene ali več senzoričnih lastnosti ali za ocenjevanje skupne kakovosti (Golob in sod., 2006).

Senzorična metoda opisna ali deskriptivna analiza strokovnjaku omogoča, da pridobi popoln senzoričen opis izdelka. Pri omenjeni metodi je senzorični ocenjevalec dolžan opisati vino z besedami, ki služijo za boljšo zbranost in poglobljenost ocenjevalcev, nato pa ga kvalitativno oceniti s številkami (Nemanič, 1996). Tako je rezultat analize niz izrazov, s katerimi je možno objektivno opisati zaznane senzorične lastnosti vina, nato pa jih na ustreznih intenzivnostih lestvicah še kvantitativno oceniti. Panel za deskriptivno analizo je običajno sestavljen iz 8-12 članov (Golob in Jamnik, 2004).

V deskriptivno analizo, kjer so senzorični ocenjevalci vzorce vina ocenili s točkami od 1 do 5, pri čemer je vrednost 1 pomenila najmanj, vrednost 5 pa najbolj izraženo posamezno ocenjevano senzorično lastnost, smo vključili naslednje senzorične deskriptorje: vonj po tropskem sadju oziroma težja tropska aroma (pasijonka, mango), vonj po citrusih oziroma sveža tropska aroma (grenivka, limona), vonj po sadju oziroma

fermentacijska aroma (hruška, jabolko), vonj po zelenem oziroma prekrivanje sortnih arom (zeleni paprika) in celokupno kakovost vina (okus in aroma).

Rangiranje ali razvrščanje vzorcev je senzorična metoda oz. preskus z uporabo lestvic, pri katerem dobi preskuševalec istočasno serijo treh ali več vzorcev. Razvrstiti jih mora po intenzivnosti določene senzorične lastnosti oz. po vsečnosti (Golob T. in sod., 2006).

3.5 STATISTIČNA ANALIZA

Vse analize smo opravili v dveh oziroma treh paralelkah, rezultate pa smo podali kot povprečje $\pm$ standardni odklon, ki smo ga izračunali po enačbi:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N}} \quad \dots (17)$$

σ – standardni odklon

x_i – i-ta enota vzorca

$\bar{x}$ – aritmetična sredina vzorca

N – število vseh enot

Korelacijo med dvema spremenljivkama smo poiskali s pomočjo linearne regresije z metodo najmanjših kvadratov.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

V nadaljevanju magistrske naloge so prikazani rezultati analiz, ki smo jih pridobili s fizikalno-kemijskimi metodami in rezultati senzorične analize vzorcev mladega vina. Vzorci so razdeljeni v šest trojic, sestavljenih iz treh različnih vzorcev označenih z oznakami 1-3, 4-6, 7-9, 10-12, 13-15, 16-18, pri čemer je eden izmed vzorcev v skupini le z dodatkom komercialnega seva kvasovk, druga dva pa poleg komercialnega seva kvasovk vsebujeta še različna dodatka in sicer dodatek hranil za kvasovke ali trsk iz hrastovega lesa. Z oznako 0 je označen kontrolni vzorec, kjer je potekala spontana alkoholna fermentacija in v katerega nismo posegali oz. mu nismo ničesar dodali.



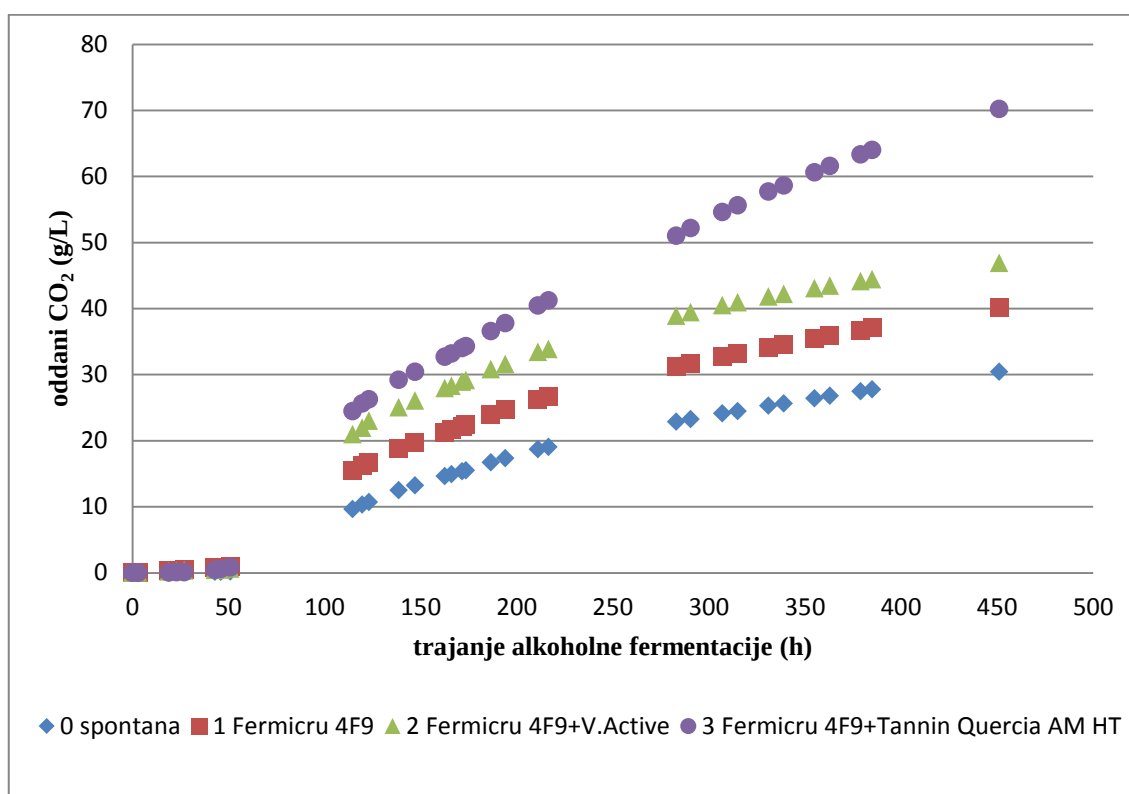
Slika 5: Videz mladih pridelanih vin po zaključku spremljanja poskusa alkoholne fermentacije.

4.1 FERMENTACIJSKE KRIVULJE

Fermentacijski poskus oziroma spremljanje mase fermentacijskih steklenic je potekalo 451 ur, kar znaša nekaj več kot 18 dni. Tekom alkoholne fermentacije se je masa vsebine v fermentacijskih steklenicah zmanjševala, kar je posledica oddanega CO_2 , ki nastane pri reakciji, v kateri med alkoholno fermentacijo iz glukoze nastaja etanol. S pomočjo programa Excel smo izrisali fermentacijske krivulje posameznih vzorcev, ki prikazujejo časovno odvisnost oddanega CO_2 . Narisali smo tudi krivulje fermentacijske kinetike vzorcev kot spremembo oddanega CO_2 na časovno enoto.

Hitrost alkoholne fermentacije in s tem posledično količina oddanega CO_2 je odvisna od različnih dejavnikov: fizikalno-kemijske sestave mošta, inokuliranega seva kvasovk in temperature alkoholne fermentacije (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). V nalogi nas je zanimalo, ali dodatek selekcioniranih kvasovk, dodatek trsk iz hrastovega lesa in dodatek hranila vpliva na potek alkoholne fermentacije in če vpliva, v kolikšni meri.

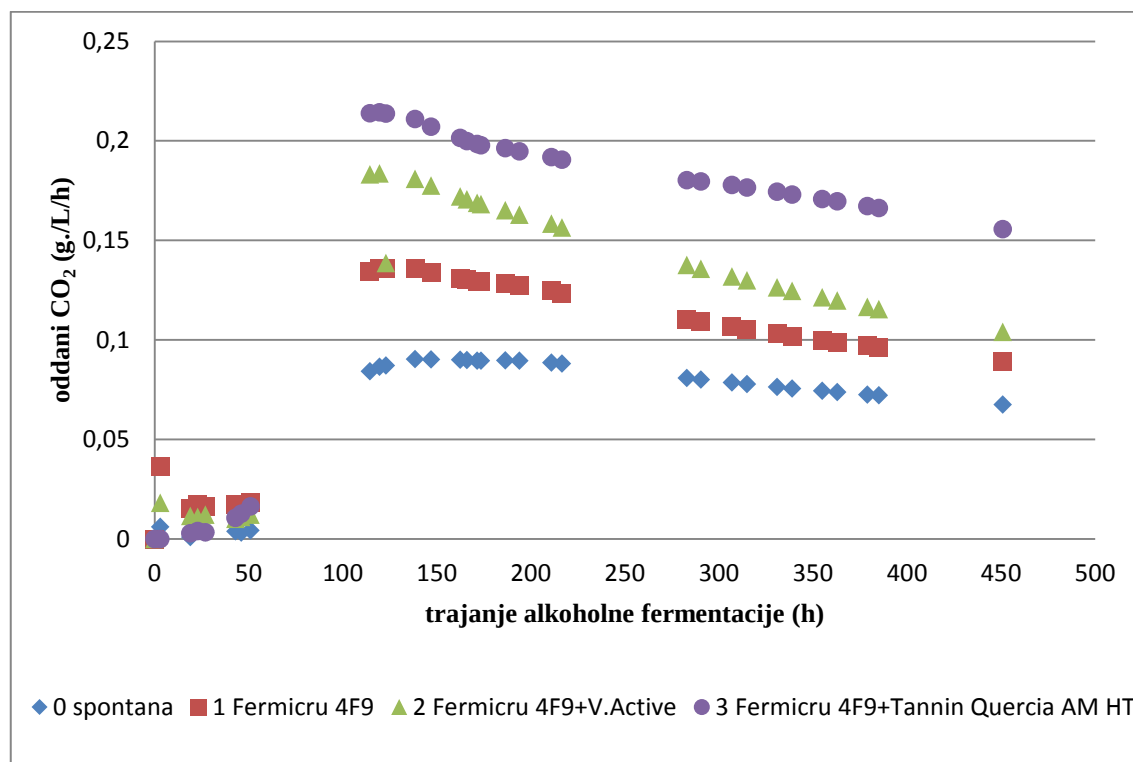
Fermentacijske krivulje in krivulje fermentacijske kinetike so prikazane na slikah od 6 do 17 za vse vzorce pridelanega vina v primerjavi s kontrolnim vzorcem.



Slika 6: Fermentacijske krivulje vzorcev 1, 2, 3 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

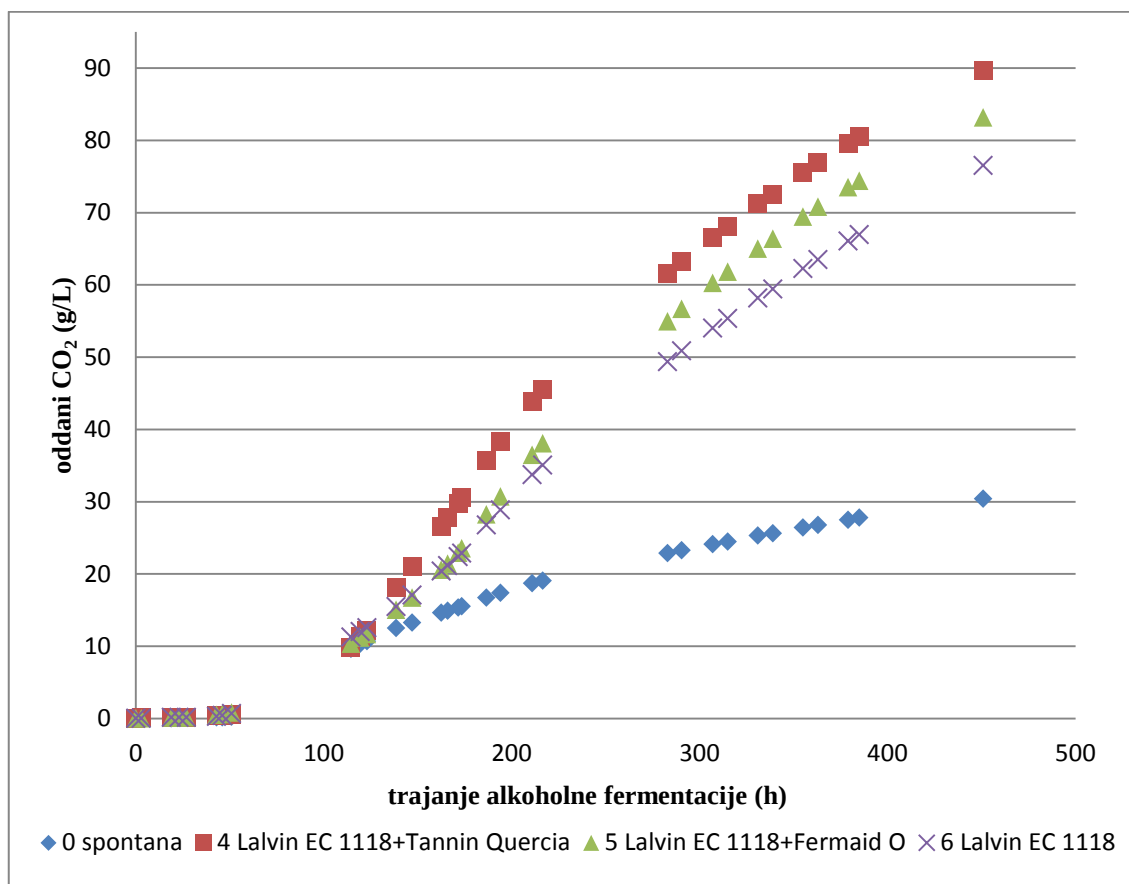
Slika 6 prikazuje oddani CO_2 (g/L) med alkoholno fermentacijo za vzorce 1, 2 in 3. Pri teh vzorcih smo uporabili komercialni sev kvasovk Farmicru 4F9, kjer gre za kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*, ki so primerne za pridelavo zelo aromatičnih belih vin in rose vin. Uporabo Femicru 4F9 se še posebej priporoča za zorenje vina na drožeh (Lallemand, 2012). Vzorec 1 je vseboval startersko kulturo omenjenega seva vinskih kvasovk, vzorec 2 startersko kulturo vinskih kvasovk in hranilo za kvasovke V Activ, vzorec 3 pa startersko kulturo vinskih kvasovk ter trske iz hrastovega lesa Tannin Quercia AM HT. V Activ je enostavnejše hranilo, sestavljeno iz amonijevega sulfata, amonijevega fosfata, kalijevega hidrogenkarbonata in vitamina B₁. Gre za biološko aktiven produkt, izdelan iz kompleksnih spojin in vitaminov za pospeševanje rasti in razmnoževanje kvasnih kultur ter zagotavljanje hitre in zanesljive fermentacije. Glede na geografsko poreklo gre pri trskah iz hrastovega lesa Tannin Quercia AM HT za ameriški hrastov tanin (AM) z visoko stopnjo ožganosti (HT), ki omogoča pridelavo odličnih in elegantih vin, saj prispeva k učinkoviti stabilizaciji barvil pri rdečih vinih, hkrati pa podaljšuje in povečuje odpornost proti oksidaciji vin. Pri belih vinih se uporablja v času fermentacije z namenom izboljšanja bistrenja in stabilizacije proteinov (beljakovin) v vinu. Omenjeni tanin ne preprečuje oksidacije, vendar vinu omogoča večjo trajnost in odpornost v daljšem časovnem obdobju.

Iz slike 6 je razvidno, da začetek alkoholne fermentacije v vseh treh vzorcih sovpada z začetkom fermentacije v kontrolnem vzorcu. S spremljanjem poteka alkoholne fermentacije smo v prvi trojici potrdili pozitiven vpliv dodatka trsk iz hrastovega lesa tekom celotnega trajanja alkoholne fermentacije, saj je bila količina oddanega CO_2 v primerjavi s kontrolnim vzorcem očitno večja.



Slika 7: Kinetika alkoholne fermentacije vzorcev 1, 2, 3 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Slika 7 prikazuje kinetiko oddanega CO₂ (g/L/h) za vzorce 1, 2 in 3 v primerjavi s kontrolnim vzorcem, ki nam pokaže, kdaj so vzorci mladega vina posameznih vrelnih steklenic dosegli največje sproščanje CO₂. Razlika v kinetiki oddanega CO₂ je med vzorci 1, 2 in 3 očitna. Vsi vzorci so dosegli največje sproščanje CO₂ po približno 135 urah od pričetka fermentacijskega poskusa. Vzorec z oznako 3 (dodatek trsk iz hrastovega lesa) je dosegel maksimalno sproščanje CO₂ z intenziteto 0,21 g/L/h, vzorca 1 in 2 sta imela bistveno manjše maksimalno sproščanje CO₂ in po pričakovanju kontrola najmanjše maksimalno sproščanje CO₂ in sicer zgolj 0,09 g/L/h.

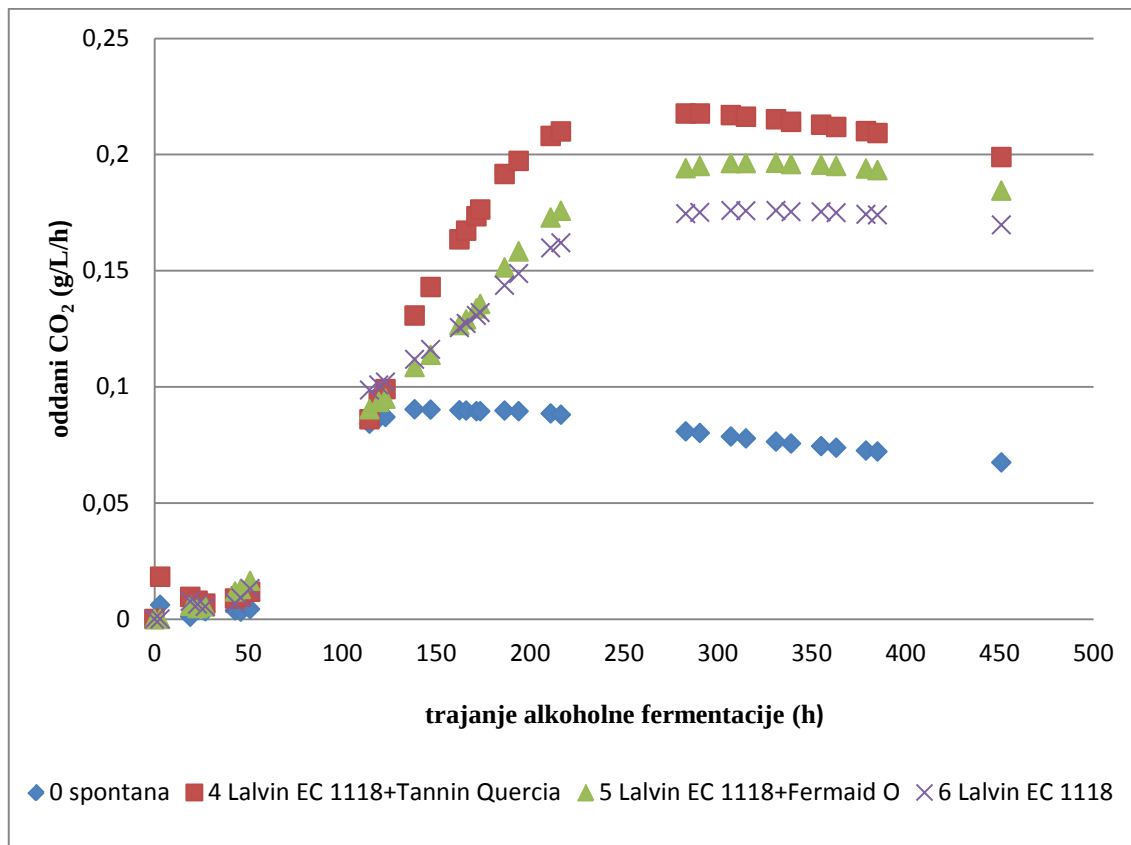


Slika 8: Fermentacijske krivulje vzorcev 4, 5, 6 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Slika 8 prikazuje oddani CO_2 (g/L) med alkoholno fermentacijo za vzorce 4, 5 in 6, iz katere je razvidno, da je začetek alkoholne fermentacije v vseh treh vzorcih sovpada z začetkom fermentacije v kontrolnem vzorcu. Pri teh vzorcih smo uporabili komercialni sev kvasovk Lalvin EC 1118. Gre za kvasovke vrste *Saccharomyces bayanus*, ki ima zelo široko temperaturno območje delovanja (10-30 °C) oz. sposobnosti fermentacije in je zato ena od najširše in najpogostejše uporabljenih kvasovk na svetu. Zanj so značilne naslednje lastnosti: majhna tvorba pene, hlapnih kislin, vodikovega sulfida, visoka odpornost do alkohola in osmotskega tlaka, dobra flokulacijska sposobnost in nevtralen okus. Primerna je za pridelavo vseh vrst vina, tako penečih kot tudi vin poznih trgateg ter jabolčnih vin. Prav tako pa se jo lahko uporabi tudi pri ponovnem zagonu nedokončanih oz. prekinjenih alkoholnih fermentacij (Lallemand, 2012b).

Vzorec 6 je vseboval startersko kulturo omenjenega seva vinskih kvasovk, vzorec 5 startersko kulturo vinskih kvasovk in hranilo Fermaid O, vzorec 4 pa startersko kulturo vinskih kvasovk ter trske iz hrastovega lesa Tannin Quercia AM HT. Fermaid O predstavlja organsko hrano za kvasovke, ki se priporoča pri pridelavi belih, rose in rdečih vin. Hranilo je primerno zlasti za mošte z manjšo ali srednjo stopnjo pomanjkanja asimilativnega dušika. Gre za izredno uravnoteženo hranilo za kvasovke z rahlo asimilativnimi aminokislinami in peptidi, ki zmanjšajo tveganje za pojav bekserja in je naravni vir vitaminov (Lallemand, 2012a).

Tudi v tem primeru smo ugotovili in potrdili pozitiven vpliv dodanih hrastovih trsk in hranila za kvasovke tekom celotnega trajanja alkoholne fermentacije, saj je bila količina oddanega CO₂ v vzorcih z omenjenima dodatkom očitno večja kot v primeru kontrolnega vzorca.

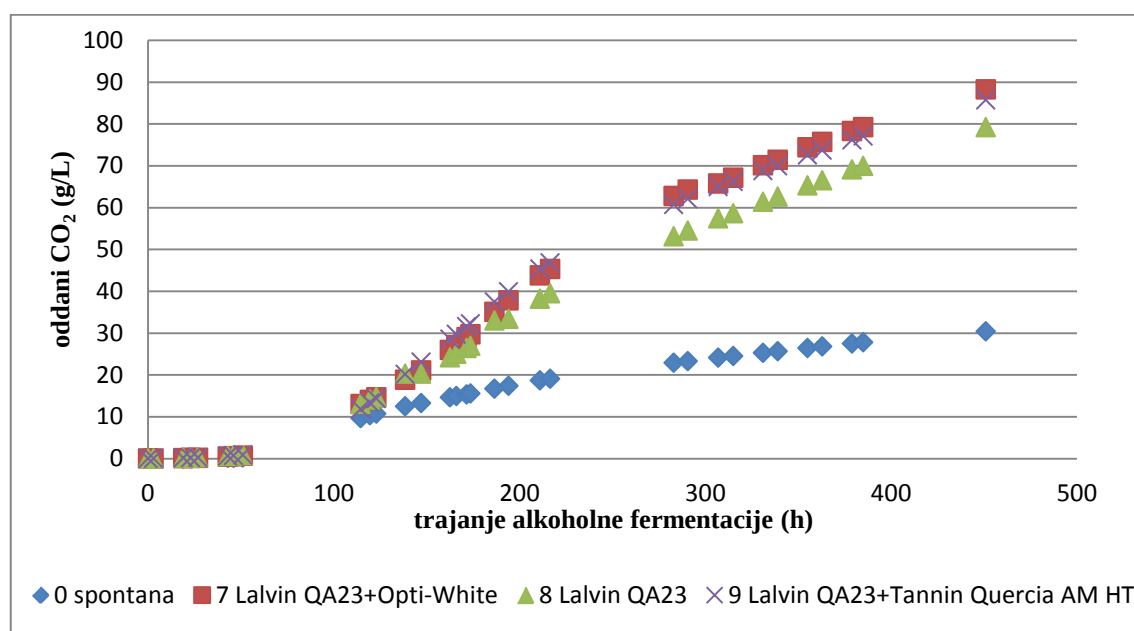


Slika 9: Kinetika alkoholne fermentacije vzorcev 4, 5, 6 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

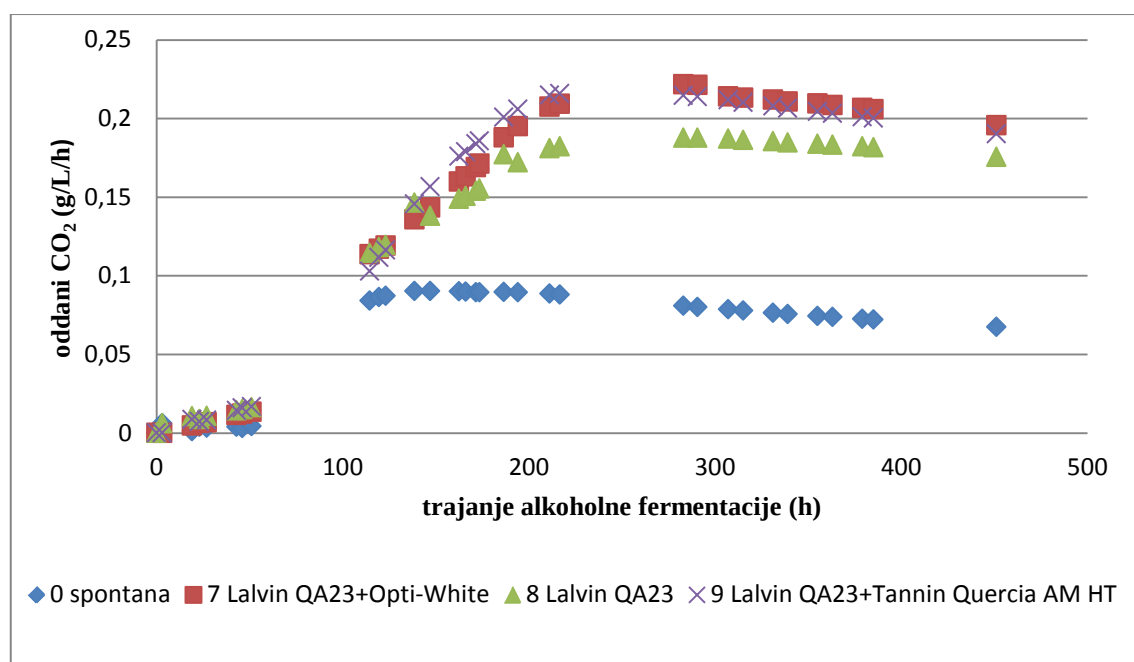
Slika 9 nam prikaže očitno razliko med vzorci 4, 5 in 6 v kinetiki alkoholne fermentacije. Tako kot pri vzorcih 1, 2 in 3, kjer je bila uporabljena starterska kultura Fermicru 4F9, je tudi v primeru starterske kulture Lalvin EC 1118 kinetika največja pri dodatku hrastovih trsk, sledi ji pa vzorec z dodatkom hranila za kvasovke.

Kinetika oddanega CO₂ vzorcev 4, 5 in 6 se od kontrolnega vzorca razlikuje. Iz slike je razvidno, da je kontrolni vzorec dosegel bistveno manjšo največjo količino sproščenega CO₂ in to v relativno krajšem času. Največjo intenziteta sproščanja CO₂ kontrolnega vzorca znaša približno 0,09 g/L/h, le-to pa je kontrolni vzorec dosegel po 189 urah, medtem ko je največja intenziteta sproščanja CO₂ preostalih vzorcev bistveno večja (0,22, 0,196 in 0,176 g/L/h).

V primeru dodatka hrastovih trsk je značilen bolj enakomeren potek alkoholne fermentacije zaradi enakomernejše porazdelitve kvasovk po celotni fermentirajoči prostornini, saj le-te odigrajo vlogo t.i. povečanja notranje prostornine (Košmerl, 2013).



Slika 10: Fermentacijske krivulje vzorcev 7, 8, 9 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

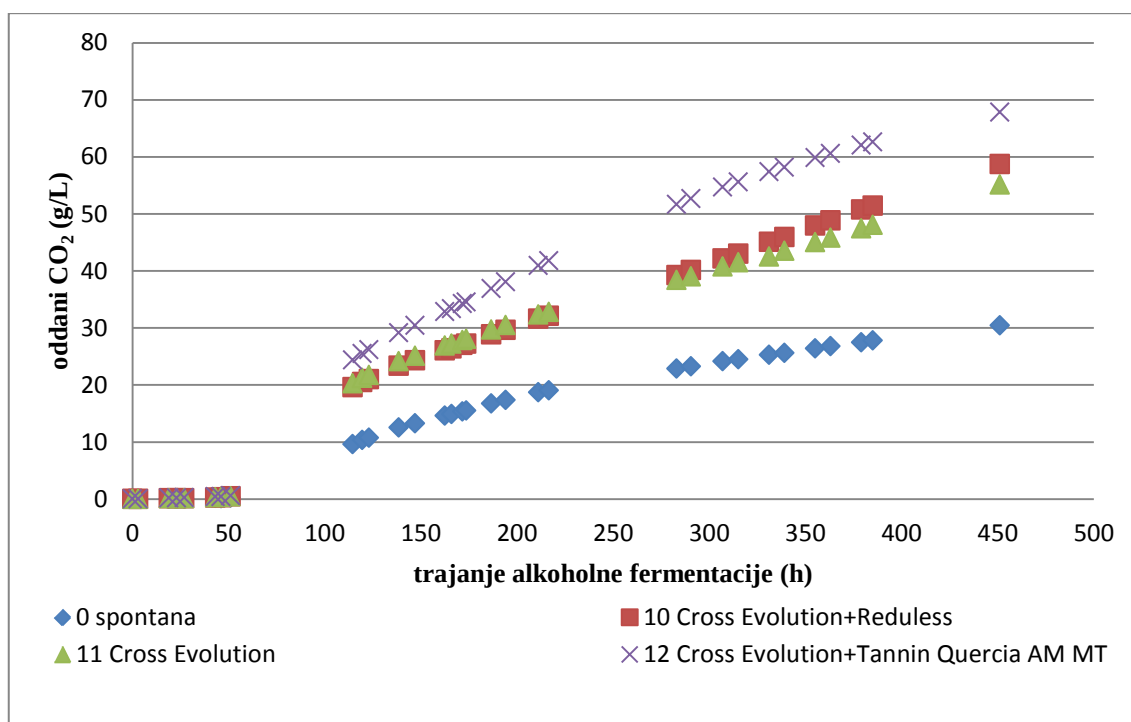


Slika 11: Kinetika alkoholne fermentacije vzorcev 7, 8, 9 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

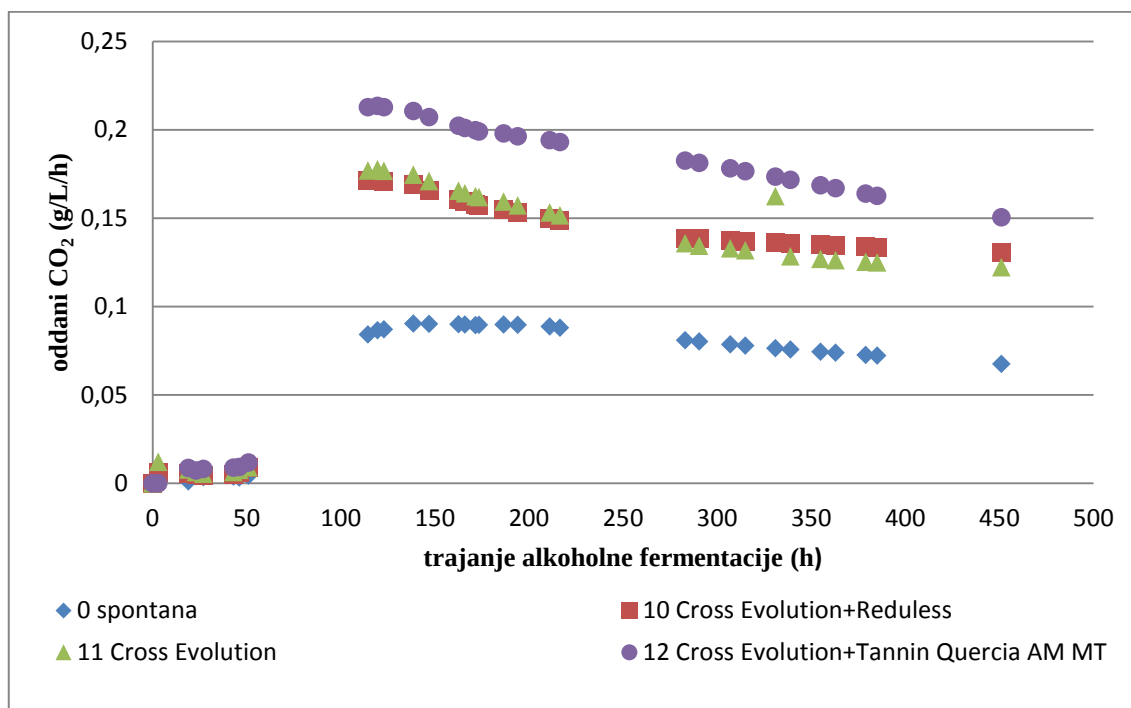
Sliki 10 in 11 nam prikazujeta, da lahko tudi na primeru vzorcev 7, 8, 9, kjer smo kot startersko kulturo uporabili Lalvin QA23, potrdimo pozitiven vpliv dodanih trsk iz hrastovega lesa (vzorec 9) in dodanega hranila (vzorec 7) na potek alkoholne fermentacije, saj je količina oddanega CO_2 v primeru obeh dodatkov očitno večja v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Vzorec 8 je vseboval startersko kulturo komercialnega seva kvasovk Lalvin QA23, kjer gre za kvasovko vrste *Saccharomyces cerevisiae bayanus*, ki je bila selekcionirana na inštitutu UTAD na Portugalskem. Je ena

izmed najbolj znanih kvasovk za bela vina, ki daje izredno sadna in odprta sveža vina, saj je zelo zanesljiva in nezahtevna za hranila. Običajno vre pri nizkih temperaturah in je odporna do 16 vol.% alkohola. V praksi se jo lahko uporablja za vse bele sorte grozdja. Vzorec 7 je vseboval omenjeno startersko kulturo vinskih kvasovk in hranilo Opti-White, vzorec 9 pa startersko kulturo vinskih kvasovk ter trske iz hrastovega lesa Tannin Quercia AM HT. Hranilo Opti-White je kompleksnejše hranilo za kvasovke, ki se dodaja direktno v mošt po bistrenju ali ob začetku fermentacije, saj poveča zaokroženost in aromatski potencial belih vin ter preprečuje oksidacijo fenolnih spojin, predstavlja pa tudi biološko hranilo za kvasovke in oskrbuje mošt z aminokislinami, vitamini in minerali, vendar sam ne more nadomestiti običajne hrane za preživetje kvasnih celic. Dodatek hranila v mošt preprečuje motnje v barvi nastalega vina in zavira proces spreminjanja barve k intenzivno rumeni oz. oranžni (Lallemand, 2012a; Lallemand, 2012b).

Prav tako je kinetika alkoholne fermentacije v primeru omenjenih dodatkov večja od vzorca 8. Opazimo pa lahko tudi, da ni bistvene razlike med vzorcema 7 in 9 tako v časovni odvisnosti količine oddanega CO₂, kot tudi ne v kinetiki alkoholne fermentacije.



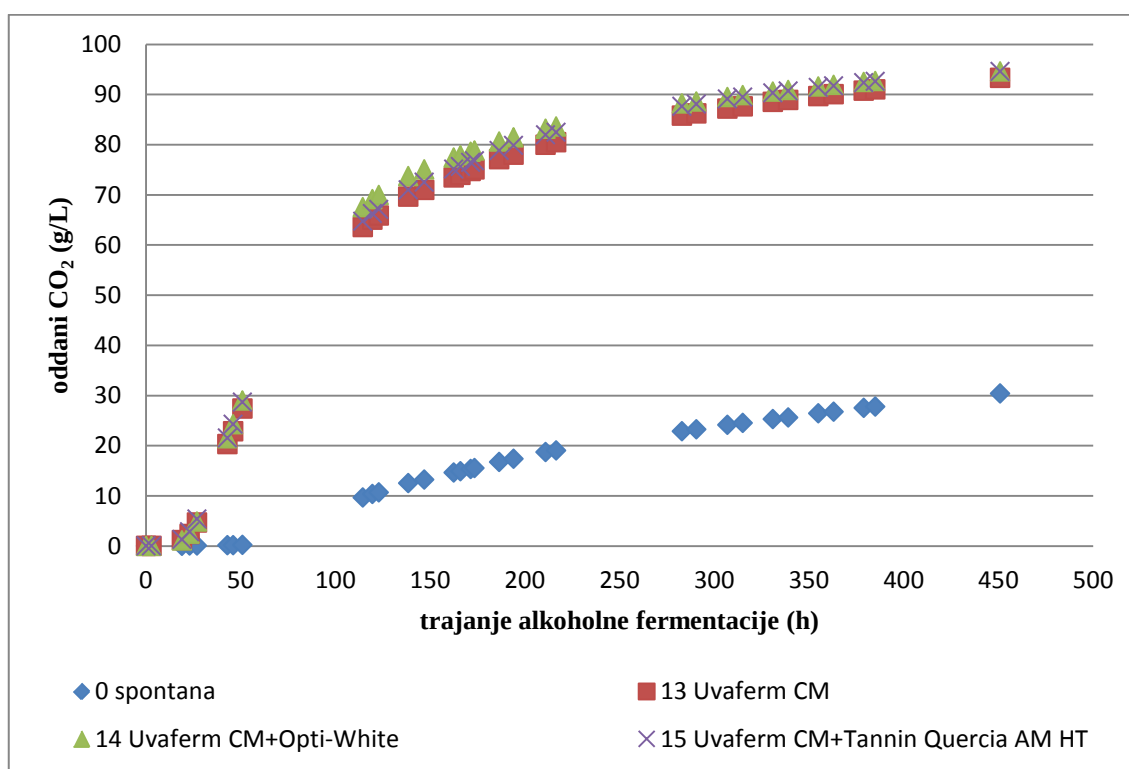
Slika 12: Fermentacijske krivulje vzorcev 10, 11, 12 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.



Slika 13: Kinetika alkoholne fermentacije vzorcev 10, 11, 12 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Iz slik 12 in 13 lahko ponovno potrdimo pozitivni vpliv dodatka hrastovega lesa (vzorec 12) tekom celotnega trajanja alkoholne fermentacije. V vseh fazah fermentacije je bila v vzorcu 12, ki je vseboval dodatek trsk iz ameriškega hrastovega lesa Tannin Quercia AM MT, izrazito večja količina oddanega CO₂ v primerjavi ne samo s kontrolo, pač pa tudi z vzorcem 11, ki je vseboval zgolj dodatek starterske kulture Cross Evolution in vzorcem 10, ki je poleg dodatka starterske kulture vseboval še dodatek hranila Redules. Uporabljeni komercialni sev kvasovke Cross Evolution je hibrid kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae*, selekcioniran na Univerzi v Stellenbosch-u v Republiki Južna Afrika, ki je idealen za pridelavo aromatičnih belih in rose vin z visoko vsebnostjo alkohola (15 vol.%) in nizko temperaturo fermentacije (14 °C). Glede vsebnosti dušika sev ni zahteven in prispeva k uravnoteženi aromatski kakovosti vina. V poskusu uporabljeno hranilo Redules predstavlja hrano za kvasovke in zmanjšuje oz. preprečuje nastanek žveplovih spojin, zato se uporablja zlasti pri pridelavi vin, ki so nagnjena k pojavom bekserja. Je tudi biološka hrana za kvasovke, saj oskrbuje mošt z α -amino kislinami, vitamini ter minerali, ki so potrebni za njihovo preživetje. Navadno se hranilo dodaja moštom, ki so revna s hranili in nagnjena k počasi fermentaciji ali popolnemu zastoju fermentacije. V moštih z dodatkom hranila Redules, je tvorba žveplovih spojin veliko manjša, vsebnost ostalih nezaželenih snovi pa se prav tako bistveno zmanjša, saj se le-te vežejo na preparat in se nato se z usedlino izločijo iz mošta oz. vina (Lallemant, 2012a; Lallemant 2012b).

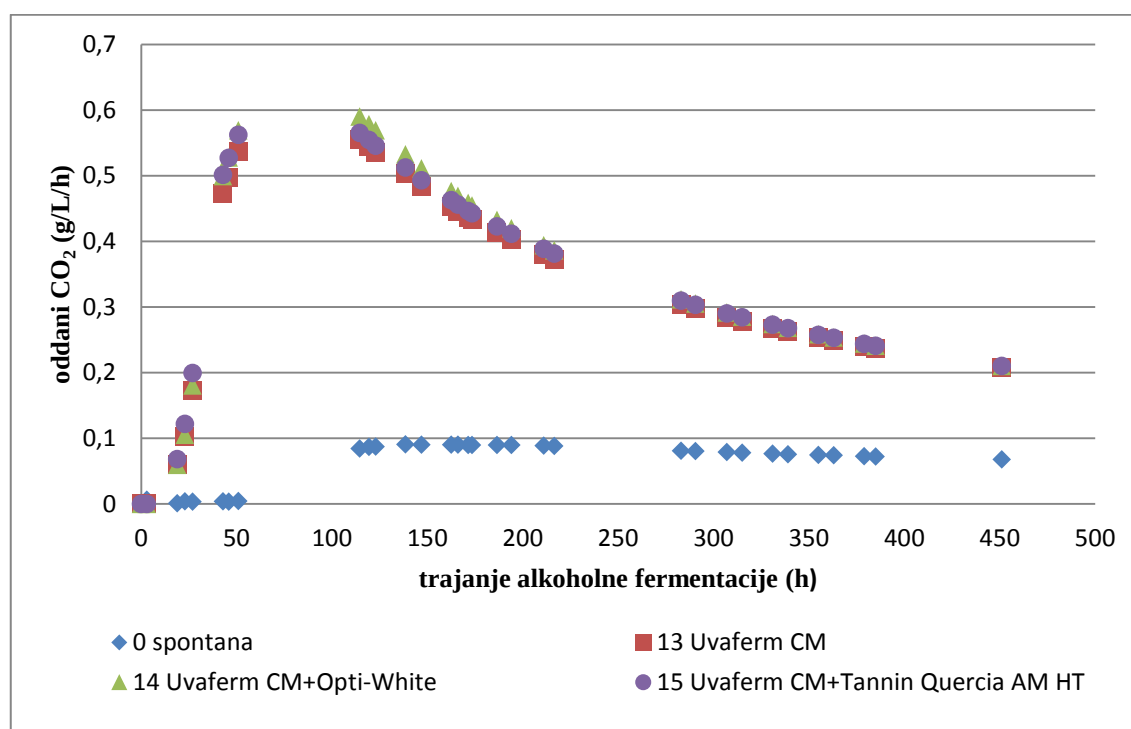
Je pa zanimivo in iz slike 12 lepo razvidno, da v prvih 50-ih urah fermentacijskega poskusa med vzorcema 10 in 11 ni opaziti razlike v količini oddanega CO₂ kot tudi ne v kinetiki fermentacije (slika 13).



Slika 14: Fermentacijske krivulje vzorcev 13, 14, 15 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

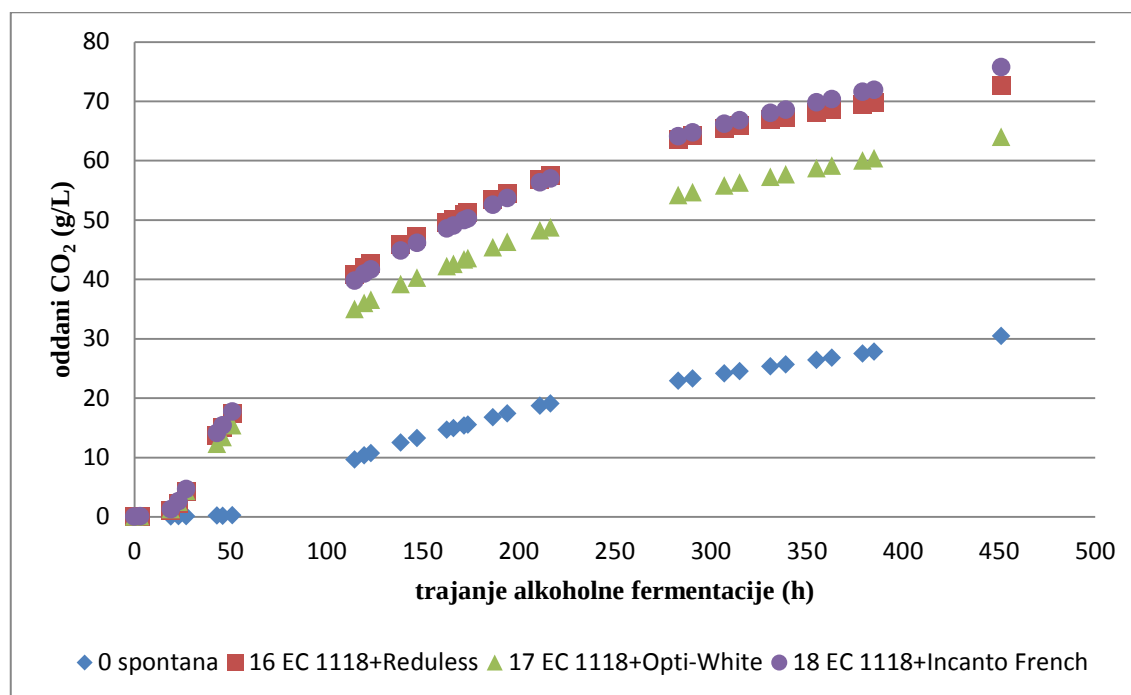
Slika 14 prikazuje časovno odvisnost količine oddanega CO_2 (g/L) med alkoholno fermentacijo pri vzorcih 13, 14 in 15, kjer smo uporabili komercialni sev kvasovk Uvaferm CM. Gre za komercialno selekcionirano kvasovko vrste *Saccharomyces cerevisiae cerevisiae*, ki je bila zaradi svoje enakomerne hitrosti fermentacije in kratke lag faze, ena izmed prvih komercialnih kvasovk, ki so bile v uporabi v aktivni suhi obliki. Vzorec 13 je vseboval startersko kulturo omenjenega seva vinskih kvasovk, vzorec 14 startersko kulturo in vinskih kvasovk in hranilo Opti-White, vzorec 15 pa startersko kulturo vinskih kvasovk ter trske iz hrastovega lesa Tannin Quercia AM HT (Lallemand, 2012b).

Tudi v tem primeru nam rezultati potrjujejo bistveno večjo količino oddanega CO_2 med alkoholno fermentacijo v primerjavi s kontrolo. Opazimo, da med vzorci 13, 14 in 15 ni bistvene razlike v količini oddanega CO_2 tekom celotnega fermentacijskega poskusa. Prav tako lahko opazimo, da ima kontrola nekoliko daljšo fazo prilagajanja, torej kasnejši začetek fermentacije. V tem primeru ni bilo nikakršnega dodatka, gre torej za spontano fermentacijo avtohtonih kvasovk.



Slika 15: Kinetika alkoholne fermentacije vzorcev 13, 14, 15 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Hitrost oddajanja CO₂ (g/L/h) vzorcev 13, 14 in 15 je bistveno večja v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Iz slike 15 je lepo razvidna veliko daljša faza prilagajanja avtohtone kvasne populacije v kontrolnem vzorcu in tudi precej nižja največja hitrost sproščanja CO₂ (0,089 g/L/h). Za vzorce 13, 14 in 15 je razvidna podobna vrednost za maksimalno sproščanje CO₂.

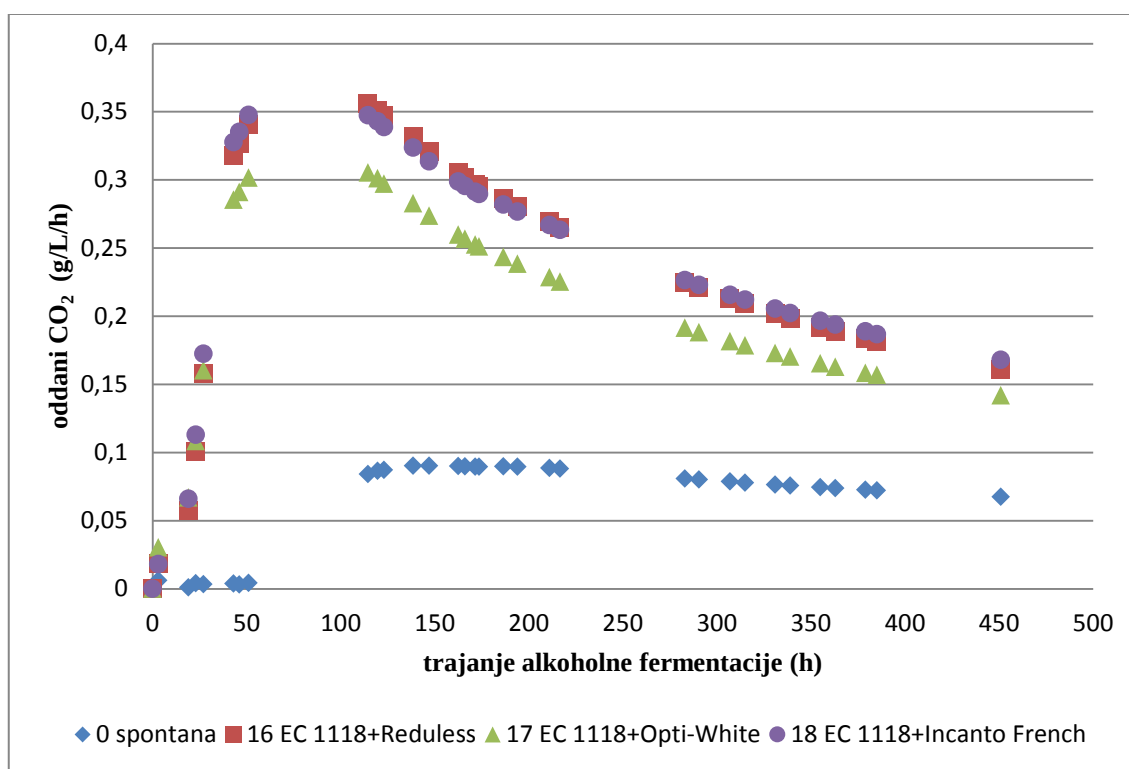


Slika 16: Fermentacijske krivulje vzorcev 16, 17, 18 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Slika 16 prikazuje časovno odvisnost količine oddanega CO₂ za trojico vzorcev (16, 17 in 18) v primerjavi s kontrolo. Pri raziskavi, ki smo jo opravili z omenjenimi vzorci, smo želeli podati primerjavo med dvema vrstama hranil, Reduless (vzorec 16) in Opti-White (vzorec 17), ob dodatku starterske kulture Lalvin EC 1118. Vzorec 18 je poleg dodatka omenjene starterske kulture vseboval dodatek srednje ožganih trsk iz francoskega hrastovega lesa, Incanto French, ki oddajajo arome sladkobnega sadja, cvetlic in vanilije ter s tem povečujejo aromatičnost, sladkobnost in polnost okusa pridelanega vina.

Rezultati potrjujejo krajši čas prilagajanja in posledično bistveno hitrejši začetek fermentacije ter intenzivnejše sproščanje CO₂ vzorcev z dodatki (komercialne kvasovke + hranila zanje, komercialne kvasovke + trske iz hrastovega lesa) v primerjavi z vzorcem kontrole (spontana fermentacija).

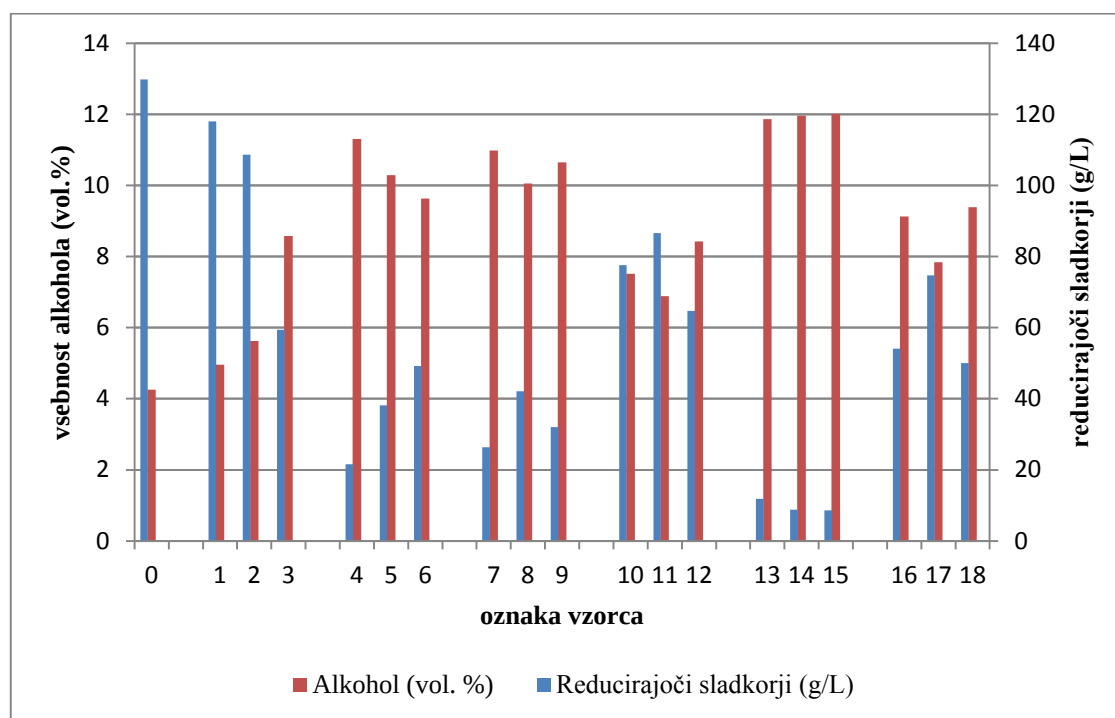
Pri pridelavi vina je zaželeno, da je faza prilagajanja kvasovk oziroma t.i. lag faza čim krajša, saj kratka faza prilagajanja pomeni hitrejši začetek fermentacije. Najpočasnejša je fermentacija v kontrolnem vzorcu, kar je bilo tudi pričakovano (začetek je šele po približno 46 h), vendar nam že dejstvo, da proces alkoholne fermentacije steče, pove, da mošt vsebuje naravno prisotno mikrofloro s kvasovkami, ki vršijo fermentacijo.



Slika 17: Kinetika alkoholne fermentacije vzorcev 16, 17, 18 v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

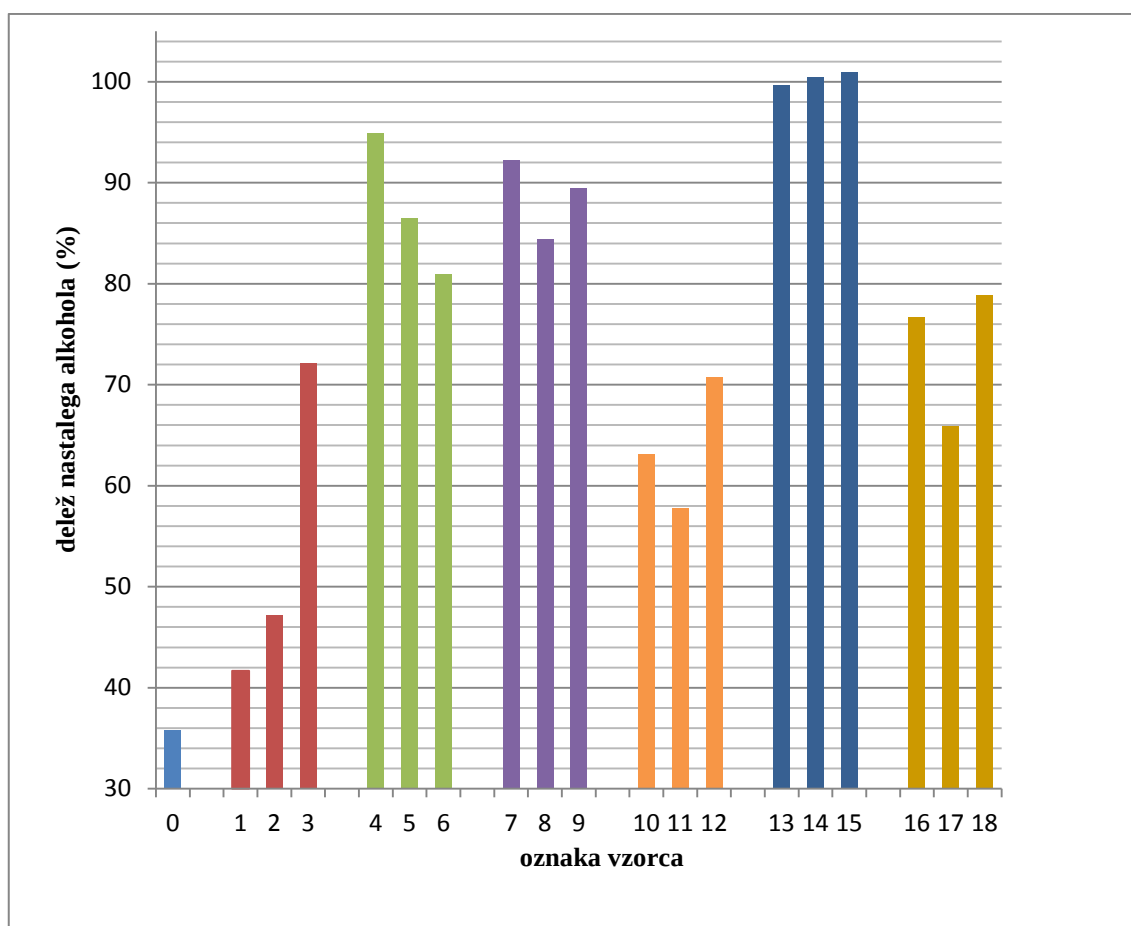
Slika 17 prikazuje hitrost oddajanja CO₂ za zadnjo trojico vzorcev mošta v primerjavi s kontrolnim vzorcem, iz katere je zelo lepo razvidna veliko daljša faza prilagajanja kontrolnega vzorca in zelo kratka faza prilagajanja vzorcev 16, 17 in 18. Za vzorca z oznako 16 in 18 je značilna hitra in intenzivna eksponentna faza rasti, prav tako oba vzorca dosežeta intenziteto maksimalnega sproščanja okoli 0,35 g/L/h.

Pričakovati je bilo, da bo tudi v tem primeru alkoholna fermentacija najhitreje potekla v vzorcu z dodatkom trsk iz hrastovega lesa. V primeru dodatka trsk se kvasovke posedajo na delce, kateri omogočijo enakomernejšo porazdelitev kvasovk in s tem izboljšajo pogoje alkoholne fermentacije. Iz slike 17 je razvidno, da je začetek alkoholne fermentacije pri vseh dodatkih (hranilo Reduless, hranilo Opti-White in dodatek trsk) približno enaki in sicer po 19-ih urah. Krivulji kinetike oddajanja CO₂ za vzorec z dodatkom hranila Reduless in vzorca z dodatkom trsk iz hrastovega lesa skoraj sovpadata, šele po 283 urah se pričneta krivulji nekoliko ločevati (razlika v oddanem



površin grozdnih jagod in vinske kleti, zato lahko le-te izpeljejo spontano alkoholno fermentacijo (Košmerl, 2013). Nezadostna pretvorba sladkorjev v etanol, daljša faza prilagajanja oz. ne ravno hiter začetek fermentacije sta le dve izmed neželenih lastnosti endogene kvasne mikroflore. Ravno omenjenima lastnostnima lahko pripišemo, da je v kontrolnem vzorcu vsebnost reducirajočih sladkorjev največja (129,78 g/L). Daljša faza prilagajanja endogene kvasne populacije v kontrolnem vzorcu je lepo razvidna na prejšnjih slikah magistrske naloge, ki prikazujejo fermentacijsko krivuljo kontrolnega vzorca.

Večjo vsebnost reducirajočih sladkorjev sta vsebovala tudi vzorca 1 in 2 (118,01 g/L; 108,63 g/L) iz česar lahko sklepamo, da alkoholna fermentacija v omenjenih vzorcih še ni potekla do konca. To lahko potrdimo tudi iz krivulje oddanega CO₂ (g/L/h) (slika 7), iz katere lahko razberemo, da so kvasovke v omenjenih vzorcih še v stacionarni fazi oz. na koncu le-te, vendar ne še v fazi odmiranja.

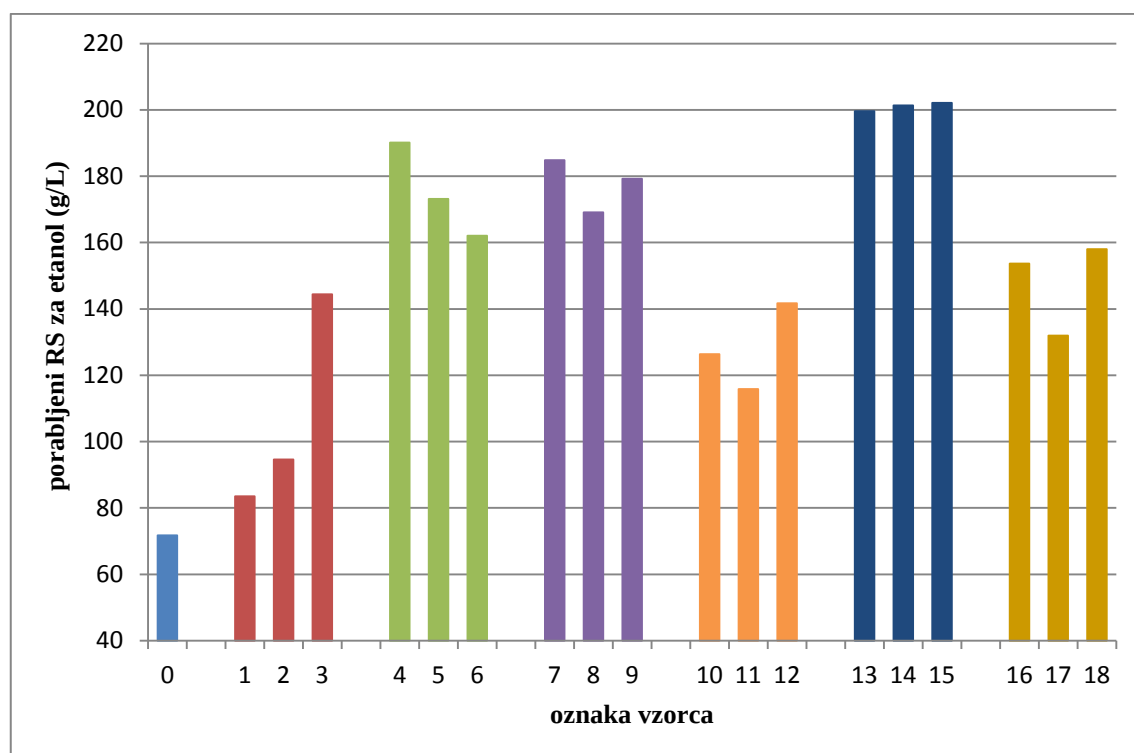


Slika 19: Delež nastalega alkohola (%) v vzorcih mladega vina v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Na sliki 19 so nazorneje prikazane razlike v vsebnosti alkohola, ki je podana kot delež nastalega alkohola. Delež alkohola (%) smo izračunali v skladu z relacijo:

delež nastalega alkohola =

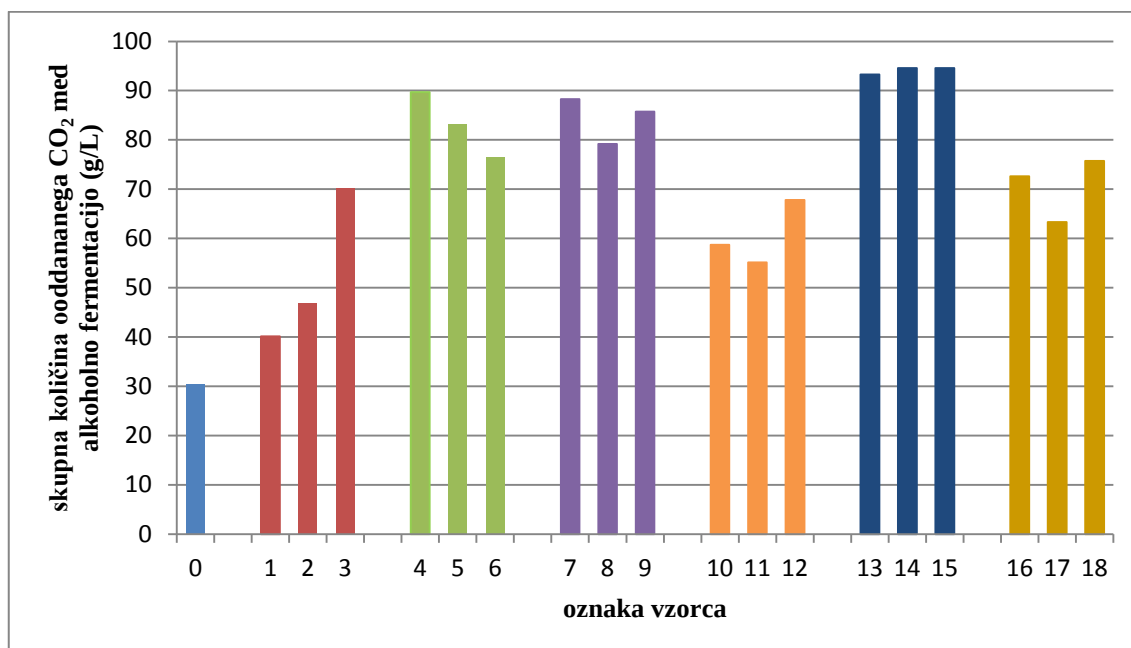
Delež nastalega alkohola po opravljenem poskusu je v vseh vzorcih očitno večji v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Vsi vzorci (brez kontrolnega) so imeli dodano komercialno startersko kulturo, katere fermentacijske lastnosti so: hiter začetek fermentacije, visoka učinkovitost, večja odpornost na alkohol (Košmerl, 2013) in katerim gre pripisati vzrok za večji delež nastalega alkohola. Zanimivo in iz slike 19 lepo razvidno za posamezne trojice vzorcev je tudi, da so vzorci z dodatkom trsk iz hrastovega lesa imeli največji delež nastalega alkohola. Do podobnega zaključka so prišli tudi Košmerl in sod. (2012) v raziskavi, kjer so izpostavili predvsem enakomernejši in hitrejši potek alkoholne fermentacije v primeru dodatka trsk v mošt.



Slika 20: Porabljeni reducirajoči sladkorji za nastali etanol (g/L) v vzorcih mladega vina v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Zgornja slika prikazuje porabljeni RS za etanol, ki smo ga izračunali s spodnjo relacijo:

porabljeni RS za etanol =



Slika 21: Oddani CO₂ med alkoholne fermentacijo (g/L) v vzorcih mladega vina v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Iz slik 6, 8, 10, 12, 14 in 16 lahko določimo količino sproščenega CO₂ v (g/L) v posameznih vzorcih mladega vina po tem, ko se je proces fermentacije zaključil. Kot je bilo pričakovano, se količina oddanega CO₂ s časom večja, razlike v količini oddanega CO₂ pa nam podajajo prikaz učinkovitosti delovanja kvasovk v kombinaciji z dodatki.

Slika 21 prikazuje oddani CO₂ (g/L) med alkoholno fermentacijo, ki smo ga določili po 450 urah fermentacije za vse vzorce pridelanega mladega vina in kontrolni vzorec. Rezultati potrjujejo bistveno hitrejši začetek alkoholne fermentacije in posledično večjo skupno količino oddanega CO₂ v primeru posameznih dodatkov.

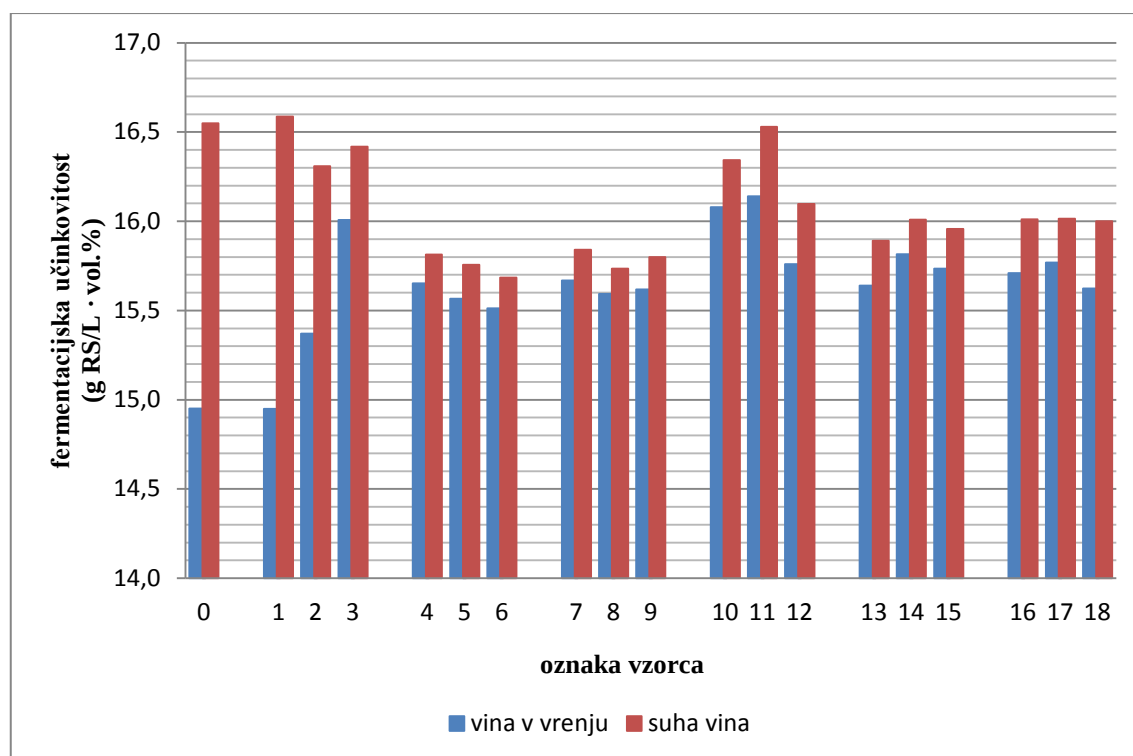
Pričakovano je bilo, da bo v vzorcu z dodatkom trsk iz hrastovega lesa fermentacija potekla najhitreje, količina oddanega CO₂ pa bo v primerjavi s kontrolnim vzorcem večja. Dodatek hrastovih trsk omogoča kvasnim celicam, da se posedajo na dodane trske oz. čipse in s tem omogočijo boljšo razporeditev kvasovk v vinu, posledično pa boljše pogoje delovanja. S spremljanem poteka alkohole fermentacije smo pozitiven vpliv dodanih trsk iz hrastovega lesa tekom celotnega trajanja 18 dni tudi potrdili, saj je bila v vseh fazah večja količina oddanega CO₂ v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

O pozitivni korelaciji med potekom alkoholne fermentacije in dodatkom trsk iz hrastovega lesa pišejo tudi Košmerl in sod. (2012b), ki pravijo, da je dodatek trsk v mošt vplival na fermentacijske značilnosti mladih vin sorte rebula. Izpostavljajo, da dodatek trsk iz hrastovega lesa pripomore predvsem k enakomernejšemu in hitrejšemu poteku alkoholne fermentacije, pri čemer je največja razlika na sredini alkoholne fermentacije (Košmerl in sod., 2012b). Pozitiven vpliv smo z našim poskusom tudi potrdili v vseh štirih skupinah trojic vzorcev mošta sauvignon.

4.2.1.1 Fermentacijska učinkovitost

Pri računanju fermentacijske učinkovitosti (FU) smo uporabili podatke o sladkorni stopnji mošta, ki smo jih pridobili iz korelacijske tabele med gostoto mošta, relativno gostoto in sladkorno stopnjo mošta, % saharoze in alkoholom v vinu. Za izračun fermentacijske učinkovitosti smo potrebovali tudi podatke o vsebnosti alkohola in masni koncentraciji reducirajočih sladkorjev.

Formula za izračun fermentacijske učinkovitosti se glasi:



tako. Največjo fermentacijsko učinkovitost ima vzorec z oznako 1, ki pa ima najnižjo vrednost alkohola in največjo vsebnost reducirajočih sladkorjev. Iz tega lahko sklepamo, da so rezultati WineScan analize po programu vina v vrenju realnejši v primerjavi z rezultati programa suha vina. V tem primeru (program vina v vrenju) ima vzorec 1 najmanjšo FU, ki je primerljiva s kontrolnim vzorcem, kar smo tudi pričakovali.

Čeprav razlike v FU niso velike, bi lahko bil vzrok za takšne rezultate neprimerna izbrana kvasovka ali hranilo oz. kombinacija obojega. Ne glede na rezultate, smo pričakovali, da bo fermentacijska učinkovitost boljša pri vzorcih z dodatkom trsk iz hrastovega lesa, kar pa v našem primeru ne drži. To lahko pripišemo velikemu ostanku reducirajočih sladkorjev v nekaterih vzorcih oziroma tudi dejstvu, da se je verjetno del reducirajočih sladkorjev porabil za tvorbo metabolitov, ne le etanola.

4.2.2 Skupne fenolne spojine

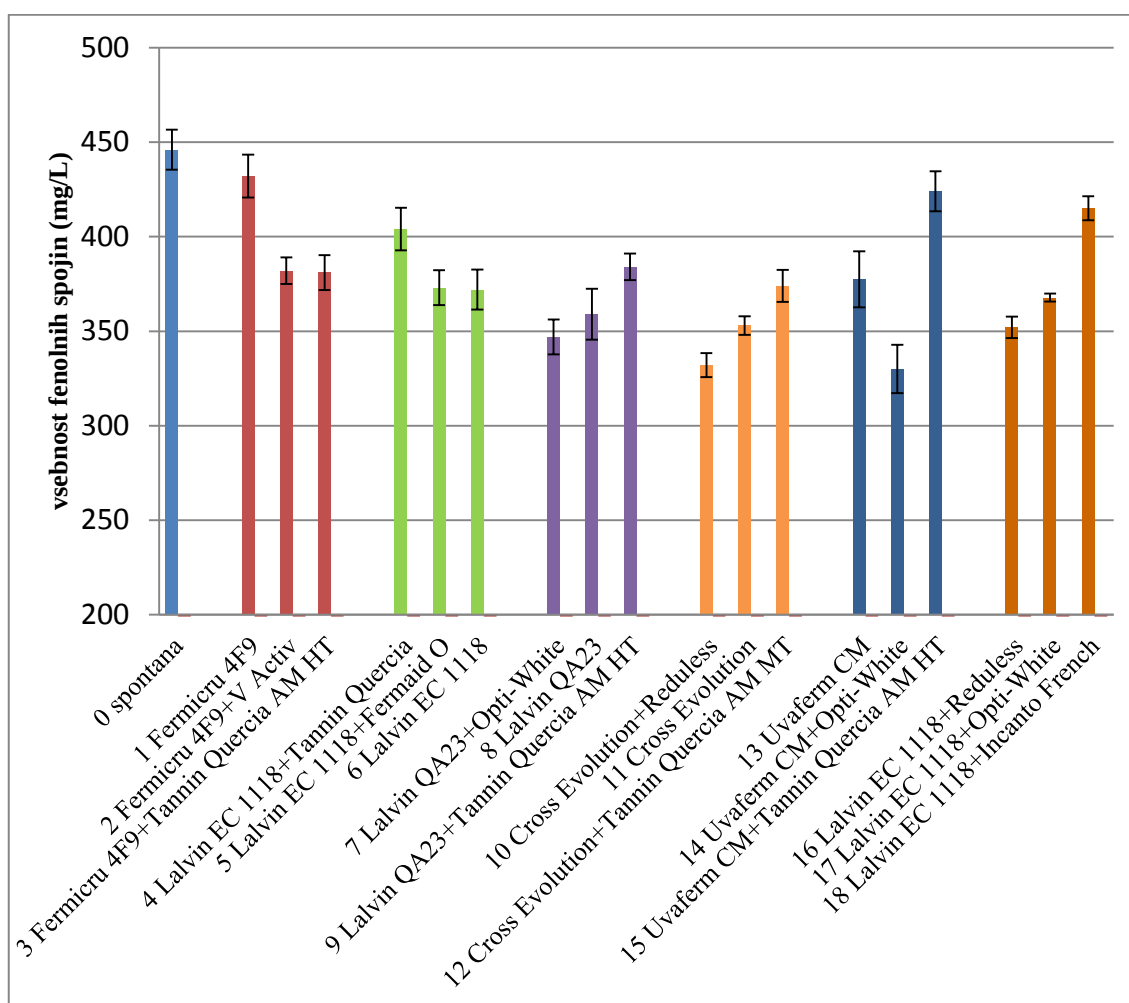
Fenolne spojine v vinu so bodisi relativno enostavne fenolne spojine, ki izvirajo iz grozdja, kot tudi kompleksne fenolne spojine (tanini), ki se ekstrahirajo iz lesene vinske posode med procesom zorenja vina. Določanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin je spektrofotometrična metoda. Fenolne spojine absorbirajo predvsem svetlobo UV spektra in vidnega spektra, zaradi česar lahko odčitano vrednost absorbance pri valovni dolžini 765 nm uporabimo za oceno koncentracije skupnih fenolov (Košmerl in Kač, 2009).

Fenolne spojine igrajo pomembno vlogo v enologiji, saj prispevajo k barvi ter vplivajo na vonj in okus pridelanega vina. So tudi osnova za staranje vina, delujejo kot antioksidanti ter imajo pozitivne zdravstvene učinke, kajti antioksidativne in bakteriocidne lastnosti fenolnih spojin varujejo potrošnike pred boleznimi srca in ožilja. Za razliko od večine fizikalno-kemijskih prametrov mošta oz. vina vsebnost fenolnih spojin v vinu zakonsko ni omejena (Bavčar, 2006; Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

Koncentracija skupnih fenolnih spojin je odvisna od številnih dejavnikov, izmed katerih naj omenim slednje: čas kontakta grozdnega soka s kožicami in pečkami, koncentracija etanola, temperatura fermentacije, mešanje soka in kožic pri maceraciji, intenzivnost stiskanja, sorta vinske trte idr. (Košmerl in Kač, 2009).

Klasično pridelana bela vina vsebujejo 100-400 mg polifenolov/L vina, od katerih je večina neflavonidov (flavonoidov je le okrog 20-40 mg/L).

Po končani alkoholni fermentaciji smo določali vsebnost skupnih fenolnih spojin v pridelanem mladem vinu. Povprečne vrednosti za posamezne vzorce vina, pridelanega z različnimi dodatki, in standardni odmik, so prikazane na sliki 23.



Slika 23: Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg/L) po zaključeni fermentaciji v vzorcih pridelanega mladega vina z različnimi dodatki v primerjavi s kontrolo (spontana fermentacija, oznaka 0).

Na sliki 23 je razvidno, da je vsebnost fenolnih spojin poleg številnih zgoraj naštetih dejavnikov odvisna tudi od različnih dodatkov v mošt, v našem primeru dodatka hranila za kvasovke in trsk iz hrastovega lesa (vir taninov).

Največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin sta imela kontrolni vzorec (oznaka 0), kjer je potekala spontana alkoholna fermentacija in vzorec z dodatkom komercialnega seva kvasovk Fermicru 4F9 (vzorec 1). Rezultati so tako le delno v skladu s pričakovanju, saj je največja vsebnost skupnih fenolnih spojin v kontrolnem vzorcu (oznaka 0) in ne v vzorcih z dodatkom trsk iz hrastovega lesa, kakor je bilo pričakovano. Po primerjavi rezultatov dobljenih z WCS analizo (Priloga A in Priloga B) in vsebnosti skupnih fenolnih spojin, ki smo jo določili s Folin-Ciocalteu reagentom (Slika 23), lahko zaključimo, da je v kontrolnem vzorcu in vzorcu 1 večja določena vrednost za vsebnost fenolnih spojin najverjetneje zaradi večje vsebnosti oziroma preostanka reducirajočih sladkorjev (v vzorcih 0 in 1 je vsebnost reducirajočih sladkorjev okrog 120 g/L, povprečje preostalih vzorcev pa znaša 48 g/L).

Kot pravi Abramovič (2011), je slabost uporabljene Folin-Ciocalteujeve metode pri določanju skupnih fenolnih spojin ravno to, da omenjeni reagent reagira nespecifično z vsemi fenolnimi –OH skupinami, vključno z aromatskimi aminokislinami ter z drugimi reducirajočimi zvrstmi, kot so askorbinska kislina, reducirajoči sladkorji in organske kisline (Abramovič, 2011), do česar je najverjetneje prišlo tudi v našem primeru.

Z izjemo prve trojice vzorcev (vzorci 1, 2 in 3) lahko naša pričakovanja glede največje vsebnosti skupnih fenolnih spojin v vzorcih mladega vina z dodatkom trsk iz hrastovega lesa potrdimo. Vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih mladega vina z dodatkom trsk iz hrastovega lesa v povprečju znaša 397 mg/L, medtem ko je vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih mladega vina z dodatkom hranila za kvasovke najmanjša in v povprečju znaša 355 mg/L. Zanimivo je, da je vsebnost fenolnih spojin v vzorcih z dodatkom komercialnega seva kvasovk večja kot v vzorcih z dodatkom kvasovk in hranil zanje.

Vpliv dodatka enoloških sredstev na vsebnost fenolnih spojin vina so proučevali tudi Košmerl in sod. (2012b), ki so prišli do enakih ugotovitev in sicer je v tudi omenjeni raziskavi dodatek tanina povečal vsebnost skupnih fenolnih spojin (tako vsebnost taninov, flavonoidov in antocianov).

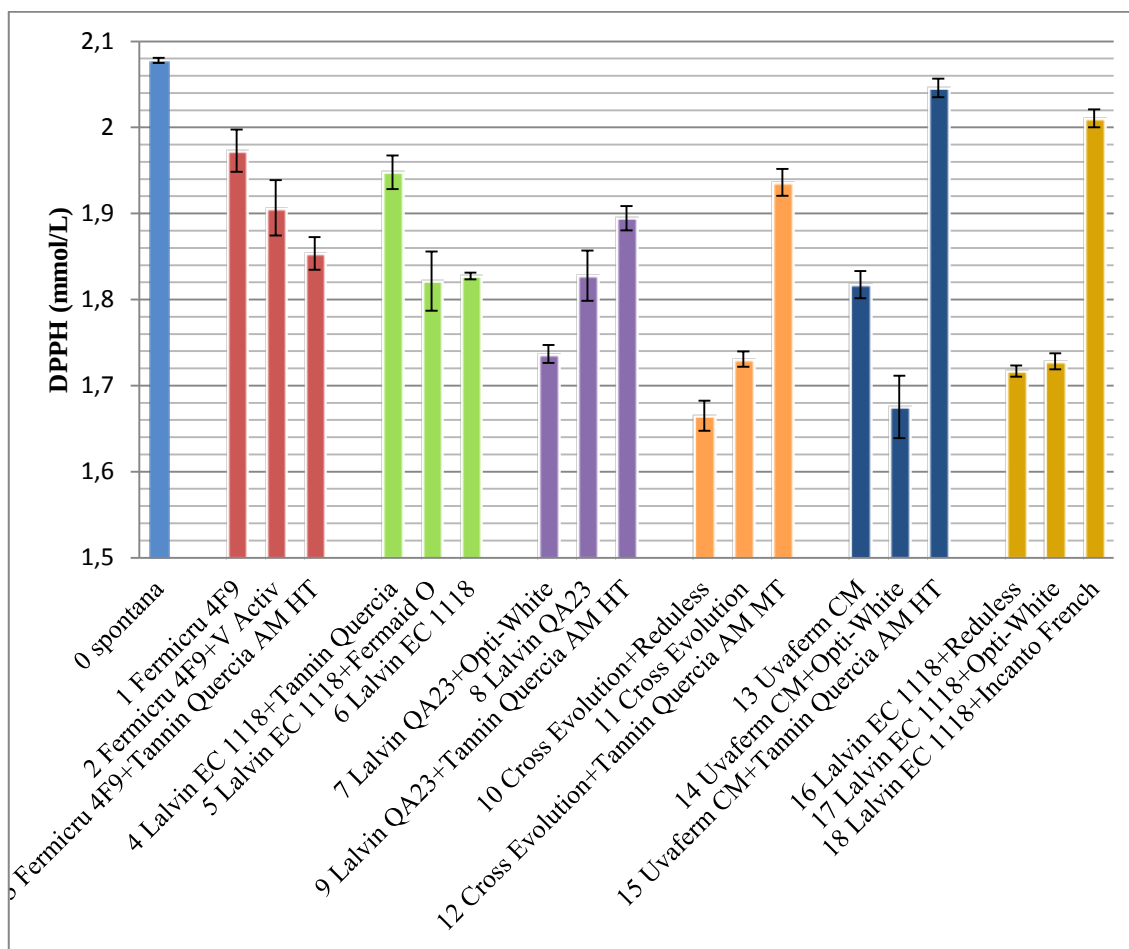
4.2.3 Antioksidativni potencial vina

Za določanje antioksidativne učinkovitosti je poznanih več različnih načinov. V splošnem pa metode razvrstimo v dve skupni in sicer:

- testi, kjer merimo učinek dodanega antioksidanta na napredovanje oksidacije v lipidnem sistemu in
- testi, kjer v modelnem sistemu merimo kako antioksidant učinkuje na izbrano tarčo (radikal, kovinski ion) (Abramovič, 2011).

Ko želimo opisati potencialno antioksidativno učinkovitost neke snovi, uporabimo reaktivne spojine, ki jih lahko pričakujemo v okolju, kjer bi preiskovani antioksidant uporabili (Abramovič, 2011).

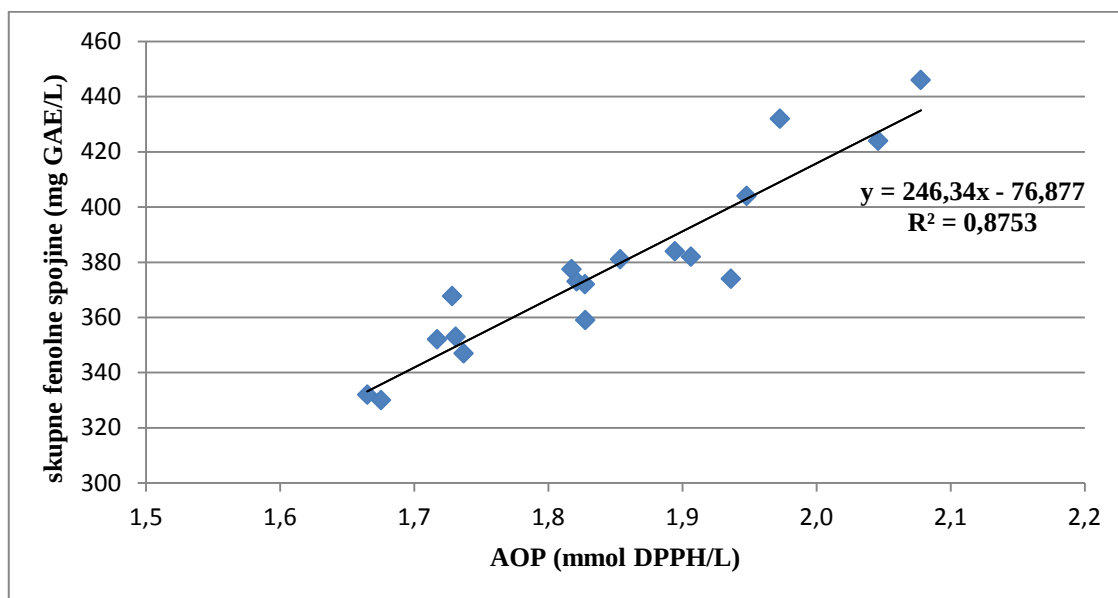
Antioksidativni potencial mladih vin smo določali s spektrofotometrično metodo s prostim radikalom DPPH•. Določitev sposobnosti lovljenja radikala DPPH• je ena izmed starejših metod za določitev antioksidativnega potenciala vzorca oziroma za določitev sposobnosti antioksidantov za lovljenje radikalov. Metoda temelji na meritvah absorbance, ki se spreminja kot posledica spremembe barve iz vijolične v rumeno, ko radikal DPPH• preide v stabilno molekulo DPPH-H zaradi reakcije med stabilnim radikalom DPPH• in antioksidantom, ki je donor vodika (Abramovič, 2011). V primeru vzorca vina so donorji vodika fenolne spojine vina.



Slika 24: Množina ulovljenega prostega radikala DPPH na L vina po zaključeni alkoholni fermentaciji v vzorcih mladih vin z različnimi dodatki v primerjavi s kontrolo (spontana fermentacija, oznaka 0).

Slika 24 nam prikazuje, da je imel največji antioksidativni potencial kontrolni vzorec (vzorec z oznako 0), enega izmed najmanjših pa vzorec 14. Rezultati določanja sposobnosti antioksidanta za lovljenje radikala DPPH• skoraj v celoti sovpadajo z rezultati analize določanja skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteujevo metodo (Slika 23). Vzorec z največjo vsebnostjo fenolnih spojin ima hkrati tudi največji antioksidativni potencial, saj večji delež inhibicije radikala DPPH• pomeni, da je antioksidant bolj učinkovit v lovljenju radikala (Abramovič, 2011).

Z izjemo prve trojice vzorcev (vzorci 1, 2 in 3), lahko tudi tukaj potrdimo naša pričakovanja glede večjega antioksidativnega potenciala vzorcev z dodatkom trsk iz hrastovega lesa.



Slika 25: Korelacija vsebnosti skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L) in AOP (mmol DPPH/L) vzorcev mladega vina.

Zanimalo nas je tudi, ali zveza med antioksidativnim potencialom in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin mladega pridelanega vina sorte sauvignon obstaja in če obstaja, ali je tesna. Slika 25 prikazuje, da korelacija med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in AOP v naših vzorcih mladega vina obstaja in je tesna ($R^2 = 0,875$).

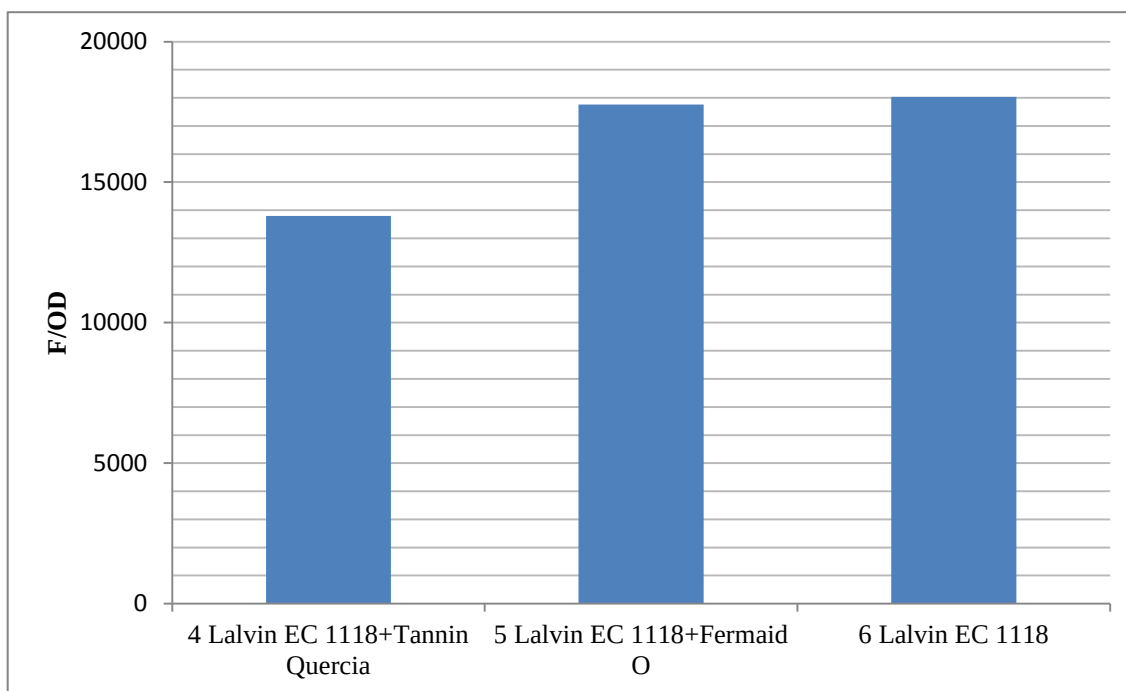
Košmerl in sod. (2012a) so v nedavni raziskavi, kjer so prav tako proučevali zvezo med antioksidativnim potencialom in vsebnostjo posameznih in skupnih fenolnih spojin v vinih sort cabernet sauvignon, refošk in merlot, prišli še do nekoliko bolj tesne korelacije ($R^2 = 0,95$). Dodajajo pa tudi, da gre nekoliko nižje vrednosti antioksidativnega potenciala, ki jih določimo z metodo za lovljenje radikala DPPH• v primerjavi z vrednostmi, ki jih določimo z FC metodo, pripisati sestavi fenolnih spojin vina. Delno oksidirani in polimerizirani fenoli, ki so prisotni v vinu, prispevajo k slabšemu odgovoru v primeru metode z DPPH• radikalom.

4.2.4 Antioksidativni potencial droži

Za celice kvasovk je značilno omejeno število podvojevanj v smislu procesa reprodukcije skozi njihov življenjski čas, zaradi česar nam le-te predstavljajo zanimiv model za študijske primere, ko proučujemo proces staranja. Na ta način nam omogočajo izvedbo poskusov, ki jih pri višjih evkariontih izvedemo le s težavo. V stacionarni fazi rasti kvasovk pride do prekinitve razmnoževanja in upočasnitve metabolizma le-teh. Celice kvasovk so v takem stanju in brez hranil sposobne preživeti tudi več tednov oz. mesecev (Jakubowski in sod., 2000).

Določanje antioksidativnega potenciala droži smo izvedli po principu metode določanja intracelularne oksidacije celic. Z omenjeno metodo smo želeli dokazati, da imajo kvasne celice, kljub temu, da so v stacionarni fazi rasti in v njih že nekaj časa ne poteka fermentacija, določen antioksidativni potencial.

Poleg antioksidativnega potenciala pridelanega mladega vina, smo določali tudi antioksidativni potencial droži. Na sliki 26 so za trojico vzorcev (vzorci 4, 5 in 6) prikazani histogrami, ki prikazujejo razmerje med fluorescenco in optično gostoto. V teoriji velja, da večja kot je vrednost razmerja, manjši je antioksidativni potencial vzorca oz. pridelanega mladega vina.



Slika 26: Antioksidativni potencial droži v vzorcih 4, 5, 6, izražen kot razmerje med fluorescenco in optično gostoto.

V trojici vzorcev 4, 5 in 6 ima najmanjši antioksidativni potencial vzorec 6, kjer poleg komercialnega seva kvasovk ni bilo posebnega dodatka. Za vzorec 4, kjer smo uprabili hrastove trske Tanin Quercia, je vrednost razmerja $F/OD = 13795$. Manjša vrednost razmerja F/OD pomeni večji antioksidativni potencial vzorca vina in obratno. Tako smo tudi z analizo AOP droži potrdili pozitiven vpliv dodanih trsk iz hrastovega lesa na antioksidativni potencial pridelanega mladega vina. Glede na dobljene rezultate meritve antioksidativnega potenciala droži vzorcu z dodatkom trsk sledi vzorec z dodatkom hranil Fermaid O in sicer z vrednostjo $F/OD = 17767$. Vzorec 6 je vzorec le z dodatkom komercialnega seva kvasovk. Le ta ima najvišjo vrednost F/OD , tj. 18039 in posledično najmanjši antioksidativni potencial. Če rezultate analize antioksidativnega potenciala droži omenjenih vzorcev (4, 5, 6) primerjamo z rezultati analize antioksidativnega potenciala AOP vzorcev mladega vina, ugotovimo, da se le-ti ujemajo.

V preostalih trojicah vzorcev je prišlo do težav pri eksperimentalnem postopku. Te lahko pripišemo naravi preiskovanega vzorca oz. temu, da je od konca fermentacijskega poskusa do začetka meritev antioksidativnega potenciala droži preteklo preveč časa in je zaradi omenjenega prišlo v nekaterih vzorcih do aglomeracije kvasovk zaradi težnje le-teh k tvorbi skupkov. Zaradi omenjenega je lahko prišlo do napak pri nekaterih vzorcih v fazi pipetiranja oz. nanašanja vzorca na mikrotitrsko ploščo.

4.3.1 Senzorično ocenjevanje vina

Senzorična analiza je znanstvena disciplina o merjenju in vrednotenju lastnosti živil s čutili, s katerimi človek zaznava videz, barvo, vonj, okus, temperaturo, bolečino, idr. (Košmerl, 2005). Golob in sodelavci (2006) pa senzorično analizo definirajo kot analiza za opisovanje in ocenjevanje lastnosti živila s človekovimi čuti, ki obsega niz različnih tehnik in načinov. Le-ti omogočajo natančno merjenje človekovega odziva na hrano, minimalizirajo možne stranske učinke ocenjevanega izdelka pa tudi zunanje učinke, ki vplivajo na preskuševalčevo zaznavo (Golob in sod., 2006).

Senzorična ocena je nenadomestljiv dodatek kemijske analize vina, s katero lahko dodatno prepoznamo številne spojine v vinu, njihovih medsebojnih vplivov pa ne moremo določiti (Jug in sod., 2014).

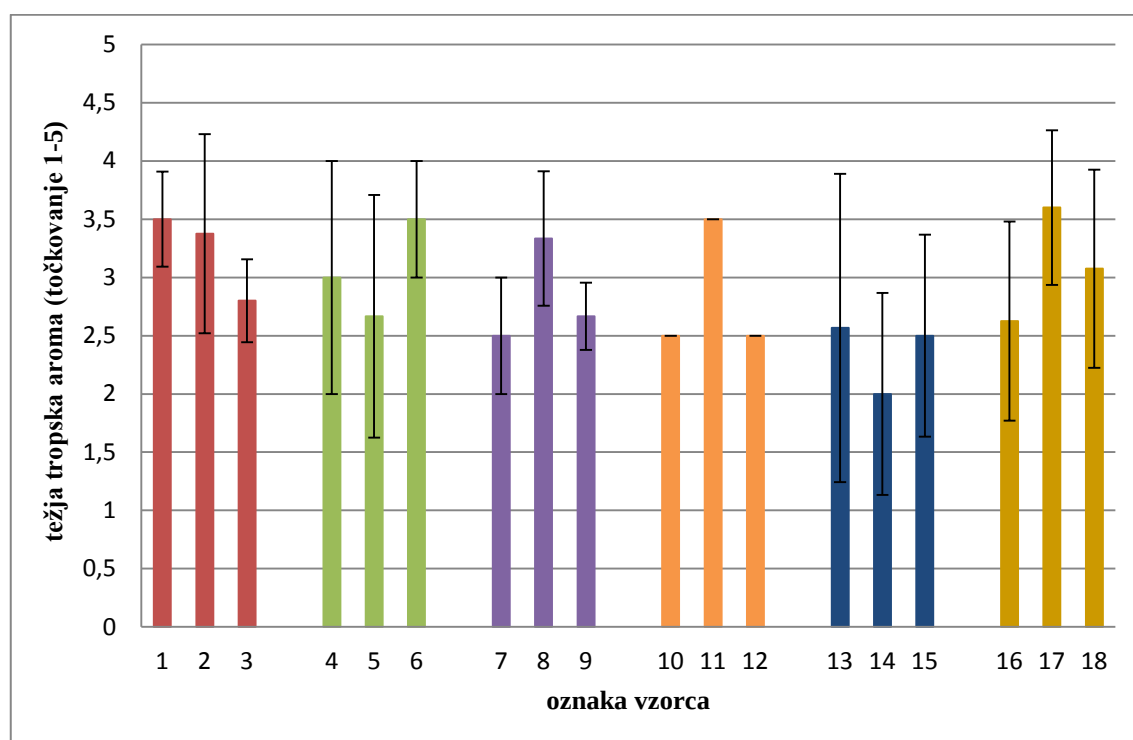
Dandanes je senzorična analiza priznana kot znanstvena disciplina, katere pomen se kljub številnim sodobnim in visoko občutljivim instrumentalnim analiznim metodam kot so plinska in tekočinska kromatografija, infrardeča in vijolična spektroskopija, nuklearna magnetna resonanca itd. , iz dneva v dan povečuje (Golob in sod., 2006).

Za ocenjevanje intenzitete različnih vonjev oz. arom ter celokupne kakovosti (okus + aroma) mladega vina sauvignon smo uporabili deskriptivno senzorično analizo, kjer smo deskriptorje ocenjevali po lestvici od 1 (najmanj) do 5 (najbolj). Nato smo vzorce rangirali oz. razvrstili od prvega do zadnjega mesta.

Kakovostno vino mora imeti poudarjeno sortno aromo. Le-ta ni odvisna od porekla, sorte, stopnje zrelosti in zdravstvenega stanja uporabljenega grozdja, vendar tudi od fermentacijskih in fizioloških lastnosti kvasovk, ki speljejo alkoholno fermentacijo (Wondra, 1998).

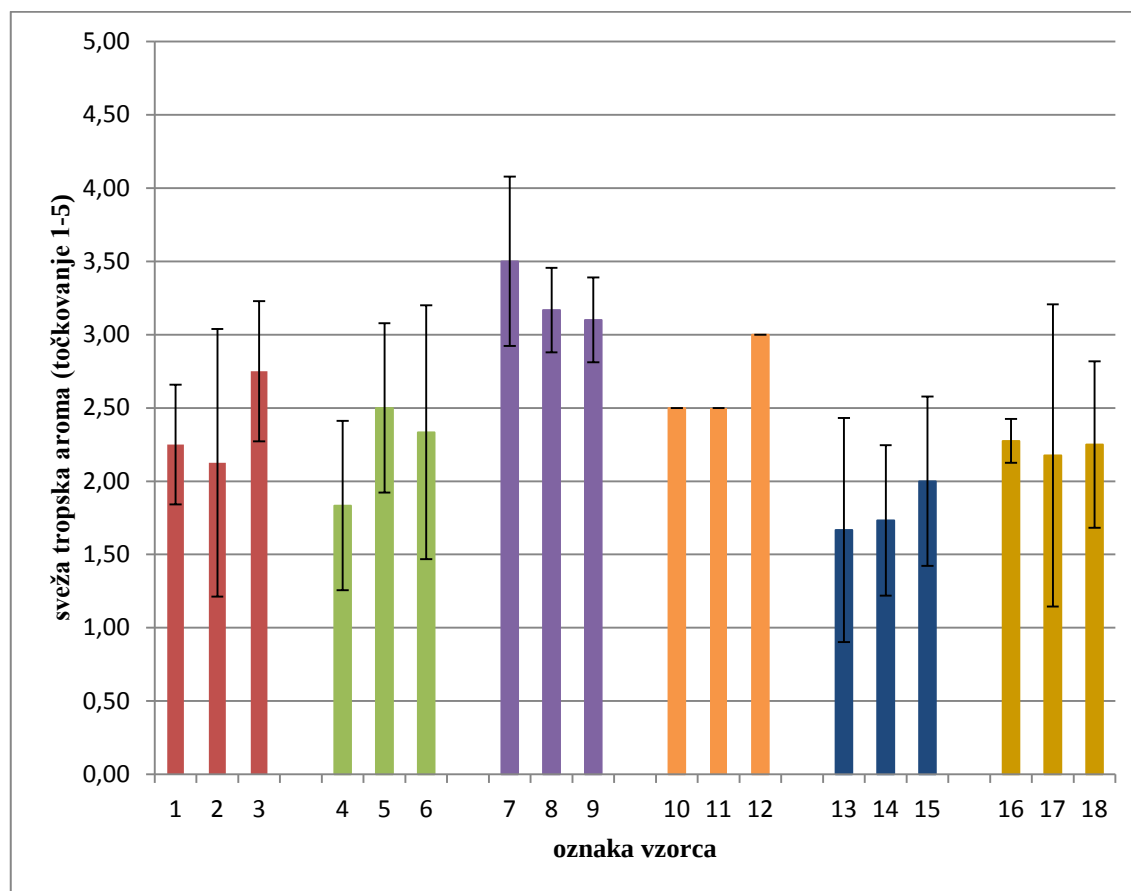
Preglednica 16: Ocenjevalni elementi deskriptivne senzorične analize mladega vina sauvignon (Smolnikar, 2012).

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



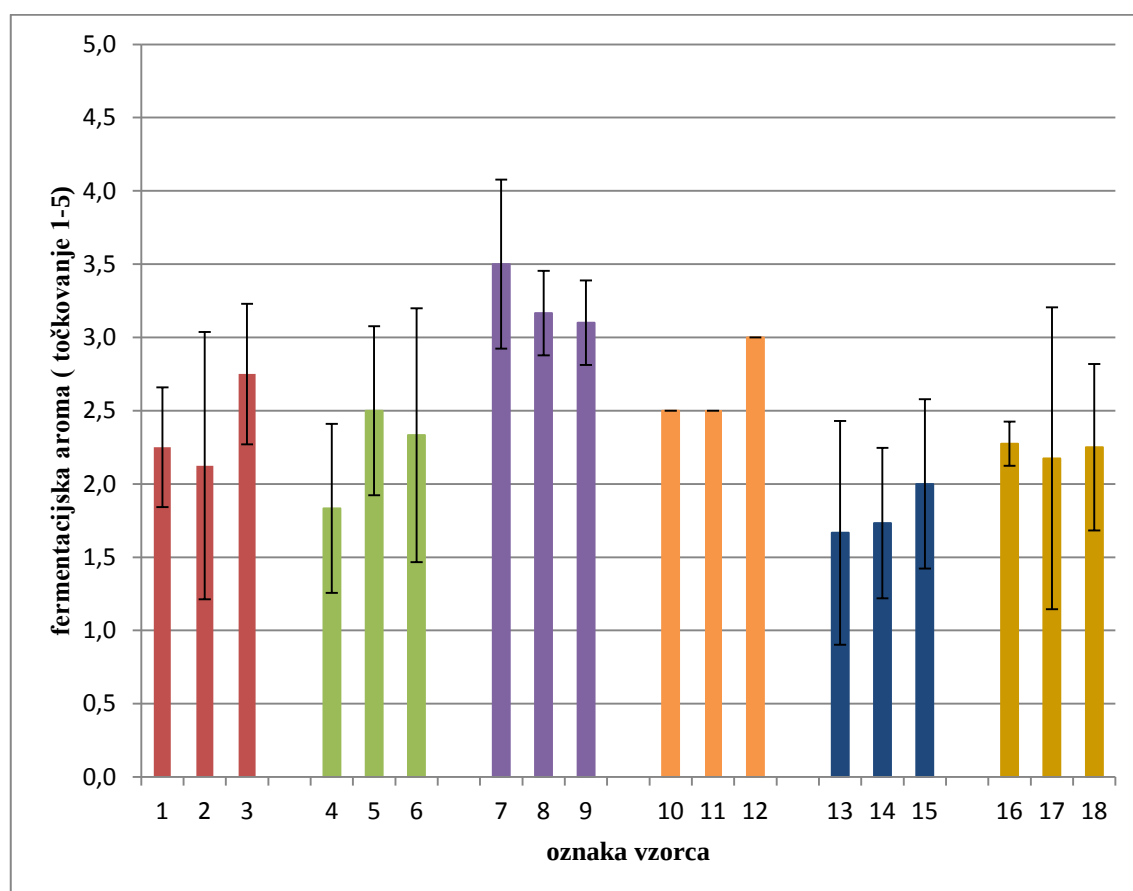
Slika 27: Rezultati ocenjevanja težje tropske arome (točkovanje 1-5) v vzorcih mladega vina, pridelanega z različnimi sevi kvasovk, dodatki hranil in trsk iz hrastovega lesa.

Na sliki 27 so prikazani rezultati ocenjevanja težje tropske arome pridelanih mladih vin. Kadar govorimo o težjih tropskih aromah, imamo v mislih aromo po tropskem sadju, po pasijonki in mangu. Na sliki 27 je razvidno in povsem očitno, da so vzorci pridelani le z dodatkom komercialnega seva kvasovk, dobili najvišje ocene. Najslabšo oceno je dobil vzorec 14, najboljšo pa vzorec 17. Oba vzorca sta imela poleg komercialnega seva kvasovk še dodatek hranil za kvasovke in sicer sta vsebovala hranilo Opti-White.



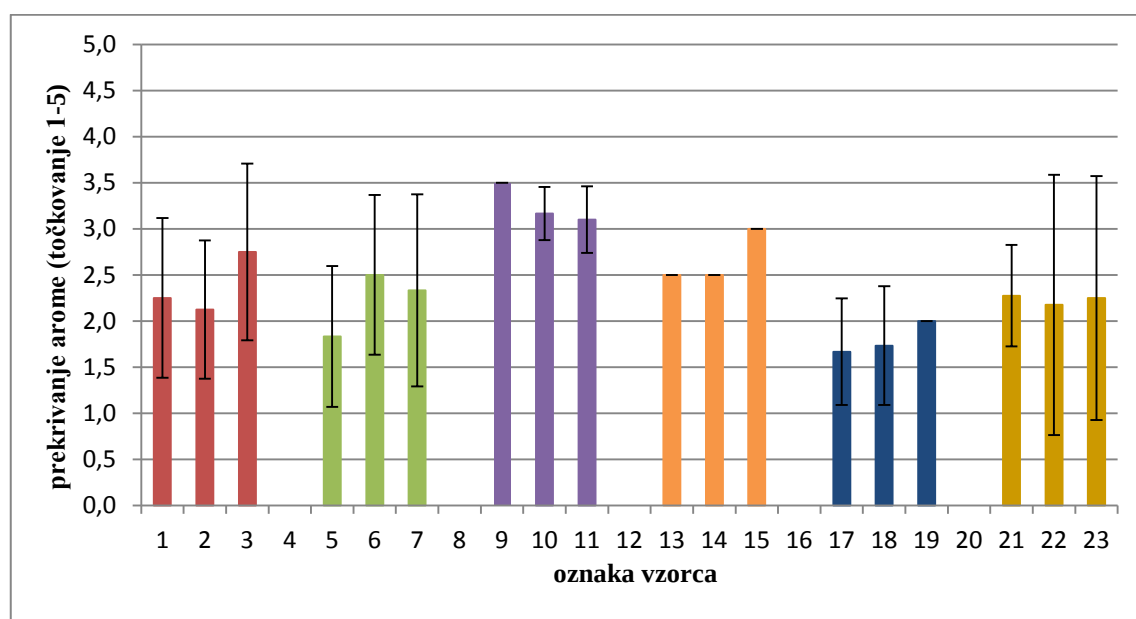
Slika 28: Rezultati ocenjevanja sveže tropske arome (točkovanje 1-5) v vzorcih mladega vina, pridelanega z različnimi sevi kvasovk, dodatki hranil in trsk iz hrastovega lesa .

Na sliki 28 so prikazani rezultati ocenjevanja sveže tropske arome, ki zajema arome po citrusih (po limoni in grenivki). Če primerjamo rezultate s slike 27, ugotovimo, da si rezultati niso podobni, pač pa si v večji meri nasprotujejo. Iz zgornjih rezultatov lahko ugotovimo, da vzorci s specifičnim dodatkom (dodatek hranila za kvasovke ali dodatek trsk iz hrastovega lesa) niso dobili najboljših ocen, kar pa je v skladu z našimi pričakovanji, saj nota po citrusih ni kakovostni parameter vina sauvignon



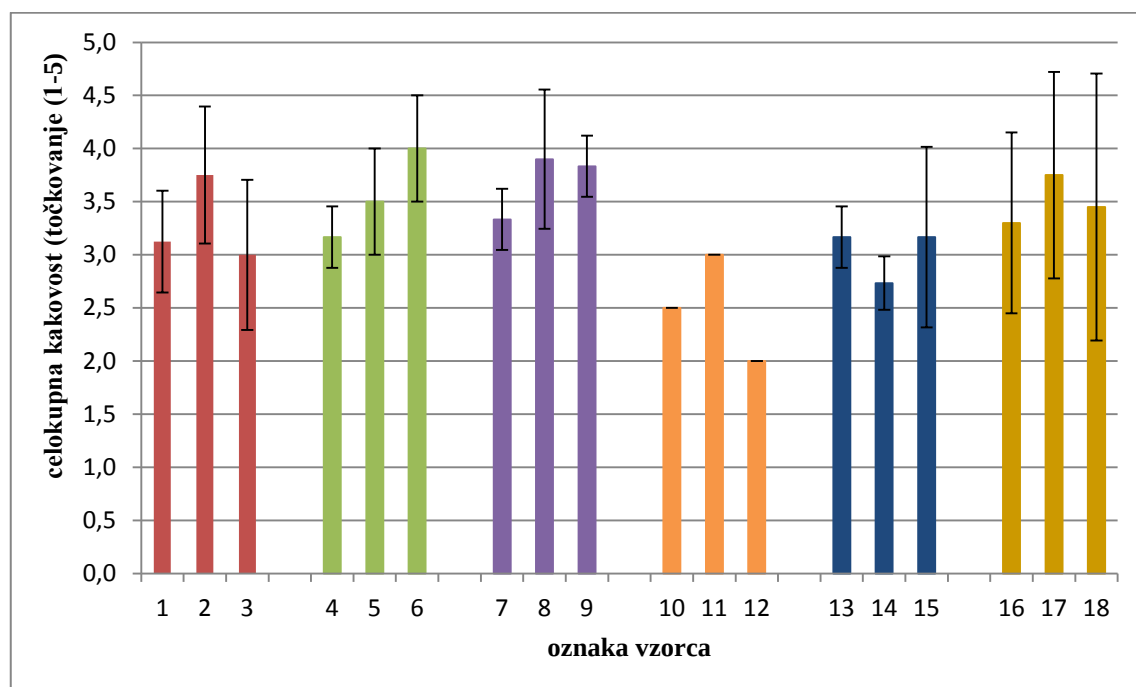
Slika 29: Ocenjevanje fermentacijske arome (točkovanje 1-5) v vzorcih mladega vina.

Pri ocenjevanju fermentacijske arome, smo pridobili podobne ocene med vzorci posamezne trojice, kar je lepo razvidno iz slike 29. Med posameznimi trojicami vzorcev so bistveno večje razlike kot med vzorci znotraj trojice. Opazno je, da so ocene pri vzorcih, pridelanih s kvasovkami Lalvin EC 1118, ki smo jih uporabili v dveh trojicah (trojici vzorcev 4, 5 in 6 ter 16, 17 in 18), primerljive.



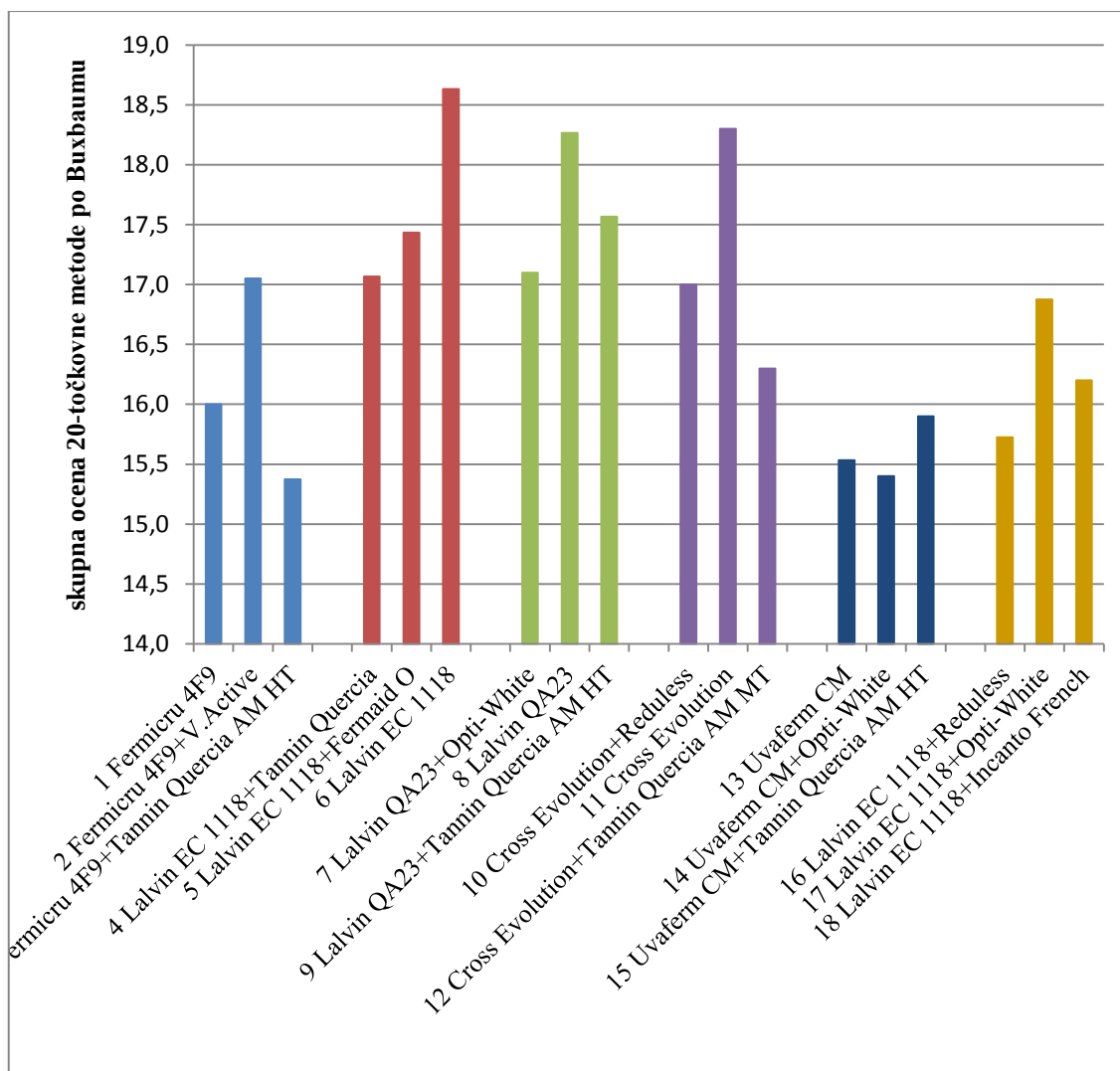
Slika 30: Ocenjevanje prekrivanja sortnih arome (točkovanje 1-5) v vzorcih mladega vina, pridelanega z različnimi sevi kvasovk, dodatki hranil in trsk iz hrastovega lesa.

Slika 30 nam prikazuje rezultate ocenjevanja prekrivanja sortnih arom v vzorcih mladega vina. Tudi pri ocenjevanju tega elementa deskriptivne senzorične analize, podobno kot pri ocenjevanju fermentacijske arome, opazimo primerljive ocene vzorcev, pridelanih s kvasovkami Lalvin EC 1118, ki smo jih uporabili v dveh trojicah (trojica vzorcev z oznakami 4-6 in 16-18).



Slika 31: Ocenjevanje celokupne kakovosti (točkovanje 1-5) v vzorcih mladega vina, pridelanega z različnimi sevi kvasovk, dodatki hranil in trsk iz hrastovega lesa.

Slika 31 prikazuje rezultate ocenjevanja celokupne kakovosti vzorcev mladih vin. Če primerjamo povprečne ocene vzorcev posameznih trojic, ugotovimo, da so bili v nekaterih trojicah bolje ocenjeni vzorci zgolj z dodatkom komercialne kvasovke (vzorci 6, 8, 11, 13), v drugem primeru vzorci z dodatkom hranila za kvasovke (vzorci 2, 8, 17), spet v tretjem pa vzorec z dodatkom trsk iz hrastovega lesa (vzorec 15). Iz rezultatov je moč sklepati, da pri celokupni kakovosti ne igra pomembne vloge vrsta dodatka, ampak gre za vpliv kombinacijo dodatkov, torej kvasovke in hranila, oz. kvasovke in trsk iz hrastovega lesa.



Slika 32: Skupna ocena ocenjevanje z 20-točkovno Buxbamovo metodo vzorcev mladega vina, pridelanega z različnimi sevi kvasovk, dodatki hranil in trsk iz hrastovega lesa.

Slika 32 prikazuje rezultate skupnih ocen, ki smo jih pridobili s senzoričnim ocenjevanjem po 20-točkovni Buxbamovi metodi. Če primerjamo povprečne ocene vzorcev posameznih trojic, ugotovimo, da so bili v posameznih trojicah v splošnem najboljše ocenjeni vzorci zgolj z dodatkom komercialne kvasovke (vzorec 2, 6, 8, 11), v enem primeru vzorec z dodatkom hranila za kvasovke (vzorec 17) in enem primeru tudi vzorec z dodatkom trsk iz hrastovega lesa (vzorec 15). Tako kot pri ocenjevanju

celokupne kakovosti po 5-točkovni ocenjevalni lestvici (slika 31), je iz rezultatov tudi v tem primeru moč sklepati, da pri skupni oceni ocenjevanja po 20-točkovni Buxbamovi lestvici ne igra pomembne vloge vrsta dodatka, ampak gre za vpliv kombinacije dodatkov, torej kvasovke in hranila, oziroma kvasovke in trsk iz hrastovega lesa. Če primerjamo rezultate ocenjevanja celokupne kakovosti po 5-točkovni ocenjevalni lestvici (Slika 31) in rezultate skupne ocene ocenjevanja po 20-točkovni Buxbamovi metodi (Slika 32), lahko ugotovimo, da so le-ti skladni (izjema je le vzorec 2).

Vzorci mladih pridelanih vin so ocenjevalci na koncu senzoričnega ocenjevanja rangirali oz. razvrstili od prvega do tretjega mesta. Pri tem 1. mesto pomeni najboljše ocenjeni in 3. mesto najslabše ocenjeni vzorec. Rezultati rangiranja trojic posameznih vzorcev so:

Vzorci z oznako 1-3:

- 1. mesto: vzorec 2 (Fermicru 4F9 + V Activ)
- 2. mesto: vzorec 1 (Fermicru 4F9)
- 3. mesto: vzorec 3 (fermicru 4F9 + Tannin Quercia AM HT)

Vzorci z oznako 4-6:

- 1. mesto: vzorec 1 (Lalvin EC 1118)
- 2. mesto: vzorec 5 (Lalvin EC 1118 + Fermaid O)
- 3. mesto: vzorec 6 (Lalvin EC 1118 + Tannin Quercia)

Vzorci z oznako 7-9:

- 1. mesto: vzorec 8 (Lalvin QA23)
- 2. mesto: vzorec 7 (Lalvin QA23 + Tannin Quercia AM HT)
- 3. mesto: vzorec 9 (Lalvin EC 1118 + Opti-White)

Vzorci z oznako 10-12:

- 1. mesto: vzorec 11 (Cross Evolution)
- 2. mesto: vzorec 10 (Cross Evolution + Reduless)
- 3. mesto: vzorec 12 (Cross Evolution + Tannin Quercia AM MT)

Vzorci z oznako 13-15:

- 1. mesto: vzorec 15 (Uvaferm CM + Tannin Quercia AM HT)
- 2. mesto: vzorec 14 (Uvaferm CM)
- 3. mesto: vzorec 13 (Uvaferm CM + Opti-White)

Vzorci z oznako 16-18:

- 1. mesto: vzorec 17 (Lalvin EC 1118 + Opti-White)
- 2. mesto: vzorec 16 (Lalvin EC 1118 + Reduless)
- 3. mesto: vzorec 18 (Lalvin EC 1118 + Incanto French)

Rezultate rangiranja vzorcev bi lahko le s težavo povzeli. Problem je v tem, da so si rezultati posameznih trojic med seboj preveč različni, v nekaterih primerih je najvišje rangiran vzorec zgolj z dodatkom komercialnega seva kvasovk, v drugem primeru vzorec z dodatkom kvasovk in hranila zanje, spet v tretjem pa vzorec z dodatkom kvasovk in trsk iz hrastovega lesa. Košmerl in sod. (2012b) pravijo, da dodatek trsk iz

hrastovega lesa v mošt vpliva na fermentacijske, tehnološke kot aromatične značilnosti pridelanih mladih vin sorte rebula, v manjši meri pa na senzorično oceno. Rezultate omenjene raziskave lahko brez težave prenesemo na naš primer mladih vin sorte sauvignon, kjer je vpliv dodatka na senzorično oceno ponekod večji, ponekod pa zelo majhen.

5 SKLEPI

Na podlagi dobljenih rezultatov pri proizvodnji mladega vina sauvignon z različnimi komercialnimi sevi kvasovk, hranili za kvasovke in dodatki trsk iz hrastovega lesa lahko v celoti potrdimo vse tri delovne hipoteze:

- Hipoteza 1: Uporabljene kombinacije sevov kvasovk, hranil za kvasovke in dodatek trsk iz hrastovega lesa vplivajo na fermentacijske lastnosti kvasovk in fizikalno-kemijske parametre vina, v manjši meri pa na senzorične lastnosti vina. Dodatek trsk iz hrastovega lesa ima izmed omenjenih dodatkov največji vpliv na fizikalno-kemijske parametre vina, saj so znotraj posamezne trojice vzorcev, vzorci z dodatkom trsk iz hrastovega lesa imeli največji delež nastalega alkohola in največjo vsebnost oddanega CO₂ med alkoholno fermentacijo. Prav tako omenjeni dodatek vpliva na fermentacijske značilnosti kvasovk in sicer je značilen bolj enakomeren potek fermentacije kot posledica enakomerne porazdelitve kvasovk. Tudi dodatek hranila za kvasovke v mošt vpliva na fermentacijske značilnosti pridelanih mladih vin sorte sauvignon, a je njegov vpliv manjši od vpliva dodanih trsk iz hrastovega lesa
- Hipoteza 2: V okviru petih različnih uporabljenih kvasovk so značilne razlike v kinetiki alkoholne fermentacije in sicer najbolj izrazite v dolžini faze prilagajanja in količini sproščenega CO₂. Izmed uporabljenih kvasovk je največje sproščanje CO₂ značilno za komercialni sev Uvaferm CM in najmanjše za komercialno kvasovko Lalvin QA23.
- Hipoteza 3: Vsebnost fenolnih spojin je bistveno večja v vzorcih z dodatkom hrastovih trsk (izjema le prva trojica vzorcev) in prav tako tudi antioksidativni potencial vina. Iz rezultatov je moč potrditi tudi, da je vsebnost fenolnih spojin večja v vzorcih, katerim smo v mošt dodali zgolj selekcionirane kvasovke, in ne v vzorcih, kjer smo poleg kvasovk dodali tudi hranila zanje. Enako velja za antioksidativni potencial mladega pridelanega vina.

Poleg zgoraj zapisanega, lahko iz rezultatov oblikujemo še naslednja sklepa:

- Zveza med antioksidativnim potencialom in vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, ki jih določimo s Folin-Ciocalteuovo metodo, obstaja in je tesna ($R^2 = 0,875$).
- Primer vzorcev z največjo vsebnostjo reducirajočih sladkorjev, kjer smo določili tudi večjo vrednost za vsebnost skupnih fenolnih spojin s Folin-Ciocalteuovo metodo, potrjuje slabost omenjene metode pri določanju skupnih fenolnih spojin, saj dokazuje, da omenjeni reagent reagira tudi z reducirajočimi sladkorji.

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo želeli ugotoviti, kako različni dodatki pri pridelavi vina sauvignon vplivajo na značilnosti, kot so fizikalno-kemijski parametri, vsebnost skupnih fenolnih spojin, senzorične lastnosti in antioksidativni potencial pridelanega mladega vina ter vinskih droži. V kontrolnem vzorcu je potekala spontana fermentacija z avtohtono kvasno populacijo, medtem ko je bila v preostalih 18 vzorcih alkoholna fermentacija spodbujena s selekcioniranimi kvasovkami in različnima dodatkoma (dodatek hranil za kvasovke ali trsk iz hrastovega lesa). Med alkoholno fermentacijo smo skrbno spremljali izgubo mase in iz dobljenih rezultatov za posamezne vzorce izrisali fermentacijske krivulje in krivulje fermentacijske kinetike.

Po zaključeni alkoholni fermentaciji smo opravili fizikalno-kemijske in senzorične analize mladega vina ter analizo droži (določanje intracelularne oksidacije celic). S pridobljenimi rezultati smo ugotovili, da dodatek hranila za kvasovke in dodatek trsk iz hrastovega lesa pri pridelavi vina bistveno vplivata na značilnosti pridobljenega mladega vina, kjer gre izpostaviti predvsem vpliv na fermentacijske in tehnološke značilnosti, v manjši meri pa na senzorične lastnosti.

Do sedaj za mnoge sorte že ugotovljeno korelacijo med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin in antioksidativnim potencialom vina, smo z magistrsko nalogo potrdili tudi za belo vinsko sorto sauvignon. Prav tako smo potrdili pozitiven vpliv dodatka trsk iz hrastovega lesa na večjo vsebnost skupnih fenolnih spojin vina. Največjo izmerjeno vrednost za vsebnost fenolnih spojin je imel kontrolni vzorec, a smo po proučitvi literature prišli do sklepa, da je bila navidezno večja vrednost le na račun velikega preostanka reducirajočih sladkorjev, ki so bili posledica nedokončane fermentacije. Omenjeni sladkorji so reagirali s Folin-Ciocalteu reagentom in tako prispevali k lažno večjim rezultatom vsebnosti fenolnih spojin.

Vpliv dodatka hranila in trsk iz hrastovega lesa se je pri senzorični analizi ni pokazal kot izrazit. Iz rezultatov senzorične analize lahko zaključimo, da omenjeni dodatki na senzorične lastnosti pridelanega mladega vina vplivajo le v manjši meri.

Uporaba različnih dodatkov, tako sevov kvasovk kot hranil zanje in trsk iz hrastovega lesa, nam omogoča spoznati različne vplive na kakovost in značilnosti pridelanega mladega vina. S pravilno izbiro oz. pravilno kombinacijo dodatkov lahko močno pripomoremo k pridelavi vina z želenimi lastnostmi.

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abramovič H. 2011. Antioksidanti in metodologija določanja antioksidativne učinkovitosti: učbenik za izbirni predmet na interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 112 str.
- Bautista-Ortin A.B., Lencina A.G., Cano-Lopez M., Pardo-Minguez F., Lopez-Roca J.M., Gomez-Plaza E. 2008. The use of oak chips during the ageing of a red wine in stainless steel tanks or used barrels: effect of the contact time and size of the oak chips on aroma compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*: 14, 2: 63-70
- Bavčar D. 2006. Kletarjenje danes. Ljubljana, Kmečki glas: 286 str.
- De Beer D., Joubert E., Gelderblom W. C. A., Manley M. 2002. Phenolic compounds: A review of their possible role as *in vivo* antioxidant of wine. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 23, 2: 48-61
- Cigić B., Rudan Tasić D. 2006. Antioksidanti in prooksidanti. V: Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih. 24. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana 9. in 10. november 2006. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 103-116
- Commission Regulation (EC) No 606/2009 of 10 July 2009 laying down certain detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No 479/2008 as regards the categories of grapevine products, oenological practices and the applicable restrictions. 2009. *Official Journal of European Union*, 52, L192: 59 str.
- Fernández-Pachón M.S., Villaño D., Troncoso A. M., García-Parrilla M. C. 2005. Influence of enological practices on the antioxidant activity of wines. *Food Chemistry*, 95 3: 394-404
- FOOS. 2014. WineScanTM Flaxdatasheet. Hillerød, FOOS, 2 str.
<http://www.foss.dk/industry-solution/products/winescan-so2> (september 2014)
- Golob T., Bertoncelj J., Doberšek U., Jamnik M. 2006. Senzorična analiza živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 81 str.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2000. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford, Clarendon Press: 936 str.

- Lambrechts M. G., Pretorius I.S. 2000. Yeast and its importance to wine aroma - A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, Special Issue: 97-125
- Jakubowski W., Bilinski T., Bartosz G. 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 5: 659-664
- Jenko M., Čuš F., Košmerl T. 2012. Starterske kulture kvasovk kot možnost za izboljšanje senzorične lastnosti vina. V: *Vinarski dan 2012*, Ljubljana, 28. november. Čuš F. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 15-32
- Jug T., Košuta M., Polanec R. A., Rusjan D. 2014. *Analiza grozdja in vina*. Nova Gorica, Kmetijsko gozdarski zavod: 46 str.
- Košmerl T., Prosen H., Jug T., Demšar L., Francetič V. Vpliv dodatka trsk iz hrastovega lesa v mošt. V: *Vinarski dan 2012*, Ljubljana, 28. november. Čuš F. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 5-14
- Košmerl T. 2003. Pomen hranilnih snovi za optimalen potek alkoholne in jabolčno-mlečnokislinske fermentacije. V: *Vinarski dan 2003*, Ljubljana, 12. junij 2003. Marinček L. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 13-35
- 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:
- Košmerl T. 2007. Alkoholna fermentacija mošta: izbrana poglavja pri predmetu Tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 95 str.
- Košmerl T., Cigić B. 2008. Antioxidant potential and phenolic composition of white and red wines. *Le Bulletin de l'OIV*, 81: 251-259
- Košmerl T., Kač M. 2009. Osnovne kemijske in senzorične analize mošta in vina: laboratorijske vaje pri predmetu Tehnologije predelave rastlinskih živil - vino. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 74 str.
- Košmerl T. 2011. Naravni polifenoli antioksidanti vina. *SAD: revija za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo*, 22, 2: 20-22
- Košmerl T., Jamnik P., Francetič V. 2012a. Comparison of antioxidant activity of wine and wine lees. V: *35th World congress of vine and wine*, 18-22 June, 2012. Izmir, Turkey, [S. l.] TAPDK, 81: 7 str. [CD-ROM]
- Košmerl T., Prosen H., Jug T., Gašperlin L., Francetič. 2012b. Fermentation characteristics of wine yeast in the presence of oak chips. V: *35th World Congress*

- of Vine and Wine, 18-22 June, 2012, Izmir, Turkey. [S. l.] TAPDK 81: 7 str. [CD-ROM]
- Košmerl T. 2013. Vinske kvasovke, hranila in tanini. Maribor, Jurana d.o.o.: 67 str.
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21
- Lallemend. 2012a. Nutrients. Toulouse, Lallemend Corporation: 7 str.
http://www.lallemendwine.us/products/nutrient_strains.php (15. avgust 2014)
- Lallemend. 2012b. Yeast selected from nature. Toulouse, Lallemend Corporation: 7 str.
http://www.lallemendwine.us/products/yeast_strains.php (15. avgust 2014)
- Moriera J. L., Santos L. 2004. Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis. *Analytica Chimica Acta*, 513: 263-268
- Nemanič J. 1996. Spoznajmo vino. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 46-47
- Plahuta P. 2004. Veliki vinski leksikon. Ljubljana, Mladinska knjiga: 515 str.
- Pravilnik o postopku in načinu ocenjevanja vina in drugih proizvodov iz grozdja in vina. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 32: 3857-3862
- Pravilnik o o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu, 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 43: 5336-5358
- Pretorius I. S. 2002. Vinske kvasovke za tretje tisočletje: sodobni pristopi k starodavni umetnosti vinarstva. V: Pomen mikrobiologije in biotehnologije v proizvodnji vina. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-12.
- Ribéreau Grayon P., Glories, Y., Maujean, A., Dudourdieu, D. 2006. Handbook of Enology: Vol. 2: The chemistry of wine stabilization and treatments. 2nd ed. Chichester, J. Willey & Sons: 441 str.
- Shahidi. F., Naczki M. 1995. Antioxidant properties of food phenolics. V: Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications. Shahidi F. (ed.). Lancaster, Technomic Publishing Company, 235-273
- Skvarč T. 2007. Določanje glavnih sestavin in parametrov kakovosti v vinih. Diplomsko naloga strokovnega študijskega programa. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 29-32

- Smolnikar J. 2012. Vpliv kvasovk in fermentacijske temperature na aromatične značilnosti mladih vin sorte sauvignon. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 76 str.
- Vrhovšek U. 1996. Fenoli kot antioksidanti v vinu. V: 1. Zbornik referatov 1. Slovenskega vinogradniško-vinarskega kongresa. Portorož, od 4. do 6. decembra 1996. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas: 124-134
- Wondra M. 1998. Vpliv kvasovk na senzorične lastnosti vina. V: Vinogradniško-vinarski dan 1998. Ljubljana, 30. januar 1998. Marinček L. (ur.) Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 64-74

ZAHVALA

Znanje je moč.
(F. Bacon)

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Heleni Abramovič za vso strokovno pomoč, nasvete, naklonjenost in vložen trud pri nastajanju magistrskega dela.

Za hiter pregled magistrske naloge se zahvaljujem somentorici dr. Tjaši Jug.

Prav tako se iskreno zahvaljujem recenzentki prof. dr. Tatjani Košmerl za konstantno pomoč pri izdelavi magistrske naloge, neprestano nudenje strokovnih nasvetov in podpore ter temeljit pregled naloge.

Prof. dr. Poloni Jamnik hvala za strokovno pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil.

Lini Burkan se zahvaljujem za pregled referenc in končni pregled magistrske naloge.

Hvala tudi sošolcem in sošolkam za nepozabnih 5 let študija. Hvala vam za vso naklonjenost in nesebično podporo, kakor tudi za vsa skupna doživetja, popotovanja in druženja, zaradi katerih se bom študijskih let na Biotehniški fakulteti z veseljem spominjala.

Posebna zahvala gre moji družini, predvsem mami in očetu, ker sta mi s finančno in moralno podporo omogočila brezskrben in nepozaben študij, pa tudi bratu za vse živce. Hvala tudi vsem najožjim sorodnikom, ki ste mi kakorkoli pomagali pri uresničitvi mojih želja.

Leo, hvala za vse vzpodbudne besede, potrpežljivost, čustveno in moralno podporo in to, da si vseskozi verjel vame, me venomer bodril in mi bil v največjo čustveno in moralno podporo. Hvala!

PRILOGE

PRILOGA A: Osnovni fizikalno-kemijski parametri mošta sorte sauvignon letnika 2013 dobljeni z WineScan (WSC) analizo na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica.

parameter	izmerjena vrednost
sladkorna stopnja	87 °Oe
sladkor	20,3 °Brix
gostota	1,085 g/cm ³
relativna gostota	1,087
pH	3,51
skupne kisline	5,19 g/L, kot vinska kislina
jabolčna kislina	2,85 g/L
vinska kislina	3,77 g/L
hlapne kisline	0,07 g/L, kot očetna kislina
mlečna kislina	0,89 g/L
prosti aminoksilinski dušik	108,1 mg/L
vsota glukoze in fruktoze	207,8 g/L
Follin-Ciocalteu indeks	0,07
amoniak	94 mg/L
kalij	1841 mg/L
etanol	0,27 vol. %
glicerol	0 mg/L
etil acetat	0,44 mg/L
manitol	0,02 mg/L
3-metil 1-butanol	0,24 mg/L
sorbitol	0 mg/L
acetaldehid	0,21 mg/L
glukoza	111,2 g/L
fruktoza	108,5 g/L

PRILOGA B: Rezultati WineScan analize za vzorce mladih pridelanih vin in kontrole po programu SUHA VINA

oznaka vzorca	specifična gostota	alkohol (vol.%)	ekstrakt	RS (g/L)	SK (g/L)	HK (g/L)	pH	JK (g/L)	MK (g/L)	CK (g/L)	VK (g/L)	glicerol (mg/L)	CO ₂ (g/L)
0	1,0615	4,62	160,5	129,78	5,12	0,355	3,188	4,19	-0,3	0,06	5,65	-0,4	216,86
1	1,05472	4,96	147,13	118,01	4,96	0,317	3,157	4,07	0,3	0,09	5,38	0,87	3004,41
2	1,04974	5,62	137	108,63	5,31	0,344	3,28	3,71	0,01	0,28	5,29	1,39	2592,58
3	1,02277	8,58	83,15	59,41	5,62	0,216	3,391	3,01	0,13	0,44	4,02	3,32	2359,95
4	1,00167	11,3	41,73	21,58	5,77	0,325	3,443	2,63	0,25	0,44	3,33	4,63	1811,21
5	1,01003	10,29	58,5	38,15	5,69	0,317	3,459	2,97	0,25	0,51	3,63	3,52	1905,45
6	1,01594	9,63	70,29	49,24	5,72	0,331	3,443	3,04	0,32	0,52	3,93	3,2	2104,3
7	1,00414	10,98	46,39	26,35	5,45	0,289	3,47	2,67	0,2	0,39	3,02	4,36	1858,21
8	1,0125	10,05	63,46	42,14	5,61	0,289	3,455	3,03	0,27	0,43	3,6	3,54	2057,73
9	1,00703	10,65	52,31	32,02	5,52	0,255	3,436	2,85	0,21	0,42	3,21	4,17	1982,02
10	1,03196	7,51	101,29	77,54	5,26	0,235	3,373	3,29	0,11	0,4	4,23	2,37	2393,52
11	1,03713	6,88	111,45	86,56	5,22	0,258	3,355	3,41	0,06	0,37	4,42	1,99	2423,95
12	1,02524	8,42	88,31	64,74	5,44	0,208	3,383	3,01	0,15	0,43	3,88	3,29	2221,38
13	0,99683	11,86	31,48	11,82	5,94	0,409	3,438	2,45	0,13	0,29	2,51	5,57	1747,16
14	0,99563	11,96	28,89	8,82	6,04	0,388	3,447	2,38	0,16	0,29	2,49	6,07	1460,15
15	0,99568	12,01	28,94	8,63	6,01	0,34	3,464	2,32	0,15	0,29	2,4	6,25	1372,93
16	1,01983	9,13	77,73	54,1	5,71	0,304	3,42	2,65	0,23	0,42	3,84	4,01	1933,75
17	1,03112	7,84	100,06	74,72	5,79	0,309	3,39	3,34	0,14	0,38	4,54	2,98	1900,16
18	1,01753	9,39	73,2	50,04	5,43	0,348	3,44	2,08	0,44	0,44	3,64	4,41	2078,39

Legenda: RS = skupne kisline, HK = hlapne kisline, JK = jabolčna kislina, MK = mlečna kislina, CK = citronska kislina, VK = vinska kislina.

PRILOGA C: Rezultati WineScan analize za vzorce mladih pridelanih vin in kontrole po programu VINA V VRENJU.

oznaka vzorca	specifična gostota	alkohol (vol.%)	glukoza, fruktoza (g/L)	RS (g/L)	SK (g/L)	HK (g/L)	pH	MK (g/L)	VK (g/L)	CO ₂ (g/L)
1	1,05093	4,66	122,54	128,18	5,31	0,08	3,4	3,39	0,34	1236
2	1,04483	5,49	110,47	115,9	5,54	0,08	3,39	3,37	0,33	1129
3	1,02214	8,51	61,3	64,06	5,62	0,04	3,43	2,86	0,25	1348
4	1,00312	11,32	23,13	23,1	5,77	0,13	3,46	2,86	0,23	1184
5	1,01075	10,29	39,51	40,1	5,63	0,13	3,46	3,07	0,26	1057
6	1,01625	9,59	51,01	51,52	5,63	0,1	3,44	3,17	0,27	1258
7	1,00509	11	27,27	27,93	5,5	0,12	3,46	2,7	0,21	1449
8	1,01277	10,02	43,64	44,03	5,58	0,13	3,45	2,89	0,24	1519
9	1,00783	10,67	33,15	33,64	5,53	0,1	3,45	2,8	0,21	1563
10	1,02984	7,44	79,06	80,65	5,33	0,05	3,41	2,9	0,23	1424
11	1,03423	6,82	88,08	90,21	5,34	0,06	3,41	2,99	0,23	1454
12	1,02429	8,38	66,1	68,21	5,47	0,05	3,43	2,64	0,21	1467
13	0,99839	11,89	13,15	14,33	5,99	0,23	3,45	2,66	0,31	1583
14	0,99699	11,99	9,96	10,66	6,08	0,23	3,45	2,63	0,32	1336
15	0,99692	12,05	9,54	10,67	6,07	0,18	3,44	2,66	0,28	1296
16	1,01933	9,06	55,85	57,95	5,7	0,15	3,45	2,53	0,3	1239
17	1,02917	7,75	76,89	78,07	5,82	0,12	3,44	3	0,28	1045
18	1,01748	9,36	51,42	54,05	5,43	0,17	3,49	1,98	0,32	1467

Legenda: **KO** = reusirajoci snalogji, **SK** = skupne kisline, **RS** = narne kisline, **HK** = jadoisna kisline, **MK** = micsna kisline, **VK** = vinska kisline.

PRILOGA D: Degustacijski list uporabljen pri senzoričnem ocenjevanju vzorcev mladih vin z ocenjevalno lestvico (točkovanje 1-5).

Oznaka vzorca	Vonj po tropskem sadju (pasjonka, mango)	Vonj po citrusih (grenivka, limona)	Vonj po sadju (hruška, jabolko)	Vonj po zelenem (zeleni paprika)	Celokupna kakovost (okus+aroma)	Opisna ocena ali pripomba
Uvajalni 1						
Uvajalni 2						
Uvajalni 3						
0						
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
Opomba vonjev	Težja tropska aroma	Sveža tropska aroma	Fermentacijska aroma	Prekrivanje primarnih aroma		

Rangiranje uvajalnih treh vzorcev (od 1. do 3. mesta): _____

Rangiranje vaših treh vzorcev poskusa (od 1. do 3. mesta): _____

PRILOGA E: Degustacijski list uporabljen pri senzoričnem ocenjevanju vzorcev mladih vin po 20-točkovni metodi po Buxbaumu.

DITVDATIM.T

Oznaka vzorca	Bistrost (do 2 točki)	Barva (do 2 točki)	Vonj (do 4 točke)	Okus (do 6 točk)	Harmonija (do 6 točk)	Opombe
Uvajalni 1						
Uvajalni 2						
Uvajalni 3						
0						
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						