

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Urška ŽNIDARŠIČ

**VSEBNOSTI IN POMEN ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA
V VINU**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Urška ŽNIDARŠIČ

VSEBNOSTI IN POMEN ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA V VINU

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

**THE CONTENT AND SIGNIFICANCE OF SULFUR DIOXIDE IN
WINE**

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

Ljubljana, 2016

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

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

Mentorica: prof. dr. Tatjana KOŠMERL

Somentorica: dr. Tjaša JUG

Recenzentka: prof. dr. Lea DEMŠAR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

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

Urška Žnidaršič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**ŠD** Du2**DK** UDK 663.253:663.257.4:543.272.51(043)=163.6**KG** vino/žveplov dioksid/antioksidanti/protimikrobne snovi/molekularna oblika/bela vina/rdeča vina/rdečkasta vina/vina PTP/fizikalno-kemijski parametri**AV** ŽNIDARŠIČ, Urška, dipl. inž. živ. in preh. (UN)**SA** KOŠMERL, Tatjana (mentorica)/ JUG, Tjaša (somentorica)/ DEMŠAR, Lea (recenzentka)**KZ** SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101**ZA** Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo**LI** 2016**IN** VSEBNOSTI IN POMEN ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA V VINU**TD** Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo)**OP** XI, 67 str., 18 pregl., 14 sl., 39 vir.**IJ** sl**JI** sl/en

AI Žveplov dioksid (SO_2) so kot konzervans uporabljali že konec 18. stoletja. V sledovih ga lahko tvorijo kvasovke in drugi mikroorganizmi, večina SO_2 pa se doda med samim kletarjenjem v vino zaradi preprečevanja aktivnosti oksidacijskih encimov (polifenol oksidaze), vezave s porabniki žvepla, preprečevanja reakcij porjavenja in preprečevanja rasti nezaželenih mikroorganizmov. Koncentracije SO_2 v vinu so natančno določene in jih ne smemo preseči, saj so prevelike koncentracije nevarne za zdravje ljudi. V vinu najdemo tri oblike SO_2 : molekularno, sulfitno in bisulfitno obliko. Dodan SO_2 se v vinu veže z različnimi spojinami, t.j. vezani SO_2 , tisti del, ki pa ostane, je prosti SO_2 . Najbolj pomembna je molekularna oblika SO_2 , saj deluje protimikrobno in preprečuje procese kvara. Za mikrobiološko stabilnost morajo bela vina vsebovati 0,8 mg/L molekularne oblike SO_2 , rdeča vina 0,6 mg/L in rdečkasta vina med 0,6 in 0,8 mg/L. Ker ima žveplov dioksid veliko negativnih lastnosti, lahko v vinarstvu uporabljamo tudi nadomestke SO_2 . V magistrskem delu smo analizirali vsebnost SO_2 v belih, rdečih in rdečkastih vinih. S statistično obdelavo smo ugotovili, da je veliko vzorcev vin, ki vsebujejo premalo molekularne oblike SO_2 . Ugotovili smo, da bela vina vsebujejo največ SO_2 , sledijo rdečkasta, najmanj pa rdeča vina. Ločeno smo obdelali tudi vina z oznako PTP. V fizikalno-kemijskih parametrih različnih vin smo ugotovili velike razlike.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 663.253:663.257.4:543.272.51(043)=163.6

CX wine/sulfur dioxide/antioxidants/antimicrobials/molecular form/white wines/red wines/reddish wines/PTP wines/physico-chemical parameters

AU ŽNIDARŠIČ, Urška

AA KOŠMERL, Tatjana (supervisor)/ JUG, Tjaša (co-advisor)/ DEMŠAR, Lea (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

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

PY 2016

TY THE CONTENT AND SIGNIFICANCE OF SULFUR DIOXIDE IN WINE

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

NO XI, 67 p., 18 tab., 14 fig., 39 ref.

LA sl

AI sl/en

AB The use of sulfur dioxide for conservation dates back to the end of the 18th century. In the traces, it can be formed by yeasts and other microorganisms, but most of sulfur dioxide is added during winemaking. SO₂ is added to the wine in order to prevent the oxidation activity of enzymes (polyphenol oxidase), bonding with the consumer compounds of sulfur, preventing reactions of browning and preventing the growth of undesirable microorganisms. SO₂ concentrations in wine are clearly defined and they should not be exceeded, because excessive concentrations are harmful to human health. In wine we can find three forms of SO₂: molecular, sulfite and bisulfite. Added SO₂ is bonded in wine with different compounds - bound SO₂, the part which remains, is free SO₂. The most important is molecular form of SO₂ as an antimicrobial action and prevents the deterioration processes. For microbiological stability, white wines must contain 0,8 mg/L of molecular form of SO₂, red wines 0,6 mg/L and reddish wines between 0,6 and 0,8 mg/L. Whereas sulfur dioxide has a lot of negative properties, we can also use substitutes of SO₂. In thesis, we had analyzed the content of SO₂, in white, red and reddish wines. By statistical analysis we came to conclusion, that a lot of wine samples contain to small amount of molecular SO₂. We have found, that white wines contains maximum of SO₂, followed by reddish, but at least red wines. Separately we processed the wines with PTP label. Among the wines we got large differences in content of physico-chemical parameters.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA UPORABE ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA.....	3
2.2 FIZIKALNE IN KEMIJSKE LASTNOSTI ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA	3
2.3 ŽVEPLOV DIOKSID V VINU	3
2.4 IONIZACIJSKE OBLIKE ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA.....	5
2.4.1 Molekularna oblika	9
2.4.2 Bisulfitna oblika.....	11
2.4.3 Sulfitna oblika	11
2.5 POMEN ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA V VINU.....	11
2.5.1 Protimikrobno delovanje	11
2.5.2 Antioksidativno delovanje in preprečevanje reakcij porjavenja	13
2.5.3 Vezava s »porabniki« žvepla	15
2.5.4 Senzoričen vpliv SO ₂	16
2.5.5 Druge reakcije žveplovega dioksida.....	17
2.6 UPORABA ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA V VINARSTVU	17
2.6.1 Čas in količina žveplanja	18
2.6.1.1 Žveplanje grozdja, drozge, mošta in vina.....	18
2.7 NAČINI ŽVEPLANJA	20

2.7.1 Žveplanje s trakovi – žveplenicami.....	20
2.7.2 Kalijev bisulfit.....	21
2.7.3 Žveplanje z utekočinjenim SO ₂	22
2.7.4 5-6 % raztopina žveplove(IV) kisline H ₂ SO ₃ (žveplasta kislina).....	22
2.8 NEGATIVNE LASTNOSTI ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA	23
2.9 NADOMESTKI ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA V VINARSTVU	23
2.9.1 Dodatek snovi.....	24
2.9.1.1 Dimetil dikarbonat.....	24
2.9.1.2 Bakteriocini	24
2.9.1.3 Fenolne spojine.....	24
2.9.1.4 Lizocim.....	25
2.9.2 Fizikalne metode	25
2.9.2.1 Pulzna električna polja.....	25
2.9.2.2 Ultrazvok	25
2.9.2.3 Ultravijolično obsevanje.....	26
2.9.2.4 Visok hidrostatski tlak.....	26
3 MATERIAL IN METODE	28
3.1 VZORCI ZA STATISTIČNO OBDELAVO	28
3.2 POOBLAŠČENE ORGANIZACIJE ZA OCENJEVANJE VIN.....	28
3.3 METODE DOLOČANJA ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA V VINU	29
3.3.1 Določanje žveplovega dioksida v vinu po Rebeleinu	29
3.3.1.1 Določanje skupnega žveplovega dioksida.....	30
3.3.1.2 Določanje prostega žveplovega dioksida (brez destilacije).....	30
3.3.1.3 Določanje prostega žveplovega dioksida s korekcijo na askorbinsko kislino (brez destilacije)	30
3.3.2 Referenčna metoda za določanje prostega in skupnega žveplovega dioksida (Navodilo o fizikalno..., 2001)	31
3.3.2.1 Določanje prostega žveplovega dioksida	32
3.3.2.2 Določanje skupnega žveplovega dioksida.....	32
3.3.3 Določanje žveplovega dioksida z WineScan™ FOSS analizo	33
3.4 STATISTIČNA ANALIZA	34

3.4.1 Enovzorčna analiza	34
3.4.1.1 Aritmetična sredina ali povprečje.....	34
3.4.1.2 Varianca in standardni odklon.....	35
3.4.1.3 Koeficient variabilnosti	35
3.4.2 Dvovzorčna analiza	36
3.4.2.1 Koeficient korelacije po Pearsonu.....	36
3.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV	37
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	38
4.1 REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETROV VZORCEV VIN LETNIKA 2013.....	38
4.2 REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETROV VZORCEV VIN LETNIKA 2014.....	46
4.3 IZLOČENI VZORCI	56
5. SKLEPI	60
6 POVZETEK.....	62
7 VIRI	65
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Največje vrednosti kemijskih parametrov, ki so zahtevane pri posameznih kakovostnih razredih vin, ki so pridelana na ozemlju Republike Slovenije, ki jih predpisuje Pravilnik* (Priloga II).....	5
Preglednica 2: Vpliv pH vina ne deleže oblik žveplovega dioksida (Bavčar, 2009)	8
Preglednica 3: Zahtevano prosto žveplo, ki je potrebno za doseganje določene količine molekularnega SO ₂ (Košuta in Jug, 2010)	10
Preglednica 4: Delež vezane in proste oblike žveplovega dioksida (SO ₂) pri pH 3,5 in 3,1 (Košmerl, 2005a).....	15
Preglednica 5: »Porabniki« žvepla v vinu, njihov delež vezave (%) in običajna koncentracija »porabnikov« v vinu (mg/L) (Košmerl in Kač, 2009).....	16
Preglednica 6: Prednosti in slabosti dodatkov ter fizikalnih metod, ki lahko nadomestijo žveplov dioksid v vinarstvu (Santos in sod., 2012).....	27
Preglednica 7: Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti spremenljivk (Seljak, 1996).....	37
Preglednica 8: Rezultati fizikalno-kemijskih parametrov belih, rdečih in rdečkastih vin, letnik 2013 z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	38
Preglednica 9: Rezultati fizikalno-kemijskih parametrov za vina letnik 2013 z oznako PTP in vina brez oznake PTP, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	42
Preglednica 10: Največje dovoljene koncentracije prostega in skupnega SO ₂ za vina PTP, ki jih predpisujejo veljavni Pravilniki*	43
Preglednica 11: Razlike fizikalno-kemijskih parametrov med belimi, rdečimi in rdečkastimi vini, letnik 2013	44
Preglednica 12: Razlike fizikalno-kemijskih parametrov med vini z oznako PTP in vini brez oznake PTP, letnik 2013	45
Preglednica 13: Rezultati fizikalno-kemijskih parametrov belih, rdečih in rdečkastih vin, letnik 2014 z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	46
Preglednica 14: Rezultati fizikalno-kemijskih parametrov za vina letnik 2014 z oznako PTP in vina brez oznake PTP, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	49
Preglednica 15: Razlike fizikalno-kemijskih parametrov med belimi, rdečimi in rdečkastimi vini, letnik 2014	50

Preglednica 16: Razlike fizikalno-kemijskih parametrov med vini z oznako PTP in vini brez oznake PTP, letnik 2014.....	52
Preglednica 17: Rezultati bivariatne analize primerjave povezanosti fizikalno-kemijskih parametrov.....	53
Preglednica 18: Koncentracije prostega, skupnega in molekularnega SO ₂ belih, rdečih in rdečkastih izločenih vin, v letih 2013 in 2014 z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri.....	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Delež posameznih oblik SO ₂ pri različnih pH vrednostih (Divol in sod., 2012)	6
Slika 2: Prosta, vezana in skupna oblika žveplovega dioksida (Rotter, 2001)	7
Slika 3: Koncentracija prostega SO ₂ , ki je potreben za vzdrževanje 0,8 mg/L in 0,5 mg/L molekularnega SO ₂ v odvisnosti od pH vina (Margalit, 2004)	8
Slika 4: Shema naprave, ki se uporablja za določanje prostega in skupnega SO ₂ (Navodilo o fizikalno..., 2001).....	31
Slika 5: Destilacijska naprava za določanje prostega in skupnega SO ₂ , ki jo imajo v agroživilskem laboratoriju na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica ter značilno obarvanje vzorca vina pred (a) in po končani destilaciji (b)	32
Slika 6: Obarvanje vzorca vina pred in po titraciji (Handerson, 2014)	33
Slika 7: Naprava WineScan TM (FOSS, 2016)	34
Slika 8: Koncentracije molekularnega SO ₂ (mg/L) za vzorce sladkih vin, letnik 2013.....	40
Slika 9: Povprečna koncentracija prostega, skupnega in molekularnega SO ₂ v belih, rdečih in rdečkastih vzorcih vin (letnik 2013).....	41
Slika 10: Povprečne koncentracije prostega, skupnega in molekularnega SO ₂ za vina z oznako PTP, letnik 2013.....	43
Slika 11: Koncentracije molekularnega SO ₂ (mg/L) za vzorce sladkih vin, letnik 2014 ...	48
Slika 12: Povprečna koncentracija prostega, skupnega in molekularnega SO ₂ v belih, rdečih in rdečkastih vzorcih vin (letnik 2014).....	48
Slika 13: Povprečne koncentracije prostega, skupnega in molekularnega SO ₂ za vina z oznako PTP, letnik 2014.....	50
Slika 14: Povprečne koncentracije prostega, skupnega in molekularnega SO ₂ za izločene vzorce vin	57

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CO ₂	ogljikov dioksid
FTIR	»Fourierjeva transformacijska infrardeča spektroskopija«
H ₂ S	vodikov sulfid
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (angl. minimum inhibitory concentration)
PTP	priznано tradicionalno poimenovanje
RS	reducirajoči sladkorji
SO ₂	žveplov dioksid
SPE	sladkorja prosti ekstrakt

1 UVOD

Po slovenski zakonodaji je vino pridelek, ki je pridobljen s popolnim ali delnim alkoholnim vrenjem drozge ali mošta, pridelanega iz grozdja žlahtne vinske trte (Pravilnik o pogojih..., 2004). Pri pridelavi vina se vinarji srečujejo z različnimi enološkimi sredstvi, ki so jim v pomoč. Med njimi je tudi žveplov dioksid.

Žveplov dioksid (pogovorno žveplo) se kot antioksidant in inhibitor (zaviralec mikrobiološke aktivnosti) uporablja v različnih področjih živilske tehnologije. Uporaba žvepla v tehnologiji vina sega daleč nazaj, v egipčanske in romanske čase. Prvi literaturni podatki o uporabi žvepla so iz leta 1912. Kljub dolgoletni uporabi pa njegova vloga še ni popolnoma pojasnjena zaradi številnih učinkov delovanja in reakcij, v katere je vključen. Že v začetku prejšnjega stoletja so vedeli, da se žveplo nahaja v različnih oblikah in so ocenjevali, da ima prosta oblika približno 50-krat večjo antiseptično aktivnost v primerjavi z vezano obliko. Znanstveniki si po celem svetu prizadevajo zmanjšati potrebno količino dodanega žveplovega dioksida v prid našega zdravja, boljše kakovosti pridelanega sadja, zelenega biološkega razkisa in boljše senzorične kakovosti vina. Kljub številnim raziskavam še vedno nimamo ustrezne zamenjave za žveplo, ki ga uporabljamo kot nujno "zlo" (Košmerl, 2005a).

V vinu je žveplo v prosti in vezani obliki, njegovo vsebnost pa izražamo kot koncentracijo žveplovega dioksida v mg/L ali v mg SO₂/L. Po žveplanju vina žveplo le kratek čas ostane v nevezanem stanju. Večji del se ga veže na druge spojine in tako se količina prostega žveplovega dioksida hitro zmanjšuje.

V kletarstvu je žveplov dioksid nenadomestljiv, saj deluje antiseptično in protimikrobno. Koristno je v določeni količini, dodano ob pravem času in v pravi koncentraciji. Če ga v vinu primanjkuje, je vzrok za mnoge napake in bolezni vina. Nestrokovna uporaba žvepla lahko učinkuje škodljivo, saj prevelika koncentracija negativno vpliva na človekovo zdravje. Žveplov dioksid je plin ostrega vonja in ga senzorično lahko zaznamo, če je v prevelikih količinah. Zgornja meja vsebnosti SO₂ je zakonsko določena in, če je le-ta presežena, govorimo, da je vino prežveplano. Tako vino ni primerno za uživanje ali promet. Z zakonom predpisane zgornje meje prostega SO₂ se razlikujejo od dežele do dežele in prav tako so različne dovoljene zgornje meje skupnega SO₂ (Vodovnik A. in Vodovnik T, 1999).

1.1 NAMEN NALOGE

Namen magistrske naloge je ugotoviti vsebnost žveplovega dioksida v belih, rdečih in rdečkastih vinih letnikov 2013 in 2014 ter različnih sort. Poleg antioksidativnega delovanja deluje žveplov dioksid v moštu in vinu tudi protimikrobno, kar je posledica prisotnosti molekularne oblike, ki zaviralno deluje na kvasovke in ocetnokislinske bakterije. V manjši meri pa protimikrobno deluje tudi bisulfitna oblika na mlečnokislinske bakterije.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da bo med vini velik razpon v vsebnostih vseh oblik žveplovega dioksida ter, da imajo bela vina več žveplovega dioksida kot rdeča in rdečkasta vina. Skušali bomo poiskati povezavo med vsebnostjo žveplovega dioksida in izločenimi vzorci, saj so pogosto vzorci, ki imajo premajhno količino žveplovega dioksida pri ocenjevanju izločeni oz. dobijo slabšo oceno. Dobljene rezultate bomo statistično obdelali.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA UPORABE ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA

Žveplov dioksid so kot konzervans uporabljali že konec 18. stoletja (Santos in sod., 2012). Prvi so ga uporabili Rimljani, ko so odkrili, da zažiganje sveč iz žveplovega dioksida ohranja prazne posode za shranjevanje vina sveže in zmanjša vonj po kislem (Handerson, 2014). Danes se uporablja v številnih živilskih industrijah, predvsem v industrijah kjer pridelujejo živila, ki imajo majhno vrednost pH, kot so sadni sokovi in fermentirane pijače (Santos in sod., 2012). Tradicionalno se je žveplov dioksid v vinarstvu uporabljal za kontroliranje nezaželenih mikroorganizmov in za inhibicijo aktivnosti encima polifenol oksidaze. Vinarji so ga dodajali v zmleto grozdje ter v rdeče vino po končani mlečnokislinski fermentaciji. Tako je žveplov dioksid ščitil vino pred oksidativnimi procesi in pred nezaželeno ponovno fermentacijo (Guerrero in Cantos-Villar, 2015).

2.2 FIZIKALNE IN KEMIJSKE LASTNOSTI ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA

Žveplo se lahko uporablja že v vinogradu, kjer z žveplom poškropimo vinsko trto in tako preprečimo razvoj pepelovke in gnilobe. Če žveplo oksidira, se tvori žveplov dioksid (SO_2) (Henderson, 2014). Žveplov dioksid je brezbarvni plin, z zelo močnim, dražečim in zadušljivim vonjem (Margalit, 2004). Njegova molska masa je 64,06 g/mol. Žveplov dioksid je dobro topen v vodi, njegova topnost pa je funkcija temperature. Pri 20 °C se v enem volumnu vode topi 40 volumnov plina, pri 10 °C pa 55. Temperaturna odvisnost topnosti žveplovega dioksida je predvsem praktičnega pomena, kot npr. hitra priprava vodne raztopine H_2SO_3 iz jeklenke pri nizkih temperaturah. Pri tem moramo paziti na to, da je raztopina nasičena z žveplovim dioksidom pri 10 °C, z ogretjem raztopine na običajno delovno temperaturo 20 °C pa izgubimo približno 15 volumnov plina na enoto volumna raztopine (Košmerl, 2005a).

S senzoričnega stališča je prispevek prostega žveplovega dioksida odvisen od vrednosti pH in temperature. V parni fazi je prag zaznave 10 mg/L v zraku, oziroma 15-40 mg/L v vinu (odvisno tudi od posameznika). Vpliv temperature vina predstavlja osnovo pri serviranju. Vina, ki imajo nizko vrednost pH in veliko koncentracijo prostega žvepla, serviramo pri nižjih temperaturah (Košmerl, 2005a).

2.3 ŽVEPLOV DIOKSID V VINU

Žveplov dioksid v sledovih tvorijo kvasovke in drugi mikroorganizmi, večina SO_2 pa dodajo vinarji med različnimi enološkimi postopki (Sacks in Howe, 2015). Kvasovke tvorijo žveplov dioksid v koncentracijah nad 15 mg/L. Koncentracija je predvsem odvisna od seva kvasovk, koncentracije žvepla na samem grozdju in od pogojev med fermentacijo.

Med kvasovke, ki tvorijo veliko žveplovega dioksida, uvrščamo kvasovke vrste *Saccharomyces bayanus* (Bavčar, 2009).

V vinarstvu je inhibicija neugodnih mikroorganizmov ključnega pomena, da pridelamo vino, ki je kakovostno in tudi varno. Številne različne mikroorganizme lahko najdemo na grozdni jagodi in kletarski opremi, iz katere se nato prenesejo v mošt. Večino mikroorganizmov lahko inhibiramo z nizko vrednostjo pH, inokulacijo kvasovk ali pa z dodatkom SO₂. SO₂ v vinu inhibira divje kvasovke in bakterije kvarljivke, kot so mlečnokislinske bakterije. Na mikrobno raznovrstnost v vinu pa ne vpliva samo dodatek žveplovega dioksida. Velik pomen ima tudi filtriranje vina pred stekleničenjem, kletarska oprema in samo okolje, kjer shranjujemo vino (Takahashi in sod., 2014).

Večje koncentracije žveplovega dioksida so posledica uporabe enoloških sredstev, ki vsebujejo žveplov dioksid. Do danes še niso uspeli najti enološkega sredstva, ki bi lahko zamenjal žveplov dioksid. Zaradi svoje učinkovitosti, dostopnosti in enostavne uporabe je glavno enološko sredstvo, brez katerega je nemogoče pridelati kakovostno in obstojno vino (Bavčar, 2009).

Glavni namen dodatka žveplovega dioksida v mošt ali vino (Bavčar, 2009):

- preprečevanje aktivnosti oksidacijskih encimov, kot so npr. polifenol oksidaze,
- vezava s porabniki žvepla (acetaldehid, piruvat, α -ketoglutarat, antociani, sladkorji,...),
- preprečevanje in zadrževanje reakcij porjavenja,
- preprečevanje rasti nezaželenih mikroorganizmov, kot so bakterije in ne-*Saccharomyces* kvasovke.

Vina ne smejo vsebovati prevelike koncentracije žveplovega dioksida. Njihove največje dovoljene koncentracije za posamezne kakovostne razrede vin prikazuje preglednica 1.

Pravilnik o pogojih...(2004) navaja, da lahko minister zaradi neugodnih klimatskih pogojev in zdravstvenega stanja grozdja, na predlog pooblaščenice organizacije za spremljanje dozorevanja grozdja, za določeno vinorodno območje, ki ni večje od vinorodnega okoliša, za določeno obdobje dovoli, da se največja dovoljena količina skupnega SO₂ v mirnih vinih, če ne presega 300 mg/L, lahko poveča največ za 40 mg/L.

Preglednica 1: Največje vrednosti kemijskih parametrov, ki so zahtevane pri posameznih kakovostnih razredih vin, ki so pridelana na ozemlju Republike Slovenije, ki jih predpisuje Pravilnik* (Priloga II)

Kemijski parameter			Največja dovoljena koncentracija	
Skupni SO ₂ (mg/L)	rdeča vina	do 5 g/L red. sladkorjev	160	
		nad 5 g/L red. sladkorjev	210	
	bela in rose vina	do 5 g/L red. sladkorjev	210	
		nad 5 g/L red. sladkorjev	260	
Skupni / prosti SO ₂ (mg/L)	vrhunsko vino ZGP	(do 7 g/L red. sladkorjev)	180/40 (bela in rose)	140/35 (rdeča)
		(nad 7 g/L red. sladkorjev)	240/45 (bela in rose)	180/40 (rdeča)
	vrhunsko vino ZGP - pozna trgatev		300/50	
	vrhunsko vino ZGP - izbor		350/50	
	vrhunsko vino ZGP - jagodni izbor, ledeno vino, suhi jagodni izbor		400/50	
	barrique vino		160/50 (bela in rose)	160/40 (rdeča)

*Pravilnik o pogojih, ki jih mora izpolnjevati grozdje za predelavo vina, o dovoljenih tehnoloških postopkih in enoloških sredstvih za pridelavo vina in o pogojih glede kakovosti vina, mošta ali drugih proizvodov v prometu (2004)

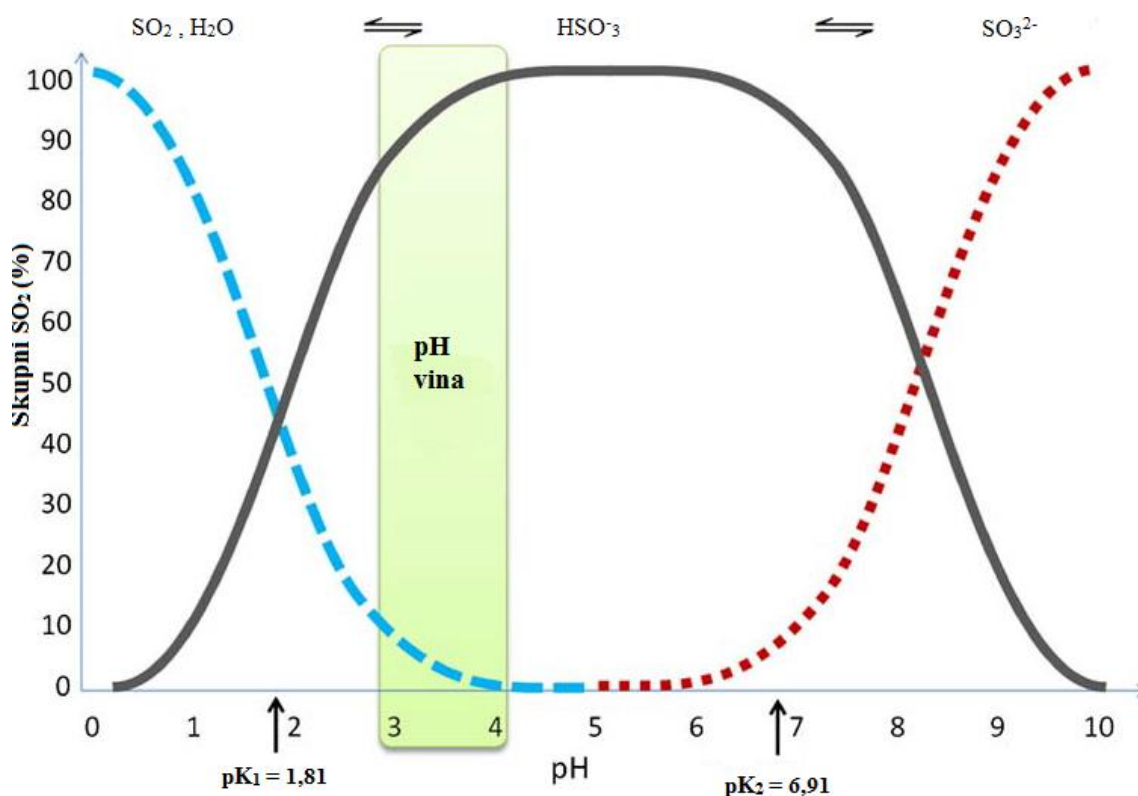
Ne glede na našo nacionalno zakonodajo pa je veljavna omejitev skupnega SO₂ po evropski zakonodaji (Commission Regulation ..., 2009), kjer so koncentracije manjše za 10 mg/L za vsa vina normalne trgatev, ne glede na barvo, to je največ 150 oziroma 200 mg/L za vina do 5 g/L reducirajočih sladkorjev in 200 oziroma 250 mg/L za vina z več kot 5 g/L reducirajočih sladkorjev.

2.4 IONIZACIJSKE OBLIKE ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA

Žveplov dioksid, ki je raztopljen v moštu ali vinu, se obnaša kot kislina, kar se posledično kaže v treh različnih oblikah, ki so funkcija vrednosti pH (Košmerl, 2005a):

- molekularna oblika (SO₂): je glavna oblika pri pH pod 1,86,
- bisulfitna oblika (hidrogensulfitni ion; HSO₃⁻): glavna oblika pri pH med 1,86 in 7,18,
- sulfitna oblika (sulfitni ion; SO₃²⁻) je glavna oblika pri pH nad 7,18.

Delež posameznih oblik SO₂ lahko vidimo na sliki 1.



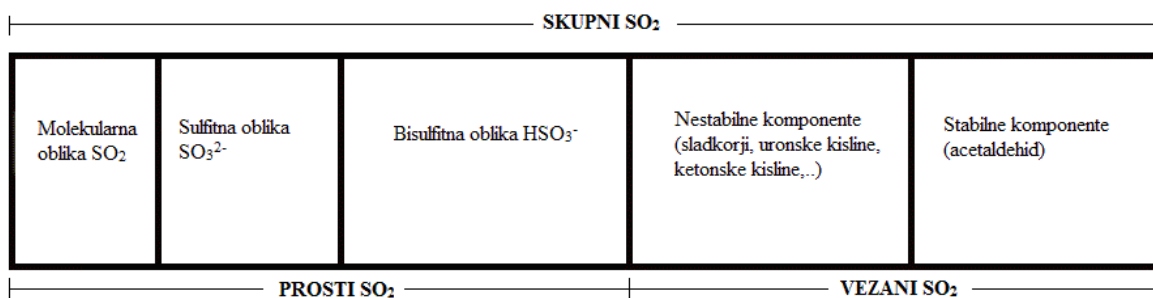
Slika 1: Delež posameznih oblik SO_2 pri različnih vrednostih pH (Divol in sod., 2012)

Ko v mošta ali v vino dodamo žveplov dioksid, le-ta disociira v tri različne molekule na naslednji način (Divol in sod., 2012):



Količina SO_2 , ki ga dodamo v vino, se veže s spojinami vina. Obliko, ki se veže, imenujemo vezani SO_2 , tisti del, ki ostane, pa prosti SO_2 . Skupni SO_2 je vsota prostega in vezanega SO_2 . To lahko vidimo grafično na sliki 2 (Rotter, 2001).

pH vina je običajno med 3 in 4, prevladujoča oblika v vinu pa je bisulfitna oblika HSO_3^- (Divol in sod., 2012). S kletarskega stališča je bistvenega pomena, da je pri vrednostih pH mošta in vina prevladujoča oblika bisulfitnega iona, delež ostalih oblik pa je odvisen predvsem od vrednosti pH konkretnega vzorca (Košmerl, 2005b).



Slika 2: Prosta, vezana in skupna oblika žveplovega dioksida (Rotter, 2001)

V vinarstvu govorimo o prostem žveplovem dioksidu, ki obsega predvsem molekularno obliko, nevezano bisulfitno ter nedisociirano sulfitno obliko. Senzorično lahko zaznamo samo molekularno obliko (Bavčar, 2009). Prosti SO₂ je definiran kot nevezana oblika žveplovega dioksida v vinu. To je žveplov dioksid, ki ni vezan na acetaldehid, druge aldehyde ali organske spojine. V vinu je raztopljen kot SO₂ in kot HSO₃⁻. Ravnotežje med tema dvema oblikama je odvisno od vrednosti pH in temperature (Košmerl in Kač, 2009):



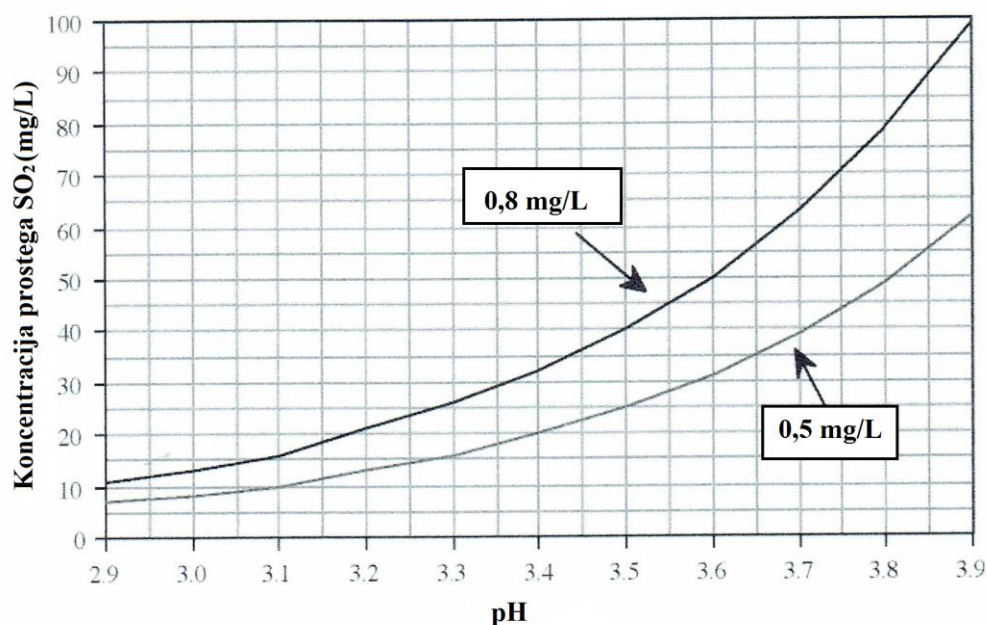
Z vezavo »porabnikov« žvepla, kot so acetaldehid, ketoglutarat, piruvat, antociani, tanini in sladkorji, nastanejo hidroksi sulfonati. Tako se koncentracija prostega žveplovega dioksida zmanjšuje, dokler se ne vežejo vsi »porabniki« žvepla na bisulfitno obliko SO₂. (Bavčar, 2009). Vezana oblika ne deluje na kvasovke, vendar pa lahko posamezne frakcije vezanega SO₂ na acetaldehid in piruvično kislino delujejo protibakterijsko (to delovanje je pet- do desetkrat šibkejše kot pri prostem SO₂) (Rotter, 2001).

Skupni žveplov dioksid, ki ga določamo kot fizikalno-kemijski parameter, zaobjema vse možne tri oblike žveplovega dioksida. Na razmerja med oblikami odločilno vpliva pH ter koncentracija spojin, ki so vezane v bisulfitno obliko. Vpliv pH vina na deleže oblik prisotnega žveplovega dioksida v modelni alkoholni raztopini (14 vol.%) je podan v preglednici 2 (Bavčar, 2009).

Preglednica 2: Vpliv pH vina na deleže oblik žveplovega dioksida (Bavčar, 2009)

pH	SO ₂ (%)	HSO ₃ ⁻ (%)	SO ₃ ²⁻ (%)
2,7	10,5	89,5	0,00283
2,8	8,54	91,5	0,00364
2,9	6,90	93,1	0,00467
3,0	5,56	94,4	0,00596
3,1	4,47	95,5	0,00759
3,2	3,58	96,4	0,00964
3,3	2,87	97,1	0,0122
3,4	2,29	97,7	0,0155
3,5	1,83	98,2	0,0196
3,6	1,46	98,5	0,0248
3,7	1,16	98,8	0,0312
3,8	0,924	99,0	0,0394
3,9	0,736	99,2	0,0497
4,0	0,585	99,4	0,0627

Za vinarje je najpomembnejši podatek o prostem žveplovem dioksidu, zlasti njegov delež, ki je potreben za vzdrževanje koncentracije molekularnega žveplovega dioksida 0,825 mg/L, ki zagotavlja mikrobiološko in kemijsko stabilnost vina (Košmerl, 2005b). Koncentracija prostega SO₂ je v vinu ključnega pomena, saj je edina oblika, ki lahko veže spojine, ki bi lahko oksidirale spojine v vinu (Divol in sod., 2012). Posebej pozorni moramo biti na to, da zadostna koncentracija prostega SO₂, ki prepreči nezaželeno oksidacijo ne zadostuje potrebni koncentraciji molekularnega SO₂, ki bi zavirala mikrobo rast (Sacks in Howe, 2015).

**Slika 3:** Koncentracija prostega SO₂, ki je potreben za vzdrževanje 0,8 mg/L in 0,5 mg/L molekularnega SO₂ v odvisnosti od pH vina (Margalit, 2004)

2.4.1 Molekularna oblika

Molekularna oblika žveplovega dioksida je pomembna zaradi protimikrobnega delovanja, saj preprečuje procese kvara zaradi neželenih bakterij in kvasovk, hkrati pa jo lahko tudi senzorično zaznamo z vohanjem (Košmerl, 2005a). Meja zaznavnosti je odvisna od temperature in pH vina (Košuta in Jug, 2010). Molekularno žveplo lahko zelo hitro reagira z vodikovim peroksidom, ki nastane pri oksidaciji fenolnih spojin (Košmerl, 2005a).

Pri pH 3,0 je molekularnega žveplovega dioksida 6,1 %, pri pH 4,0 pa le še 0,6 % (Košuta in Jug, 2010). To lahko razložimo s pomočjo konstante kislosti. H_2SO_3 je šibka kislina, ki ima konstanto kislosti $K_a = 1,6 \times 10^{-2}$, ki v vodi razpade na oksonijev ion (H_3O^+) in bisulfitni ion (HSO_3^-). V vinu s pH 3 (koncentracija oksonijevih ionov je 10^{-3}) je ravnotežje pomaknjeno v prid nastajanje in ohranjanja bisulfitnega iona in to kar 16-krat (Košuta in Jug, 2010).



$$K_a(\text{H}_2\text{SO}_3) = \frac{[\text{HSO}_3^-] \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{H}_2\text{SO}_3]} \Rightarrow \frac{[\text{HSO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{SO}_3]} = \frac{K_a}{[\text{H}_3\text{O}^+]} = \frac{1,6 \cdot 10^{-2}}{10^{-3}} = 16 \quad \dots (6)$$

Poleg pH vrednosti pa imata vpliv na delež molekularnega SO_2 tudi temperatura in koncentracija alkohola (Košmerl, 2005b).

Za mikrobiološko stabilnost suhih vin je potrebno 0,8 mg/L molekularnega žveplovega dioksida. Pri rdečih vinih pa je dovolj že 0,6 mg/L. Pri vinih z ostankom nepovretega sladkorja pa je potrebno doseči 1,5–2,0 mg/L molekularne oblike žveplovega dioksida (Košuta in Jug, 2010). Sama učinkovitost molekularnega žveplovega dioksida je odvisna tudi od vsebnosti alkohola. Velja, da vina z višjo alkoholno stopnjo potrebujejo manj žveplovega dioksida, kot pa vina z manjšo vsebnostjo alkohola (Košmerl, 2005a).

Koncentracija molekularne oblike žveplovega dioksida v vinu je odvisna od vrednosti pH, koncentracije etanola, temperature, vsebnosti antocianov in hranilnih snov (Sturm in sod., 2014).

V celice kvasovk prehaja molekularna oblika SO_2 . Ker nima naboja lahko prehaja skozi celično membrano z enostavno difuzijo. V notranjosti kvasne celice (pH je od 5,5 do 6,5) dicociira v bisulfitne in sulfitne anione (Divol in sod., 2012).

Iz preglednice 3 lahko določimo, kolikšen dodatek žvepla potrebujemo. To določimo iz izmerjene vsebnosti prostega žveplovega dioksida in pH vina glede na potrebno vsebnost molekularnega žvepla (Košuta in Jug, 2010).

Preglednica 3: Zahtevano prosto žveplo, ki je potrebno za doseganje določene količine molekularnega SO₂ (Košuta in Jug, 2010)

pH	Potrebni prosti SO ₂ (mg/L) za določeno količino molekularnega SO ₂		
	0,6 mg/L	0,8 mg/L	2 mg/L
2,8	6	9	22
2,9	8	11	27
3,0	10	13	33
3,1	12	16	41
3,2	15	20	51
3,3	19	26	64
3,4	24	32	80
3,5	30	40	100
3,6	38	50	125
3,7	47	63	157
3,8	59	79	197
3,9	74	99	248
4,0	94	125	312

Potreba molekularnega žvepla za mikrobiološko stabilnost vina je odvisna od (Košuta in Jug, 2010):

- vrste kvasovk in bakterij, ki so na žveplo različno občutljive. Nekateri sevi so lahko razvili odpornost na žveplo, zato moramo žveplati v zadostni količini v enkratnih odmerkih;
- razvojne faze mikroorganizmov;
- kemične sestave vina – npr. razpoložljivost hranilnih snovi in koncentracija alkohola imata direkten vpliv na razmnoževanje določenih vrst mikroorganizmov.

V vinarstvu je molekularna oblika zelo pomembna, zato je pomembno, da poznamo njeno koncentracijo v vinu. Koncentracijo lahko preračunamo po Henderson-Hasselbalchovi enačbi (8) (Divol in sod., 2012):

$$[\text{molekularni SO}_2] = \frac{[\text{HSO}_3^-]}{10^{\text{pH}-\text{pK}_1}} \quad \dots(7)$$

oz.

$$[\text{molekularni SO}_2] = \frac{[\text{prosti SO}_2]}{1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}_1}} \quad \dots (8)$$

Legenda:

[molekularni SO₂] - koncentracija molekularne oblike SO₂ (mg/L)

[prosti SO₂] - koncentracija prostega SO₂ (mg/L)

pH - vrednost pH vina

pK₁ - konstanta disociacije (1,81)

V enačbah (7) in (8) je pK₁ 1,81. Vrednost pK₁ za žveplov dioksid ni konstanta in variira glede na koncentracijo etanola, temperaturo in koncentracijo drugih raztopljenih ionov. Vino se shranjuje pri nizkih temperaturah, kar zmanjšuje vrednost pK₁, posledično pa je manjša tudi koncentracija molekularnega žveplovega dioksida. Vina analiziramo v

laboratoriju pri višjih temperaturah in tako dobimo večjo koncentracijo molekularnega dioksida, kot pa je v skladiščenemu vinu (Sacks in Howe, 2015).

2.4.2 Bisulfitna oblika

S kletarskega stališča je bisulfitna oblika najmanj pomembna oblika žvepla zaradi reakcij vezave žvepla s »porabniki«, ki nastanejo med samo alkoholno fermentacijo. Produkti vezave, ki jih imenujemo α -hidroksisulfonati, so odgovorni za vezano obliko žveplovega dioksida. V okviru žvepla odpade na bisulfitno obliko največji delež in sicer od 94 % pri pH 3,0 do 99 % pri pH 4,0. Pozitiven vidik vezave žvepla zlasti z acetaldehidom, ki je produkt reakcij oksidacije mladega vina ali staranja, je senzoričen. Kot druga prednost vezave žvepla pa je pri porjavenju, kjer pride do tvorbe rjavih pigmentov iz oksidiranih fenolnih spojin zaradi encimskih oksidacij v moštu oziroma kemijskih oksidacij v vinu. V obeh primerih pride do izgube prostega žveplovega dioksida (Košmerl, 2005a).

2.4.3 Sulfitna oblika

Sulfitna oblika žvepla deluje kot antioksidant in tako preprečuje oksidacijo drugih snovi v moštu ali vinu. Prisotna je v zelo majhnih koncentracijah (0,006 % pri pH 3,0 do 0,06 % pri pH 4,0). Reakcija sulfitnega iona s kisikom je relativno hitra, saj etanol v vinu nekoliko upočasni hitrost reakcije (4 dni pri belem; nekoliko manj pri rdečem vinu). Ta reakcija s kisikom upočasni oksidacijo fenolnih spojin ob tvorbi kinonov, tvorbo acetaldehida in rjavih pigmentov.

Pojav zlatih do rjavih odtenkov barve med zorenjem ali staranjem vina, izguba sortnega karakterja, tvorba aldehydskih komponent in porjavenje v steklenici so znaki nezaželenih kemijskih sprememb, ki jih lahko opazimo v belih vinih. Prav tako potekajo te reakcije v rdečih vinih, vendar to ni tako očitno zaradi naravnih barvil in večje vsebnosti snovi, ki so v te reakcije vključene. V teh reakcijah s kisikom reagira sulfitni ion. Pri tem se porabijo 4 mg SO₂ za 1 mg O₂ (Košmerl, 2005a).

2.5 POMEN ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA V VINU

2.5.1 Protimikrobno delovanje

Žveplov dioksid zavira razvoj različnih mikroorganizmov, kot so kvasovke, mlečnokislinske in očetnokislinske bakterije. Njegovo delovanje prepreči pojav motnosti v vinu, nezaželeno sekundarno fermentacijo, rast kvasovk rodu *Brettanomyces* in drugih bakterij.

Protimikrobna aktivnost se povečuje z višjo pH vrednostjo. SO₂ se najpogosteje doda zaradi inhibiranja rasti mlečnokislinskih bakterij in razvoja mlečnokislinske fermentacije (Guerrero in Cantos-Villar, 2015).

Protimikrobno delovanje oziroma preprečevanje rasti in razmnoževanje mikroorganizmov je povezano s prosto obliko žveplovega dioksida. Vpliv vezane oblike je le minimalen. Molekularna oblika je od prostih oblik najbolj toksična za mikroorganizme. Te oblike je pri pH vina zelo malo. Pri pH 3 le 6 % in pri pH 4 0,6 %. Vendar pa že 1,5 mg/L molekularnega žveplovega dioksida zadostuje za preprečevanje rasti bakterij, predvsem oacetnokislinskih bakterij in ne-*Saccharomyces* kvasovk (Bavčar, 2009). Učinkovitost dodane koncentracije žveplovega dioksida lahko povečamo z znižanjem prvotne mikrobne populacije. To lahko dosežemo s filtracijo (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Glavne mlečnokislinske bakterije, ki jih najpogosteje najdemo v vinu, so bakterije rodov *Oenococcus*, *Pediococcus* in *Lactobacillus*. Bakterije vrste *Oenococcus oeni* lahko rastejo pri nizkem pH in veliki koncentraciji etanola ter tako povzročijo mlečnokislinsko fermentacijo (Guerrero in Cantos-Villar, 2015). Na te bakterije ima velik vpliv vezani žveplov dioksid. Te bakterije sproščajo acetaldehid iz njegove vezane oblike hidroski sulfonatov in tako nastali prosti žveplov dioksid zavira njihovo delovanje. Prav zaradi tega je le manjša koncentracija skupnega žveplovega dioksida, pod 60 mg/L, priporočljiva za uspešno izveden biološki razkis (Bavčar, 2009).

Bakterije vrst *Lactobacillus hilgardii* in *Pediococcus pentosaceus* lahko vplivajo na kakovost vina. Povzročajo lahko razne bolezni vina in tvorijo snovi, ki negativno vplivajo na aromo vina ter biogene amine (Guerrero in Cantos-Villar, 2015), npr. kadaverin, putrescin, histamin ali tiramin (Takahashi, 2014). Bakterije rodu *Lactobacillus* lahko porabljajo sladkorje in posledično povečajo koncentracijo hlapnih kislin, kot sta očetna in mlečna kislina, kar vpliva na senzorične spremembe vina (Guerrero in Cantos-Villar, 2015).

Za kvasovke rodu *Brettanomyces* je značilna počasna rast, njihovo število pa se poveča, ko se zmanjša število hitro fermentirajočih kvasovk in ko so ugodne prehranske razmere (Sturm in sod., 2014). Kvasovke rodu *Brettanomyces* sodelujejo pri tvorbi neprijetnih vonjev v vinu (vonj po usnju, živalih), saj tvorijo etil fenole (4-etilfenol, 4-etilgvajakol, 4-vinilfenol) iz hidroksicimetnih kislin, ki so prisotne v grozdju (Guerrero in Cantos-Villar, 2015). Kritični točki, kjer lahko pride do kvara zaradi teh kvasovk, je staranje vina v lesenih sodih in stekleničenje vina. Mikrobno rast teh kvasovk lahko kontroliramo z ustreznimi pH vrednostjo, etanolom in temperaturo. Protimikrobno pa deluje tudi žveplov dioksid (Sturm in sod., 2014).

Oacetnokislinske bakterije lahko najdemo na grozdju, v drozgi, vinu ter v stekleničenem vinu. Prisotne so predvsem bakterije rodov *Acetobacter*, *Gluconobacter* in *Gluconacetobacter*. Te bakterije oksidirajo etanol v očetno kislino in naprej v ogljikov dioksid in vodo. Koncentracija oacetnokislinskih bakterij je višja na grozdju, ki je bilo v vinogradu okuženo s plesnijo *Botrytis cinerea*. Pomembno je, da vino vsebuje določeno koncentracijo žveplovega dioksida, da zaščiti vino pred temi bakterijami.

Bakterije vrste *Acetobacter aceti* lahko rastejo pri koncentraciji 25 mg/L prostega SO₂, 0,8 mg/L molekularne oblike SO₂ pa popolnoma inhibira rast teh bakterij (Bartowsky in Henschke, 2008).

Kvasovke rodu *Saccharomyces* so relativno neobčutljive na žveplov dioksid. To je posledica tvorbe acetaldehida pri nizkem pH in njegove vezave v celicah kvasovk ter posebnih prilagoditev transportnih poti sulfita v celici kvasovk. Splošno velja, da dodatek žvepla deluje toksično bolj na neaktivne ali dormantne celice kot pa na aktivne ali delujoče. To je predvsem prednost pri dodatku kvasnega vrelnega nastavka *Saccharomyces* kvasovk v primerjavi z divjimi kvasovkami iz grozdja in vinarske opreme. Zakasnitev v vrenju močno žveplanih moštov ali daljše prilagajanje kvasovk je povezano s povečano tvorbo porabnikov žvepla (acetaldehid, ketoglutarat). Šele ko je njihova vezava z žveplom končana, lahko kvasovke začnejo s svojo rastjo in metabolizmom (Bavčar, 2009).

Na žveplov dioksid so predvsem občutljive divje kvasovke in še bolj bakterije. Protimikroben učinek na te mikroorganizme je odvisen od njegove najbolj toksične oblike – molekularne oblike SO₂, ki jo poveča nizka vrednost pH mošta. Obstajajo pa tudi mikroorganizmi (kvarljivci), ki nanj niso občutljivi. To so bakterije vrst *Zygosaccharomyces bailii*, *Saccharomycodes ludwigii* in nekatere kvasovke rodu *Brettanomyces* (Bavčar, 2009).

Žveplov dioksid deluje tudi antimikrobno med shranjevanjem vina, saj zavira razvoj različnih mikroorganizmov, kot so kvasovke, mlečnokislinske bakterije in v manjši meri tudi oacetnokislinske bakterije (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Med samim shranjevanjem vina žveplo preprečuje tudi (Ribéreau-Gayon in sod., 2006):

- sekundarno fermentacijo belih sladkih vin,
- kontaminacijo s kvasovkami rodu *Brettanomyces* ter njihovo tvorbo etil fenolov,
- pojav motnosti, ki jo tvorijo kvasovke,
- rast različnih bakterij, ki kvarijo vino.

2.5.2 Antioksidativno delovanje in preprečevanje reakcij porjavenja

Žveplov dioksid deluje tudi kot odličen antioksidant in s tem prepreči oksidacijo drugih snovi v moštu in vinu (Bavčar, 2009). Vino vsebuje veliko snovi, ki so občutljive na oksidacijo, kar vodi do nezaželenih produktov, ki negativno vplivajo na senzorično vrednost (Guerrero in Cantos-Villar, 2015). V moštu in vinu lahko najdemo nekatere kovinske ione, organske kisline, etanol in fenolne spojine, ki so občutljivi na oksidacijo. Med njimi prav fenolne spojine najpogosteje povzročijo reakcije porjavenja (Li in sod., 2008). Oksidativne procese lahko razdelimo na encimske in neencimske oksidacijske reakcije. Encimske se lahko pojavijo predvsem v drozgi, neencimske pa na grozdju, v moštu ali v vinu. Encime, ki povzročijo encimske oksidacijske reakcije, imenujemo oksidoreduktaze. Polifenol oksidaze najpogosteje povzročijo porjavenje, sledijo pa lakaze in peroksidaze (Guerrero in Cantos-Villar, 2015).

Encimske oksidacije fenolov se pojavijo predvsem na začetku predelave vina in potečejo v prisotnosti kisika iz zraka in encima polifenol oksidaze. Glavne oksidoreduktaze, ki povzročijo reakcije porjavenja, so polifenol oksidaze in peroksidaze, poznane pa so tudi tirozinaze, ki so naravno prisotne na grozdni jagodi in katalizirajo oksidacijo monofenolov in *o*-difenolov, encime lakaze pa proizvajajo plesni. V drozgi so encimske oksidacijske reakcije v povezavi z vsebnostjo kaftarne in kutarne kisline. Produkti, ki nastanejo pri oksidaciji, oksidirajo druge snovi v vinu in povzročijo različne spremembe (Li in sod., 2008).

Žveplov dioksid s svojim delovanjem upočasni aktivnost oksidacijskih encimov, ki oksidirajo razne aromatične spojine. Prav tako prepreči tudi tvorbo kinonov, ki nastajajo z oksidacijo fenolnih snovi. Dodatek 50 mg/L žveplovega dioksida zmanjša encimsko aktivnost za 90 % (Bavčar, 2009).

Neencimske oksidacijske reakcije imenujemo tudi kemijske oksidacije. Snovi, ki so podvržene tem reakcijam, so kavna kislina in njeni estri, katehin, epikatehin, antociani ter galna kislina (Li in sod., 2008).

Žveplov dioksid lahko preprečuje tudi neencimske oksidacijske reakcije, kot je redukcija oksidiranih produktov, npr. kinonov nazaj v fenole ali tvorbo brezbarvnih produktov s kinoni. Preprečuje tudi Maillardovo reakcijo porjavenja med sladkorji in aminokislinami ter omeji aktivnost kinonov v nadaljnjih oksidacijskih reakcijah (Bavčar, 2009).

Antioksidativno deluje sulfitna oblika žvepla, kjer 4 mg SO₂ vežejo 1 mg O₂. V vinu je te oblike zelo malo; od 0,006 % pri pH 3 do 0,06 % pri pH 4 (Bavčar, 2009).

Vezava žveplovega dioksida in kisika poteka po naslednji reakciji in poteka ob prisotnosti katalizatorja (Ribéreau-Gayon in sod., 2006):



Reakcija (9) je počasna. Ščiti vino pred kemijsko oksidacijo, na encimske oksidacije, ki so zelo hitre, pa nima nobenega vpliva (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Žveplov dioksid deluje kot antioksidant na tri načine: lahko zmanjša koncentracijo prisotnega kisika, reagira z vodikovim peroksidom ali pa reducira kinone nazaj v fenole (Guerrero in Cantos-Villar, 2015).

Velik pomen ima žveplov dioksid tudi za antioksidativno delovanje askorbinske kisline (Bavčar, 2009). Askorbinska kislina je v majhnih koncentracijah naravno prisotna na grozdju, ponavadi pa jo dodamo pred stekleničenjem ali v drugih fazah, v koncentraciji od 50 do 150 mg/L. Dodajamo jo zaradi sposobnosti zmanjšanja koncentracije molekularnega kisika. V reakciji se askorbinska kislina pretvori v dehidroaskorbinsko kislino in vodikov peroksid. Pomembno je, da imamo ob dodatku askorbinske kisline ustrezno koncentracijo SO₂, ki sodeluje pri redukciji vodikovega peroksida in reagira z različnimi karbonilnimi spojinami (Oliveira in sod., 2011).

Antioksidativno delujejo tudi droži, ki vsebujejo veliko membranskih lipidov, sterolov, adsorbiranih polifenolov, tiolne skupine iz proteinov celične stene in β -glukane. Ležanje vina na drožeh spremeni senzorične lastnosti vina in iz tega razloga ni primerno za vsa vina.

2.5.3 Vezava s »porabniki« žvepla

Bisulfitna oblika žveplovega dioksida se veže z različnimi »porabniki« žvepla. Med »porabnike« žveplovega dioksida uvrščamo acetaldehid, piruvat, ketoglutarat, sladkorje in antociane. Najbolj pomemben porabnik je acetaldehid. Nastaja tudi kot stranski produkt alkoholne fermentacije, v večji meri pa pri mikrobiološki oksidaciji etanola v prisotnosti kisika pri tvorbi očetne kisline zaradi okužbe z očetnokislinskimi bakterijami (Bavčar, 2009). Njegova prisotnost v vinu je odvisna od količine dodanega žveplovega dioksida v mošt, seva kvasovk in vitamina B1 (tiamina) (Košmerl, 2005a).

Večja koncentracija acetaldehida je v vinu nezaželena. Z žveplom se zelo hitro tvori stabilen acetaldehid-bisulfitni kompleks oz. hidroksi sulfonat, ki ga senzorično ne zaznamo. Vezava bisulfitna z ostalimi »porabniki«, kot so piruvat, ketoglutarat in sladkorji, je z izjemo antocianov v rdečih vinih manj močna in posledično so tudi nastali kompleksi manj stabilni. Te reakcije potekajo počasneje. Splošno lahko trdimo, da so hidroksi sulfonati kemijsko in mikrobiološko neaktivne oblike (Bavčar, 2009).

V manjših koncentracijah pa so porabniki žvepla tudi keto-kisline (piruvat, keto-glutarat), ki nastanejo predvsem zaradi pomanjkanja hranilnih snovi (vitaminov) in okužbe grozdja s plesnijo. K »porabnikom« žvepla uvrščamo tudi oksidacijske produkte fenolnih spojin (kinone), askorbinsko kislino ter sladkorje (glukozo). Pri rdečih vinih pa ne smemo pozabiti na antociane (malvidin, 3-glukozidom). Pri vezavi »porabnika« z žveplom pride do tvorbe senzorično nevtralnega produkta, kar še posebno velja za acetaldehid. Ne glede na količino »porabnikov« je razmerje med vezanim in prostim SO_2 odvisno predvsem od funkcije pH (Košmerl, 2005a). To prikazuje preglednica 4.

Preglednica 4: Delež vezane in proste oblike žveplovega dioksida (SO_2) v vinu pri pH 3,5 in 3,1 (Košmerl, 2005a)

pH	vezani SO_2 (%)	prosti SO_2 (%)
3,5	50	50
3,1	25	75

Preglednica 5: »Porabniki« žvepla v vinu, njihov delež vezave (%) in običajna koncentracija »porabnikov« v vinu (mg/L) (Košmerl in Kač, 2009)

Substrat (»porabnik« SO ₂)	Delež vezave* (%)	Običajna koncentracija substrata v vinu (mg/L)
acetaldehid	99	20-60
piruvična kislina	66	10-40
α -ketoglutarjeva kislina	47	30-80
ksiloza	27	-
galakturonska kislina	2,5	-
glukoza	0,12	-

*delež vezave pri žveplanju s 50 mg prostega SO₂/L vina pri pH 3-4

Poleg omenjenih spojin, ki so navedena v preglednici 5 lahko bisulfitni ion reverzibilno reagira tudi z nenasičenimi in fenolnimi spojinami (s kavno in *p*-kumarno kislino) (Košmerl in Kač, 2009).

Stopnja vezave s »porabniki« je odvisna od stanja vina in njegove starosti. Vezava je hitra (nekaj minut) kadar dodamo žveplov dioksid v mošt, ko pa je vino bolj staro je vezava počasnejša (Margalit, 2004).

2.5.4 Senzoričen vpliv SO₂

Žveplov dioksid lahko v vinu povzroči tudi nezaželene učinke, kot so negativne senzorične lastnosti, nevtralizacija arome vina ali pa je vir tvorbe vodikovega sulfida. Koncentracije, ki so prevelike, povzročijo neprijetne okuse in arome, vino pa lahko postane zaradi pretirane uporabe SO₂ motno. Velike koncentracije SO₂ nevtralizirajo aromo, še večje koncentracije po povzročijo napake v aromi vina (vonj po mokri volni).

V rdečih vinih žveplanje pripomore k raztapljanju mineralov, organskih kislin in fenolnih spojin (antociani in tanini), ki oblikujejo rdečo barvo vina. Žveplanje grozdja ima velik vpliv na barvo rose vin, žveplanje pa tudi izboljša okus vina, še posebej v primeru gnilega grozdja. Žveplov dioksid varuje tudi aromo mladih vin.

Anaerobna fermentacija in ležanje vina na drožeh lahko povzroči tvorbo vodikovega sulfida in merkaptanov iz dodane koncentracije žveplovega dioksida (Guerrero in Cantos-Villar, 2015). Vonj teh spojin je neprijeten in lahko v vinu ostane trajno (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Kljub vsem negativnim lastnostim, ki jih ima žveplov dioksid, pa lahko dodani SO₂ poveča porabo aminokislin s strani kvasovk med samo fermentacijo. Vina, ki jim med fermentacijo dodamo SO₂, imajo boljšo mikrobiološko stabilnost ter bolj kompleksen okus (Guerrero in Cantos-Villar, 2015).

2.5.5 Druge reakcije žveplovega dioksida

Z neencimsko oksidacijo nekaterih fenolnih snovi nastaja vodikov peroksid. Če žveplov dioksid ni prisoten, lahko nastali vodikov peroksid pospeši tvorbo acetaldehida iz etanola. Tako lahko dodatek žvepla prepreči še dodatno tvorbo acetaldehida. Nasprotno pa dodani žveplov dioksid v mošt pred fermentacijo pospeši tvorbo acetaldehida s strani kvasovk. To je posledica nastanka kompleksov acetaldehid-bisulfit, ki prekine ravnotežje oziroma razmerje med acetaldehidom v moštu in v celicah kvasovk. Zato začnejo kvasovke tvoriti večje količine acetaldehida, ki ga izločijo v mošt. Iz tega je razvidno, da žveplov dioksid med fermentacijo poveča koncentracijo acetaldehida.

V rdečih vinih žveplo z vezavo z antociani preprečuje stabilizacijo barve ter zaustavlja tvorbo kompleksov antociani-tanini, ki dajejo stabilno rdečo barvo vinu.

Poznano je tudi, da bisulfitna oblika žvepla razgradi vitamin tiamin, ki je pomemben za rast številnih mikroorganizmov. Posredno s tem preprečuje rast kvarljivcem, npr. kvasovkam rodu *Brettanomyces* in mlečnokislinskim bakterijam rodu *Lactobacillus*, ki za svojo rast potrebujejo minimalne količine tega vitamina (Bavčar, 2009).

2.6 UPORABA ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA V VINARSTVU

Ne glede na številne kemijske reakcije žveplovega dioksida v vinu na splošno velja, da je iz vidika dodatne tvorbe acetaldehida v vinu potrebno vzdrževanje koncentracije prostega žvepla med 5-25 mg/L. Ko dodamo žveplo v vino se koncentracija vseh treh oblik žvepla zelo hitro poveča. Približno po 2-8 urah je vezava žvepla popolnoma zaključena. V stekleničnem vinu mora biti koncentracija molekularne oblike v območju od 0,5-0,8 mg/L, kar odgovarja dodatku 20-40 mg/L v območju pH vrednosti 3,2-3,5 (Košmerl, 2005a).

Naš osnovni namen je, da zavarujemo mošt, izpeljemo alkoholno fermentacijo in omogočimo zorenje vina. Pri tem nam je lahko žveplo v veliko pomoč, če vemo kdaj in koliko ustrezno žveplati. Glavni cilj je pridelati neoporečno in obstojno vino z minimalno, za stabilnost vina še zadostno koncentracijo žveplovega dioksida (Bavčar, 2009).

Bavčar (2009) navaja osnovna pravila pri dodatku žveplovega dioksida:

- minimalni dodatki žveplovega dioksida v mošt iz zdravega grozdja (lahko celo brez), v mošt iz močno nagnitega grozdja pa dodamo maksimalno 75 mg/L žveplovega dioksida, če žveplamo močno nagnito grozdje pa do 100 mg/kg grozdja,
- zdravo grozdje, hitra predelava grozdja, minimalen stik z zrakom, vitalen nastavek kvasovk, hiter začetek alkoholne fermentacije, enakomeren potek fermentacije in povretje do suhega nam omogoča dodatek žvepla šele ob prvem pretoku,
- če želimo tudi mlečnokislinski (biološki) razkis, žveplamo ob že omenjenih pogojih šele po koncu razkisa. Pred razkisom naj bo koncentracija žveplovega dioksida majhna, saj prosti žveplov dioksid nad 25 mg/L in skupni nad 60 mg/L že lahko omejita delovanje mlečnokislinskih bakterij,

- preprečimo dostop zraka do vina z dolivanjem posod po alkoholni fermentaciji in uporabljamo inertne pline,
- največji dodatek naj bo opravljen ob prvem pretoku, ne pozabimo na mešanje vina po dodatku,
- praktično je nemogoče predvideti, kolikšen del dodanega žveplovega dioksida se bo vezal, zato je redna kontrola prostega žveplovega dioksida nujna,
- naslednji dodatki žveplovega dioksida so odvisni predvsem od prostega žveplovega dioksida (meritve),
- koncentracija kislin in pH vplivata na razmerje žveplovega dioksida. Pri nižjem pH, kar pomeni po navadi več kislin, je večji del prisotnega molekularnega (antimikrobnega) žveplovega dioksida,
- v rdečih vinih naj bo zaradi razvoja oziroma polimerizacije fenolnih spojin med zorenjem med 15 in 20 mg/L prostega žveplovega dioksida, v belih pa do 25 mg/L,
- koncentracije prostega žveplovega dioksida nad 45 mg/L resno zavirajo zorenje vina,
- večje koncentracije prostega žveplovega dioksida negativno vplivajo na senzorične lastnosti,
- med zorenjem in pred stekleničenjem je ob stabilizaciji nujna tudi kontrola in dodatek žveplovega dioksida, če je potreben,
- ne pozabimo na skupni žveplov dioksid, ki ne sme presegati zakonsko dovoljenih mej in pravzaprav odraža znanje kletarja ter higieno v kleti.

2.6.1 Čas in količina žveplanja

Količina in čas žveplanja sta odvisna od (Vodovnik in Vodovnik Plevnik, 2003):

- zdravstvenega stanja grozdja (gnilo grozdje rabi zaščito takoj – žveplamo že grozdje),
- zrelosti grozdja (manj kisline – več žveplamo),
- vremena v času trgatve (v toplem več žveplamo),
- poškodovanosti grozdja ob trgatvi,
- časa od trgatve do predelave (če traja dolgo, žveplamo že grozdje),
- časa in načina stiskanja (če traja dolgo, žveplamo že grozdje ali drozgo),
- temperature mošta (če je možnost hlajenja žveplamo manj).

2.6.1.1 Žveplanje grozdja, drozge, mošta in vina

V praksi so dobre izkušnje, da zaščitimo že grozdje, saj je velikokrat čas od trgatve do žveplanja mošta predolg. Skupna poraba žvepla je nižja, če ga dodamo pravočasno in preprečimo delovanje drobnoživk ter oksidacijskih encimov. Velja pravilo, da žveplamo samo enkrat: ali grozdje ali drozgo ali mošt. Če žveplamo večkrat je možnost, da prežveplamo. V praksi se zelo dobro obnese žveplanje grozdja ali drozge, nato kontrola prostega SO₂ mošta in po potrebi dožveplanje mošta na 30 mg prostega SO₂/L (Vodovnik in Vodovnik Plevnik, 2003).

V pridelavi belih in rdečih vin se kaže trend dodajanja SO₂ le v minimalnih količinah pred začetkom alkoholnega vrenja. Če je možno (zdravo grozdje, nastavek dobro razmnoženih kvasovk, ne prenizke vrelnne temperature), se lahko tako izognemo dodatku SO₂ do končnega biološkega razkisa. S senzoričnega stališča kakovosti mladih rdečih vin, da zagotovimo maksimalno polimerizacijo fenolnih spojin (izguba grenkobe in trpkosti), naj prosti SO₂ ne preseže koncentracije 15 mg/L, kar pa je seveda odvisno od pH vrednosti (Košmerl, 2005b).

Pri prvem pretoku vino ločimo od droži, žveplamo in pripravimo vino na zorenje (Šikovec, 1993). Z dodatkom žveplovega dioksida zavarujemo vino pred oksidacijo in zavremo škodljive mikroorganizme. Količina SO₂ mora biti taka, da vino zaščiti, a tudi omogoča razvoj in zorenje vina (Bavčar, 2009). Dodan žveplov dioksid se v vinu veže s porabniki, ki bi nevezani na SO₂ prekrili sortnost vina in dali vinu prazen oksidirajoč okus ter višjo barvo. Ta proces moramo kontrolirati z ustrezno količino prostega SO₂ (Šikovec, 1993). Za določanje količine žveplovega dioksida si lahko pomagamo z zračnim testom.

Izvedemo ga tako, da v kozarec natočimo mlado vino iz sredine posode in ga pustimo 24 ur na zraku. Oksidacija oz. porjavitev se pojavi v kozarcu od gladine navzdol, približno potrebo po žveplu pa nakazujeta hitrost in intenzivnost porjavitve. Vino, ki potemni takoj in globoko proti dnu kozarca, potrebuje večji dodatek žveplovega dioksida (Bavčar, 2009). Ob prvem pretoku vinu po navadi dodamo od 50 do 60 mg/L SO₂ oziroma 1 mL 5-6 % žveplove(IV) kisline na liter vina. Žveplamo s svežimi sredstvi. Močneje žveplamo, tudi do 80 mg/L SO₂, vina iz gnilega grozdja in vina z večjim ostankom nepovretega sladkorja. Po dodatku žveplovega dioksida vino dobro premešamo in po dveh do treh dneh preverimo vsebnost prostega SO₂. V belih vinih ga mora biti vsaj 25 mg/L, v rdečih pa 20 mg/L. Koncentracije, ki so višje (nad 45 mg/L prostega SO₂), so moteče na vonj in zavrejo razvoj mladega vina (Bavčar, 2009).

Najbolj praktično je žveplanje med pretokom, saj tako zagotovimo dobro porazdelitev žveplovega dioksida. Po pretoku žveplamo tista vina katera smo namenoma zračno pretočili. To so predvsem rdeče vina in vina z reduktivnimi vonji. Pred pretokom žveplamo samo vina, ki kažejo nagnjenost k oksidaciji zaradi gnilega grozdja, nedolitih posod, delovanja oacetnokislinskih bakterij ali pojava drugih bolezni. Pri tem moramo računati, da se del žveplovega dioksida med pretokom izgubi. Če v vinu namenoma zaustavljamo biološki razkis, potem lahko vino ohladimo, pretočimo, žveplov dioksid pa dodamo kar med pretokom. Po prvem pretoku so meritve prostega in skupnega SO₂ nujne vse do stekleničenja (Bavčar, 2009).

Če vino vsebuje preveliko koncentracijo prostega žveplovega dioksida, ga lahko odstranimo z mešanjem, aeracijo ali z dodatkom vodikovega peroksida, ki je pri nas nedovoljeno (Rotter, 2001).

Vina pa ne smejo biti premalo žveplana saj se taka vina hitro razvijejo, imajo intenzivno barvo zaradi oksidacije flavonoidov, izgubijo svežino zaradi prostega acetaldehida ter dobijo top, oksidiran okus in vonj. Vina, ki vsebujejo nepovret sladkor, lahko postanejo motna in se pojavijo razne napake in bolezni vina, ki jih povzročajo različne bakterije (Šikovec, 1993).

Za obstojnost vina v steklenicah je zelo pomembna stabilnost vina na vsebnost prostega žveplovega dioksida. Vino mora pred stekleničenjem držati prosti SO_2 vsaj tri tedne na želeni ravni. To nam pokaže, da so porabniki žvepla zasičeni oziroma nevtralizirani. Še veliko večjo pozornost na vsebnost prostega SO_2 moramo imeti pri vinih, ki bodo v steklenicah dalj časa čakala na potrošnike (Vodovnik in Vodovnik Plevnik, 2003).

Med stekleničenjem vina prihaja do izgub skupnega SO_2 , kar je posledica fizikalno-kemijskih reakcij, ki so vezane na prosti žveplov dioksid (Košmerl, 2005a):

- izhlapevanje in izmenjava plinov skozi zamašek;
- oksidacija s kisikom v stekleničnem vinu; v steklenici vina naj bi bilo približno 5 mL zraka (1 mL zraka ali 1,4 mg kisika), za njegovo nevtralizacijo pa potrebujemo okoli 5-6 mg prostega SO_2 ;
- tvorba močnih vezi med žveplom in porabniki žvepla – kinoni;
- počasna oksidacija sulfita z oksidiranimi fenolnimi spojinami, pri čemer se tvori sulfat.

2.7 NAČINI ŽVEPLANJA

V kletarstvu se uporabljajo različni pripravki za žveplanje vina (Bavčar, 2009):

- žveplanje s trakovi – žveplenicami,
- kalijev bisulfit $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$,
- plinski SO_2 (90 % aktivnost),
- 5–6 % raztopina žveplove(IV) kisline H_2SO_3 (žveplasta kislina).

2.7.1 Žveplanje s trakovi – žveplenicami

Žveplo v naravi najdemo kot rumeno snov, ki je izpostavljena različnim spremembam. S segrevanjem preide v tekočo obliko in pri nenadni ohladitvi v trdno, prožno obliko. Če žveplo segrevamo v odsotnosti kisika, ta preide v plinasto obliko, če pa ga zažgemo pa zgori z modrim plamenom v oksid:



Na atom žvepla se vežeta dva atoma kisika kar praktično pomeni, da pri zgorevanju 1 g žvepla nastane kar 2-kratna količina SO_2 (2 g). Na tanki žveplenci je običajno 3 g žvepla, pri sežiganju pa tako nastane 6 g žveplovega dioksida, vendar pa se pri sežiganju v sodu izgubi približno polovica nastalega plina. Iz tega sledi, da v praksi računamo, da je učinkovita le polovična vrednost, to je 3 g SO_2 . Pri sežiganju elementarnega žvepla na traku, ki zgori z modrim plamenom, dobimo žveplov dioksid, v raztopini pa žveplasto kislino. Danes trakovi omogočajo, da žveplo povsem zgori in ne kaplja na dno posode, kot se je dogajalo v preteklosti (Šikovec, 1993). Žveplenice imajo na trak nanese elementarno žveplo, po 3, 4, 5, 6, 7, 8 ali 10 gramov. Zaradi različnih mas žveplenic moramo vedeti, koliko gramske smo kupili, da ne žveplamo preveč ali premalo (Vodovnik A. in Vodovnik T., 1999).

Priporočljivo je, da želeno število trakov namestimo na žico, ki jo prej ožgemo, da zgori cinkova obloga in tako ne nastane kovinski oksid, ki bi lahko prešel v vino. Trakove, ki so na žici ožgemo, spustimo v sod tako, da gleda konec žice iz soda in sod zapremo s čepom. Če žveplo ne gori, pomeni, da v sodu ni kisika ali pa, da je sod plesniv. Žveplene trakove tako sežigamo samo v zdravi leseni posodi. Če je sod plesniv, ga je potrebno očistiti, oprati, odcediti in nato zažveplati. Pri prvem pretoku zažveplamo prazen sod v katerega bomo pretakali mlado vino. Pomembno je, da pri sežiganju ne poškodujemo lesa ali obloge kovinskih tankov, ki so občutljive na visoke temperature. Za jeklene posode so bolj primerne druge oblike žvepla (Šikovec, 1993).

Prednosti žveplanja z žveplenicami (Šikovec, 1993):

- cenovno ugodne,
- težko pride do prežveplanja,
- neomejen rok uporabe,
- primerno za shranjevanje prazne lesene posode,
- primerno za žveplanje ob prvem pretoku.

Pomanjkljivosti (Šikovec, 1993; Košuta in Jug, 2010):

- ne moremo natančno določiti učinka žveplanja,
- naenkrat ne moremo uporabiti večjih količin,
- uporaba omejena na manjše lesene posode,
- nepopolno zgorevanje v zaprtem, mokrem sodu.

Uporaba žveplenic se zaradi številnih stranskih učinkov, kot so netočno doziranje, kapljanje v sod, možnost priokusov in enostavnejše uporabe drugih sredstev, umika iz kleti (Bavčar 2009).

2.7.2 Kalijev bisulfit

Ta oblika se priporoča predvsem za žveplanje gnilega grozdja, drozge, mošta ali mladih vin. Na voljo je v obliki (Šikovec, 1993):

- prahu, ki ni primeren, saj na zraku hitro oksidira v sulfat in tako izgubi učinkovitost,
- tablet s trgovsko oznako pirol, kalfit, stopflor,...

Tablete so pakirane v parafinirane ovitke. Po odprtju ovitka, ga moramo shranjevati v suhem prostoru in kmalu porabiti, ker tablete postopoma izgubljajo učinkovitost (Šikovec, 1993). Kalijev bisulfit vsebuje 57,5 % SO_2 , v praksi pa upoštevamo 50 % izkoristek: torej 10 g/hL K-metabisulfita da 50 mg/L SO_2 (Košuta in Jug, 2010). V kislem okolju mošta ali vina kalijev bisulfit hitro ionizira v plinasti SO_2 in ima svež izkoristek okoli 50 %. S hranjenjem izkoristek upada, ker pride do oksidacije sulfita v sulfat v prisotnosti vlage in kisika (Bavčar, 2009).

Tablete zdrobimo in raztopimo v kozarcu z malo vina ali mošta. Nato takoj ob močnem mešanju vlijemo v sod ali drugo posodo. Pri tem si pomagamo z ročnim ali električnim mešalom. Nepravilno je, če tablete damo v vrečko in potopimo v mošt ali vino, ker nastane prenasičenost žveplaste kisline v spodnjih plasteh soda. Sproščen kalij pospeši izločanje vinskega kamna, zato pred stekleničenjem ne smemo žveplati s kalijev disulfitom. Žveplov dioksid se iz kalijevega disulfita sprosti le v kislem mediju in za to ni primerno za mokro konzerviranje lesenih sodov ali sterilizacijo praznih steklenic (Šikovec, 1993).

Prednost (Vodovnik A. in Vodovnik T., 1999):

- možnost žveplanja grozdja, drozge, mošta, mladih vin.

Pomanjkljivosti (Vodovnik A. in Vodovnik T., 1999; Košuta in Jug, 2010):

- ni primeren za donegovana vina,
- izguba učinkovitosti na zraku,
- pri manjših posodah in odmerkih potrebujemo tehniko z natančnostjo 1 g.
-

2.7.3 Žveplanje z utekočinjenim SO₂

Za uporabo utekočinjenega SO₂ potrebujemo ustrezne dozirne aparate. SO₂ se nahaja v jeklenkah, na katere namestimo dozirno napravo, ki jo imenujemo sulfodozator. Ta ima cev, ki jo potopimo v posodo in uvajamo določeno količino SO₂ (Šikovec, 1993).

Prednosti (Šikovec, 1993):

- natančno doziranje,
- v vino vnašamo čist SO₂, brez primesi,
- mnogostranska uporaba,
- nizka cena.

Pomanjkljivost (Šikovec, 1993):

- plin SO₂ poškoduje kovinske dele dozirnega aparata in tesnila, zato je potrebna večkratna zamenjava tesnil. Cev mora biti iz nevtralne snovi, ki je obstojna na SO₂ ter ne sme oddajati tujega vonja in okusa. Najboljša je iz posebne gume, dovolj dolga, na koncu z težjim nastavkom za izliv, ki ga je potrebno potopiti čim globlje v sod. SO₂ se ne sme dozirati prepočasi in tudi ne prehitro. Pomembno je, ga dobro premešamo z mešalom.

2.7.4 5-6 % raztopina žveplove(IV) kisline H₂SO₃ (žveplasta kislina)

Zaradi prisotnosti vode je uporaba omejena na razkuževanje steklenic ali pa za mokro konzerviranje lesene posode. Lahko jo pa uporabljamo za dožveplanje, vendar jo je obvezno dobro premešati s celotno količino vina (Šikovec, 1993).

En dL/hL 5-6 % žveplaste kisline da 50 mg/L SO₂ (Košuta in Jug, 2010).

Prednost (Košuta in Jug, 2010):

- uporaba in odmerjanje preprosta.

Pomanjkljivost (Košuta in Jug, 2010):

- shranjevanje brez dostopa kisika, saj se na zraku razgrajuje (odprto raztopino moramo kmalu porabiti, še posebej, če se shranjuje v plastenkah).

Doziranje žveplaste kisline je natančno, če je iz neodprte steklenice in da je njena koncentracija pravilno določena. Natančno koncentracijo lahko preverimo z merjenjem gostote (Bavčar, 2009).

2.8 NEGATIVNE LASTNOSTI ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA

Poleg korozivnih lastnosti, ki so posledica prekomerne uporabe pri čiščenju in sterilizaciji vinarske opreme, je edina slaba lastnost žveplovega dioksida negativni vpliv na zdravje ljudi. V koncentracijah nad 45 mg/L prostega žveplovega dioksida večina ljudi zazna moteč vonj. Žveplov dioksid pa lahko sproži tudi astmatske napade pri ljudeh, ki so občutljivi oziroma alergijske reakcije, pri tistih, ki ne morejo pretvoriti sulfitov v sulfate. To bolezen imenujemo sulfitoria (Bavčar, 2009).

Simptomi, ki se lahko pojavijo pri ljudeh, ki so občutljivi na sulfit v koncentraciji 10-50 mg/L, so dermatitis, urtikarija, bolečine v trebuhu, driska in anafilaktični šok (Santos in sod., 2012).

Že leta 1973 so dokazali alergijske reakcije na sulfite. Alergijske reakcije se pojavijo pri astmatikih (4-10 % človeške populacije) že pri zelo majhnih koncentracijah SO₂ (okoli 1 mg). Zato se astmatikom priporoča, da se odpovejo uživanju vina.

Študije glede toksičnosti SO₂ so pokazale pojav simptomov zastrupitve, kot so bruhanje, slabost in draženje želodca pri zelo velikih absorbiranih koncentracijah (4 g natrijevega sulfita v enkratnem odmerku) (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

2.9 NADOMESTKI ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA V VINARSTVU

Raziskovalci si v vinarstvu močno prizadevajo najti druge konzervanse in inovativne tehnologije, ki so neškodljive za zdravje ljudi in lahko nadomestijo ali izboljšajo lastnosti žveplovega dioksida. Prepoved dodajanja žveplovega dioksida kot antimikrobnega sredstva brez novih alternativ bi povečala tveganje razvoja kvasovk in bakterij, ki bi negativno vplivale na kakovost vina. V vinarstvu je pomembno iskanje novih alternativ, ki bi zagotavljale varnost vina in ne bi imele škodljivih učinkov na zdravje ljudi (Guerrero in Cantos-Villar, 2015). Nadomestki, ki se dodajo v vino morajo zagotoviti mikrobiološko stabilnost vina, ščititi vino pred oksidacijo in ohraniti organoleptične lastnosti vina.

V vinarstvu lahko SO₂ nadomestimo z dodatkom različnih snovi ali pa z uporabo fizikalnih metod (Santos in sod., 2012). Njihove pozitivne lastnosti in slabosti so prikazane v preglednici 6.

Nobena alternativa se do sedaj še ni izkazala, da je učinkovita tako kot SO₂, lahko pa nekatere snovi pospešijo zorenje vina ali izboljšajo ekstrakcijo nekaterih snovi pred alkoholno fermentacijo (Guerrero in Cantos-Villar, 2015).

2.9.1 Dodatek snovi

2.9.1.1 Dimetil dikarbonat

Dimetil dikarbonat je kemični inhibitor mikroorganizmov, ki se lahko uporablja namesto SO₂. V državah Evropske unije je v vinarstvu dovoljena uporaba do 200 mg/L dimetil dikarbonata v stekleničenem vinu, ki ima več kot 5 g/L reducirajočih sladkorjev. Deluje tako, da inhibira delovanje encimov (alkohol-dehidrogenaze, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze) in s tem zavira rast mikrobnih celic. Dodan dimetil dikarbonat se v vinu hitro pretvori v metanol, nekaj pa se ga pretvori v metil karbonat ali alkil karbonate v reakcijah s polifenoli ali organskimi kislinami. Nastane lahko tudi nekaj metil karbamata v reakciji dimetil dikarbonata z amoniakom in aminokislinami. Koncentracije nastalih derivatov so zelo majhne in nimajo negativnega vpliva na vonj ali okus vina. Njegova protimikrobna učinkovitost je v vinu odvisna od temperature, koncentracije etanola, vrste, seva in števila mikroorganizmov. Protimikrobno deluje bolj na kvasovke kot na bakterije in je v primerjavi z SO₂ bolj učinkovit. Njegovo delovanje uniči mikrobne celice, SO₂ pa samo zavre rast celic. Koncentracija dimetil dikarbonata od 250 do 400 mg/L zavira kvasovke vrst *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida guilliermondii*, *Brettanomyces intermedius*, *Pichia membranaefaciens*, *S. bayanus* in *S. uvarum*. Bakterije so nanj bolj odporne. Bakterije vrste *Acetobacter aceti* in *Lactobacillus* sp. inhibirajo večje koncentracije (>500 mg/L). V rdečih vinih dimetil dikarbonat poveča intenzivnost barve zaradi reakcije z antociani (Santos in sod., 2012).

2.9.1.2 Bakteriocini

Nizin, pediocin in plantaricin so bakteriocini, ki jih proizvajajo specifične mlečnokislinske bakterije. So majhni polipeptidi, ki so inhibitorni za druge vrste bakterij. Bakteriocini delujejo na gram pozitivne bakterije, učinkovitost proti gram negativnim bakterijam pa je odvisna od vrste bakterije. So brez barve, vonja in so netoksični. Nizin je edini bakteriocin, ki ga lahko dobimo na trgu in uspešno inhibira bakterije, ki kvarijo vino. Je zelo učinkovit proti mlečnokislinskim bakterijam. Bakterija vrste *Oenococcus oeni* je na nizin bolj občutljiva. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) za to bakterijo je 0,024 µg/mL, za druge mlečnokislinske bakterije pa je MIC 12,5 µg/mL. Kvasovke so na nizin zelo odporne in imajo MIC večjo od 400 µg/mL. Pediocin in plantaricin sta inhibitorna za več vrst mlečnokislinskih bakterij (Santos in sod., 2012).

2.9.1.3 Fenolne spojine

Glavne fenolne spojine, ki so prisotne v vinu, so fenolne kisline, flavonoidi, stilbeni, tanini in v rdečih vinih še antociani. Dodatek fenolnih spojin deluje protimikrobno in antioksidativno. Lahko zavirajo delovanje bakterij vrst *Staphylococcus aureus*, *E. coli* in *Candida albicans*. Fenolne kisline in flavonoidi so učinkoviti tudi proti patogenim bakterijam. Največji protimikroben učinek na rast mlečnokislinskih bakterij imajo stilbeni in flavonoli (Santos in sod., 2012).

2.9.1.4 Lizocim

Lizocim je protein, izoliran iz jajčnega beljaka in je učinkovito protimikrobno sredstvo. Je zelo stabilen pri pH od 2,8 do 4,2. Zavira rast bakterij in kontrolira rast mlečnokislinskih bakterij. Njegova učinkovitost je odvisna od prisotnih mikroorganizmov in pogojev. Bakterijska občutljivost na lizocim je odvisna od peptidoglikanske strukture v celični steni. Bolj deluje proti gram pozitivnim bakterijam. Najbolj občutljive so bakterije rodu *Oenococcus* spp., manj pa so občutljive bakterije rodov *Lactobacillus* in *Pediococcus*. Je bolj učinkovit v belih vinih kot v rdečih. Rdeča vina vsebujejo različne fenolne spojine, ki vežejo lizocim. V belih vinih ima lizocim daljšo aktivnost, vendar pa lahko povzroči tvorbo meglice. Vina, katerim dodamo lizocim, ne kažejo sprememb v aromi. Skupaj z nizinom izboljšata vrednost MIC, s tanini pa ščitita vino pred razvojem nezaželenih mikroorganizmov. Njegova uporaba v vinu lahko predstavlja tveganje za potrošnike, ki so alergični na jajca. Prav zaradi tega mora biti prisotnost lizocima v vinu napisana na etiketi (Santos in sod., 2012).

2.9.2 Fizikalne metode

2.9.2.1 Pulzna električna polja

To je zelo hitra in učinkovita tehnika za inaktivacijo patogenih mikroorganizmov v živilih brez, da bi se spremenila njihova kakovost. V mikroorganizmih povzroči irreverzibilno spremembo v njihovi celični membrani. Kvasovke vrst *Dekkera anomala* in *Dekkera bruxellensis* sta na električna polja bolj občutljivi kot bakterije vrst *Lactobacillus hilgardi* in *Lactobacillus plantarum*. Uporaba električnih polj lahko zmanjša dodatek žveplovega dioksida v vino in nima vpliva na vsebnost dušikovih snovi, maščobnih kislin in hranilnih snovi, ki so potrebne za rast kvasovk. Druga prednost uporabe električnih polj je v zmanjšanju časa maceracije in povečani ekstrakciji fenolnih spojin. Tehnologija ima veliko prednosti in bi lahko v vinarstvu zamenjala uporabo SO₂, vendar pa so vina brez dodatka SO₂ manj kompleksnega okusa (Santos in sod., 2012).

2.9.2.2 Ultrazvok

Ko tekočino izpostavimo ultrazvočnim valovom se tvorijo mehurčki. Učinkovitost te tehnike je odvisna od vrste in števila prisotnih mikroorganizmov in od frekvence ultrazvočnih valov. Spore so na ultrazvočne valove relativno odporne. Uporaba ultrazvoka lahko inhibira določene encime, v moštih zmanjša število kvarljivcev in poveča intenzivnost barve in koncentracijo spojin, ki tvorijo okus vina. Prav tako lahko ultrazvok ustavi mlečnokislinsko fermentacijo ali pa pospeši avtolizo kvasovk in spodbudi mlečnokislinsko fermentacijo. Tako kot pulzna električna polja tudi ta tehnologija poveča količino fenolnih spojin v rdečih vinih in pospeši staranje vina (Santos in sod., 2012).

2.9.2.3 Ultravijolično obsevanje

Ultravijolično obsevanje vključuje sevanje iz elektromagnetnega spektra od 100 do 400 nm. S sevanjem lahko uničimo mikroorganizme rodov *Brettanomyces*, *Saccharomyces*, *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* in *Oenococcus*. Metoda je uporabna za bela vina, rdeča vina pa vsebujejo fenolne spojine, ki lahko absorbirajo UV sevanje. Uporabljamo jo v končnih fazah vinarstva, ko vino ni več motno (Santos in sod., 2012).

2.9.2.4 Visok hidrostatski tlak

Visok hidrostatski tlak se lahko uporablja v živilih za inaktivacijo mikroorganizmov in encimov ter za spremembo funkcionalnih lastnosti snovi, ki sestavljajo živilo. V moštu lahko s tlakom 700 MPa zavremo delovanje polifenol oksidaz, lahko pa pri določenem tlaku te encime aktiviramo kar zmanjša antioksidativno aktivnost in vsebnost antocianov. Visok tlak lahko inaktivira mikroorganizme, kot so bakterije vrste *Leuconostoc oenos*, *Lactobacillus* spp. in *Acetobacter* ter plesen vrste *Botrytis cinerea*. Prav tako lahko visok tlak zmanjša začetno mikrobno populacijo, kot so kvasovke vrst *Saccharomyces cerevisiae*, *Brettanomyces bruxellensis* in mlečnokislinske bakterije vrste *Oenococcus oeni*. Aerobne bakterije so na visok tlak bolj občutljive kot kvasovke in mlečnokislinske bakterije.

Uporaba visokega tlaka je v vinu možna v zadnji fazi, kjer nadomestimo dodan SO₂ pred stekleničenjem (Santos in sod., 2012).

Preglednica 6: Prednosti in slabosti dodatkov ter fizikalnih metod, ki lahko nadomestijo žveplov dioksid v vinarstvu (Santos in sod., 2012)

	METODA	UČINEK V VINU	SLABOST
Dodatek snovi	Dimetil dikarbonat	- inhibira rast mikroorganizmov	- manj učinkovit proti bakterijam kot proti kvasovkam
	Bakteriocini	- zaviranje bakterijske rasti, - kontrola mlečnokislinske fermentacije	- ne učinkuje na rast kvasovk
	Fenolne spojine	- zavirajo rast mikroorganizmov, - antioksidativna aktivnost, - ne vplivajo na porabo dušikovih spojin, - zagotovijo boljše senzorične lastnosti	- negativne spremembe v barvi in aromi vina
	Lizocim	- inhibira rast bakterij, - kontrolira mlečnokislinsko fermentacijo	- majhna aktivnost proti gram negativnim bakterijam, - ne deluje na kvasovke, - vezava s polifenolnimi spojinami v rdečih vinih, - pojav motnosti
Fizikalne metode	Pulzno električno polje	- uničenje patogenih mikroorganizmov, - zmanjšanje časa maceracije, - povečana ekstrakcija fenolnih spojin, - pospešuje staranje vina	/
	Ultrazvok	- pospešuje zorenje vina, - povečana ekstrakcija fenolnih spojin	/
	Ultravijolično obsevanje	- uničenje patogenih mikroorganizmov, - s stilbeni bogata vina	- manj učinkovito v rdečih vinih kot v belih
	Visok hidrostatski tlak	- uničenje patogenih mikroorganizmov	- aktivacija nekaterih encimov, ki zmanjša antioksidativno aktivnost in vsebnost antocianov

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI ZA STATISTIČNO OBDELAVO

V magistrski nalogi so bila obdelana vina letnikov 2013 in 2014 ter so bila leta 2014 ocenjena na naših pooblaščenih organizacijah. Od vin letnika 2013 je 3345 belih, 1111 rdečih in 315 rdečkastih vin, od letnika 2014 pa 854 belih, 251 rdečih in 77 rdečkastih vin. Za leto 2013 je bilo v obdelavi 41 različnih sort vin iz 24 vinorodnih okolišev, za leto 2014 pa 32 sort vin iz 15 vinorodnih okolišev. Obdelovala so se mirna in peneča vina, vključena pa so bila tudi vina z oznako priznana tradicionalno poimenovanje (PTP). V nalogi so se obdelala suha, polsuha, polsladka in sladka vina. Med vsemi vzorci so bili tudi vzorci, ki so bili izločeni zaradi raznih napak. Ti vzorci so bili obdelani posebej.

Rezultate ocenjenih vin smo pridobili na Ministrstvu za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (sistem Bachus).

Zakon o vinu (2006) določa, da se z oznako PTP lahko označijo vina, ki izpolnjujejo določene pogoje, lahko pa se vinu PTP priključi dodatni tradicionalni izraz, če je tako opredeljeno v elaboratu in v predpisu, ki ureja podrobnejše pogoje za pridelavo in označevanje tega vina. Za vina PTP mora biti izdelan elaborat, ki določa naziv vina PTP, ki je besedna izpeljanka geografske označbe s seznama geografskih označb. Določati mora pogoje pridelave, vključno z opredelitvijo geografskega območja pridelave in ki določa tehnologijo pridelave in lastnosti vina. Lastnosti morajo biti tradicionalno značilne za vino s tega območja. V obdelavi so bila naslednja vina PTP: Cviček PTP, Teran PTP, Beli Bizeljčan PTP, Rdeči Bizeljčan PTP in Belokranjec PTP.

Rezultati vzorcev, ki smo jih pridobili iz sistema Bachus, so imeli določene naslednje fizikalno-kemijske parametre: relativno gostoto, dejanski alkohol, skupni ekstrakt, skupne kisline, nehlapne kisline, hlapne kisline, pepel, prosti in skupni SO₂, reducirajoče sladkorje in vrednost pH. Vsem vzorcem smo izračunali sladkorja prosti ekstrakt (relacija 11) in koncentracijo molekularnega SO₂ (relacija 8). Koncentracija molekularnega SO₂ je bila izračunana samo za vzorce kakovostnih vin, za katere smo imeli podano pH vrednost.

Sladkorja prosti ekstrakt (g/L) = skupni ekstrakt (g/L) – reducirajoči sladkorji (g/L) ... (11)

3.2 POOBLAŠČENE ORGANIZACIJE ZA OCENJEVANJE VIN

Postopek in način ocenjevanja grozdnega in vinskega mošta, vina, žganja iz vina oziroma iz drugih proizvodov iz grozdja in drugih proizvodov iz grozdja in vina ureja Pravilnik o postopku... (2000). Ocenjevanje pridelkov in proizvodov opravljajo le pooblaščne organizacije.

Pooblaščne organizacije morajo izpolnjevati naslednje zahteve:

- neodvisnost in nevtralnost ocen;
- ustrezne kadre, najmanj enega zaposlenega z visoko izobrazbo kmetijske ali živilsko tehnološke fakultete z najmanj 5 let delovnih izkušenj v analitiki vina ter opravljen predpisan preizkus senzoričnih sposobnosti ter poznavanja enologije in predpisov o vinogradništvu in vinarstvu;
- ustrezne prostore za laboratorij in degustacijske prostore, ki izpolnjujejo s tem pravilnikom predpisane pogoje, predvsem pa omogočajo anonimnost ocenjevanja;
- laboratorijsko opremo za opravljanje analiz po predpisanih metodah oziroma metodah, katerih rezultat je enak meritvam narejenim po predpisanih metodah;
- možnost priključitve na bazo podatkov registra pridelovalcev grozdja in vina Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano;
- predpisana primerljivost in ponovljivost rezultatov analiz.

Pooblaščne organizacije na osnovi razpisa izbere in z odločbo imenuje minister, pristojen za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Trenutno so pri nas pooblaščne organizacije Kmetijski inštitut Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod (KGZ) Maribor, KGZ Nova Gorica, KGZ Novo mesto in Andreja Brglez s.p., Enološko svetovanje Analiza, Ptuj.

Vzorci vina se na pooblaščenih organizacijah senzorično oceni, analizirajo pa se tudi fizikalno-kemijski parametri.

3.3 METODE DOLOČANJA ŽVEPLOVEGA DIOKSIDA V VINU

3.3.1 Določanje žveplovega dioksida v vinu po Rebeleinu

Titracijska metoda za določanje koncentracije SO₂ (Košmerl in Kač, 2010)

Vzorec vina destiliramo in nato kvantitativno določimo prosti in skupni SO₂ v destilatu s titracijo z raztopino jodovice ali natrijevega tiosulfata. Destilacijska metoda določanja SO₂ je referenčna metoda, saj se izognemo številnim motečim dejavnikom pri direktnem titrimetričnem določanju – po Riperju.

Opis metode: Z destilacijo predestiliramo skupni žveplov dioksid iz vzorca vina, ki mu pred destilacijo dodamo metanol in raztopino žveplove (VI) kisline, v reakcijsko zmes kalijevega jodata. Po destilaciji dodamo reakcijski zmesi ponovno žveplovo (VI) kislino in titriramo z raztopino natrijevega tiosulfata s škrobom kot indikatorjem.

Potrebna oprema: električni grelec (300 W), laboratorijska ura, destilacijska cev, stojalo, bireti (25 mL in 50 mL), pipete (polnilne 2 mL in 10 mL), destilacijske bučke (100 mL), 250 mL erlenmajerica, puhalka z deionizirano vodo.

Reagenti: raztopina kalijevega jodata, metanol, 16 % raztopina žveplove (VI) kisline, raztopina škrobovice (indikator), raztopina natrijevega tiosulfata (titrant), 10 % raztopina propanola.

3.3.1.1 Določanje skupnega žveplovega dioksida

Električni grelec predhodno ogrevamo vsaj 5 minut, ogrejemo pa tudi destilacijsko cev z destilacijo 10 mL deionizirane vode (3-4 min). Obe bireti napolnimo z raztopino kalijevega jodata in raztopino natrijevega tiosulfata brez zračnih mehurčkov do vrha. V 250 mL erlenmajerico nalijemo iz birete 50 mL raztopine kalijevega jodata in postavimo pod konec destilacijske cevi, tako da sega konica cevi do dna erlenmajerice. V 100 mL destilacijsko bučko odpipetiramo 2 mL metanola, 10 mL vzorca vina in 10 mL 16 % raztopine žveplove(VI) kisline. Dobro premešamo in destilacijsko bučko trdno pritrdimo na silikonski zamašek na začetku destilacijske cevi. Bučko postavimo na ogret električni grelec in destiliramo točno 3 minute. Po končani destilaciji najprej dvignemo destilacijsko cev in konico speremo z deionizirano vodo, nato pa snamemo še destilacijsko bučko z zamaška in konico destilacijske cevi ponovno sperem. Destilacijsko bučko ohladimo pod tekočo hladno vodo. V erlenmajerico nato dodamo po 10 mL škrobovice in 16 % raztopine žveplove(VI) kisline in titriramo z raztopino natrijevega tiosulfata do prehoda črno do temno modro obarvane raztopine v brezbarvno oziramo rahlo modrikasto barvo.

3.3.1.2 Določanje prostega žveplovega dioksida (brez destilacije)

Obe bireti napolnimo z raztopino kalijevega jodata in raztopino natrijevega tiosulfata brez zračnih mehurčkov do vrha. V 100 mL erlenmajerico odpipetiramo 10 mL vzorca vina, dodamo 10 mL 16 % raztopine žveplove(VI) kisline in 10 mL škrobovice. Dobro premešamo, v erlenmajerico damo magnet in jo postavimo na osvetljeno magnetno mešalo. Titriramo z raztopino kalijevega jodata do prehoda barve raztopine v rahlo modrikasto. Barva mora biti obstojna vsaj 20-30 sekund. Vrednost direktno odčitamo iz birete in jo pomnožimo z 10. Rezultat (c_1), ki ga dobimo predstavlja masno koncentracijo prostega žveplovega dioksida in reducentov, izraženo kot mg SO_2 /L vina. Reducenti so predvsem reducirajoči sladkorji in askorbinska kislina.

3.3.1.3 Določanje prostega žveplovega dioksida s korekcijo na askorbinsko kislino (brez destilacije)

Obe bireti napolnimo z raztopino kalijevega jodata in raztopino natrijevega tiosulfata brez zračnih mehurčkov do vrha. V 100 mL erlenmajerico odpipetiramo 10 mL vzorca vina, dodamo 1 mL 10 % raztopine propanola, premešamo ter erlenmajerico pokrijemo s parafilmom in počakamo točno 5 minut. V teh minutah poteče reakcija prostega žveplovega dioksida s propanolom. Po 5 minutah nadaljujemo s postopkom določanja prostega SO_2 kot pri točki 3.3.1.2. Vsebnost direktno odčitamo z birete in jo pomnožimo z 10. Rezultat (c_2) predstavlja masno koncentracijo askorbinske kisline, izraženo kot prosti žveplov dioksid (mg/L).

Izračun prostega SO₂: dejansko koncentracijo prostega SO₂ (mg/L) izračunamo iz razlike izračunanih koncentracij prostega SO₂ v vzorcu vina c_1 (prosti SO₂ brez korekcije na askorbinsko kislino) in c_2 (prosti SO₂ s korekcijo na askorbinsko kislino) – (relacija 12).

$$c_{\text{SO}_2}(\text{prosti}) = c_1 - c_2 \quad \dots(12)$$

Izračun vezanega SO₂: koncentracijo vezanega SO₂ (mg/L) izračunamo iz razlike izračunanih koncentracij skupnega in prostega SO₂ v vzorcu vina (relacija 13).

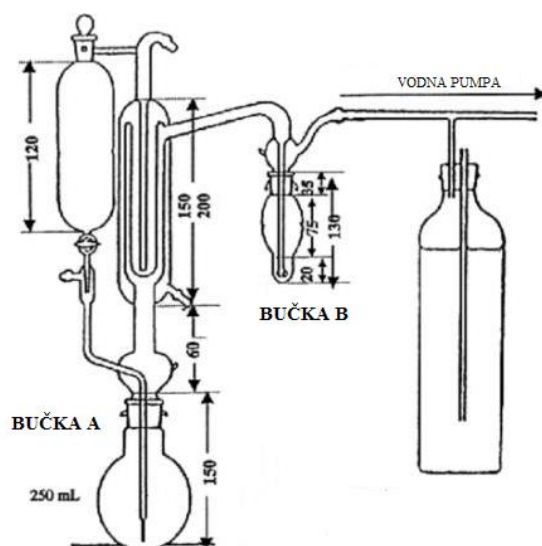
$$c_{\text{SO}_2}(\text{vezani}) = c_{\text{SO}_2}(\text{skupni}) - c_{\text{SO}_2}(\text{prosti}) \quad \dots(13)$$

3.3.2 Referenčna metoda za določanje prostega in skupnega žveplovega dioksida (Navodilo o fizikalno..., 2001)

Princip: žveplov dioksid odstranimo iz vina s tokom zraka oziroma dušika ter ga fiksiramo in oksidiramo tako, da mehurčke vodimo skozi razredčeno in nevtralno raztopino vodikovega peroksida. Nastalo žveplovo(VI) kislino določimo titrimetrično s standardno raztopino natrijevega hidroksida. Prosti SO₂ odstranimo iz vina z vzdrževanjem nizke temperature (10 °C), skupni SO₂ pa s segrevanjem na visoko temperaturo (100 °C).

Naprava: naprava, ki jo uporabljamo, mora biti taka kot je na sliki 4, posebno pozornost pa moramo nameniti kondenzatorju (hladilniku).

Reagenti: 85 % fosforna kislina (H₃PO₄), raztopina vodikovega peroksida (H₂O₂), indikator (metil rdeče, metilen modro, alkohol) in 0,01 M raztopina natrijevega hidroksida (NaOH).

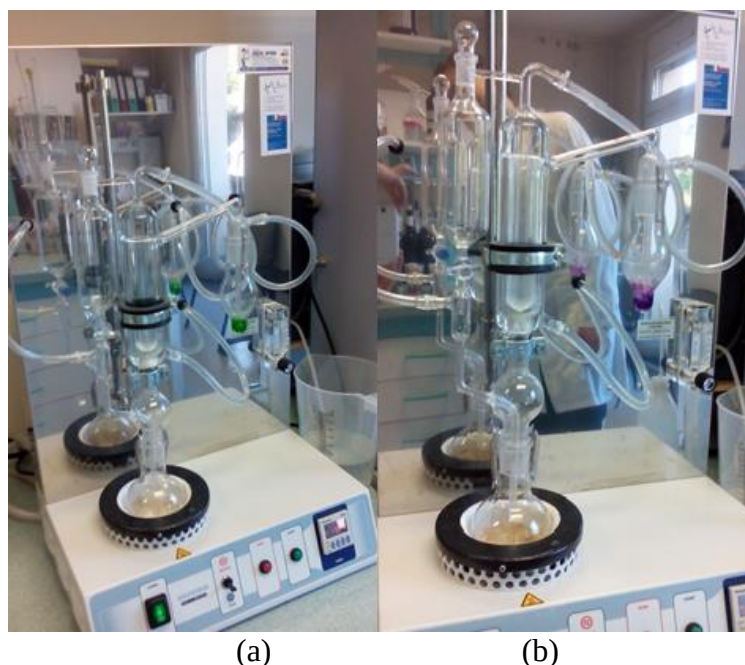


Slika 4: Shema naprave, ki se uporablja za določanje prostega in skupnega SO₂ (Navodilo o fizikalno..., 2001)

3.3.2.1 Določanje prostega žveplovega dioksida

Vino moramo imeti shranjeno v polni in zamašeni steklenici pri 20 °C dva dneva pred samo analizo. V zgornjo bučko (bučka B) damo 2–3 mL vodikovega peroksida in dve kapljici indikatorja. Raztopino vodikovega peroksida nevtraliziramo z 0,01 M raztopino natrijevega hidroksida in povežemo bučko z napravo. V spodnjo bučko (bučka A) nalijemo 50 mL vzorca vina in 15 mL fosforne kisline ter povežemo z napravo. Tok zraka naj deluje 15 minut in tako se sproščeni žveplov dioksid v zgornji bučki oksidira v žveplovo kislino. Zgornjo bučko nato snamemo in titriramo nastalo kislino z 0,01 M raztopino natrijevega hidroksida do preskoka barve iz vijolične do zelene. Porabljeni volumen za titracijo v mL pomnožimo z 6,4 ter tako dobimo koncentracijo prostega žveplovega dioksida v mg/L.

$$c(\text{prosti SO}_2 \text{ v mg/L}) = 6,4 \times \text{volumen titranta (mL)} \quad \dots(14)$$



Slika 5: Destilacijska naprava za določanje prostega in skupnega SO₂, ki jo imajo v agroživilskem laboratoriju na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica, ter značilno obarvanje vzorca vina pred (a) in po končani destilaciji (b)

3.3.2.2 Določanje skupnega žveplovega dioksida

Če ocenjena koncentracija skupnega SO₂ v vzorcu ni večja od 50 mg/L, damo v 250 mL bučko 50 mL vzorca vina in 15 mL fosforne kisline, če pa koncentracija skupnega SO₂ presega 50 mg/L pa damo v bučko 20 mL vzorca vina in 5 mL fosforne kisline. V bučko B damo 2-3 mL raztopine vodikovega peroksida in ga nevtraliziramo tako kot pri določanju prostega žveplovega dioksida. Vino v bučki A segrejemo do vrenja s pomočjo 4 do 5 cm visokega plamena, ki se dotika dna bučke. Paziti moramo, da bučke ne postavimo na železno ploščo, ampak na disk s približno 30 mm luknjo v sredini.

S tem se izognemo pregrevanju iz ekstrahiranih snovi, ki se nalagajo na steni bučke. Med pretokom zraka vzdržujemo vrenje in po 15 minutah izženemo in oksidiramo ves SO_2 . Nastalo žveplovo kislino titriramo z 0,01 M raztopino natrijevega hidroksida in si zabeležimo porabljeni volumen. Če za določanje uporabimo 50 mL vzorca vina porabljeni volumen za titracijo v mL pomnožimo z 6,4, če pa smo vzeli 20 mL vina pa pomnožimo z 16 ter tako dobimo vsebnost skupnega žveplovega dioksida v mg/L.

$$c \text{ (skupni SO}_2 \text{ v mg/L)} = 16 \times \text{volumen titranta (mL)} \quad \dots(15)$$



Slika 6: Obarvanje vzorca vina pred in po titraciji (Handerson, 2014)

3.3.3 Določanje žveplovega dioksida z WineScan™ FOSS analizo

Za določanje fizikalno-kemijskih parametrov se lahko v vinarstvu poslužujemo tudi WineScan analize. WineScan je sodobna naprava proizvajalca FOSS, katero imajo v agroživilskem laboratoriju na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica.

Naprava zagotavlja popolno kontrolo nad celotnim postopkom vinarstva, vse od trgatve grozdja do stekleničenja vina ter omogoča hitre analize (približno 30 sekund). Naprava WineScan™ omogoča analizo preko 20 fizikalno-kemijskih parametrov. Z napravo lahko določamo naslednje fizikalno-kemijske parametre:

- relativno gostoto mošta in vina,
- vsebnost alkohola,
- vrednost pH,
- vsebnost reducirajočih sladkorjev,
- koncentracijo skupnih in hlapnih kislin,
- masne koncentracije skupnega suhega ekstrakta,
- koncentracije organskih kislin,...

Analiza nam da hitre rezultate, priprava vzorca je enostavna, saj nam ni potrebno vzorca predhodno segrevati ali kemijsko obdelati, prav tako pa so stroški za uporabljene reagentne nizki (FOSS, 2016).



Slika 7: Naprava WineScanTM (FOSS, 2016)

WineScan analiza deluje na principu infrardeče spektroskopije. Fotoni infrardeče svetlobe imajo energijo primerno za vzbujanje nihanj vezi med atomi v posameznih molekulah. Leti nihajo na različne načine, ki so značilni za posamezen tip vezi, zato jih lahko uporabimo za kvalitativno in kvantitativno določitev komponent v vzorcu. Velja, da večja kot je molekula, večje je tudi število nihanj. Ponavadi se za ugotavljanje posameznih funkcionalnih skupin infrardeče spektre snema v območju 400 cm^{-1} - 1600 cm^{-1} . FTIR (»Fourierjeva transformacijska infrardeča spektroskopija«) naprave omogočajo sočasno spremljanje intenzitete svetlobe v celem infrardečem spektru. Hkrati pa te naprave ohranjajo natančnost in stabilnost tradicionalnih instrumentov (Skvarč, 2007).

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

3.4.1 Enovzorčna analiza

3.4.1.1 Aritmetična sredina ali povprečje

Povprečje je vrednost, za katero velja, da če bi bili vsi podatki enaki, bi bili tako enaki povprečju. Računa se samo za številske spremenljivke in ima predvsem analitični pomen. Povprečje lahko izračunamo na tri načine: aritmetično sredino, geometrijsko sredino in harmonično sredino. Način izračuna je odvisen od vrste podatkov (Košmelj, 2007).

Standardna oznaka za aritmetično sredino podatkov $x_1, x_2, \dots, x_n$ je $\bar{x}$. Aritmetična sredina leži med vrednostmi $x_1, x_2, \dots, x_n$. Vsaka posamezna vrednost x_i se od $\bar{x}$ lahko odklanja navzgor ali navzdol: odklon $x_i - \bar{x}$ je pozitiven ali pa negativen.

Aritmetična sredina je postavljena tako, da je vsota odklonov enaka 0 (Košmelj, 2007):

$$\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) = 0 \quad \dots(16)$$

Iz tega izraza dobimo izraz za aritmetično sredino:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad \dots(17)$$

Aritmetično sredino izračunamo tako, da seštejemo vse vrednosti spremenljivke in nato vsoto delimo s številom naših podatkov n . Je najpogostejše uporabljena srednja vrednost in na aritmetično sredino vplivajo vse vrednosti. Izjemno velike oz. majhne vrednosti – osamelci, močno vplivajo na vrednost aritmetične sredine. Najbolje je, da se aritmetična sredina izračuna z osamelci in brez njih (Košmelj, 2007).

3.4.1.2 Varianca in standardni odklon

Varianca vzorca (s^2) je merilo razpršenosti podatkov oz. variiranje okoli aritmetične sredine. Izračunamo jo po enačbi, kot povprečje kvadratov odklonov posameznih vrednosti od aritmetične sredine. Kadar je število statističnih enot vzorca manjše od 30, je imenovalec v enačbi zmanjšan za eno (Adamič, 1989).

Varianca je za statistično analizo podatkov zelo pomembna. Kot opisni parameter je manj pomembna, saj kvadrat merske enote ene spremenljivke pogosto nima pravega smisla. Pogosto se uporablja standardni odklon ali standardna deviacija, ki je kvadratni koren variance. Izračunamo ga po enačbi (Adamič, 1989).

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)} \quad \dots(18)$$

$$SD = s = \sqrt{s^2} \quad \dots(19)$$

3.4.1.3 Koeficient variabilnosti

Za primerjavo variiranja več statističnih spremenljivk z različnimi povprečnimi vrednostmi absolutne mere variance, kot sta na primer varianca in standardni odklon, običajno niso primerne. Objektivno primerjavo nam omogoča koeficient variabilnosti (KV), ki ga izračunamo tako, da standardno deviacijo delimo z aritmetično sredino opazovanega vzorca in dobljeno vrednost izrazimo v odstotkih (Adamič, 1989).

$$KV(\%) = \frac{s}{x} \cdot 100 \quad \dots(20)$$

3.4.2 Dvovzorčna analiza

Medsebojno zvezo dveh spremenljivk (x,y) preučujemo s statistično metodo korelacije in regresije, pri čemer ugotavljamo, ali obstaja povezanost med spremenljivkama in kakšne vrste je, ali pa poizkušamo na osnovi ene spremenljivke napovedati vrednost druge (Adamič, 1989).

Korelacija obe spremenljivki obravnava kot neodvisno, naključni in odvisni od napak pri merjenju. Na obe lahko delujejo biološki ali pa drugi dejavniki variabilnosti. Korelacija se razlikuje glede na smer povezanosti in govorimo o pozitivni ali pa negativni korelaciji. Lahko je velika, majhna la pa je sploh ni (Adamič, 1989).

3.4.2.1 Koeficient korelacije po Pearsonu

Pearsonov koeficient korelacije (r) je merilo linearne povezanosti dveh številskih spremenljivk, ki sta naključni, med seboj povezani, vendar ni nujno, da sta odvisni ena od druge. Koeficient je enak razmerju med kovarianco (C_{xy}) (22) in zmnožkom standardnih deviacij za obe spremenljivki x in y (s_x in s_y) (21).

$$r = \frac{C_{xy}}{s_x \cdot s_y} \quad \dots(21)$$

$$C_{xy} = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n [(x - \bar{x}) \cdot (y - \bar{y})] \quad \dots(22)$$

Koeficient korelacije po Pearsonu ima lahko vrednost med -1 (maksimalno negativna korelacija) in +1 (maksimalno pozitivna korelacija). Pozitivne vrednosti pomenijo, da vrednost ene spremenljivke narašča z vrednostjo druge, negativne pa, da vrednost ene spremenljivke raste, druge spremenljivke pa pada. Vrednost 0 pomeni, da spremenljivki nista povezani. Na osnovi koeficienta korelacije lahko sklepamo, kako močna je povezava med statističnimi enotami. Kadar je koeficient večji od 0,7, govorimo o močni povezanosti (Adamič, 1989). Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti so navedene v preglednici 7.

Preglednica 7: Mejne vrednosti za presojanje moči povezanosti spremenljivk (Seljak, 1996)

Koeficient korelacije (r)	Povezanost
od 0,00 do $\pm 0,20$	povezanosti ni
nad $\pm 0,20$ do $\pm 0,40$	šibka
nad $\pm 0,40$ do $\pm 0,70$	zmerna
nad $\pm 0,70$ do $\pm 1,00$	močna

3.5 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP.

Osnovne statistične parametre smo izračunali s postopkom MEANS, s postopkom UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve (SAS Software, 1999). Rezultati so bili analizirani po metodi najmanjših kvadratov s postopkom GLM (*General Linear Model*).

Za analizo vpliva barve vina, fizikalno-kemijske in senzorične parametre vin smo uporabili statistični model 1, v katerega smo za vsak posamezen letnik 2013 in 2014 vključili fiksni vpliv barve vina (B: bela, rdečkasta in rdeča). V statistični model 2 pa smo za vsak posamezen letnik 2013 in 2014 vključili fiksni vpliv PTP (PTP: da, ne).

Pričakovane povprečne vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane s testom LSM (*Least Squares Mean*) in primerjane pri 5 % tveganju. Pearsonovi korelacijski koeficienti med parametri vin so izračunani s postopkom CORR.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETROV VZORCEV VIN LETNIKA 2013

Preglednica 8: Rezultati fizikalno-kemijskih parametrov belih, rdečih in rdečkastih vin, letnik 2013 z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

BELO VINO	Parameter (enota)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
	Relativna gostota (/)	3345	0,9961	0,9222	1,1075	0,007	0,7
	Alkohol (vol.%)	3345	11,82	8,50	15,23	0,990	8,4
	Skupni ekstrakt (g/L)	3345	30,3	15,9	320,3	15,899	52,4
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	3345	6,44	3,50	13,10	1,077	16,7
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	3345	10,6	0,1	249,7	13,650	128,5
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	3345	19,7	8,3	70,6	3,173	16,1
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	3345	0,31	0,10	2,01	0,121	39,0
	Pepel (g/L)	1939	1,99	1,20	8,05	0,417	20,9
	Prosti SO ₂ (mg/L)	3345	34	2	94	11,080	32,7
	Skupni SO ₂ (mg/L)	1480	127	6	330	45,687	35,8
	pH	1940	3,27	2,78	6,52	0,197	6,0
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	1939	1,202	0,001	4,223	0,596	49,6
	Senzorična ocena	3345	17,1	13,5	19,2	0,721	4,2
RDEČE VINO	Parameter (enota)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
	Relativna gostota (/)	1111	0,9945	0,9912	1,0298	0,002	0,2
	Alkohol (vol.%)	1111	11,95	9,05	15,87	0,908	7,6
	Skupni ekstrakt (g/L)	1111	26,2	17,8	110,5	5,615	21,4
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	1111	7,00	3,50	11,93	1,441	20,6
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	1111	2,0	0,1	86,2	4,303	219,2
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	1111	24,2	16,8	43,7	3,133	12,9
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	1111	0,39	0,10	1,20	0,198	51,4
	Pepel (g/L)	623	2,48	1,47	3,92	0,448	18,1
	Prosti SO ₂ (mg/L)	1111	22	6	63	9,184	41,0
	Skupni SO ₂ (mg/L)	382	63	15	156	29,519	46,6
	pH	624	3,38	2,77	4,00	0,188	5,6
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	622	0,620	0,095	2,168	0,336	54,1
	Senzorična ocena	1111	16,9	14,2	18,4	0,717	4,3

"se nadaljuje"

"nadaljevanje preglednice 8. Rezultati fizikalno-kemijskih parametrov belih, rdečih in rdečkastih vin, letnik 2013 z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri"

RDEČKASTO VINO	Parameter (enota)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
	Relativna gostota (/)	315	0,9946	0,9931	0,9965	0,001	0,1
	Alkohol (vol.%)	315	9,74	8,50	12,47	0,359	3,7
	Skupni ekstrakt (g/L)	315	20,2	17,1	27,7	1,272	6,3
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	315	7,12	6,00	9,80	0,631	8,9
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	315	1,2	0,5	2,4	0,343	29,4
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	315	19,0	16,0	26,6	1,267	6,7
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	315	0,24	0,10	0,55	0,075	31,7
	Pepel (g/L)	294	1,78	1,40	2,58	0,247	13,9
	Prosti SO ₂ (mg/L)	315	22	8	36	4,277	19,4
	Skupni SO ₂ (mg/L)	294	71	16	120	22,560	31,6
	pH	294	3,16	2,90	3,46	0,098	3,1
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	294	0,948	0,368	1,840	0,267	28,1
	Senzorična ocena	315	15,8	13,7	16,6	0,288	1,8

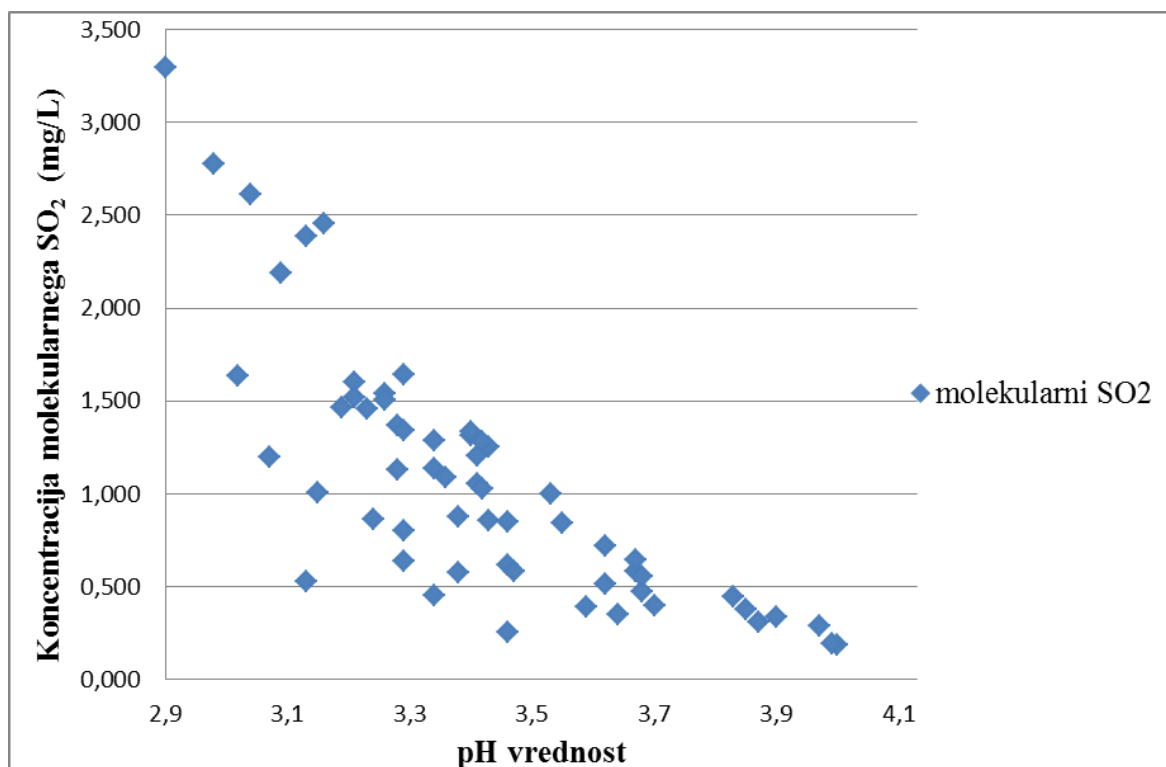
n – število obravnavanj; $\bar{x}$ – povprečna vrednost; min – minimalna vrednost; max – maksimalna vrednost; so – standardni odklon; KV (%) – koeficient variabilnost

V preglednici 8 so prikazani rezultati fizikalno-kemijskih parametrov za vina letnik 2013. Od tega je 3345 belih (70,1 %), 1111 rdečih (23,3 %) in 315 (6,6 %) rdečkastih vin.

Bela vina potrebujejo za mikrobiološko stabilnost 0,8 mg/L molekularne oblike SO₂. Iz preglednice 8 lahko vidimo, da je povprečje za bela vina 1,202 mg/L, kar je dobro, vendar pa se vrednosti molekularnega žvepla gibljejo od 0,001 do 4,223 mg/L. 450 (23,2 %) vzorcev belih vin, vsebuje premalo molekularne oblike in tako niso primerno zaščiteni. Tudi pri vzorcih rdečih vin najdemo vzorce, ki vsebujejo premajhne koncentracije molekularnega SO₂. Za rdeča vina je priporočljivo, da vsebujejo nekoliko manj kot bela in sicer 0,6 mg/L molekularnega SO₂. Od vseh 622 vzorcev, ki imajo izračunani molekularni SO₂, je 350 (56,3 %) vzorcev, ki vsebujejo manj kot 0,6 mg/L molekularnega žvepla. Tudi pri teh vzorcih je povprečje ustrezno (0,620 mg/L), vendar se vrednosti gibljejo od 0,095 do 2,168 mg/L. Za rdečkasta vina je optimalno, da za mikrobiološko stabilnost vsebujejo med 0,6 in 0,8 mg/L molekularnega SO₂. Vzorci, ki so bili v obdelavi vsebujejo od 0,368 do 1,840 mg/L molekularne oblike SO₂. Le 22 (7,5 %) vzorcev rdečkastih vin ni primerno zaščitenih.

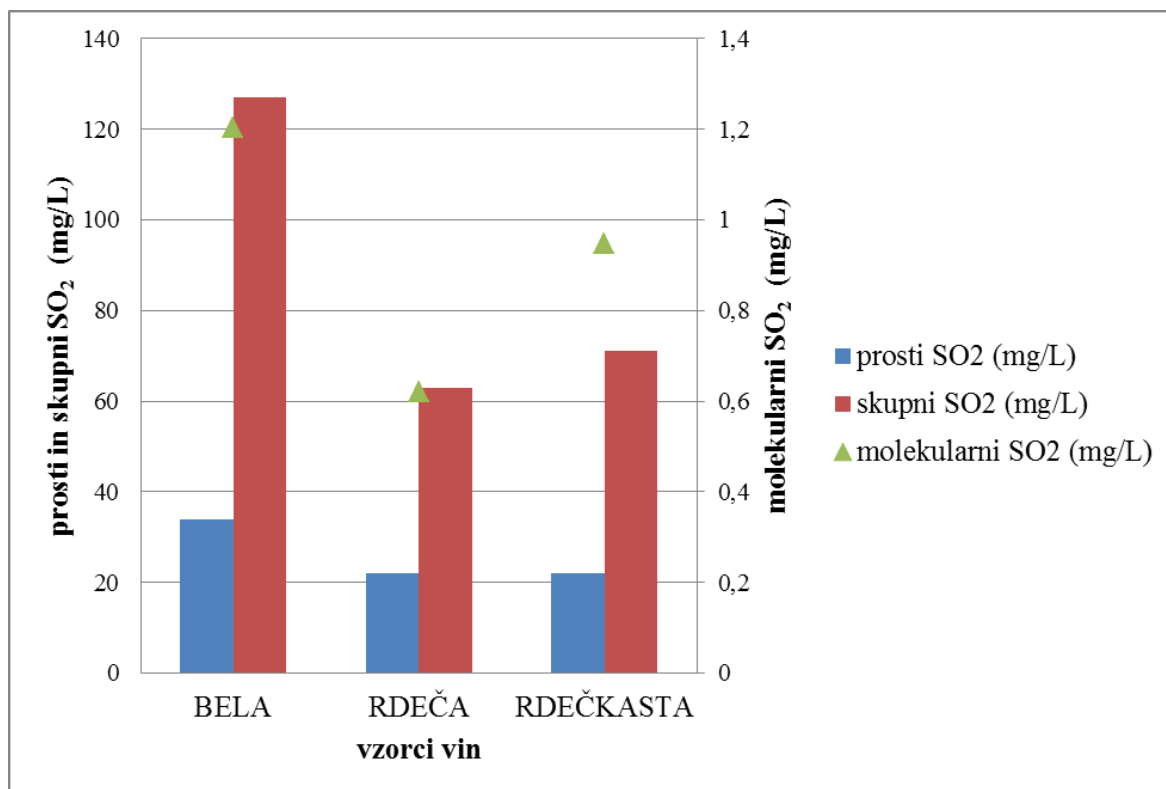
Pozorni moramo biti na to, da za vse vzorce nismo imeli podatka o pH vrednosti vzorca in tako nismo mogli izračunati koncentracije žveplovega dioksida po formuli 8. pH vrednost se določa samo pri kakovostnih vinih.

Sladka vina potrebujejo za mikrobiološko stabilnost nekoliko več molekularnega SO_2 , in sicer 1,2 g/L. Od vseh vin letnika 2013 je 70 (1,5 %) vin, ki imajo koncentracijo reducirajočih sladkorjev večjo od 45 g/L in jih uvrščamo med sladka vina. Molekularnega SO_2 , izračunanega za 62 vzorcev sladkih vin, je v povprečju 1,068 mg/L, kar pa ni zadosti. Le 24 (38,7 %) vzorcev ima koncentracijo večjo od 1,2 mg/L in so tako primerno zaščiteni. Koncentracije molekularnega SO_2 za vse vzorce sladkih vin so prikazane na sliki 8.



Slika 8: Koncentracije molekularnega SO_2 (mg/L) za vzorce sladkih vin, letnik 2013

Na sliki 9 je prikazano, da imajo bela vina večje povprečne koncentracije prostega (34 mg/L) in skupnega SO_2 (127 mg/L) kot rdeča in rdečkasta vina, ki imajo enako povprečno koncentracijo prostega SO_2 (22 mg/L), koncentracija skupnega SO_2 pa je pri rdečkastih vinih (71 mg/L) večja kot pri rdečih (63 mg/L).



Slika 9: Povprečna koncentracija prostega, skupnega in molekularnega SO₂ v belih, rdečih in rdečkastih vzorcih vin (letnik 2013)

Rdeča vina imajo boljšo zaščito kot pa bela in rose vina, saj vsebujejo snovi v grozdni kožici in pečkih, ki imajo antioksidativne lastnosti. Te snovi so predvsem fenolne spojine (Van Leeuw in sod., 2014). Fenolne spojine vinu dajejo barvo, vplivajo na okus in vonj vina, so osnova za staranje vina, delujejo kot antioksidanti in konzervansi, znano pa je tudi protimikrobno delovanje (Bavčar, 2009).

Ker rdeča vina vsebujejo več fenolnih spojin kot bela vina, posledično potrebujejo tudi manj žveplovega dioksida za zaščito pred oksidacijo.

Koncentracija fenolnih spojin je odvisna od koncentracije fenolov v grozdni kožici in soku ter v pečkih, njihova vsebnost pa je močno odvisna tudi od postopkov vinarstva, sestave prsti, geografske lege in vremenskih pogojev (Paixão in sod., 2007; Van Leeuw in sod., 2014). Fenolne spojine v vinu lahko razdelimo v dve skupini: v flavonoide in neflavonoide. Med prve uvrščamo flavan-3-ole (katehin, kondenzirani tanini), flavonole (kvercetin) in antociane. Med neflavonoide pa hidroksibenzojske kisline (galna kislina), hidroksicimetne kisline in stilbene (resveratrol) (Bavčar, 2009; Yang in sod., 2009). Največ fenolov vsebujejo vina Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc in Modri Pinot (Van Leeuw in sod., 2014). Koncentracija fenolnih spojin v vinu ni samo sortno pogojena. Na obseg ekstrakcije fenolnih spojin vplivajo enološki postopki, maceracija, temperatura, trajanje postopka, pH ter koncentraciji etanola in žveplovega dioksida (Bavčar, 2009).

Rdečkasta vina sestavljajo določen delež belih in rdečih sort grozdja, njihova vsebnost pa je natančno predpisana. Prav zaradi sortne sestave (bele in rdeče sorte) potrebujejo rdečkasta vina več žveplovega dioksida kot rdeča vina in manj kot bela.

Preglednica 9: Rezultati fizikalno-kemijskih parametrov za vina letnik 2013 z oznako PTP in vina brez oznake PTP, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

	Parameter (enota)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
	Parameter (enota)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
PTP DA	Relativna gostota	486	0,9944	0,9906	0,9983	0,001	0,1
	Alkohol (vol.%)	486	10,46	8,50	13,00	1,029	9,8
	Skupni ekstrakt (g/L)	486	21,7	17,2	34,6	2,985	13,7
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	486	7,23	5,50	11,00	0,904	12,5
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	486	1,3	0,1	9,4	0,785	60,4
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	486	20,4	16,0	33,5	2,962	14,5
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	486	0,31	0,10	0,90	0,161	52,6
	Pepel (g/L)	486	1,94	1,30	3,89	0,380	19,5
	Prosti SO ₂ (mg/L)	486	22	8	47	5,923	27,3
	Skupni SO ₂ (mg/L)	486	69	15	172	29,444	42,9
	pH	486	3,20	2,90	3,74	0,134	4,2
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	486	0,869	0,140	2,054	0,347	40,0
	Senzorična ocena	486	16,3	15,0	18,3	0,728	4,5
PTP NE	Parameter (enota)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
	Relativna gostota (/)	4285	0,9958	0,9222	1,1075	0,062	0,6
	Alkohol (vol.%)	4285	11,85	8,50	15,87	0,990	8,4
	Skupni ekstrakt (g/L)	4285	29	16	320	14,401	48,9
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	4285	6,55	3,50	13,10	1,189	18,2
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	4285	8,7	0,1	249,7	12,758	146,0
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	4285	20,7	8,3	7,1	3,713	17,9
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	4285	0,32	0,10	2,01	0,144	44,3
	Pepel (g/L)	2370	2,10	1,20	8,05	0,478	22,7
	Prosti SO ₂ (mg/L)	4285	31	2	95	11,725	37,3
	Skupni SO ₂ (mg/L)	1670	120	6	330	48,162	40,1
	pH	2372	3,29	2,77	6,52	0,204	6,2
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	2369	1,086	0,001	4,223	0,604	55,6
	Senzorična ocena	4285	17,0	12,0	19,2	0,740	4,3

n – število obravnavanj; $\bar{x}$ – povprečna vrednost; min – minimalna vrednost; max – maksimalna vrednost; so – standardni odklon; KV (%) – koeficient variabilnosti

Od vseh vin letnik 2013 je med vsemi 4771 vzorci le 486 (10,2 %) vin, ki imajo oznako PTP. Iz preglednice 9 lahko vidimo, da imajo vina PTP manjšo koncentracijo molekularnega, skupnega ter prostega SO₂, kot ostala vina, ki nimajo oznake PTP. Povprečna koncentracija molekularnega SO₂ je za PTP vina pravilna, vendar pa se

vrednosti gibljejo od 0,140 pa vse do 2,054 mg/L. Kar 109 (22,4 %) vin PTP ima koncentracijo molekularnega SO₂ manjšo od 0,6 mg/L in tako niso primerno zaščiteni. Tudi pri drugih fizikalno-kemijskih parametrih imajo vina z oznako PTP manjše povprečne koncentracije od ostalih ne-PTP vin.

Od vseh PTP vin si dovoljene koncentracije prostega in skupnega SO₂ sledijo v naslednjem vrstnem redu: Teran PTP < Cviček PTP < Metliška črnina PTP < Belokranjec PTP in rdeči Bizeljčan PTP < beli Bizeljčan PTP. Njihove dovoljene koncentracije so prikazane v preglednici 10. Povprečne koncentracije prostega, skupnega in molekularnega SO₂ za PTP vina, letnik 2013 so grafično prikazane na sliki 10.

Preglednica 10: Največje dovoljene koncentracije prostega in skupnega SO₂ za vina PTP, ki jih predpisujejo veljavni Pravilniki*

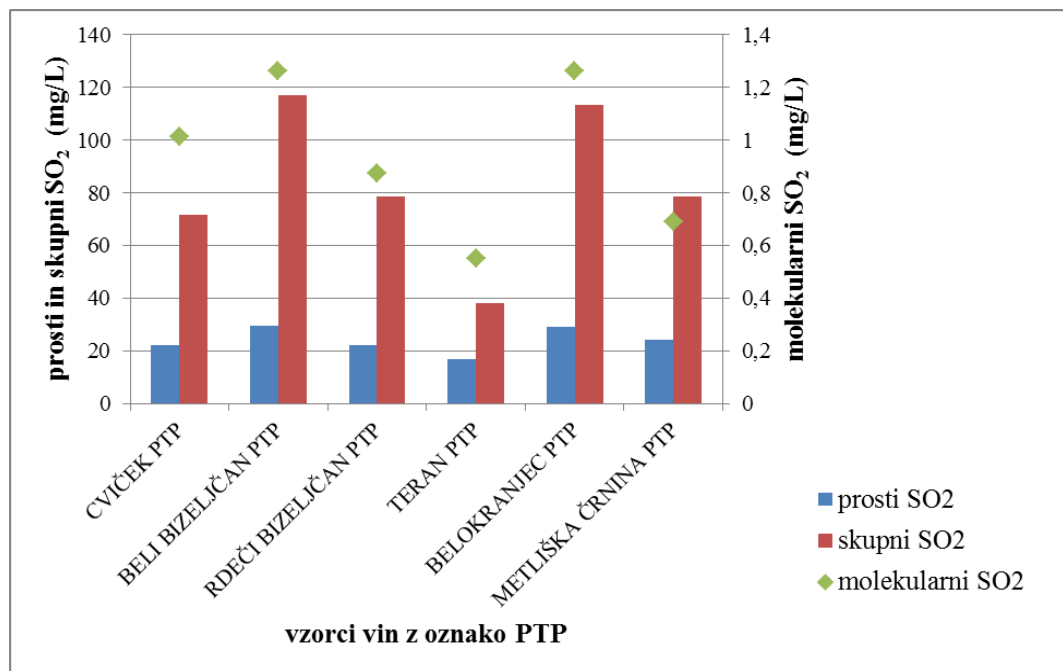
	Koncentracija prostega SO ₂ (mg/L)	Koncentracija skupnega SO ₂ (mg/L)
Cviček PTP**	25	120
Teran PTP***	28	100
Belokranjec PTP*	30	160
Beli Bizeljčan PTP****	30	180
Rdeči Bizeljčan PTP****	ni podatka	160
Metliška črnina PTP*	25	130

*Pravilnik o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – Metliška črnina in Belokranjec (2008)

**Pravilnik o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – cviček (2000)

***Pravilnik o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – teran (2008)

****Pravilnik o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – Bizeljčan (23. 3. 2009)



Slika 10: Povprečne koncentracije prostega, skupnega in molekularnega SO₂ za vina z oznako PTP, letnik 2013

Preglednica 11: Razlike fizikalno-kemijskih parametrov med belimi, rdečimi in rdečkastimi vini, letnik 2013

	BARVA	Bela	Rdečkasta	Rdeča	Z.
	ŠTEVILO VZORCEV	3345	315	1111	
FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI	Relativna gostota (/)	0,9961 ± 0,0001 A	0,9946 ± 0,0003 B	0,9945 ± 0,0002 B	***
	Alkohol (vol.%)	11,82 ± 0,05 B	9,74 ± 0,05 C	11,95 ± 0,02 A	***
	Skupni ekstrakt (g/L)	30,3 ± 0,2 A	20,2 ± 0,8 C	26,2 ± 0,4 B	***
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	6,44 ± 0,02 B	7,12 ± 0,06 A	7,00 ± 0,03 A	***
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	10,6 ± 0,5 A	1,2 ± 0,2 B	2,0 ± 0,7 B	***
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	19,7 ± 0,1 B	19,0 ± 0,2 C	24,3 ± 0,1 A	***
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	0,31 ± 0,00 B	0,24 ± 0,01 C	0,39 ± 0,00 A	***
	Pepel (g/L)	1,99 ± 0,01 B	1,78 ± 0,02 C	2,48 ± 0,02 A	***
	Prosti SO ₂ (mg/L)	34 ± 0 A	22 ± 1 B	22 ± 0 B	***
	Skupni SO ₂ (mg/L)	127 ± 1 A	71 ± 2 B	63 ± 2 C	***
	pH	3,27 ± 0,00 B	3,16 ± 0,01 C	3,38 ± 0,01 A	***
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	1,20 ± 0,01 A	0,95 ± 0,03 B	0,62 ± 0,02 C	***
	Senzorična ocena	17,08 ± 0,01 A	15,82 ± 0,04 C	16,87 ± 0,02 B	***

Z. – značilnost: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (A, B, C) znotraj vrstice se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik med skupinami)

Iz preglednice 11 lahko vidimo, da so med belimi, rdečimi in rdečkastimi vzorci vin statistično zelo visoke značilne razlike. Največ molekularnega SO₂ imajo bela vina, sledijo rdečkasta, najmanj pa rdeča vina, kar je bilo tudi za pričakovati. Da so bela vina primerno zaščitena potrebujejo 0,8 mg/L molekularnega SO₂, rdeča 0,6 mg/L, rdečkasta vina pa nekje vmes med 0,6 in 0,8 mg/L. Rdeča vina potrebujejo manj molekularne oblike SO₂ kot bela saj so manj občutljiva na oksidacijo in v večini primerov je v rdečih vinih mlečnokislinska fermentacija popolnoma zaključena, tako, da je ni potrebno preprečevati (Henderson, 2014).

Velja, da vina z višjo alkoholno stopnjo potrebujejo manj žveplovega dioksida. To lahko glede na dobljene rezultate potrdimo, saj imajo rdeča vina največjo povprečno koncentracijo alkohola (11,95 vol.%) in najmanj molekularnega ter skupnega SO₂. Iz preglednice 11 lahko tudi vidimo, da so bila daleč najslabše ocenjena rdečkasta vina, sledijo rdeča, najbolj pa so bila ocenjena bela vina. Na splošno velja, da imajo rdeča vina višjo pH vrednost kot bela vina. Iz preglednice lahko vidimo, da imajo vzorci rdečih vin najvišjo vrednost pH, sledijo vzorci belih vin, najnižji pH pa imajo rdečkasta vina.

Preglednica 12: Razlike fizikalno-kemijskih parametrov med vini z oznako PTP in vini brez oznake PTP, letnik 2013

	PTP	DA	NE	Z.
	ŠTEVILO VZORCEV	486	4285	
FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI	Relativna gostota (/)	0,9944 ± 0,0001 B	0,9958 ± 0,0003 A	***
	Alkohol (vol.%)	10,46 ± 0,02 B	11,85 ± 0,03 A	***
	Skupni ekstrakt (g/L)	21,7 ± 0,2 B	29,5 ± 0,6 A	***
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	7,23 ± 0,02 A	6,55 ± 0,05 B	***
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	1,3 ± 0,3 B	8,7 ± 0,2 A	***
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	20,4 ± 0,1 A	20,7 ± 0,2 A	nz
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	0,31 ± 0,00 B	0,32 ± 0,01 A	**
	Pepel (g/L)	1,94 ± 0,01 B	2,10 ± 0,02 A	***
	Prosti SO ₂ (mg/L)	22 ± 0 B	31 ± 1 A	***
	Skupni SO ₂ (mg/L)	69 ± 1 B	120 ± 2 A	***
	pH	3,20 ± 0,00 B	3,29 ± 0,01 A	***
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	0,87 ± 0,01 B	1,09 ± 0,03 A	***
	Senzorična ocena	16,30 ± 0,01 B	17,02 ± 0,03 A	***

Z. – značilnost: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; nz $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv. srednje vrednosti z različno črko (A, B) znotraj vrstice se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik med skupinami)

Iz preglednice 12 lahko vidimo, da se gostota, alkohol, skupni ekstrakt, skupne kisline, reducirajoči sladkorji, pepel, prosti SO₂, skupni SO₂, pH, molekularni SO₂ in senzorična ocena statistično razlikujejo med vzorci PPT in ne-PPT, vina z oznako PTP imajo drugačno koncentracijo, kot vina, ki nimajo oznake PTP. Vina z oznako PTP imajo večjo samo povprečno koncentracijo skupnih kislin (7,23 g/L), ostale parametre pa imajo večje vina brez oznake PTP.

Statistično neznačilen vpliv oznake PPT lahko vidimo pri vsebnosti sladkorja prostega ekstrakta, saj imajo vina PTP 20,4 g/L SPE, vina ki pa nimajo oznake PTP pa 20,7 g/L SPE. Statistično visoko značilen omenjen vpliv je tudi pri vsebnosti hlapnih kislin. Vina z oznako PTP imajo nekoliko manjšo koncentracijo hlapnih kislin kot vina, ki nimajo oznake PTP.

4.2 REZULTATI FIZIKALNO-KEMIJSKIH PARAMETROV VZORCEV VIN LETNIKA 2014

Preglednica 13: Rezultati fizikalno-kemijskih parametrov belih, rdečih in rdečkastih vin, letnika 2014 z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

BELOVINO	Parameter (enota)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
	Relativna gostota (/)	854	0,9973	0,9905	1,0338	0,005	0,5
	Alkohol (vol.%)	854	11,14	8,50	13,69	0,934	8,4
	Skupni ekstrakt (g/L)	854	31,2	18,7	132,8	10,382	33,3
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	854	7,44	4,14	10,98	0,993	13,3
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	854	9,3	0,3	94,5	9,277	100,3
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	854	21,9	13,3	38,3	2,513	11,5
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	854	0,28	0,10	0,92	0,113	40,4
	Pepel (g/L)	415	2,60	1,41	4,47	0,474	18,2
	Prosti SO ₂ (mg/L)	854	33	4	69	11,286	34,2
	Skupni SO ₂ (mg/L)	312	133	36	260	43,349	32,5
	pH	419	3,38	2,97	3,89	0,152	4,5
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	419	0,891	0,216	2,789	0,426	47,8
	Senzorična ocena	854	16,7	14,9	18,5	0,491	2,9
RDEČE VINO	Parameter (enota)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
	Relativna gostota (/)	251	0,9960	0,9911	1,0306	0,003	0,3
	Alkohol (vol.%)	251	11,34	8,50	15,20	0,901	7,9
	Skupni ekstrakt (g/L)	251	28,4	20,2	114,4	6,762	23,8
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	251	7,78	4,41	12,60	1,541	19,8
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	251	2,4	0,3	80,9	5,530	228,6
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	251	26,0	18,1	37,4	3,562	13,7
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	251	0,35	0,10	1,20	0,165	47,8
	Pepel (g/L)	129	2,90	1,70	4,75	0,588	20,2
	Prosti SO ₂ (mg/L)	251	23	2	72	9,869	43,3
	Skupni SO ₂ (mg/L)	86	65	17	150	29,776	45,9
	pH	129	3,45	3,07	3,90	0,190	5,5
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	129	0,532	0,071	1,481	0,281	52,8
	Senzorična ocena	251	16,6	14,1	18,5	0,577	3,5

"se nadaljuje"

"nadaljevanje preglednice 13. Rezultati fizikalno-kemijskih parametrov belih, rdečih in rdečkastih vin, letnik 2014 z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri"

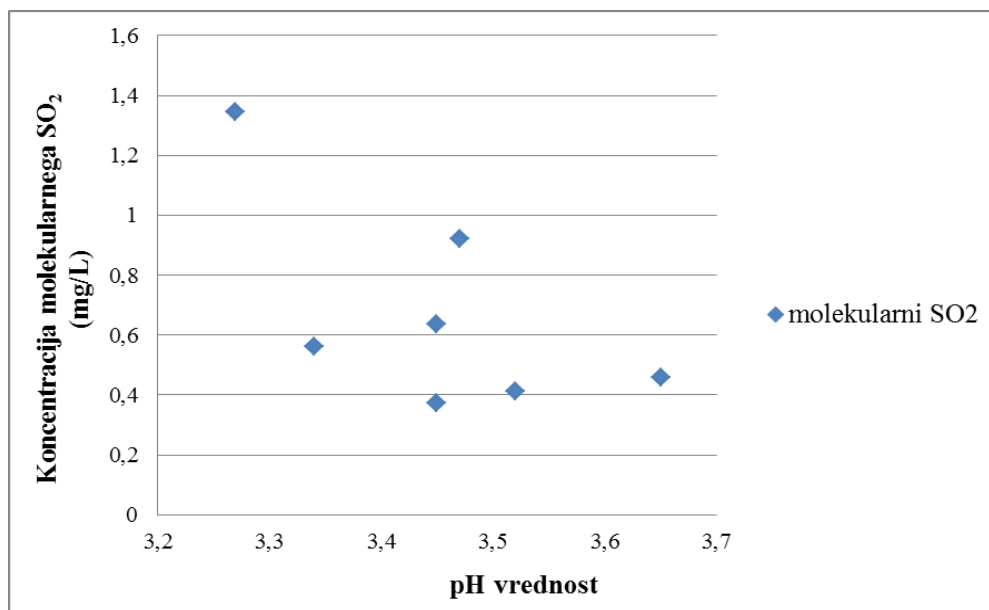
RDEČKASTO VINO	Parameter (enota)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
	Relativna gostota (/)	77	0,996	0,9945	0,9999	0,001	0,1
	Alkohol (vol.%)	77	9,53	8,63	11,15	0,385	4,0
	Skupni ekstrakt (g/L)	77	23,1	20,2	38,2	2,279	9,9
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	77	7,71	6,00	9,15	0,688	8,9
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	77	1,3	0,1	15,9	1,725	131,5
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	77	21,8	19,2	25,3	1,350	6,2
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	77	0,26	0,10	0,36	0,049	19,0
	Pepel (g/L)	74	2,45	1,72	3,29	0,328	13,4
	Prosti SO ₂ (mg/L)	77	22	7	25	3,516	16,0
	Skupni SO ₂ (mg/L)	74	75	27	120	23,420	31,3
	pH	74	3,31	3,09	3,58	0,104	3,1
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	74	0,678	0,282	1,142	0,171	25,2
	Senzorična ocena	77	15,9	15,2	17,5	0,305	1,9

n – število obravnavanj; $\bar{x}$ – povprečna vrednost; min – minimalna vrednost; max – maksimalna vrednost; so – standardni odklon; KV (%) – koeficient variabilnost

V preglednici 13 so prikazani rezultati fizikalno-kemijskih parametrov za vina letnika 2014. Od tega je 854 (72,3 %) belih, 251 (21,2 %) rdečih in 77 (6,5 %) rdečkastih vin.

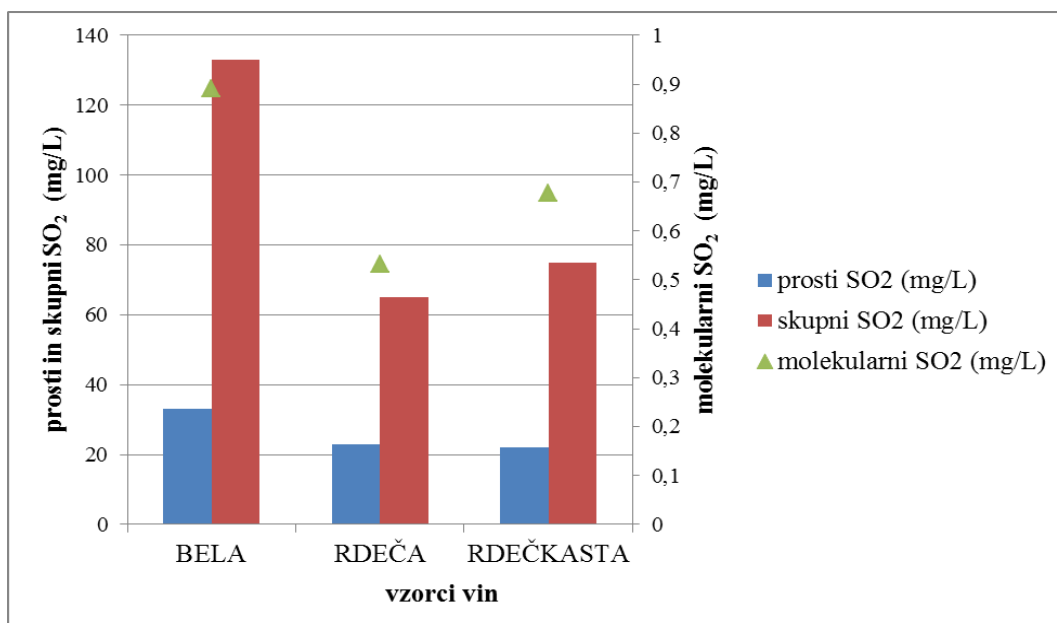
Pri belih vinih imamo izračunan molekularni žveplov dioksid le za 419 vzorcev, pri katerih je povprečje molekularne oblike SO₂ ustrezno in so vina primerno zaščiteni, vendar pa se vrednost gibljejo vse od 0,216 do 2,789 mg/L; kar polovica vzorcev (50,1 %) ima molekularni SO₂ pod 0,8 mg/L in niso primerno zaščiteni. Tudi pri rdečih vinih najdemo vzorce vin, ki imajo premajhne koncentracije te protimikrobne oblike žveplovega dioksida. Od vseh 129 vzorcev rdečih vin, kateri imajo izračunani molekularni žveplov dioksid, je kar 90 (69,8 %) vzorcev, ki imajo koncentracijo molekularnega SO₂ pod 0,6 mg/L. Da ima večina premajhno koncentracijo molekularnega SO₂ lahko vidimo že iz povprečja, ki znaša 0,532 mg/L molekularnega žveplovega dioksida. Za rdečkasta vina je optimalno, da za mikrobiološko stabilnost vsebujejo med 0,6 in 0,8 mg/L molekularnega SO₂. Med vzorci, ki so bili v obdelavi, je od 74 vzorcev rdečkastih vin le 27 (36,5 %) vin, pri katerih so vrednosti molekularnega žveplovega dioksida med 0,6 in 0,8 mg/L. Vzorci, ki so bili v obdelavi, vsebujejo od 0,282 do 1,142 mg/L molekularne oblike SO₂. Kar 28 (37,8 %) vzorcev vsebuje premajhne koncentracije molekularnega SO₂ (< 0,6 mg/L), 19 (25,7 %) vzorcev pa je takih, ki vsebujejo več kot 0,8 mg/L molekularnega SO₂.

Tudi med vini letnika 2014, najdemo vzorce, ki vsebujejo več kot 45 g/L reducirajočih sladkorjev in jih tako uvrščamo med sladka vina. Koncentracije molekularne oblike SO₂ so grafično prikazane na sliki 11, na kateri lahko vidimo, da je le en vzorec primerno zaščiten in vsebuje več kot 1,2 mg/L molekularnega SO₂. Sladkih vin letnika 2014 je le 7, saj sladka vina potrebujejo dlje časa za zorenje.



Slika 11: Koncentracije molekularnega SO₂ (mg/L) za vzorce sladkih vin, letnik 2014

Bela vina vsebujejo večje povprečne koncentracije prostega (33 mg/L) in skupnega SO₂ (133 mg/L) kot pa rdeča in rdečkasta vina. Povprečna koncentracija prostega SO₂ pri rdečih vinih je 23 mg/L, pri rdečkastih pa 22 mg/L. Vzorci rdečkastih vin vsebujejo več skupnega SO₂ (75 mg/L), rdeča vina pa najmanj (65 mg/L). Tudi za letnik 2014 je značilno, da rdeča vina vsebujejo najmanj skupnega SO₂. Predvidevamo, da zaradi vsebnosti antioksidativnih snovi. Povprečne koncentracije vseh treh oblik žveplovega dioksida so prikazane grafično na sliki 12.



Slika 12: Povprečna koncentracija prostega, skupnega in molekularnega SO₂ v belih, rdečih in rdečkastih vzorcih vin (letnik 2014)

Preglednica 14: Rezultati fizikalno-kemijskih parametrov za vina letnika 2014 z oznako PTP in vina brez oznake PTP, z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

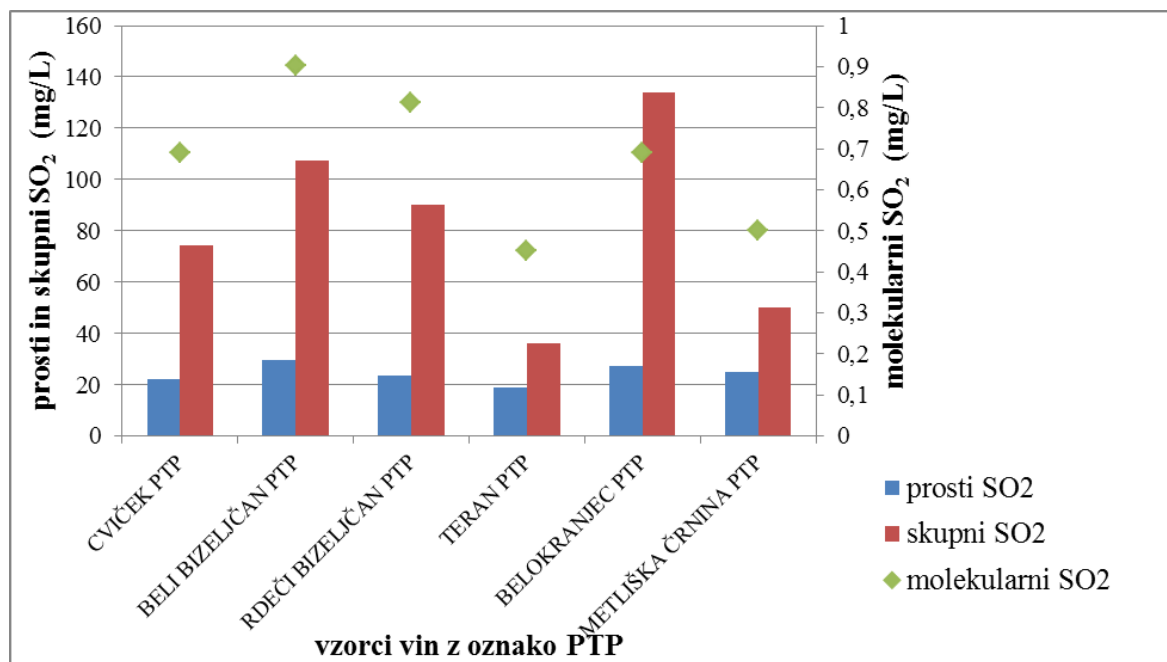
	Parameter (enota)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
PTP DA	Relativna gostota (/)	123	0,9956	0,9926	0,9989	0,001	0,1
	Alkohol (vol.%)	123	10,14	8,63	12,03	0,880	8,7
	Skupni ekstrakt (g/L)	123	23,9	19,9	36,1	2,915	12,2
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	123	7,65	6,00	11,00	0,832	10,9
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	123	1,4	0,2	15,9	1,541	111,8
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	123	22,5	15,0	35,0	2,915	13,0
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	123	0,31	0,10	0,81	0,134	43,3
	Pepel (g/L)	123	2,54	1,78	4,10	0,450	17,7
	Prosti SO ₂ (mg/L)	123	23	11	44	5,309	23,5
	Skupni SO ₂ (mg/L)	123	74	17	186	32,979	44,5
	pH	123	3,34	3,07	3,78	0,132	4,0
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	123	0,655	0,184	1,508	0,243	37,0
	Senzorična ocena	123	16,2	15,2	17,4	0,497	3,1
PTP NE	Parameter (enota)	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
	Relativna gostota (/)	1059	0,9971	0,9905	1,0338	0,004	0,4
	Alkohol (vol.%)	1059	11,19	8,80	15,20	0,946	8,5
	Skupni ekstrakt (g/L)	1059	30,8	18,7	132,8	9,868	32,1
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	1059	7,52	4,14	12,60	1,154	15,4
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	1059	8,0	0,1	94,5	9,130	114,6
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	1059	22,8	13,3	38,3	3,208	14,1
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	1059	0,29	0,10	1,20	0,125	43,2
	Pepel (g/L)	495	2,68	1,41	4,75	0,514	19,2
	Prosti SO ₂ (mg/L)	1059	31	2	72	11,838	38,2
	Skupni SO ₂ (mg/L)	349	125	29	260	46,930	37,6
	pH	499	3,39	2,97	3,90	0,166	4,9
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	499	0,825	0,071	2,789	0,429	52,1
	Senzorična ocena	1059	16,7	14,1	18,5	0,524	3,1

n – število obravnavanj; $\bar{x}$ – povprečna vrednost; min – minimalna vrednost; max – maksimalna vrednost; so – standardni odklon; KV (%) – koeficient variabilnost

Od vseh vin letnika 2014 je med vsemi 1182 vzorci le 123 (10,4 %) vin, ki imajo oznako PTP. Tudi vina PTP letnika 2014 imajo prav tako kot vina PTP letnik 2013 manjše koncentracije molekularnega, prostega in skupnega SO₂ kot ostala vina, ki nimajo oznake PTP. Povprečna koncentracija molekularnega SO₂ (0,655 mg/L) je za PTP vina ustrezna, vendar pa se vrednosti gibljejo med 0,184 in 1,508 mg/L. Od vseh 123 vzorcev je skoraj polovica vin (46,3 %), ki niso primerno zaščiteni in imajo koncentracije molekularnega SO₂ manjše od 0,6 mg/L.

Tudi pri drugih fizikalno-kemijskih parametrih imajo vina z oznako PTP manjše povprečne koncentracije parametrov od ostalih ne-PTP vin, večjo imajo le koncentracijo skupnih kislin (7,65 g vinske kisline/L) in koncentracijo hlapnih kislin (0,31 g očetne kisline/L). Vina z oznako PTP so bila tudi slabše ocenjena, kot vsa preostala ne-PTP vina.

Povprečne koncentracije prostega, skupnega in molekularnega SO₂ za PTP vina, letnik 2014, so grafično prikazane na sliki 13.



Slika 13: Povprečne koncentracije prostega, skupnega in molekularnega SO₂ za vina z oznako PTP, letnik 2014

Preglednica 15: Razlike fizikalno-kemijskih parametrov med belimi, rdečimi in rdečkastimi vini, letnik 2014

	BARVA	Bela	Rdečkasta	Rdeča	Z.
	ŠTEVILO VZORCEV	854	77	251	
FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI	Relativna gostota (/)	0,9973 ± 0,0001 A	0,9960 ± 0,0005 B	0,9960 ± 0,0003 B	***
	Alkohol (vol.%)	11,14 ± 0,03 B	9,53 ± 0,10 C	11,34 ± 0,06 A	***
	Skupni ekstrakt (g/L)	31,2 ± 0,3 A	23,1 ± 1,1 C	28,4 ± 0,6 B	***
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	7,44 ± 0,04 B	7,71 ± 0,13 A	7,78 ± 0,07 A	***
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	9,3 ± 0,8 A	1,3 ± 0,3 B	2,4 ± 0,9 B	***
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	21,9 ± 0,1 B	21,8 ± 0,3 B	26,0 ± 0,2 A	***
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	0,28 ± 0,00 B	0,26 ± 0,01 a	0,35 ± 0,01 A	***

"nadaljevanje preglednice 15. Razlike fizikalno-kemijskih parametrov med belimi, rdečimi in rdečkastimi vini, letnik 2014"

	BARVA	Bela	Rdečkasta	Rdeča	Z.
	ŠTEVILO VZORCEV	854	77	251	
FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI	Pepel (g/L)	2,60 ± 0,02 B	2,45 ± 0,06 C	2,90 ± 0,04 A	***
	Prosti SO ₂ (mg/L)	33 ± 0 A	22 ± 1 B	23 ± 1 B	***
	Skupni SO ₂ (mg/L)	133 ± 2 A	75 ± 4 B	65 ± 4 B	***
	pH	3,38 ± 0,01 B	3,31 ± 0,02 C	3,45 ± 0,01 A	***
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	0,89 ± 0,02 A	0,68 ± 0,04 B	0,53 ± 0,03 C	***
	Senzorična ocena	16,71 ± 0,02 A	15,87 ± 0,06 C	16,60 ± 0,03 B	***

Z. – značilnost: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (A, B, C) znotraj vrstice se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik med skupinami)

Iz preglednice 15 lahko vidimo, da so tudi pri letniku 2014 med belimi, rdečimi in rdečkastimi vzorci vin statistično značilne razlike. Največ molekularnega SO₂ imajo bela vina, sledijo rdečkasta, najmanj pa rdeča vina, kar je bilo tudi za pričakovati. Tudi pri letniku 2014 lahko potrdimo trditev, da vina z višjo alkoholno stopnjo potrebujejo manj žveplovega dioksida, saj imajo rdeča vina najvišjo povprečno alkoholno stopnjo (11,34 vol.%) in najmanj molekularnega ter skupnega SO₂. Iz preglednice 15 lahko tudi vidimo, da so bila najslabše ocenjena rdečkasta vina, sledijo rdeča, najboljše pa so bila senzorično ocenjena bela vina. Tudi pri letniku 2014 imajo rdeča vina najvišji pH (3,45), sledijo vzorci belih vin (3,38), najnižji pH pa imajo rdečkasta vina (3,31).

Preglednica 16: Razlike fizikalno-kemijskih parametrov med vini z oznako PTP in vini brez oznake PTP, letnik 2014

	PTP	DA	NE	Z.
	ŠTEVILO VZORCEV	123	1059	
FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI	Relativna gostota (/)	0,9956 ± 0,0004 B	0,9971 ± 0,0001 A	***
	Alkohol (vol.%)	10,14 ± 0,08 B	11,19 ± 0,03 A	***
	Skupni ekstrakt (g/L)	23,9 ± 0,8 B	30,8 ± 0,3 A	***
	Skupne kisline (g vinske kisline/L)	7,65 ± 0,10 A	7,52 ± 0,03 A	nz
	Reducirajoči sladkorji (g/L)	1,4 ± 0,5 B	8,0 ± 0,3 A	***
	Sladkorja prosti ekstrakt (g/L)	22,5 ± 0,3 A	22,8 ± 0,1 A	nz
	Hlapne kisline (g očetne kisline/L)	0,31 ± 0,01 A	0,29 ± 0,00 A	nz
	Pepel (g/L)	2,54 ± 0,05 B	2,68 ± 0,02 A	*
	Prosti SO ₂ (mg/L)	23 ± 1 B	31 ± 0 A	***
	Skupni SO ₂ (mg/L)	74 ± 4 B	125 ± 2 A	***
	pH	3,34 ± 0,01 B	3,39 ± 0,01 A	**
	Molekularni SO ₂ (mg/L)	0,65 ± 0,04 B	0,82 ± 0,02 A	***
	Senzorična ocena	16,20 ± 0,05 B	16,68 ± 0,02 A	***

Z. – značilnost: *** $p \leq 0,001$ statistično zelo visoko značilen vpliv; ** $p \leq 0,01$ statistično visoko značilen vpliv; * $p \leq 0,05$ statistično značilen vpliv; nz $p > 0,05$ statistično neznačilen vpliv; srednje vrednosti z različno črko (A, B) znotraj vrstice se statistično značilno razlikujejo ($p < 0,05$; značilnost razlik med skupinami)

Iz preglednice 16 lahko vidimo, da se relativna gostota, alkohol, skupni ekstrakt, reducirajoči sladkorji, prosti SO₂, skupni SO₂, molekularni SO₂ in senzorična ocena statistično razlikujejo med vini z oznako PTP in vini brez oznake PTP. Vina z oznako PTP imajo nekoliko večjo samo povprečno koncentracijo skupnih kislin (7,65 g/L) in koncentracijo hlapnih kislin (0,31 g/L), vendar so med PTP vini in ne-PTP vini razlike neznačilne. Statistično neznačilen vpliv oznake PTP lahko vidimo tudi pri vsebnosti sladkorja prostega ekstrakta, saj imajo vina PTP 22,5 g/L SPE, ne-PTP vina pa 22,8 g/L SPE. Statistično visok značilen vpliv oznake PTP je pri vrednosti pH, pri vsebnosti pepela pa statistično značilen. PTP vina vsebujejo manj pepela (2,54 g/L) kot pa ne-PTP vina (2,68 g/L).

Preglednica 17: Rezultati bivariatne analize primerjave povezanosti fizikalno-kemijskih parametrov

Število vzorcev = 6980	Alkohol	Skupni ekstrakt	Skupne kisline	Reducirajoči sladkorji	Sladkorja prosti ekstrakt	Hlapne kisline	Pepel	Prosti SO ₂	Skupni SO ₂	pH	Molekularni SO ₂	Senzorična ocena
Relativna gostota	-0,30***	0,97***	0,18***	0,96***	0,63***	0,32***	0,34***	0,12***	0,37***	0,09***	0,05***	0,20***
Alkohol	1	-0,15***	-0,42***	-0,18***	0,03*	0,26***	0,19***	-0,10***	-0,07***	0,37***	-0,25***	0,30***
Skupni ekstrakt		1	0,11***	0,98***	0,67***	0,38***	0,38***	0,11***	0,37***	0,15***	0,01	0,26***
Skupne kisline			1	0,06***	0,28***	-0,08***	-0,05***	-0,05***	-0,14***	-0,48***	0,27***	-0,28**
Reducirajoči sladkorji				1	0,50***	0,30***	0,27***	0,18***	0,41***	0,08***	0,08***	0,27***
Sladkorja prosti ekstrakt					1	0,48***	0,65***	-0,16***	0,11***	0,34***	-0,26***	0,14***
Hlapne kisline						1	0,45***	-0,16***	0,04*	0,41***	-0,30***	0,14***
Pepel							1	-0,12***	0,10***	0,67***	-0,51***	0,14***
Prosti SO₂								1	0,55***	-0,11***	0,70***	0,12***
Skupni SO₂									1	-0,02	0,38***	0,25***
pH										1	-0,68***	0,20***
Molekularni SO₂											1	-0,02
Senzorična ocena												1

*** korelacija je značilna pri 0,001 stopnji zaupanja

** korelacija je značilna pri 0,05 stopnji zaupanja

V preglednici 17 lahko vidimo kateri fizikalno-kemijski parametri so med seboj povezani.

V močni korelaciji so naslednji parametri:

- relativna gostota z vsebnostjo skupnega ekstrakta (pozitivna) in z vsebnostjo reducirajočih sladkorjev (pozitivna);
- koncentracija skupnega ekstrakta z vsebnostjo reducirajočih sladkorjev (pozitivna),
- koncentracija prostega žveplovega dioksida s koncentracijo molekularne oblike žveplovega dioksida (pozitivna).

Močne korelacije smo pričakovali, saj je znano, da so ti fizikalno-kemijski parametri med seboj v povezavi. Pozitivna vrednost pomeni, da ena vrednost narašča z drugo vrednostjo. Z ozirom na žveplov dioksid lahko vidimo, da koncentracija molekularne oblike SO_2 linearno narašča s koncentracijo prostega SO_2 .

Med vsemi fizikalno-kemijskimi parametri je kar nekaj parametrov, ki so med seboj v zmerni korelaciji:

- relativna gostota z vsebnostjo skupnega prostega ekstrakta (pozitivna). Skupni prosti ekstrakt izračunamo po enačbi, kjer od skupnega ekstrakta odštejemo koncentracijo reducirajočih sladkorjev, koncentracijo skupnega ekstrakta pa izračunamo iz relativne gostote vina in relativne gostote destilata z uporabo Tabariéjevega obrazca in z uporabo tabel;
- vsebnost alkohola s koncentracijo skupnih kislin (negativna). Med dozorevanjem grozdja koncentracija reducirajočih sladkorjev narašča, koncentracija skupnih kislin pa se zmanjšuje. Večja kot je koncentracija reducirajočih sladkorjev, bolj so vina alkoholna bogata in manjša je koncentracija skupnih kislin;
- koncentracija skupnega ekstrakta z vsebnostjo skupnega prostega ekstrakta (pozitivna). Koncentracijo skupnega prostega ekstrakta izračunamo iz skupnega ekstrakta in posledično je med njima povezava;
- koncentracija reducirajočih sladkorjev s koncentracijo skupnega prostega ekstrakta (pozitivna). Tudi pri tej korelaciji izhaja povezava iz enačbe po kateri izračunamo koncentracijo skupnega prostega ekstrakta tako, da od skupnega ekstrakta odštejemo koncentracijo reducirajočih sladkorjev;
- koncentracija reducirajočih sladkorjev z vsebnostjo skupnega SO_2 (pozitivna). Vina, ki imajo večje koncentracije reducirajočih sladkorjev morajo biti bolj zaščitena z žveplovim dioksidom;
- vsebnost sladkorja prostega ekstrakta z vsebnostjo pepela (pozitivna). Ekstraktno bolj bogata vina vsebujejo večje koncentracije pepela. Rdeča vina vsebujejo več sladkorja prostega ekstrakta zaradi tehnologije in posledično vsebujejo višje koncentracije pepela;
- vsebnost sladkorja prostega ekstrakta s koncentracijo hlapnih kislin (pozitivna);
- koncentracija hlapnih kislin z vsebnostjo pepela (pozitivna);
- koncentracija hlapnih kislin s pH vrednostjo (pozitivna). Pri tej korelaciji smo pričakovali, da bo korelacija negativna, saj višje koncentracije hlapnih kislin znižujejo pH vrednost;
- vsebnost pepela s koncentracijo molekularne oblike SO_2 (negativna);

- vsebnost pepela s pH vrednostjo (pozitivna). Pepel je anorganska snov (bazični ioni) in več kot je pepela v vinu, bolj gre pH vrednost vina proti 7,0;
- koncentracija prostega SO_2 s koncentracijo skupnega SO_2 (pozitivna). Korelacija med fizikalno-kemijskima parametroma je bila pričakovana;
- pH vrednost in koncentracija molekularnega SO_2 (negativna). Tudi ta korelacija je bila pričakovana, saj koncentracija molekularnega žveplovega dioksida pada z naraščanjem pH vrednosti vina.

Med fizikalno-kemijskimi parametri so tudi šibke povezave, vidimo pa lahko, da med določenimi parametri povezanosti ni.

Molekularni žveplov dioksid je v šibki negativni povezavi:

- s koncentracijo alkohola (negativna). Vina, ki so alkoholno bolj bogata, potrebujejo za zaščito manj molekularnega žveplovega dioksida;
- z vsebnostjo sladkorja prostega ekstrakta (negativna);
- s koncentracijo hlapnih kislin (negativna). Pričakovali smo, da bo povezava bolj močna, saj več kot imamo molekularne oblike SO_2 v vinu, manjša je verjetnost, da se bojo razvile očetnokislinske bakterije in tvorile hlapne kisline, kot je očetna kislina;
- s koncentracijo skupnih kislin (pozitivna);
- in s koncentracijo skupnega SO_2 (pozitivna).

Molekularna oblika žveplovega dioksida ni v povezavi z relativno gostoto, skupnim ekstraktom in koncentracijo reducirajočih sladkorjev. Pričakovali smo, da bo pozitivna povezava med molekularnim žveplovim dioksidom in koncentracijo reducirajočih sladkorjev, saj je znano, da morajo biti vina, ki vsebujejo višje koncentracije RS bolj zaščitena z molekularno obliko SO_2 .

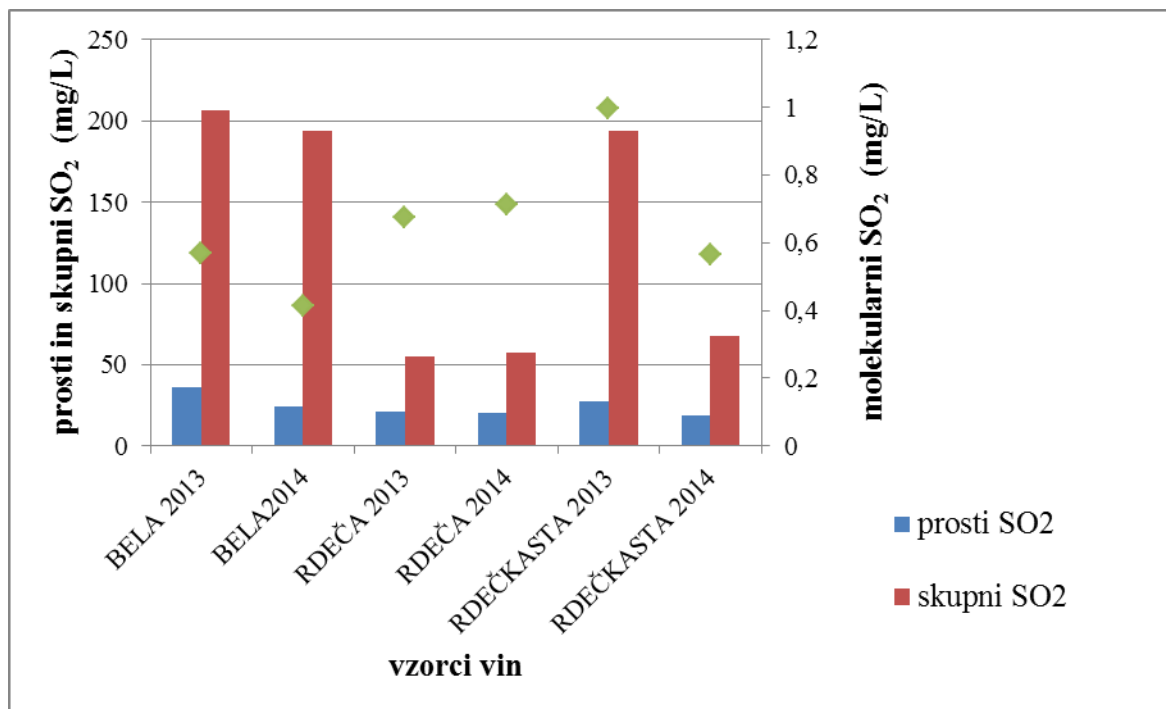
4.3 IZLOČENI VZORCI

Preglednica 18: Koncentracije prostega, skupnega in molekularnega SO₂ belih, rdečih in rdečkastih izločenih vin, v letih 2013 in 2014 z izračunanimi osnovnimi statističnimi parametri

	Barva vina	Oblika SO ₂	n	$\bar{x}$	min	max	so	KV (%)
2013	Bela vina	Prosti SO ₂ (mg/L)	54	35,8	4	145	29,733	83,0
		Skupni SO ₂ (mg/L)	10	206,6	57	450	134,415	65,1
		Molekularni SO ₂ (mg/L)	16	0,569	0,065	1,854	0,598	105,0
	Rdeča vina	Prosti SO ₂ (mg/L)	34	21,4	8	55	11,290	52,7
		Skupni SO ₂ (mg/L)	4	55,0	23	88	27,240	49,5
		Molekularni SO ₂ (mg/L)	10	0,677	0,164	1,530	0,451	66,7
	Rdečkasta vina	Prosti SO ₂ (mg/L)	4	27,8	10	48	16,460	59,3
		Skupni SO ₂ (mg/L)	2	149,5	109	190	57,275	38,3
		Molekularni SO ₂ (mg/L)	2	0,996	0,701	1,292	0,418	41,9
2014	Bela vina	Prosti SO ₂ (mg/L)	38	24,0	4	95	22,436	93,4
		Skupni SO ₂ (mg/L)	6	194,3	14	508	235,035	120,9
		Molekularni SO ₂ (mg/L)	6	0,413	0,040	0,958	0,386	93,5
	Rdeča vina	Prosti SO ₂ (mg/L)	48	20,375	5	57	11,133	54,6
		Skupni SO ₂ (mg/L)	7	57,7	19	112	40,701	70,5
		Molekularni SO ₂ (mg/L)	16	0,713	0,047	2,182	0,643	90,2
	Rdečkasta vina	Prosti SO ₂ (mg/L)	5	19	12	32	7,810	41,1
		Skupni SO ₂ (mg/L)	1	68	68	/	/	/
		Molekularni SO ₂ (mg/L)	2	0,567	0,513	0,623	0,078	13,7

Preglednica 18 prikazuje koncentracije prostega, skupnega in molekularnega žveplovega dioksida za izločene vzorce. To so vzorci pri katerih so bile ugotovljene razne napake in so tako bili neprimerni za prodajo. V letu 2013 je bilo neprimernih 92 vzorcev (54 belih, 34 rdečih, 4 rdečkastih), v letu 2014 pa en vzorec manj, tj. 91 vzorcev (38 belih, 48 rdečih, 5 rdečkastih).

V preglednici 18 in na sliki 14 lahko vidimo, da imajo vzorci belih vin v obeh letih povprečno koncentracijo molekularne oblike SO_2 premajhno (0,569 mg/L in 0,413 mg/L) in le 8 vzorcev ima primerno koncentracijo molekularnega SO_2 , ki je večja od 0,8 mg/L. Za vzorce rdečih vin lahko vidimo, da je povprečna koncentracija molekularnega SO_2 za leto 2013 in 2014 ustrezna in tako večja od 0,6 mg/L, vendar pa se še vedno najdejo vzorci, ki imajo premalo te oblike žveplovega dioksida. V letu 2013 sta imela oba rdečkasta vzorca dovolj molekularnega SO_2 (povprečje je 0,996 mg/L), v letu 2014 pa je 1 vzorec ustrezen, drugi pa vsebuje premalo molekularnega SO_2 .



Slika 14: Povprečne koncentracije prostega, skupnega in molekularnega SO_2 za izločene vzorce vin

Iz dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da večina izločenih vzorcev ne vsebuje ustreznih koncentracij molekularnega žveplovega dioksida in tako niso primerno zaščiteni.

Tudi pri izločenih vzorcih ni bilo za vse vzorce podatka o vrednosti pH, ker so deželna vina in tako ni bilo mogoče izračunati koncentracije molekularnega žveplovega dioksida po formuli 8.

Med izločenimi vzorci so bili v letu 2013 štiri vzorci, ki so presegali dovoljeno koncentracijo skupnega SO_2 in štiri vzorci s preveliko koncentracijo prostega SO_2 . V letu 2014 pa sta le dva vzorca imela preveč skupnega SO_2 in dva vzorca preveč prostega SO_2 . Pri vzorcih, ki so imeli preveč skupnega žveplovega dioksida se koncentracije molekularne oblike SO_2 gibljejo vse od 0,244 mg/L do 1,854 mg/L. Za vzorce, ki so imeli preveč prostega SO_2 pa nimamo podatka o vrednosti pH, ker so deželna vina. Prevelike koncentracije žveplovega dioksida so lahko posledica napake vinarja, ki je dodal preveliko koncentracijo žvepla.

Večina izločenih vzorcev ima zelo majhne koncentracije prostega in skupnega SO₂. Zaključimo lahko, da je vzorcev, ki so izločeni zaradi prevelikih koncentracij žveplovega dioksida, relativno malo in da večina izločenih vzorcev vsebuje premajhne koncentracije žveplovega dioksida. Nekateri vzorci, pri katerih je bila ugotovljena napaka ali bolezen, vsebujejo zadostne količine žveplovega dioksida. Sklepamo lahko, da so bila ta vina prepozno zažveplena.

Najpogostejši vzroki za prepoved prodaje vina so bili naslednji:

- oksidacija,
- prevelika koncentracija hlapnih kislin (ocetni cik),
- nečisti vonji in okusi,
- vonj po žveplovodiku,
- etilacetat,
- miševina,
- ...

Napake vina so nezaželeni spremembe v barvi, vonju in okusu samega vina. Do napak lahko pride zaradi neustreznih postopkov v kletarjenju, nezaželenih fizikalno-kemijskih procesov ter prisotnosti tujih spojin v moštu in vinu. Najpogostejša napaka je žveplovodik, ki je hlapna spojina z žveplom. Imenujemo ga tudi vodikov sulfid ali bekser. V koncentracijah nad zaznavo (50-80 µg/L), njegov vonj spominja na gnila jajca. Izhaja iz različnih virov, kot so sulfati v grozdju, sulfit iz žveplovega dioksida, razgradnja aminokislin in žveplo iz fungicidov. Koncentracija H₂S, ki nastane med alkoholno fermentacijo, se med zorenjem vina zmanjšuje. Del se odstrani z izhajanjem CO₂ oz. ga odstranimo s pretoki. Če med zorenjem nastane prevelika koncentracija H₂S, ta negativno vpliva na vonj vina (Bavčar, 2009).

Vonj in okus po oksidaciji sta najpogostejši napaki vina, ki nastane zaradi neustrezne zaščite vina pred kemijsko in encimsko oksidacijo. Oksidacija povzroči spremembo vonja (po naribanih jabolkih), porjavitev belih vin, izgubo barve rdečih vin, aktivira delovanje baterij in divjih kvasovk ter povzroči različne lome. Začetek oksidacije imenujemo tudi zračni ton, zaustavimo pa jo lahko s pravočasnim žveplanjem in polnimi vinskimi posodami ali uporabo inertnih plinov. Druge napake vina so še motnosti, usedline in lomi, okus po dimu, okus po zmrzali, vonj in okus po zdravilih, vonj in okus po plesni, vonj in okus po lesu, vonj in okus po pecljevini, vonj po zamašku,... (Bavčar 2009).

Bolezni vina so spremembe vina zaradi delovanja mikroorganizmov. Povzročajo jih predvsem divje kvasovke, očetnokislinske in mlečnokislinske bakterije.

Miševina je bolezen, ki je dobila ime zaradi okusa po mišjem seču oz. acetamidu, ki se pojavi v vinu. Tvori se zaradi oksidacije aminokisline lizina pod vplivom nekaterih bakterij rodu *Lactobacillus* in kvasovk rodu *Brettanomyces* (Bavčar, 2009).

Večje koncentracije očetne kisline (izražamo kot hlapne kisline) so posledica delovanja očetnokislinskih bakterij med procesom pridelave vina. V vinu jo zaznamo v koncentracijah nad 0,7 g/L, večje koncentracije (nad 1,4 g/L) pa dajejo vinu vonj in okus po kisu. Največkrat je vzrok za kvar s strani očetnokislinskih bakterij nezaščiteno vino (Bavčar, 2009).

Sklepamo lahko, da je do očetnega cika prišlo zaradi premajhne koncentracije molekularnega SO₂, saj vzorci, ki so bili izločeni zaradi očetnega cika, vsebujejo majhne koncentracije proste oblike SO₂ (povprečna koncentracija prostega SO₂ je 22,6 mg/L za vzorce izločene v letu 2013 in 21,8 mg/L za vzorce izločene v letu 2014).

Nastanek etilacetata povezujemo z delovanjem očetnokislinskih bakterij, nastane pa tudi kot posledica neencimske esterifikacije ali aktivnosti drugih mikroorganizmov, kot so mlečnokislinske bakterije. Njegov vonj v vinu spominja na lepilo oziroma lak. Poznane so še druge bolezni vina, kot so kan, diacetil, vlečljivost, akrolein, manitol, geranijev ton, acetaldehid,... (Bavčar, 2009).

Vino je mikrobiološko nestabilno, če vsebuje mikroorganizme, ki pretvorijo določene sestavine vina v povsem druge snovi (Košmerl in Kač, 2009). Mikroorganizme je potrebno odstraniti oz. preprečiti njihovo nadaljnjo razmnoževanje.

Zaviranje razmnoževanja mikroorganizmov (Košmerl in Kač, 2009):

- velika vsebnost proste žveplove(IV) kisline – pomemben je delež molekularnega SO₂, ki je odvisen od pH;
- visoka stopnja alkohola;
- nizek pH oz. velika koncentracija titrabilnih kislin;
- čim hitrejša potrošnja in
- čim manjša koncentracija reducirajočih sladkorjev.

5. SKLEPI

Pri magistrski nalogi so bili ugotovljeni naslednji sklepi:

- med belimi, rdečimi in rdečkastimi vzorci vin je velik razpon v vsebnosti vseh oblik žveplovega dioksida,
- molekularno, prosto in skupno obliko žveplovega dioksida imajo največ bela vina, sledijo rdečkasta, najmanjše koncentracije pa so bile ugotovljene v rdečih vinih,
- rdečkasta vina pridelujemo iz belih in rdečih sort grozdja in prav zaradi sortne sestave potrebujejo več žveplovega dioksida kot rdeča vina in manj kot bela,
- kljub ustreznim povprečnim koncentracijam molekularnega SO₂ (letnik 2013 in 2014) je kar nekaj vzorcev, ki vsebujejo premajhne koncentracije te oblike SO₂, ki deluje predvsem protimikrobno,
- pri obeh letnikih vsebuje večina vzorcev sladkih vin premajhne koncentracije molekularne oblike SO₂ (< 1,2 mg/L),
- rdeča vina vsebujejo najmanj SO₂, ker vsebujejo snovi (fenolne spojine), ki delujejo antioksidativno in deloma tudi protimikrobno,
- pri obeh letnikih (2013 in 2014) imajo PTP vina manjše koncentracije SO₂, kot pa ne-PTP vina in kar nekaj vzorcev PTP vsebuje premajhne koncentracije molekularne oblike SO₂,
- med belimi, rdečimi in rdečkastimi vzorci so pri obeh letnikih statistično značilne razlike v vsebnosti fizikalno-kemijskih parametrov,
- v obeh letnikih lahko potrdimo dejstvo, da vina z višjo alkoholno stopnjo potrebujejo manj žveplovega dioksida. Pri obeh letnikih imajo rdeča vina največjo alkoholno stopnjo in najmanj molekularnega ter skupnega SO₂,
- pri obeh letnikih lahko vidimo, da se večina fizikalno-kemijskih parametrov statistično razlikuje; vina z oznako PTP imajo drugačno koncentracijo kot pa ne-PTP vina. Vina z oznako PTP se v vsebnosti prostega, skupnega in molekularnega SO₂ od ne-PTP vin statistično razlikujejo in vsebujejo manjše koncentracije kot pa ne-PTP vina. Pri vinih letnika 2013 oznaka PTP neznatno vpliva samo na koncentracijo skupnega prostega ekstrakta, pri vinih letnika 2014 pa na koncentracije skupnih kislin, hlapnih kislin in sladkorja prostega ekstrakta,
- pri bivariatni analizi najdemo vse štiri povezave (močne, zmerne, šibke, ni povezave). Močne in nekatere šibke povezave smo pričakovali,
- koncentracija molekularne oblike SO₂ linearno narašča s koncentracijo prostega SO₂,
- z naraščanjem pH vrednosti se koncentracija molekularnega SO₂ zmanjšuje,
- izločeni vzorci ne vsebujejo ustrezne koncentracije molekularne oblike žveplovega dioksida in tako niso ustrezno zaščiteni,
- napaka vinarja pri odmerjanju koncentracije žvepla je lahko posledica prevelikih koncentracij SO₂ v vzorcih,
- izločeni vzorci v večini vsebujejo premajhne koncentracije prostega in skupnega SO₂,
- vzorci izločenih vin so bili lahko prepozno zažveplani, saj kljub ugotovljeni napaki ali bolezni vsebujejo ustrezno koncentracijo SO₂,

- najpogostejše napake ali bolezni vin v izločenih vzorcih so oksidacija, previsoka koncentracija hlapnih kislin (ocetni cik), nečisti vonji in okusi, vonj po žveplovodiku, etilacetat, miševina,
- vzorci, v katerih je bil ugotovljen ocetni cik, vsebujejo majhne koncentracije prostega SO₂ in posledično tudi premajhne koncentracije molekularne oblike SO₂, ki bi protimikrobno delovala na ocatnokislinske bakterije.

6 POVZETEK

V magistrskem delu smo pod drobnogled vzeli vzorce vin, letnikov 2013 in 2014, ki so bili senzorično ocenjeni na pooblaščenih organizacijah in so imeli določene fizikalno-kemijske parametre. Analizirali smo bela, rdeča in rdečkasta vina. Od vin letnika 2013 je bilo 3345 (70,1 %) belih, 1111 (23,3 %) rdečih in 315 (6,6 %) rdečkastih vin, od letnika 2014 pa 854 (72,3 %) belih, 251 (21,2 %) rdečih in 77 (6,5 %) rdečkastih vin. Analizirane so bile različne sorte vin iz različnih vinorodnih okolišev. Obdelovala so se mirna in peneča vina, vključena pa so bila tudi vina, ki imajo oznako priznано tradicionalno poimenovanje (PTP). Vsem vzorcem smo izračunali koncentracijo sladkorja prostega ekstrakta (enačba 11) in koncentracijo molekularne oblike SO_2 iz podatka o vrednosti pH in koncentraciji prostega SO_2 (enačba 8).

Vse podatke smo statistično obdelali in dobili rezultate.

V preglednici 8 smo prikazali rezultate fizikalno-kemijskih parametrov za vina letnika 2013 z osnovnimi statističnimi parametri. Ugotovili smo, da je pri belih vinih povprečna koncentracija molekularnega SO_2 ustrezna, vendar pa kar 450 (23,2 %) vzorcev vsebuje premalo molekularne oblike SO_2 ($< 0,8$ mg/L) in tako niso primerno zaščiteni. Povprečne molekularne koncentracije SO_2 so bile ustrezne tudi pri rdečih in rdečkastih vinih. Od rdečih vinih je več kot polovica vzorcev, ki vsebujejo manj kot 0,6 mg/L molekularnega SO_2 , od rdečkastih vin pa je le 22 (7,5 %) vzorcev, ki ne vsebujejo ustrezne koncentracije molekularne oblike SO_2 . Tudi pri vinih letnika 2014 (preglednica 13) vsa bela vina niso primerno zaščiteni. Kar polovica vzorcev vsebuje premalo molekularne oblike SO_2 . Prav tako je pri rdečih in rdečkastih vinih.

Sladka vina potrebujejo za mikrobiološko stabilnost koncentracije molekularne oblike SO_2 , ki so večje od 1,2 mg/L. Pri obeh letnikih večina vzorcev vin vsebuje premajhne koncentracije (prikazano grafično na sliki 8 in 11).

Pri obeh letnikih smo dobili, da bela vina vsebujejo največ prostega, skupnega in molekularnega SO_2 . Najmanj žveplovega dioksida vsebujejo rdeča vina, saj ta vina vsebujejo naravno prisotne antioksidativne in antimikrobne snovi (fenolne spojine) in tako zmanjšujejo potrebo po dodajanju žveplovega dioksida. Na njihovo koncentracijo lahko tudi vplivamo s trajanjem maceracije in temperature, vsebnost fenolnih spojin pa je tudi sortno pogojena (povprečne koncentracije za SO_2 so prikazane na sliki 9 in 12).

V preglednici 9 in 14 imamo prikazane rezultate fizikalno-kemijskih parametrov za vina z oznako PTP in ne-PTP vina. Pri obeh letnikih imajo PTP vina manjše koncentracije prostega, skupnega in molekularnega SO_2 in pri obeh letnikih najdemo vina z oznako PTP, ki vsebujejo premajhne koncentracije molekularne oblike SO_2 . Tudi pri drugih fizikalno-kemijskih parametrih so pri vinih PTP povprečne koncentracije večinoma manjše. Povprečne koncentracije SO_2 smo za Teren PTP, Cviček PTP, Belokranjec PTP, Metliška črnina PTP, beli in rdeči Bizeljčan PTP, Belokranjec PTP prikazali grafično na sliki 10 in 13.

V preglednici 11 in 15 smo zbrali razlike fizikalno-kemijskih parametrov med belimi, rdečimi in rdečkastimi vini za letnika 2013 in 2014. Za oba letnika velja, da so med vzorci vin statistično zelo visoke značilne razlike. Največ molekularnega SO₂ imajo bela vina, sledijo rdečkasta, najmanj pa rdeča, kar smo tudi pričakovali. Z dobljenimi rezultati smo lahko tudi potrdili trditev, da vina z višjo alkoholno stopnjo potrebujejo manj žveplovega dioksida. Pri obeh letnikih imajo rdeča vina najvišjo alkoholno stopnjo ter najmanjšo koncentracijo skupnega in prostega SO₂.

Iz preglednic lahko tudi vidimo, da so bila najslabše ocenjena rdečkasta vina, sledijo rdeča, najbolj pa bela vina tako pri letniku 2013, kot pri letniku 2014.

V preglednici 12 in 16 smo prikazali razlike fizikalno-kemijskih parametrov med vini z oznako PTP in vini brez oznake PTP za oba letnika. Večinoma se fizikalno-kemijski parametri med PTP vini in ne-PTP vini statistično razlikujejo. Pri letniku 2013 imajo vina z oznako PTP večjo samo koncentracijo skupnih kislin, ne pa tudi pri vsebnosti sladkorja prostega ekstrakta. Pri PTP vinih, letnik 2014 imajo vina nekoliko večjo samo povprečno koncentracijo skupnih in hlapnih kislin, vendar je med PTP vini in ne-PTP vini razlika neznačilna. Vrednosti pH in koncentraciji pepela v vinih sta statistično značilno odvisni od oznake PTP.

V preglednici 17 so prikazani rezultati bivariatne analize, s katero smo poiskali morebitne povezave med fizikalno-kemijskimi parametri. V močni povezavi so relativna gostota z vsebnostjo skupnega ekstrakta in vsebnostjo reducirajočih sladkorjev; koncentracija skupnega ekstrakta z vsebnostjo reducirajočih sladkorjev in koncentracija prostega SO₂ s koncentracijo molekularne oblike SO₂. Te povezave smo pričakovali. Glede na temo magistrske naloge je najbolj pomembna zadnja korelacija, kjer pozitivna vrednost pomeni, da koncentracija molekularnega SO₂ linearno narašča s koncentracijo prostega SO₂. Pri analizi smo dobili tudi kar nekaj zmernih povezav, ki smo jih pričakovali. Pri analizi smo dobili, da je povezava med koncentracijo hlapnih kislin in pH vrednostjo pozitivna, pričakovali pa smo, da bo negativna, saj višje koncentracije hlapnih kislin znižujejo vrednost pH. Med koncentracijo molekularnega SO₂ in koncentracijo reducirajočih sladkorjev ni povezave. Tega nismo pričakovali, saj je znano, da morajo biti vina, ki vsebujejo višje koncentracije RS, bolj zaščitena z molekularno obliko.

Posebej smo obdelali tudi vzorce, ki so bili v letu 2013 in 2014 izločeni na senzoričnem ocenjevanju zaradi različnih napak ali bolezni. Koncentracije prostega, skupnega in molekularnega SO₂ so prikazane v preglednici 18. V letu 2013 je bilo neprimernih 92 vzorcev vin, v letu 2014 pa 91 vzorcev. Z obdelavo vzorcev je bilo ugotovljeno, da večina izločenih vzorcev ne vsebuje ustreznih koncentracij molekularnega SO₂. Od vseh 92 izločenih vzorcev belih vin v letu 2013 in 2014 je samo 8 vzorcev, ki vsebujejo koncentracijo molekularnega SO₂, ki je višja od 0,8 mg/L. Tudi rdeča in rdečkasta izločena vina vsebujejo premajhne koncentracije.

Ugotovljeno je tudi bilo, da je vzorcev, ki so bili izločeni zaradi prevelikih koncentracij SO₂, relativno malo in da večina izločenih vzorcev vsebuje premajhne koncentracije SO₂. Napaka vinarja pri odmerjanju koncentracije žvepla je lahko posledica prevelikih koncentracij SO₂ v vzorcih.

Vzorci so bili izločeni predvsem zaradi drugih napak in bolezni (oksidacija, prevelika koncentracija hlapnih kislin, nečisti vonji in okusi, vonj po žveplovodiku, etilacetat, miševina,...). Kljub ugotovljeni napaki ali bolezni, vsebujejo nekateri vzorci vin zadostne količine SO₂. Sklepamo lahko, da so bila ta vina prepozno zažveplana. Vzorci, v katerih je bil ugotovljen očetni cik, vsebujejo majhne koncentracije prostega SO₂ in posledično tudi premajhno koncentracijo molekularne oblike SO₂, ki bi lahko protimikrobno delovala na očetnokislinske bakterije.

7 VIRI

- Adamič Š. 1989. Temelji biostatistike. 2. izd. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze Edvarda Kardelja v Ljubljani: 195 str.
- Bartowsky E. J., Henschke P. A. 2008. Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 60–70
- Bavčar D. 2009. Kletarjenje danes. 2. izd. Ljubljana, Kmečki glas: 295 str.
- Commission Regulation (EC) No 606/2009 of 10 July 2009 laying down certain detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No 479/2008 as regards the categories of grapevine products, oenological practices and the applicable restrictions. 2009. *Official Journal of the European Union*, 52, L193: 1-59
- Divol B., du Toit M., Duckitt E. 2012. Surviving in the presence of sulphur dioxide: strategies developed by wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95: 601–613
- FOSS. 2016. WineScan™ Flaxdatasheet. Hillerød, FOSS: 2 str.
<http://www.foss.dk/industry-solution/products/winescan-so2> (april, 2016)
- Guerrero R. F., Cantos-Villar E. 2015. Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, 42: 27–43
- Handerson P. 2014. Sulfur dioxide: The science behind this anti-microbial, anti-oxidant wine additive. *Practical Winery & Vineyard*, 95, 1A: 54–59
- Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. dop. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf (marec, 2016)
- Košmerl T. 2005a. Primerno žveplanje vina. *SAD: revija za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo*, 16, 6: 21–23
- Košmerl T. 2005b. Žveplove spojine v vinu. *SAD: revija za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo*, 16, 1: 21–22
- Košmerl T., Kač M. 2009. Osnovne kemijske in senzorične analize mošta in vina. Laboratorijske vaje pri predmetu tehnologije predelave rastlinskih živil – vino, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 74 str.

- Košmerl T., Kač M. 2010. Kemijske analize in postopki čiščenja vina: laboratorijske vaje pri izbirnem predmetu Vinarstvo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 72 str.
- Košuta M., Jug T. 2010. Koliko žvepla dodati? SAD: revija za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo, 21, 3: 20–21
- Li H., Guo A., Wang H. 2008. Mechanisms of oxidative browning of wine. Food Chemistry, 108: 1–13
- Margalit Y. 2004. Concepts in wine technology. San Francisco, Wine Appreciation Guild, Ltd: 179–226
- Navodilo o fizikalno kemijskih analizah grozdnega mošta in vina. 2001. Uradni list Republike Slovenije, 11, 43: 4788-4843
- Oliveira C. M., Ferreira A. C. S., De Freitas V., Silva A. M. S. 2011. Oxidation mechanisms occurring in wines. Food Research International, 44: 1115–1126
- Paixão N., Perestrelo R., Marques J. C., Câmara J. S. 2007. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. Food Chemistry, 105: 204-214
- 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: 5336–5358
- Pravilnik o postopku in načinu ocenjevanja vina in drugih proizvodov iz grozdja in vina. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 32: 3857–3862
- Pravilnik o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – Bizeljčan. 2009. Uradni list Republike Slovenije, 19, 22: 2827-2828
- Pravilnik o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – cviček. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 3: 286-287
- Pravilnik o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – Metliška črnina in Belokranjec. 2008. Uradni list Republike Slovenije, 18, 5: 341-343
- Pravilnik o vinu z oznako priznanega tradicionalnega poimenovanja – teran. 2008. Uradni list Republike Slovenije, 18, 16: 1166-1168
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donéche B., Lonvaud A. 2006. Handbook of enology. Vol. 1. The microbiology of wine and vinifications. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd: 193–221

- Rotter B. 2001. Sulphur dioxide. Vancouver (Canada), Vancouver Amateur Winemakers Association: 52 str.
<http://www.brsquared.org/wine/Articles/SO2/SO2.htm> (oktober, 2015)
- Sacks G. L., Howe P. A. 2015. "Free" doesn't always mean free: Rethinking SO₂ measurements in the winery. Research News from Cornell's Viticulture and Enology Program, 4: 6 str.
<https://grapesandwine.cals.cornell.edu/sites/grapesandwine.cals.cornell.edu/files/shared/Research%20Focus%202015-4.pdf> (april, 2016)
- Santos M. C., Nunes C., Saraiva J. A., Coimbra M. A. 2012. Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. European Food Research and Technology, 234: 1–12
- Seljak J. 1996. Statistične metode. Ljubljana, Visoka upravna šola: 197–199
- Skvarč T. 2007. Določanje glavnih sestavin in parametrov kakovosti v vinih. Diplomsko naloga strokovnega študijskega programa. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 29–32
- Sturm M. E., Arroyo-López F. N., Garrido-Fernández A., Querol A., Mercado L. A., Ramirez M. L., Combina M. 2014. Probabilistic model for the spoilage wine yeast *Dekkera bruxellensis* as a function of pH, ethanol and free SO₂ using time as a dummy variable. International Journal of Food Microbiology, 170: 83–90
- Šikovec S. 1993. Vinarstvo: od grozdja do vina. Ljubljana, Kmečki glas: 283 str.
- Takahashi M., Ohta T., Masaki K., Mizuno A., Goto-Yamamoto N. 2014. Evaluation of microbial diversity in sulfite-added and sulfite-free by culture-dependent and – independent methods. Journal of Bioscience and Bioengineering, 117, 5: 569–575
- Van Leeuw R., Kevers C., Pincemail J., Defraigne J. O., Dommes J. 2014. Antioxidant capacity and phenolic composition of red wines from various grape varieties: Specificity of Pinot Noir. Journal of Food Composition and Analysis, 36: 40–50
- Vodovnik A., Vodovnik T. 1999. Nasveti za vinarje. Ljubljana, Kmečki glas: 265 str.
- Vodovnik A., Vodovnik Plevnik T. 2003. Od mošta do kozarca: pridelava vina, pridelava sadjevca. Maribor, Grafiti studio: 206 str.
- Zakon o vinu. 2006. Uradni list Republike Slovenije, 16, 105: 16016–10629
- Yang J., Martinson T., E., Hai Liu R. 2009. Phytochemical profiles and antioxidant activities of wine grapes. Food Chemistry, 116: 332–339

ZAHVALA

Večji kot je otok znanja, daljša je obala čudes.

(R. M. Sockman)

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Tatjani Košmerl za njeno vso strokovno pomoč, nasvete, naklonjenost, vložen trud in potrpežljivost pri nastajanju magistrskega dela.

Za nasvete, pomoč in hiter pregled magistrske naloge se zahvaljujem somentorici dr. Tjaši Jug.

Prav tako se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Lei Demšar za pomoč pri statistični obdelavi rezultatov in temeljit pregled naloge.

Zahvala gre tudi Kmetijsko gozdarskemu zavodu Nova Gorica in Katedri za tehnologije, prehrano in vino, ki sta omogočila izvedbo praktičnega dela magistrske naloge.

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

Hvala tudi vsem sošolkam in sošolcem za nepozabnih 5 let študija. Hvala vam za vso podporo, pomoč, kakor tudi za vsa druženja, doživetja in popotovanja.

Posebna zahvala gre moji družini, predvsem mami Bernardi in očetu Antonu, ki sta mi s finančno in moralno podporo omogočila študij. Zahvala tudi sestrama Jerneji in Anji, ki sta me med samim študijem podpirali. Hvala tudi vsem najožjim sorodnikom, ki ste verjeli vame in mi kakorkoli pomagali pri uresničitvi mojih želja.

Hvala tudi Urški in Mojci, ki sta me na poti nastajanja magistrske naloge podpirali, pomagali, dajali nasvete in mi pogosto narisali smeh na obrazu.

Hvala tudi vsem drugim prijateljem, ki so mi kakorkoli pomagali in me podpirali.

Primož, hvala za vse vzpodbudne besede, potrpežljivost, pomoč in podporo in to, da si vseskozi verjel vame. Hvala!