

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jure ŠTALCAR

BIOGENI AMINI V VINU

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jure ŠTALCAR

BIOGENI AMINI V VINU

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

BIOGENIC AMINES IN WINE

M. SC. THESIS

Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za tehnologije, prehrano in vino na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Analiza organskih kislin je bila opravljena na Kmetijskem inštitutu v Ljubljani; analiza biogenih aminov pa na Fakulteti za znanosti o okolju Univerze v Novi Gorici.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Mojmirja Wondro, za somentorico doc. dr. Andrejo Vanzo in za recenzenta prof. dr. Marka Krefta.

Mentor: doc. dr. Mojmir Wondra

Somentorica: doc. dr. Andreja Vanzo

Recenzent: prof. dr. Marko Kreft

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Jure Štalcar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 663.253:547.233:615.9(043)=163.6
KG	vino/modra frankinja/biogeni amini/jabolčno mlečnokislinska fermentacija/mlečnokislinske bakterije/histamin /biološki razkis
AV	ŠTALCAR, Jure, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
SA	WONDRA, Mojmir (mentor)/VANZO, Andreja (somentorica)/ KREFT, Marko (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2015
IN	BIOGENI AMINI V VINU
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo)
OP	X, 65 str., 8 pregl., 23 sl., 73 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	V osmih vzorcih vina modra frankinja iz vinorodnega okoliša Bela krajina smo s pomočjo analize HPLC določali vsebnost 11-ih biogenih aminov (BA) (histamin, tiramin, putrescin, etanolamin, metilamin, butilamin, kadaverin, triptamin, 2-metilbutilamin, izopentilamin, heksilamin). Želeli smo ugotoviti razlike v vsebnosti BA med vzorci, kjer je jabolčno mlečnokislinska fermentacija (JMKF) potekla spontano s pomočjo avtohtonih mlečnokislinskih bakterij (MKB) in vzorci, pri katerih je bila dodana selekcionirana kultura MKB. Opravili smo tudi analizo organskih kislin (citronska, vinska, jabolčna in mlečna kislina) ter določili osnovne fizikalno-kemijske parametre (alkohol, skupni ekstrakt, pH, titrabilne/skupne kisline, hlapne kisline, prosti in skupni SO₂). Največjo skupno koncentracijo BA smo določili v vzorcu, kjer je JMKF potekla popolnoma spontano s pomočjo avtohtone mikrobiote. Pri vseh vzorcih smo izmerili največje koncentracije etanolamina. Kar 5 od 8-ih vzorcev je vsebovalo histamin nad zakonsko mejo, ki je 2 mg/L. Največjo koncentracijo histamina smo izmerili v vzorcu, kjer je bila dodana selekcionirana kultura MKB in sicer 6,56 mg/L. Kljub temu, da je največjo skupno koncentracijo BA vseboval vzorec, kjer je JMKF potekla spontano, nismo ugotovili statistično značilnih razlik med vzorci v vsebnosti BA.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 663.253:547.233:615.9(043)=163.6

CX wine/ Blaufränkisch/biogenic amines/malolactic fermentation/lactic acid
bacteria/histamine

AU ŠTALCAR, Jure

AA WONDRA, Mojmir (supervisor)/VANZO, Andreja (co-advisor)/KREFT, Marko
(reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

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

PY 2015

TY BIOGENIC AMINES IN WINE

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)

NO X, 65 p., 8 tab., 23 fig., 73 ref.

LA sl

Al sl/en

AB The main goal of this master thesis was to determine 11 different biogenic amines (BA) (histamine, tyramine, putrescine, ethanolamine, methylamine, butylamine, cadaverine, tryptamine, 2-methylbutylamine, izopentylamine, hexylamine) in eight samples of Blaufränkisch wine from the winegrowing district Bela krajina. The difference between spontaneous and inoculated malolactic fermentation was compared. We also determined the content of organic acids (citric, tartaric, malic and lactic acid) and measured some basic parameters of wine quality (alcohol, total extract, pH, titrable/total acidity, volatile acidity, free and total sulphur dioxide). The highest total concentration of BA was determined in sample which underwent spontaneous malolactic fermentation. In all samples we determined a maximum concentration of ethanolamine. Concentration of histamine was in 5 samples above the legal limit which is 2 mg/L. The maximum concentration of histamine was measured in sample 3 – 2013 where selected culture of lactic acid bacteria was added. There was no statistical significant differences in BA content.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BIOGENI AMINI	3
2.1.1 Definicija in kemijske značilnosti biogenih aminov	3
2.1.2 Nastanek biogenih aminov	4
2.1.3 Funkcije biogenih aminov	7
2.1.4 Toksikološki učinki in metabolizem biogenih aminov	7
2.2 MIKROORGANIZMI, POVEZANI S TVORBO BA V VINU	10
2.2.1 Kvasovke	10
2.2.2 Mlečnokislinske bakterije	12
2.2.3 Druge bakterije	13
2.2.4 Plesni	14
2.3 FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA NASTANEK BA V GROZDJU IN VINU	14
2.3.1 Vinogradniški vplivi	14
2.3.2 Vpliv alkoholne fermentacije	16
2.3.3 Vpliv maceracije	16
2.3.4 Vpliv pektolitičnih encimov	17
2.3.5 Vpliv fenolnih spojin	17
2.3.6 Vpliv ležanja vina na drožeh	17
2.3.7 Vpliv jabolčno mlečnokislinske fermentacije	18

2.3.8	Vplivi med zorenjem in staranjem vina	19
2.3.9	Vpliv stila vina	20
2.3.10	Vpliv fizikalno-kemijske sestave vina	21
2.3.11	Vpliv čistilnih sredstev	22
2.4	UKREPI ZA ZMANJŠEVANJE IN PREPREČEVANJE NASTAJANJA BA	23
2.5	BIOLOŠKI RAZKIS	24
2.5.1	Mlečnokislinske bakterije	24
2.5.2	Spremembe med JMKF	25
2.5.3	Dejavniki, ki vplivajo na rast MKB	26
3	MATERIAL IN METODE	28
3.1	MATERIAL	28
3.1.1	Vzorci	28
3.2	METODE	30
3.2.1	Določanje pH vina	30
3.2.2	Določanje skupnih in titrabilnih kislin	30
3.2.3	Določanje relativne gostote, alkohola in ekstrakta	31
3.2.4	Določanje žveplovega dioksida	32
3.2.5	Določanje hlapnih kislin	32
3.2.6	Določanje vsebnosti organskih kislin	33
3.2.7	Določanje biogenih aminov v vinu	34
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	36
4.1	REZULTATI OSNOVNIH KEMIJSKIH ANALIZ VINA	36
4.1.1	Rezultati določanja vsebnosti alkohola	37
4.1.2	Rezultati določanja skupnega ekstrakta	38
4.1.3	Rezultati merjenja vrednosti pH	38
4.1.4	Rezultati določanja titrabilnih in skupnih kislin	39
4.1.5	Rezultati določanja hlapnih kislin	40
4.1.6	Rezultati določanja prostega in skupnega žveplovega dioksida	41
4.2	REZULTATI ANALIZE ORGANSKIH KISLIN	43
4.2.1	Rezultati določanja citronske kisline	43

4.2.2	Rezultati določanja vinske kisline	44
4.2.3	Rezultati določanja jabolčne kisline	45
4.2.4	Rezultati določanja mlečne kisline	46
4.3	REZULTATI ANALIZE BIOGENIH AMINOV	47
4.3.1	Rezultati določanja histamina	49
4.3.2	Rezultati določanja tiramina	51
4.3.3	Rezultati določanja putrescina	52
4.3.4	Rezultati določanja etanolamina	53
4.3.5	Rezultati določanja metilamina	54
4.3.6	Rezultati določanja butilamina	54
4.3.7	Rezultati določanja kadaverina	55
4.3.8	Rezultati določanja triptamina	55
4.3.9	Rezultati določanja 2-metil-butilamina	55
4.3.10	Rezultati določanja izopentilamina	56
4.3.11	Rezultati določanja heksilamina	56
4.3.12	Skupna vsebnost kvantitativno določenih BA	56
5	SKLEPI	57
6	POVZETEK	58
7	VIRI	59
ZAHVALA		

KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijske strukture najpomembnejših BA v vinu (prirejeno po Smit in sod., 2008: 114)....	3
Slika 2: Princip dekarboksilacije aminokislin. Histamin nastane z dekarboksilacijo histidina pod vplivom encima histidin dekarboksilaza (prirejeno po Anli in Bayram, 2009: 89)	4
Slika 3: Proces dekarboksilacije in transporta aminokisline ter nastalega BA skozi membrano bakterijske celice (prirejeno po Molenaar in sod., 1993: 2869)	5
Slika 4: Metabolne poti za nastanek BA (prirejeno po Halász in sod., 1994: 43).....	6
Slika 5: Potek absorpcije in detoksifikacije BA v črevesju (prirejeno po Ladero in sod., 2010: 11). 8	
Slika 6: Pretvorba jabolčne kisline v mlečno kislino (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a: 145).....	26
Slika 7: Koncentracije alkohola (% vol) v vzorcih vina.....	37
Slika 8: Koncentracije skupnega ekstrakta (g/L) v vzorcih vina.....	38
Slika 9: Vrednost pH v vzorcih vina	39
Slika 10: Koncentracije titrabilnih in skupnih kislin (g/L) v vzorcih vina.....	40
Slika 11: Koncentracije hlapnih kislin (g/L) v vzorcih vina	41
Slika 12: Koncentracije prostega in skupnega žveplovega dioksida (mg/L) v vzorcih vina.....	42
Slika 13: Koncentracije citronske kisline (g/L) v vzorcih vina.....	43
Slika 14: Koncentracije vinske kisline (g/L) v vzorcih vina	44
Slika 15: Koncentracije jabolčne kisline (g/L) v vzorcih vina	45
Slika 16: Koncentracije mlečne kisline (g/L) v vzorcih vina	46
Slika 17: Koncentracija histamina (mg/L) v vzorcih vina.....	49
Slika 18: Koncentracija tiramina (mg/L) v vzorcih vina.....	51
Slika 19: Koncentracija putrescina (mg/L) v vzorcih vina.....	52
Slika 20: Koncentracija etanolamina (mg/L) v vzorcih vina.....	53
Slika 21: Koncentracija metilamina (mg/L) v vzorcih vina	54
Slika 22: Koncentracija butilamina (mg/L) v vzorcih vina.....	54
Slika 23: Skupne koncentracije kvantitativno določenih biogenih aminov v posameznih vzorcih vina.....	56

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Fiziološki in toksikološki učinki BA (Ladero in sod., 2010: 4)	9
Preglednica 2: Tvorba BA s strani različnih vrst kvasovk v sterilnem grozdnem moštu v laboratorijskih razmerah v dveh študijah (prirejeno po Smit in sod., 2008: 113)	11
Preglednica 3: Meje detekcije (LOD) in meje kvantitativne določitve (LOQ) organskih kislin	34
Preglednica 4: Meje detekcije (LOD) in meje kvantitativne določitve (LOQ) biogenih aminov	35
Preglednica 5: Rezultati osnovnih kemijskih analiz vina modra frankinja	36
Preglednica 6: Koncentracija posameznih organskih kislin v vzorcih vina modra frankinja	43
Preglednica 7: Vsebnost BA (mg/L) v vzorcih vina modra frankinja	47
Preglednica 8: Statistična primerjava spontane in vodene JMKF	48

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AF	alkoholna fermentacija
AK	aminokislina
BA	biogeni amini
HDC	histidin dekarboksilaza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
JMKF	jabolčno mlečnokislinska fermentacija
LOD	meja kvalitativne določitve
LOQ	meja kvantitativne določitve
MKB	mlečnokislinske bakterije
ND	spojina ni detektirana
ODC	ornitin dekarboksilaza
°Oe	Oechslejeve stopinje
O.I.V.	Organisation Internationale de la Vigne et du Vin
PCR	verižna reakcija s polimerazo
SO ₂	žveplov dioksid
TDC	tirozin dekarboksilaza

1 UVOD

V zadnjem času se vplivom vina na zdravje posveča veliko pozornosti. Med neželene spojine vina spadajo tudi biogeni amini (BA). Zaradi številnih toksičnih učinkov na zdravje posameznikov lahko pričakujemo, da bo v prihodnosti to poleg vsebnosti žveplovega dioksida, eden od pomembnejših kriterijev kakovosti vin.

BA so biološko aktivne organske dušikove spojine, ki lahko nastajajo kot posledica endogene dekarboksilacije aminokislin ali zaradi aktivnosti dekarboksilaza pozitivnih mikroorganizmov. V manjših koncentracijah so normalno prisotni v rastlinskih in živalskih celicah in so nujno potrebni za potek številnih procesov v organizmu. Večje koncentracije BA imajo za človeški organizem toksične učinke. BA pogosto vsebujejo živila, kot so: ribe, zorjeni siri, suhomesnati izdelki, kislo zelje, pivo, vino, ...

Jabolčno mlečnokislinska fermentacija (JMKF) je za alkoholno fermentacijo (AF) drugi najpomembnejši biokemijski proces v vinu. Osnovni namen JMKF je zmanjšanje kislosti, hkrati pa pride tudi do sprememb senzoričnih lastnosti vina. JMKF se pogosteje opravlja pri rdečih vinih, v procesu pa lahko pride tudi do nastanka BA predvsem zaradi delovanja mlečnokislinskih bakterij (MKB), ki imajo sposobnost dekarboksilacije aminokislin. Za tvorbo BA so najbolj odgovorne bakterije iz rodov *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* in *Oenococcus*. Manjše količine BA lahko nastanejo že med AF zaradi delovanja kvasovk. Najpomembnejši BA v vinu so putrescin, histamin, tiramin, kadaverin. Ker je tvorba BA zelo odvisna od seva se priporoča inokulacija vina s selekcioniranimi MKB *O. oeni*, ki med drugim ne tvorijo BA, predvsem histamina.

V magistrski nalogi smo določali vsebnost BA v vinu modra frankinja. Sorta izvira iz podonavskih dežel, v Sloveniji pa je najbolj razširjena v vinorodni deželi Posavje. Za sorto modra frankinja smo se odločili, ker je najbolj zastopana rdeča sorta grozdja v Beli krajini, poleg tega pa se vse več uporablja za pridelavo visoko kakovostnih rdečih vin, pri katerih se opravlja JMKF.

1.1 NAMEN DELA

Namen naloge je bil v osmih vzorcih vina modra frankinja določiti vsebnost BA. Želeli smo ugotoviti razlike v vsebnosti BA med vini, kjer je JMKF potekla spontano s pomočjo avtohtone mikrobiote in vini, kjer je bila dodana selekcionirana kultura *O. oeni*. Hkrati smo opravili tudi analizo osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov vina ter določili vsebnost organskih kislin. Zanima nas ali so različni fizikalno-kemijski parametri vina povezani z vsebnostjo BA.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Vzorci, kjer je bila dodana selekcionirana kultura MKB vsebujejo manj BA v primerjavi z vzorci, kjer je JMKF potekla spontano s pomočjo avtohtonih MKB.
- Vsebnost histamina v vzorcih je pod zakonsko mejo 2 mg/L.
- Preiskovani vzorci vsebujejo relativno majhne koncentracije BA in so primerljive z rezultati primerljivih študij v literaturi.
- Največjo vsebnost BA pričakujemo v vzorcih, kjer je JMKF potekla spontano.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOGENI AMINI

2.1.1 Definicija in kemijske značilnosti biogenih aminov

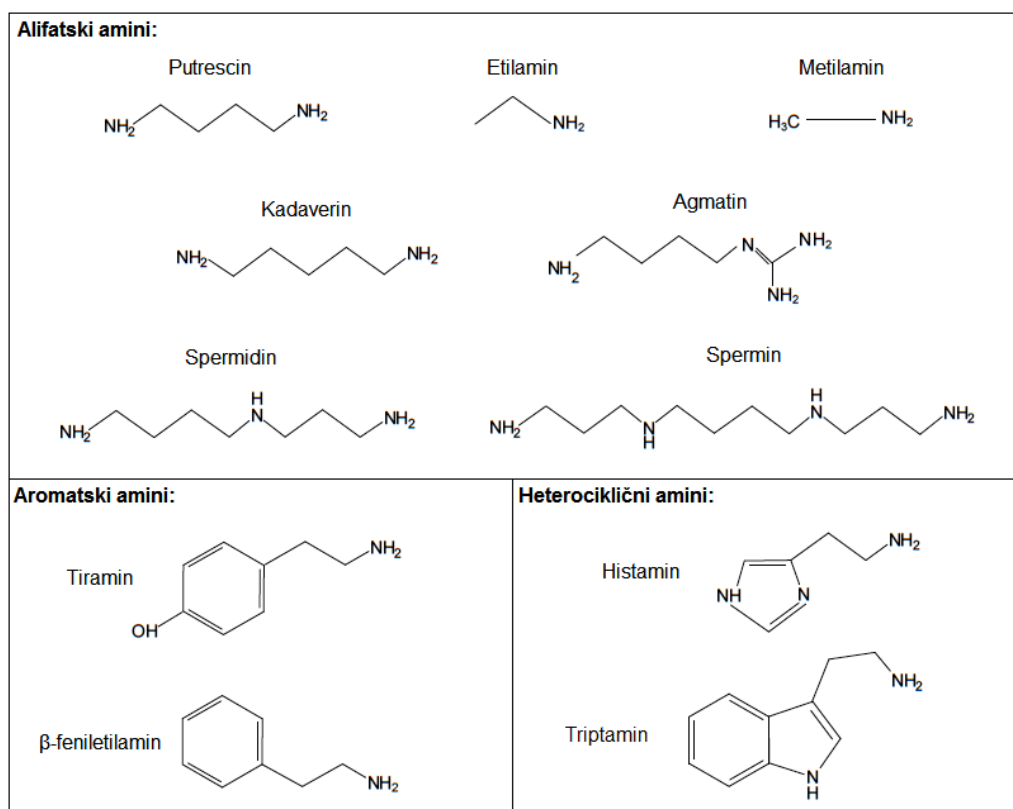
BA so bazične nizkomolekularne dušikove spojine, derivati aromatskih ali kationskih aminokislin. Imajo enega ali več pozitivnih nabojev in hidrofbni značaj. So produkt metabolizma mikroorganizmov, rastlinskih ali živalskih celic (Moreno-Arribas in Polo, 2009). BA nastanejo predvsem z dekarboksilacijo prekursorskih aminokislin ali z aminacijo in transaminacijo aldehydov in ketonov (Karovičová in Kohajdová, 2003).

Glede na kemijsko strukturo, delimo BA na (Silla Santos, 1996):

- alifatske (putrescin, kadaverin, spermin, spermidin, agmatin),
- aromatske (tiramin, feniletilamin),
- heterociklične (histamin, triptamin, serotonin).

Glede na število amino skupin, lahko BA razdelimo v tri skupine (Glória, 2003):

- monoamini (tiramin, feniletilamin),
- diamini (histamin, serotonin, triptamin, putrescin, kadaverin),
- poliamini (spermin, spermidin in agmatin).



Slika 1: Kemijske strukture najpomembnejših BA v vinu (prirejeno po Smit in sod., 2008: 114)

2.1.2 Nastanek biogenih aminov

Glede na nastanek, amine delimo na naravne in biogene. Naravni amini (spermin, spermidin, putrescin in histamin) nastanejo s pomočjo lastne sinteze organizma, biogeni amini pa nastanejo zaradi mikrobne dekarboksilacije prekursorskih aminokislin. Histamin je lahko naravnega (tkivni bazofilci) ali biogenega izvora (Glória, 2003).

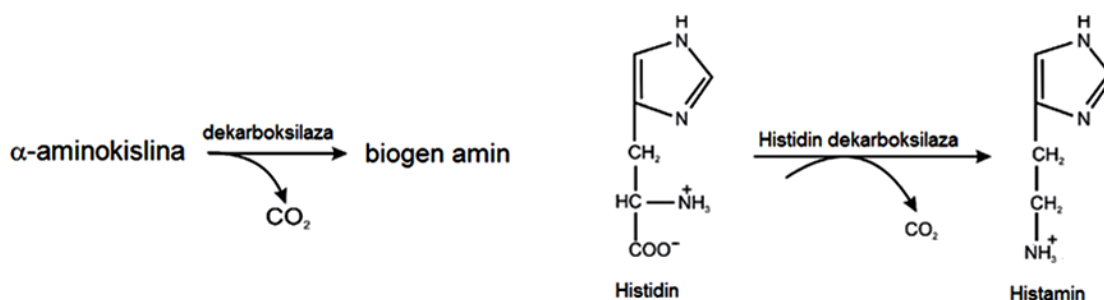
Tvorba BA je navadno rezultat dekarboksilacije prostih aminokislin s pomočjo encimov bakterijskega izvora. Pri dekarboksilaciji aminokislin pride do odstranitve α -karboksilne skupine in nastanka odgovarjajočega amina. Proteoliza bodisi avtolitična ali bakterijska, pomembno vpliva na nastanek prostih aminokislin, ki so lahko prekursorji za nastanek BA (Shalaby, 1996).

Nehlapni BA (histamin, putrescin, kadaverin, spermin, spermidin, agmatin, tiramin, triptamin) in hlapni amin feniletilamin se pretežno tvorijo z mikrobno dekarboksilacijo prekursorskih aminokislin. Hlapni amini (npr. izoamil amin, etanolamin), razen feniletilamina, pa nastajajo pri reduktivni aminaciji ali transaminaciji pripadajočega aldehida ali ketona (Moreno-Arribas in Polo, 2009).

Nekatere skupine bakterij značilno tvorijo določene BA. Tvorba putrescina in kadaverina je pogosta pri enterobakterijah, tvorba tiramina pa je značilna za enterokoke. Kljub temu je sposobnost tvorbe BA precej odvisna od seva bakterij in se pojavlja pri številnih rodovih in vrstah. Delno je za pojavnost dekarboksilazne aktivnosti odgovoren tudi horizontalni prenos genov med posameznimi sevi bakterij (EFSA, 2011).

Pogoji za tvorbo BA s strani mikroorganizmov so (Silla Santos, 1996):

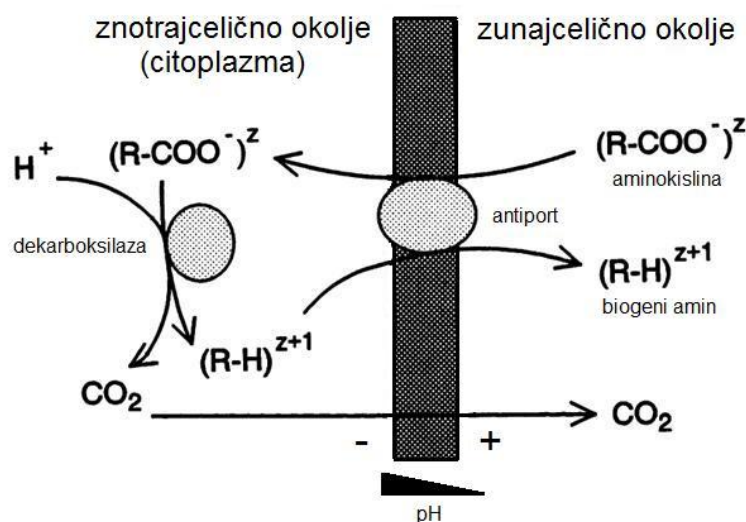
- prisotnost prostih aminokislin,
- prisotnost mikroorganizmov z dekarboksilazno aktivnostjo,
- primerne razmere za rast bakterij in aktivnost encima dekarboksilaze.



Slika 2: Princip dekarboksilacije aminokislin. Histamin nastane z dekarboksilacijo histidina pod vplivom encima histidin dekarboksilaza (prirejeno po Anli in Bayram, 2009: 89)

Poznamo dva načina dekarboksilacije aminokislin: piridoksal fosfat odvisna in piridoksal fosfat neodvisna dekarboksilacija. Pri piridoksal fosfat odvisni dekarboksilaciji služi piridoksal-5-fosfat kot kofaktor. Piridoksal neodvisne dekarboksilaze pa imajo kot prostetično skupino kovalentno vezan piruvil, ki je enovalentni radikal piruvične kisline. Večino aminokislinskih dekarboksilaz je odvisnih od piridoksal-5-fosfata (Linares in sod., 2011).

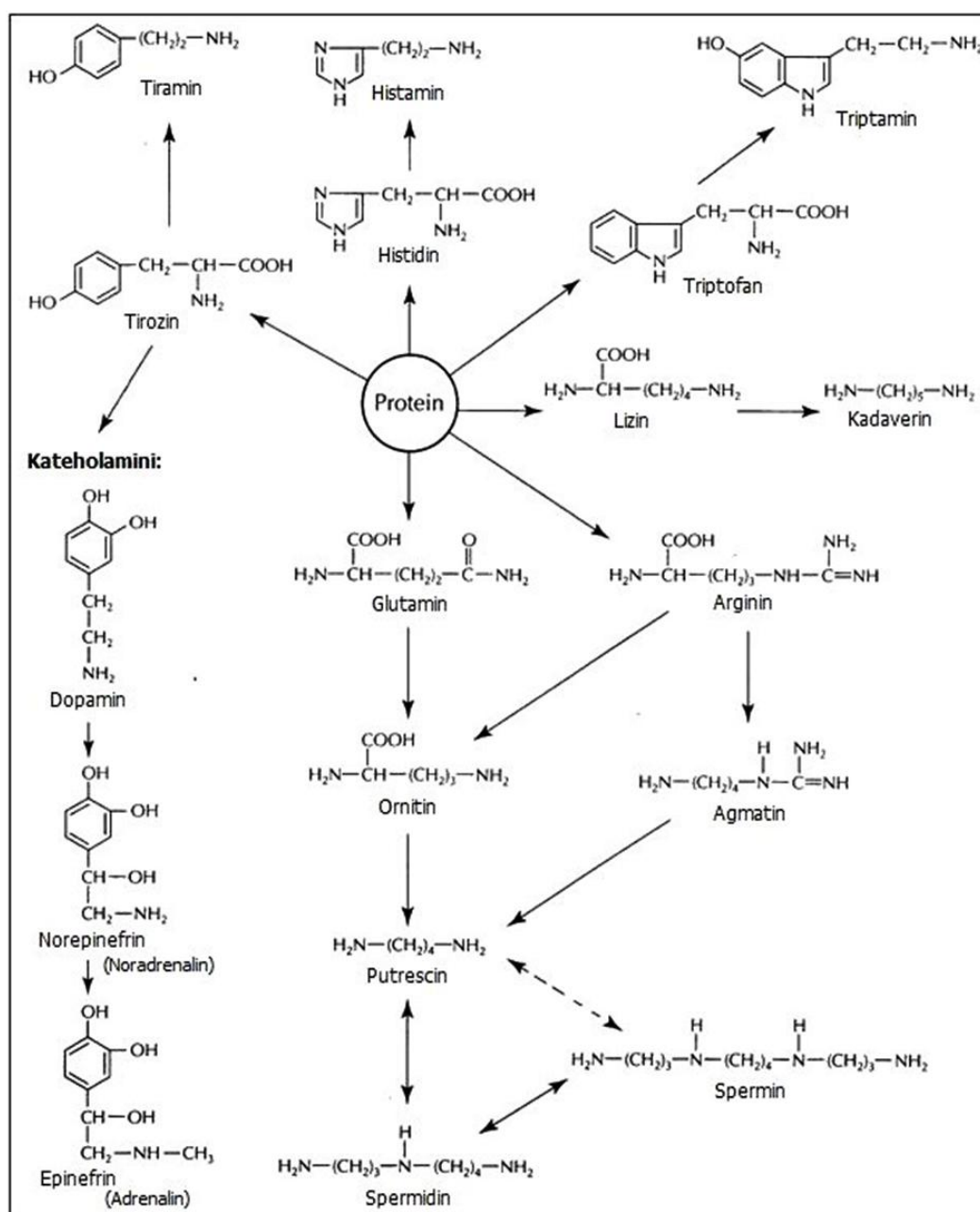
Histidin dekarboksilaze evkariontskih celic in Gram-negativnih bakterij uporabljajo piridoksal-fosfat kot kofaktor, dekarboksilaze Gram-pozitivnih bakterij pa so piridoksal-fosfat neodvisne. Tirozin dekarboksilaza katalizira dekarboksilacijo tirozina v tiramin. Kadaverin se tvori iz lizina s pomočjo lizin dekarboksilaze. Tvorba kadaverina je značilna predvsem za Gram-negativne bakterije. Putrescin se tvori iz ornitina s pomočjo ornitin dekarboksilaze. Možna je tudi pretvorba arginina v agmatin s pomočjo arginin dekarboksilaze, agmatin pa se lahko nadalje pretvori v putrescin s pomočjo treh encimov: agmatin deiminaze, putrescin karbamoil transferaze in karbamat kinaze. Dekarboksilaze niso striktno specifične do substratov, ki jih katalizirajo. To pomeni, da lahko v odsotnosti primarnega substrata, dekarboksilirajo aminokisline s podobno kemijsko zgradbo. Ornitin dekarboksilaza lahko katalizira nastanek kadaverina iz lizina, arginin dekarboksilaza v manjši meri dekarboksilira arginin v ornitin, tirozin dekarboksilaze pa lahko tvorijo feniletilamin iz fenilalanina (EFSA, 2011).



Slika 3: Proces dekarboksilacije in transporta aminokisline ter nastalega BA skozi membrano bakterijske celice (prirejeno po Molenaar in sod., 1993: 2869)

V procesu tvorbe BA ima ključno vlogo tudi transportni protein, ki deluje na principu antiporta in se nahaja na celični membrani, kjer je odgovoren za prenos substrata (AK) v celico in izločanje produktov dekarboksilacije (BA) iz citoplazme celice (EFSA, 2011). Reakcija dekarboksilacije, skupaj z elektrogeno izmenjavo prekursorske aminokisline in pripadajočega BA, ustvarja protonsko gonilno silo. V procesu dekarboksilacije se porabi

proton, kar povzroči nastanek transmembranskega pH gradienta (znotraj celice višji pH) in elektrokemijskega gradienta (znotraj celice negativen) (Trip in sod., 2012). Slednji nastane zaradi razlike v naboju med histidinom in histaminom (histamin ima en pozitivni naboj več), zato tak transport imenujemo elektrogeni antiport (Konings in sod., 1997). Protonska gonilna sila lahko poganja transport drugih snovi proti gradientu njihovega elektrokemijskega potenciala ali sproži nastanek molekule ATP s pomočjo membranske F_0F_1 -ATPaze (Konings in sod., 1997). Zaradi višje pH vrednosti v celici, omogoča proces dekarboksilacije aminokislin lažje preživetje celic v kislem in okolju, dekarboksilacija aminokislin pa za celico predstavlja posredno tudi vir energije (Molenaar in sod., 1993).



Slika 4: Metabolne poti za nastanek BA (prirejeno po Halász in sod., 1994: 43)

2.1.3 Funkcije biogenih aminov

BA so vir dušika in prekurzorji za sintezo hormonov, nukleinskih kislin, proteinov in alkaloidov. V organizmu sodelujejo pri regulaciji telesne temperature, krvnega tlaka, pH vrednosti želodca, vplivajo na delovanje možganskih funkcij, privzem hranil, ipd. (Karovičová in Kohajdová, 2003). Feniletilamin in tiramin povzročita povišanje krvnega tlaka, medtem ko histamin znižuje krvni tlak. Histamin je nevrottransmitter, mediator vnetja, sodeluje pri alergijskem odzivu in vpliva na prepustnost žil (Silla Santos, 1996).

Diamin putrescin ter poliamina spermidin in spermin so naravno prisotni v rastlinah, kjer sodelujejo pri številnih fizioloških procesih, kot so celična delitev, cvetenje, razvoj plodov, stresni odziv in staranje (Smit in sod., 2008). Prav tako so vključeni v sintezo DNA, RNA in proteinov ter sodelujejo pri rasti in stabilizaciji celične membrane (Košmerl in sod., 2013).

Prisotnost poliaminov v zadostnih koncentracijah je še posebej pomembna v hitro rastočih tkivih. Putrescin, spermidin in spermin imajo pomembno vlogo tudi pri rasti tumorjev, zato potekajo številne študije v smeri inhibicije biosinteze teh poliaminov pri bolnikih z rakom. Poliamini so nujno potrebni za ohranjanje visoke metabolne aktivnosti in imunskega sistema črevesja (Karovičová in Kohajdová, 2003).

BA so potencialni prekurzorji za nastanek karcinogenih N-nitrozo spojin. Sekundarni amini (putrescin, kadaverin, agmatin, spermin, spermidin) lahko reagirajo z nitriti in tvorijo karcinogene nitrozamine (Halász in sod., 1994).

Nekateri BA, kot na primer putrescin, kadaverin in spermin, lahko delujejo kot lovilci prostih radikalov. Dokazano je, da lahko poliamini inhibirajo oksidacijo večkrat nenasičenih maščobnih kislin, antioksidativna aktivnost pa je odvisna od števila amino skupin. Tudi tiramin izkazuje močne antioksidativne lastnosti (Silla Santos, 1996).

Poleg toksičnih učinkov, so BA v živilih tudi indikatorji kvara, predvsem pri ribah in mesu (Silla Santos, 1996).

2.1.4 Toksikološki učinki in metabolizem biogenih aminov

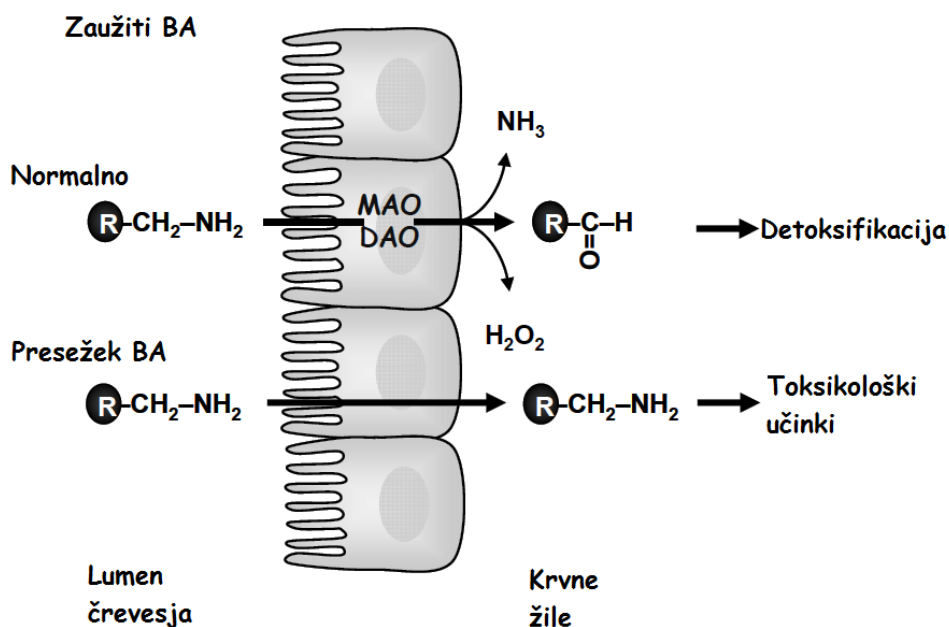
Čeprav so nekateri BA nujno potrebni za nemoteno delovanje številnih funkcij v organizmu, lahko zaužitje prevelikih količin BA povzroči toksične učinke. Najbolj pogoste so alimentarne intoksikacije s histaminom predvsem zaradi uživanja kontaminiranih rib ali sirov (Silla Santos, 1996).

V primerjavi z vinom so iz stališča BA načeloma bolj problematična živila, ki jih navadno uživamo pogosteje in v večjih količinah ter vsebujejo večje koncentracije BA. Sem sodijo sir, pivo, fermentirane mesnine, ribe, itd. (Moreno-Arribas in Polo, 2009). Vsebnosti BA v alkoholnih pijačah posvečamo posebno pozornost zato, ker lahko prisotni etanol poveča

toksične učinke BA tako, da direktno ali indirektno inhibira encime, ki so odgovorni za detoksifikacijo BA (Košmerl in sod., 2013).

Pri manjši količini BA, se le-ti hitro detoksificirajo s pomočjo amin oksidaz ali s konjugacijo. Amin oksidaze katalizirajo deaminacijo BA in nastanek aldehida, vodikovega peroksida in amonijaka. Problem se pojavi pri zaužitju večje količine BA ali v primeru inhibiranega oziroma gensko okvarjenega sistema za katabolizem BA. Toksična doza določenega BA je odvisna od tolerance posameznika, skupne koncentracije BA ter prisotnosti alkohola in drog v organizmu (Moreno-Arribas in Polo, 2009).

Toksičnost histamina in tiramina je odvisna od učinkovitosti katabolizma z monoamin oksidazami in diamin oksidazami. BA, kot so tiramin, putrescin in kadaverin, lahko zmanjšajo metabolizem histamina. S histaminom namreč tekmujejo za vezavna mesta encimov mono- in diamin oksidaz in tako zmanjšajo njihovo učinkovitost pri detoksifikaciji histamina. Na ta način je omogočen povečan prehod histamina iz črevesja v kri. Zaradi nespecifičnosti mono- in diamin oksidaz, lahko povzročijo motnje katabolizma tudi alkohol, acetaldehid in antidepresivi (Smit in sod., 2008).



Slika 5: Potek absorpcije in detoksifikacije BA v črevesju (prirejeno po Ladero in sod., 2010: 11)

Toksične koncentracije BA v alkoholnih pijačah znašajo 8 – 20 mg/L za histamin, 25 – 40 mg/L za tiramin in le 3 mg/L za feniletilamin (Karočičová in Kohajdová, 2003). Kanny in sod. (2001) poročajo, da lahko povprečen posameznik peroralno zaužije do 120 mg histamina preden se pojavijo značilni simptomi, intravenozno pa ta količina znaša le 7 µg. Zaužitje 5 – 10 mg histamina, lahko pri občutljivih posameznikih že povzroči toksične

učinke. Zaužitje 100 mg histamina predstavlja srednjo, 1000 mg pa visoko stopnjo toksičnosti za človeški organizem (Karovičová in Kohajdová, 2003).

Kljub temu, da je prag tolerance pri posameznikih različen, pride pri prevelikem vnosu do značilnih reakcij. Simptomi prevelikega vnosa histamina so izpuščaji, edem, bruhanje, glavobol, hipotenzija, palpitacije, driska, motnje v delovanju srca. Tiramin in feniletilamin lahko povzročata hipertenzijo in druge simptome povezane z njo (možganske krvavitve, migrena) tako, da spodbudita izločanje noradrenalina in norepinefrina, ki sta vazokonstriktorja. Putrescin in kadaverin sama po sebi nista toksična, lahko pa potencirata toksičnost histamina, tiramina, feniletilamina, saj motijo reakcije detoksifikacije (Moreno-Arribas in Polo, 2009).

Nekateri BA lahko poleg toksičnih učinkov na zdravje, negativno vplivajo na senzorično kakovost vin. Večje količine histamina lahko pri nekaterih posameznikih povzročijo dražеч občutek v grlu, višje koncentracije putrescina in kadaverina pa z vonjem po gnilem mesu negativno vplivajo na aromo vina (Smit in sod., 2008).

Ker se vsebnosti BA v vinih namenja vse več pozornosti, so nekatere države že določile zakonske meje glede vsebnosti BA. V Švici in Avstriji je najvišja dovoljena koncentracija histamina 10 mg/L, v Nemčiji 2 mg/L, na Nizozemskem 3 mg/L, v Belgiji 5-6 mg/L in v Franciji 8mg/L (Smit in sod. 2008). Pri nas je največja dovoljena koncentracija 2 mg/L (Pravilnik o pogojih ..., 2004).

Preglednica 1: Fiziološki in toksikološki učinki biogenih aminov (BA) (Ladero in sod., 2010: 4)

BA	Fiziološki učinki (vplivi)	Toksikološki učinki (simptomi)
Histamin	Je lokalni mediator, pomemben za prebavila, kožo in imunski sistem. Je tudi nevrottransmitter, vendar v možgane skoraj ne prehaja.	Glavobol, potenje, izcedek iz nosu, rdečica obraza, rdeči izpuščaji, omotica, srbenje, edem, urtikarija, oteženo požiranje, diareja, dihalna stiska, bronhospazem, povečan utripni volumen srca, tahikardija, ekstrasistole, motnje v krvnem tlaku.
Tiramin	Vpliva na sproščanje noradrenalina, ki je vazokonstriktor. Povzroči tudi dvig ravni glukoze v krvi in poveča utripni volumen srca.	Glavobol, migrena, nevrološke motnje, slabost, potenje, motnje dihanja, hipertenzija.
Putrescin	Sodeluje pri regulaciji genske ekspresije in celični rasti.	Povečan utripni volumen srca, tahikardija, hipotenzija.

2.2 MIKROORGANIZMI, POVEZANI S TVORBO BA V VINU

Tekom vinifikacije so lahko v tvorbo BA vključene vse skupine mikroorganizmov, ki so prisotne v vinu, vendar je dokazano, da so za nastanek BA v največji meri odgovorne mlečnokislinske bakterije (MKB) (Košmerl in sod., 2013).

2.2.1 Kvasovke

Poleg selekcioniranih kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*, lahko pri alkoholni fermentaciji (AF) sodelujejo tudi številne avtohtone kvasovke. Glede tvorbe BA s strani kvasovk, je bilo opravljenih več študij, od katerih večina primerja vpliv različnih vrst kvasovk na tvorbo histamina. Številni avtorji navajajo, da med AF zaradi aktivnosti kvasovk ne pride do znatnega povečanja koncentracij BA, kar pomeni, da kvasovke niso odgovorne za prisotnost BA v vinu (Smit in sod., 2008).

Landete in sod. (2007) so proučevali tvorbo BA pri 36-ih različnih sevih kvasovk, izoliranih iz mošta in vina. Preiskovane kvasovke so bile iz rodov *Aureobasidium*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula* in sevi iz vrst *S. cerevisiae*, *S. cerevisiae* var. *bayanus*, *S. cerevisiae* var. *chevalieri* in *S. cerevisiae* var. *Steiner*. Nobeden sev v sintetičnem mediju ni tvoril BA.

Caruso in sod. (2002) so v študiji proučevali tvorbo BA s strani skupno 50-ih sevov kvasovk vrst *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera apiculata*, *Candida stellata*, *Metschnikowia pulcherrima* in *Brettanomyces bruxellensis*. Pri vseh sevih kvasovk so bile koncentracije nastalega histamina zelo majhne ali celo pod mejo detekcije. Največje koncentracije skupnih BA so tvorile kvasovke vrste *Brettanomyces bruxellensis* (15,0 mg/L) sledile so kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* (12,1 mg/L). Pri slednjih gre tako veliko vsebnost skupnih BA pripisati predvsem izredno veliki koncentraciji etanolamina (6,0 mg/L). Pri ostalih vrstah kvasovk so bile skupne vrednosti BA manjše od 10 mg/L.

Podobno študijo so izvedli tudi Granchi in sod. (2005). Proučevali so tvorbo BA s strani enakih vrst kvasovk, kot pri Caruso in sod. (2002), ter dobili primerljive rezultate. Pomembno je poudariti, da je bila tvorba histamina, putrescina, kadaverina in metilamina, ne glede na sev kvasovk, relativno majhna (pod 2 mg/L). V preglednici 2 so prikazani rezultati obeh študij.

Torrea-Goni in Ancin-Azpilicueta (2001) sta v rose vinih proučevala tvorbo BA s strani različnih sevov *S. cerevisiae*. Izmerila sta rahlo povečane koncentracije putrescina, spermina, spermidina, feniletilamina in tiramina. Kvasovke s killer faktorjem so tvorile večje količine BA v primerjavi s killer nevtralnimi kvasovkami. Vidal-Carou in sod. (1990) niso zaznali tvorbe histamina med AF, so pa ugotovili minimalno tvorbo tiramina (0,6 mg/L).

Torrea in Ancin (2002) sta nadaljevala s podobnimi študijami in ugotovila, da vsebujejo vina iz inokuliranih moštov s selekcioniranimi kvasovkami večje koncentracije BA, v primerjavi z vini, kjer je AF potekala spontano z avtohtonimi kvasovkami. Vzrok temu naj bi bil v večji porabi prekursorskih aminokislin tekom AF s strani selekcioniranih kvasovk in manjša populacija avtohtonih kvasovk.

Preglednica 2: Tvorba BA s strani različnih vrst kvasovk v sterilnem grozdnem moštu v laboratorijskih razmerah v dveh študijah (prirejeno po Smit in sod., 2008: 113)

Vrsta kvasovk	Skupna povprečna vrednost BA (mg/L)	
	Caruso in sod. (2002)	Granchi in sod. (2005)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12,1	13,7
<i>Kloeckera apiculata</i>	6,2	9,7
<i>Candida stellata</i>	7,7	7,8
<i>Metschnikowia pulcherimma</i>	9,6	13,3
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	15,0	20,0

Pomembno je poudariti, da je tvorba BA zelo odvisna od seva, zato se za inokulacijo priporoča uporaba selekcioniranih sevov kvasovk, ki ne tvorijo BA, čeprav ta kriterij navadno ni upoštevan pri selekciji starterskih kultur. Čeprav kvasovke navadno ne tvorijo histamina, so lahko odgovorne za prisotnost drugih BA, ki lahko potencirajo toksičnost histamina (Romano in sod., 2007).

Buteau in sod. (1984) zavračajo tezo, da BA nastajajo med jabolčno mlečnokislinsko fermentacijo (JMKF) s strani MKB. Ugotovili so namreč, da je ravno med AF nastalo največ BA: agmatin, kadaverin, etanolamin, histamin, putrescin in tiramin. Med JMKF je celo prišlo do zmanjšanja koncentracij kadaverina, histamina in putrescina, povečale pa so se koncentracije agmatina in tiramina.

Znano je, da kvasovke tvorijo različne BA kot MKB. V literaturi je relativno malo podatkov o biokemiji, genetiki in regulaciji tvorbe BA s strani kvasovk. Glede na opravljene študije lahko sklepamo, da so kvasovke v manjši meri lahko odgovorne za prisotnost BA v vinu, vendar je tvorba minimalna in precej odvisna od seva. Vpliv kvasovk je tudi posreden, saj lahko spremenijo sestavo mošta tako, da porabljajo določene aminokisline in vplivajo na nastanek novih. Med avtolizo sproščajo aminokisline, ki lahko služijo kot prekursorji za nastanek BA (Smit in sod., 2008).

2.2.2 Mlečnokislinske bakterije

Največkrat so za prisotnost BA v vinu odgovorne MKB, ki imajo sposobnost dekarboksilacije aminokislin. MKB so skupina Gram- pozitivnih bakterij, nesporogene palčke ali koki, ki kot končni produkt fermentacije ogljikovih hidratov tvorijo mlečno kislino. V vinu, ki je zelo selektiven medij, lahko rastejo le nekateri sevi. Največji tvorci BA so bakterije iz rodov *Lactobacillus*, *Pediococcus*, in *Oenococcus* (Košmerl in sod., 2013).

Na področju proučevanja tvorbe BA s strani MKB je bilo do sedaj opravljenih veliko študij. Prve študije so pokazale, da največ BA tvorijo bakterije iz rodu *Pediococcus* (*Pediococcus cerevisiae*). Novejše študije te ugotovitve potrjujejo, čeprav so tvorbe BA, predvsem histamina, sposobni le nekateri sevi. Poleg tega so za tvorbo BA v vinu odgovorne tudi bakterije iz rodov *Lactobacillus*, *Leuconostoc* in *Oenococcus* (Moreno-Arribas in Polo, 2009). Sposobnost tvorbe BA s strani MKB je v veliki meri odvisna od seva in ne od vrste. Dekarboksilazna aktivnost je torej naključno prisotna znotraj različnih vrst bakterij *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* in *Oenococcus* (Smit in sod., 2008).

O. oeni je prevladujoča vrsta MKB v vinu in najbolj prilagojena na nizek pH vina. Nekateri avtorji poročajo, da so bakterije *O. oeni* lahko precej odgovorne za prisotnost histamina v vinu, čeprav je količina odvisna največ od seva (Košmerl in sod., 2013). Komercialni sevi *O. oeni*, so selekcionirani na podlagi številnih enoloških kriterijev, eden pomembnejših je odsotnost aminokislinske dekarboksilaze (Moreno-Arribas in Polo, 2009).

Moreno-Arribas in sod. (2003) so v razmerah *in vitro* testirali 39 sevov *O. oeni* in pri nobenem niso ugotovili tvorbe histamina, tiramina ali putrescina. Tudi Straub in sod. (1995) niso pri nobenem izmed 88 sevov *O. oeni* ugotovili tvorbe BA. Costantini in sod. (2006) so v gojitvenem mediju testirali 92 sevov *O. oeni*, nobeden ni tvoril BA. S pomočjo metode PCR so potrdili odsotnost genov za dekarboksilazo.

Nasprotno, nekateri avtorji poročajo, da je *O. oeni* lahko v precejšnji meri odgovoren za prisotnost BA v vinu, seveda odvisno od seva. Guerrini in sod. (2002) so ugotovili, da lahko *O. oeni* znatno prispeva h končni koncentraciji BA v vinu, katerih tvorba se močno razlikuje glede na sev. Izmed 44-ih sevov, je v optimalnih pogojih v sintetičnem mediju, kar 27 sevov tvorilo histamin v koncentracijah 1 – 33 mg/L. Poleg histamina je 7 sevov je tvorilo še putrescin (9,9 – 146 mg/L) in kadaverin (14,8 – 43,6 mg/L).

Podobno so ugotovili tudi Coton in sod. (1998), ki so med 118-imi vini iz jugozahodne Francije s pomočjo PCR metode ugotavljali prisotnost histidin dekarboksilaza pozitivnih bakterij. Pri skoraj polovici testiranih vin so ugotovili prisotnost bakterij, ki imajo gen za histidin dekarboksilazo, od tega so vsi sevi pripadali vrsti *Oenococcus oeni*. Vina, pri katerih niso našli genskega zapisa za histidin dekarboksilazo, niso vsebovala histamina.

Vina, v katerih so potrdili prisotnost dekarboksilaza pozitivnih bakterij, pa so vsebovala histamin v različnih koncentracijah.

Do leta 2003 ni bilo podatkov, ki bi dokazovali vpletenost sevov *Leuconostoc* v tvorbo BA. Moreno-Arribas in sod. (2003) so dokazali, da ima sev *Leuconostoc mesenteroides* veliko sposobnost tvorbe tiramina, saj so 3 od 17 sevov tvorili tiramin. Landete in sod. (2007) pa so izolirali drug sev *Leuconostoc mesenteroides*, kateri je tvoril znatne količine histamina.

Landete in sod. (2005a) so proučevali prisotnost gena za histidin dekarboksilazo in tvorbo histamina pri 136-ih sevih MKB, izoliranih iz vina. S pomočjo encimatske metode in HPLC so ugotovili, da so številni preiskovani sevi *O. oeni*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus mali*, *Leuconostoc mesenteroides* in *Pediococcus parvulus* v sintetičnem mediju tvorili histamin. Najvišje koncentracije histamina so tvorili sevi *L. hilgardii* (povprečno 145 mg/L) in *P. parvulus* (povprečno 240 mg/L), medtem ko so bile koncentracije histamina pri *O. oeni* bistveno nižje (povprečno 25 mg/L). Kar 78 % preiskovanih sevov *O. oeni* je tvorilo histamin.

Sebastian in sod. (2011) so proučevali tvorbo BA pri MKB, izoliranih iz vina. Od skupno 57 sevov *Lactobacillus brevis* je tiramin tvorilo kar 55 sevov, medtem ko je histamin tvorilo 11 sevov *Lactobacillus brevis*. Pri vrstah *Lactobacillus delbrueckii* in *Oenococcus oeni* niso ugotovili tvorbe BA.

Moreno-Arribas in sod. (2000) so proučevali tvorbo tiramina s strani MKB. Ugotovili so, da so za nastanek tiramina v vinu najbolj odgovorne bakterije rodu *Lactobacillus*, predvsem *L. brevis* in *L. hilgardii*. Pri nobenem sevu *O. oeni* niso ugotovili tvorbe tiramina. Tudi rezultati študije, ki so jo opravili Landete in sod. (2007) kažejo na to, da so za tvorbo tiramina odgovorne bakterije rodu *Lactobacillus*, predvsem *L. brevis*. Poleg tega so vsi sevi, ki so tvorili tiramin, tvorili tudi feniletilamin.

Landete in sod. (2007) predvidevajo, da za pojav nekaterih BA v vinu, kot so putrescin, kadaverin in triptamin, niso odgovorne MKB, temveč izvirajo predvsem iz grozdja. Granchi in sod. (2005) poročajo, da nekateri sevi *O. oeni* lahko tvorijo putrescin, predvsem v primeru dekarboksilacije arginina, ki je ena najpomembnejših aminokislin v moštu in vinu. Marcobal in sod. (2004) so izolirali in identificirali sev *O. oeni*, ki ima izražen gen za ornitin dekarboksilazo in lahko tvori putrescin. Genski zapis so nato primerjali z 42-imi drugimi sevi in ugotovili, da nobeden izmed njih nima gena za ornitin dekarboksilazo.

2.2.3 Druge bakterije

Landete in sod. (2007) so na 40-ih različnih sevih očetnokislinskih bakterij proučevali tvorbo BA v sintetičnem mediju. Pri nobenem sevu niso zaznali tvorbe histamina, tiramina,

feniletilamina, putrescina, kadaverina in triptamina. Tudi ostala literatura ne omenja tvorbe BA s strani oacetnokislinskih bakterij.

Chang in sod. poročajo, da so v tajvanskih sadnih vinih izolirali dva seva iz rodu *Bacillus* in en sev oacetnokislinskih bakterij, ki so tvorili histamin (Chang in sod., 2008).

2.2.4 Plesni

Prisotnost plesni *Botrytis cinerea* na grozdju, lahko vpliva na povečano koncentracijo BA v grozdju. Plesen penetrira skozi jagodno kožico ter vpliva na sestavo in količino aminokislin, ogljikovih hidratov in poveča količino aminov v grozdni jagodi. Za kvar s plesnijo so poleg nagnitega grozdja, okuženega s plesnijo *Botrytis cinerea*, problematična tako imenovana botricidna vina (Tokaj, vina poznih trgateg, ledena vina) (Smit in sod., 2008).

2.3 FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA NASTANEK BA V GROZDJU IN VINU

Koncentracija BA v vinu je precej odvisna od prisotnosti prekursorskih aminokislin v moštu oziroma vinu in mikroorganizmov, sposobnih dekarboksilacije aminokislin. Na vsebnost aminokislin v moštu vplivajo tehnologija vinifikacije, sorta grozdja, lega, letnik, idr. Nekateri dejavniki povečajo koncentracijo prekursorskih aminokislin, drugi pa vplivajo na encimsko aktivnost in rast mikroorganizmov, ki lahko tvorijo BA (Moreno-Arribas in Polo, 2009).

2.3.1 Vinogradniški vplivi

Nekateri BA, kot na primer putrescin in ostali poliamini, so lahko prisotni že v grozdni jagodi. Končna koncentracija putrescina v vinu je bolj odvisna od njegove vsebnosti v grozdju, kot od postopka vinifikacije (Moreno-Arribas in Polo, 2009).

Sorta cabernet sauvignon naj bi imela visoke koncentracije putrescina, kadaverina in spermidina v perikarpu grozdnih jagod, poleg tega so le-ti v večjih koncentracijah tudi v grozdnih pečkih (Smit in sod., 2008).

Pomanjkanje kalija v prsti je lahko vzrok za večje koncentracije putrescina v grozdju, medtem ko pomanjkanje vode v sušnih letih nima neposrednega vpliva na količino BA v grozdju oz. vinu (Moreno-Arribas in Polo, 2009).

Koncentracija BA je odvisna tudi od sorte grozdja in prehrane vinske trte, kar vpliva na aminokislinsko sestavo in koncentracijo prekursorskih aminokislin. Tudi stopnja zrelosti, zdravstveno stanje grozdja, geografska lega in tip prsti vplivajo na količino BA v vinu. Gnojenje z dušikom vpliva na večjo vsebnost poliaminov v grozdju ter lahko poveča koncentracijo aminokislin v grozdju in posledično tudi vsebnost BA v vinu. Pri sortah z

večjim deležem asimilacijskega dušika je navadno končna koncentracija BA vinu večja (Smit in sod., 2008).

Koncentracija poliaminov v grozdju je manjša v vinogradih z ozelenitvijo tal. Vsebnost BA (predvsem etilamina in izopentilamina) v gnilem grozdju je precej večja, prav tako vsebnost BA narašča s stopnjo infekcije z plesnijo *Botrytis cinerea* (Grossmann in sod., 2009).

Cecchini in sod. (2005) so primerjali vpliv sorte na koncentracijo BA v vinu. Izmed sort merlot, syrah, sangiovese, cesanese d'affile in cabernet franc, so bile v povprečju najvišje koncentracije BA izmerjene pri sorti cabernet franc. Več študij je pokazalo, da sorta modri pinot v povprečju vsebuje višje koncentracije BA od sorte cabernet sauvignon (Smit in sod., 2008).

Del Prete in sod. (2009) so na sedmih različnih sortah grozdja proučevali vpliv grozdja na vsebnost BA v vinu. Pri vseh sortah so ugotovili prisotnost etanolamina, etilamina in putrescina v grozdju. Prisotnosti tiramina v grozdju niso zaznali, čeprav nekateri avtorji navajajo, da je tiramin v manjših koncentracijah lahko prisoten v grozdju. Rezultati študije potrjujejo, da je vsebnost BA v grozdju odvisna od sorte in precej tudi od letnika, kar pomeni, da vremenske razmere bistveno vplivajo na nastajanje BA v grozdju.

Tudi Martin-Álvarez in sod. (2006) navajajo, da lahko povprečna vsebnost BA razen kadaverina precej variira med različnimi letniki. Vzrok je delno v različnih koncentracijah aminokislinskih prekurzorjev med različnimi letniki, delno pa tudi v diverziteti mikrobiote grozdja, ki se med letniki lahko razlikuje.

Cecchini in Morassut (2010) sta proučevala vpliv skladiščenja grozdja na vsebnost BA v grozdju sort chardonnay, rizling in sauvignon. V moštih iz takoj stisnjenega grozdja so pri vseh treh sortah ugotovili prisotnost etanolamina, etilamina in putrescina, pri sorti chardonnay pa tudi tiramin. Pri moštih, kjer so grozdje pred stiskanjem skladiščili 24 ali 48 ur, pa so ugotovili tudi prisotnost agmatina, histamina, kadaverina in tiramina. Rezultati kažejo, da so etanolamin, etilamin, putrescin ter delno tiramin, izvirali iz grozdja, ostali BA pa so nastali naknadno zaradi mikrobiološke aktivnosti tekom skladiščenja grozdja.

Marques in sod. (2008) so proučevali vpliv regije, sorte grozdja in uporabo fungicidov na vsebnost BA v vinih. Rezultati so potrdili, da so koncentracije BA v vinu odvisne od sorte grozdja, razlikujejo pa se tudi med posameznimi pokrajinami. Vina pridelana iz grozdja, ki je bilo tretirano z fungicidi so vsebovala manjše koncentracije BA v primerjavi z vini iz grozdja, pridelanega brez uporabe fungicidov.

2.3.2 Vpliv alkoholne fermentacije

Marques in sod. (2008) so proučevali vpliv aktivatorjev fermentacije. Uporabili so dva aktivatorja fermentacije in sicer prvega so dodali v mošt pred začetkom AF, drugega pa po koncu AF, pred začetkom JMKF. Ugotovili so, da dodatek aktivatorjev vrenja nima posebnega vpliva na koncentracijo BA.

Del Prete in sod. (2009) so ugotovili, da je med AF prišlo do povečanja koncentracij etanolamina. Slednji je prekurzor fosfatidilholina, ki je najbolj zastopan fosfolipid v membrani evkariontskih celic in je zaradi regulacije metabolizma fosfolipidov verjetno prišlo do sproščanja v vino. Med AF je prišlo do znatnega zmanjšanja koncentracije putrescina. Razlog je verjetno v tem, da ga kvasovke vključijo v metabolizem, kot prekurzor za spermidin ali spermin. Med AF je prišlo tudi do znižanja koncentracije etilamina, verjetno zato, ker predstavlja vir ogljika in dušika za kvasovke. Med JMKF ni prišlo do znatnih sprememb koncentracij putrescina in etilamina.

García-Marino in sod. (2010) so proučevali vpliv postopkov vinifikacije na tvorbo BA v rdečih vinih. Do največjega povečanja skupne koncentracije BA v vinih je prišlo ob koncu AF, kar le potrjuje dejstvo, da so nekateri sevi *S. cerevisiae* sposobni tvoriti BA. Med AF je prišlo predvsem do povečanja koncentracije etilamina, kar je v nasprotju z ugotovitvami Del Prete in sod. (2009).

2.3.3 Vpliv maceracije

Maceracija omogoča ekstrakcijo številnih komponent iz grozdja, predvsem fenolnih spojin, proteinov, polisaharidov in aminokislin, ki so med drugim tudi prekurzorji BA. Pri večini rdečih vin poteka maceracija hkrati z AF. Maceracija lahko pri nekaterih rdečih vinih poteka tudi po končani AF. Pri hladni maceraciji se belo grozdje macerira pri nizki temperaturi pred AF. V primeru dodatka pektolitičnih encimov se ekstrahira v mošt še več snovi, ki vplivajo na koncentracijo BA (Smit in sod., 2008).

Kovačević Ganić in sod. (2009) so proučevali vsebnost BA v vinu v različnih tehnoloških stopnjah pridelave. V vinu, kjer so opravili nekaj-urno hladno maceracijo pred začetkom AF, so izmerili večje koncentracije BA v primerjavi z vini, kjer maceracije ni bilo.

Martín-Álvarez in sod. (2006) so ugotovili, da trajanje maceracije precej vpliva na koncentracijo BA v vinu. Vina, kjer je maceracija potekala več kot 10 dni, so vsebovala znatno večje koncentracije BA, v primerjavi z vini, kjer je bila maceracija krajša od 10 dni.

Smit in sod. (2013) so primerjali vpliv maceracije na koncentracijo aminokislin in tvorbo BA v vinu. Presenetljivo so v vinu, kjer maceracije niso opravili, izmerili velike koncentracije številnih aminokislin in BA. Delno je lahko za to odgovorna manjša koncentracija fenolnih spojin, kar ugodno vpliva na tvorbo BA. Največje koncentracije BA so izmerili v vinih, kjer so opravili klasično in podaljšano maceracijo. Pri vinih, kjer so

opravili hladno maceracijo, so takoj po končani hladni maceraciji izmerili večje vsebnosti aminokislin in BA, vendar so bile končne vrednosti BA v teh vinih najmanjše. Kaže, da hladna maceracija negativno vpliva na tvorbo BA.

Soleas in sod (1999) niso našli nobene povezave med trajanjem maceracije in vsebnostjo BA v vinu.

2.3.4 Vpliv pektolitičnih encimov

Uporaba pektolitičnih encimov je v procesu vinifikacije zelo pogosta, saj povečamo ekstrakcijo komponent, dosežemo boljši učinek stiskanja in boljše bistenje. Vendar imajo tovrstni encimi lahko sekundarno aktivnost, med drugim tudi proteolitično aktivnost, ki se odraža v povečanju koncentracije aminokislin v moštu (Moreno-Arribas in Polo, 2009).

Martín-Álvarez in sod. (2006) so ugotovili, da dodatek 2 g pektolitičnega encima / 100 kg grozdja ne vpliva na povečanje koncentracije BA v vinu.

Smith in sod. (2013) so primerjali vpliv pektolitičnega encima pri hladni maceraciji na koncentracijo BA v vinu. Ugotovili so, da je vpliv dodanega pektolitičnega encima na koncentracijo BA v vinu minimalen in zanemarljiv.

2.3.5 Vpliv fenolnih spojin

Med maceracijo se ekstrahirajo tudi polifenoli. Te spojine so odgovorne za številne kemijske reakcije v grozdju in vinu, saj so med drugim vključene v oksidacijske reakcije (so močni antioksidanti) in vplivajo na barvo in okus vina. Znano je, da fenolne spojine lahko pozitivno in negativno vplivajo na rast in metabolizem MKB. Galna kislina, katehini, kaftarna kislina, kutarna kislina, ferulična kislina, *p*-kumarna kislina in prosti antociani lahko stimulirajo rast MKB (Smit in sod., 2008).

Alberto in sod. (2007) so primerjali vpliv fenolnih spojin na metabolizem agmatina s strani *L. hilgardii* X₁B. Pretvorba agmatina v putrescin poteka brez aktivnosti aminokislinske dekarboksilaze. Ugotovili so, da je tvorba putrescina manjša v prisotnosti fenolnih komponent z izjemo kvercetina in galne kisline.

Tkachenko in sod. (2004) so ugotovili, da je putrescin sposoben zaščititi DNA pred poškodbami s strani reaktivnih kisikovih zvrsti in tako povečati preživelost celic *Escherichia coli* v okolju oksidativnega stresa. Fenoli so močni antioksidanti in ščitijo celice pred oksidativnim stresom, zato je tvorba putrescina v njihovi pristnosti manjša.

2.3.6 Vpliv ležanja vina na drožeh

Vloga finih droži je glede vpliva na tvorbo BA v vinu ključna, saj predstavljajo zalogo proteinov, peptidov in aminokislin. Poleg tega se med avtolizo kvasovk še dodatno

sproščajo aminokisline, vitamini in drugi rastni faktorji, ki omogočajo rast in aktivnost bakterij. Poleg kvasovk, vsebujejo fine droži še številne druge mikroorganizme (predvsem MKB), ki lahko tvorijo BA (Pérez-Serradilla in Luque de Castro, 2008).

Na področju vpliva droži na tvorbo BA v vinu, je bilo opravljenih več študij. Pri večini so rezultati pokazali, da podaljšan stik s kvasnimi drožmi vodi v večje koncentracije BA v vinu (Pérez-Serradilla in Luque de Castro, 2008).

Martín-Álvarez in sod. (2006) so preučevali vpliv ležanja na drožeh na koncentracijo BA v vinu. Ugotovili so, da so vina, ki so dva meseca ležala na drožeh, vsebovala večje koncentracije metilamina in putrescina. Vzrok je najverjetneje v hidrolizi proteinov do peptidov in nadalje do aminokislin, ki so prekursorji BA. Koncentracije tiramina in histamina pa so bile manjše v vinih, ki so bila v podaljšanem stiku z drožmi. Avtorji predvidevajo, da so bakterijske celice porabile del tiramina za izgradnjo ogljikohidratnega skeleta ali amino skupin.

Marques in sod. (2008) so ugotovili, da vina, ki so ležala v stiku z drožmi (2 ali 6 mesecev) vsebujejo povečane koncentracije tiramina in putrescina, medtem ko se vsebnost histamina ni povečala.

2.3.7 Vpliv jabolčno mlečnokislinske fermentacije

JMKF je pomemben biokemijski proces s pomočjo katerega zmanjšamo koncentracijo skupnih kislin, hkrati pa izboljšamo senzorične lastnosti vina, v kolikor je proces izpeljan pravilno s pomočjo zelenih mlečnokislinskih bakterij. Poleg tega se poveča mikrobiološka stabilnost vina. JMKF je zelo priporočljiva za večino rdečih in nekatera bela vina. *Oenococcus oeni* so najpomembnejše bakterije JMKF, saj so najbolj prilagojene na okolje v vinu (nizek pH, visoka vsebnost etanola, majhna vsebnost hranil). Kljub temu, da se zaradi svojih lastnosti uporabljajo kot najpogostejša starterska kultura, nekatere študije kažejo, da lahko nekateri sevi *Oenococcus oeni* tvorijo različne BA (Corzani, 2007). Pomembno je, da po zaključeni JMKF onemogočimo razvoj avtohtonih MKB, zaradi morebitne tvorbe BA (Košmerl in sod., 2013).

Martín-Álvarez in sod. (2006) so v 224-ih vzorcih španskih rdečih vin primerjali spontano in vodeno JMKF, kjer so uporabili startesko kulturo. V vinih, kjer so uporabili selekcionirano kulturo so izmerili manjše koncentracije BA v primerjavi z vini, kjer je JMKF potekala z avtohtono mikrobioto. Starterske kulture delno preprečijo rast avtohtoni mikrobioti in tako preprečijo nastanek BA s pomočjo neželenih sevov.

Inokulacija s selekcionirano startersko kulturo je torej zelo priporočljiv način zmanjševanja vsebnosti BA v vinu. V primerjavi z naknadno inokulacijo po končani AF se je ko-inokulacija s selekcionirano kulturo ob začetku AF izkazala za celo bolj učinkovit način preprečevanja tvorbe BA v vinu (Moreno-Arribas in Polo, 2009).

Schneider in sod. so v študiji dokazali, da imajo vina, kjer je bila po koncu AF dodana selekcionirana kultura MKB manjšo vsebnost histamina v primerjavi z vini, kjer je JMKF potekala spontano (Košmerl in sod., 2013).

Marques in sod. (2008) so proučevali vpliv dodatka aktivatorjev fermentacije in uporabo selekcionirane starterske kulture MKB na tvorbo BA v belih in rdečih vinih. Ugotovili so, da aktivatorji fermentacije nimajo posebnega vpliva. Vina, kjer so uporabili selekcionirane MKB, so vsebovala bistveno manjše koncentracije BA, v primerjavi z vini, kjer je JMKF potekala spontano z avtohtono mikrobioto. Rezultati študije kažejo, da je uporaba selekcioniranih kultur smiselna in priporočljiva, saj na ta način lahko pridelamo vina z manjšimi koncentracijami BA.

2.3.8 Vplivi med zorenjem in staranjem vina

Landete in sod. (2005) so v prvih šestih mesecih zorenja vina v steklenici opazili naraščanje koncentracije histamina. Tudi Kovačević Ganić in sod. (2009) poročajo o povečanju koncentracij BA v prvih mesecih po končani JMKF v vinu sorte sauvignon. Študija, ki so jo izvedli Herbert in sod. (2005), kaže na konstantno naraščanje koncentracije BA v rdečih in belih vinih v prvih 18. mesecih po končani JMKF. Izjema sta tiramin in putrescin, katerih koncentracije so se povečale takoj po končani JMKF.

Do naknadnega povečevanja koncentracij BA po končani JMKF je najverjetneje prišlo zaradi premajhne koncentracije žveplovega dioksida v vinu, ki ni popolnoma preprečil nadaljnje biokemijske in encimske aktivnosti. Delno je za to odgovoren tudi razmeroma visok pH, ki predstavlja ugodnejše pogoje za mikrobiološko aktivnost, hkrati pa je pri višji pH-vrednosti antimikrobni učinek žveplovega dioksida manjši, saj se delež molekularnega žveplovega dioksida z višanjem pH vrednosti zmanjšuje. Tudi ležanje vina na drožeh poveča možnost za naknadno tvorbo BA (Smit in sod., 2008).

Coton in sod. (1998) so zaznali histidin dekarboksilazno aktivnost tudi po tem, ko v vinu ni bilo več živih celic. To kaže, da se lahko del BA tvori tudi kasneje tekom zorenja oz. staranja vina. Poleg tega je večina aminov, kot tudi dekarboksilaznih encimov toplotno stabilnih, kar pomeni, da s toplotnimi postopki ne moremo inhibirati njihove aktivnosti (Smit in sod., 2008).

Po začetnem povišanju koncentracij BA, pride kasneje med staranjem vin do zmanjšanja koncentracije BA, delno tudi zaradi delovanja oksidacijskih encimov, prisotnih v nekaterih bakterijah. To pojasnjuje dejstvo, da so Vasquez-Lasa in sod. (1998) v povprečju izmerili večje koncentracije histamina v mladih rdečih vinih iz Rioje v Španiji, v primerjavi s tistimi, ki so bila starana na tradicionalen način.

Hernández-Orte in sod. (2008) so proučevali tvorbo BA v vinih sorte cabernet sauvignon in tempranillo. Primerjali so spremembe v koncentraciji BA in aminokislin tekom

vinifikacije in zorenja vin v lesenih sodčkih. Opazili so korelacijo med skupno koncentracijo BA in skupno koncentracijo aminokislin, kakor tudi korelacijo med naraščanjem koncentracije določenega BA in manjšanjem koncentracije prekursorske aminokisline. Uporaba komercialnih starterskih kultur se je izkazala za priporočljivo, saj so vina, kjer je JMKF potekala z avtohtonimi MKB, vsebovala znatno večje koncentracije BA. Ugotovili so, da je v času zorenja nastalo več BA, kot med JMKF. Pri vinih, inokuliranih s selekcionirano kulturo *O. oeni*, so koncentracije histamina v vseh fazah zorenja primerljive s kontrolo, kjer JMKF ni potekla. Predvsem v vinih, kjer je JMKF potekala spontano, se je tekom 6-mesečnega zorenja, koncentracija histamina povečala za nekajkrat. To kaže na bodisi naknadno bakterijsko aktivnost ali prisotnost ekstracelularnih dekarboksilaznih encimov v času po končani JMKF. Pomembno je poudariti, da se je koncentracija histamina tekom zorenja povečala tudi pri kontrolnih vzorcih, kjer JMKF ni potekla. Populacija MKB se je tekom zorenja vina zmanjšala skoraj na nič, čeprav se je pri nekaterih vzorcih, tudi kontrolnih, po šestih mesecih zorenja populacija rahlo povečala, najverjetneje zaradi padca koncentracije prostega SO_2 .

Znano je, da nihanja temperature lahko povzročijo neželjeno kemijsko, mikrobiološko in encimsko aktivnost, vendar je direkten vpliv temperature na tvorbo BA v času zorenja vin, minimalen. Izkazalo se je, da je tvorba histamina med zorenjem vina pri 20 °C rahlo večja, kot pri temperaturi 4 °C ali 35 °C. Največ BA tekom zorenja nastane v prvih 45-ih dneh po končani JMKF zaradi dekarboksilazne aktivnosti (Smit in sod., 2008).

Tudi vrsta posode v kateri poteka zorenje vpliva na koncentracijo BA. Dokazano je, da v posodah iz nerjavnega jekla povprečno nastane več BA, kot v lesenih sodih. Sestavine lesa, predvsem fenolne spojine, naj bi vplivale na skupno koncentracijo BA. Vrsta hrasta iz katerega je narejen sod ne vpliva na koncentracijo BA. Tudi uporaba lesnih čipsov ali enoloških taninov lahko zmanjša količino BA. Po drugi strani pa lahko zorenje v lesenih sodih poveča verjetnost za kontaminacijo z bakterijami, prisotnimi v posodi (Moreno-Arribas in Polo, 2009).

2.3.9 Vpliv stila vina

Navadno so pri rdečih vinih koncentracije BA večje, kot pri belih ali rose vinih. Razlog je predvsem v JMKF, ki pogosteje poteka pri rdečih vinih. V primeru JMKF, so tudi pri belih in rose vinih koncentracije BA primerljive oz. malo manjše v primerjavi z rdečimi vini. Bela vina vsebujejo navadno tudi manjše koncentracije aminokislinskih prekursorjev in imajo nižji pH, poleg tega razen nekajurne hladne maceracije, navadno belih vin ne maceriramo. Delni razlog je lahko tudi, da je uporaba bentonita pri rdečih vinih manjša in bolj poredka, kakor pri belih vinih. Bentonit namreč adsorbira del aminov. Med JMKF lahko pride do dodatnega sproščanja prekursorskih aminokislin zaradi avtolize kvasovk (Smit in sod., 2008).

2.3.10 Vpliv fizikalno-kemijske sestave vina

Fizikalno-kemijski faktorji vina, kot so pH, temperatura, SO₂, številne snovi vina ter produkti fermentacije, lahko vplivajo na količino in sestavo mikroorganizmov v vinu, kot tudi na dekarboksilazno encimsko aktivnost in gensko ekspresijo le-te (Smit in sod., 2008).

- **Vpliv sestave vina na encimsko aktivnost in ekspresijo gena za dekarboksilazo**

Prisotnost gena za histidin dekarboksilazo v vinu ne pomeni nujno, da je encim aktiven in da se bo tvoril histamin. V mediju, kjer primanjkuje hranil, lahko dekarboksilacija histidina predstavlja dodaten vir energije za celice. Čeprav navadno nastane več histamina v mediju, kjer primanjkuje hranil, ima lahko prisotnost L – jabolčne kisline in glukoze stimulativen učinek na aktivnost aminokislinske dekarboksilaze (Smit in sod., 2008). Moreno-Arribas in sod. (2000) poročajo, da je TDC pozitiven sev *Lactobacillus*, tvoril več tiramina v prisotnosti glukoze. Nasprotno pa so Arena in sod. (2007) ugotovili, da je koncentracija tiramina padala s povečanjem koncentracije glukoze, fruktoze in L – jabolčne kisline. Glukoza naj ne bi vplivala na aktivnost encima HDC bakterij *O. oeni*, medtem ko jabolčna kislina igra ključno vlogo za začetek razgradnje arginina s strani *O. oeni* in s tem tvorbo putrescina.

Mlečna kislina deluje inhibitorno na delovanje HDC, medtem ko na aktivnost ODC nima vpliva. Na HDC in TDC imajo v manjši meri inhibitoren vpliv tudi citronska, jantarna in jabolčna kislina ter D-sorbitol. TDC aktivnost v različnem obsegu inhibirajo še glicerol, β-merkaptetanol, mlečna kislina in etanol. Vendar je koncentracija teh spojin premajhna, da bi lahko zadostno inhibirale tvorbo tiramina (Smit in sod., 2008).

Tudi pH vrednost vina in etanol lahko delujejo inhibitorno na dekarboksilazno encimsko aktivnost. HDC aktivnost in posledično tvorba histamina je intenzivnejša pri pH nad 3,5 in deležu etanola do 10 % vol. Visoke koncentracije etanola (nad 12 % vol) zmanjšujejo HDC aktivnost, saj vplivajo na fizikalno-kemijske lastnosti membrane in upočasnijo transport histidina v celico (Smit in sod., 2008).

Tvorba histamina je odvisna tudi od koncentracije histidina, histamina, piridoksal 5'-fosfata ter faze rasti bakterij. Prisotnost histidina (1-2 g/L) inducira ekspresijo HDC gena, histamin (1-2 g/L) pa deluje zaviralno. Prisotnost piridoksal 5'-fosfata (0,5 g/L) poveča HDC aktivnost (Smit in sod., 2008).

Lucas in sod. (2005) so odkrili, da je fenotipska izraženost HDC odvisna od okolja. V kislem mediju z malo hranili je število HDC pozitivnih celic *L. hilgardii* 0006 naraščalo, medtem ko je v bogatem mediju z višjo pH-vrednostjo, število HDC celic upadalo oziroma se je povečalo število mutantskih celic, brez HDC aktivnosti.

Redki sevi *O. oeni* imajo proteolitično aktivnost, ki pa je odvisna tudi od hranilne sestave medija in je navadno večja proti koncu eksponentne faze rasti, ko so zaloge hranil že izčrpane. Navadno pride do ekspresije proteolitične in dekarboksilazne aktivnosti v stresnih razmerah, ko ni lažjega načina za preživetje (Smit in sod., 2008).

- **Vpliv sestave vina na rast in preživetje bakterij**

Marcobal in sod. (2006) so v študiji primerjali vpliv petih faktorjev (temperatura in čas inkubacije, pH medija, koncentracija dodanega tirozina in piridoksal 5'-fosfata) na rast celic in tvorbo tiramina v aerobnih in anaerobnih pogojih s strani bakterij *L. brevis* CECT 4669 in *Ent. faecium* BIFI-58, izoliranih iz grozdnega mošta. S pomočjo multiple linearne regresije so ugotovili, da so idealni pogoji za tvorbo tiramina, anaerobna inkubacija pri pH 4,4 v prisotnosti visoke koncentracije tirozina.

Žveplov dioksid preprečuje tvorbo BA, ker zmanjšuje število in aktivnost MKB. Inhibitoren učinek žveplovega dioksida je pri vinih z visoko pH vrednostjo manjši, zato lahko kljub žveplanju koncentracija BA med zorenjem vina naraste. Več študij je potrdilo, da se visoke koncentracije histamina (nad 10 mg/L) navadno pojavljajo v vinih, ki imajo pH vrednost 3,7 in več (Košmerl in sod., 2013).

Pri višjem pH je število različnih bakterij večje, posledično vsebujejo vina z višjo pH-vrednostjo navadno več BA. Landete in sod. (2005) so preučevali vsebnost BA v vinih iz La Rioje. Ugotovili so, da so imela vina, ki so vsebovala večje količine histamina pH večji od 3,6.

Gardini in sod. (2005) so ugotovili, da je tvorba BA pri veliki koncentraciji etanola in majhni vsebnosti piridoksal 5'-fosfata majhna. Razlog za manjšo tvorbo BA pri veliki vsebnosti etanola in nizkem pH gre pripisati zmanjšani metabolni aktivnosti in preživetju celic.

Večje koncentracije očetne kisline (hlapne kisline) so bile v študiji, ki so jo izvedli Vidal-Carou in sod. (1990) v korelaciji z velikimi koncentracijami histamina v belih in rose vinih. Vzrok za to povezavo ni znan.

2.3.11 Vpliv čistilnih sredstev

Pomemben vpliv na tvorbo BA po končani JMKF ima filtracija z uporabo diatomejske zemlje, ki veže nase aminokisline in kationske proteine ter tako zmanjša možnost za pojav BA (Smit in sod., 2008). Tudi uporaba bentonita lahko zaradi svoje adsorptivne sposobnosti delno zmanjša vsebnost BA, predvsem histamina. Grossmann in sod. (2009) so preučevali vpliv nekaterih čistilnih sredstev (kalijev kazeinat, želatina, aktivno oglje, natrijev bentonit, natrij kalijev bentonit, kalcijev bentonit) na zmanjšanje koncentracije putrescina, spermidina in spermina v moštu in vinu. Pri tretiranju mošta s čistilnimi

sredstvi, je pri vseh sredstvih prišlo do znatnega znižanja koncentracij BA. Vpliv čistilnih sredstev na zmanjšanje vsebnosti BA v vinu je bil bistveno manjši, do opaznega zmanjšanja je prišlo le pri uporabi bentonita. Vrsta bentonita na obseg znižanja ni imela vpliva.

2.4 UKREPI ZA ZMANJŠEVANJE IN PREPREČEVANJE NASTAJANJA BA

Trenutno je najučinkovitejši način omejevanja tvorbe BA preprečevanje rasti avtohtonih in drugih mikroorganizmov, ki imajo sposobnost dekarboksilacije aminokislin. Žveplov dioksid je zaenkrat najučinkovitejše antimikrobno sredstvo. Dodatek žveplovega dioksida takoj po koncu JMKF inhibira delovanje bakterij in nadaljnjo tvorbo BA. Kljub temu so v nekaterih vinih dokazali povečanje koncentracije histamina tudi po končani JMKF in dodatku žveplovega dioksida, kar kaže na to, da dodatek žveplovega dioksida ne inhibira popolnoma bakterijskih encimskih reakcij vključno z dekarboksilazno aktivnostjo. Zaradi višje pH vrednosti je učinkovitost žveplovega dioksida manjša. Nekaj študij je potrdilo povezavo med višjo pH vrednostjo vina in večjo koncentracijo histamina v rdečih vinih (Moreno-Arribas in Polo, 2009).

Lizocim je encim, ki povzroča lizo celičnih sten Gram-pozitivnih bakterij, kamor spadajo tudi MKB. Njegova aktivnost je tudi pri visokem pH vina nespremenjena. Je učinkovit način za inhibicijo rasti večine MKB, predvsem, kadar se uporablja v kombinaciji z žveplovim dioksidom. Bakteriocini so antimikrobni peptidi, ki jih proizvajajo nekateri sevi MKB. Nizin je komercialno dostopen bakteriocin, ki deluje na citoplazemsko membrano Gram-pozitivnih bakterij. Kombinirana uporaba nizina in žveplovega dioksida bi bila učinkovita za inhibicijo rasti kvarnih bakterij, vendar za vino ni dovoljena. Obstaja tudi možnost uporabe naravnih fenolov, kot antimikrobno sredstvo (Smit in sod., 2008).

Inokulacija vina s komercialnimi sevi *O. oeni*, ki nimajo sposobnosti dekarboksilacije aminokislin je pomemben in učinkovit pristop k zmanjševanju koncentracije BA v vinu. Kaže, da ima koinokulacija s kulturo MKB med oz. v začetku AF celo večji učinek pri zmanjševanju tvorbe BA, kot klasična inokulacija po končani AF (Smit in sod., 2008).

Vinogradniški ukrepi, ki bi lahko zmanjšali količino BA v grozdju in vinu so predvsem vezani na primerno oskrbo tal in trte s hranili (Smit in sod., 2008).

Manjše koncentracije BA v vinu lahko dosežemo tudi z omejevanjem tehnoloških ukrepov, kjer prihaja do ekstrakcije aminokislin, predvsem maceracija in stik z vina z vinskimi drožmi (Smit in sod., 2008).

Bistrenje je najučinkovitejši enološki ukrep za zmanjšanje koncentracije BA v vinu. Tudi uporaba čistilnih sredstev, predvsem bentonita je zelo učinkovita, saj že 80 g/hL bentonita zmanjša količino histamina tudi do 60 %. Uporaba bentonita je učinkovitejša, če ga

dodamo v mošt, kasneje v postopku bistrenja se veže nanj le manjši delež BA (Košmerl in sod., 2013).

Zaradi tvorbe BA s strani MKB, so Husnik in sod. (2006) s pomočjo genskega inženiringa razvili genetsko stabilen sev kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ML01, ki so sposobne popolnoma razgraditi L-jabolčno kislino med AF. S tem se izognemo potrebi po mlečnokislinski fermentaciji in posledično neželeni tvorbi BA. Sev je s strani organizacije FDA priznan kot varen.

Znano je, da lahko nekateri mikroorganizmi, med drugim tudi MKB, razgradijo BA s pomočjo encimov amin oksidaz. To so predvsem aerobni mikroorganizmi, ki pa navadno tehnološko niso sprejemljivi (Smit in sod., 2008). García-Ruiz in sod. (2011) so na 85-ih sevih mlečnokislinskih bakterij izoliranih iz vina ter treh mlečnokislinskih starterskih kulturah, proučevali sposobnost razgradnje histamina, tiramina in putrescina. Zmanjšanje koncentracij histamina so zaznali pri 25 % sevov, zmanjšanje tiramina in putrescina pa pri 18 % sevov. Pri nobeni od mlečnokislinskih starterskih kultur niso ugotovili zmanjšanja BA. Največjo sposobnost razgradnje BA so opazili pri rodovih *Lactobacillus* in *Pediococcus*.

2.5 BIOLOŠKI RAZKIS

Biološki razkis ali jabolčno mlečnokislinska fermentacija (JMKF) je za AF drugi najpomembnejši mikrobiološki proces v vinu. V osnovi gre za pretvorbo jabolčne kisline v mlečno kislino in ogljikov dioksid pod vplivom mlečnokislinskih bakterij (MKB). Najpomembnejši učinek JMKF je zmanjšanje kislosti, kar je priporočljivo za vina z večjo koncentracijo skupnih kislin oziroma večjo koncentracijo jabolčne kisline iz hladnejših pridelovalnih območij. Poleg tega pride do značilnih sprememb vonja in okusa zaradi tvorbe novih ali sprememb obstoječih aromatičnih spojin (Bavčar, 2009).

2.5.1 Mlečnokislinske bakterije

MKB so enocelični, prokariontski organizmi, Gram-pozitivne palčke ali koki. So fakultativno anaerobne fermentativne bakterije, odporne na nizek pH in občutljive na žveplov dioksid. MKB v osnovi delimo na homofermentativne, ki tvorijo v veliki meri samo mlečno kislino in heterofermentativne, ki poleg mlečne kisline tvorijo še etanol, ocatno in jantarno kislino ter glicerol. Pomembnejše so heterofermentativne bakterije, kamor spadajo tudi *Oenococcus oeni* (McKay in sod., 2011).

V procesu JMKF sodelujejo rodovi *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* in *Leuconostoc*. Najpomembnejše so bakterije *Oenococcus oeni*, saj so najbolj prilagojene na nizek pH, majhne koncentracije hranil ter visoko vsebnost alkohola v vinu (Lonvaud-Funel, 1999).

MKB so na zdravem grozdju prisotne v majhnem številu, med AF pa se njihovo število še dodatno zmanjša iz 10^3 na 1 celico/mL. Njihov izvor je lahko tudi na vinarski opremi, predvsem v primeru slabe higijene. Po končani AF so *Oenococcus oeni* prevladujoče MKB v vinu in so najbolj odgovorne za potek JMKF. Njihovo število naraste do 10^8 celic/mL. Seveda je rast bakterij precej odvisna od pH vrednosti. Pri pH nad 3,5 se lahko uspešno namnožijo tudi rodovi *Pediococcus* in *Lactobacillus*, kateri so pogosto odgovorni za kvar in imajo lahko antagonističen učinek na *O. oeni* (Smit in sod., 2008).

Kvasovke in druge bakterije lahko delujejo inhibitorno na MKB. Kvasovke tvorijo etanol, žveplov dioksid, toksične maščobne kisline, ki inhibirajo rast MKB. Poleg tega kvasovke porabijo večino aminokislin in ostalih hranil, ki so potrebna za normalno rast MKB. Nekateri sevi kvasovk lahko tvorijo tudi lizocim, ki deluje baktericidno. Proti koncu AF je negativen vpliv kvasovk manjši, tudi zaradi avtolize kvasnih celic in posledičnega sproščanja hranil v vino. Rast oacetnokislinskih bakterij lahko pozitivno vpliva na rast MKB, saj deluje očetna kislina inhibitorno na kvasovke *S. cerevisiae* (McKay in sod., 2011).

JMKF poveča mikrobiološko stabilnost vina, saj se zmanjša vsebnost hranilnih snovi za ostale mikroorganizme, ki bi lahko povzročili kvar. Nasprotno pa višji pH omogoča nadaljnjo rast MKB in drugih bakterij (Bavčar, 2009). Zato se po končani JMKF priporoča ohlajitev, žveplanje in pretok ali celo sterilna filtracija vina (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

2.5.2 Spremembe med JMKF

Glavna reakcija JMKF je dekarboksilacija dikarboksilne jabolčne kisline v piruvično, le-ta pa se nato reducira v monokarboksilno mlečno kislino. Teoretično nastane iz 1 g jabolčne kisline 0,67 g mlečne kisline in 0,33 g ogljikovega dioksida. V praksi je izkoristek manjši, okoli 80 %. Koncentracija skupnih kislin se povprečno zmanjša za 1 do 3 g/L, pH pa se poveča za 0,1 do 0,3 enote (Bavčar, 2009).

Poleg mlečne kisline in ogljikovega dioksida nastajajo med JMKF številni stranski produkti. Eden najpomembnejših je diacetil, ki ima vonj po maslu in nastaja pretežno iz citronske kisline. V koncentracijah od 1 do 4 mg/L pozitivno vpliva na kakovost vina, v koncentracijah nad 5 mg/L pa je nezaželen in negativno vpliva na aromo vina. Znano je, da več diacetila nastane v aerobnih pogojih in pri nižjem pH. Koncentracija diacetila je najvišja ob koncu JMKF, ko je porabljena vsa jabolčna kislina, nato se počasi zmanjšuje na račun redukcije v 2,3-butandiol (McKay in sod., 2011).

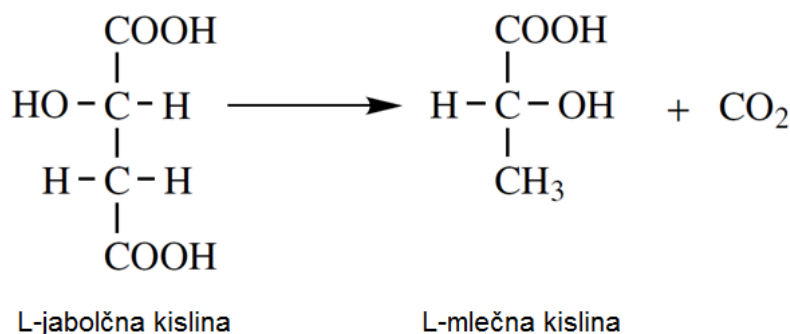
MKB lahko kot vir energije uporabljajo tudi glukozo in fruktozo, kar vodi v nastanek manitola in očetne kisline. V nekaterih primerih lahko metabolizirajo glicerol do akroleina, ki ima grenek okus. MKB lahko metabolizirajo tudi sorbinsko kislino, kar vodi v nastanek

geranijevega tona, ki je nezaželen. Nekatere MKB lahko razgradijo določene aldehide in tako odstranijo vegetativne vonje (Bavčar, 2009).

Nekateri sevi MKB imajo izraženo β -glukozidazno aktivnost, ki se odraža v cepitvi vezanih aromatičnih spojin iz prekursorjev. Poleg tega lahko sprostijo vezane antocianidine in vplivajo na spremembo barve vina. Do zmanjšanja intenzivnosti barve pride tudi zaradi dviga pH, delno pa tudi zaradi kondenzacije antocianov s tanini (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Fenolne kisline (predvsem ferulna in *p*-kumarna) so naravno prisotne v grozdju. Med JMKF lahko pride do dekarboksilacije teh spojin in nastanek hlapnih fenolov, kot sta na primer 4-etil gvajkol in 4-etil fenol, ki imata neprijeten vonj po konjih in hlevu (McKay in sod., 2011).

Ostale spojine, ki lahko vplivajo na vonj, so acetaldehid, acetoin, dietil sukcinat, etilacetat, etil laktat in heksanol (Bavčar, 2009).



Slika 6: Pretvorba jabolčne kisline v mlečno kislino (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a: 145)

2.5.3 Dejavniki, ki vplivajo na rast MKB

- **pH:** Je eden najpomembnejših faktorjev, ki vplivajo na rast MKB. JMKF lahko poteka, če je pH višji od 3,0. Nižji pH povzroči zamik JMKF in počasnejši potek procesa zaradi inhibitornega vpliva in povečane občutljivosti bakterij na alkohol, žveplov dioksid in toksične maščobne kisline (Bavčar, 2009). Pri pH pod 3,5 navadno prevladujejo bakterije *O. oeni*, nad 3,5 pa dobro rastejo tudi bakterije vrst *Pediococcus* in *Lactobacillus*. Poudariti je potrebno, da so pogosto za kvar odgovorne bakterije iz rodu *Lactobacillus*. pH vpliva tudi na metabolizem in tvorbo stranskih produktov. Pri pH vrednosti nad 3,5 bakterije izdatneje razgrajujejo sladkorje, vinsko kislino in citronsko kislino, nastane tudi manj diacetila (Košmerl in sod., 2013).

- **Žveplov dioksid:** Bakterije so v primerjavi s kvasovkami bistveno bolj občutljive na prosti in skupni žveplov dioksid. Od prostih oblik SO_2 ima molekularna oblika največji protimikrobni učinek. Nižji kot je pH, tem večji je protimikrobni učinek žveplovega dioksida (Košmerl in sod., 2013). Prosti žveplov dioksid nad 25 mg/L navadno prepreči rast MKB, za skupni žveplov dioksid pa ta vrednost znaša od 50 do 100 mg/L (Bavčar, 2009). Občutljivost na žveplov dioksid se razlikuje glede na sev, *O. Oeni* spadajo med najbolj občutljive. Optimalna temperatura delovanja MKB se z naraščanjem koncentracije žveplovega dioksida znižuje (McKay in sod., 2011).
- **Temperatura:** Zaradi tvorbe neželenih spojin, znaša priporočena temperatura za potek JMKF med 18 in 20 °C. MKB lahko rastejo v temperaturnem območju med 10 in 30 °C, izven teh meja je metabolizem zmanjšan ali celo prekinjen. Optimalna temperatura rasti MKB se spreminja s koncentracijo alkohola. Večja kot je koncentracija alkohola, tem nižja je optimalna temperatura rasti MKB (Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Jabolčna kislina se najbolj uspešno porablja pri temperaturah med 20 in 25 °C, pri temperaturah pod 10 °C pa se dekarboksilacija prekine. V takem primeru se lahko JMKF nadaljuje tudi nekaj mesecev pozneje, če pride do povišanja temperature (Bavčar, 2009).
- **Etanol:** Mlečnokislinske bakterije so občutljive na etanol že pri 8 – 10 %vol. Koki so bolj občutljivi od bacilov. Občutljivost na alkohol je odvisna tudi od seva, pH vina in temperature (Košmerl in sod., 2013). Koncentracije nad 13 % delujejo inhibitorno, saj pride do zmanjšanja pretvorbe jabolčne kisline v mlečno celo do 80 % (McKay in sod., 2011).
- **Kisik:** Manjše koncentracije kisika v začetni fazi delujejo stimulatorno na rast MKB (Bavčar, 2009).
- **Ostali dejavniki:** MKB so glede hranil zelo zahtevne, zato se ob inokulaciji priporoča dodatek hranil, ki vsebujejo aminokisline, nikotinsko kislino, tiamin, biotin, pantotensko kislino, itd. (Bavčar, 2009). Dokazano je, da postopki maceracije ugodno vplivajo na rast MKB. Tudi stik s kvasnimi drožmi stimulatorno vpliva na rast MKB, saj predstavlja vir hranil, ki se sproščajo med avtolizo kvasovk (McKay in sod., 2011). Nekateri pesticidi lahko delujejo inhibitorno na rast MKB (Vrščaj Vodošek, 2007).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Vzorci

Vzorci vina modra frankinja smo pridobili v treh belokranjskih vinskih kletih. Pri vseh vzorcih je potekla JMKF z razliko, da je pri polovici vzorcev potekala spontana JMKF, pri drugi polovici pa so uporabili selekcionirano kulturo MKB. V nadaljevanju bo postopek vinifikacije vzorcev na kratko opisan. V oznaki vzorca je naveden pridelovalec s črko A, B ali C; dvomestno število za njim pa označuje letnik pridelave vina (2011, 2012 in 2013). Vsaka oznaka vzorca vsebuje še pripono -S ali -V, ki označuje spontano (-S) oziroma vodeno (-V) JMKF.

Izbor vzorcev:

Vzorec A11-S: modra frankinja letnik 2011, pridelovalec A	Spontana JMKF
Vzorec A12-S: modra frankinja letnik 2012, pridelovalec A	
Vzorec B12-S: modra frankinja letnik 2012, pridelovalec B	
Vzorec B13-S: modra frankinja letnik 2013, pridelovalec B	
Vzorec B12-V: modra frankinja letnik 2012, pridelovalec B	Vodena JMKF
Vzorec B13-V: modra frankinja letnik 2013, pridelovalec B	
Vzorec C12-V: modra frankinja letnik 2012, pridelovalec C	
Vzorec C13-V: modra frankinja letnik 2013, pridelovalec C	

Vzorec A11-S

Trgatev je bila 16. 9. 2011. Sladkorna stopnja mošta je bila 96 °Oe. Grozdje je bilo razpecljano, zdrozgano ter prečrpano v vinifikator, kjer je bil dodan kvasni nastavek. AF je potekala 14 dni pri temperaturi do 30 °C. Maceracija je trajala štiri tedne, nakar je sledilo stiskanje in pretok v rabljene barrique sodčke, kjer je vino ob rednem mešanju eno leto ležalo na drožeh, hkrati pa je spontano potekla tudi JMKF. Temperatura v kleti je bila 10 – 15 °C; odvisno od letnega časa. Po enem letu so vino pretočili v cisterno in žveplali.

Vzorec A12-S

Trgatev je potekala 21. 9. 2012. Sladkorna stopnja mošta je bila 91 °Oe. Grozdje je bilo razpecljano, zdrozgano ter prečrpano v vinifikator, kjer je bil dodan kvasni nastavek. AF je potekala 14 dni pri temperaturi do 30 °C. Maceracija je trajala štiri tedne, nakar je sledilo stiskanje in pretok v rabljene barrique sodčke, kjer je vino ob rednem mešanju eno leto ležalo na drožeh, hkrati pa je spontano potekla tudi JMKF. Temperatura v kleti je, odvisno od letnega časa, znašala 10 – 15 °C. Po enem letu so vino pretočili v cisterno in žveplali.

Vzorec B12-S

Trgatev je potekala 18. 9. 2012. Sladkorna stopnja mošta je bila 84 °Oe. Grozdje je bilo takoj razpecljano, zdrozgano ter prečrpano v vinifikator, kjer so drozgi dodali kvasni nastavek. Temperatura drozge ob začetku AF je bila 20,5 °C, kasneje pa se je povečala na 25 °C. Maceracija je trajala 6 dni, nato je sledilo stiskanje in pretok v cisterno, kjer je po končani AF spontano potekla JMKF pri temperaturi 20 °C. Po 23-ih dneh je bila JMKF končana, sledil je pretok vina in žveplanje.

Vzorec B12-V

Trgatev je bila 18. 9. 2012. Sladkorna stopnja mošta je bila 90 °Oe. Grozdje je bilo takoj razpecljano, zdrozgano ter prečrpano v vinifikator, kjer so drozgi dodali kvasni nastavek. Začetna temperatura AF je bila 22,5 °C, v najbolj intenzivni fazi AF pa 30 °C. Maceracija je trajala 17 dni, nakar je sledilo stiskanje in pretok v cisterno, kjer je potekala JMKF. Vinu so dodali selekcionirano kulturo MKB Oeno 2 proizvajalca Lamothe-Abiet. Zaradi težav pri rehidraciji liofilizirane kulture MKB so vino cepili šele dva dni po pretoku. JMKF je potekala 12 dni pri temperaturi 18 °C, sledil je pretok in žveplanje vina. Zaradi kasnejšega dodatka selekcionirane kulture MKB je možno, da je v začetku prišlo do aktivnosti avtohtonih MKB.

Vzorec B13-S

Trgatev je bila 2. 10. 2013. Sladkorna stopnja mošta je bila 83 °Oe. Grozdje je bilo takoj razpecljano, zdrozgano ter prečrpano v vinifikator, kjer so drozgi dodali kvasni nastavek. Ker je bila drozga zaradi vremenskih razmer precej hladna, se je AF začela šele tretji dan po polnitvi vinifikatorja. Ob začetku AF je bila temperatura drozge 13 °C; kasneje pa je maceracija potekala pri temperaturi 23 °C. Maceracija je trajala 9 dni, nato je sledilo stiskanje in pretok v cisterno, kjer je AF potekla do konca. Po končani AF so vinu dodali manjšo količino vina (10 %), kjer je že potekala spontana JMKF. JMKF je v 23-ih dneh pri temperaturi 20 °C potekla do konca. Sledilo je hlajenje, pretok in žveplanje vina.

Vzorec B13-V

Trgatev je potekala 3. 10. 2013. Sladkorna stopnja mošta je bila 88 °Oe. Grozdje je bilo takoj razpecljano, zdrozgano ter prečrpano v vinifikator, kjer so drozgi dodali kvasni nastavek. Ker je bila drozga zaradi vremenskih razmer precej hladna, se je AF začela šele tretji dan po polnitvi vinifikatorja. Ob začetku AF je bila temperatura drozge 16,5 °C, kasneje pa je maceracija potekala pri temperaturi 24 °C. Maceracija je trajala 20 dni. Nato je sledilo stiskanje in pretok v cisterno. Ker je AF med maceracijo potekla do konca, so takoj dodali selekcionirano kulturo MKB Oeno 2 proizvajalca Lamothe-Abiet. JMKF je potekala 13 dni pri temperaturi 20 °C. Sledil je pretok in žveplanje vina.

Vzorec C12-V

Sladkorna stopnja mošta je bila 93 °Oe. Takoj po pecljanju in drozganju je bil dodan kvasni nastavek. Maceracija je potekala 21 dni pri temperaturi 30 °C v času najbolj intenzivne AF. Sledilo je stiskanje in pretok ter dodatek selekcionirane kulture MKB Extremo X03. JMKF je potekala 3 tedne pri temperaturi 21 – 22 °C. Po končani JMKF je bilo vino ohlajeno in po enem mesecu pretočeno v 225 L sodčke, kjer je vino ležalo na drožeh. Ves čas je bilo droži potrebno redno mešati, zaradi možnosti pojava reduktivnih vonjev.

Vzorec C13-V

Sladkorna stopnja mošta je bila 83 °Oe. Takoj po pecljanju in drozganju je bil dodan kvasni nastavek. Maceracija je potekala 14 dni pri temperaturi do 30 °C v času najbolj intenzivne AF. Po dveh tednih je sledil pretok vina v cisterno, kjer je AF potekla do konca. Po končani AF je bilo vino pretočeno in cepljeno z MKB Extremo X03. JMKF je potekala 3 tedne pri temperaturi 21 – 22 °C. Po končani JMKF je bilo vino ohlajeno in po desetih dneh pretočeno v 225 L sodčke, kjer je vino ležalo na drožeh. Ves čas je bilo potrebno redno mešati droži, zaradi možnosti pojava reduktivnih vonjev.

3.2 METODE**3.2.1 Določanje pH vina**

Potenciometrična metoda (Košmerl in Kač, 2009):

Pri določanju pH merimo razliko v potencialu med dvema elektrodama, ki sta potopljeni neposredno v vzorec vina. Referenčna elektroda ima stalen potencial, merilna steklena elektroda pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti H_3O^+ ionov v raztopini. Uporabili smo pH meter Mettler Toledo DL50 Graphix s kombinirano stekleno elektrodo. Pred analizo smo pH meter pri temperaturi 20 °C umerili s pufrnima raztopinama s pH 4,00 in 7,02 in nato še s standardno raztopino (nasičena raztopina kalijevega hidrogentartrata), katere pH pri 20 °C znaša točno 3,57.

3.2.2 Določanje skupnih in titrabilnih kislin

Potenciometrična metoda (Košmerl in Kač, 2009):

Metoda temelji na potenciometrični titraciji skupnih kislin z 0,1 M raztopino NaOH. Pri kislinsko-bazni potenciometrični titraciji merimo razliko v potencialu med referenčno in merilno elektrodo. Titracija poteka na avtomatskem titratorju do pH 7,0 oziroma 8,2. Uporabili smo pH meter Mettler Toledo DL50 Graphix s kombinirano stekleno elektrodo.

Pri dodajanju baze je potekla naslednja reakcija: $\text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^- \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O}$... (1)

Masno koncentracijo oz. titrabilnih kislin, izraženo v g vinske kisline/L, izračunamo s pomočjo naslednjih formul:

$$TK_1(g\ L) = \frac{a_1\ mL \cdot c \cdot M(g\ mol)}{v(mL) \cdot n} \quad \dots(2)$$

oziroma

$$TK_2(g\ L) = \frac{a_3(mL) \cdot c \cdot M(g\ mol)}{v(mL) \cdot n} \quad \dots(3)$$

Legenda: TK_1 – titrabilne kisline

TK_2 – skupne kisline

a_1 – volumen porabljene baze pri titraciji do pH 7,00 (mL)

a_3 – volumen porabljene baze pri titraciji do pH 8,20 (mL)

c – koncentracija NaOH (0,10067 mol/L oz. 0,10220 mol/L)

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

v – volumen vzorca (25 mL)

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

3.2.3 Določanje relativne gostote, alkohola in ekstrakta

Denzimetrija (Košmerl in Kač, 2009):

Termostatiranemu vzorcu vina pri temperaturi 20 °C izmerimo relativno gostoto z denzimetrom znamke Mettler Toledo DE45 Density Meter. Nato 100 mL ponovno termostatiranega vzorca kvantitativno prenesemo v destilacijsko napravo D.E.E. Gibertini ter v destilacijsko posodo dodamo še 5 mL 12 % raztopine kalcijevega oksida in 2-3 kapljice protipenilca. Stene destilacijske posode speremo z deionizirano vodo ter vzorec predestiliramo v 100 mL bučko. Po destilaciji vzorca dobljeni alkoholni destilat termostatiramo, dopolnimo do oznake z destilirano vodo ter izmerimo njegovo relativno gostoto z denzitometrom. Odčitamo tudi koncentracijo oz. volumski delež alkohola.

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

$$d_{SE} = d_V - d_A + 1,0000 \quad \dots(4)$$

Masno koncentracijo skupnega ekstrakta v vinu (g SE/L vina) odčitamo iz tabele, na podlagi znane relativne gostote skupnega ekstrakta vina (d_{SE}).

Legenda: d_{SE} – relativna gostota skupnega ekstrakta vina

d_V – relativna gostota vzorca vina

d_A – relativna gostota alkoholnega destilata

SE – skupni ekstrakt

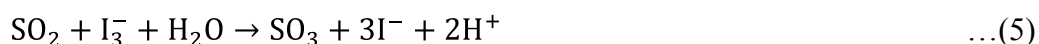
3.2.4 Določanje žveplovega dioksida

Titracijska metoda (Ripperjeva metoda – jodometrična titracija) (Košmerl in Kač, 2009):

Določanje prostega in skupnega žveplovega dioksida (SO₂) po Ripperjevi metodi temelji na oksidacijsko-redukcijski reakciji z raztopino joda (I₂).

Koncentracijo prostega SO₂ določimo tako, da 25 mL vzorca vina najprej nakisamo z dodatkom 5mL žveplove(VI) kisline (s tem zmanjšamo oksidativni vpliv vina). Nato dodamo 5mL škrobovice (indikator) in titriramo s standardizirano raztopino joda. Jod oksidira žveplove(IV) kislino v žveplove(VI) kislino. V končni točki titracije prebitna količina joda obarva raztopino modro. Koncentracijo skupnega SO₂ pa določimo tako, da vzorcu vina najprej dodamo 25 mL 1 M NaOH, ki povzroči hidrolizo vezanega SO₂. Nato dodamo ostale reagentne in izvedemo jodometrično titracijo, kot pri določanju prostega SO₂.

Pri določanju SO₂ v vinu po Ripperju pride do značilne reakcije: oksidacija žveplove(IV) kisline v žveplove(VI) kislino:



Koncentracijo prostega in skupnega SO₂ (mg/L) izračunamo s pomočjo naslednje formule:

$$c_{\text{SO}_2} \text{ mg L} = \frac{a \cdot c_{\text{I}_2} \cdot M \cdot 1000}{n \cdot v} \quad \dots(6)$$

Legenda: a – volumen standardizirane raztopine joda (mL)

c(I₂) – koncentracija joda (0,01 M)

M – molska masa SO₂ (64,06 g/mol)

n – molsko razmerje kemijske reakcije med jodom in SO₂ (n = 1)

v – volumen vzorca vina (25 mL)

3.2.5 Določanje hlapnih kislin

Destilacijska metoda (Cash steam distillation, Markham steam distillation) (Košmerl in Kač, 2009):

Hlapne kisline določimo titrimetrično v destilatu vina. V destilacijsko bučko odpipetiramo 20 mL vzorca vina, dodamo 1 mL 50 % raztopine vinske kisline in 2-3 kapljice protipenilca. Stene destilacijske bučke speremo z deionizirano vodo. Vzorec nato destiliramo s pomočjo destilacijske naprave D. E. E. Gibertini in generatorja pare VADE Gibertini v 250 mL erlenmajerico do končnega volumna destilata 150 mL. Po končani destilaciji dodamo destilatu 2-3 kapljice raztopine fenolftaleina in takoj titriramo s standardizirano 0,1 M raztopino NaOH do prehoda brezbarvne raztopine v svetlo rožnato

barvo. Iz volumna porabljene NaOH nato izračunamo koncentracijo hlapnih kislin. Rezultat izrazimo kot koncentracijo očetne kisline (g/L). Opravimo tudi korekcijo na prosti in vezan žveplov dioksid.

Koncentracijo hlapnih kislin v vinu izračunamo s pomočjo naslednje formule:

$$HK_1 = a_1 \cdot c \cdot M(\text{g mol}) \cdot \frac{50}{1000} \quad \dots(7)$$

Korekcijo za prosti žveplov dioksid opravimo tako, da takoj po končani prvi titraciji hlapnih kislin z bazo, dodamo v erlenmajerico 1 mL žveplove(VI) kisline, 1 mL raztopine škrobovice ter titriramo z 0,01 M raztopino joda do prehoda v modro-zeleno barvo raztopine. Korekcijo za prosto žveplovo(IV) kislino izračunamo kot masno koncentracijo očetne kisline (g/L):

$$HK_2 = a_2 \cdot 0,06 \quad \dots(8)$$

Korekcijo za vezani žveplov dioksid opravimo tako, da takoj po končani drugi titraciji, dodamo v raztopino 10 mL 1M raztopine NaOH, segrevamo do vrenja, ohladimo in dodamo 5 mL raztopine žveplove(VI) kisline, 1mL raztopine škrobovice ter titriramo z 0,01 M raztopino joda do prehoda v modro-zeleno barvo. Korekcijo za vezani žveplov dioksid izračunamo kot masno koncentracijo očetne kisline (g/L):

$$HK_3 = a_3 \cdot 0,03 \quad \dots(9)$$

Upoštevajoč korekcijo za prosti in vezani žveplov dioksid, izračunamo koncentracijo hlapnih kislin v vinu s pomočjo naslednje formule:

$$HK = HK_1 - (HK_2 + HK_3) \quad \dots(10)$$

3.2.6 Določanje vsebnosti organskih kislin

Določanje organskih kislin s pomočjo HPLC (OIV, 1990):

S pomočjo HPLC metode smo določali citronsko, vinsko, jabolčno in mlečno kislino. Vzorec za HPLC analizo smo pripravili tako, da smo vino degazirali z dušikom in filtrirali v vialo skozi filter s celulozno membrano velikosti por 0,45 µm (Minisart RC25, Sartorius).

Za identifikacijo in kvantifikacijo posameznih organskih kislin v vzorcu vina smo uporabili visokotlačni tekočinski kromatograf HPLC (Agilent 1100) z dioda array detektorjem DAD (Agilent Technologies, Paolo Alto, ZDA). Za identifikacijo posameznih spojin smo posneli UV-VIS spekter med 190 in 300 nm z detekcijo vrhov pri 210 nm.

Kromatografski pogoji:

- predkolona št. 125-0129 (Bio-Rad Laboratories);
- izmenjevalna kolona (HPX-87 H BIO-RAD), dimenzije 300 mm × 7,8 mm, velikost delcev 0,9 µm, št. 125-0140 (Bio-Rad Laboratories);
- mobilna faza: 0,0125 M H₂SO₄ v deionizirani vodi (18 MΩcm);
- temperatura: 65 °C;
- čas ločevanja: 35 min;
- pretok mobilne faze: 0,5 mL/min;
- volumen vzorca: 10 µL.

Preglednica 3: Meje detekcije (LOD) in meje kvantitativne določitve (LOQ) organskih kislin

Organska kislina	LOD (g/L)	LOQ (g/L)
Citronska kislina	0,006	0,021
Vinska kislina	0,020	0,050
Jabolčna kislina	0,020	0,050
Mlečna kislina	0,020	0,080

3.2.7 Določanje biogenih aminov v vinu

Analize BA so bile opravljene na Fakulteti za znanosti o okolju, Univerze v Novi Gorici po prirejeni metodi po standardu OIV-MA-AS315-18 (Rakar, 2013):

Vzorci smo za HPLC analizo pripravili tako, da smo jih prefiltrirali skozi filter s celulozno membrano, velikosti por 0,45 µm (Minisart RC25, Sartorius). Vzorce vina smo nato razredčili z metanolom in jih pri sobni temperaturi derivatizirali z ortohtalaldehidom ob prisotnosti 2-merkaptotetanolu in boratnega pufra s pH-vrednostjo 10,5. Med reakcijo derivatizacije poteka tvorba derivatov med BA in ortohtalaldehidom. Derivati oddajajo fluorescenco pri višji valovni dolžini, kjer je manj interferenčnih spojin. Fluorescirajoče derivate BA smo nato analizirali na tekočinskem kromatografu Agilent 1100 v povezavi s fluorescenčnim detektorjem Agilent 1100 Series G2321A, kjer smo merili intenziteto luminiscence, ki je podan z enoto LU. Zaradi nestabilnosti derivatov smo meritve izvajali neposredno po derivatizaciji vzorcev. Detekcija je potekala pri valovni dolžini 445 nm, medtem ko je vzbujevanje fluorescence potekalo pri valovni dolžini 356 nm.

Kromatografski pogoji:

- kolona (Supelco Discovery C18), dimenzije 250 mm × 4,6 mm, velikost delcev 5 µm;
- stacionarna faza: oktadecilsilan C18;
- mobilna faza: (A) metanol / (B) raztopina 0,05 M natrijevega acetata in tetrahidrofurana v razmerju 96:4;
- pretok mobilne faze: 1 mL/min;

- temperatura kolone: 35 °C;
- volumen vzorca: 25 μ L;
- čas ločevanja: 95 min.

Ker je vino kompleksen matriks je na kromatogramu veliko interferenčnih vrhov, ki ne pripadajo BA. S pomočjo metode standardnega dodatka natančno identificiramo posamezne vrhove na kromatogramu.

Za izdelavo umeritvene krivulje, pripravimo štiri redčitve standardne mešanice BA. Standardno mešanico pripravimo tako, da zatehtamo različne mase BA in jih raztopimo v sintetičnem vinu.

Preglednica 4: Meje detekcije (LOD) in meje kvantitativne določitve (LOQ) biogenih aminov

BA	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Histamin	0,5	1,5
Tiramin	0,2	0,6
Putrescin	2,2	6,9
Etanolamin	0,2	0,5
Metilamin	0,2	0,5
Butilamin	0,1	0,4
Kadaverin	1,8	5,4
Triptamin	0,2	0,7
2-metil-butilamin	0,2	0,6
Izopentilamin	0,2	0,6
Heksilamin	0,8	2,3

3.2.8 Obdelava podatkov

Rezultate analize BA smo statistično obdelali s programom SigmaPlot 13 (Systat Software Inc., Erkrath, Germany). Najprej smo opravili Shapiro-Wilkov test normalnosti ter Brown-Forsythov test homogenosti varianc. V primerih, kjer sta oba testa pokazala statistično neznačilne razlike, smo uporabili t-test; kjer pa je eden od testov pokazal statistično značilne razlike, smo uporabili Mann-Whitney U-test. V primeru, ko so bile vrednosti BA manjše od LOQ, smo v statistični analizi uporabili povprečno vrednost med LOD in LOQ.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 REZULTATI OSNOVNIH KEMIJSKIH ANALIZ VINA

V spodnji preglednici so prikazani rezultati osnovnih kemijskih analiz vzorcev vin modra frankinja.

Preglednica 5: Rezultati osnovnih kemijskih analiz vina modra frankinja

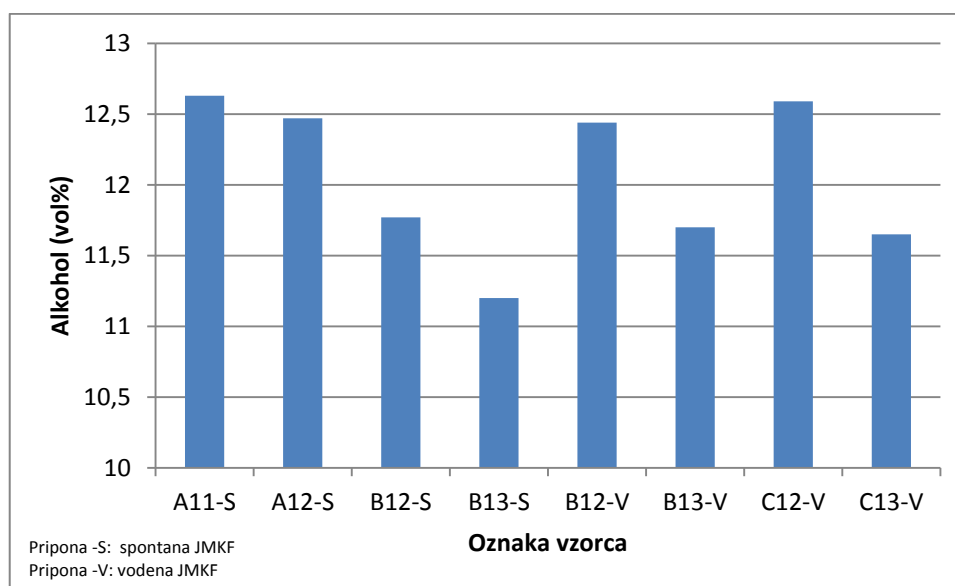
Preiskovani parameter	Vzorci – spontana JMKF				Vzorci – vodena JMKF			
	A11-S	A12-S	B12-S	B13-S	B12-V	B13-V	C12-V	C13-V
Alkohol (% vol)	12,63	12,47	11,77	11,20	12,44	11,70	12,59	11,65
Skupni ekstrakt (g/L)	31,96	29,14	24,47	24,41	25,83	27,72	27,01	24,44
pH- vrednost	3,35	3,37	3,36	3,30	3,33	3,27	3,44	3,38
Titribilne kisline TK ₁ (g/L)	6,20	5,50	5,45	5,27	6,32	6,09	5,30	5,35
Skupne kisline TK ₂ (g/L)	6,75	6,00	5,87	5,68	6,77	6,58	5,85	5,73
Hlapne kisline (g/L)	0,62	0,50	0,45	0,44	0,89	0,53	0,45	0,41
Prosti SO ₂ (mg/L)	13	23	12	31	17	21	20	25
Skupni SO ₂ (mg/L)	50	85	84	105	50	64	60	79

4.1.1 Rezultati določanja vsebnosti alkohola

Ko govorimo o alkoholu, mislimo predvsem na etanol, ki je najpomembnejši alkohol v vinu. Nastane kot posledica delovanja kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* v času AF. Vinu daje stabilnost, deluje kot topilo in zagotavlja posebne senzorične lastnosti (Bavčar, 2009). Poleg etanola vsebuje vino tudi druge monohidroksialkohole in nekatere poliole. Koncentracija etanola v vinu je med drugim odvisna od sorte, vsebnosti fermentativnih sladkorjev, kvasovk, temperature AF, vsebnosti hranilnih snovi v moštu, itd. Običajno ves razpoložljiv sladkor v moštu ne povre v etanol, zato je njegova koncentracija manjša od pričakovane (Košmerl in Kač, 2009).

Glede na vsebnost alkohola delimo vina na (Bavčar, 2009):

- tanka (do 9,0 % vol alkohola);
- lahka (9,5 – 10,5 % vol alkohola);
- srednje močna (10,5 – 12,0 % vol);
- močna (12,5 – 14,0 % vol);
- zelo močna (več kot 14,0 % vol).

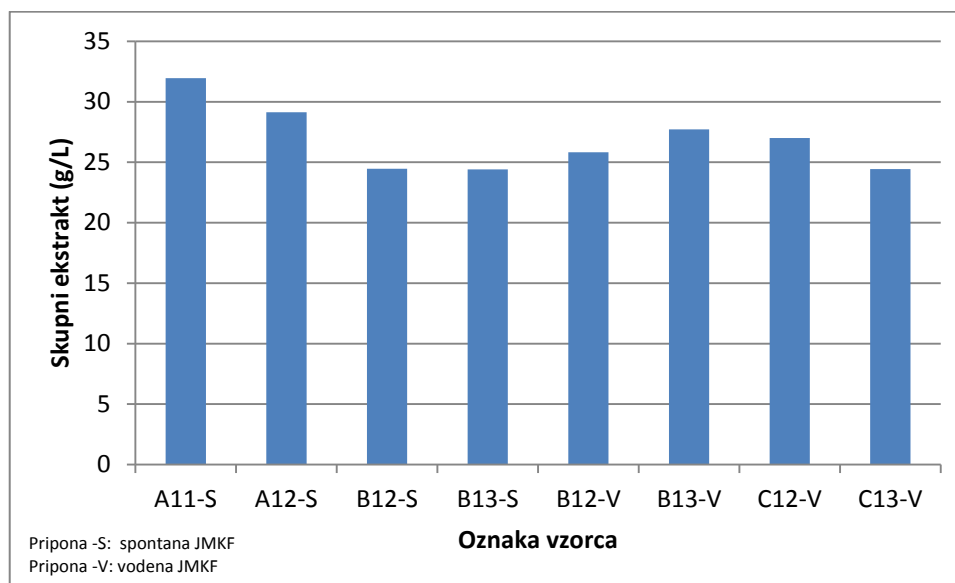


Slika 7: Koncentracije alkohola (% vol) v vzorcih vina

Slika 7 prikazuje vsebnost alkohola (% vol) v preiskovanih vzorcih. Največjo vsebnost alkohola smo izmerili v vzorcu A11-S (12,63 % vol); najmanjšo pa v vzorcu B13-S (11,20 % vol). Glede na vsebnost alkohola lahko vzorce vin uvrstimo med srednje močna in močna vina. Relativno velike koncentracije alkohola kažejo na dobro kakovost vin in so v skladu z izmerjenimi vsebnostmi sladkorja ob trgatvi. Ugotovimo lahko, da vzorci vin letnika 2012 vsebujejo večje koncentracije alkohola v primerjavi z vzorci vin letnika 2013, kar je rezultat slabše zrelosti grozdja v letu 2013 zaradi vremenskih razmer.

4.1.2 Rezultati določanja skupnega ekstrakta

Skupni ekstrakt vina sestavljajo po definiciji O.I.V. pri 100 °C nehlapne komponente vina (sladkorji, fiksne kisline, organske soli, itd.). Glede na vsebnost ekstrakta v vinu lahko sklepamo na začetno vsebnost sladkorja v moštu, iz katerega je bilo vino pridelano. Sladkorja prosti ekstrakt je razlika med skupnim ekstraktom in reducirajočimi sladkorji. Vina navadno vsebujejo 7 – 30 g/L sladkorja prostega ekstrakta (Košmerl in Kač., 2009).

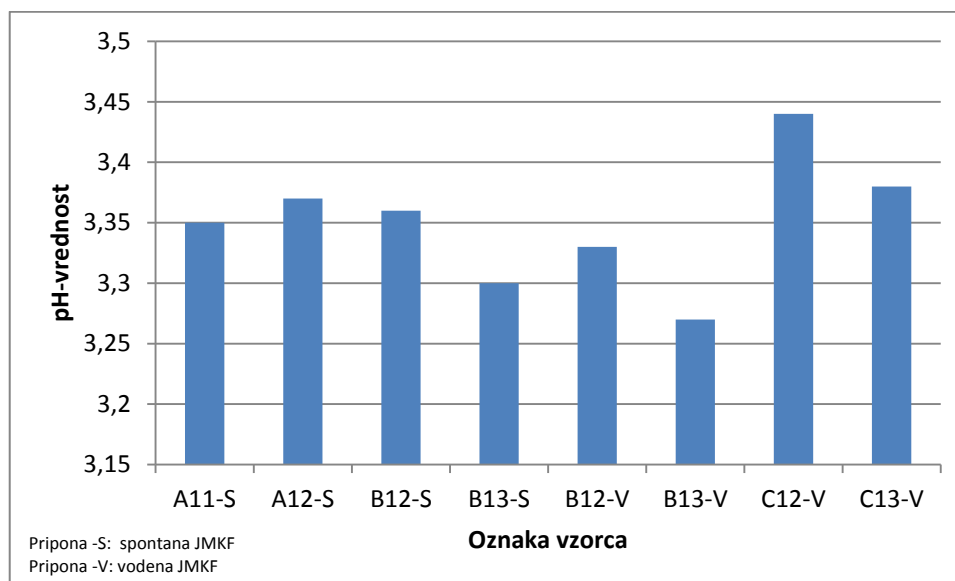


Slika 8: Koncentracije skupnega ekstrakta (g/L) v vzorcih vina

Slika 8 prikazuje rezultate določanja skupnega ekstrakta. Iz grafa je razvidno, da smo največjo vsebnost skupnega ekstrakta izmerili v vzorcu A11-S (31,96 g/L); najmanjšo pa v vzorcu B13-S (24,41 g/L). Relativno velike koncentracije skupnega ekstrakta, ob predpostavki, da je šlo pri vseh vzorcih za suho vino, kažejo na visoko kakovost vseh vzorcev vin. Velika vsebnost skupnega ekstrakta je posledica tehnologije vinifikacije, predvsem visoke temperature med AF ter zelo zrelega grozdja. Opazimo lahko, da sta vsebnost alkohola in skupnega ekstrakta tesno povezani. Vzorec A11-S ima največji vsebnosti alkohola in skupnega ekstrakta, vzorec B13-S pa najmanjši.

4.1.3 Rezultati merjenja vrednosti pH

Vpliv vrednosti pH v vinu se kaže v selektivnem delovanju na mikroorganizme, v intenzivnosti in odtenku barve, okusu, oksidacijsko-redukcijskem potencialu, razmerju med prostim in vezanim žveplovim dioksidom, itd. Mošt normalnih trgatev ima pH navadno med 3,1 in 3,6. Običajno imajo vina pH pod 3,6 (Košmerl in Kač, 2009). Pri JMKF pride zaradi zmanjšanja razgradnje jabolčne kisline do povečanja pH za 0,1 do 0,3 enote, kar lahko med drugim negativno vpliva na mikrobiološko stabilnost vina in delno izgubo barve rdečih vin (Bavčar, 2009).

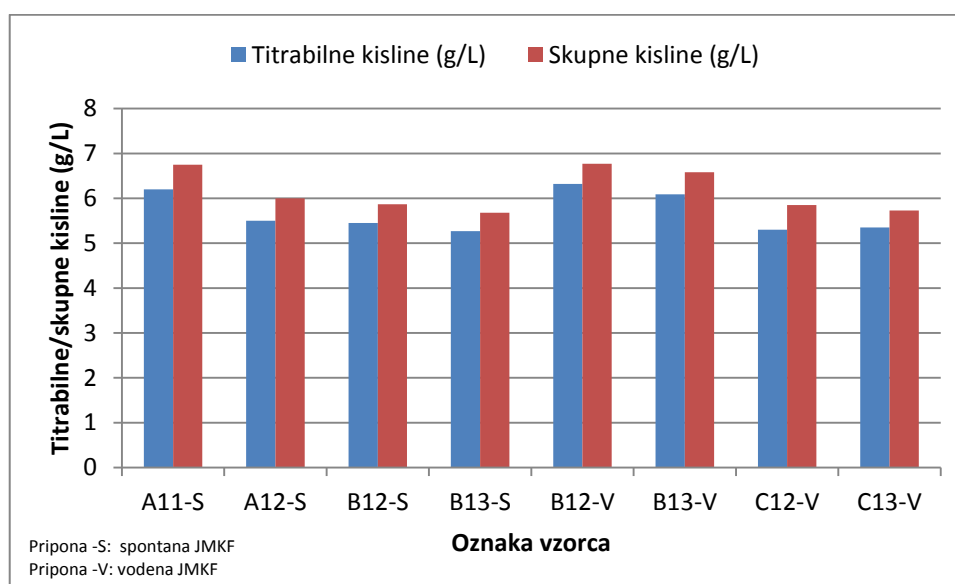


Slika 9: Vrednost pH v vzorcih vina

Slika 9 prikazuje izmerjene pH vrednosti vzorcev. Največjo pH vrednost smo izmerili v vzorcu C12-V (3,44); najmanjšo pa v vzorcu B13-V (3,27). Pri vseh vzorcih je pH v območju normalnih vrednosti za rdeča vina, kjer je potekla JMKF. Opazimo da, so pH-vrednosti vzorcev letnika 2012 višje od vzorcev 2013, kar je posledica slabše zrelosti grozdja v letu 2013 in dejstva, da je bilo leto 2013 hladnejše, posledično so bile tudi pH-vrednosti grozdja manjše.

4.1.4 Rezultati določanja titrabilnih in skupnih kislin

Grozdje vsebuje znatne količine različnih šibkih karboksilnih kislin, katerih koncentracija se tekom zorenja grozdja zmanjšuje, hkrati pa se povečuje pH. Vsebnost karboksilnih kislin izražamo kot množino vinske kisline na liter vina. Glede na pH končne točke titracije, uporabljamo izraz skupne in titrabilne kisline. V grozdnem moštu prevladujejo vinska, jabolčna in citronska kislina. Med in po AF pa lahko nastanejo še: očetna, mlečna, piruvična, propionska, jantarna, galakturonska, glikolna, oksalna in fumarna kislina (Košmerl in Kač, 2009). Vsebnost skupnih karboksilnih kislin v vinu (izraženo v g vinske kisline/L vzorca) je navadno med 5,5 in 8,5 g/L. Znano je, da vina iz hladnejših pridelovalnih območij vsebujejo večje koncentracije kislin. Koncentracija kislin je pomembna za stabilnost, barvo, primeren pH in obstojnost vina. Pomembno vplivajo tudi na senzorično ravnotežje vina (Bavčar, 2009). Najmanjša zahtevana koncentracija skupnih kislin, določena s strani zakonodaje, je 3,5 g/L (Pravilnik o pogojih ..., 2004).

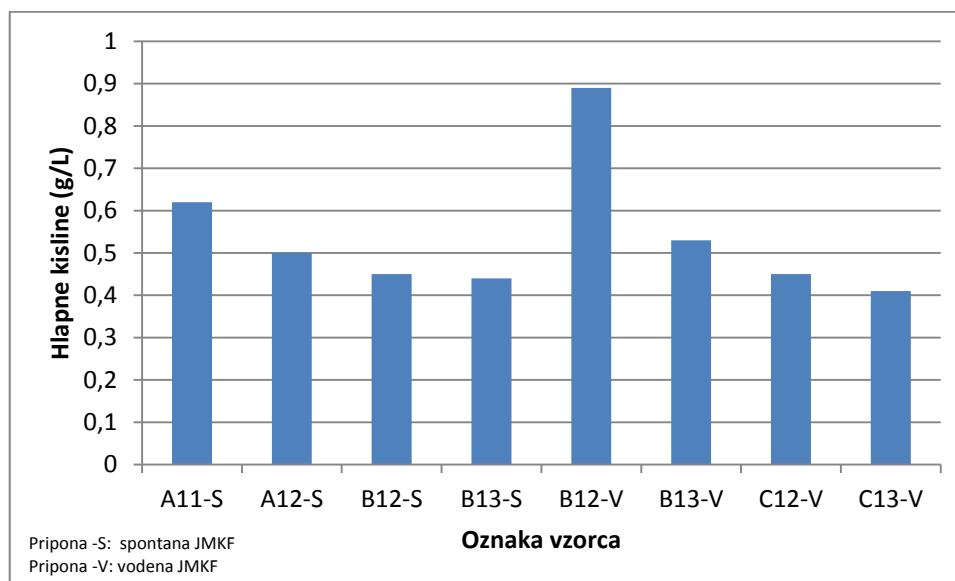


Slika 10: Koncentracije titrabilnih in skupnih kislin (g/L) v vzorcih vina

Na sliki 10 so prikazani rezultati določanja titrabilnih kislin (g/L) (modri stolpci) in skupnih kislin (g/L) (rdeči stolpci). Največjo vsebnost titrabilnih kislin smo izmerili v vzorcu B12-V (6,32 g/L); najmanjšo pa v vzorcu B13-S (5,27 g/L). Največjo vsebnost skupnih kislin smo določili v vzorcu B12-V (6,77 g/L); najmanjšo pa v vzorcu B13-S (5,68 g/L). Rezultati, kljub razlikam med letniki, kažejo na zelo izenačene vsebnosti skupnih (titrabilnih) kislin v vzorcih. Prav tako so koncentracije skupnih kislin v območju običajnih vrednosti za rdeča vina.

4.1.5 Rezultati določanja hlapnih kislin

Glavne hlapne kisline v vinu so očetna, mravljična in butanojska kislina. Najpomembnejša je očetna kislina, ki ima v normalnih koncentracijah v vinu pomembno vlogo kot aromatična spojina in pri tvorbi estrov (Bavčar, 2009). Manjše količine hlapnih kislin (do 0,3 g očetne kisline/L) se tvorijo že med AF pod vplivom kvasovk, nastajajo pa lahko tudi med JMKF zaradi razgradnje citronske kisline ali sladkorjev s strani MKB. Povečane koncentracije hlapnih kislin so posledica delovanja očetno kislinskih bakterij v vinu in lahko pri koncentracijah 0,6 – 0,9 g očetne kisline/L vina povzročajo bolezen vina, imenovano očetno-kislinski ton ali cik. Mlada vina običajno vsebujejo manj hlapnih kislin kot stara (Košmerl in Kač, 2009). Koncentracija hlapnih kislin, izraženih kot očetna kislina (g/L), je zakonsko omejena in za rdeča vina ne sme presegati 1,2 g/L (Pravilnik o pogojih ..., 2004).

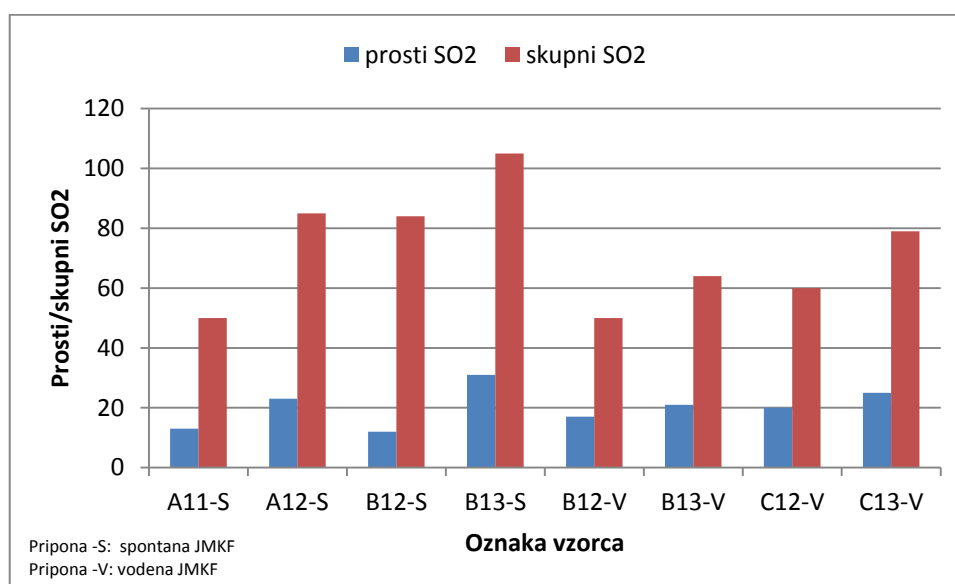


Slika 11: Koncentracije hlapnih kislin (g/L) v vzorcih vina

Slika 11 prikazuje vsebnosti hlapnih kislin (g/L). Največjo vsebnost hlapnih kislin smo določili v vzorcu B12-V (0,89 g/L), najmanjšo pa v vzorcu C13-V (0,41 g/L). Iz rezultatov je razvidno, da je vrednosti hlapnih kislin pri vseh vzorcih pod zakonsko določeno mejo 1,2 g/L. Od vseh vzorcev izstopa le vzorec B12-V, ki v primerjavi z ostalimi vzorci, vsebuje precej več hlapnih kislin. Delno je vzrok lahko v visoki temperaturi AF (do 30 °C) ter dolgotrajni maceraciji (17 dni), kjer je lahko proti koncu AF zaradi zmanjšane tvorbe ogljikovega dioksida prišlo do aktivnosti očetnokislinskih bakterij. Pri ostalih vzorcih so vsebnosti hlapnih kislin relativno majhne, kar kaže na zdravo in kakovostno grozdje ter ustrezno tehnologijo predelave grozdja.

4.1.6 Rezultati določanja prostega in skupnega žveplovega dioksida

Žveplov dioksid v vinarstvu uporabljamo z namenom preprečevanja aktivnosti oksidacijskih encimov in reakcij porjavenja, preprečevanja rasti neželenih mikroorganizmov ter vezave s porabniki. Že same kvasovke lahko med AF tvorijo žveplov dioksid v koncentracijah nad 15 mg/L. Večje koncentracije pa so posledica uporabe enoloških sredstev, ki vsebujejo žveplov dioksid. Nove smernice v vinarstvu gredo v smeri zmanjšanja uporabe žveplovega dioksida, vendar ga zaenkrat ni mogoče popolnoma nadomestiti (Bavčar, 2009). Vina običajno vsebujejo 5 – 40 mg/L prostega žveplovega dioksida (Košmerl in Kač, 2009). Slovenska zakonodaja določa največjo dovoljeno koncentracijo skupnega žveplovega dioksida, ki za rdeča vina znaša 160 mg/L. Za vrhunska rdeča vina je največja dovoljena vsebnost skupnega žveplovega dioksida 140 mg/L, prostega pa 35 mg/L. Vrednosti veljajo za suha vina, ki vsebujejo do 5 g/L oziroma v primeru vrhunskih vin do 7 g/L reducirajočih sladkorjev (Pravilnik o pogojih ..., 2004).



Slika 12: Koncentracije prostega in skupnega žveplovega dioksida (mg/L) v vzorcih vina

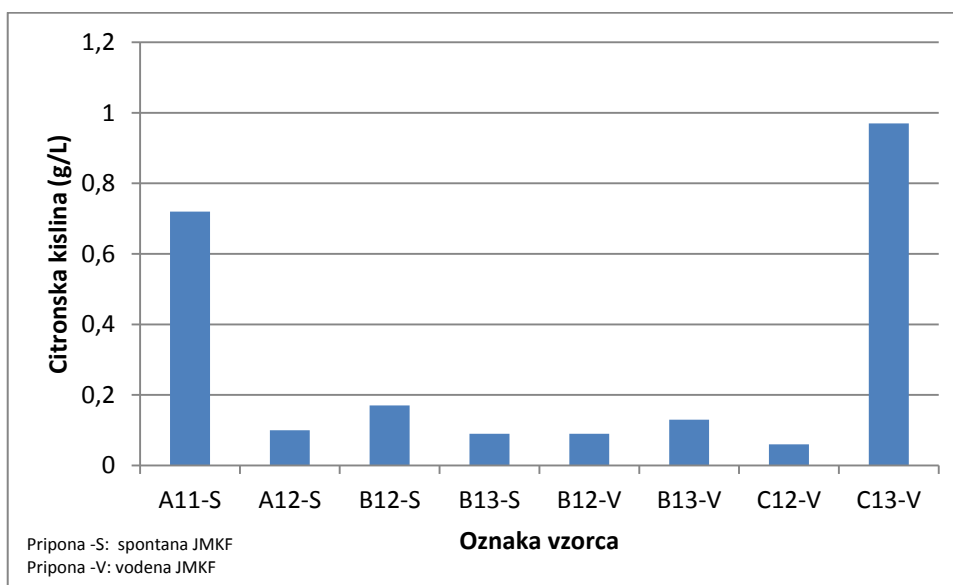
Slika 12 prikazuje izmerjene vrednosti prostega in skupnega žveplovega dioksida. Iz grafa je razvidno, da smo največjo vsebnost prostega SO_2 izmerili v vzorcu B13-S (31 mg/L), najmanjšo pa v vzorcu B12-S (12 mg/L). Največjo vsebnost skupnega SO_2 smo določili v vzorcu B13-S (105 mg/L), najmanjšo pa v vzorcih A11-S in B12-V (50 mg/L). Če pogledamo koncentracije skupnega SO_2 , ugotovimo, da so krepko pod zakonsko dovoljeno mejo, kar kaže na dobro kakovost vin in tehnologijo vinifikacije. Majhne vrednosti so tudi odraz prizadevanj po zmanjšani uporabi SO_2 v vinarstvu ter dejstva, da rdeča vina vsebujejo veliko fenolnih snovi, ki so antioksidanti, kar v določeni meri zmanjša potrebo po dodatku SO_2 . Splošno so vzorci vin letnika 2013 vsebovali več skupnega SO_2 v primerjavi z vzorci letnika 2012. Največji vzrok je v slabši kakovosti grozdja v letu 2013, ko je bilo zaradi deževnega vremena več gnilega ali poškodovanega grozdja. Vzorci B12-S, B13-S, B12-V, B13-V so iz iste kleti, razlika je le v tem, da spadajo vzorci s pripono -S v kakovostni razred vina, vzorci s pripono -V pa v vrhunski razred vin. Ker so za vrhunski razred vin izbirali bolj zdravo grozdje, je bila potreba po dodatku SO_2 manjša, kar se odraža tudi v manjši koncentraciji skupnega SO_2 . Pri prostem SO_2 so vrednosti med vzorci precej različne. Ker so bili vzorci vin po vzorčenju v kleti nekaj tednov pred analizo SO_2 shranjeni v steklenicah, je pri nekaterih vzorcih prišlo do zmanjšanja koncentracije prostega SO_2 , vendar ne pod mejo, ki bi ogrožala stabilnost vina.

4.2 REZULTATI ANALIZE ORGANSKIH KISLIN

Preglednica 6: Koncentracija posameznih organskih kislin v vzorcih vina modra frankinja

Organske k. (g/L)	Vzorci – spontana JMKE				Vzorci – vodena JMKE			
	A11-S	A12-S	B12-S	B13-S	B12-V	B13-V	C12-V	C13-V
Citronska kislina	0,72	0,10	0,17	0,09	0,09	0,13	0,06	0,97
Vinska kislina	2,80	2,90	2,80	2,60	2,60	2,90	2,20	2,30
Jabolčna kislina	0,20	0,30	0,10	0,10	0,40	0,10	0,10	0,20
Mlečna kislina	1,60	1,40	1,60	1,30	1,20	1,30	1,10	1,40

4.2.1 Rezultati določanja citronske kisline



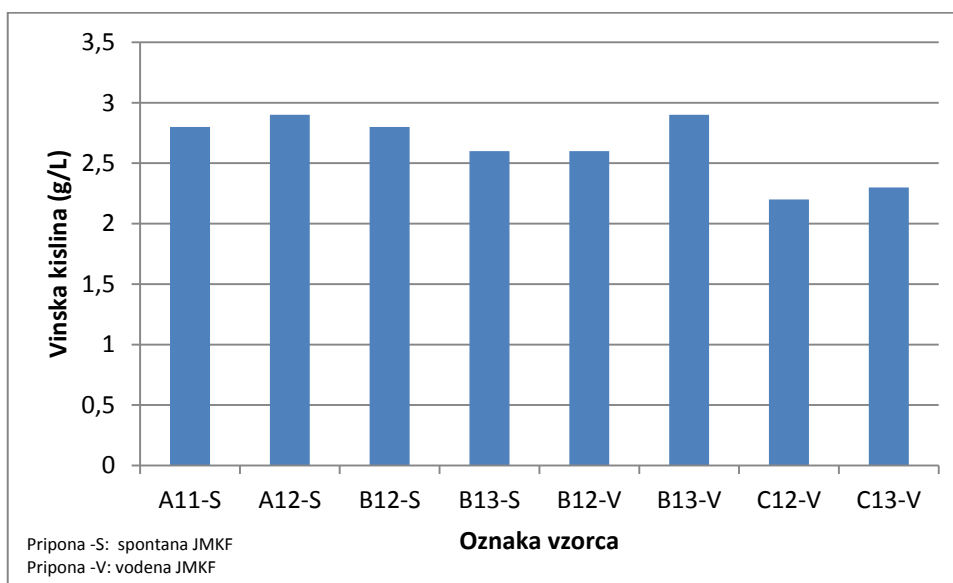
Slika 13: Koncentracije citronske kisline (g/L) v vzorcih vina

Citronska kislina je v grozdni jagodi vezana na celične opne, zato je mnogo zaostane v tropinah, predvsem v vinih, kjer maceracija ne poteče. V vinu je stabilna, neobstoja je le v primeru aktivnosti MKB. Vsebnost citronske kisline v grozdju se lahko poveča tudi kot posledica delovanja plesni *Botrytis cinerea* (Bavčar, 2009). Koncentracija citronske kisline v vinu pred JMKE znaša od 0,5 do 1,0 g/L (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b). Kljub majhni koncentraciji v vinu je zelo pomembna, saj lahko iz nje pod vplivom MKB nastaja očetna kislina, kar poveča koncentracijo hlapnih kislin v vinu; ter diacetil, ki zelo vpliva na aromo vina. Znano je namreč, da diacetil v koncentraciji do 5 mg/L pozitivno vpliva na

kompleksnost vina, pri večjih koncentracijah pa deluje negativno (Costantini in sod., 2009).

Slika 13 prikazuje vsebnost citronske kisline v vzorcih. Največjo koncentracijo citronske kisline smo izmerili v vzorcu C13-V (0,97 g/L); najmanjšo pa v vzorcu C12-V (0,06 g/L). Iz grafa je razvidno, da sta vzorca C13-V in A11-S vsebovala bistveno več citronske kisline v primerjavi z ostalimi vzorci, pri katerih se koncentracije gibljejo med 0,06 mg/L in 0,17 mg/L. Pri slednjih je najverjetneje prišlo do razgradnje citronske kisline med JMKF bodisi v diacetil ali očetno kislino, medtem ko razgradnja citronske kisline pri vzorcih C13-V in A11-S najverjetneje ni potekla. Zanimivo je tudi dejstvo, da vzorec C13-V izmed vseh vzorcev vsebuje največjo koncentracijo citronske kisline, hkrati pa tudi najmanjšo koncentracijo hlapnih kislin. Manj verjetno je, da je pri vzorcih C13-V in A11-S k večji koncentraciji citronske kisline prispevala plesen *Botrytis cinerea*, saj so vrednosti v teh dveh vzorcih v območju normalnih koncentracij v vinu, poleg tega je bilo grozdje zdravo in minimalno okuženo s plesnijo *Botrytis cinerea*.

4.2.2 Rezultati določanja vinske kisline

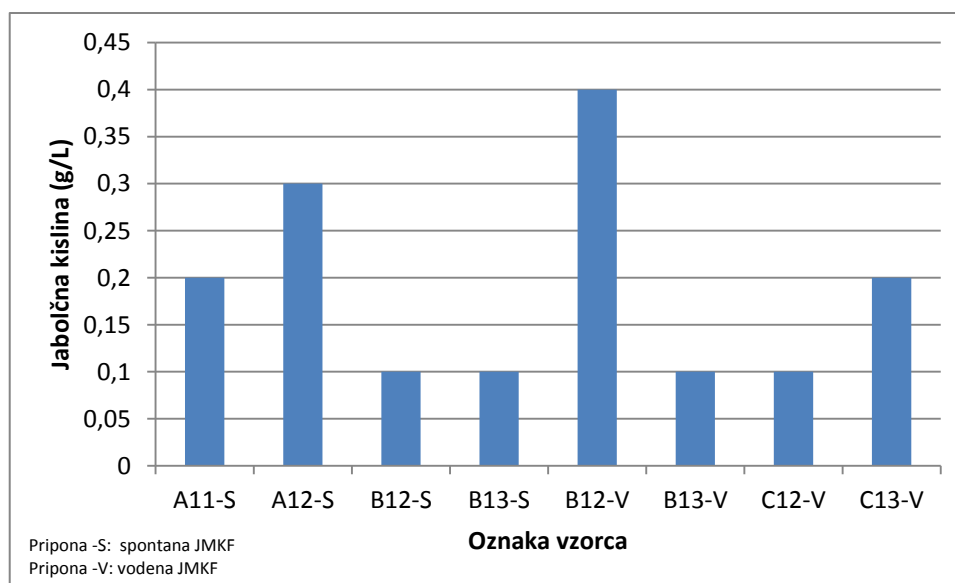


Slika 14: Koncentracije vinske kisline (g/L) v vzorcih vina

Vinska kislina je v zrelem grozdju prevladujoča kislina. V grozdju se nahaja v koncentracijah med 5 in 10 g/L mošta (Bavčar, 2009). Mošti iz toplejših pridelovalnih območij pa lahko vsebujejo tudi manj kot 3 g/L vinske kisline (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b). Njena koncentracija je odvisna predvsem od sorte in končnega volumna grozdne jagode ob trgatvi, med dozorevanjem pa njena koncentracija ne upada. Vinska kislina je slabo topna in se izloča kot kalijev bitartrat in kalcijev tartrat. Mikroorganizmi v vinu je ne uporabljajo kot substrat (Bavčar, 2009). Po zakonu je predpisana najmanjša koncentracija vinske kisline v vinu, ki predstavlja 1,0 g/L (Pravilnik o pogojih ..., 2004).

Slika 14 prikazuje vsebnost vinske kisline v vzorcih. Največjo koncentracijo vinske kisline smo določili v vzorcih A12-S in B13-V (2,9 g/L); najmanjšo pa v vzorcu C12-V (2,2 g/L). Vzorci so glede vsebnosti vinske kisline, kljub različnim letnikom, med seboj precej izenačeni. Pri vseh vzorcih so koncentracije relativno majhne, tudi zato, ker se je del vinske kisline izločil v obliki soli.

4.2.3 Rezultati določanja jabolčne kisline

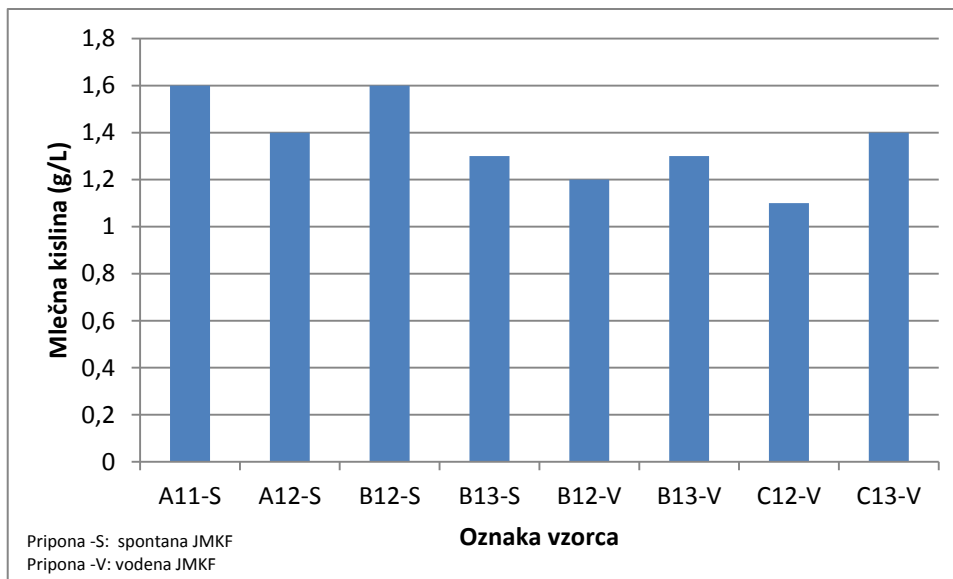


Slika 15: Koncentracije jabolčne kisline (g/L) v vzorcih vina

Jabolčna kislina se v zrelem grozdju iz hladnejših pridelovalnih območij nahaja v koncentracijah od 4 do 6 g/L mošta, medtem ko lahko mošti iz toplejših pridelovalnih območij vsebujejo le 1-2 g/L jabolčne kisline (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b). Koncentracija je odvisna predvsem od sorte in temperature v času dozorevanja grozdja. Z dozorevanjem grozdja se njena koncentracija zmanjšuje, še posebej pri visokih temperaturah. Ker je mikrobiološko nestabilna, jo lahko MKB v procesu JMKF spremenijo v mlečno kislino (Bavčar, 2009).

Na sliki 15 je prikazana vsebnost jabolčne kisline v vzorcih. Iz grafa je razvidno, da je največ jabolčne kisline vseboval vzorec B12-V (0,4 g/L); najmanj pa vzorci B12-S, B13-S, B13-V, C12-V (0,1 mg/L). Iz grafa je razvidno, da so tudi po končani JMKF v vzorcih ostale manjše koncentracije jabolčne kisline, kar je po novjših ugotovitvah zaželeno, saj jabolčna kislina v manjših koncentracijah pozitivno vpliva na harmonijo sadni značaj vina. Predvsem je ostanek jabolčne kisline priporočljiv za vina, ki imajo majhno koncentracijo skupnih kislin.

4.2.4 Rezultati določanja mlečne kisline



Slika 16: Koncentracije mlečne kisline (g/L) v vzorcih vina

Mlečna kislina se v vinu nahaja v koncentracijah od 0 do 2,5 g/L, izjemoma tudi več. Nastane predvsem kot rezultat dekarboksilacije jabolčne kisline pod vplivom MKB (L-mlečna kislina) (Bavčar, 2009). Med AF lahko kvasovke tvorijo D-mlečno kislino v koncentracijah od 200 do 300 mg/L vina (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

Slika 16 prikazuje izmerjene vsebnosti mlečne kisline v vzorcih. Največjo vsebnost mlečne kisline smo določili pri vzorcih A11-S in B12-S (1,6 g/L); najmanjšo pa pri vzorcu C12-V (1,1 g/L). Vzorci so glede vsebnosti mlečne kisline med seboj zelo izenačeni. Glede na vsebnosti mlečne kisline in ostanke jabolčne kisline, lahko ugotovimo, da je pri vseh vzorcih JMKF potekla v optimalnem obsegu. Preveč mlečne kisline lahko namreč negativno vpliva na senzorično kakovost vina.

4.3 REZULTATI ANALIZE BIOGENIH AMINOV

Preglednica 7: Vsebnost biogenih aminov (BA) (mg/L) v vzorcih vina modra frankinja

Koncentracija BA (mg/L)	Vzorci – spontana JMKF				Vzorci – vodena JMKF			
	A11-S	A12-S	B12-S	B13-S	B12-V	B13-V	C12-V	C13-V
Histamin	4,83	< 1,50	< 1,50	3,98	< 1,50	5,04	6,56	4,59
Tiramin	1,76	1,31	< 0,60	< 0,60	0,77	0,65	0,93	< 0,60
Putrescin	11,83	15,13	< 6,90	< 6,90	< 6,90	< 6,90	< 6,90	< 6,90
Etanolamin	27,24	34,85	40,47	22,53	27,24	29,11	28,92	17,31
Metilamin	< 0,50	0,90	< 0,50	< 0,50	< 0,50	< 0,50	0,85	< 0,50
Butilamin	< 0,40	1,01	0,87	0,97	0,87	0,85	0,94	0,85
Kadaverin	< 5,40	< 5,40	< 5,40	< 5,40	< 5,40	< 5,40	< 5,40	< 5,40
Triptamin	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-metil- butilamin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Izopentilamin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Heksilamin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

* ND- ni detektirano

Preglednica 8: Statistična primerjava vsebnosti biogenih aminov (BA) v vzorcih med spontano in vodo JMKE

Posamezni BA	Povprečje -spontana JMKE (mg/L)	Povprečje - vodena JMKE (mg/L)	Sign.* (test Shapiro-Wilk)	Sign. (test Brown-Forsythe)	Sign. (Student t-test)	Sign. (Mann-Whitney U- test)
Histamin	2,70	4,30	0,415 ns	0,827 ns	0,341 ns	
Tiramin	0,97	0,69	0,729 ns	<0,05 **	0,464 ns	0,886 ns
Putrescin	9,02	4,55	0,231 ns	<0,05 **	0,145 ns	0,343 ns
Etanolamin	31,27	25,65	0,302 ns	0,336 ns	0,292 ns	
Metilamin	0,49	0,48	<0,05 **	0,949 ns	0,949 ns	0,886 ns
Butilamin	0,78	0,88	<0,05 **	0,266 ns	0,587 ns	0,486 ns

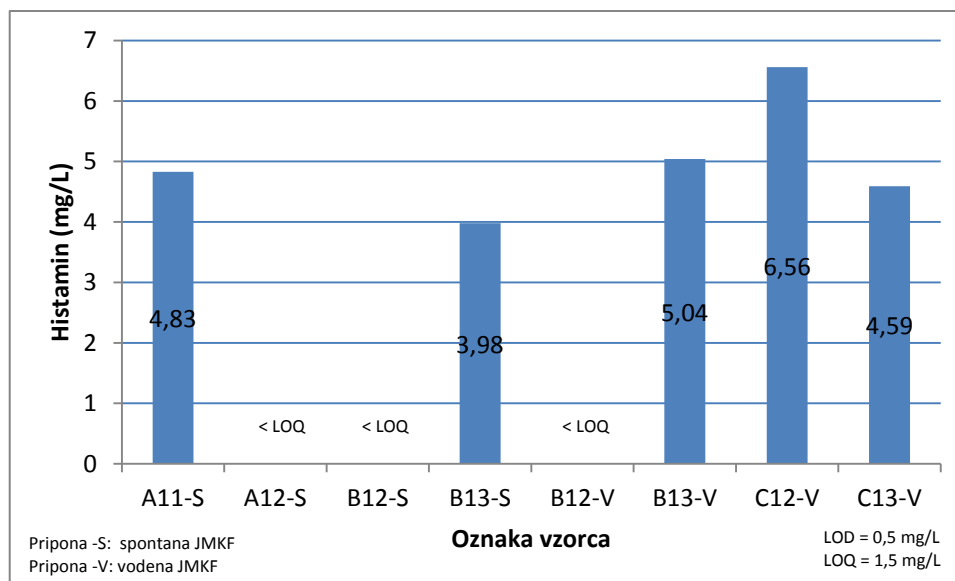
*stopnja statistične značilnosti (signifikanca)

**statistično značilne razlike ($p < 0,05$)

ns- ni statistično značilnih razlik

V primeru, ko so bile vsebnosti BA manjše od LOQ (Preglednica 7), smo za statistično analizo uporabili srednjo vrednost med LOD in LOQ. V primeru naših vzorcev nismo ugotovili statistično značilnih razlik v vsebnosti BA med spontano in vodo JMKE.

4.3.1 Rezultati določanja histamina



Slika 17: Koncentracija histamina (mg/L) v vzorcih vina

Slika 17 prikazuje vsebnost histamina v vzorcih. Med vzorci, pri katerih smo koncentracijo histamina lahko določili kvantitativno, je največ histamina vseboval vzorec C12-V (6,56 mg/L); najmanj pa v vzorec B13-S (3,98 mg/L). Pri vzorcih A12-S, B12-S in B12-V smo določili prisotnost histamina, vendar pod mejo kvantifikacije LOQ, ki je bila 1,5 mg/L.

Iz rezultatov je razvidno, da je kar 5 od 8-ih vzorcev preseglo zakonsko določeno mejo, ki je 2 mg histamina/L vina (Pravilnik o pogojih ..., 2004). Rezultati vsebnosti histamina so si glede na izvor vzorcev precej različni. Opazimo, da med vsebnostjo histamina in načinom poteka JMKF (s pomočjo avtohtonih ali selekcioniranih MKB) ni jasne povezave. Pri vzorcih A11-S, A12-S, B12-S, B13-S je JMKF potekala spontano z avtohtonimi MKB, pri vzorcih B12-V, B13-V, C12-V, C13-V pa smo uporabili selekcionirano kulturo MKB.

Med tem, ko med vzorci, kjer je potekla spontana oziroma vodena JMKF ni bistvene razlike; lahko opazimo razliko pri vzorcih iz iste kleti med različnimi letniki. Vzorca A11-S in A12-S sta pridelana v isti kleti iz grozdja iz istega vinograda, primerljive kakovosti in zrelosti. Razlika je le v letniku, tehnologija vinifikacije pa je enaka. Glede vsebnosti histamina pa se med seboj precej razlikujeta; vzorec A11-S vsebuje 4,83 mg/L histamina, vzorec A12-S pa manj kot 1,5 mg/L, torej pod mejo kvantifikacije. Tudi pri vzorcih B12-S in B12-V je koncentracija histamina manjša od 1,5 mg/L; medtem ko je pri vzorcih B13-S (3,98 mg/L) in B13-V (5,04 mg/L) bistveno večja.

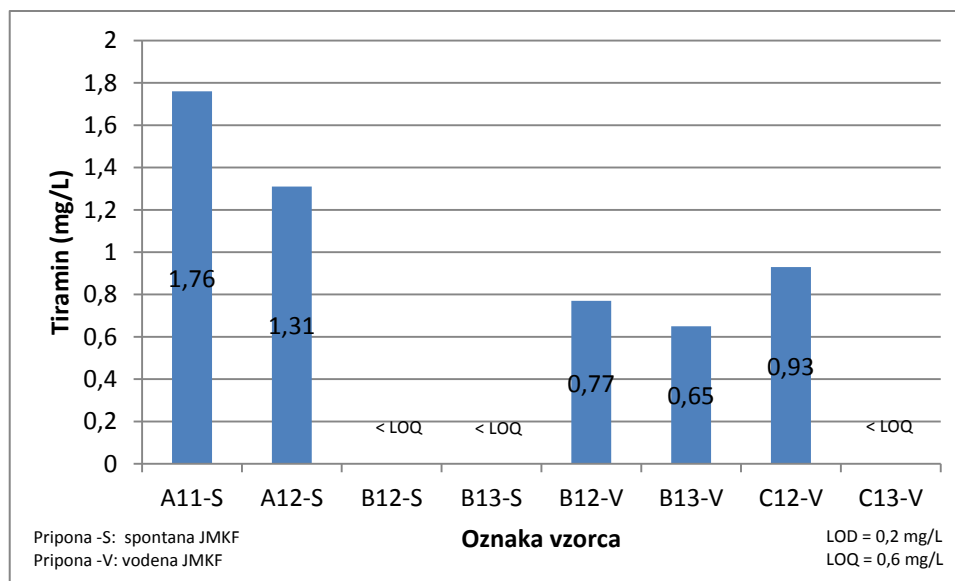
Glede na rezultate lahko sklepamo, da vsebnost histamina v naših vzorcih ni povezana z načinom inokulacije (avtohtona/selekcionirana kultura) in se bolj razlikuje glede na letnik. Pričakovali bi, da vzorci, kjer smo uporabili selekcionirano kulturo *O. oeni*, vsebujejo

manjše koncentracije histamina zlasti, ker selekcionirane kulture MKB nimajo sposobnosti dekarboksilacije histidina. Prav nasprotno. Opazimo lahko, da vzorec C12-V, kjer je JMKF potekla s pomočjo selekcioniranih MKB, vsebuje največjo koncentracijo histamina, hkrati pa smo pri vzorcih B12-S in A12-S, kjer je JMKF potekala s pomočjo avtohtonih MKB, določili koncentracijo histamina pod mejo kvantifikacije. Vzrok je lahko v različni sestavi avtohtone mikrobiote med letniki ter različni vsebnosti histidina, kot prekursorja histamina. Hkrati se poraja vprašanje uspešnosti inokulacije s selekcioniranimi MKB, ter morebitne tvorbe BA iz njihove strani. Pomembno je opozoriti na dejstvo, da je imel vzorec C12-V, pri katerem smo določili največjo koncentracijo histamina, hkrati tudi največjo pH vrednost (3,44). Znano je namreč, da pri večji pH vrednosti lažje rastejo bakterije vrst *Lactobacillus* in *Pediococcus*, ki so potencialni tvorci histamina. Tudi Landete in sod. (2005) poročajo, da so vina z večjim pH, vsebovala večje koncentracije histamina. Glede na omenjena dejstva, obstaja sum, da so poleg selekcionirane kulture v JMKF zaradi večjega pH, sodelovale tudi druge MKB, ki so odgovorne za nastali histamin v vinu. Po drugi strani pa je vzorec B13-V, ki je vseboval drugo največjo koncentracijo histamina in pri katerem je bila dodana selekcionirana kultura MKB, imel najmanjšo pH vrednost (3,27). To kaže na kompleksnost problema tvorbe histamina v vinu in odvisnost od številnih dejavnikov.

Če naše rezultate primerjamo z drugimi študijami, ugotovimo naslednje: Čuš in sod. (2013) so analizirali 7 vzorcev vina modra frankinja letnikov 2006, 2007, 2009 iz Dolenjskega vinorodnega okoliša. V enem vzorcu so določili 2,0 mg/L histamina, pri vseh ostalih vzorcih pa so bile dobljene vrednosti manjše od 0,5 g/L. Pri vseh vzorcih je potekla tudi JMKF. Opazimo lahko, da so ti vzorci v primerjavi z našimi, vsebovali precej manjše koncentracije histamina, kljub geografski bližini in podobni tehnologiji vinifikacije. Bolj primerljive vrednosti našim, so v 25-ih vzorcih modre frankinje, določili Konakovsky in sod. (2011). V vzorcih so določili vsebnost histamina od 0,73 mg/L do 20,2 mg/L. Povprečno so vzorci vsebovali 6,54 mg/L histamina, kar je primerljivo našim vrednostim. Baša Česnik in sod. (2014) so analizirali 82 vzorcev vina teran letnikov 2011-2013. Pri približno 60% vzorcev so določili prisotnost histamina v koncentracijah od 0,003 mg/L do 13,86 mg/L; povprečno so vzorci vsebovali 2,63 mg/L histamina.

Glede na podatke iz literature, lahko zaključimo, da so vrednosti histamina v naših vzorcih primerljive s povprečnimi koncentracijami histamina v vzorcih, analiziranih v podobnih študijah. Pomembno je poudariti, da so v nekaterih drugih Evropskih državah omejitve glede vsebnosti histamina precej manj stroge kot v Sloveniji.

4.3.2 Rezultati določanja tiramina



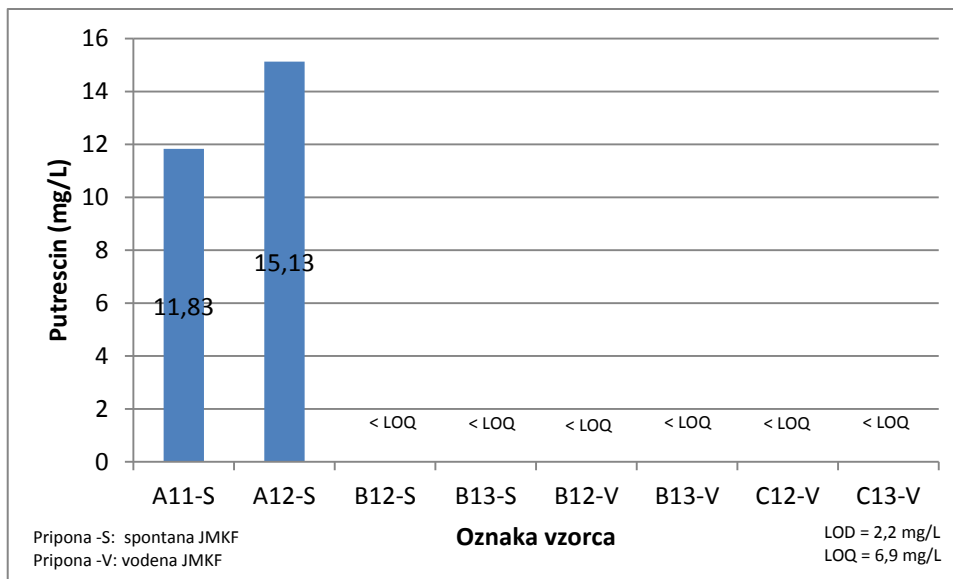
Slika 18: Koncentracija tiramina (mg/L) v vzorcih vina

Slika 18 prikazuje vsebnost tiramina v vzorcih. Z izjemo vzorcev B12-S, B13-S in C13-V, kjer so bile koncentracije tiramina pod mejo kvantifikacije ($< 0,6$ mg/L), smo v ostalih vzorcih kvantitativno določili vsebnost tiramina. Največjo koncentracijo je vseboval vzorec A11-S (1,76 mg/L); najmanjšo pa vzorec B13-V (0,65 mg/L).

Tudi v primeru tiramina ni povezave med koncentracijo tiramina in načinom inokulacije vina. Največje koncentracije tiramina pripadajo vzorcema iz kleti, kjer je JMKF potekla popolnoma spontano, brez nadzora temperature, vino je ležalo tudi na drožeh. Če primerjamo vzorce pridelovalca B, ugotovimo, da vzorca B12-V (0,77 mg/L) in B13-V (0,65 mg/L), pri katerih je bila uporabljena selekcionirana kultura MKB, vsebujeta večje koncentracije tiramina od vzorcev B12-S ($< 0,6$ mg/L) in B13-S (0,6 mg/L), pri katerih je JMKF potekla s pomočjo avtohtonih MKB.

V primerjavi s histaminom, je vsebnost tiramina v vseh vzorcih manjša, kar je v skladu z rezultati analiz, ki so jih opravili Konakovsky in sod. (2011). V vzorcih modre frankinje so določili od 1,14 mg/L do 9,35 mg/L tiramina (povprečno 3,77 mg/L). Čuš in sod. (2013) so med sedmimi vzorci modre frankinje izmerili največjo koncentracijo 2,1 mg/L; štirje vzorci pa so vsebovali manj kot 0,3 mg/L tiramina. V 82-ih vzorcih terana so Baša Česnik in sod. (2014) pri 60% odstotkov vzorcev določili prisotnost tiramina v koncentracijah od 0,01 mg/L do 10,77 mg/L (povprečno 1,72 mg/L). Podobne podatke je moč zaslediti tudi v drugi literaturi, kar kaže na dejstvo, da so koncentracije tiramina v vinu navadno primerljive ali celo manjše od koncentracij histamina (Landete in sod., 2005b; Vazquez-Lasa in sod., 1998; Tuberoso in sod., 2015; Gárcia-Marino in sod., 2010).

4.3.3 Rezultati določanja putrescina

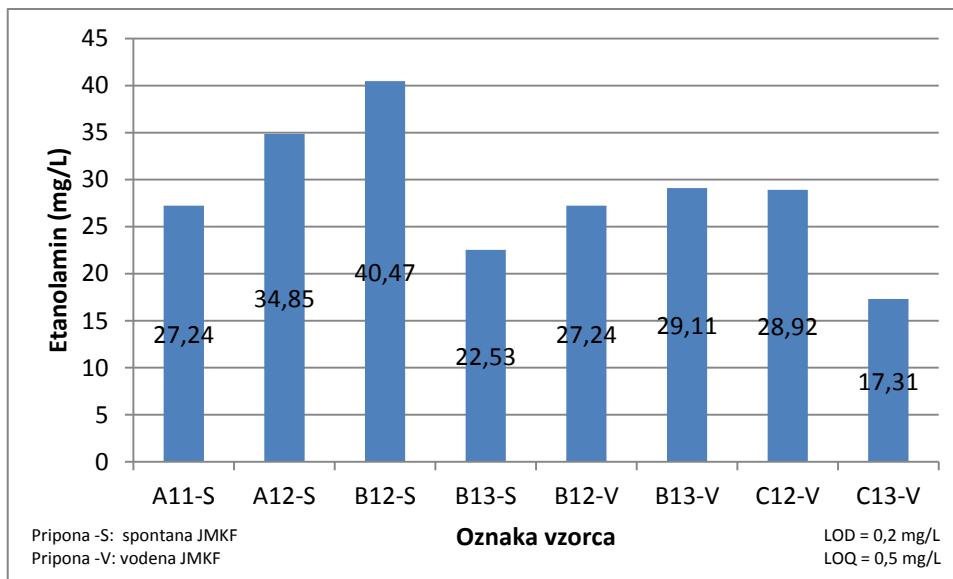


Slika 19: Koncentracija putrescina (mg/L) v vzorcih vina

Slika 19 prikazuje vsebnost putrescina v vzorcih. Največjo koncentracijo putrescina smo določili v vzorcu A12-S (15,13 mg/L); sledil je vzorec A11-S (11,83 mg/L). Pri vseh ostalih vzorcih so bile koncentracije putrescina manjše od 6,9 mg/L; torej pod mejo kvantifikacije. Podobno, kot pri tiraminu, vsebujeta največ putrescina vzorca A12-S in A11-S. Pri obeh vzorcih je JMKF potekala z avtohtonimi MKB. Žal je bila v primeru putrescina meja kvantifikacije precej visoko (6,9 mg/L); kar nam onemogoča bolj natančno primerjavo vzorcev. Kot sem že omenil v poglavju 2.3.1, je dokazano, da je končna koncentracija putrescina v vinu najbolj odvisna od njegove vsebnosti v grozdju, kar le še potrjuje dejstvo, da smo v obeh vzorcih iz iste kleti določili podobne koncentracije putrescina.

Podatki iz literature kažejo na velike razlike v vsebnosti putrescina med posameznimi vzorci. Medtem ko so Čuš in sod. (2013) izmed sedmih vzorcev modre frankinje izmerili najvišjo koncentracijo 4,6 mg/L, Konakovsky in sod. (2011) poročajo o bistveno večjih vsebnostih putrescina. Izmed 25-ih vzorcev je bila najmanjša izmerjena koncentracija 4,2 mg/L; največja pa kar 108,0 mg/L (povprečje 19,6 mg/L). V vzorcih terana so Baša Česnik in sod. (2014) določili tudi do 78,71 mg/L putrescina, povprečno so vzorci vsebovali 15,97 mg/L putrescina. Izmed vseh BA se putrescin v vinu navadno nahaja v največjih koncentracijah, kar pa ne drži za naše vzorce, pri katerih smo v primerjavi s podatki iz literature izmerili manjše koncentracije.

4.3.4 Rezultati določanja etanolamina

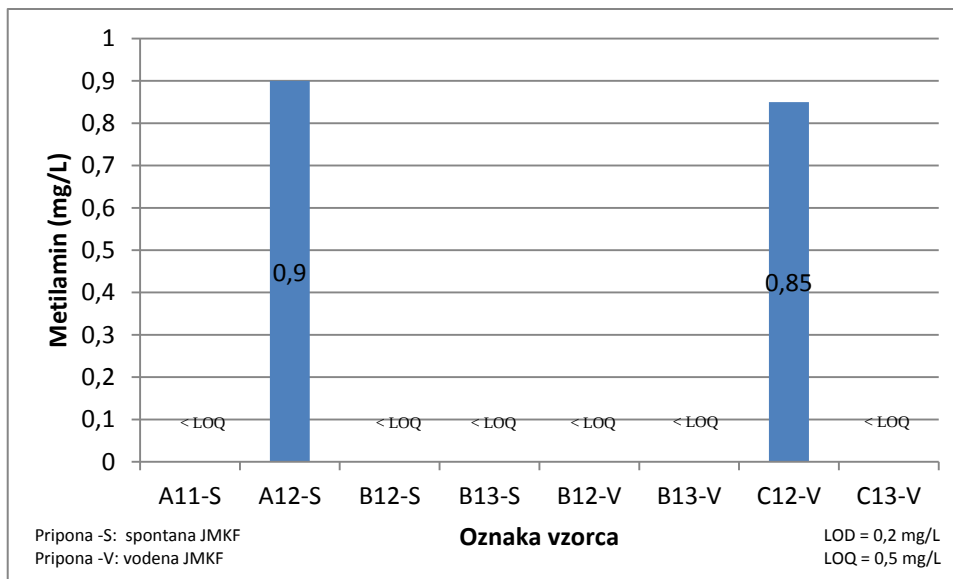


Slika 20: Koncentracija etanolamina (mg/L) v vzorcih vina

Slika 20 prikazuje vsebnost etanolamina v vzorcih. Največjo koncentracijo etanolamina smo izmerili v vzorcu B12-S (40,47 mg/L); najmanjšo pa v vzorcu C13-V (17,31 mg/L). Izmed vseh analiziranih BA, smo najvišje koncentracije pri vseh vzorcih izmerili prav pri etanolaminu. Tudi v tem primeru ni povezave med koncentracijo etanolamina v posameznem vzorcu in tehnologijo vodenja JMKF. Prav tako ni opaziti bistvenih razlik med letniki.

V primerjavi s podatki, ki jih navajajo Baša Česnik in sod. (2014), vsebujejo naši vzorci večje koncentracije etanolamina. Slednji so v vseh 82-ih vzorcih terana izmerili od 9,03 mg/L do 37,5 mg/L (povprečno 18,78 mg/L). Vrednosti etanolamina so v literaturi precej skopo omenjene, med podatki posameznih študij pa so velike razlike. Znatne količine etanolamina lahko nastanejo že med AF, o čemer pričajo izsledki študije, ki so jo opravili Buteau in sod. (1984).

4.3.5 Rezultati določanja metilamina

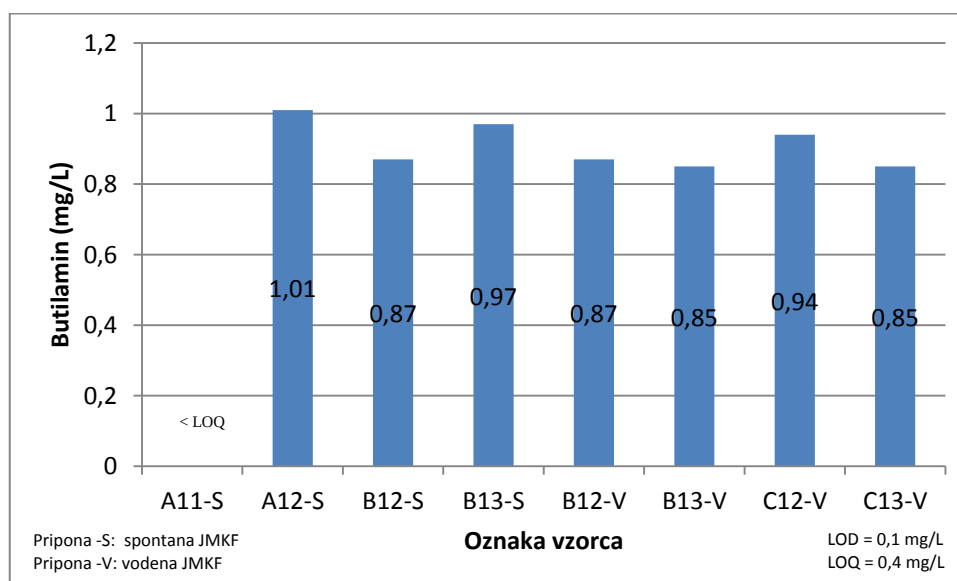


Slika 21: Koncentracija metilamina (mg/L) v vzorcih vina

Slika 21 prikazuje vsebnost metilamina v vzorcih. Z izjemo vzorcev A12-S (0,90 mg/L) in C12-V (0,85 mg/L) so bile pri vseh ostalih vzorcih koncentracije manjše od 0,5 mg/L.

Vsebnosti metilamina so pri vseh vzorcih majhne in primerljive z rezultati študije, ki so jo izvedli Tuberoso in sod. (2015). V osmih vzorcih vina cannonau so povprečno izmerili 0,90 mg/L metilamina. Baša Česnik in sod. (2014) so pri 60 % izmed 82-ih vzorcev terana določili vsebnost metilamina med 0,004 mg/L in 1,2 mg/L (povprečje 0,36 mg/L).

4.3.6 Rezultati določanja butilamina



Slika 22: Koncentracija butilamina (mg/L) v vzorcih vina

Slika 22 prikazuje vsebnost butilamina v vzorcih. Največjo koncentracijo butilamina smo določili v vzorcu A12-S (1,01 mg/L), najmanjšo pa v vzorcih B13-V in C13-V (0,85 mg/L). V vzorcu A11-S je bila vsebnost butilamina manjša od 0,4 mg/L. Glede na rezultate lahko ugotovimo, da so vrednosti pri vseh vzorcih razen vzorca A11-S, zelo izenačene in relativno majhne.

Primerljive koncentracije butilamina so v tretjini vzorcev terana določili tudi Baša Česnik in sod. (2014) in sicer do 1,85 mg/L.

4.3.7 Rezultati določanja kadaverina

Pri vseh vzorcih smo določili kadaverin v koncentracijah pod mejo kvantifikacije; vrednosti kadaverina so bile torej večje od 1,8 mg/L in manjše od 5,4 mg/L. Kot pri putrescinu, je bila tudi v primeru kadaverina meje kvantifikacije precej visoka (5,4 mg/L). V raziskavah drugih avtorjev (Konakovsky in sod., 2011; Čuš in sod., 2013; Baša Česnik in sod., 2014) so bile vrednosti LOQ bistveno manjše, kar pomeni, da lahko vzorce kvantificiramo pri manjših koncentracijah ter posledično lažje primerjamo vrednosti med seboj.

Vsebnost kadaverina v naših vzorcih je v skladu z vrednostmi, ki so jih določili Konakovsky in sod. (2013). Vzorci modre frankinje so vsebovali od 0,09 mg/L do 2,13 mg/L kadaverina (povprečno 0,42 mg/L). Čuš in sod. (2013) so v vseh sedmih vzorcih izmerili koncentracije kadaverina manjše od 0,5 mg/L. Tudi drugi avtorji so v različnih vrstah rdečih vin določili primerljive vrednosti (Tuberoso in sod., 2015; Vazquez-Lasa, 1998).

4.3.8 Rezultati določanja triptamina

V nobenem od preiskovanih vzorcev nismo določili triptamina, kar pomeni, da so bile morebitne koncentracije pod mejo detekcije (LOD = 0,2 mg/L).

Konakovsky in sod. (2013) navajajo, da so bile koncentracije triptamina v preiskovanih vzorcih manjše od 0,27 mg/L. Tudi Baša Česnik in sod. (2014) ter Tuberoso in sod. (2015) poročajo o zelo nizkih vsebnostih triptamina v vinu teran oziroma cannonau.

4.3.9 Rezultati določanja 2-metil-butilamina

2-metil-butilamina nismo določili pri nobenem izmed vzorcev (LOD = 0,2 mg/L). Baša Česnik in sod. (2014) so pri desetini vseh vzorcev terana določili vsebnost 2-metila-butilamina in sicer v koncentracijah pod 1,16 mg/L, v povprečju 0,24 mg/L. Žal v literaturi nisem zasledil dodatnih podatkov o vsebnosti 2-metil-butilamina v vinih, vendar je jasno, da gre v našem primeru za zanemarljivo majhne koncentracije.

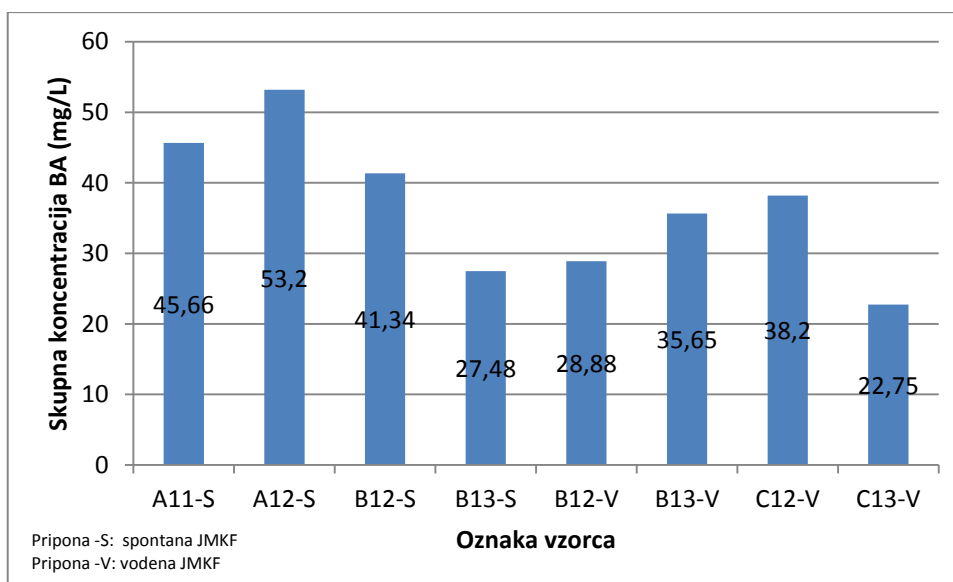
4.3.10 Rezultati določanja izopentilamina

Izopentilamina nismo določili pri nobenem izmed vzorcev ($\text{LOD} = 0,2 \text{ mg/L}$). V vzorcih terana so Baša Česnik in sod. (2014) izmerili povprečno koncentracije izopentilamina $0,20 \text{ mg/L}$; največja izmerjena koncentracija je bila $4,69 \text{ mg/L}$.

4.3.11 Rezultati določanja heksilamina

Heksilamina nismo določili v nobenem vzorcu ($\text{LOD} = 0,8 \text{ mg/L}$). Prav tako tudi Baša Česnik in sod. (2014) v nobenem vzorcu niso določili heksilamina.

4.3.12 Skupna vsebnost kvantitativno določenih BA



Slika 23: Skupne koncentracije kvantitativno določenih biogenih aminov v posameznih vzorcih vina

Na sliki 23 so prikazane skupne koncentracije BA pri posameznem vzorcu. Za skupno vsebnost smo upoštevali le koncentracije nad mejo kvantifikacije, ki je za vsak BA različna. Iz grafa je razvidno, da je največjo skupno koncentracijo BA vseboval vzorec A12-S ($53,2 \text{ mg/L}$), sledil je vzorec A11-S ($45,65 \text{ mg/L}$). Najmanjšo skupno koncentracijo BA pa je vseboval vzorec C13-V ($22,75 \text{ mg/L}$). Ugotovimo lahko, da sta največji skupni koncentraciji BA vsebovala vzorca pridelovalca A, kjer je JMKF potekla popolnoma spontano z avtohtonimi MKB. V obeh primerih je vino ležalo eno leto na drožeh, kar še dodatno vpliva na večje koncentracije BA.

5 SKLEPI

- Pri vseh vzorcih smo opravili osnovne kemijske analize ter analize organskih kislin. Ugotovili smo, da so bile vse vrednosti analiziranih parametrov v skladu s pričakovanji in znotraj mej, ki jih določa zakonodaja. Rezultati osnovnih kemijskih analiz kažejo na ustrezno kakovost analiziranih vzorcev.
- Največjo skupno vsebnost BA smo določili v vzorcih A12-S in A11-S, pri katerih je JMKF potekla spontano s pomočjo avtohtone mikrobiote.
- Najmanjšo skupno koncentracijo BA smo določili v vzorcu C13-V, kjer je JMKF potekla s pomočjo selekcioniranih MKB.
- Izmed vseh preiskovanih BA smo pri vseh vzorcih določili največje koncentracije etanolamina.
- Pri določanju histamina je kar 5 od 8-ih preiskovanih vzorcev vsebovalo večje koncentracije od zakonsko določene meje, ki je 2 mg/L. V primerjavi z drugimi državami ima Slovenija strožje kriterije glede vsebnosti histamina v vinu.
- Največjo koncentracijo histamina smo določili v vzorcu, kjer je JMKF potekla s pomočjo selekcionirane kulture MKB. To kaže na možnost, da so poleg selekcioniranih bakterij *O. oeni*, v procesu JMKF sodelovale tudi avtohtone MKB ali na morebitno tvorbo histamina s strani bakterij *O. oeni*.
- Koncentracije tiramina v vzorcih so bile manjše od koncentracij histamina, kar je skladno s podatki iz literature.
- Inokulacija s selekcionirano kulturo MKB ni pokazala statistično značilnih razlik med vzorci, pri katerih smo dodali startersko kulturo MKB in vzorci, kjer je JMKF potekla s pomočjo avtohtone mikrobiote.
- Vsebnosti triptamina, 2-metilbutilamina, izopentilamina in heksilamina nismo določili pri nobenem izmed vzorcev.
- Koncentracije BA v naših vzorcih so razen etanolamina, ki smo ga določili v večjih koncentracijah, primerljive s podatki drugih avtorjev iz literature.

6 POVZETEK

Namen naloge je bil v osmih vzorcih vina modra frankinja določiti vsebnost BA. Želeli smo ugotoviti razlike v vsebnosti BA v vinih, kjer je JMKF potekla spontano s pomočjo avtohtone mikrobiote in vinih, kjer je bila dodana selekcionirana kultura *O. oeni*. Hkrati smo opravili tudi analizo osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov vina ter določili vsebnost organskih kislin.

Vzorci vina modra frankinja smo pridobili v treh vinskih kletah iz vinorodnega okoliša Bela krajina. Pri polovici vzorcev je JMKF potekla spontano, pri polovici pa je bila dodana komercialna starterska kultura *O. oeni*. S pomočjo metode HPLC smo v vzorcih določili vsebnost 11-ih BA (histamin, tiramin, putrescin, etanolamin, metilamin, butilamin, kadaverin, triptamin, 2-metilbutilamin, izopentilamin, heksilamin). Prav tako smo v vzorcih s pomočjo HPLC analize določili vsebnost citronske, vinske, jabolčne in mlečne kisline. Pri vseh vzorcih smo opravili tudi analizo osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov (alkohol, skupni ekstrakt pH, titrabilne/skupne kisline, hlapne kisline, prosti in skupni SO₂).

Izmed vseh BA smo v vzorcih določili največje koncentracije etanolamina. Vsebnosti triptamina, 2-metilbutilamina, izopentilamina in heksilamina nismo določili pri nobenem izmed vzorcev. Največjo skupno koncentracijo BA smo določili v vzorcu A12-S (53,2 mg/L), pri katerem je JMKF potekla popolnoma spontano s pomočjo avtohtone mikrobiote. Najmanjšo skupno koncentracijo BA pa smo določili v vzorcu C13-V (22,75 mg/L), pri katerem je JMKF potekla s pomočjo selekcioniranih MKB. Kljub temu je največjo koncentracijo histamina vseboval vzorec C12-V, kateremu je bila dodana selekcionirana kultura MKB in sicer 6,56 mg/L. Kar pet od osmih vzorcev je vsebovalo histamin nad zakonsko mejo, ki je 2 mg/L. Vsebnosti tiramina so bile pri vseh vzorcih manjše od vsebnosti histamina. Koncentracije ostalih BA so bile primerljive s podatki iz literature.

Kljub temu, da je največjo skupno koncentracijo BA vseboval vzorec, kjer je JMKF potekla spontano, nismo ugotovili statistično značilnih razlik med vzorci v vsebnosti BA. Razlog za to je lahko možnost, da so poleg selekcioniranih MKB med JMKF delovale tudi avtohtone MKB in tvorile BA, predvsem histamin. Zaključimo lahko, da je inokulacija s selekcionirano kulturo sicer priporočljiva, vendar pod pogojem, da med JMKF ne sodelujejo tudi avtohtone MKB. K temu največ pripomore pravilna inokulacija, po končani JMKF pa odstranitev droži ter dodatek žveplovega dioksida, ki prepreči nadaljnjo aktivnost mikroorganizmov.

7 VIRI

- Alberto M. R., Arena M. E., Manca de Nadra M. C. 2007. Putrescine production from agmatine by *Lactobacillus hilgardii*: Effect of phenolic compounds. *Food Control*, 18: 898-903
- Anli R. E., Bayram M. 2009. Biogenic amines in wines. *Food Reviews International*, 25: 86-102
- Arena M. E., Fiocco D., Manca de Nadra M. C. 2007. Characterization of a *Lactobacillus plantarum* strain able to produce tyramine and partial cloning of a putative tyrosine decarboxylase gene. *Current Microbiology*, 55: 205-210
- Baša Česnik H., Lisjak K., Rakar A., Žorž M., Žabar R., Martelanc M., Butinar L., Sivilotti P., Trebše P., Franko M. 2014. Hlapni fenoli in biogeni amini v vinih teran. V: Tradicionalni kraški pridelki in produkti-raziskave za izboljšanje njihove kakovosti. Simpozij Agrotur, Trst, 27. november 2014. Lisjak K. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut: 79-90
- Bavčar D. 2009. Kletarjenje danes. 2. dop. izd. Ljubljana, Kmečki glas: 148-157
- Buteau C., Duitschaever C. L., Ashton G. C. 1984. A Study of the biogenesis of amines in a villard noir wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35, 4: 228-236
- Caruso M., Fiore C., Contursi M., Salzano G., Paparella A., Romano P. 2002. Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeasts. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18: 159-163
- Cecchini F., Morassut M. 2010. Effect of grape storage time on biogenic amines content in must. *Food Chemistry*, 123: 263-268
- Cecchini F., Morassut M., Moruno E. G. 2005. Influence of cultivar on biogenic amines content in wines. V: XIV International GESCO Viticulture Congress, Geisenheim, 23-27 August 2005. Geisenheim, Gesellschaft zur Förderung der Forschungsanstalt Geisenheim: 845-850
- Chang S., Lin C., Jiang C., Chen H., Shih M. Chen Y., Tsai Y. 2009. Histamine production by bacilli bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from fruit wines. *LWT-Food Science and Technology*, 42: 280-285
- Corzani C. 2007. Food safety in wine: optimization of analytical controls and evaluation of production technologies. PhD in food science. Bologna, Faculty of Agriculture: 119 str. http://amsdottorato.unibo.it/1056/1/Tesi_Corzani_Claudia.pdf (november, 2014)

- Costantini A., Cersosimo M., Del Prete V., Garcia-Moruno E. 2006. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: Screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. *Journal of Food Protection*, 69, 2: 391-396
- Costantini A., García-Moruno E., Moreno-Arribas M. V. 2009. Biochemical transformations produced by malolactic fermentation. V: *Wine chemistry and biochemistry*. Moreno-Arribas M. V., Polo M. C. (eds.). New York, Springer Science+Business Media: 27-57
- Coton E., Rollan G., Bertrand A., Lonvaud-Funel A. 1998. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: Early detection, frequency, and distribution. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 2: 199-204
- Čuš F., Bach B., Barnavon L., Žnidaršič Pongrac V. 2013. Analytical determination of Dolenjska region wines quality. *Food Control*, 33: 274-280
- Del Prete V., Costantini A., Cecchini F., Morassut M., Garcia-Moruno E. 2009. Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes. *Food Chemistry*, 112: 474-481
- EFSA. 2011. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9, 10: 2393, doi: 10.2903/j.efsa.2011.2393: 93 str.
- García-Marino M., Trigueros Á., Escribano-Bailón T. 2010. Influence of oenological practices on the formation of biogenic amines in quality red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 455-462
- García-Ruiz A., González-Rompinelli E. M., Bartolomé B., Moreno-Arribas M. V. 2011. Potential of wine-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines. *International Journal of Food Microbiology*, 148: 115-120
- Gardini F., Zaccarelli A., Belletti N., Faustini F., Cavazza A., Martuscelli M., Mastrocola D., Suzzi G. 2005. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control*, 16: 609-616
- Glória M. B. A. 2003. Amines. V: *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Vol. 1. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). 2nd ed. Amsterdam, Academic Press: 173-181
- Granchi L., Romano P., Mangani S., Guerrini S., Vincenzini M. 2005. Production of biogenic amines by wine microorganisms. *Bulletin O.I.V.*, 78, 895-896: 595-609

- Grossmann M., Smit M., Loehnertz I., O. Ansorge A. 2009. Biogenic amines and grapes: effect of microbes and fining agents. Technical papers: presented at International symposium microsfafetywine, Vilafranca del Penedés, Spain, 20-21 November 2007. Infowine-Internet Journal of Enology and Viticulture : 6 str.
<http://www.infowine.com/Default.asp?scheda=7751#> (december, 2014)
- Guerrini S., Mangani S., Granchi L., Vincenzini M. 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. Current Microbiology, 44: 374-378
- Halász A., Baráth Á., Simon-Sarkadi L., Holzapfel W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends in Food Science & Technology, 5: 42-49
- Herbert P., Cabrita M. J., Ratola N., Laureano O., Alves A. 2005. Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region: Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. Journal of Food Engineering, 66: 315-322
- Hernández-Orte P., Lapena A. C., Pena-Gallego A., Astrain J., Baron C., Pardo I., Polo L., Ferrer S., Cacho J., Ferreira V. 2008. Biogenic amine detection in wine fermented in oak barrels: Factors affecting formation. Food Research International, 41: 697-706
- Husnik J. I., Volschenk H., Bauer J., Colavizza D., Luo Z., van Vuuren H. J. J. 2006. Metabolic engineering of malolactic wine yeast. Metabolic Engineering, 8: 315-323
- Kanny G., Gerbaux V., Olszewski A., Frémont S., Empereur F., Nabet F., Cabanis J. C., Moneret-Vautrin D. A. 2001. No correlation between wine intolerance and histamine content in wine. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 107, 2: 375-378
- Karovičová J., Kohajdová Z. 2005. Biogenic amines in food. Chemical Papers, 59, 1: 70-79
- Konakovsky V., Focke M., Hoffmann-Sommergruber K., Schmid R., Scheiner O., Moser P., Jarisch R., Hemmer W. 2011. Levels of histamine and other biogenic amines in high-quality red wines. Food Additives and Contaminants, 28, 4: 408-416
- Konings W. N., Lolkema J. S., Bolhuis H., van Veen H. W., Poolman B., Driessen A. J. M. 1997. The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria: Energy transduction and multidrug resistance. Antonie van Leeuwenhoek, 71: 117-128
- 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., Šučur S., Prosen H. 2013. Biogenic amines in red wine: The impact of technological processing of grape and wine. *Acta agriculturae Slovenica*, 101: 249-261
- Kovačević Ganić K., Komes D., Čurko N., Lovrić T. 2009. Changes of the content of biogenic amines during winemaking of Sauvignon wines. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 1, 2: 21-27
- Ladero V., Calles M., Fernández M., Alvarez M. A. 2010. Toxicological effect of dietary biogenic amines. *Current Nutrition and Food Science*, 6, 2: 145-156
- Landete J. M., Ferrer S., Pardo I. 2005a. Which lactic acid bacteria are responsible for histamine production in wine. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 580-586
- Landete J. M., Ferrer S., Pardo I. 2007. Biogenic amine production by lactic acid bacteria, acetic bacteria and yeast isolated from wine. *Food Control*, 18: 1569-1574
- Landete J. M., Ferrer S., Polo L., Pardo I. 2005b. Biogenic amines in wines from three spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1119-1124
- Linares D. M., Martín M. C., Ladero V., Alvarez M. A., Fernández M. 2011. Biogenic amines in diary products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51: 691-703
- Lonvaud-Funel A. 1999. Lactic acid bacteria in the quality improvement and deprecitation of wine. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76: 317-331
- Lucas P. M., Wolken W. A. M., Claisse O., Lolkema J. S., Lonvaud-Funel A. 2005. Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3: 1417-1424
- Marcobal Á., Martín-Álvarez P. J., Moreno-Arribas M. V., Munoz R. 2006. A multifactorial design for studing factors influencing growth and tyramine production of the lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* CET 4669 and *Enterococcus faecium* BIFI-58. *Research in Microbiology*, 157: 417-424
- Marcobal A., Rivas B., Moreno-Arribas M. V., Munoz R. 2004. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. *FEMS Microbiology Letters*, 239: 213-220
- Marques A. P., Leitao M. C., San Romao M. V. 2008. Biogenic amines in wines: Influence of oenological factors. *Food Chemistry*, 107: 853-860
- Martín-Álvarez P. J., Marcobal Á., Polo C., Moreno-Arribas M. V. 2006. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wine. *European Food Research and Technology*, 222: 420-424

- McKay M., Buglass A., Lee C. G. 2011. Fermented beverages: beers, ciders, wines and related drinks. V: Handbook of alcoholic beverages: technical, analytical and nutritional aspects. Vol. 1. Buglass A. J. (ed.). Chichester, John Wiley & Sons: 96-113
- Molenaar D., Bosscher J. S., Brink B., Driessen A. J. M., Konings W. N. 1993. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. Journal of Bacteriology, 175, 10: 2864-2870
- Moreno-Arribas M. V., Polo M. C. 2009. Amino acids and biogenic amines. V: Wine chemistry and biochemistry. Moreno-Arribas M. V., Polo M. C. (eds.). New York, Springer Science+Business Media: 163-189
- Moreno-Arribas V., Polo M. C., Jorganes F., Munoz R. 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. International Journal of Food Microbiology, 84: 117-123
- Moreno-Arribas V., Torlois S., Joyeux A., Bertrand A., Lonvaud-Funel A. 2000. Isolation, properties and behaviour of tyramine-producing lactic acid bacteria from wine. Journal of Applied Microbiology, 88: 584-593
- OIV-MA-AS313-04. Organic acids. 1990. V: Méthodes internationales d'analyse des vins. Paris, Office International de la Vigne et du Vin: 165-167
- Pérez-Serradilla J. A., Luque de Castro M. D. 2008. Role of lees in wine production: A review. Food Chemistry, 111: 447-456
- Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo v vino, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta in drugih proizvodov v prometu. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 43: 5353-5355
- Rakar A. 2013. Uvajanje metode HPLC za določanje biogenih aminov. Diplomsko delo. Nova Gorica, Fakulteta za znanosti o okolju: 46 str.
- Ribéreau-Guyon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2006a. Handbook of enology. Vol 1: The microbiology of wine and vinifications. 2nd ed. Chichester, John Wiley & Sons: 115-181, 367-380
- Ribéreau-Guyon P., Dubourdieu D., Donéche B., Lonvaud A. 2006b. Handbook of enology. Vol 2: The chemistry of wine stabilization and treatments. 2nd ed. Chichester, John Wiley & Sons: 121-124

- Romano P., Capece A., Poeta C. 2007. Biogenic amine formation in alcoholic fermentation. V: International Symposium Microbiology and Food Safety of Wine "Microsafetywine", Vilafranca del Penedés: 11 str.
<https://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir1311/dd16608/10-p-romanol.pdf> (maj, 2015)
- Sebastian P., Herr P., Fischer U., König H. 2011. Molecular identification of lactic acid bacteria occurring in must and wine. South African Journal of Enology and Viticulture, 32, 2: 300-309
- Shalaby A. R. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. Food Research International, 29, 7: 675-690
- Silla Santos M. H. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. International Journal of Food Microbiology, 29: 213-231
- Smit A. Y., du Toit W. J., du Toit M. 2008. Biogenic amines in wine: Understanding the headache. South African Journal of Enology and Viticulture, 29, 2: 109-127
- Smit A. Y., du Toit W. J., Stander M., du Toit M. 2013. Evaluating the influence of maceration practices on biogenic amine formation in wine. LWT-Food Science and Technology, 53: 297-307
- Soleas G. J., Carey M., Goldberg D. M. 1999. Method development and cultivar-related differences of nine biogenic amines in Ontario wines. Food Chemistry, 64: 49- 58
- Straub B. W., Kicherer M., Schilcher S. M., Hammes W. P. 1995. The formation of biogenic amines by fermentation organisms. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung, 201: 79-82
- Tkachenko A. G. 2004. Mechanisms of protective functions of *Escherichia coli* polyamines against toxic effects of paraquat, which causes superoxide stress. Biochemistry (Moscow), 69, 2: 188-194
- Torrea D., Ancin C. 2002. Content of biogenic amines in a chardonnay wine obtained through spontaneous and inoculated fermentations. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 4895-4899
- Torrea-Goni D. T., Ancín-Azpilicueta C. 2001. Influence of yeast strain on biogenic amine content in wines: Relationship with the utilization of amino acids during fermentation. American Journal of Enology and Viticulture, 52: 185-190

- Trip H., Mulder N. L., Lolkema J. S. 2012. Improved acid stress survival of *Lactococcus lactis* expressing the histidine decarboxylation pathway of *Streptococcus thermophilus* CHCC1524. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 14: 11195-11204
- Tuberoso C. I. G., Congiu F., Serreli G., Mameli S. 2015. Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD. *Food Chemistry*, 175: 29-35
- Vazquez-Lasa M. B., Iniguez-Crespo M., Gonzalez-Larraina M., González-Guerrero A. 1998. Biogenic amines in Rioja wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49: 229
- Vidal-Carou M.C., Codony-Salcedo R., Mariné-Font A. 1990. Histamine and tyramine in spanish wines: Relationship with total sulfur dioxide level, volatile acidity and malolactic fermentation intensity. *Food Chemistry*, 35: 217-227
- Vrščaj Vodošek T. 2007. Vpliv sorte, letnika in dodatka starterske kulture v mošt ali vino na potek jabolčno-mlečnokislinske fermentacije. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 166 str.

ZAHVALA

Mentorju doc. dr. Mojmirju Wondri se zahvaljujem za vso strokovno pomoč, nasvete in čas, ki ga je namenil za pregledovanje magistrske naloge.

Iskrena hvala tudi somentorici doc. dr. Andreji Vanzo za strokovne nasvete in pomoč pri analizi biogenih aminov. Hvala tudi za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Hvala recenzentu prof. dr. Marku Kreftu za strokoven pregled naloge.

Zdenki Zupančič hvala za pomoč pri laboratorijskem delu.

Hvala tudi Lini Burkan Makivić za pomoč pri iskanju literature in pregledu virov.

Zahvaljujem se tudi staršem in dekletu za podporo in pomoč med študijem.