

1 UVOD

Pred 125 leti je Louis Pasteur pojasnil enostavni biološki proces fermentacije grozdnega mošta s pomočjo kvasovk v vino. Razvoj v zadnjih 20 - 25 letih je jasno dokazal, da sta fermentacija in proizvodnja vrhunskih vin kompleksen enološko - biokemijski proces. V teh letih je prišlo tudi do napredka v fermentacijski tehnologiji, vendar je proces fermentacije mošta ostal še vedno v veliki meri neobvladljiv.

Taksonomske in sistematske raziskave mikroorganizmov v moštu in vinu na začetku tega stoletja in napredek na področju kemijskih in biokemijskih tehnik so razkrile pravo sliko o vinu. Z razvojem sodobnega bioprocenega inženirstva je bilo omogočeno boljše razumevanje vloge procesne tehnologije in spoznavanja mehanizmov delovanja metabolizma vinskih kvasovk.

Raziskave in razvoj fermentacijske tehnologije v vinarstvu so ena izmed najbolj zanimivih smeri sodobne procesne biotehnologije. V svetu je slovensko vinarstvo ustvarilo naši deželi velik ugled, zato je v prihodnjih letih na tem področju pričakovati dvig kakovosti vina ob sočasnem znižanju proizvodnih stroškov.

Novejše raziskave ponujajo nekatere inovacije, še vedno pa ne omogočajo dovolj dobre kontrole samega procesa vinske fermentacije. Če želimo proces voditi, moramo najprej zgraditi sistem pridobivanja informacij, s katerimi sproti opisujemo stanje procesa in potek značilnih procesnih parametrov.

Počasna in/ali nepopolna razgradnja sladkorjev s kvasovko vrste *Saccharomyces cerevisiae* med alkoholno fermentacijo grozdnega mošta v vino, predstavlja nenehen problem pri proizvodnji vina. Na zaustavitev ali prekinitvev procesa fermentacije lahko vpliva več dejavnikov, kot so temperatura procesa, pomanjkanje hranilnih snovi v moštu, prisotnost toksičnih substanc, spremembe pH ali slaba odpornost kvasovk na prisoten etanol. Stopnja fermentacije je močno odvisna od sposobnosti kvasnih celic za transport sladkorjev. Razni šoki iz okolja in fiziološki šoki, vodijo do zmanjšanja transportne aktivnosti. Zgodnja identifikacija motenj, ki nastanejo v kvasnem metabolizmu, je pomembna za preprečevanje upočasnitve, zaustavitve ali prekinitve fermentacije.

Izboljšanje sedanjega stanja je možno v boljšem razumevanju in nadzoru poteka procesa fermentacije mošta, kakor tudi v fazi zorenja vina. Z izbiro primerne strategije vodenja bioprocasa, skušamo z vplivom na ključne spremenljivke doseči njegov optimalni potek, zagotavljanje pogojev za rast in delovanje kvasnih celic, optimizacijo porabe energije, časa in vhodnih surovin ter izboljšavo konsistence in kakovosti produkta.

1.2. NAMEN RAZISKAVE

Intenzivnost nekega fiziološkega procesa je v veliki meri odvisna od aktivacije encimske verige v mikrobnih celicah. Ta aktivnost se odraža, pri konstantni temperaturi, v izmenjavi elektronov in spreminjanju razmerja med celokupnim razmerjem aktivnosti vseh oksidantov in aktivnostjo vseh reducentov. Podobno kot pri merjenju pH, je redoks potencial odraz vsote vseh oksidoreduktivnih reakcij fermentativnega sistema v katerem igra mikroorganizem s svojim aktiviranim encimskim sistemom dominantno vlogo. Ta vloga se odraža v meritvah redoks potenciala med procesom fermentacije. Spremembe med mikrobnimi fiziologijami vsakega mikroorganizma se običajno jasno odražajo v karakterističnem poteku redoks potenciala, zato predstavlja meritev redoks potenciala okno, skozi katerega lahko opazujemo razvoj vsake vrste mikroorganizma in spremljamo potek vsake fermentacije.

V primeru alkoholne fermentacije sem želela s spremljanjem redoks potenciala razložiti potek posameznih faz v mikrobnih fiziologijah kvasovk med alkoholno fermentacijo grozdnega mošta v vino. S spoznavanjem posameznih fizioloških faz sem želela ustvariti celokupno sliko mikrobnega metabolizma. Ta slika prevedena v profil meritve redoks potenciala alkoholne fermentacije lahko postane osnova za primerjanje uspešnosti fermentacijske pretvorbe grozdnega mošta v končni, iz mnogih komponent zgrajeni produkt, ki mu pravimo vino.

Primerjava posameznih redoks profilov fermentacijskega procesa z organoleptičnimi analizami vzorcev vina vodi do postavitve tehnološkega optimuma, ki je karakterističen za posamezne vinske sorte in ga je mogoče tehnološko standardizirati.

Namen mojega dela je ob tem bil preučiti potek redoks potenciala vsake fermentacije v smislu preučitve možnosti vpliva zunanjih faktorjev na krmiljenje bioprocesa in s tem ustvarjanje uspešne fermentacije. S tem znanjem seveda ne smatram, da bi lahko iz slabega vinskega letnika ustvarili najboljšega, gotovo ne. Pridobljeno znanje teh raziskav lahko v praksi pomaga ustvariti iz slabega letnika najboljše kar se iz njega ustvariti da.

2 TEORETIČNE OSNOVE

2.1 KEMIJSKA SESTAVA GROZDNEGA MOŠTA

V grozdnem soku poznamo 230 različnih sestavin, ki jih razdelimo v naslednje skupine: voda, ogljikovi hidrati, kisline, mineralne snovi, dušikove spojine, čreslovinaste snovi, barvne snovi, olja, maščobe in voski, encimi, aromatične in buketne snovi. Grozdni mošt je vodna raztopina sladkorjev in drugih substanc z gostoto 1,060-1,120 gcm⁻³ in 70-80 % vsebnostjo vode. (Šikovec, 1996)

Voda, kot topila za snovi, ki se nahajajo v grozdni jagodi, igra pomembno vlogo v življenjskih funkcijah tega organa vinske trte. Vsebnost vode v vinu je zaradi procesov, ki potekajo med alkoholno fermentacijo večja, kot v moštu. V največji meri so v moštu zastopani saharidi, ki nastajajo v grozdni jagodi med procesom fotosinteze. (Sponholz, 1989)

2.1.1 OGLJIKOVI HIDRATI

Nastanek ogljikovih hidratov je kot pri vseh rastlinah s klorofilom, rezultat procesa fotosinteze. Ta proces se pri grozdju v največji meri odvija v listih in delno tudi v ostalih zelenih delih vinske trte, vključno z grozdno jagodo, dokler je še zelena in ima v sebi klorofil.

2.1.1.1 Monosaharidi

Pentoze

Med monosaharidi grozdja in mošta imajo pentoze manjši pomen kot heksoze. Tukaj se nahajajo večinoma v obliki svojih anhidridov, več ali manj polimeriziranih kot pentozani. V obliki anhidridov so lahko pentoze v kombinaciji s heksozami kot heksozo-pentozani ali pentozo-heksozani. V moštu je od pentoz najbolj zastopana arabinoza, v manjši meri pa ksiloza in ramnoza. Vsebnost pentoz je največja v trdnih delih grozda, predvsem v pečkih, medtem ko je sam mošt bolj reven s pentozami. (Muštovič, 1985)

Heksoze

Med sladkorji v grozdju sta najbolj zastopani heksozi glukoza in fruktoza. Ti sladkorji največ nastajajo v listju vinske trte, kot produkti procesa fotosinteze. Vsebnost sladkorja v grozdju se razlikuje od sorte do sorte in to je eden glavnih kriterijev za oceno tehnološke vrednosti posameznih sort vinske trte. Giblje se v širokih mejah, med 15 in 30 %, največkrat pa v mejah od 18 do 22 %. Za dinamiko pretvarjanja sladkorja v procesu razvoja grozdne jagode je karakteristično razmerje med vsebnostjo glukoze in fruktoze. V zgodnji fazi razvoja jagode, dokler je jagoda še zelene barve in je v fazi rasti, predstavlja glukoza $\frac{3}{4}$ sladkorja, $\frac{1}{4}$ pa predstavlja fruktoza. Z zorenjem grozdja se razmerje glukoza/fruktoza postopoma spreminja v prid fruktoze, tako da se v času polne zrelosti vzpostavi ravnotežje in vrednost razmerja glukoza/fruktoza znaša približno 1. Po tem obdobju se ravnotežje ruši na škodo glukoze. (Radovanović, 1986)

D-glukoza (dekstroza, grozdni sladkor)

je podvržena razgradnji z mnogimi mikroorganizmi. Najpomembnejši so vsekakor predstavniki kvasa (*Saccharomyces*, *Kloeckera* in drugi), ki med procesom alkoholne fermentacije proizvajajo: etanol, glicerol, CO₂ in drugo. Bakterije mlečnokislinske fermentacije jo spremenijo v mlečno kislino, CO₂ in vodo. Tudi predstavniki posameznih plesni uporabljajo ta sladkor za proizvodnjo raznih snovi, kot so citronska kislina in druge. (Radovanović, 1986)

D-fruktoza (levuloza, sadni sladkor)

ta sladkor je pri rastlinah zelo razširjen in pogosto spremlja glukozo. Tudi fruktoza je substrat v nekaterih fermentacijah, med katerimi je najpomembnejša alkoholna fermentacija. Večina kvasovk hitreje razgrajuje glukozo, kot pa fruktozo. (Radovanović, 1986)

2.1.1.2 Disaharidi

Saharoza

V pogledu sladkosti zavzema mesto med glukozo in fruktozo. Danes je dokazano, da se saharoza nahaja v vsaki sorti grozdja. Količine tega disaharida so običajno zelo majhne, v primerjavi s količinami glukoze in fruktoze (Radovanović, 1986).

2.1.2 KISLINE V MOŠTU

Na kislinsko stanje mošta vpliva več dejavnikov. Pred vsem ima veliki vpliv sorta. Odvisno od sorte, se vsebnost kislin giblje v širokih mejah, med 3 do 12 gL⁻¹, najpogosteje pa od 4 do 8 gL⁻¹, izraženo v vinski kislini. Vrednost realne kislosti se giblje med pH 2,5 in 3,8. V okviru iste sorte pa lahko na kislinsko stanje mošta vplivajo tudi klimatski in geomorfološki faktorji. Kislinsko stanje grozdnega soka se spreminja v procesu razvoja grozdne jagode in zorenja grozdja. Kislost mošta ima velik pomen tudi za vino, ker posamezne kisline prehajajo iz mošta in skupaj s kislinami, ki nastajajo naknadno, prevzemajo zelo pomembno vlogo, predvsem v formiranju različnih estrov, ki vplivajo na okus vina, kot tudi v nizu kemijskih in biokemijskih procesov (Radovanović, 1986).

2.1.2.1 Organske kisline

Organske kisline grozdja smatrajo za produkt nepopolne oksidacije sladkorja in kot takšne zavzemajo eno pomembnejših mest v procesih dihanja rastlinskih celic nasploh. V teh procesih se organske kisline pojavljajo kot vmesni produkti spremembe snovi v splošnem metabolizmu rastlinskih celic. Medtem, ko po eni strani iz sladkorja nastajajo nove količine organskih kislin, pa se v nadaljnjih procesih dihanja tudi same oksidirajo in s tem prehajajo v končne produkte CO₂ in vodo. Med organskimi kislinami grozdja so najpomembnejše:

- vinska,
- jabolčna in
- citronska kislina.

Te kisline karakterizirajo kislinsko stanje vina, tako da vsaka sprememba v vsebnosti katerekoli od njih, vodi do sprememb v kislosti vina (Šikovec, 1993).

Vinska kislina (COOH CHOH CHOH COOH)

Nahaja se kot D-vinska kislina v vseh zelenih delih grozda. V moštu se nahaja v količinah od 1 - 8 gL⁻¹. V začetku se vinska kislina nahaja le v prosti obliki, v času razvoja jagode in zorenja grozdja, pa prehaja v prisotnosti alkalij iz zemlje v tartrate. Med solmi vinske kisline grozdja so najbolj zastopane: primarni kalijev tartrat, sekundarni kalijev tartrat, primarni kalcijev tartrat, sekundarni kalcijev tartrat. Najbolj zastopana sol je kalijev hidrogentartrat. Ta sol vinske kisline je slabo topna v vodi, še manj pa v prisotnosti alkohola, tako da v vinu redno prihaja do večjega ali manjšega izločanja na dno ali na zidove vinske posode. Izločanju te soli pa pomaga še nizka temperatura. Tudi kalcijeve soli vinske kisline so slabo topne. Te soli se skupaj s kalijevim hidrogentartratom, izločajo delno že v moštu, delno v vinu v obliki vinskega kamna. (Šikovec, 1993)

Jabolčna kislina (COOH CH₂ CHOH COOH)

Je produkt nepopolne oksidacije sladkorja v listju. Od tu jabolčna kislina prehaja v jagodo, kjer se tudi sama oksidira do končnih produktov vode in ogljikovega dioksida. Jabolčno kislino v svojih dihalnih procesih grozdna jagoda v veliki meri izkorišča kot energetski material. Dokler je jagoda še zelena je vsebnost 15 – 25 gL⁻¹, potem se vsebnost zmanjšuje in v obdobju tehnološke zrelosti grozdja doseže 3 – 5 gL⁻¹. Kislina je topna v vodi in alkoholu. Manj se je nahaja v prosti obliki, več v obliki soli malata, od katerih so najboljše zastopane soli kalija, kalcija in magnezija. Jabolčna kislina iz mošta prehaja v vino. V vinu je jabolčna kislina neobstoja in se transformira pod vplivom raznih mikroorganizmov. (Šikovec, 1993)

Citronska kislina (COOH CH₂ COH(COOH) CH₂ COOH)

V fazi razvoja in zorenja grozdne jagode najdemo v moštu do 0,7 gL⁻¹ citronske kisline. Za citrsko kislino je značilno, da jo iz sladkorja tvorijo mnoge plesni. *Botrytis cinerea* pretvarja del sladkorja iz grozdja v citrsko kislino. Iz mošta prehaja v vino, kjer je zelo nestabilna in jo nekatere bakterije transformirajo v mlečno kislino (Šikovec, 1993).

Pirogrozdna kislina (COOH CH₂ CH₂ COOH)

Nastane v rastlinski celici kot produkt nepopolne oksidacije glukoze. Je pomembna sestavina vina, v katerem se pojavlja kot sekundarni produkt alkoholne fermentacije, v manjši meri pa nastaja z razgrajevanjem glutaminske kisline. Ostale pomembnejše organske kisline v moštu in vinu so še (Šikovec, 1993): glikolna kislina, oksalna kislina, glukuronska kislina, glukonska kislina, salicilna kislina.

2.1.3 FENOLNE SPOJINE

Senzorične lastnosti vina, barva, okus, procesi stabilizacije in staranja so v tesni povezavi s prisotnostjo fenolnih spojin. Po novjših podatkih, predstavljajo fenoli v grozdju in vinu: fenolne kisline, flavone, antociane in taninske spojine. (Muštović, 1985)

2.1.4 AROMATIČNE SNOVI

Aromatične snovi iz grozdja prehajajo v vino in sodelujejo pri tvorbi dišečih snovi kot primarne aromatične snovi. Aromatične snovi delimo v več skupin: 30 alkoholov, 15 aldehidov, 8 ketonov, 15 maščobnih kislin, 90 estrov, 9 terpenov

Odvisno od tega, kje se pretežno nahajajo in v kakšnih koncentracijah nastopajo, lahko aromatične snovi razdelimo v dve skupini:

- spojine značilne za grozdje muškatinih sort in grozdje direktno rodnih hibridov. Ta skupina je zastopana v zrelem in prezrelem grozdju, tako da je njihova prisotnost značilna za sorte, ki se gojijo v krajih s toplo klimo. Te snovi prehajajo v vino in mu dajejo karakterističen muškatin vonj ali pa specifični hibridni vonj,
- snovi, katerih aromatične lastnosti v grozdju niso posebno izražene. Te snovi prehajajo iz grozdja v vino, kjer se med alkoholno fermentacijo in v času staranja vina, transformirajo v druge, tako imenovane **sekundarne** in **terciarne aromatične snovi**. (Šikovec, 1993)

Tipična aroma vina nastaja med kvasno fermentacijo mošta in je odvisna od delovanja kvasovk, sorte vina, temperature pri kateri fermentacija poteka,.... Pogoji fermentacije in različne metode vinifikacije vodijo do nastanka različnih aromatičnih vin. Ker so aromatične komponente v sestavi vina zelo pomembne za kakovost, je pomembno tudi razumevanje njihovega nastanka, sprememb in odvisnosti od metod vinifikacije. Mnogi višji alkoholi nastajajo med fermentacijo in dosegajo koncentracije v mejah od 150 do 550 mgL⁻¹. Ti alkoholi in njihovi estri imajo močan vpliv na aromo vina. Pomembnejša višja alkohola nastala med fermentacijo sta izobutanol (metil-2-propanol-1) in izoamilalkohol (metil-2-butanol-1 in metil-3-butanol-1). V majhnih koncentracijah do 300 mgL⁻¹, sodelujeta pri oblikovanju kompleksnih aromatičnih značilnosti vina. Višji alkoholi nastajajo z delovanjem kvasovk, direktno iz sladkorjev ali pa iz aminokislin. (Muštovič, 1985)

2.1.5 DUŠIKOVE SPOJINE

Dušikove spojine grozdja, mošta in vina vsebujejo več pomembnih spojin, ki vstopajo kot komponente v mnoge biokemijske in fizikalno - kemijske procese. Njihova vsebnost v grozdju je delno odvisna od sorte vinske trte, v večji meri pa od stopnje zrelosti grozdja in ekoloških pogojev gojenja trte. Najpomembnejše dušikove spojine v moštu in vinu so: proste aminokisliline, proteini, polipeptidi, amini, amidi, heksozoamini, nukleinski dušik.

2.1.6 VITAMINI

Vino poleg vitaminov iz grozdja vsebuje tudi druge vitamine, ki se v vinu pojavljajo kot produkti, ki jih proizvajajo kvasovke v svojih celicah, po odmiranju in avtolizi kvasovk pa ostanejo v vinu. Vitamini iz grozdja, mošta in vina sodelujejo v posameznih procesih. V grozdju, moštu ali v vinu, regulirajo tok teh procesov in jih usmerjajo v določeni smeri. Najpomembnejši vitamini so: provitamin A, vitamin B₁, vitamin B₂, nikotinamid, pantotenska kislina, piridoksin, vitamin B₁₂, *p*-aminobenzojska kislina, folna kislina, holin, biotin, vitamin P, askorbinska kislina, tokoferol (Muštovič, 1985).

2.1.7 ENCIMI

Fermentacijo grozdnega mošta v vino pogojuje prisotnost različnih encimskih kompleksov. V živi rastlinski celici so encimi v posameznih procesih neposredno povezani z različnimi življenjskimi funkcijami vinske trte. S stiskanjem grozdnih jagod, se grozdni sok znebi celičnih sten in prehaja v okolje, kjer vladajo novi zunanji pogoji. S tem prihajajo v novo okolje tudi encimi in tako se spremeni tudi dinamika njihovega delovanja (Muštović, 1985).

2.1.7.1 Encimi oksidacijsko-redukcijskih reakcij

Dehidrogenacija je kot oblika oksidacije značilen proces za substrate organskega izvora in pogost proces med biološkimi oksidacijami. Ker se v grozdju in vinu odvija cel niz oksidacijsko-redukcijskih reakcij s premeščanjem vodika iz ene na drugo substanco, je pri tem vloga encimov, kot katalizatorjev oksidacijsko redukcijskih reakcij, zelo pomembna. Do pred kratkim so za najpomembnejši encim te skupine smatrali polifenoloksidazo. Po novejših raziskavah pa je ta encim pravzaprav sestavljen iz dveh encimov. Eden od teh je tirozinaza, drugi pa je lakaza, ki jo izloča gliva *Botrytis cinerea*. Najpogostejši encimi te skupine so (Muštović, 1985): tirozinaze grozdja, lakaze, askorbinooksidaze, peroksidaze, katalaze.

Encimi hidrolizirajoče narave

Izmed encimov te skupine so za grozdje, mošt in vino zanimivi encimi: saharaze, pektolitični encimi, proteolitični encimi.

Pektolitični encimi

Razvrstimo jih lahko v dve skupini: encimi tipa esteraza in encimi, ki katalizirajo reakcije depolimerizacije.

Proteolitični encimi

Ta skupina encimov, kot tudi njihova vloga v grozdju, moštu in vinu je slabo proučena. Predvidevamo, da je govora o dveh vrstah encimov: proteaze (proteinaze) in peptidaze.

2.1.8 MINERALNE SNOVI

Mineralne snovi črpa vinska trta preko koreninskega sistema iz zemlje in jih razporeja v organe, kjer jih koristi za razne življenjske funkcije. Del teh snovi prehaja tudi v grozd, od koder pri nadaljnji predelavi prehajajo v mošt in naprej v vino. Te snovi se vključujejo v sestavo spojin, ki imajo neposredni vpliv na dinamiko posameznih biokemijskih procesov v grozdu. Pomanjkanje vodi do napak v razvoju grozdne jagode. Prisotnost mineralnih snovi v moštu je zelo pomembna za proces alkoholne fermentacije, ker predstavljajo pomemben faktor za razmnoževanje kvasovk. Z regulacijo vsebnosti mineralnih snovi v moštu v času alkoholne fermentacije kvasovke regulirajo režim prehrane, s tem pa tudi usmerjajo proces alkoholne fermentacije v pravo smer. Vloga nekaterih kovin pri stabilizaciji vina kot katalizatorjev in regulatorjev oksido-redukcijskih reakcij v vinu, je danes že splošno znana.

Pomembnejše mineralne snovi so: kalij in kalcij, magnezij, natrij, aluminij, železo, baker, cink, fosforna kislina, žveplova(VI) kislina, klorovodikova kislina, mikroelementi: mangan, bor, molibden (Muštović, 1985).

2.2 VINSKA KVASOVKA

Znanja o mikrobiologiji vinskih kvasovk in njihovi uporabi v vinarstvu izvirajo iz pionirskih študij Louisa Pasteurja. Pasteur je ugotovil, da so kvasovke mikroorganizmi, ki povzročajo alkoholno fermentacijo grozdnega mošta v vino. Od Pasteurja naprej je postal študij mikrobiologije alkoholnega vrenja intenziven in vedno bolj je pojasnjeval kompleksnost ekologije vinskih kvasovk. Kvasovke imajo velik pomen v vinarstvu, ker:

- vodijo proces vinske fermentacije,
- z avtolizo vplivajo na kakovost vina.

Fermentacija sladkorja v etanol je osnovni bioproces pretvorbe mošta v vino, ki ga preučujejo že okrog 150 let, od prvih raziskav Louisa Pasteurja (Amerine, 1985). Med fermentacijo kvasovke kot substrat porabljajo sladkor v moštu in ga presnavljajo v etanol, CO₂ in druge metabolite, ki prispevajo k strukturi in senzorični kakovosti vina. V osnovi delimo kvasovke, ki so sposobne fermentacije sladkorja v alkohol v dve skupini (Boulton *in sod.*, 1996):

- v močno vrelni kvasovke, ki fermentirajo sladkor v moštu v etanol in CO₂, imajo hitrejši metabolizem, so odporne na koncentracije etanola nad 6 vol.% in ne tvorijo produktov, ki so v vinu nezaželeni. Takšne kvasovke so v vinarstvu zaželeni (predstavniki rodu *Saccharomyces*),
- v šibko vrelni kvasovke, ki med vrenjem tvorijo poleg etanola številne spojine, ki so komponente kvara vina (acetaldehid, etilacetat, H₂S...). Običajno ne uspevajo pri koncentracijah etanola nad 5 vol.% in imajo počasnejši metabolizem v primerjavi z močnovrelnimi kvasovkami (predstavniki rodov *Kloeckera*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Brettanomyces*, *Torulaspora*, *Pichia*, *Dekkera*, *Candida*...)

V okviru vinarstva delimo vrenje mošta v vino kot:

- spontano ali naravno vrenje, kjer naravna populacija kvasovk, prisotna na površini grozdne jagode in pecljev začne fermentacijo mošta v vino,
- vodene fermentacije, kjer ločimo relativno čisto vrenje in absolutno čisto vrenje. V obeh primerih v mošt dodajo vcepke selekcioniranih kultur kvasovk. V primeru absolutno čistega vrenja mošt pred dodatkom vcepka in vrenjem pogosto pasterizirajo in tako uničijo naravno prisotno populacijo mikroorganizmov. Selekcionirane kvasovke omogočajo hiter začetek fermentacije, v primeru relativno čistega vrenja že v začetku fermentacije presegajo koncentracije naravne populacije mikroorganizmov v moštu, kjer s svojo aktivnostjo močno zavrejo razmnoževanje mikroorganizmov, povzročiteljev kvara vina (Šikovec, 1980).

V sodobni tehnologiji vinarstva uporabljajo kemijske preparate, ki z baktericidnim učinkom zavirajo razmnoževanje kvasovk šibkega vrenja in ostalih nezaželenih mikroorganizmov. Uporaba selekcioniranih kultur kvasovk, regulacija temperature vrenja mošta in razne tehnološke rešitve omogočajo izvajanje vodenih bioprocesov fermentacije mošta v vino (Šikovec, 1980).

2.2.1 MORFOLOGIJA VINSKE KVASOVKE

Vinska kvasovka je enocelični mikroorganizem, ki sodi v veliko skupino gliv. Pod mikroskopom jo spoznamo po obliki okroglih, jajčastih in elipsoidnih celic, ki imajo premer od 4 do 16 μm . Celica kvasovke je sestavljena v glavnem iz celične stene, protoplazme in celičnega jedra (Judež, 1981).

2.2.1.1 Celična stena

V zadnjih 20 letih so raziskovalci v veliki meri razširili znanja o sestavi celične stene kvasovk, ki predstavlja 15 – 25 % suhe mase celotne celice. Sestavljena je iz polisaharidov. Je multifunkcionalna organela, ki ščiti celico, ji daje obliko, omogoča kontakt med celicami, dovoljuje sprejem snovi od zunaj in omogoča vezavo nanjo ter vključuje specializirane encimske aktivnosti (Fleet, 1991). Splošno ji pripisujejo rigidnost in obenem elastičnost, saj je sposobna prenesti velike osmotske in mehanske tlake. Ima debelino od 150 do 400 nm in predstavlja približno 25 % mase celice (Robinow in Johnson, 1991; Rose in Harrison, 1998). Vsekakor pa je sestava celične stene odvisna od ravnega okolja, pogojev rasti, starosti celice in vrstne specifičnosti kvasovke (Raspor, 1996).

2.2.1.2 Plazemska membrana

Plazemska membrana deluje kot 8-10 μm sloj med celično zunanostjo in njeno notranostjo. Njena funkcija je regulacija vstopa hranil in izstopa metabolitov. Dodatno omogoča sintezo komponent celične stene in izhod ekstracelularnih encimov. Sestavljena je iz lipidov in proteinov v približno enakem razmerju. Plazemska membrana kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* je sestavljena iz 40 % lipidov in 50 % proteinov. Glukani in manani so prisotni le v majhnih količinah. Glavni fosfolipidi membrane so: glicerolfosfolipidi, sfingolipidi in steroli. Prisotni fosfolipidi zagotavljajo prepreko med zunanostjo in notranostjo ter obratno. Plazemska membrana predstavlja čvrsto, hidrofobno pregrado med citoplazmo in okoljem izven celice zaradi njenih fosfolipidov in sterolov. Predstavlja določeno nepropustnost za raztopine, v funkciji osmotskih lastnosti. Zaradi svojega sistema permeaz, membrana kontrolira izmenjavo snovi med celico in medijem. (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998)

Transportni sistem sladkorjev skozi membrano še ni dokončno pojasnjen. Obstajata najmanj dva načina transporta: visoko afinitetni sistem in nizko afinitetni sistem. Nizko afinitetni sistem igra veliko vlogo v lag fazi in njegova aktivnost se zmanjša v stacionarni fazi. Visoko afinitetni sistem deluje pri velikih koncentracijah glukoze, kot v primeru grozdnega mošta (Salmon *in sod.*, 1993).

2.2.1.3 Citoplazma in organele v citoplazmi

Med plazemsko membrano in membrano jedra, se nahaja citoplazma in v njej citoplazmatske substance ali citosol in organele. Te organele so: endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat, vakuole in mitohondriji. Od citosola so organele ločene z membrano. Citosol je puferna raztopina, s pH med 5 in 6, vsebuje topne encime, glikogen in ribosome.

Encimi, ki sodelujejo pri glikolizi in pri alkoholni fermentaciji, kot tudi trehalaza (encim, ki katalizira hidrolizo trehaloze) se nahajajo v citosolu.

Endoplazmatski retikulum je sistem dveh membran, ki deli citoplazmo. Povezan je s citoplazemsko membrano in jedrno membrano. Njegova funkcija je, da zagotavlja prepoznavanje proteinov, ki jih sintetizirajo ribosomi.

Golgijev aparat je sestavljen iz sklada membranskih ovojnic in vključenih mehurčkov. Ima dvojno funkcijo: odgovoren je za glikolizacijo proteinov in za razvrstitev tako preko mehurčkov ali direktno v vakuolo ali v plazemsko membrano. Vakuole so organele sferičnih oblik, obdane z enojno membrano. Vakuole igrajo pomembno vlogo pri prepuščanju celularnih proteinov. Imajo pa tudi sekundarno funkcijo in sicer skladiščijo metabolite pred njihovo uporabo (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998).

Mitochondriji se nahajajo v okolici citoplazme, neposredno ob plazemski membrani v obliki podolgovatih in okroglih struktur z jasno izraženima membranama, od katerih tvori notranja značilne invaginacije – kriste. Mitochondriji zavzemajo po ocenah 12 % volumna celotne prostornine celice. Njihovo obliko in število pogojujejo spremembe v celičnem ciklusu in fiziološkem stanju organizma, ki je odvisno od okolja. Delovna funkcija mitochondrija je vezana na posedovanje encimov, ki vodijo cikel trikarboksilnih kislin (TCA). Prav tako poteka na notranji membrani transport elektronov in oksidativna fosforilacija, ki napaja celico s potrebno obliko energije (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998).

2.2.1.4 Jedro

Jedro je sferoidne oblike s približno 2 μm premera. V času intenzivne rasti ga lahko lociramo med vakuolo in brstom ali pa ob največji vakuoli v mirujočih celicah. Vsi poznani procesi mitoze in mejoze potekajo v jedrni regiji. Vakuole igrajo pomembno vlogo v notranjih tokovih snovi v celici in se močno spreminjajo med rastnim ciklom. Njihova funkcija je v vzdrževanju rezervoarja metabolitov in hidrolitičnih encimov (Zinser *in sod.*, 1995). V številnih kvasovkah so pogosto prisotne lipidne kapljice. Sodelujejo v metabolizmu nekaterih substratov. Urejene transportne poti potekajo od jedra preko endoplazmatskega retikuluma v Golgijev aparat in od tu v vakuole ali pa z vezikli na citoplazmino membrano in v zunanje okolje celice (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998).

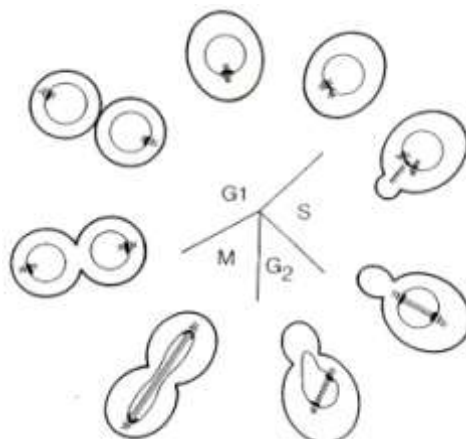
2.2.2 RAST IN DELITEV CELICE IN NJENE POJAVNE OBLIKE

2.2.2.1 Vegetativno razmnoževanje

Razmnoževanje, rast in delitev celic so v splošnem vezani na brstenje in cepljenje. Če se ne tvori psevdomicelij ali pravi micelij, se potomec oddeli od starša takrat, ko hčerinska celica doseže približno velikost materinske celice. To je vegetativno ali nespolno razmnoževanje, pri čemer hčerinska celica sprejme polovico vseh prisotnih struktur materinske celice.

Cikel delimo v faze:

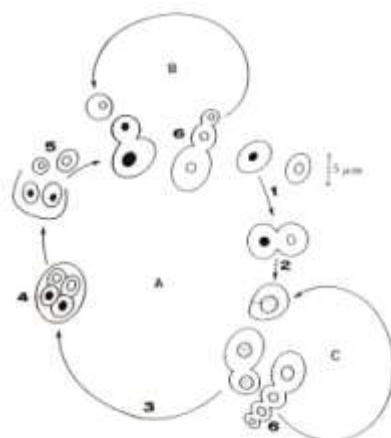
G_1 - to je faza, v kateri celica raste,
S – čas sinteze DNA,
 G_2 - konec sinteze DNA,
M - stacionarna faza.



Slika 1.: Razmnoževalni cikel z brstenjem (Raspor, 1996).

2.2.2.2 Spolno razmnoževanje

Spolna stanja pri kvasovkah imajo lahko dve pojavnosti: konjugacijo in oblikovanje spor. S kopulacijo dveh kvasnih celic oziroma spor se začne spolni krog, ki vodi v oblikovanje asko - oziroma bazidiospor. Kvasovka ima haploidni in diploidni del cikla. Organizem, v katerem je haploidna ali diploidna oblika stabilna in se množi poljubno dolgo, pojmujemo kot haploiden ali diploiden. Redukcijska delitev (mejoza) diploidnih oziroma poliploidnih celic in oblikovanje spor poteka v aerobnih razmerah. Redukcijska delitev pri kvasovkah privede do različnega števila spor. Indukcija sporulacije je najučinkovitejša v zgodnji stacionarni fazi, ko je na razpolago še obilo celičnega glikogena. Ko se začne mejoza, si dogodki sledijo: sinteza DNA, parjenje, rekombinacija, segregacija. Ob ugodnih pogojih spore vzkalijo in nadaljujejo življenjski krog (Adamič, 1992, Raspor, 1996).



Slika 2.: Razmnoževalni cikel rodu *Saccharomyces*: **A** – seksualna reprodukcija, 1 – kopulacija, 2 – fuzija, 3 – mejoza, 4 – askus, 5 – spore, 6 – brstenje haplo- oz. diploidnih celic; **B** – haploidni neseksualni cikel, **C** – diploidni neseksualni cikel (Raspor, 1996).

2.2.4 ŽIVLJENJSKE STOPNJE KVASOVKE PRI VRENJU

Vinska kvasovka ima več razvojnih stopenj, ki so povezane z vrenjem mošta in zorenjem vina (Judež, 1965):

- **razmnoževanje**; v glavnem z brstenjem. Hitrost razmnoževanja vinske kvasovke je odvisna v glavnem od življenjskih razmer. V času brstenja potekajo v kvasovki pomembni procesi, od katerih je najbolj pomembna pretvorba sladkorja v etanol in ogljikov dioksid. Nastali alkohol postane inhibitor, ki jo ovira pri razmnoževanju.
- **intenzivno vrenje**; razmnoževanje kvasovk se zmanjšuje zaradi vse večje količine alkohola. Kvasovke vrejo intenzivno; v tem stanju si nakopičijo v notranjosti rezervne snovi, posebno glikogen. V tej fazi se nahajajo vsaka zase, ker ogljikov dioksid razbija večje kolonije.
- **stradanje**; ko kvasovkam v vinu začne primanjkovati sladkorja, porabljajo za prehrano svoje rezervne snovi, predvsem glikogen. Kvasovke se počasi zmanjšujejo, citoplazma pa dobi izrazito znato strukturo.
- **stanje odmiranja in razpadanja**; če kvasovke dalj časa nimajo hrane, poginejo. Mrtve kvasovke razpadejo, kar je škodljivo za vino.
- **razpadanje, avtoliza**; v končni stopnji fermentacije mošta nastopi avtoliza kvasovk. Notranja struktura celice se poruši. Celične komponente, proteini, lipidi, nukleinske kisline, polisaharidi so podvrženi endogeni encimski razgradnji v produkte, ki imajo pomemben vpliv na senzorično kakovost vina, hkrati pa predstavljajo podlago za razvoj mlečnokislinskih bakterij in tudi nezaželenih tehnoloških kvarljivcev (Charpentier in Feuillat, 1993).
- **oksidativno stanje** po koncu vrenja, v nepolnem ali odprtem sodu, ko je dostop zraka večji, ustvarijo kvasovke na površini vina prevleko. Tako prevleko tvorijo oksidativne kvasovke. V tem stanju nastajajo estri iz očetne kisline in alkohola in ti dajejo vinu posebno cvetico, ki jo imenujemo »sherry« cvetica (Judež, 1965).

2.2.5 RASTNA KINETIKA

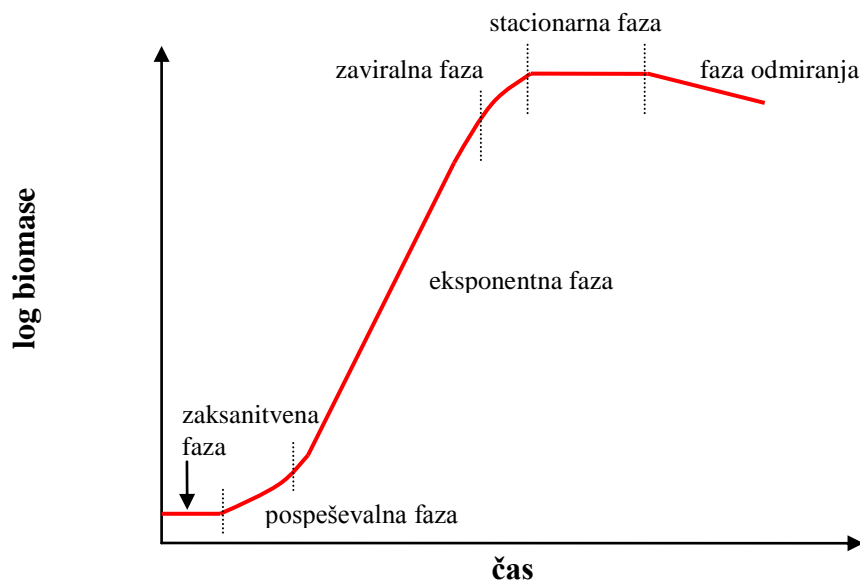
Med potekom fermentacije grozdnega mošta v vino populacija kvasovk naraste iz gostote $10^4 - 10^6$ celic/mL na $10^8 - 10^9$ celic/mL (Bely *in sod.*, 1990). Rast v šaržni kulturi lahko opišemo s tipično rastno krivuljo s štirimi fazami (Slika 2.2.3.):

- zakasnitvena faza
- eksponentna faza
- stacionarna faza
- faza odmiranja

Kinetiko rasti opisujemo z različnimi termini:

- ... dolžina trajanja zakasnitvene faze
- ... specifična konstanta rasti
- ... maksimalna celična populacija
- ... dolžina trajanja stacionarne faze in faze odmiranja

Te karakteristike se spreminjajo s fermentacijo in so odvisne od številnih dejavnikov. Prenehanje rasti kvasovk pa ni nujno povezano tudi s prenehanjem metabolizma v celicah (Fleet in Heard, 1993).



Slika 3.: Cikel rasti mikroorganizma v šaržni kulturi

Potek rasti kvasovk sledi običajnim fazam, zaksnitveni fazi, eksponentni fazi, stacionarni fazi in nadalje znižanju koncentracije kvasovk - fazi odmiranja. Med fermentacijo se kvasovke razmnožujejo z brstenjem. Na začetku fermentacije je njihovo razmnoževanje intenzivnejše in se tvori manj etanola. Nadalje se razmnoževanje postopoma zmanjšuje in nastaja več etanola (intenzivno vrenje – eksponentna faza rasti). Kvasovke v eksponentni fazi rasti skladiščijo energijo v obliki glikogena in trehaloze znotraj celice. Naraščajoča koncentracija etanola med fermentacijo deloma upočasnjuje rast kvasovk. Etanol deluje uničujoče na membrano in proteine kvasovk. Mikroorganizem se na takšne pogoje odziva s sintezo trdnejše celične membrane. Ko kvasovke v vinu nimajo več dovolj sladkorja, prično trošiti lastne rezervne snovi, predvsem glikogen (stacionarna faza rasti). Ob izrabi hranil prične skupaj s toksičnim učinkom etanola faza odmiranja biomase (Judež, 1965).

Potek fermentacije je mogoče zasledovati preko merjenja biomase (merjenje živih celic sposobnih rasti in razmnoževanja, suhe mase celic, štetjem pod mikroskopom), merjenja produkcije CO₂, etanola in porabe sladkorja. Številni faktorji vplivajo na celično rast in kinetiko fermentacije. Ti faktorji so predvsem: temperatura fermentacije, sestava mošta, vsebnost žveplovega dioksida, vrsta selekcionirane kulture kvasovk, interakcija z drugimi mikroorganizmi in avtoliza kvasovk.

2.3 BIOKEMIJA ALKOHOLNE FERMENTACIJE IN METABOLIZEM VINSKIH KVASOVK

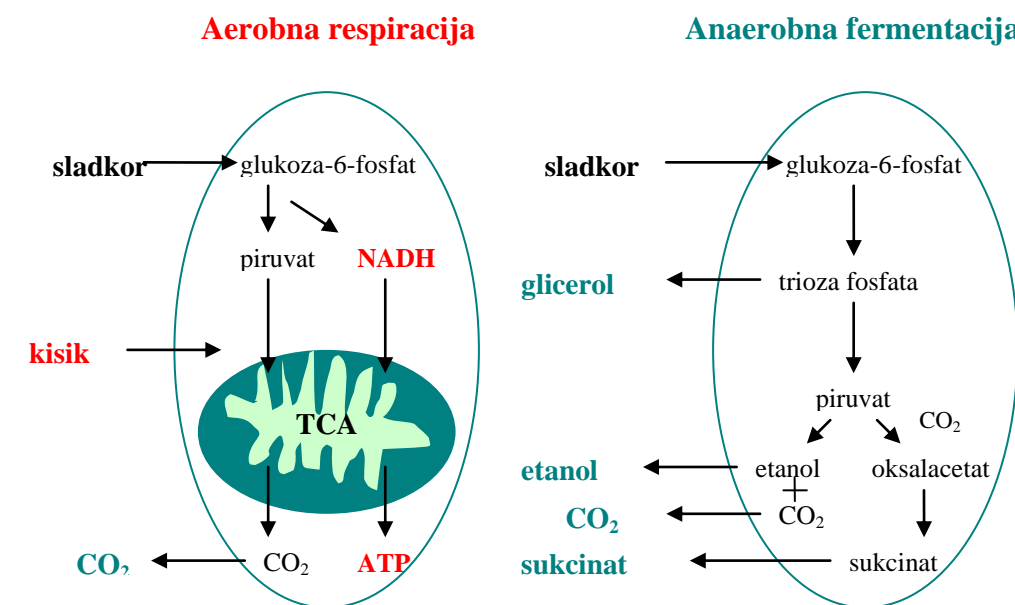
2.3.1 AEROBNI IN ANAEROBNI METABOLIZEM

Najpomembnejši izvor energije pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* je glukoza. Glikoliza je glavna metabolna pot za konverzijo glukoze do piruvata, pri kateri vzporedno nastaja energija v obliki ATP in se tvorijo intermediati ter reduktivna moč v obliki NADH za biosintezne metabolne poti. Ločimo dva osnovna metabolna modela nadaljnje razgradnje piruvata za produkcijo energije:

- aerobni proces - respiracija: nastajanje biomase
- anaerobni proces - fermentacija: nastajanje etanola

Ob tem razgradnja glukoze do piruvata poteka po enaki poti v anaerobnih in aerobnih pogojih. Med glikolizo poteka razgrajevanje glukoze preko fruktoza-1,6-difosfata in glicerolaldehid-3-fosfata do piruvata. (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998)

Ob prisotnosti kisika vstopa piruvat v mitohondrij, kjer se oksidativno dekarboksilira v acetyl-CoA s piruvat-dehidrogenaznim kompleksom encimov. Ta reakcija poveže glikolizo s ciklom trikarboksilnih kislin, v katerem se acetyl CoA oksidira in daje kot končni produkt dve molekuli CO₂ in reduktivne ekvivalente v obliki NADH in FADH₂. Cikel trikarboksilnih kislin je amfibolna metabolna pot razgradnje piruvata, ker združuje kombinacijo katabolnih in anabolnih funkcij. Med alkoholno fermentacijo sladkorjev, kvasovke reoksidirajo NADH v NAD⁺ v dvostopenjski reakciji od piruvata, ki se prvotno dekarboksilira s pomočjo piruvat dekarboksilaze. Temu sledi redukcija acetaldehida, katalizirana z alkohol dehidrogenazo (ADH). Hkrati s to reakcijo nastaja iz dihidroksiacetonfosfata tudi glicerol, kar zagotavlja nastanek NAD⁺.



Slika 4.: Metabolizem kvasovke v aerobnih in anaerobnih pogojih
(http://biochemie.web.med.unimuenchen.de/Yeast_Biology/03_Metabolism.ht)

Biokemijske reakcije, ki potekajo med fermentacijo grozdnega mošta s pomočjo vinske kvasovke, se delijo v tri sklope. In sicer:

- aerobni proces - respiracija
- biokemija alkoholne fermentacije
- metabolizem dušikovih spojin

2.3.2 ANAEROBNA FIZIOLOGIJA KVASOVK *Saccharomyces cerevisiae*

Med fermentacijo grozdnega mošta se sladkorji presnavljajo v bioprocesu glikolize. Končni produkt glikolize je piruvat. Serija reakcij, ki glukozo pretvarjajo v piruvat, z nastankom ATP, predstavlja nekakšno univerzalno shemo v bioloških sistemih.

2.3.2.1 Glikoliza

Glikoliza poteka ob pomoči desetih encimov v citoplazmi celice (Slika 5.). Njena glavna naloga je transformiranje molekul glukoze na preprostejše molekule. To je stopenjski proces, ki ga katalizira večencimski sistem, ki ga sestavlja 13 glavnih encimov in nekaj koencimov. Ta proces glikolize se imenuje EMP-pot (Embden-Mayerhof-Parnas). Posamezne faze, ki karakterizirajo ta proces so:

1. Transport glukoze in fruktoze iz grozdnega mošta preko celične stene in skozi plazemsko membrano aktivira kompleksni sistem proteinskega transporta. Glukoza in fruktoza potujeta v celico z mehanizmom difuzije, saharoza pa je predhodno s pomočjo ekstracelularnih invertaz razgrajena na monosaharide. Mehanizem pospešuje difuzijo heksoz iz mošta v citoplazmo, kjer poteka metabolizem. Ker raztopina potuje v smeri koncentracijskega gradienta, iz koncentriranega zunanega medija v manj koncentriran medij v notranjosti, to ni aktivni transport, ki zahteva energijo. Neposredno ob prestopu sladkorjev preko celične membrane sledi fosforilacija sladkorjev, preko ene od treh kinaz (heksokinaza PI, heksokinaza PII, glukokinaza) (Bisson, 1993). ATP (adenozin trifosfat) služi kot fosfatni donator v reakciji. Nadalje se proces glikolize odvija v citosolu celice. V prvi stopnji razgradnje se glukoza transformira v fruktoza 1,6-difosfat, kar zahteva 2 ATP molekuli. Ta stopnja sama pa vključuje tri korake: začetno fosforilacijo glukoze v glukoza 6-fosfat, izomerizacijo v fruktoza 6-fosfat in sekundarno fosforilacijo, po kateri nastane fruktoza 1,6-difosfat. Te tri reakcije so katalizirane z encimi: heksokinaza, fosfoglukozaza, izomeraza, fosfoglukokinaza. Pravzaprav ima *Saccharomyces cerevisiae* dve heksokinazi (heksokinaza PI in heksokinaza PII) odgovorni za fosforilacijo glukoze in fruktoze. Heksokinaza PII je bistvena in je aktivna predvsem med lag fazo v mediju z večjimi koncentracijami sladkorja. Heksokinaza PI pa je delno zavirana z glukozo in ni aktivna vse do stacionarne faze (Bisson, 1993).
2. V drugi fazi poteka tvorba glicerolaldehid 3-fosfata. S katalitičnim delovanjem encima aldolaze, se molekula fruktoza-1,6-difosfat cepi in tvori dve fosfotriozi: dihidroksiacetonfosfat in glicerolaldehid-3-fosfat (GA3P). Oba produkta sta v ravnotežni koncentraciji med seboj, kar omogoča encim triozafosfatizomeraza. (Bisson, 1993)

3. Tretja faza združuje dve stopnji, ki ponovno nadomestita del porabljene energije od glicerolaldehid 3-fosfata (GA3P). Najprej se glicerolaldehid 3-fosfat (GA3P) oksidira v 1,3-difosfoglicerat (1,3-BPG) preko NAD-encima. Ta reakcija je katalizirana z glicerolaldehid-3-fosfat-dehidrogenazo. Istočasno poteka redukcija koencima NAD^+ v NADH. To je reakcija oksidacije, združena s fosforilacijo. Nikotinamid-adenozin difosfat (NAD^+) je kofaktor hidrogenacije. Na tej stopnji je v svoji oksidirani obliki, nikotinamid je reaktivni del molekule. NAD^+ sprejme dva elektrona in vodikov atom, izgubljen pri oksidaciji substrata. Fosfoglicerolkinaza katalizira transfer fosforilnih skupin acilfosfata iz 1,3-BPG do ADP; v tej stopnji nastaneta 3-fosfoglicerat in ATP. V tej točki sta bili porabljeni in generirani dve molekuli ATP, energijska bilanca procesa je uravnotežena. (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998)
4. Zadnja faza glikolize je transformacija 3-fosfoglicerata v piruvat. Fosfoglicerat mutaza katalizira konverzijo 3-fosfoglicerata v 2-fosfoglicerat. Enolaza katalizira pretvorbo 2-fosfoglicerata v fosfoenolpiruvat. Encim piruvatkinaza pretvori fosfoenolpiruvat v zadnji stopnji v piruvat ob nastanku molekule ATP iz molekule ADP in prenesene fosfatne skupine. Na ta način nastajajo pri glikolizi 4 molekule ATP. Dve se takoj porabita za aktivacijo novih molekul heksoze. Med glikolizo nastaneta dve molekuli ATP na molekulo heksoze. (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998).

Zaradi omejene količine molekul koencima NAD^+ , ki se med glikolizo reducirajo v NADH je za neprekinjen potek procesa glikolize pomembna faza fermentacije, ki omogoča reoksidacijo NADH molekul v NAD^+ . Encim piruvatdekarboksilaza pretvori v bioprocesu fermentacije piruvat v acetaldehid in CO_2 . V tej reakciji je potreben kofaktor tiaminpirofosfat. V naslednji fazi encim alkoholdehidrogenaza (ADH I) reducira acetaldehid v etanol ob reoksidaciji NADH v NAD^+ (Malik, 1998).

Tvorba pirogrodne kisline predstavlja pomembno stopnjo v procesu alkoholne fermentacije, to je drugi most pri tvorbi glavnih produktov tega procesa. V tej stopnji fosforna kislina zapusti molekulo sladkorja in se veže z ADP. V nadaljnjih reakcijah piruvična kislina podleže dekarboksilaciji in to je trenutek ko se v procesu alkoholne fermentacije pojavi ogljikov dioksid pri tem pa se tvori acetaldehid. Nastali acetaldehid se z redukcijo pretvarja v etanol.

Količina nastalega etanola, proizvedenega na enoto porabljenega sladkorja med fermentacijo, predstavlja po teoretičnih izračunih, kjer izključimo rast biomase in izgubo etanola v obliki hlapov 51,1 % (teoretično se 180 g sladkorja pretvori v 88 g CO_2 in 92 g etanola). Pri optimalnih pogojih fermentacije mošta se pretvori: 70-80 % sladkorja v etanol, 4,5-10 % v glicerol, 0,5-2 % v jantarno kislino, okrog 0,5 % sladkorja v očetno kislino in 10-13 % v biomaso (Rose in Harrison, 1998).

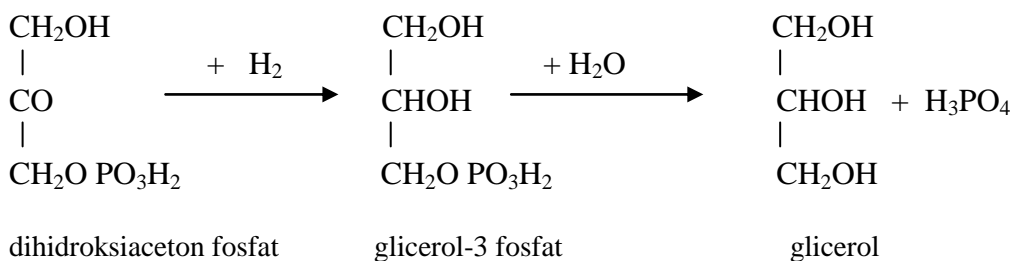
Anaerobna konverzija glukoze v etanol s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* je redoks nevtralna in NAD^+ , ki se porablja v začetku procesa Embden-Meyerhof-Parnas-ove metabolne poti, se regenerira ob nastanku etanola. Kadar intermediati EMP metabolne poti postanejo prekursorji za sintezo celičnega materiala, je to ravnotežje porušeno. Presežek nastalega NADH se ne spreminja nazaj v NAD^+ . To lahko povzroči zaustavitev metabolizma, če ne obstaja proces, pri katerem se NAD^+ regenerira. Med anaerobno rastjo se NADH ne more oksidirati s kisikom, ampak se regenerira z nastankom sekundarnih produktov, kot je glicerol v primeru *Saccharomyces cerevisiae* (Oura, 1977).

Glicerol je kvantitativno najpomembnejši sekundarni produkt anaerobne konverzije glukoze v etanol s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. Na osnovi mnogih študij vinskih fermentacij je Genevois (1936) ugotavljal povezavo med količino nastalega glicerola v mediju in količino nastalih sekundarnih produktov (ocetna kislina, jantarna kislina in acetaldehid). V kasnejših delih je ugotovil še povezavo nastanka glicerola zaradi nastanka biomase (Genevois, 1961).

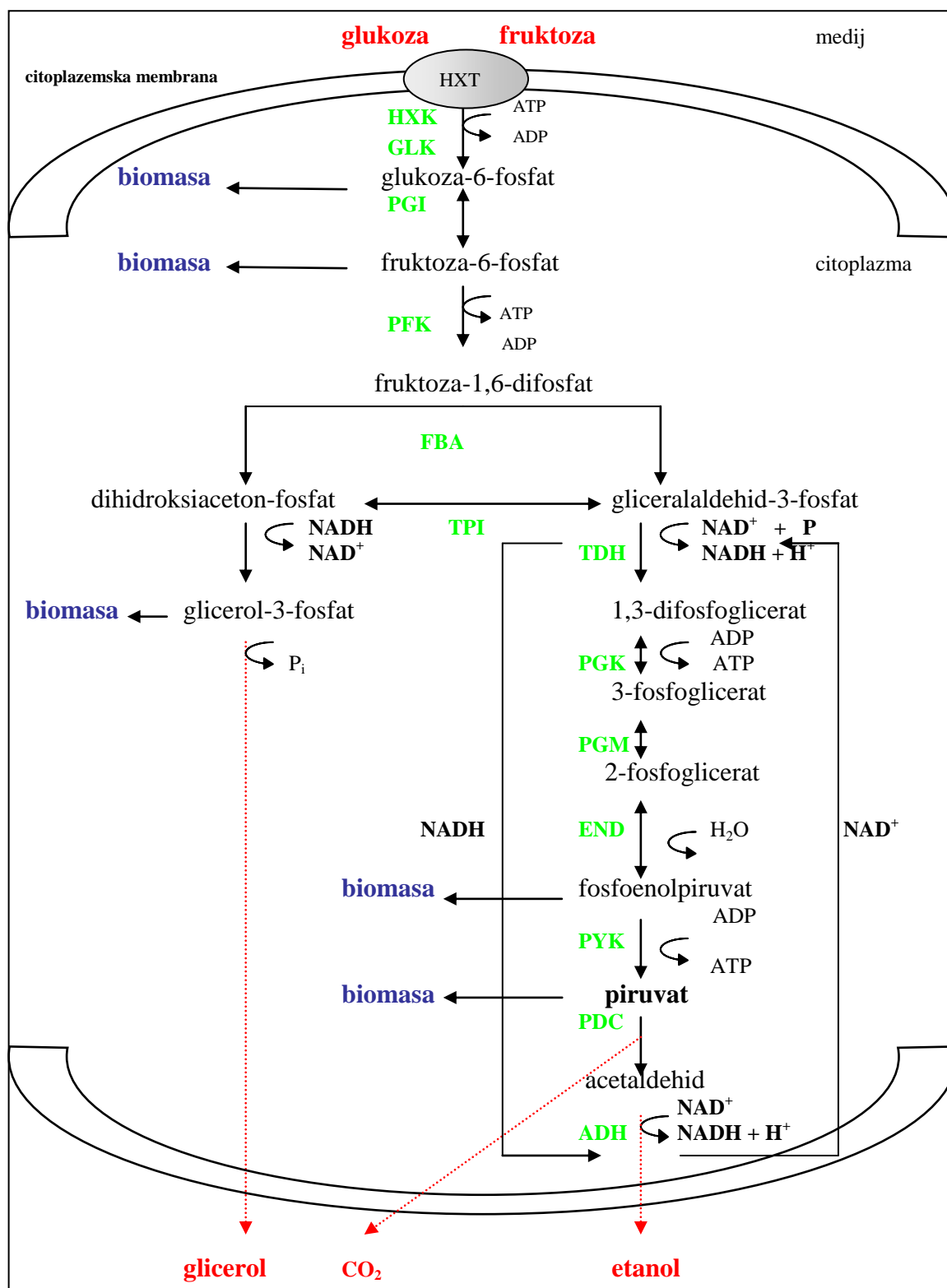
Stališče, da nastaja glicerol zaradi vzpostavitve redoks ravnotežja, je obveljalo kasneje z deli Barron in Levina (1952) in Holzerja *in sod.* (1963). Anabolizem je odgovoren za večji del nastalega glicerola in tudi za izločanje organskih kislin, kot so ocetna kislina, pirogrozdna kislina in jantarna kislina, kar zahteva kompenzatorni nastanek glicerola. Posebej tvorba jantarne kisline vodi do nastanka večjih količin glicerola. (Schulze, 1995)

Reducirajoča moč NADH, ki nastane pri glikolizi, se mora transformirati v končni akceptor elektronov, ki regenerira NAD⁺. Pri alkoholni fermentaciji to ni piruvat, ampak acetaldehid, produkt dekarboksilacije piruvata, ki deluje kot končni akceptorji elektronov. Z razliko od glikolize alkoholna fermentacija vsebuje dve dodatni encimski reakciji (Slika 2.3.2.). Pri prvi reakciji, katalizirani s piruvat dekarboksilazo, se dekarboksilira pirogrozdna kislina. Pri drugi reakciji pa se acetaldehid reducira v etanol z NADH. To reakcijo katalizira alkoholdehidrogenaza, katere aktivna stran vsebuje Zn²⁺ ion. (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998).

Pred nastankom acetaldehida opravlja v ciklusu kvasnega metabolizma vlogo akceptorja vodika dihidroksiacetonfosfat:



Pri tej reakciji nastaja glicerol-3 fosfat. S pomočjo fosfataze, se ob poteku hidrolize iz glicerol-3 fosfata izloči fosforna kislina. Končni produkt reakcije pa je glicerol, glavni predstavnik sekundarnih produktov alkoholne fermentacije. Glicerol nastaja v začetku procesa fermentacije, preden nastanejo večje količine acetaldehida, pravzaprav v fazi nastanka pirogrozdne kisline. S pojavom acetaldehida se vodik porablja za njegovo redukcijo in ne za redukcijo glicerolaldehid-3-fosfata in nastanek glicerola (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998).



Slika 5.: Shematični prikaz bioprocasa glikolize in alkoholne fermentacije.

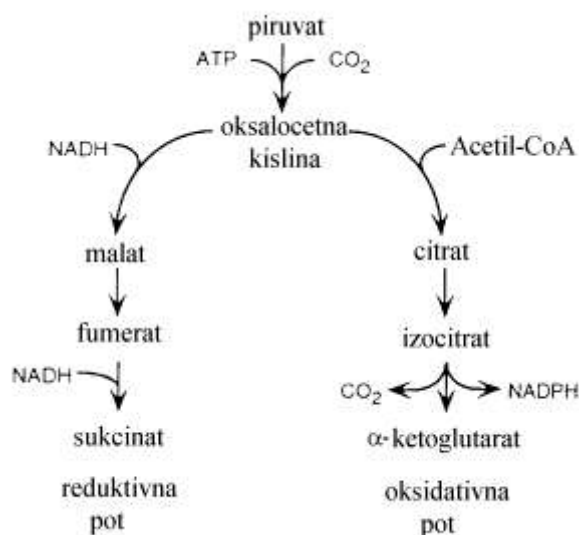
Pomen kratic na sliki: HXT (prenašalni protein za heksozo), HXK (heksokinaza), GLK (glukokinaza), PFI (fosfoglukoizomeraza), PFK (fosfofruktokinaza), FBA (aldolaza), TPI (triozafosfat izomeraza), TDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza), PGK (fosfoglicerat kinaza), PGM (fosfoglicerat mutaza), ENO (enolaza), PYK (piruvat kinaza), PDC (piruvat dekarboksilaza), ADH (alkohol dehidrogenaza). (Boulton *in sod.*, 1996)

2.3.3 SEKUNDARNI PRODUKTI GLICEROL PIROGROZDNE FERMENTACIJE

Poleg glicerola, kot enega glavnih sekundarnih produktov alkoholne fermentacije, nastajajo tudi drugi sekundarni produkti: očetna in jantarna kislina in 2,3-butandiol. Vsi ti produkti nastajajo v procesu alkoholne fermentacije iz enega dela acetaldehida, preden se le-ta preoblikuje v alkohol. Na začetku procesa, takoj po dekarboksilaciji piruvične kisline, se nastali acetaldehid ne reducira takoj v alkohol, ampak se porablja za nastanek sekundarnih produktov.

Kadar nastane glicerol iz molekule piruvata, se ta ne more transformirati v etanol. Pri anaerobnih pogojih je oksalacetat oblika, v kateri vstopa piruvat v cikel trikarboksilnih kislin, ki poteka v citosolu. Piruvatkarboksilaza je encim, ki katalizira karboksilacijo piruvata v oksalacetat. V anaerobnih pogojih se cikel karboksilnih kislin ne more popolnoma zaključiti, ker je za aktivnost encima sukcinatdehidrogenaza potrebna prisotnost FAD, ki je striktno respiratorni koencim. Veriga reakcij je tako prekinjena pri sukcinatu, ki se tako akumulira ($0,5 - 1,5 \text{ gL}^{-1}$). NADH, ki nastaja v tem delu Krebsovega cikla (od oksalacetata do sukcinata), se reoksidira z nastankom glicerola iz dihidroksiacetona (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 2000).

Ker ima α -ketoglutaratdehidrogenaza zelo nizko aktivnost v anaerobnih, se oksidativne reakcije Krebsovega cikla prekinijo pri α -ketoglutaratu. Po njihovem mnenju, reduktivna pot cikla trikarboksilnih kislin vodi do nastanka jantarne kisline po tej poti (Boulton *in sod.* 1996):



Slika 6.: Shematični prikaz sinteze jantarne in α -ketoglutarjeve kisline (Boulton *in sod.* 1996)

Pri kvasovkah je to najbrž glavna metabolna pot, ker lahko le oksidativna pot Krebsovega cikla skrbi za vzdrževanje redoks ravnotežja NAD^+/NADH med fermentacijo (Oura, 1977). Izmed sekundarnih produktov so pomembne ketonske komponente (pirogrozdna kislina, α -ketoglutarjeva kislina) in acetaldehid. Njihovo izločanje je največje med stopnjo bujne rasti kvasovk in začne padati proti koncu fermentacije. Acetaldehid se sprošča v prisotnosti prekomernih količin žveplovega dioksida v moštu. Zvišan pH in fermentacijska temperatura,

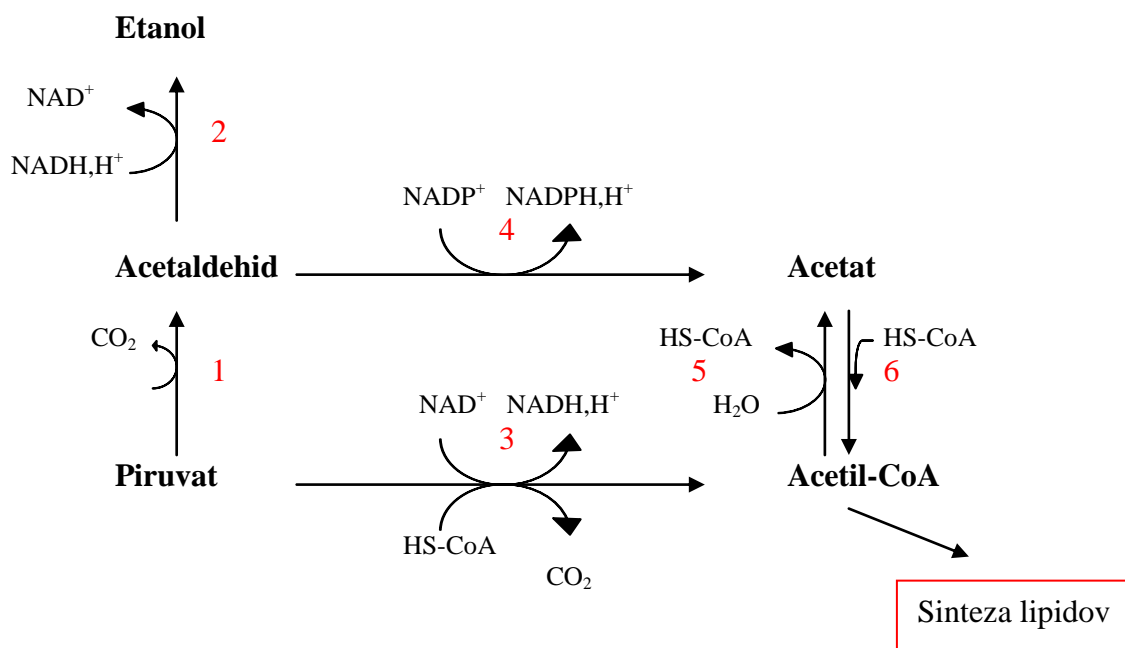
anaerobni pogoji ter primanjkljaj tiamina in pantotenske kisline povečajo produkcijo ketonskih kislin. Dodajanje tiamina v mošt limitira akumulacijo ketonskih komponent v vinu (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 2000a).

Drugi sekundarni produkti fermentacije, ki prav tako izhajajo iz pirogrozdne kisline, so: očetna kislina, mlečna kislina, butandiol, diacetil in acetoin.

2.3.3.1 Tvorba in kopičenje očetne kisline

Očetna kislina je glavna hlapna kislina v vinu. Nastaja zlasti med kvarnim delovanjem bakterij, vedno pa nastaja tudi med kvasno fermentacijo. Nad določeno mejo, katera je odvisna od vina in znaša $1,0 \text{ gL}^{-1}$ za bela vina in $1,2 \text{ gL}^{-1}$ za rdeča vina, ima očetna kislina škodljiv senzorični vpliv na kakovost vina. V zdravem grozdnem moštu s koncentracijo sladkorja manj kot 220 gL^{-1} , proizvaja *Saccharomyces cerevisiae* relativno majhne količine očetne kisline ($100 - 300 \text{ mgL}^{-1}$) (Lafon-Lafourcade, 1983).

Biokemijsko nastaja očetna kislina s hidrolizo acetil CoA. Piruvatdehidrogenaza proizvaja acetil CoA s predhodno oksidativno dekarboksilacijo pirogrozdne kisline. Reakcija poteka v matrici mitohondrijev in je limitirana v anaerobnih pogojih. Aldehid dehidrogenaza lahko prav tako tvori očetno kislino z oksidacijo acetaldehida (Slika 2.3.4.) (Verduyn *in sod.*, 1990).



Slika 7.: Nastanek očetne kisline v kvasovkah (1 = piruvat dekarboksilaza; 2 = alkohol dehidrogenaza; 3 = piruvat dehidrogenaza; 4 = aldehid dehidrogenaza; 5 = acetil-CoA hidrolaza; 6 = acetil CoA sintetaza) (Schulze, 1995)

Majhne količine očetne kisline nastajajo med alkoholno fermentacijo kot sekundarni produkt delovanja kvasovk. Pogoji pri pridelavi vina so tisti, ki določajo nastanek večjih koncentracij očetne kisline v vinu. Podobno kot pri glicerolu, je tudi nastanek očetne kisline odvisen od začetne koncentracije sladkorja v moštu in je neodvisen od količine fermentiranega sladkorja (Tabela 1.). Večja kot je koncentracija sladkorja, več očetne kisline in glicerola kvasovke izločajo med procesom fermentacije (Lafon-Lafourcade, 1983).

Tabela 1.: Vpliv začetne koncentracije sladkorja v moštu na nastanek sekundarnih produktov fermentacije (Lafon-Lafourcade, 1983)

Začetni sladkor (gL ⁻¹)	Fermentirani sladkor (gL ⁻¹)	Sekundarni produkti		
		očetna kislina (gL ⁻¹)	glicerol (gL ⁻¹)	jantarna kislina (gL ⁻¹)
224	211	0.26	4.77	0.26
268	226	0.45	5.33	0.25
318	211	0.62	5.70	0.26
324	179	0.84	5.95	0.26
348	152	1.12	7.09	0.28

Drugi dejavniki, ki v vinarstvu povečajo produkcijo očetne kisline so še: aerobnost, nizek pH (< 3.1) ali visok pH (> 4), primanjkljaj določenih aminokislin ali vitaminov v moštu in visoke temperature v fazi rasti kvasovk (25 – 30 °C) (Lafon-Lafourcade, 1983).

Med fermentacijo rdečih in belih vin kvasovke ne izločajo očetne kisline med celotnim postopkom. Kvasovke lahko izločajo večje količine očetne kisline izločene v moštu v času presnavljanja prvih 50 – 100 g sladkorja. Očetna kislina se potem reducira do acetaldehida, ki prednostno podpira alkoholno fermentacijo na škodo glicerol - pirogrozdne fermentacije. Ker se očetna kislina ne presnavlja v drugi polovici fermentacije, se akumulira v vinu do zaključka fermentacije (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 2000a).

2.3.3.2 Drugi sekundarni produkti fermentacije

Tako kot očetna kislina, tudi mlečna kislina nastaja iz piruvata, ki ga kvasovke reducirajo s pomočjo L(+) in D(-) laktatdehidrogenaz. V anaerobnih pogojih kvasovke sintetizirajo predvsem D(-) laktatdehidrogenaze. Kvasovka tvori 200 – 300 mg D(-) mlečne kisline na liter in le zelo majhne količine L(+) mlečne kisline. Mlečna kislina nastaja predvsem v začetku fermentacije. Kvasovke uporabljajo pirogrozdno kislino tudi za biosintezo acetoina, diacetila in 2,3-butandiola. Proces se prične s kondenzacijo molekule piruvata in aktivne acetaldehidne vezi s tiaminpirofosfatom, ki vodi do nastanka mlečne kisline. Že od začetka alkoholne fermentacije kvasovke tvorijo diacetil, ki se nato hitro reducira do acetoina in do 2,3-butandiola. Ta redukcija poteka po končani fermentaciji. Acetoin in diacetil močno spominjata na aromo masla (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 2000).

2.3.4 CIKEL TRIKARBOKSILNIH KISLIN – TCA CIKEL

Cikel trikarboksilnih kislin ali TCA cikel igra pomembno vlogo v oksidativni rasti in metabolizmu kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Ta presnovna pot zagotavlja reduktivne ekvivalente, ki se porabljajo v dihalni verigi, kjer nastaja energija v obliki ATP. Prav tako ima TCA cikel pomembno vlogo v procesih biosinteze, posebej v tistih, kjer nastajajo

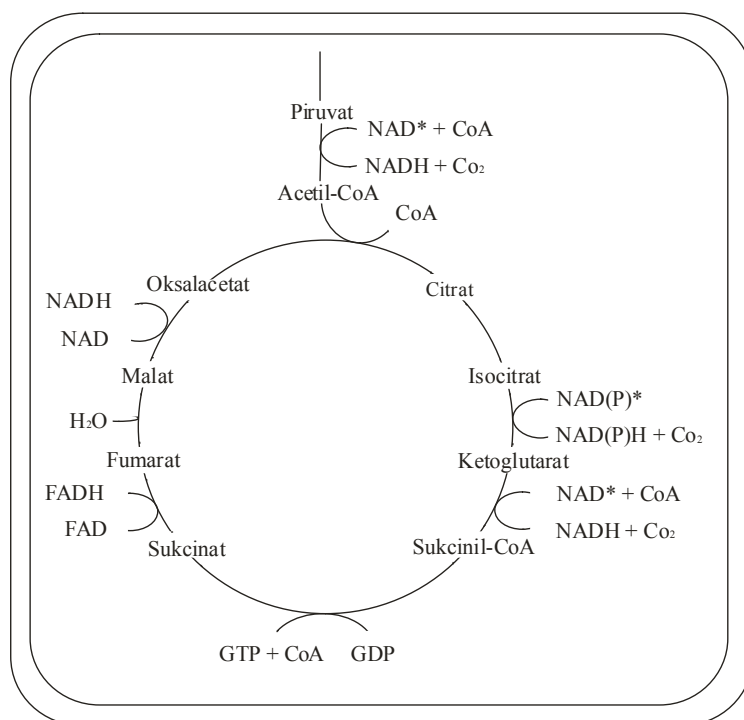
aminokislina. Manjšo vlogo ima TCA cikel v centralnem, anaerobnem metabolizmu, natančneje pri tvorbi energije med anaerobno fermentacijo (Camarasa *in sod.*, 2003).

Tradicionalno je cikel trikarboksilnih kislin (TCA cikel) označen kot katabolna metabolna pot, zaradi svoje vloge pri aerobnih procesih, pri katerih poteka popolna oksidacija piruvata do CO_2 , z vzporedno tvorbo energije ATP. V TCA ciklu nastajajo tudi prekursorji za biosinteze in pri anaerobnih pogojih je to edina funkcija TCA cikla. Iz tega sledi, da TCA cikel lahko okarakteriziramo kot anabolno pot. Anabolne reakcije so odgovorne za nastanek biomase (Schulze, 1995).

V mnogih raziskavah je bilo ugotovljeno, da se vsi encimi TCA cikla nahajajo in delujejo v mitohondrijih, torej pod anaerobnimi pogoji (Wales *in sod.*, 1980). Piruvat se v mitohondrije transportira z nosilcem, čemur sledi konverzija v acetil-CoA v reakciji, katalizirani s piruvat dehidrogenazo (PHD). Nastali acetil-CoA vstopa v TCA cikel s kondenzacijo z oksalacetatom.

Z vidika mikrobne fiziologije lahko TCA cikel opišemo z dvema ireverzibilnima reakcijama (Streyer, 1988):

1. kondenzacijo acetil-CoA in oksalacetata v citrat;
2. dekarboksilacijo in oksidacijo α -ketoglutarata v sukcinil-CoA



Slika 8.: Shematski prikaz TCA cikla ali Krebsovega cikla (Schulze, 1995)

2.3.5 REGULACIJA METABOLNIH POTI PRESNOVE SLADKORJA

Kvasovke lahko razvrstimo v različne skupine, glede na to ali energijo proizvajajo s pomočjo aerobnih ali anaerobnih procesov. Pomembno je, da so procesi večinoma regulirani z vplivom zunanjih faktorjev, od katerih sta najpomembnejša razpoložljivost glukoze in kisika. Kvasovke se lahko prilagodijo različnim ravnim pogojem, tudi znotraj ene vrste. Tako lahko, glede na pogoje iz okolice, same prilagajajo metabolno pot, po kateri razgrajuje glukozo. Glukozo lahko *Saccharomyces cerevisiae* porablja na več različnih načinov, odvisno od prisotnosti kisika in izvora ogljika.

2.3.5.1 Regulacija med fermentacijo in nastajanjem biomase: Pasteurjev in Crabtree efekt

Pasteur je podal primerjavo med aerobno in anaerobno rastjo kvasovk. Pri majhnih koncentracijah glukoze v mediju, kvasovke koristno porablja sladkor z nastajanjem biomase in s fermentacijo. Prezračevanje povzroča naraščanje nastale biomase in zmanjšanje količine nastalega etanola in porabe sladkorja. Pasteur je tako sklepal, da proces dihanja zavira alkoholno fermentacijo. Pasteurjev efekt je bil razložen na več načinov. Eden od njih razlaga, da gre za tekmovanje dveh encimov, ki katalizirata ali aerobni ali anaerobni proces presnove piruvata. Piruvat dekarboksilaza, ki je vključena v fermentativno pot, ima manjšo afiniteto do piruvata kot piruvat dehidrogenaza. Inhibicija glikoliznih encimov z ATP razlaga Pasteurjev efekt. ATP, ki nastaja pri oksidativni fosforilaciji, zavira posebej fosfofruktokinazo. Kot posledica tega se nabira fosforilirana heksoza. Membranski transport sladkorjev tako upočasnjuje glikolizo (Schulze, 1995).

Pri velikih koncentracijah glukoze – npr. v grozdnem moštu – pa kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* presnavljajo sladkorje le po fermentativni poti. Tudi v prisotnosti kisika je respiracija nemogoča. Ta fenomen je raziskal Crabtree (1929) in ga imenujemo tudi katabolna represija z glukozo, Pasteurjevemu nasprotni efekt ali Crabtree efekt. Kvasovke jasno kažejo ta efekt z naslednjimi znaki: degeneracija mitohondrijev, padec razmerja celičnih sterolov in maščobnih kislin in preprečitev obeh sintez Krebsovega cikla mitohondrijskih encimov in sestavnih delov dihalne verige. Z 9 g sladkorja na liter dosežemo Crabtree efekt pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*. V grozdnem moštu so kvasovke pri kateri koli koncentraciji prisotnega kisika, sposobne le fermentirati velike koncentracije glukoze in fruktoze (Schulze, 1995).

2.3.5.2 Regulacija med alkoholno in glicerol - pirogrozno fermentacijo: nastajanje glicerola

Vina vsebujejo približno 8 g glicerola na 100 g etanola. Med fermentacijo mošta se pretvori približno 8 % molekul sladkorja v glicerol - pirogrozno fermentaciji in 92 % alkoholni fermentaciji. Med fermentacijo prvih 100 g sladkorja nastaja večina glicerola, nato se tvorba glicerola upočasni, vendar se nikoli popolnoma ne ustavi. Alkoholna in glicerol - pirogrozna fermentacija tako potekata ves čas vzporedno.

Piruvična kislina nastaja pri glikolizi. Če se ta molekula nadalje ne porabi pri alkoholni fermentaciji, sodeluje pri nastanku sekundarnih produktov fermentacije. V tem primeru nastaja molekula glicerola z redukcijo dihidroksiacetona. Nastajanje glicerola tako drži v ravnotežju kvasni endocelularni oksidacijsko - redukcijski potencial ali NAD^+/NADH ravnotežje. Ta »varnostni ventil« preprečuje presežek NADH, ki se pojavlja ob koncu sinteze aminokislin in proteinov (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998).

Glicerol je kvantitativno najpomembnejši sekundarni produkt alkoholne fermentacije. Nastaja iz dihidroksiaceton fosfata, ki se reducira v glicerol-3-fosfat s pomočjo glicerol-3-fosfat dehidrogenaze (GPDH). Glicerol-3-fosfat se nato spremeni v glicerol s pomočjo specifičnih fosfataz. Nastanek glicerola igra pomembno vlogo pri vzpostavljanju notranjega celičnega redoks ravnotežja NADH/NAD^+ in osmotskega tlaka (Hohmann, 1997).

2.3.6 ODZIV KVASNIH CELIC NA STRES

Alkoholna fermentacija je dinamični proces, med katerim je sadni sok podvržen nenehnim spremembam, ki so odvisne od zunanjih fizikalnih faktorjev in biološke aktivnosti mikroorganizmov, ki sodelujejo v fermentaciji. Ker se okolica in s tem pogoji okolice nenehno spreminjajo, mora organizem znotraj celice vzdrževati fizikalne in kemijske parametre znotraj meja, da bi tako dosegel optimalne pogoje za metabolno aktivnost. Kot enocelični organizem, so kvasne celice direktno izpostavljene faktorjem iz okolja. Enocelični organizmi so tako razvili vrsto mehanizmov, ki omogočajo zaznavanje zunanjih sprememb, ki prihajajo iz okolja in hitro adaptiranje na te spremembe, s tem da ohranjajo integriteto celice in metabolnih aktivnosti. Ekstremni pogoji ali neuspela adaptacija kvasnih celic na te pogoje, vodijo v smrt celice ali pa v zmanjšanje rasti, odvisno od pogojev.

Razen reakcije na temperaturne spremembe, so še drugi parametri, ki zahtevajo specifično adaptacijo mikroorganizma, ki zagotavlja celično rast in preživetje (Mager in Hohmann, 1997):

- oksido – reduktivno okolje,
- razpoložljivost hranil v mediju,
- osmotski tlak,
- pH ravnine substrata,
- prisotnost večjih koncentracij za rast zavirajočih ali toksičnih komponent, kot je etanol ali soli,
- vpliv nastalega CO_2 ,
- vpliv svetlobe.

Naravna biološka odstopanja in odpornost vinskih kvasovk proti stresnim pogojem sta še posebej pomembna dejavnika v vinarstvu. Upočasnjena ali celo prekinjena fermentacija ali nastajanje nepravilnih arom, so faktorji, ki so pogosto povezani z nezmožnostjo odziva in adaptacije kvasovk na neželene, stresne pogoje za rast (Bisson, 1999).

2.3.7 POMEN GLICEROLA V TEHNOLOGIJI PRIDELAVE VIN IN FAKTORJI, KI VPLIVAJO NA POVEČANJE TVORBE GLICEROLA

Glicerol je sladek alkohol, ki nastaja kot stranski produkt fermentacije, s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae*. V vinu se koncentracija giblje v mejah od 1 do 15 gL⁻¹. Obsežnejše študije so pokazale, da se odvisno od seva kvasovk, medija in procesnih pogojev, 4 – 10 % razpoložljivega sladkorja spremeni v glicerol (Radler in Schütz, 1982), kar predstavlja 7 do 10 % nastalega etanola. (Ciani in Ferraro, 1996) Višje koncentracije vplivajo na viskoznost in gladkost vina.

V fizioloških procesih, ki se odvijajo v kvasovki vrste *Saccharomyces cerevisiae*, igra glicerol pomembno vlogo. Z izločanjem glicerola kvasovka kompenzira osmotski tlak, nadzira raven fosfata v citosolu in vzdržuje NAD⁺/NADH redoks ravnotežje. (Blomberg in Adler, 1992; Prior in Hohmann, 1997; Hohmann, 1997).

Usmerjene fermentacije s *S. cerevisiae* v smeri produkcije večjih količin glicerola je še posebej zanimivo za industrijo hrane in pijač (Pretorius in Van der Westhuizen, 1991). To lahko dosežemo z genetskimi manipulacijami kvasovke ali pa s kontrolo zunanjih pogojev.

V tehnologiji pridelave vrhunskih vin predstavlja glicerol eno izmed najbolj pomembnih nehlapnih komponent, ki prispevajo k mehkoobi, polnosti in popolnosti vin. (Eustace in Thornton, 1987). Povečana produkcija glicerola ugodno vpliva tudi na senzorične zaznave vina (Pretorius in Van der Westhuizen, 1991). Med parametre, ki pospešujejo povišanje biosinteze glicerola med alkoholno fermentacijo, prištevajo tudi značilnosti izbranega seva kvasovk in mešanje (Radler in Schütz, 1982). Rezultati raziskav so pokazali, da s postopnim povišanjem temperature, počasi narašča vsebnost glicerola v nastajajočem vinu (Ough *in sod.*, 1972; Gardner *in sod.*, 1993).

Različne študije so pokazale, da počasno zviševanje temperature vpliva na izločanje glicerola (Ough *in sod.*, 1972; Gardner *in sod.*, 1993). Prav tako so ugotovili, da na izločanje glicerola vpliva tudi mešanje (Radler in Schütz, 1982) ter izbrani sev kvasovke. Produkcija glicerola v alkoholnih fermentacijah pravzaprav predstavlja aktivnost mikroorganizma, s katero razpolaga mikroorganizem pri vzpostavljanju osmotske stabilnosti kvasovk in vzpostavitve redoks ravnotežja (Hohmann, 1998), kjer predstavlja glikoliza nevtralno redoks komponento, predstavlja povečana produkcija kvasne biomase, s spremljajočo produkcijo NADH, povišano produkcijo glicerola in recikliranje NAD⁺ pri anaerobnih pogojih fermentacije (Van Dijken in Scheffers, 1986). Znano je, da so različne vrste mikroorganizmov sposobne pri različnih stresnih pogojih producirati glicerol, kot substanco pomembno za izravnavo redoks ravnotežja. Regulacija redoks ravnotežja med alkoholno fermentacijo s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, poteka preko glicerol-3-fosfatdehidrogenaze (NAD⁺) (André *in sod.*, 1991).

V skladu z Arrheniusovo enačbo, vpliva povišanje temperature fermentacije v eksponentijalni fazi, na hitrejši potek biosinteze etanola, sočasno pa tudi na biosintezo glicerola. Količina glicerola, ki ob tem nastaja, je odvisna od konstantne fermentacijske temperature. Če v tej eksponentijalni fazi rasti pride do nenadnega večjega povišanja fermentacijske temperature ali temperaturnega šoka, mikroorganizem izpade iz svojega redoks ravnotežja in začne, za izravnavanje ravnotežja novonastale redoks situacije, ob tem intenzivno producirati glicerol

kot sredstvo za vzpostavitev novonastalega ravnotežja. Na ta način se prilagodi novemu okolju (Kenyon *in sod.*, 1986, Hemming *in sod.*, 1991). Če pa pride ponovno do namenskega temperaturnega šoka, mikroorganizem ponovno reagira na enak način, s produkcijo glicerola, ki pa ni več tako intenzivna, kot v prvem primeru (Kukec *in sod.*, 2002).

Glicerol je analog trehalozi in tako deluje kot osmotska zaščita mikroorganizma pred različnimi osmotskimi šoki. (Blomberg et al., 1989). V kvasnem metabolizmu igra glicerol pomembno vlogo, posebej v medijih z nizkim osmotskim potencialom (Nevoight in Stahl, 1997) in pri anaerobnih pogojih (Van Dijken in Scheffers, 1986). Pri anaerobnih pogojih nastaja glicerol zaradi reoksidacije NADH, ki je nastal v procesu anabolizma in med sintezo nekaterih organskih kislin (Oura, 1977; Van Dijken in Scheffers, 1986).

NAD⁺, ki se prvotno porablja med Embden-Meyerhoff-Parnasovo (EMP) metabolno potjo, se regenerira, medtem ko nastaja etanol. Kadar intermediati v EMP metabolni poti nastopijo kot prekursorji za sintezo celičnega materiala, je ta bilanca motena, ker se presežek nastalega NADH ne more spremeniti nazaj v NAD⁺. To povzroča zaustavitev metabolizma, v primeru, ko ne nastopi regeneracija NAD⁺. Med anaerobno rastjo se NADH ne more oksidirati s kisikom, ampak to poteče z vzporednim nastankom reduciranih stranskih produktov, kot je glicerol v primeru *Saccharomyces cerevisiae* (Gancedo *in sod.*, 1968; Oura, 1977). Glicerol nastaja z redukcijo dihidroksiacetonfosfata v glicerol-3-fosfat. Ta reakcija je katalizirana z NAD⁺ - odvisno glicerol-3-fosfat dehidrogenazo (Costenoble *in sod.*, 2000).

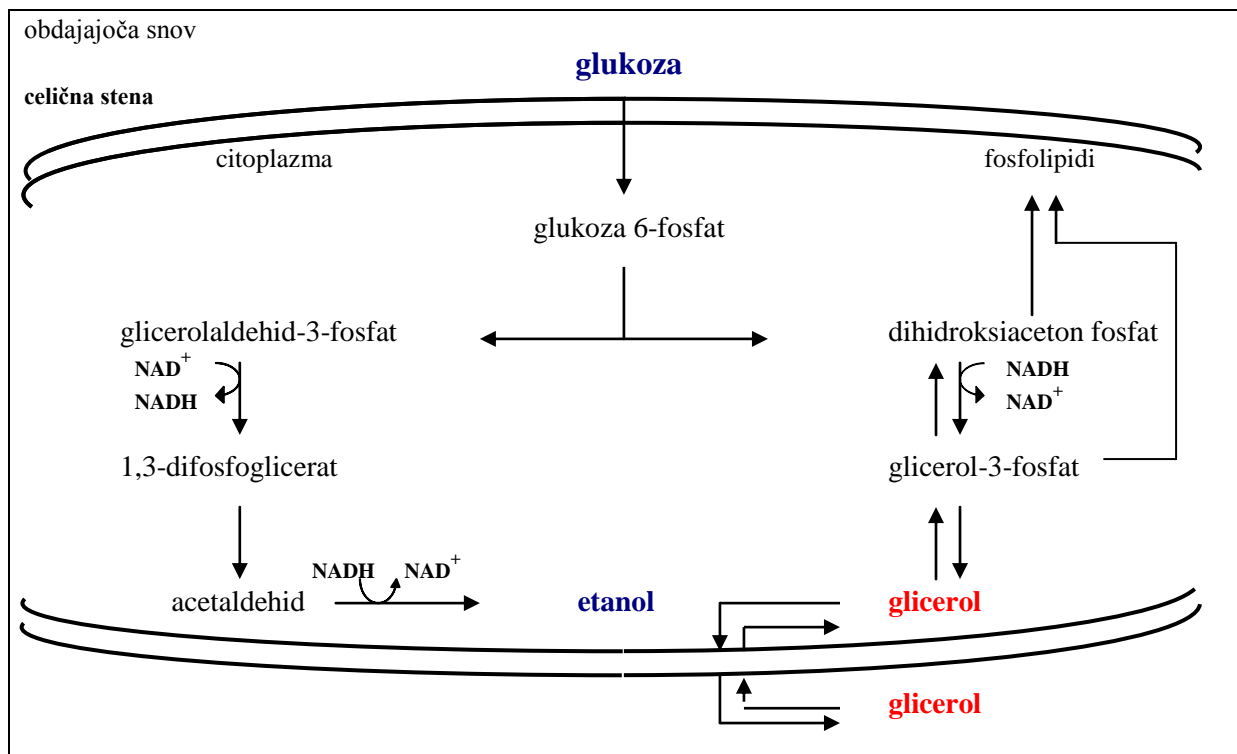
Dodatek žveplovega dioksida povečuje koncentracijo nastalega glicerola, ker disulfid veže acetaldehid, ki potem ni na voljo, da bi odstranjeval NADH za produkcijo etanola. Presežek NADH se zato oksidira vzporedno z redukcijo dihidroksiacetonfosfata v glicerol-3-fosfat in se potem defosforilira v glicerol (Rankine in Bridson, 1971, Ough *in sod.*, 1972, Gardner *in sod.*, 1993).

2.3.8 METABOLIZEM GLICEROLA V KVASNI CELICI

Glicerol nastaja v citosolu kvasne celice. Glukoza se fosforilira takoj, ko vstopi v celico in se nato spreminja po normalnih stopnjah glikolize do dihidroksiacetonfosfata in gliceraldehid-3-fosfata v ekvimolarnih količinah. Večina dihidroksiacetonfosfata se nato spremeni v glicerolaldehid-3-fosfat z interkonvertnim encimom trioza fosfatizomerozo. Ta encim ima večjo afiniteto do dihidroksiacetonfosfata, kot pa do gliceraldehid-3-fosfata. Etanol nastane iz gliceraldehid-3-fosfata preko piruvata in v tem procesu se NADH reducira v NAD⁺. Dihidroksiacetonfosfat se spremeni v glicerol v dvostopenjski reakciji, ob sodelovanju NADH-odvisne glicerol-3-fosfat dehidrogenaze in fosfataze (Scanes *in sod.*, 1998).

Omeniti je potrebno dve pomembni funkciji v povezavi s sintezo glicerola v kvasni celici. To sta uravnavanje redoks ravnotežja in odziv na hiperosmotski stres. Osmotski šok je eden najpogostejših stresov v kvasni celici, zato je nujno potrebno, da celica razvije mehanizem, da bi se uprla temu šoku in preživela te pogoje. Ena posledic hiperosmotskega šoka je hitra difuzija vode iz celice v okoliški medij. Da bi to preprečila, kvasovka izloča glicerol, kot tudi druge poliole, kot so arabitol, manitol, mezoeritrol in druge (Brown, 1976). Te raztopine regulirajo intra in ekstracelularno okolico, kar je nujno za rast pri osmotskih stresnih pogojih (Larsson, 1986).

Med procesom nastanka glicerola se NADH oksidira in nastaja NAD⁺. Vzdrževanje NAD⁺/NADH redoks ravnotežja pri anaerobnih pogojih je nujno (Van Dijken in Schefers, 1986).



Slika 9.: Reakcije glicerolnega metabolizma kvasovke *S. cerevisiae* (Scanes in sod., 1998)

2.3.9 GLAVNE ZNAČILNOSTI ALKOHOLNEGA VRENJA

1. Ob vrenju se zaradi nastajajočega CO₂ prostornina mošta poveča, zato sod, v katerem poteka vrenje, ne smemo nikdar napolniti do roba. Vedno pustimo za približno za eno desetino praznega prostora, da je vrenje nemoteno.
2. Vrelni plini, ki izhajajo ob vrenju, povečujejo tlak v moštu. Slednje najlažje opazimo, če se spozabimo in sod zapremo. Sod, zaradi povečevanja notranjega tlaka preko kritične mase, dobesedno raznese. Ob vrenju nastane iz 1 kg sladkorja 2 hL plina. Plin je težji od zraka in se nabira pri tleh, zato je zelo važno, da se iz kleti odvaja s prezračevanjem. Niso osamljeni primeri, ko je zaradi visoke koncentracije plina prišlo do zadušitve. Koncentracijo plina najlažje preverimo s svečo. Če sveča ugasne, ni varno hoditi v klet.
3. Mošt med vrenjem spremeni intenziteto barve in postane močno moten.
4. Količina sladkorja se med vrenjem zmanjšuje, tvori se alkohol, spreminja se okus in aroma mošta - sladek, sortno značilen. Najbolj evidentna sprememba se dogaja v relativni gostoti mošta. Pred alkoholnim vrenjem ima mošt pri 20 °C relativno gostoto od 1,06 do 1,10 odvisno od vsebnosti sladkorja. Po alkoholnem vrenju se relativna gostota mošta spremeni - pade pod 1,00.

5. Temperatura mošta se med vrenjem zelo poveča. Vinogradnikom svetujejo vrenje pri nižji temperaturi, predvsem pri predelavi belih vin, pod 15 °C. Pri predelavi rdečih vin je povišana temperatura med alkoholnim vrenjem zelo priporočljiva, saj se zaradi višje temperature barvila in fenoli lažje in hitreje ekstrahirajo. Po novem pa tudi pri rdečih vinih svetujejo nekoliko nižjo vrelni temperaturo. Prednosti vrenja pri nižjih temperaturah so velike. Mošti ne povrevajo burno, vina so bolj sveža, ker ostane v njih več ogljikovega dioksida, ohranijo se aromatične snovi, zmanjšanje koncentracije kislin med vrenjem je manjše, vina so bolj polna. (Šikovec, 1993)
6. Med vrenjem se zmanjša vsebnost kislin, predvsem na račun izločanja vinske kisline v obliki vinskega kamna, zniža vsebnost kislin.
7. Alkoholno vrenje je sprva počasno, nato preide v burno, zatem se umiri in preide v tiho vrenje. Čas od začetka vrenja do burnega vrenja ali eksponentne faze rasti mora biti čim krajši, traja lahko več dni. Burno vrenje traja od šest do deset dni, včasih več, tiho vrenje ali stacionarna faza rasti pa lahko traja tudi cel mesec, odvisno od vrelni temperature vrenja in sladkorne stopnje.

2.3.10 VPLIV ZUNANJIH DEJAVNIKOV NA POTEK PROCESA ALKOHOLNE FERMENTACIJE

Faktorje, ki vplivajo na dogajanje med fermentacijo, lahko dodobra razumemo šele, ko kvantitativno izmerimo in ovrednotimo rastno kinetiko kvasovk med procesom. Ko podatke postavimo v soodnosnost z biokemijskimi analizami fermentacijske brozge lahko ugotovimo, kako posamezni faktorji vplivajo na kakovost vina.

2.3.10.1 Čistost grozdnega mošta

Predhodno čiščenje grozdnega mošta je bistvenega pomena, predvsem pri fermentaciji belih vin. S tem odstranimo iz mošta avtohtone kvasovke, ki so v mošt prešle iz grozdja.

2.3.10.2 Žveplov dioksid

Dodajanje SO₂ v grozdni mošt zaradi preprečevanja rasti avtohtonih mikroorganizmov je ustaljena praksa v vinarski tehnologiji. Efekti SO₂ na kinetiko rasti kvasovk so sledeči: podaljšanje zakasnitvene faze in začetka fermentacije; upočasnjevanje rast, zniževanje specifične hitrosti rasti (μ) in podaljševanje časa celotne fermentacije, pospeševanje faze odmiranja kvasovk in selektivni vpliv na vrsto kvasovk, ki sodeluje pri fermentaciji. Žveplov dioksid se v moštu raztaplja v obliki žveplove(IV) kisline. Baktericidni učinek žveplove(IV) kisline zagotavlja selekcijske pogoje v moštu, v katerih je med zakasnitveno fazo razvoja selekcionirane kulture kvasovk preprečen razvoj mlečnokislinskih bakterij in divjih hitreje rastočih sevov kvasovk z neželenim kvarnim vplivom. Vsebnost SO₂ v moštu ima tudi neugoden vpliv na vcepke: podaljšuje lag fazo selekcionirane kulture, znižuje hitrost rasti selekcionirane kulture, podaljšuje celoten proces fermentacije ter pospešuje odmiranje kvasovk. Prisotnost SO₂ v obliki žveplove(IV) kisline v moštu močno vpliva na vrenje mošta (Henick-Kling in Park, 1994).

2.3.10.3 Prezračevanje mošta

Razmnoževanje kvasovk je v tesni povezavi s prisotnostjo ali odsotnostjo kisika v moštu. V odsotnosti kisika razmnoževanje ni možno (nekaj znakov razmnoževanja lahko opazimo le v 4-5 generacijah kvasnih celic, v katerih se nahajajo zaostale rezerve kisika). Iz dosedaj objavljenih rezultatov lahko sklepamo, da je za uspešno fermentacijo potrebno čim večje število kvasnih celic v živem in aktivnem stanju. To pa lahko najdemo le pri mladih celicah. (Fleet in Heard, 1993)

Vloga kisika v procesu je ta, da omogoči razmnoževanje in tako nastanek dovolj velikega števila aktivnih celic za fermentacijo. Oskrbo kvasnih celic s kisikom omogočimo na dva načina:

- tako, da pustimo prazen prostor pri polnjenju posode z moštom,
- z občasnim pretakanjem mošta v posodah za fermentacijo,
- z mikrooksidacijo mošta ali vina.

2.3.10.4 Vpliv temperature

Temperatura, pri kateri fermentacija poteka, vpliva na:

- hitrost rasti kvasovk in s tem na trajanje fermentacije,
- delovanje posameznih vrst kvasovk v postopku fermentacije,
- biokemijske reakcije kvasovk, ki določajo kemijsko sestavo in senzorične lastnosti vina.

Hitrost rasti kvasovk in alkoholne fermentacije naraščata z naraščajočo temperaturo, z maksimumom pri temperaturi med 20 in 25 °C (Amerine, 1980). Za potek alkoholne fermentacije so večjega pomena temperature, ki vplivajo na dihanje in na fermentacijsko aktivnost. Respiracijska aktivnost, pri kateri se kvasovke razmnožujejo, se povečuje z naraščanjem temperature do 30 °C. Fermentacijska aktivnost vpliva na začetek, intenziteto in konec fermentacije. Kvasovke lahko prenesejo zelo nizke temperature, tudi do –200 °C. Veliko bolj so kvasovke občutljive na visoke temperature. Njihova vzdržljivost pri visokih temperaturah je odvisna od stanja, v katerem se nahajajo kot tudi od sestave medija. Tako so v suhem stanju veliko bolj odporne na višje temperature kot pa v vlažnem stanju. Rast in razmnoževanje kvasovk v odvisnosti od temperature sta odvisna predvsem od naslednjih dejavnikov (Amerine, 1980):

- vrste ali seva kvasovk,
- stopnje prezračevanja mošta,
- nastalega alkohola,
- obsega žveplanja.

Glede na te faktorje so optimalne temperature za aktivnost kvasovk od 30-36 °C. Najboljše je, da vzdržujemo konstantno temperaturo med celotno fermentacijo. Temperatura, pri kateri kvasovke izgubijo moč in se fermentacija konča, je kritična temperatura. Ta znaša nekje med 37 in 40 °C (Fleet in Heard, 1993).

Temperatura fermentaciji vpliva tudi na tvorbo sekundarnih produktov. Pri višjih temperaturah nastaja več produktov (Cottrell in McLellan, 1986):

- glicerol
- očetna kislina
- acetoin
- 2,3-butandiol
- piruvat (pirogrozdana kislina)
- α -ketoglutarjeva kislina

Poznavanje dejavnikov, ki vplivajo na potek fermentacije nam daje možnost, da fermentacijo reguliramo v praktični proizvodnji tako, da omogočimo optimalne pogoje za najugodnejši začetek fermentacije, pravilni potek in uspešen zaključek. Pri regulaciji temperature je pogosto treba temperaturo le znižati za nekaj stopinj.

2.3.10.5 Koncentracija sladkorja

Zelo majhne količine sladkorja v moštu niso ugodne za aktivnost kvasovk. Fermentacija poteka najbolje pri vsebnosti sladkorja od 15 do 18 % in tja do 20 %, v nasprotnih primerih teče fermentacija počasneje in vodi do nižjih koncentracij alkohola. Do motenj pri fermentaciji pri visokih koncentracijah sladkorja prihaja zaradi razlike v osmotskem tlaku raztopine sladkorja na eni strani in tlaka v vakuolah kvasnih celic na drugi strani. Zaradi polprepustnosti membrane se vzpostavi ravnotežje med zunanjo raztopino in notranjostjo kvasnih celic, pri čemer pa kvasovke izgubijo svojo vodo in tako pride do plazmolize celic, s tem pa pride do napak v funkcijah kvasnih celic.

2.3.10.6 pH

Optimalni pH za delovanje kvasovk je pH 4-6, kislost mošta pa se pogosto giblje v mejah od 2,8 do 3,8, vendar te razlike nimajo bistvenega vpliva na aktivnost kvasovk. Pri znižanju kislosti na 2,5 pa se pojavijo prve ovire v procesu alkoholne fermentacije. Povišana kislost lahko vpliva na mehanizem fermentacije in vodi k tvorbi večjega števila sekundarnih produktov. Hitrost rasti in fermentacije kvasovk vrste *S. cerevisiae* se zmanjšuje s padcem pH vrednosti 3,5 na 3,0 (Kudo *in sod.*, 1998).

Čeprav pH nima večjega vpliva na delovanje kvasovk, vpliva na druge mikroorganizme v moštu, kot na primer na razne bakterije, ki kvarijo vino. Do izrazitejšega vpliva kislin na delovanje kvasovk pride, če so le-te prisotne v znatno večjih količinah od normalnih. Kvasovke so bolj občutljive na hlapne kisline. Te kisline nastajajo kot produkti za vino škodljivih procesov. Med hlapnimi kislinami je največ očetne kisline (Judež, 1981).

2.3.10.7 Hrana kvasovk

Za pravočasen začetek in potek fermentacije, moramo kvasovkam omogočiti nemoteno razmnoževanje. Pomembno vlogo pri tem igra pravilna prehrana. Drugače povedano, mora biti v moštu dovolj takšnih snovi, ki jih kvasovke lahko koristijo za svojo hrano.

Najpomembnejša snov je vsekakor sladkor. Ta snov kvasovkam služi kot izvor energije, del pa se porablja tudi za razmnoževanje.

Pomembno vlogo v prehrani kvasovk imajo tudi mineralne snovi, ki so nujno potrebne za razmnoževanje kvasovk. Razen tega nekatere mineralne snovi prehajajo v sestavo mnogih kvasnih encimov. V tem pogledu ima pomembno vlogo fosforna kislina. Poleg fosforne kisline so za kemizem fermentacije pomembni še: železo, baker, mangan, žveplo, magnezij in drugi minerali. Med snovmi, ki imajo pomembno vlogo v prehrani kvasovk, so tudi dušikove spojine. Za prehrano kvasovk najprej uporabijo dušik, ki se nahaja v lahko dostopni obliki, kot so amonijeve soli. Ko zmanjka te oblike dušika, pa kvasovke uporabljajo tudi druge bolj kompleksne spojine: aminokisliline in amide. V svoji kemijski sestavi mošt vsebuje dovolj dušika in ga ni potrebno dodajati. Če grozd napade plesen, pa je lahko fermentacija zaradi pomanjkanja dušika ovirana. V takih primerih lahko dodajamo nekatere amonijeve soli, kot na primer amonijev sulfat, najobičajneje pa je to diamonijev hidrogenfosfat (DAP).

V prehrani kvasovk imajo pomembno vlogo tudi nekatere spojine, ki ne sodelujejo v izgradnji kvasnih celic in delujejo kot aktivatorji njihovih posameznih funkcij. To so v glavnem organske spojine z vitaminskimi lastnostmi, nekatere od njih pa se vključujejo v sestavo kvasnih encimov. Pomanjkanje nekaterih vitaminov povzroča motnje v razmnoževanju kvasovk in intenzivnosti fermentacije, kar vodi do motenj pri nastanku sekundarnih produktov. Po vsebnosti vitaminov ima mošt zadovoljujočo sestavo tako za razmnoževanje kvasovk, kot tudi za normalen potek fermentacije. Med vitamini, ki so pomembni za ta proces lahko izpostavimo vitamine iz skupine B, kot je na primer tiamin.

Razen omenjenih faktorjev kot aktivatorjev alkoholne fermentacije, v zadnjem času opažamo pomembno vlogo o vlogi nekaterih sterolov in nenasičenih maščobnih kislin velike molekulske mase. Njihova prisotnost je zaznana v lupini grozdne jagode in na njeni površini. Med steroli lahko, kot sestavino kvasnih celic, izpostavimo ergosterol, ki ga kvasovke sintetizirajo ob prisotnosti kisika. Podobno kot ergosterol se obnašajo tudi nekatere nenasičene maščobne kisline. Posebno pomembni sta oleinska in oleanolna kislina. Stimulirata razmnoževanje kvasovk pod anaerobnimi pogoji in pri visokih temperaturah.

2.3.10.8 Vpliv CO₂

Med fermentacijo se v ekvimolarnem razmerju z etanolom tvori CO₂, ki je dobro topen v vinu in deluje selektivno na razvoj mikroorganizmov med fermentacijo mošta. Zaradi toksičnega delovanja preprečuje razvoj bakterij med fermentacijo (Boulton *in sod.*, 1996). Temperatura ima pomemben vpliv na topnost CO₂ v vinu. Dvig temperature vina, ki vsebuje 11 vol.% etanola od 0 °C na 20 °C, povzroči padec raztopljenega CO₂ iz 2,9 gL⁻¹ na 1,4 gL⁻¹. Tudi vsebnost etanola v vinu predstavlja faktor, ki na topnost CO₂ vpliva podobno kot temperatura. Višanje vsebnosti etanola med fermentacijo znižuje topnost CO₂ v vinu (Zoecklein *in sod.*, 1995).

2.3.10.9 Prisotnost ostalih mikroorganizmov

Selekcionirana kultura kvasovk med fermentacijo sodeluje tudi z ostalimi mikroorganizmi, predstavniki vinske mikroflore (divjimi sevi kvasovk, mlečnokislinskimi in očetnokislinskimi bakterijami). Rast drugih mikroorganizmov in njihova metabolična aktivnost na grozdju

oziroma v moštu pred začetkom fermentacije vplivajo na potek fermentacije in kakovost vina. Znan je pozitiven učinek na kakovost vina s strani plesni vrste *Botrytis cinerea* (Ribéreau-Gayon in Seguin, 1980). Nasprotno je učinek bakterij iz rodu *Acetobacter* negativen, antagonističen za fermentacijo kvasovk in deluje kvarno na vino (tvorba oetne kisline). Mlečnokislinske bakterije imajo manjši vpliv na potek fermentacije. Zaradi izrazitega izločanja CO₂ med fermentacijo je tedaj njihova aktivnost močno zavrta (Fugelsang, 1997). V zadnjih letih je bilo narejenih veliko raziskav na področju interakcij med različnimi sevi kvasovk. Veliko je bilo posvečenega preučevanju ubijalskih toksinov – »killer toksinov«, ki jih proizvajajo ubijalski sevi kvasovk. Predstavniki so prisotni v rodovih *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Torulopsis* in tudi v rodu *Saccharomyces*. Ti lahko zavirajo delovanje selekcionirane kulture (Fugelsang, 1997, Van Vuuren in Jacobs, 1992).

2.3.10.10 Inhibitorni faktorji

Delovanje inhibitornih faktorjev se izraža v oviranju posameznih funkcij kvasovk, kot tudi v oviranju procesa fermentacije. Nekateri od teh inhibitornih faktorjev so produkt fermentacije, produkti metabolizma kvasovk in kot takšni negativno delujejo tako na razmnoževanje kvasovk kot tudi na fermentacijsko aktivnost. Po drugi strani pa se v tehnologiji vina uporabljajo različna sredstva, ki omejujejo fermentacijsko aktivnost kvasovk, da bi tako upočasnili ali pa celo povsem ustavili proces fermentacije. Za to se običajno uporabljajo antioksidanti (žveplov dioksid ali askorbinska kislina).

Naravne sestavine mošta in vina kot inhibitorji alkoholne fermentacije

- Alkoholi

Vpliv etanola se odraža v motnjah pri razmnoževanju kvasovk in prav tako pri motnjah njihove fermentacijske aktivnosti. Alkohol namreč ovira asimilacijo dušika, ki ga kvasovke koristijo za izgradnjo svojih celic. Vpliv alkohola na proces fermentacije se odraža v več smereh. Ob prisotnosti večjih količin alkohola prihaja do motenj v razmnoževanju kvasovk. Obnašanje kvasovk pod vplivom alkohola je različno pri različnih vrstah kvasovk. Na etanol je najbolj občutljiva vrsta *Kloeckera apiculata*, medtem ko je *Saccharomyces oviformis* zelo odporen. Razen etanola imajo inhibitivno delovanje na kvasovke tudi drugi alkoholi. Največja toksičnost je bila ugotovljena pri primarnih alkoholih, nato pri sekundarnih, najmanj pa so toksični terciarni alkoholi (Muštović, 1985).

- Medsebojni odnosi med različnimi mikroorganizmi

V naravni mikroflori mošta in vina se nahajajo različni mikroorganizmi. Vsi ti mikroorganizmi uporabljajo posamezne sestavine iz svoje okolice za razmnoževanje in za druge življenjske funkcije. Med posameznimi vrstami vladajo določeni odnosi, od katerih pa je odvisen karakter transformacije posameznih sestavin mošta in vina. Odnosi so lahko pozitivni ali pa negativni, tako se lahko posamezne vrste med seboj dopolnjujejo ali pa ovirajo. Produkti metabolizma ene vrste kvasovk ovirajo ali pa vzpodbujajo delo druge vrste kvasovk ali predstavnikov druge mikroflore, bakterij ali plesni.

Zunanji faktorji kot inhibitorji alkoholne fermentacije

- Antiseptična sredstva

Nekatera antiseptična sredstva prehajajo v mošt že iz grozdja, kot na primer razna fungicidna in insekticidna sredstva. Učinek antiseptičnih sredstev na kvasovke se odraža na več načinov. Skoraj vsa ta sredstva delujejo na encimski sistem kvasovk, tako da izzovejo okvare posameznih delov njihovih funkcij. Nekatera sredstva delujejo na dihalne procese in ne ovirajo fermentacije, druga pa ovirajo fermentacijo in ne dihalnih procesov. Obstajajo pa tudi takšne, ki ovirajo oba procesa. V načinu delovanja in po posledicah, ki jih antiseptična sredstva puščajo, se med seboj razlikujejo. Tako narkotiki delujejo začasno in po končanem delovanju se aktivnost kvasovk povrne. V to skupino spadajo nekateri ogljikovodiki in višji alkoholi. Strupi delujejo letalno na kvasne celice. Tako delujejo benzenova kislina, salicilna kislina, žveplov dioksid,... Specifični inhibitorji ne ovirajo dihalnih procesov in razmnoževanja kvasovk, ampak samo fermentacijo (monobromocetna kislina). Antivitamini blokirajo metabolizem kvasnih celic in izzivajo smrt kvasovk.

- Tlak

Vzdržljivost kvasovk na tlak je zelo velika. Kvasovka lahko brez poškodb prenese tudi tlak do 8000 bar. Na posamezne funkcije kvasovk pa deluje že manjši tlak. Napake, ki pri tem nastajajo, se odražajo predvsem na razmnoževanju kvasovk, se odraža tudi na fermentacijskih sposobnostih. Tlak CO₂ 8 bar popolnoma ustavi razmnoževanje. Inhibitorno delovanje tlaka CO₂ na razmnoževanje kvasovk ima velik praktični pomen pri vodenih fermentacijah, kot tudi v biološki stabilizaciji mošta in vina (Judež, 1981).

- Sevanje

Inhibitorni učinek na posamezne funkcije kvasovk imajo tudi razna sevanja, to so npr. UV sevanja, ultrazvok ali ionizirajoče sevanje. UV žarki delujejo na kvasne celice. Za sterilizacijo mošta in vina ti žarki ne dajo zadovoljivih rezultatov, ker delujejo predvsem na površini vina. Uporaba teh žarčenj je komplicirana in draga (Judež, 1981)

2.4 REDOKS POTENCIAL

2.4.1 TEORIJA REDOKS POTENCIALA

V kemiji je oksidacijsko - redukcijski potencial ali redoks potencial definiran s potekom oksidacijskih in redukcijskih reakcij v danem sistemu, ki težijo k ravnotežju.

Oksidacija je proces, pri katerem substanca odda elektrone, pri redukciji pa snov elektrone sprejema. Za ravnotežje med oksidirano obliko (Ox) in reducirano obliko (Red) velja:



Redoks potencial, ki podaja aktivnost elektronov pri reakciji (2.4.1.) opišemo z enačbo:

$$E_h = \frac{RT}{F} \ln a_e \quad (2.4.2.)$$

$$E_h = \frac{RT}{F} \ln \left[\left[\frac{1}{K} \right]^{\frac{1}{z}} \left[\frac{a_{red}}{a_{ox}} \right]^{\frac{1}{z}} \right] \quad (2.4.3.)$$

$$E_h = \frac{KRT}{zF} + \frac{RT}{zF} \ln \frac{\sum a_{ox}}{\sum a_{red}} \quad (2.4.4.)$$

Prvi del enačbe (2.4.4.) (KRT/nF) je ekvivalenten E^0 , ki predstavlja standardni redoks potencial sistema 2.4.1., a_{ox} in a_{red} pa so aktivnosti oksidirane in reducirane oblike

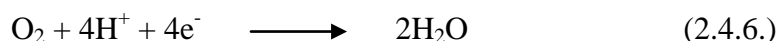
$$E_h = E^o + \frac{RT}{zF} \ln \frac{\sum a_{ox}}{\sum a_{red}} \quad (2.4.5.)$$

Enačba (2.4.5.) je poznana kot Nernstova enačba. Nernstova enačba nam daje informacijo o redoks potencialu, ki ga dobimo pri oksidacijsko-redukcijski reakciji. E^o je potencial, ki bi ga dosegli v primeru, kadar bi bile vse aktivnosti produktov in reaktantov 1.

Reakcije oksidacije in redukcije v homogenih sistemih (rastopinah) zmeraj potekajo v paru, komplementarno, ker prosti elektroni ne morejo obstajati, tako da se v eni reakciji sprostijo toliko elektronov, kot se jih v drugi porabi. Na ta način v procesih potekajo reakcije oksidacije in redukcije, ki jim z drugim imenom pravimo tudi redoks reakcije (Bühler in Galster, 1980).

Oksidacijska ali redukcijska kapaciteta raztopine je določena z aktivnostjo prostih elektronov v njej. Kljub dejstvu, da je življenjska doba prostih elektronov ekstremno kratka (od 10^{-11} do 10^{-15} s), je statistično mogoče, da obstaja prosti elektron v času transformacije od elektron-donorskega sistema do elektron-akceptorskega sistema (Balakireva *in sod.*, 1974).

Redoks potencial, ki podaja redukcijo kisika po reakciji:



v odvisnosti od pH je izražen:

$$E_h = E_{\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}}^\circ + \frac{RT}{4F} \ln a_{\text{O}_2} - \frac{RT}{F} \cdot 2,303 \cdot \text{pH} \quad (2.4.7.)$$

E_h	redoks potencial (mV)
E°	standardni potencial sistema pri 25 °C (mV)
R	plinska konstanta (8,314 J/mol K)
T	temperatura (K)
z	število elektronov (/)
F	Faradayeva konstanta (96500 C/mol)
$\sum a_{[\text{Ox}]}$	vsota aktivnosti oksidirane oblike
$\sum a_{[\text{Red}]}$	vsota aktivnost reducirane oblike

Redoks potencial je kvantitativni pokazatelj redoks stanja raztopine. Merimo ga relativno glede na standardni sistem SHE, ki ga predstavlja reakcija:



E_h za vodik – vodikov ionski redoks sistem:

$$E_h = E_{\text{H}^+/\text{H}_2}^\circ + \frac{RT}{2F} \ln \frac{a_{\text{H}^+}^2}{a_{\text{H}_2}} = \frac{RT}{2F} \ln a_{\text{H}_2} - \frac{RT}{F} 2,303 \text{pH} \quad (2.4.9.)$$

kjer je $E_{\text{H}^+/\text{H}_2}^\circ$ definiran kot nič pri vseh temperaturah (Schuldiner *in sod.*, 1966).

Če vrednost rednost E_h podamo napram neki drugi referenčni elektrodi, npr. kalomelovi elektrodi ($E_{\text{SCE}} = -0,245$ V glede na SHE), potem je potencial Pt elektrode (E_{Pt}) enak:

$$E_h = E_{\text{Pt}} - E_{\text{SCE}} \quad (2.4.10.)$$

E_{SCE}	potencial kalomelove elektrode (mV)
E_{Pt}	izmerjeni potencial platinske elektrode (mV)

Clark (1921) je predstavil koncept rH vrednosti, s katerim je skušal prikazati funkcijsko odvisnost redoks potenciala od pH. Zato je uvedel, po analogiji s pH, nov termin rH:

$$rH = -\log_{10} a_{\text{H}_2} \quad (2.4.11.)$$

kjer je rH = negativni logaritem aktivnosti vodika. Za reakcijo 2.4.8. dobimo izraz

$$rH = \frac{E_h}{0.029} + 2\text{pH} \quad (2.4.12.)$$

rH se spreminja od rH = 0 pri $pH_2 = 1 \text{ atm}$ in $pH = 0$ in rH = 42 pri $pO_2 = 1 \text{ atm}$ in $pH = 0$. Kasneje je sam Clark preklical to definicijo in jo razglasil kot neuporabno (Clark, 1923).

Redoks potencial merimo kot razliko napetosti med referenčno elektrodo (Ag/AgCl ali kalomelova elektroda) in indikatorsko elektrodo (Pt elektroda) v raztopini. Inertna elektroda v raztopini lahko sprošča ali pa sprejema elektrone. Količina sprejetih elektronov je ekvivalentna potencialu elektrode. Ta postaja pozitiven ali negativen. Merilo elektrodnega procesa je torej razlika med tokom elektronov na elektronskem donorju in elektronskem akceptorju. Iz Nernstove enačbe (2.4.5.) je razvidno, da je vrednost redoks potenciala odvisna od aktivnosti oksidantov in reducentov, od temperature ter od vrednosti pH. Redoks potencial torej daje informacijo o aktivnosti elektronov, pH pa informacijo o aktivnosti vodikovega iona (H^+). E_h vrednost raztopine se spreminja glede na rast mikroorganizma (Kjaergaard, 1976).



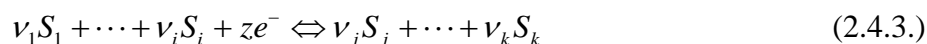
je redoks potencial podan z Nernstovo enačbo

$$E_h = E^o - \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_{red}}{a_{ox}} \quad (2.4.2.)$$

E_h	redoks potencial (V)
E^o	standardni elektrodni (redoks) potencial (V)
R	splošna plinska konstanta (8,314 J/mol K)
T	temperatura (K)
z	število elektronov (/)
F	Faradayeva konstanta (96485,3As/mol)
a_{ox}	aktivnost oksidirane oblike
a_{red}	aktivnost reducirane oblike

Razmerje $\frac{a_{red}}{a_{ox}}$ imenujemo tudi reakcijski kvocient Q (elektrone ignoriramo).

Za bolj kompleksne redoks sisteme, v katerih je prisotnih več oksidantov in reducentov, ki med seboj reagirajo po shemi:



velja:

$$E_h = E^o + \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{\prod_i a_{ox}^{\nu_{ox}}}{\prod_i a_{red}^{\nu_{red}}} \right) \quad (2.4.4.)$$

kjer je

$$\prod_i a_i^{\nu_i} \equiv a_{S_1}^{\nu_1} \cdot a_{S_2}^{\nu_2} \cdot \dots \cdot a_{S_i}^{\nu_i}$$

produkt aktivnosti vseh v sistemu prisotnih oksidantov oziroma reducentov.

Enačba nas uči, da je v sredini, v kateri je produkt aktivnosti (koncentracij) oksidantov večji od produkta aktivnosti (koncentracij) reductentov, redoks potencial večji od standardnega potenciala in obratno, ko produkt aktivnosti reductentov preraste produkt aktivnosti oksidantov postane redoks potencial manjši od standardnega potenciala ali celo negativen, kot je to primer pri fermentaciji mošta.

Oglejmo si naprimer redoks potencial za elektrodno reakcijo med vodikovimi ioni v raztopini aktivnosti a_{H^+} in vodikom, ki obliha Pt elektrodo pri parcialnem tlaku vodika P_{H_2}



ki, je uporabljena kot primerjalni sistem za druge redoks reakcije. Nernstova enačba za ta sistem se glasi:

$$E_h = E^0_{H^+/H_2} + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{a_{H^+}}{\sqrt{P_{H_2}}} \right) = E^0_{H^+/H_2} - \frac{2.303RT}{2F} \log(P_{H_2}) - \frac{2.303RT}{F} pH \quad (2.4.6.)$$

$E^0_{H^+/H_2}$ je po definiciji enak nič pri vseh temperaturah.

V biologiji je navada, da redoks potencial navajajo pri vrednosti $pH=7$.

Clark (1921) je predstavil koncept rH vrednosti, s katerim je skušal prikazati funkcijsko odvisnost redoks potenciala od pH . Zato je uvedel, po analogiji s pH , novo količino rH :

$$rH = -\log P_{H_2} \quad (2.4.7.)$$

kjer je rH = negativni dekadični logaritem aktivnosti vodika (parcialnega tlaka vodika).

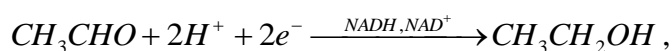
$$rH = E_h \cdot \frac{2F}{2.303RT} + 2pH \quad (2.4.8.)$$

rH se v vinarstvu še vedno veliko uporablja (Šikovec 1980, Muštovič, 1985, Dikanovič-Lučan in Palić, 1992, 1995)

Oglejmo si še pomembno metabolično pretvorbo acetaldehida v etanol v prisotnosti NAD^+ , H^+ in NAD , ki poteka pri fermentaciji vinskega mošta. Pri tej reakciji gre za prenos dveh elektronov in dveh atomov H v molekulo acetaldehida:



reakcijo je nazorno pisati takole:



ki jo lahko predstavimo s kombinacijo dveh reakcij



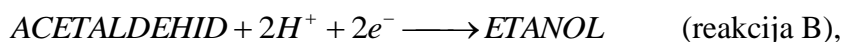
za katero se redoks potencial glasi

$$E_h = E_{NAD^+, H^+, NADH}^0 - \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{a_{NADH} a_{H^+}}{a_{NAD^+} a_{H^+}^2} \right), \quad (2.4.9.)$$

s standardnim elektrodnim potencialom

$$E_{NAD^+, H^+, NADH}^0 = -0,320 \text{ V}$$

in reakcijo



katero redoks potencial je enak

$$E_h = E_{ACALD, H^+, ETANOL}^0 - \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{a_{ETANOL}}{a_{ACETALD} a_{H^+}^2} \right), \quad (2.4.10.)$$

s standardnim elektrodnim potencialom

$$E_{ACETALD, H^+, ETANOL}^0 = -0,197 \text{ V}$$

Ker je standardni redoks potencial para $NAD^+/NADH$ bolj negativen kot E^0 para acetaldehid/etanol, bodo elektroni prehajali od $NADH$ k acetaldehidu (akceptor elektronov).

Splošno velja, da redoks par z bolj negativnim standardnim elektrodnim potencialom odda elektrone redoks paru z bolj pozitivnim redoks potencialom oziroma večjo afiniteto do elektronov. Tako npr. redoks par $NADH/NAD^+$, ki ima izrazito negativni standardni potencial E^0 , lahko oddaja elektrone velikemu številu elektronskih akceptorjev, vključno z acetaldehidom, ki nastopa kot vmesni produkt pri alkoholni fermentaciji.

Celokupno metabolno reakcijo sestavljata torej reakciji A, ki teče v nasprotni smeri kot je zapisano zgoraj, in reakcija B:



Ravnotežna konstanta za to reakcijo se glasi:

$$K = \frac{a_{ETANOL} a_{NAD^+}}{a_{NADH} a_{H^+} a_{ACETALD}} \quad (2.4.11.)$$

Ker potekata reakciji A in B istočasno na inertni (Pt) elektrodi, govorimo o dvojni (ali o večkratni elektrodi, če je reakcij več). Reakciji A in B se odvijata pri istem redoks potencialu.

Velja torej

$$E_h = E_{ACALD,H^+,ETANOL}^0 - \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{a_{ETANOL}}{a_{ACETALD} a_{H^+}^2} \right) = E_{NAD^+,H^+,NADH}^0 - \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{a_{NADH} a_{H^+}}{a_{NAD^+} a_{H^+}^2} \right) \quad (2.4.12.)$$

Iz te enačbe lahko s preureditvijo členov dobimo izraz za izračun ravnotežne konstante reakcije:



$$\ln K = \ln \frac{a_{ETANOL} a_{NAD^+}}{a_{NADH} a_{H^+} a_{ACETALD}} = \frac{2F}{RT} (E_{NAD^+,H^+,NADH}^0 - E_{ACETALD,H^+,ETANOL}^0) \quad (2.4.13.)$$

Če v enačbo (2.4.13.) vstavimo ustrezne številske vrednosti, dobimo:

$$\log K = \frac{2 \cdot 96500 \text{ As} / \text{mol}}{2.303 \cdot 8.314 \text{ VAs} / \text{Kmol} \cdot 298.15 \text{ K}} \cdot (0.320 \text{ V} - 0.197 \text{ V}) = 4.16, \text{ oziroma}$$

$$K = 10^{4.16} = 1,44 \cdot 10^4.$$

Velja si zapomniti, da je redoks potencial elektrodne reakcije B odvisen od temperature, od števila izmenjenih elektronov, od razmerja aktivnosti $a_{\text{etanol}}/a_{\text{acetald}}$ in od pH.

Povejmo še, da se v primeru neravnotežnih reakcij pri večkratni elektrodi pojavi tako imenovani mešani potencial. Ravnotežni potencial se doseže, ko se aktivnosti v reakcijah udeleženih zvrsti (specij) spremenijo tako, da je ugodeno enačbi (2.4.12.).

Za merjenje redoks potenciala uporabljamo člen:



sestavljen iz inertne kovinske elektrode (Pt ali Au) pomočene v raztopino preiskovanega sistema (v katerem lahko poteka oksidacijsko redukcijska reakcija) in neke referenčne elektrode praviloma pri standardnih pogojih ($T = 298\text{K}$ in $P = 1.013 \text{ bar}$). Za referenčno elektrodo iz praktičnih razlogov navadno uporabljamo kalomelsko elektrodo ali Ag/AgCl elektrodo namesto standardne vodikove elektrode. Seveda pa moramo v takem primeru izmerjeni redoks potencial preračunati na vrednost, ki bi jo dobili, če bi uporabili standardno vodikovo elektrodo:

$$E_h = E_{Pt,kal} + E_{SCE} \quad (2.4.14.)$$

kjer je

E_{SCE} potencial kalomelove elektrode proti standardni vodikovi elektrodi (V) (0,245V pri 298K).
 $E_{Pt,kal}$ izmerjena razlika napetosti med platinsko elektrodo in kalomelovo elektrodo (V)
 E_h redoks potencial (V).

2.4.2 MERJENJE REDOKS POTENCIALA

V principu obstajata dva načina za merjenje redoks potenciala:

- merjenje z redoks barvili
- merjenje z redoks elektrodami

Meritve redoks potenciala z barvili niso natančne in zahtevajo veliko število različnih barvil, da bi opravili semi kvantitativne meritve; barvila so lahko toksična za celice in lahko zavirajo encimsko delovanje v bioloških raztopinah (Hill, 1973). Zaradi tega se ta metoda v bioloških sistemih ne uporablja. V laboratorijskih in v industrijskih bioreaktorjih za merjenje redoks potenciala uporabljajo sterilizabilno, kombinirano elektrodo - platinsko (indikatorsko) in kalomelovo ali Ag/AgCl elektrodo (referenčno), kot elektrolit pa 3 M KCl raztopino ali pa tudi KCl-gel. Redoks elektrode so armirane. Nadtlak predstavlja zaščito pred vstopom substrata preko kontaktnega keramičnega čepa v elektrolit.

Dejavniki, ki vplivajo na proces meritve redoks potenciala (Deibner, 1964):

- platinizacija elektrode
- geometrijska površina elektrode
- kemijska obdelava elektrode (čiščenje elektrod)
- efekt temperature, aeracije in svetlobe:
 - naraščanje temperature vodi k zmanjšanju redoks potenciala in obratno
 - aeracija pa povzroča hitro rast vrednosti redoks potenciala
 - izpostavljanje sončni svetlobi zmanjšuje redoks potencial vina
- efekt praznega prostora nad tekočino in efekt mešanja
 - potencial se stabilizira hitreje v mešanem reaktorju.

2.4.2.1 Elektrode

E_h lahko merimo z elektrodo, kjer je potencial potopljene elektrode odvisen od aktivnosti elektronov v raztopini. Elektrode, ki jih uporabljajo za merjenje redoks potenciala morajo izpolnjevati naslednje zahteve:

- visoka elektronska prevodnost elektrodnega materiala
- nevtralnost do merjene raztopine; inertnost – odsotnost medsebojnega vpliva med elektrodnim materialom in merjeno raztopino
- ustrezna hitrost izmenjave elektronov na meji med elektrodo in raztopino redoks sistema, ki zagotavlja stabilne vrednosti elektrodnega potenciala in reverzibilnost specifičnega redoks sistema.

Vrste elektrod, ki izpolnjujejo zgoraj navedene zahteve so (Kjaergaard, 1976):

1. tankoplastne elektrode s povečano površino
2. elektrode iz živega srebra ali drugih kovin
3. elektrode iz ogljikovih materialov, predvsem grafita
4. elektrode iz polprevodnikov (kositrov oksid, titanov oksid)

Pomemben dejavnik pri merjenju redoks potenciala je referenčna elektroda. V principu je to vodikova elektroda. Bolj pogosto uporabljamo referenčne elektrode, kot so kalomelova elektroda ali Ag/AgCl, KCl_(sat)// elektroda. Merjeni potencial med referenčno in redoks elektrodo mora biti popravljen za potencial referenčne elektrode. Pri 20 °C je potencial za Ag/AgCl elektrodo 197 mV in za nasičeno kalomelovo elektrodo 244 mV (Linnet, 1970).

Ker ima nasičena kalomelova elektroda konstanten potencial, so spremembe izmerjenega potenciala odvisne samo od spremembe potenciala na indikatorski elektrodi. Potential nasičene kalomelove elektrode z ozirom na vodikovo elektrodo je 250 mV (Bandel, 1996).

Kalibriranje elektrod

Problem pri merjenju redoks potenciala je tudi kalibriranje elektrod. V rastnem mediju ni ravnotežja. Edina pravilna metoda kalibracije elektrod je merjenje potenciala redoks pufru v katerem obstaja ravnotežje med aktivnostjo oksidantov in reductantov pri konstantnem pH. Metoda, ki se uporablja za kalibracijo v laboratoriju je meritev potenciala v dveh nasičenih raztopinah hidrokinona pri dveh različnih vrednostih pH. Pri 25 °C je potencial hidrokinona (Linnet, 1970):

$$E_{h,\text{hidrokinon}} = 699 - 59.1\text{pH} \quad (2.4.14.)$$

2.4.3 REDOKS POTENCIAL V BIOTEHNOLOGIJI

Redoks sistem igra pomembno vlogo v življenjskem procesu vseh živih organizmov. Zato ni presenetljivo dejstvo, da so vse od kar je Priestley odkril in izoliral kisik, bile narejene teoretične in eksperimentalne študije oksidativnih in reduktivnih procesov v živalih, rastlinah in mikroorganizmih (Hewitt, 1950)

Redoks potencial v mikrobnih kulturah predstavlja vsoto vseh oksidacijsko-redukcijskih procesov v posameznih fermentacijah, v katerih je bistvenega pomena metabolizem mikrobnih celic in je posledica reverzibilnih oksidacijsko-redukcijskih reakcij, ireverzibilnih redukcij ter delovanja prostega kisika in vodika. V mikroorganizmih nastane zaradi oksidacijsko-redukcijskih reverzibilnih parov, ireverzibilnih reductentov ter prostega kisika in vodika. Posamezne raziskave so pokazale, da s pomočjo redoks potenciala dobimo več informacij o oksidativnem stanju v aerobnih in delno aerobnih mikroorganizmih kot z merjenjem parcialnega tlaka raztopljenega kisika (Berovič, 1987).

Biološke raztopine so ekstremno kompleksen medij v katerem poteka veliko število ireverzibilnih, sočasnih, zaporednih in paralelnih kemijskih in bioloških reakcij. Ugotovili so, da kljub kompleksnosti reakcij, ki določajo redoks potencial v določenih bioloških sistemih,

redoks potencial predstavlja parameter, ki lahko daje koristne informacije o metabolizmu v mikrobnih kulturah (Kjaergaard, 1977).

Redoks potencial je funkcija temperature, pH vrednosti, koncentracije raztopljenega kisika, ravnotežne konstante in oksidacijsko-redukcijskega potenciala tekočine (Ishizaki *in sod.*, 1974).

Pri prenosu kisika v aerobnih in fakultativno aerobnih kulturah, mora obstajati potencialna razlika med koncentracijo kisika v celici in koncentracijo kisika v okoliškem mediju. Koncentracija kisika se zmanjšuje od raztopine proti celici in zato je intercelularni redoks potencial mikroorganizma vedno nekoliko bolj negativen kot ekstracelularni redoks potencial. V anaerobnih mikroorganizmih povzročajo večje koncentracije kisika ireverzibilne poškodbe celice in nujno je zagotoviti anaerobne pogoje za rast. Če jih ni mogoče zagotoviti v okolju, fakultativni anaerobi porabijo kisik v začetni fazi procesa in s tem ustvarijo anaerobne pogoje za gojenje. V drugih primerih pa kisik odstranimo iz okolja (Jacob, 1970).

Dahod je ugotovil, da lahko redoks potencial koristno uporabimo namesto meritev parcialnega tlaka raztopljenega kisika. Ugotovil je tudi, da ima redoks potencial prednosti, zaradi katerih je bolj uporaben in bolj zanesljiv procesni parameter pri izjemno nizkih parcialnih tlakih kisika, kot pa meritev parcialnega tlaka raztopljenega kisika (Dahod, 1982).

V kvasovkah, ki producirajo ksilitol, vpliva dodatek kisika na izkoristek nastalega ksilitola, ki določa delitev porabe ogljika od porabe ksiloze med celično rastjo in produkcijo ksilitola. Za učinkovito biosintezo ksilitola je potrebna natančna kontrola kisika in vzdrževanje nivoja parcialnega tlaka kisika na majhnih koncentracijah. Visoke vrednosti redoks potenciala so ugodne za povečanje celične mase, bolj kot pa za produkcijo ksilitola, medtem ko nizke vrednosti podpirajo nastajanje ksilitola. Tudi v tem primeru so merili redoks potencial in s tem zasledovali potek fermentacije. Ko se je zaključila celična rast, so redoks potencial kontrolirali z uravnavanjem intenzivnosti mešanja v mejah od -60 mV do 250 mV. Proizvodnja ksilitola je maksimalna pri 100 mV (Oh *in sod.*, 1998).

V proizvodnji inosina z *Bacillus subtilis* je Shibai s sodelavci naredil korak naprej in določil pO_{2crit} z meritvami raztopljenega kisika, redoks potenciala, celične respiratorne stopnje in kontrole pH ter temperature biosinteze. Ko je koncentracija raztopljenega kisika dosegla vrednost nad $1 \cdot 10^{-2}$, je postala zveza med redoks potencialom in logaritmom parcialnega tlaka raztopljenega kisika (pO_2) linearna. Redoks potencial se je opazno znižal zaradi fizioloških sprememb v celicah, dihanje celic pa je bilo oteženo pri $E_h = -180$ mV (Shibai *in sod.*, 1974).

Meritve celičnega redoks potenciala so uspešno uporabili pri spoznavanju fiziološkega stanja mikroorganizmov (Graindorge *in sod.*, 1994; Kwong in Rao, 1991; Kwong in Rao, 1992; Oktybarsky in Smirnova, 1989), za optimizacijo učinkovitosti procesa (Du Prez *in sod.*, 1989; Kwong in Rao, 1992), za kontrolo procesa (Graindorge *in sod.*, 1994) in za spremljanje procesa (Kaake *in sod.*, 1992; Linko, 1992; Mosey, 1985).

Ishizaki, Shibai in Hirose so poskušali vzpostaviti zvezo med redoks potencialom in drugimi spremenljivkami, kot so pH in parcialni tlak raztopljenega kisika. Ugotovili so, da je naklon krivulje redoks potenciala odvisen od uporabljenega mikroorganizma in pogojev fermentacije (T, pO_2 ...) (Ishizaki *in sod.*, 1974).

Tako je Akashi s sodelavci ugotovil, da optimalna proizvodnja L-levcina z *B. lactofermentum* poteka, ko je koncentracija raztopljenega kisika praktično enaka nič in je redoks potencial med -220 in -200 mV. Poročal je o možnostih uporabe elektrode za merjenje redoks potenciala v fermentaciji L-levcina, kjer se je meritev redoks potenciala pokazala za izredno koristno pri določanju pogojev prenosa kisika, v primeru ekstremno nizkih parcialnih tlakov kisika (Akashi, 1978).

Le nekaj objavljenih objav pa opisuje spremembe celičnega redoks potenciala ali njegovo koristnost med kultivacijo višjih evkariotskih celic. Hwang in Sinskey (1991) ter Eyer in Heinzle (1996) so poročali o karakterističnih spremembah celičnega redoks potenciala in o njegovih korelacijah s koncentracijo celic, sposobnih za življenje, v hibridnih kulturah pri konstantnem parcialnem tlaku kisika in konstantnem pH.

Shibai s sodelavci je uporabil redoks potencial kot indikator prisotnosti kisika v aerobni kultivaciji *Bacillus subtilis*. Poskušal je ugotoviti zvezo med izmerjenim redoks potencialom fermentacijske brozge in produkti primarnega metabolizma. Ugotovili so, da različni nivoji redoks potenciala, ki so blizu pri vrednostih parcialnega tlaka kisika nič, *B. subtilis* v fermentacijah vplivajo na nastajanje različnih metabolitov. Pri redoks potencialu -200 mV je nastajala mlečna kislina, medtem ko je nastajal 2,3-butilenglikol pri redoks potencialu -195 mV, acetoin pa je nastajal pri -160 mV (Shibai *in sod.*, 1975).

V pretvorbi L-sorboze v 2-keto-L-glukonsko kislino, z uporabo mutanta vrste *Pseudomonas* (Tengerdy, 1961) so redoks potencial uporabili za ugotavljanje celične potrebe po kisiku. Pri biosintezi antibiotikov levorina A in levorina B z *Actinomyces levoris*, so Sukharevich in sodelavci 1970 ugotovili, da več levorina A nastaja pri višjih vrednostih redoks potenciala, med tem ko nastaja več levorina B pri nižjih vrednostih redoks potenciala. Podobni rezultati so bili dobljeni tudi v primeru aminokislinske fermentacije s *Corynebacterium glutamicum* (Radjal *in sod.*, 1984), kjer se je izkazalo, da je bila največja produkcija lizina pri rahlem pomanjkanju kisika, pri redoks potencialu med -230 in -210 mV.

Vrednost redoks potenciala lahko kontroliramo in reguliramo s pomočjo dodajanja različnih substanc ali pa s pomočjo spreminjanja procesnih parametrov, kot je intenzivnost mešanja (Berovič, 1999). V procesu submerzne fermentacije citronske kisline z *Aspergillus niger*, pri kateri so uporabili kot substrat melaso iz sladkorne pese, so z uporabo prezračevanja in mešanja, vzdrževali določen profil redoks potenciala z dvema maksimumoma (260 in 280 mV) in dvema minimumoma (180 in 80 mV); s tem so dosegli ponovljivost in visoko produktivnost procesa (Berovič in Cimerman, 1998).

Za določen optimalni proces z nekim mikroorganizmom je značilna krivulja redoks potenciala. Zelo nizki redoks potenciali označujejo reduktivno stanje fermentacijske brozge. Reduktivno stanje respiratornega sistema pomeni, da se v sistemu odvijajo intenzivne metabolne aktivnosti. Zaradi tega nekatere mikrobiološke biosintezne reakcije najugodnejše potekajo pri vrednostih redoks potenciala, ki so blizu minimalnih vrednosti. Ta ugotovitev se je izkazala za točno v proizvodnji citronske kisline (Matkovics in Kowacs, 1957; Radjal *in sod.*, 1984, Berovič *in sod.*, 1986; Berovič, 1999), v fermentativni proizvodnji riboflavina (Kramli in Szabo, 1959), aminokislin (Kwong in Rao, 1991, 1992), ksilitola (Deok-Kun *in sod.*, 1997) in v fermentativni tehnologiji proizvodnje vina (Dikanović-Lučan in Palić, 1995). Nizke vrednosti redoks potenciala pa predstavljajo tudi ugodno okolje za rast in preživetje kulture *Escherichia coli* (Bagramyan *in sod.*, 2000).

V zadnjih letih je bilo študij namenjenih meritvam redoks potenciala v anaerobnih bioloških procesih (Beck in Schink; 1995; Heppner *in sod.*, 1992, Peck in Choweth, 1992) Nekatere raziskave opisujejo tudi pomen meritev redoks potenciala v celični fiziologiji in interpretaciji meritev pri gojenju evkariotskih celic (Hwang in Sinskey, 1991) in v hibridnih kulturah fiziologije živih celic (Eyer in Heinzle, 1996; Higerada *in sod.*, 1997).

2.4.4 REDOKS POTENCIAL V VINARSTVU

Oksidacijsko - redukcijski potencial so v vinarstvu pričeli uporabljati leta 1932 in z njim pojasnili marsikateri pojav in poseg pri zorenju in staranju vina. V vinu se oksidirajoče in reducirajoče snovi nahajajo v določenem ravnotežju. Optimalna E_h vrednost vina je vrednost pri kateri se v vinu optimalno oblikuje okus, aroma in kakovost vina. E_h vrednost vina je specifična za vsako sorto.

Vino predstavlja kompleks oksidacijskih in redukcijskih reakcij med posameznimi spojinami. V vinu ločimo organske in anorganske redoks sisteme. Redoks sistem anorganske narave predstavlja prehod iz reducirane v oksidirano obliko s sproščanjem elektronov, s sprejemanjem elektronov pa se vrača v reducirano obliko. Najpogostejši so spojine težkih kovin – železa, bakra, cinka in njihove soli, ki pod določenimi pogoji prehajajo v oksidirano stanje in obratno nazaj v reducirano. Redoks sisteme organske narave pa predstavljajo etanol, organske kisline, polifenoli. To so reducirane oblike, njihove oksidirane oblike pa so acetaldehid in očetna kislina, keto kisline, dihidroaskorbinska kislina in kinoni. Redoks sistemi organske narave prehajajo iz ene v drugo obliko. Te oksidacijsko-redukcijske reakcije se odvijajo pod vplivi encimov in v odvisnosti od kemizma medija (Muštvović, 1985).

Poznavanje vrednosti redoks potenciala merjenega vzorca nam daje okvirno informacijo o redoks reakcijah, ki v tem trenutku v vinu potekajo in vplivajo na kakovost in stabilnost vina. Na splošno ima vino reduktivni značaj. Vrsta kemijskih, encimskih in bioloških procesov v vinu je povezana z redukcijsko-oksidacijskim stanjem vina. V tehnologiji vina je mogoče uporabiti redoks potencial na eni strani kot merilo za kontrolo dejanskih potreb po dodajanju žveplove(IV) kisline v mošt ali vino po končani fermentaciji, po drugi strani pa kot fiziološki faktor, pomemben za regulacijo kondenzacije in polimerizacije fenolnih komponent in spremljanje poteka procesa.

Med zorenjem, skladiščenjem in staranjem vina, imajo oksidacijsko-redukcijski procesi izjemno vlogo za končno kakovost vina. Vrednosti redoks potenciala v vinu se gibljejo v mejah od 50 do 230 mV. Oksidirana in pokvarjena vina pa kažejo višje E_h vrednosti, nad 320 mV. Stopnja oksidacije in redukcije vina je odvisna od temperature in pH vrednosti. Na splošno lahko rečemo, da zrelo vino predstavlja reduktivni značaj (Farkaš, 1988).

Po svoji kemijski sestavi vino vsebuje raznovrstne sestavine, , od katerih so mnoge podvržene redukcijsko-oksidacijskim reakcijam, ki v danem sistemu težijo k ravnotežju. Na osnovi vrednosti tega potenciala v določenem trenutku, lahko ugotovimo, v katero smer se posamezne reakcije odvijajo. Glede na njegovo vrednost lahko pravilno ukrepamo in z dodatki reguliramo te reakcije. Poznavanje potenciala je zelo pomembno za vina in razvijanje cvetice (Šikovec, 1993).

Vrednost in sprememba redoks pontenciala nam dajeta imnformacije o (Šantak, 1993):

- potek reakcije: ali poteka oksidacija ali redukcija,
- dobivamo vpogled v trenutno stanje vina, ki ga lahko primerjamo z drugimi vini,
- vrednost redoks potenciala v moštu in vinu je pomembna za razvoj ali inhibicijo rasti kvasovk,
- pri določenem redoks potencialu nastajajo usedline, še posebno, če so prisotni kovinski ioni.

V grozdnem moštu predstavlja vrednost izmerjenega redoks potenciala podatek o oksidativnem stanju fermentacijskega medija – grozdnega mošta, ki je izredno pomemben dejavnik za nadaljnji potek kvasnega metabolizma in s tem za vrsto kemijskih, encimskih in bioloških procesov, ki se dogajajo v moštu. Podatek o oksidativno–reduktivnem stanju mošta nam daje možnost regulacije procesa v smeri zagotavljanja za rast in razmnoževanje kvasovk ugodnega okolja, ki vodi do kakovosti vina.

Vrednost redoks potenciala v moštu in vinu je v tesni povezavi z mnogimi procesi v postopku pridelave vina. Takoj po stiskanju grozdja je redoks potencial okrog 325 mV, a že po 12 urah na zraku, v kontaktu s kisikom, se zaradi tvorbe peroksidnih enot v moštu, povzpne na 454 mV. Med fermentacijo pa se redoks potencial zmanjša tudi do vrednosti – 200 mV. Alkoholna fermentacija poteka pri relativno nizkem redoks potencialu, kar lahko po eni strani razložimo s porabo kisika s strani kvasovk v času njihovega razmnoževanja in z dejstvom, da iz kvasnih celic prehajajo v vino nekatere reducirajoče snovi kot sta glutation in cistein. Po končani fermentaciji, v času hranjenja vina, je vrednost redoks potenciala odvisna od prepustnosti sodov. Na začetku, pri mladih vinih, ki jih hranimo v lesenih sodih, se vrednosti redoks potencial gibljejo okrog 300 – 350 mV, medtem ko se staranje v tankih iz nerjavnega jekla odvija pri potencialu okrog 140 – 150 mV. V procesu hranjenja vina imajo na redoks potencial vpliv razni posegi, ki jih izvajamo na vinu. Posebno vlogo pri tem ima žveplov dioksid. S svojimi reduktivnimi lastnostmi veže potencialne oksidante in s tem v veliki meri zniža redoks potencial vina. Enak učinek povzroča tudi askorbinska kislina. Čeprav se ti dve snovi razlikujeta po načinu delovanja, predstavljata učinkovit regulator oksidacijsko–redukcijjskih procesov in ju prištevamo v skupino redoks regulatorjev (Wondra, 1997)

Pretakanje vina v prisotnosti zraka, filtracije in razna bistrenja prav tako vplivajo na velikost redoks potenciala. Neposredno po raztapljanju kisika v moštu, vrednost redoks potenciala ne naraste takoj, ampak šele po času nekaj ur, odvisno od časa trajanja izpostavljenosti mošta kisiku iz zraka (Kukec *in sod.*, 2002). Primarna oksidacija z molekularnim kisikom teče relativno počasi in do intenzivnejših oksidacijskih reakcij prihaja šele po nastanku intermediarnih peroksidnih enot pri tako imenovanih sekundarnih oksidacijah. Pri primarni oksidaciji fenolov v odgovarjajoče kinone nastaja H_2O_2 , ki v sekundarni oksidaciji katalizira pretvorbo etanola v acetaldehid.

Rast in metabolizem kvasnih celic med procesom fermentacije grozdnega mošta lahko opišemo s serijo oksidacijsko–redukcijjskih reakcij. Intenziteto in razmerje oksidacijskih in redukcijjskih procesov ter njihovo stanje smo želeli prikazati in ovrednotiti s krivuljami izmerjenih redoks potencialov. Redoks potencial v fermentacijskem sistemu predstavlja odvisno spremenljivko, ki nam daje informacije o trenutnem dogajanju v sistemu. S spreminjanjem zunanjih spremenljivk, kot so temperatura fermentacije, količina prisotnega kisika in CO_2 v sistemu, dodajanja reducirajočih snovi (žveplove(IV) kisline) v grozdnim mošt in kasneje v vino, lahko vplivajo na spremembo vrednosti redoks potenciala in s tem

neposredno na potek fermentacije. Merjenje redoks potenciala je relativno hitra in zanesljiva metoda, ki omogoča vpogled v oksidacijsko oziroma redukcijsko sposobnost vina in je tako zelo uporabna kot kvalitativni in kvantitativni dejavnik v spremljanju procesa vinske fermentacije in analize vina. Ker je redoks potencial tesno povezan s številnimi kemijskimi reakcijami, ki potekajo v vinu, pa naj bodo spontane ali inducirane, nam poznavanje le-tega omogoča dobro kontrolo celotnega procesa vinske fermentacije (Kukec *in sod.* 2002).

Raziskave redoks potenciala vina so bile opravljene z uporabo platinske elektrode. Najobširnejše študije so bile opravljene pod vodstvom Deibner-ja in Mourgues-a (1969). Redoks potencial vina je odvisen od pH (Ribéreau-Gayon, 1973), zato je priporočljivo vzporedno z meritvami redoks potenciala opravljati tudi meritve pH vrednosti. Deibner in Mourgues sta ugotovila, da se vrednost redoks potenciala spremeni za 60 mV na enoto pH (Deibner in Mourgues, 1969).

Oksidacijsko - redukcijske reakcije igrajo pomembno vlogo v procesu nastajanja in zorenja vina. Pravilno ravnotežje oksidiranih in reduciranih substanc je zelo pomembno za optimalni okus in aromo vina. Merjenje teh parametrov omogoča pomemben vpogled v proces razvoja vina in omogoča optimizacijo pogojev med zorenjem vina (Tomlinson in Klimartin, 1997).

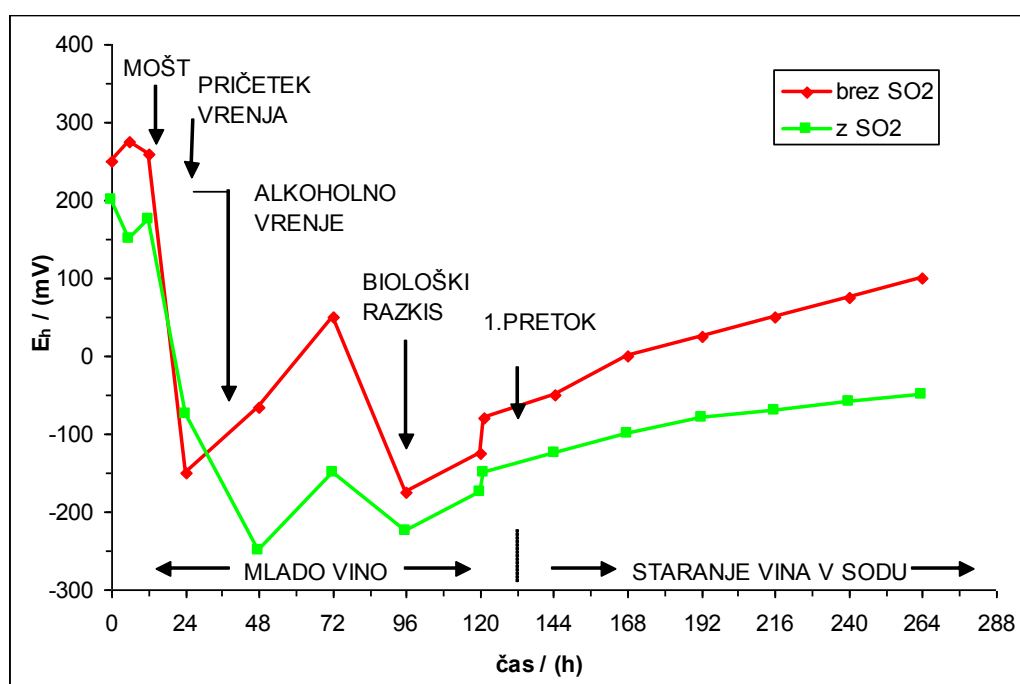
Z dodatkom žveplovega dioksida v grozdni sok, se vrednost merjenega redoks potenciala zmanjša in fermentacijski proces se upočasni. Z ozirom na vrednost redoks potenciala obstajajo velike razlike med posameznimi vrstami kvasovk. Področje delovanja kvasne aktivnosti je v mejah od -200 do 350 mV. Nad to vrednostjo deluje kisik toksično in inhibitorno, pod vrednostjo -200 mV pa je parcialni tlak raztopljenega kisika prenizek za normalne življenjske pogoje kvasovk (Judež, 1981).

Alkoholna fermentacija poteka pri relativno nizkih vrednostih redoks potenciala pretežno zaradi sproščanja redoks komponent (cistein, glutation) iz kvasnih celic v vino. Razen tega pa tudi intenzivna rast kvasnih celic, ob porabljanju raztopljenega kisika, ki ga spremlja nastajanje ogljikovega dioksida, kot tudi nastajanje redoks spojin, povzročajo zmanjšanje vrednosti redoks potenciala (Dikanović-Lučan in Palić, 1992). Redoks potencial, kot tudi parcialni tlak raztopljenega kisika se zmanjšujeta med procesom vinske fermentacije. Po nekajdnevni fermentaciji kažejo bela vina večje vrednosti redoks potenciala (340 mV in $3,49$ mgO₂L⁻¹), kot pa rdeče vina (305 mV in $0,7$ mgO₂L⁻¹) (Dikanović-Lučan in Palić, 1995).

Slika 2.4.1. prikazuje potek naraščanja in padanja vrednosti redoks potenciala v moštu ali vinu brez dodatka SO₂ in z njim med procesom predelave grozdja, fermentacije in zorenja vina. Prva faza drozga–mošt obsega predelavo grozdja od trgatve do začetka alkoholnega vrenja. V drozgi oziroma moštu pred alkoholnim vrenjem se kisik ob dostopu zraka sorazmerno hitro topi in reagira s polifenoli. Fenolne snovi iz pecljevine, kožic in pečk, ki prehajajo v grozdni sok, se zaradi oksidacije kondenzirajo v večje molekule in se med alkoholnim vrenjem izločijo. Pri predelavi belih vinskih sort, kjer so polifenoli nezaželeni, ker škodljivo vplivajo na kakovost vina, to izločanje štejemo za želen proces. Drugače je pri pridelavi rdečih vinskih sort, pri katerih se lahko tudi delno oksidirajo rdeča barvila. Zato je pri pridelavi rdečih vinskih sort še pomembnejše, da k drozgi dodamo močan vcepek kvasovk, ki hitro sproži začetek alkoholnega vrenja in s tem prepreči nadaljnjo topnost kisika iz zraka, ker sproščeni plin CO₂ prekrije prazen vrelni prostor in izrine zrak, ki bi z oksidacijo barvnih komponent škodljivo vplival na končno kakovost vina. V začetni fazi je zelo

pomembna hitra predelava zdravega, nepoškodovanega grozdja ter hiter začetek alkoholnega vrenja, da ne pride do prevelike škodljive topnosti kisika.

Pri oceni vzporednih poskusov z zdravim, hitro predelanim grozdem ob takojšnjem začetku alkoholnega vrenja brez dodatka reducirajočih žveplovih spojin, je bilo ugotovljeno, da so bila vina brez žveplanja mošta senzorično boljša. Pri nagnitem ali drugače poškodovanem grozdu pa moramo upoštevati, da se brez žveplanja ob dostopu kisika oziroma zraka v tej prvi fazi hitro razvijejo v moštu ali drozgi prisotni kvarljivi mikroorganizmi, kot so očetno in mlečnokislinske bakterije, šibkovrelne in oksidativne kvasovke. Če je že na samem grozdu preveč kvarljivcev, močan dodatek SO_2 zniža redoks potencial in poseže selektivno v sestavo patogene mikroflore, ki potrebuje kisik za svoj razvoj in delovanje (Šikovec, 1993).



Slika 10.: Redoks potenciala v moštu in vinu brez dodatka SO_2 in z njim (Šikovec, 1993)

V prvi razvojni fazi, ko imamo opravka z drozgo – moštom se lahko v prvih urah raztopi 200 mg kisika na liter, ko že doseže nasičenost. Meritve v tej fazi so težko izvedljive, ker potekata vzporedno procesa topnosti kisika in vezave kisika na posamezne sestavine. Običajno se v normalnih razmerah predelave tehnološko zrelega in zdravega grozdja raztopi v 1 litru mošta 80 do 100 mg kisika, kar ustreza vrednosti redoks potenciala približno 200 mV. Dodane kvasovke se ob topnem kisiku brez žveplanja mošta hitreje razmnožujejo in prej začnejo z alkoholnim vrenjem ob manjšem nastanku acetaldehida in piruvata, kot vzporednima stranskima produktoma fermentacije. Hiter začetek alkoholnega vrenja in ugodna kemijska sestava mošta ter temperatura med vrenjem, omogočajo kvasovkam ustrezen metabolizem, kjer nastane čim manj aldehydov, zlasti acetaldehida in piruvata, ki so veliki porabniki žvepla (Vannini *in sod.*, 1994).

Drugo fazo – alkoholno vrenje - štejemo za nastanek vina. Iz slike 10. vidimo, da je za to fazo značilna močna reduktivnost. Vrednost redoks potenciala pade pod optimalno vrednost, ker porabijo kvasovke del kisika za svoje razmnoževanje. Preostali delno topni kisik se izgubi, ker ga sproščeni ogljikov dioksid izrine iz mošta. Mošt je zaradi nastalega CO₂ zaščiten pred dodatno topnostjo kisika iz zraka. Tretja razvojna faza – po končanem alkoholnem vrenju do ustekleničenja – vina in naprej je časovno najdaljša. V tej fazi se kisik v vinu topi počasneje kot v moštu ali drozgi. Zmogljivost topnosti kisika je namreč odvisna od prejšnje obremenjenosti vina s kisikom (Šikovec, 1993).

Raziskave meritev redoks potenciala v vinu se nadaljujejo (Nilov, 1975, Russu in Maksimova, 1992, Dikanović-Lučan in Palić, 1992). Vivas (1996) s svojo raziskovalno skupino razvija tehniko, ki bi dopuščala hitrejšo stabilizacijo redoks potenciala (Tomlinson in Klimartin, 1997). Več raziskav je bilo opravljenih na proučevanju povezave med izmerjenimi vrednostmi redoks potenciala in senzoričnimi lastnostmi vin iz področja bivše Jugoslavije (Dikanović-Lučan in Palić, 1992). Parcialni tlak raztopljenega kisika je faktor, ki vpliva na vrednost redoks potenciala (Nilov, 1975, Ribéreau-Gayon, 1973). Znižanje redoks potenciala med procesom vinske fermentacije zaznamo po postopku dodajanja SO₂ ali pa askorbinske kisline v grozdni mošt ali vino (Deibner in Mourgues, 1969).

Tabela 2.: Tipične redoks komponente v vinu in njihov redoks potencial reakcij
 (<http://www.bio.cmu.edu/courses/03231/LecF03/Lec32/Redox.html>)

Reakcija (oksidiran ↔ reduciran)	E ^{0'} (V)*; pH = 3,5
$1/2O_2 + H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2O$	1,02
$O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2O_2$	0,48
<i>oksalacetat</i> + 2H ⁺ + 2e ⁻ → <i>malat</i>	0,10
<i>acetaldehid</i> + 2H ⁺ + 2e ⁻ ↔ <i>etanol</i>	0.04
$(glutation - S)_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow 2glutation - SH$	-0,023
$SO_4^{2-} + 4H^+ + 2e^- \rightarrow SO_2 + 2H_2O$	-0,24

* a_H⁺ = 10^{-3,5}

2.4.4.1 Vpliv kiska na redoks potencial vina in na rast kvasovk *S. cerevisiae*

Molekularni kisik, O₂, ki ga je v zraku skoraj 21 vol. %, je ob prisotnosti encimov (oksidaze, oksigenaze) močno oksidacijsko sredstvo. Če so v moštu ali vinu prisotni ioni težkih kovin, ki delujejo kot katalizatorji, pospeševalci prenosa kisika, lahko pride do neposredne oksidacije posameznih kemijskih sestavin mošta in vina (Šikovec, 1993). Količina v vinu raztopljenega kisika je močno odvisna od temperature. Pri nižji temperaturi, je reakcijska hitrost kisika upočasnjena, redoks potencial zato naraste, medtem ko pri višji temperaturi (20 - 25 °C) kisik reagira veliko hitreje in to znižuje redoks potencial (Dikanović-Lučan in Palić, 1995).

Delovanje kisika med samim procesom nastanka kakovostnega vina je lahko pozitivno ali negativno. Pozitivni efekt se zgodi med samim procesom fermentacije, kot tudi med procesom zorenja, negativni efekt pa je navzoč pri procesu nastanka aromatičnih komponent, ki je moten s prisotnostjo kisika (Dikanović-Lučan in Palić, 1995).

Reducirajoče lastnosti svežega mošta se izgubijo, če ga izpostavimo zraku, kar povzroči dvig vrednosti redoks potenciala. Reducirajoče snovi se v moštu in vinu v stiku s kisikom oksidirajo, zlasti polifenoli in askorbinska kislina. Oksidacijsko-redukcijski potencial mošta takoj po stiskanju znaša približno 200 do 300 mV, po daljši izpostavitvi zraku pa lahko naraste celo nad 400 mV. Posledica tega je nastajanje peroksidnih snovi. Pri belih vinih je pomembno, da je mošt čim krajši čas izpostavljen stiku s trdnimi delci grozdja, ker ti vsebujejo oksidirajoče snovi (polifenolne snovi iz pecljevine, kože grozdnih jagod in pečk) in encime (oksidaze, oksigenaze), ki posredujejo pri prenosu kisika iz zraka na posamezne sestavine. Posledica oksidacije polifenolov je zvišanje vrednosti oksidacijsko-redukcijskega potenciala. Prav tako lahko pride v grozdnem moštu ob daljši izpostavljenost večji koncentraciji kisika do hitrega razmnoževanja bakterij in šibkovrelnih kvasovk, ki tvorijo nezaželene presnovne produkte. Zlasti se v tem primeru poveča vsebnost acetaldehida, ki je največji porabnik žveplovega dioksida, poveča se tudi vsebnost hlapnih kislin, lahko pa nastajajo tudi biogeni amini in mikotoksini, ki močno zmanjšajo kakovost vina (Bandel, 1996).

Med potekom alkoholnega vrenja se oksidacijsko-redukcijski potencial zniža do vrednosti (od –250 do –300 mV). V tej fazi kvasovke pretvarjajo sladkor preko številnih vmesnih produktov v alkohol in ogljikov dioksid. Za to fazo je značilna močna reduktivnost procesa. Čim krajša je predfermentativna faza, tem manj acetaldehida bo v moštu nastalo. Zlasti prosti acetaldehid, ki ni nevtraliziran z žveplovim dioksidom, povzroča v vinu oksidativen vonj in okus. Več ko nastane acetaldehida, α -ketoglutarjeve kisline, piruvata med alkoholnim vrenjem, večje so potrebe po dodajanju žveplovega dioksida, če želimo ohraniti vino v optimalnem redukcijskem območju. Za zmanjšanje možnosti oksidacije je potrebno vse tehnološke postopke opraviti čim hitreje in s tem omejiti dostop zraka v sistem (Kukec *in sod.*, 2002).

Po končanem alkoholnem vrenju je vnos kisika v vino odvisen še od števila in načina pretokov, čiščenja, mešanja, transporta, načina stabilizacije na vinski kamen, sistema polnjenja in vrste ter kakovosti zamaškov. Na stopnjo raztapljanja kisika v vinu vplivajo temperatura, stanje mirovanja, prisotnost ogljikovega dioksida in sestava vina. Nižja ko je temperatura vina, večja je topnost kisika v vinu (Šikovec, 1993).

Kisik se na sestavine vina veže v začetku počasi, nato pa vse hitreje. Razlog za to je ta, da je kisik v molekularni obliki neaktiven. Z nastajanjem vmesnih snovi, peroksidov, se poraba kisika poviša. Posledica tega je dvig vrednosti oksidacijsko-redukcijskega potenciala. V nasprotju z raztapljanjem kisika poteka vezava kisika hitreje pri višji temperaturi. Pomemben vpliv na vezavo kisika imajo tudi oksidativne snovi, bakrovi in železovi ioni. Zelo važen je tudi način vnosa kisika v vino. Dokazano je, da je postopni vnos kisika v vino veliko boljši kot enkratni (Bandel, 1996).

Kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* so občutljive na kisik in glukozo, ki direktno ali pa indirektno, preko katabolne represije mehanizma, kontrolira dve možni katabolni poti za glukozo. Ena od teh je parcialna oksidacija po fermentativni poti, pri kateri nastaja majhna količina energije (2 mol ATP/mol glukoze) (Furukawa *in sod.*, 1983).

Glede na Pasteurjev efekt, je kisik znan kot inhibitor, ki zavira fermentacijsko pot pri biosintezi etanola (Sols, 1967), kar se kaže v padcu porabe sladkorja in nastanka ogljikovega dioksida in v povečanju celične rasti mikroorganizma. Ob prisotnosti višjih koncentracij

glukoze glukozni efekt preide Pasteur-jev efekt in fermentativna pot postane dominantna, v primeru, ko so koncentracije glukoze in kisika visoke (Furukawa *in sod.*, 1983).

Čeprav konverzija sladkorja v etanol ne zahteva kisika, pa je znano, da so majhne količine kisika nujno potrebne za celično rast (Fiechter, 1975). Malo je znanega o kvantitativnem vplivu kisika na kvasovke, zaradi dejstva, da je nivo koncentracije raztopljenega kisika pod vrednostmi, ki jih lahko izmerimo s kisikovimi elektrodami.

3 METODE IN MATERIALI

3.1 METODE

3.1.1 ODVZEM IN SHRANJEVANJE VZORCEV

Volumen vzorca fermentacijske brozge ob vzorčenju pri vseh eksperimentih je bil 100 mL. Po odvzemu sem vzorec filtrirala skozi beli filtrirni trak, filtrat pa sem shranila v prahovki pri temperaturi $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.1.2 DOLOČANJE SUHE BIOMASE

Koncentracijo suhe biomase sem določala gravimetrično. 20 mL vzorca odvzetega iz bioreaktorja, sem filtrirala skozi staničevino in tako odstranila trdne delce iz mošta. Vzorec sem nato centrifugirala pri 4000 obratih 5 min, supernatant odlila in nato sediment biomase v centrifugirkah izpirala v deionizirani vodi. Postopek izpiranja in centrifugiranja sem ponovila dva krat. Spran vzorec biomase sem prenesla na predhodno stehtan filter papir ($45\text{ }\mu\text{m}$). Filter papir z vzorcem sem sušila v električnem sušilniku pri $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 12 ur ter ga nato postavila v eksikator za 8 ur. Petrijevko z vzorcem sem stehtala. Koncentracijo suhe biomase sem izračunala po enačbi:

$$X = \frac{b - a}{V} \quad (3.1.1.)$$

X	koncentracija suhe biomase (gL^{-1})
a	masa filter papirja (g)
b	masa filter papirja z vzorcem (g)
V	volumen vzorca (L)

3.1.3 ANALIZA VIŠJIH ALKOHOLOV IN ACETALDEHIDA - GC

Višje (aromatske) alkohole sem določala s plinskim kromatografom Varian 3700, Dunaj, Avstrija. Vzorce sem predhodno predestilirala. Kvalitativno in kvantitativno sem določala prisotnost višjih alkoholov, ki v vinih predstavljajo prekurzorje arome: 1-propanol in izoamil alkohol (3-metil-1-butanol). Z isto metodo sem določala tudi prisotnost acetaldehida v moštu in vinu. Koncentracije višjih alkoholov in acetaldehida sem preračunala iz rezultatov grafično-integracijskega zapisa iz plinskega kromatografa s postopkom internega standarda. Za interni standard sem uporabila n-butanol (komponenta v fermentacijskem procesu ni prisotna) (Žorž, 1991).

3.1.3.1 Postopek internega standarda (IS)

Metoda omogoča določitev koncentracije merjenih komponent iz vrednosti podanih v obliki grafično-integracijskih izpisov plinskega kromatografa. Na podlagi znane koncentracije IS v vzorcu in v standardni raztopini, znanih koncentracij komponent v standardni raztopini sem izračunala absolutne faktorje odziva (F_i), s pomočjo teh pa koncentracije posameznih komponent v preiskovanem vzorcu. Absolutni faktorji odziva omogočajo popravek napake, ki nastane ob vnosu vzorca v plinski kromatograf.

- Priprava vzorcev za vnos v plinski kromatograf:
Vzorec sem pripravila tako, da sem zmešala 5 mL alkoholnega destilata preiskovanega vzorca in 100 μ L raztopine internega standarda. V plinski kromatograf sem vbrizgala 1 μ L vzorca.
- Priprava vzorca standardne raztopine:
Vzorec sem pripravila tako, da sem zmešala 5 mL standardne raztopine alkoholov in 100 μ L raztopine internega standarda.

Tlak plinov med procesom določitve je bil: N₂ (Messer, Avstrija) 5,5 bar, H₂ (Messer, Avstrija) 3 bar, zrak (MG, Ruše, Slovenija) 4,5 bar. Kolona za ločevanje je bila izdelek firme Supelco, HP-Inowax crosslynked polietilenglikol (stacionarna faza 5 % carbowax, nosilec 80/120 carbopack), Nemčija. Uporabili smo FID plamensko-ionizacijski detektor. Iz predhodno pripravljenih standardnih raztopin alkoholov, ki sem jo večkrat vnesla v plinski kromatograf, sem na podlagi grafičnega izpisa določila zadrževalne čase posameznih komponent raztopine in optimirala časovno temperaturni profil aparature, ter tako dosegla najugodnejše ločevanje komponent.

Najugodnejši temperaturno-časovni profil kolone za ločevanje v mojem primeru je bil:

- začetna temperatura: 30 °C, 3 min,
- korak dviga temperature: 5 °C/min,
- končna temperatura 130 °C, 3 min.

Temperatura injektorja je bila 180 °C, temperatura detektorja pa 300 °C. Absolutne faktorje odziva (F_i) sem preračunala po sledeči enačbi:

$$F_i = \frac{C_i \times A_{is}}{C_{is} \times A_i} \quad (3.1.2.)$$

F_i ...absolutni faktor odziva spojine (/)

C_i ...koncentracija spojine (gL^{-1})

C_{is} ...koncentracija internega standarda (IS) (gL^{-1})

A_i ...površina vrha spojine (AU)

A_{is} ...površina vrha internega standarda (AU)

Koncentracije posameznih komponent v vzorcu smo preračunali po enačbi:

$$C_{ivz} = \frac{C_{ivz} \times A_{ivz} \times F_i}{A_{isvz}} \quad (3.1.3.)$$

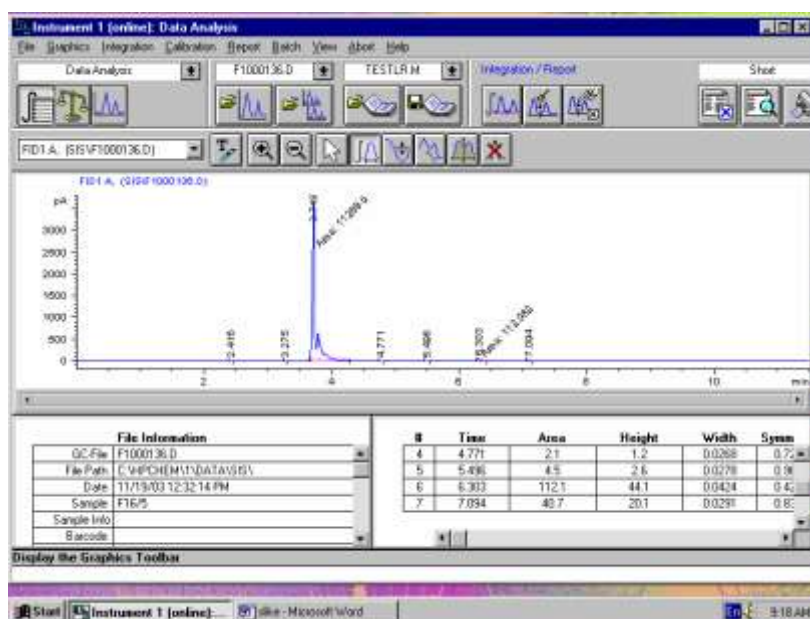
C_{ivz} ...koncentracija spojine v vzorcu

C_{isvz} ...koncentracija IS v vzorcu

A_{ivz} ...površina vrha spojine v vzorcu

A_{isvz} ...površina vrha IS v vzorcu

F_iabsolutni faktor odziva spojine



Slika 11: Orodje za zajemanje in obdelavo podatkov plinske kromatografije

3.1.4 HPLC ANALIZA

S pomočjo HPLC analize sem v okviru HPLC izokratskega sistema kvalitativno in kvantitativno določila koncentracije reducirajočih sladkorjev (glukoze in fruktoze), glicerola, etanola in organskih kislin (citronske, jabolčne, vinske, jantarne, mlečne in očetne kisline). Organske kisline sem detektirala na UV-VIS detektorju pri valovni dolžini 210 nm, sladkorje in glicerol pa preko RI diferencialnega refraktometra. Uporabila sem validirano metodo (Biorad, Guide to Aminex).

Optimalne delovne parametre na aparaturi sem dosegla z večkratnim vnašanjem standardov iskanih komponent in s spreminjanjem pretoka mobilne faze, koncentracije mobilne faze in temperature kolone. Določila sem zadrževalne čase in optimalno ločevanje komponent. Koncentracije sem določevala s pomočjo metode zunanjih standardov. S pripravo standardov različnih koncentracij za posamezne komponente sem izdelala umeritvene krivulje

komponent. Izračunala sem naklone premic umeritvenih krivulj standardov in preko njih preračunala koncentracije merjenih komponent v preiskovanih vzorcih po enačbi:

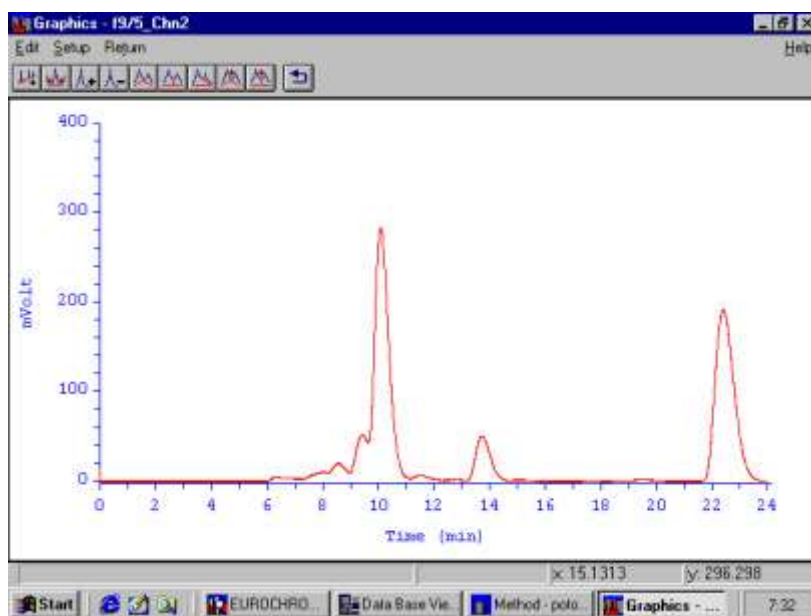
$$C_i = A_i \times F_i \quad (3.1.4.)$$

C_i ...koncentracija spojine v vzorcu;

A_i ...površina pika spojine;

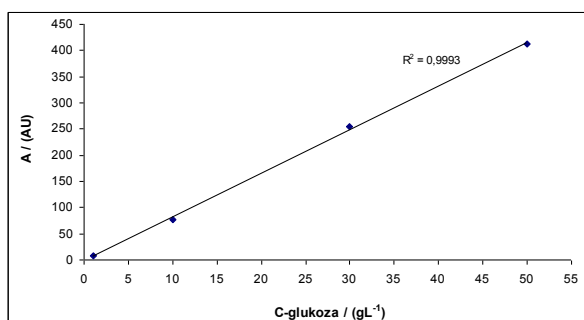
F_i ...kvocient linearne odvisnosti integracijskega izpisa spojine in njene koncentracije

Za ločevanje sem uporabila Bioradovo kolono Aminex HPX-87H (dimenzij 300×7,8 mm). Kot mobilno fazo sem uporabljala 0,002 M raztopino H_2SO_4 . Pretok mobilne faze je bil $0,6 \text{ mLmin}^{-1}$, temperatura kolone pa $65 \text{ }^\circ\text{C}$. Vzorce fermentacijske brozge sem pred vnosom v HPLC filtrirala z nitroceluloznimi filtri (Sartorius; $0,22 \mu\text{m}$ velikosti por) in po potrebi razredčila. Količina vzorca za analizo je bila $20 \mu\text{L}$.

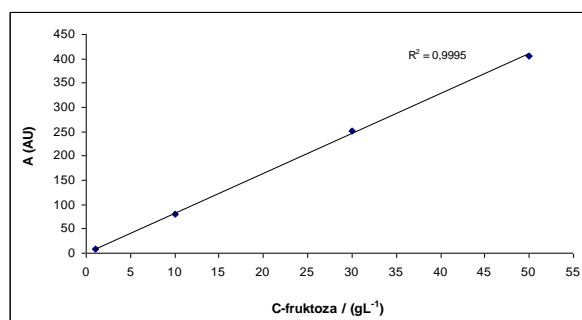


Slika 12: Orodje za zajemanje in obdelavo podatkov HPLC analiz Eurochrom 2000

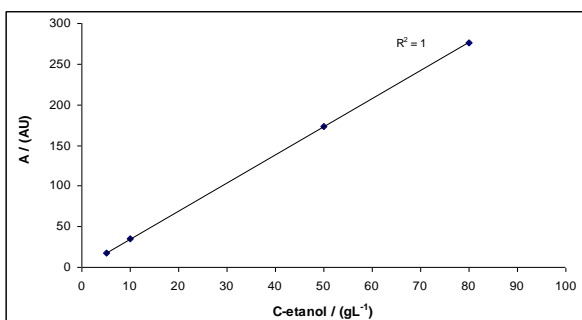
3.1.4.1 Umeritvene krivulje posameznih komponent za HPLC analizo



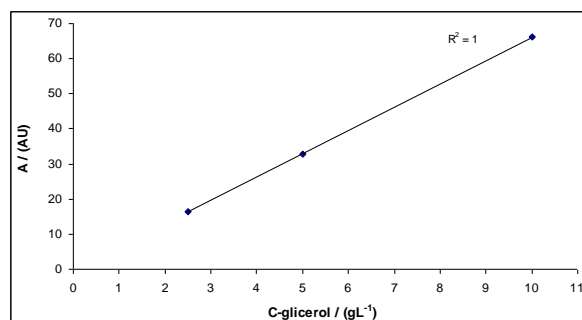
Graf 1.: Umeritvena krivulja za glukozo



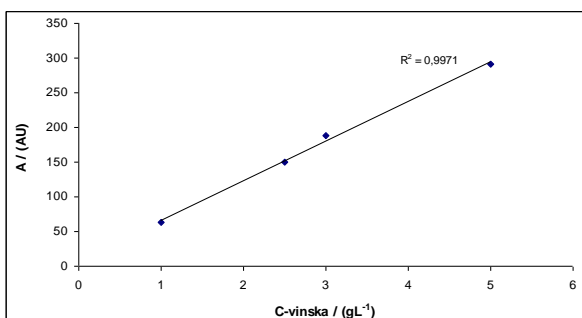
Graf 2.: Umeritvena krivulja za fruktozo



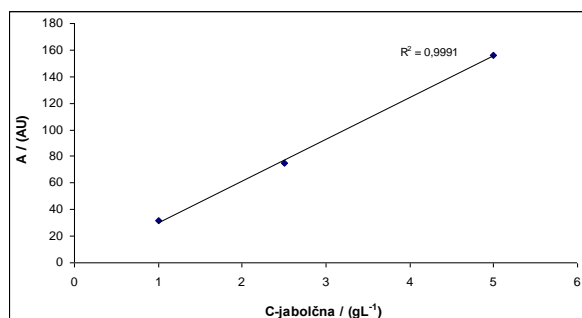
Graf 3: Umeritvena krivulja za etanol



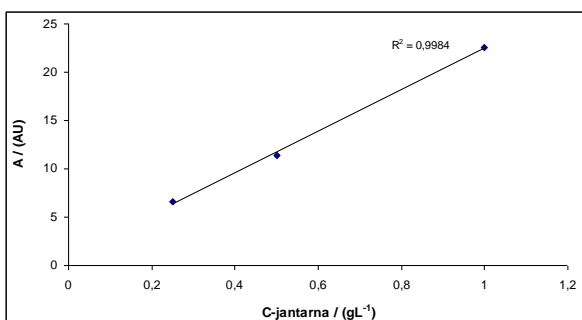
Graf 4: Umeritvena krivulja za glicerol



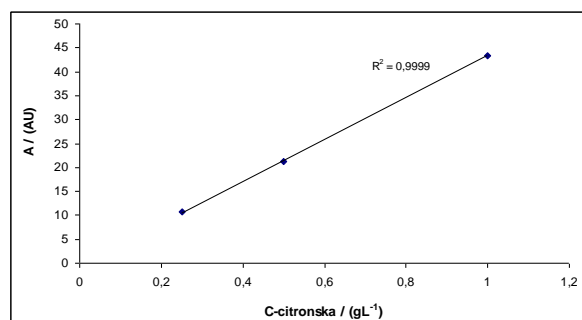
Graf 5: Umeritvena krivulja za vinsko kislino



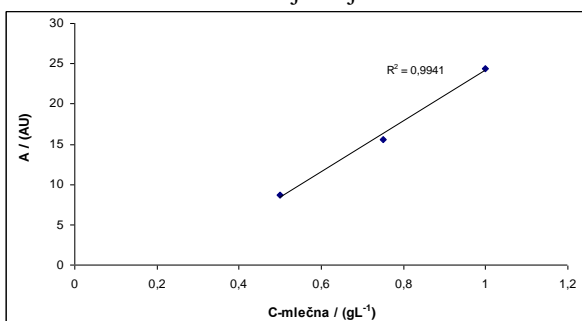
Graf 6: Umeritvena krivulja za jabolčno kislino



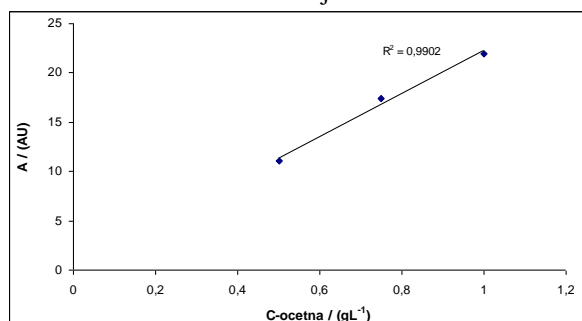
Graf 7: Umeritvena krivulja za jantarno kislino



Graf 8: Umeritvena krivulja za citronsko kislino



Graf 9: Umeritvena krivulja za mlečno kislino



Graf 10: Umeritvena krivulja za očetno kislino

3.2 MATERIALI

3.2.1 VRSTA MIKROORGANIZMA

Za raziskovanje fermentacije mošta v vino sem uporabila starter kulturo, kvasovko vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Izvor seva: Danstar Ferment AG, CH-6300 ZUG, v sklopu Lallemand INC, Canada. Klasifikacija kvasovke:

Kraljestvo ... *FUNGI*
Oddelek ... *EUMYCOTA*
Pododdelek ... *ASCOMYCOTINA*
Razred ... *HEMIASCOMYCETES*
Red ... *ENDOMYCETALES*
Družina ... *SACCHAROMYCETACEAE*
Poddružina ... *SACCHAROMYCOIDEAE*
Rod ... *SACCHAROMYCES*
Vrsta ... *S. CEREVISIAE*

3.2.2 SUBSTRAT – GROZDNI MOŠT

Uporabila sem grozdni mošt, sorte sauvignon, vinorodnega okoliša Ljutomersko-Ormoških goric. 10 litrom mošta sem dodala 3 g biološkega aktivatorja Feraid E (Danstar Ferment AG). Moštu, ki sem ga uporabila za fermentacije v laboratorijskem merilu nisem dodajala žveplovega dioksida, razen pri eksperimentih, kjer sem proučevala vpliv dodatka H_2SO_3 na metabolizem kvasovk (dodano 50 mg SO_2/L). Mošt ni bil filtriran pred postopkom izvedbe fermentacije. Grozdni mošt sem do uporabe hranila pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}C$.

3.2.3 KEMIKALIJE

3.2.3.1 Komponente standarda in internega standarda za umeritev plinskega kromatografa

- 1-propanol, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA)
- 2-butanol, (Kemika, Zagreb, Hrvaška, PA)
- izoamilalkohol (3-metil-1-butanol), (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA)
- acetaldehid (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA)
- etanol (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA)
- 1-butanol (Kemika, Zagreb, Hrvaška, PA)

3.2.3.2 Komponente standarda za umeritev HPLC sistema

- vinska kislina, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA)
- jabolčna kislina, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA)
- mlečna kislina, (Riedel de Haen, Hannover, Nizozemska, PA)
- glicerol, (Alkaloid, Skopje, Makedonija, PA)
- glukoza, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA)
- fruktoza, (E. Merck, Darmstadt, Nemčija, PA)

3.2.3.3 Mobilna faza za HPLC sistem

- 0,002 M raztopina H₂SO₄, ki sem jo predhodno filtrirala z nitroceluloznim filtrom (Sartorius; 0,22 µm velikost por).
- žveplova (VI) kislina H₂SO₄ (95-97%, E. Merck, Darmstadt, Nemčija)

3.2.3.4 Biološki aktivator Fermaid E

Sestava: deaktivirane kvasovke, diamonijev fosfat, amonijev sulfat, tiamin hidroklorid.
Proizvajalec: Danstar Ferment AG, Zug, Švica.

3.2.4 BIOREAKTORJI IN OPREMA

Eksperimentalno delo je potekalo v 10 litrskih laboratorijskih mešalnih bioreaktorjih:

- 10 L mešalni bioreaktor (STR), (Bioengineering AG, Švica), s standardno konfiguracijo, s prezračevalnim sistemom (perforiran obroč) in tremi diskastimi Rustonovimi turbinami, s 6 lopaticami.
- 10 L mešalni bioreaktor (STR) (Infors AG, Švica), s tremi diskastimi Rushtonovimi turbinami, s 6 lopaticami.
- 10 L mešalni bioreaktor (STR) (Chemap AG, Švica) D = 38 cm, H = 13 cm s standardno konfiguracijo (STC), z dvema diskastima Rustonovima turbinama, s 4 lopaticami.

Med fermentacijo smo *on-line* spremljali (kontrolni sistem in program Shiva, Bia d.o.o, Ljubljana in pa Visidaq-Genie, Professional V3.11, proizvajalca Advantech) redoks potencial, pH, temperaturo in parcialni tlak raztopljenega kisika v raztopini in v nekaterih poskusih tudi parcialni tlak ogljikovega dioksida v sistemu. Reaktorji so bili opremljeni s sterilizabilnimi Ingold pH elektrodami, redoks elektrodami in industrijskimi Lab pO₂ in pCO₂ elektrodami, skupaj z avtomatsko enoto za kontrolo in regulacijo temperature.

Kinetiko razgradnje in nastanka metabolitov, tj. višjih alkoholov (1-propanol, 2-butanol, izoamil alkohol), acetaldehida, etanola, glicerola, organskih kislin in kislin nastalih v TCA ciklu, kakor tudi reducirajočih sladkorjev smo zasledovali *off-line* s tekočinsko (HPLC) in plinsko kromatografijo (GC).

Zaradi intenzivnega vrenja je bilo potrebno uporabiti na vrhu bioreaktorja refluks hladilnik s hlajenjem na temperaturo 4 °C, ki preprečuje izgubo aromatičnih snovi, ki tvorijo bogastvo vinske cvetice in bi jih intenziven tok 100 % vlažnega ogljikovega dioksida odnašal iz nastajajočega vina. Pri izvedbi poskusov fermentacije v laboratorijskem merilu smo uporabili tudi prepihanje površine nad tekočim substratom s plinastim dušikom pretoka od 0,3 – 1,2 Lmin⁻¹. S tem smo preprečili oksidacijo medija v sistemu.

3.2.4.1 Instrumentacija bioreaktorja

Za *on-line* meritve v sistemu Infors AG Švica, volumna 10 L sem uporabila Ingold pH in redoks elektrode, Industrial Lab pO₂ elektrode, Industrial Lab MFG 509 avtomatsko kontrolo penjenja in temperaturno kontrolno enoto. Za *on-line* meritve v bioreaktorju Infors je bil uporabljen program SHIVA (BIA d.o.o.; Slovenija).

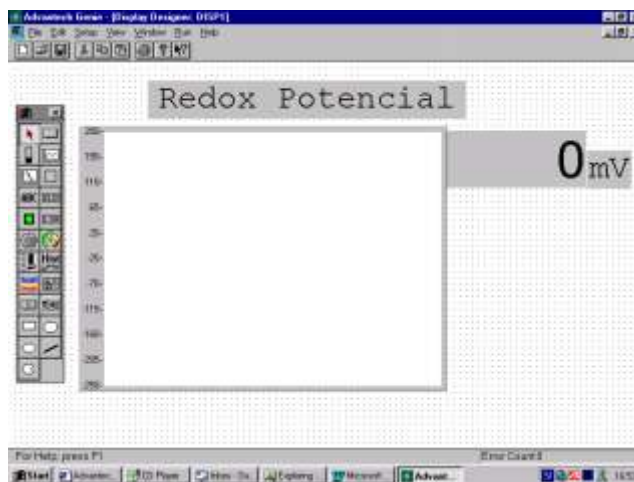
Bioreaktor Bioengineering AG bioreaktor, volumna 10 L, je bil opremljen s sterilizabilno Ingold pH elektrodo, Ingold redoks elektrodo (platinasta elektroda kot indikatorska elektroda in kalomelova elektroda kot referenčna elektroda), Ingold pO₂ elektrodo in pCO₂ elektrodo, skupaj z avtomatsko temperaturno kontrolno enoto (Mettler Toledo) ter kisikovo polarizacijsko elektrodo Mettler Toledo s transponderjem 4320 (Švica). Signal sem zajemala z DAQ modulom ADAM 4017(Švica), ki ima osem galvansko ločenih kanalov s prebojno napetostjo 3000 V, 16 bitni procesor in max. hitrost zajemanja 10 podatkov/s. Ker ima le industrijski izhod rs-485, je zraven vezan še pretvornik 4250, ki pretvori signal v rs 232, katerega sprejema osebni računalnik. Podatke sem beležila s pomočjo programa za zajem in kontrolo Genie (Advantech, Taiwan). Enaka merilna instrumentacija je bila uporabljena pri Chemap AG Švica bioreaktorju, volumna 10 L.

Kalibracijo pH in Pt redoks elektrod sem izvedla s pomočjo kalibracijskih pufrov (pH 2/4, E_h 220/468 mV) po dvotočkovnem postopku s pomočjo programa »Shiva«.

Vrednost E_h v vseh meritvah in grafih je merjena razlika potencialov med platinsko in kalomelovo elektrodo: $E_h = E_{Pt} - E_{SCE}$.

3.2.4.2 Računalniška kontrola

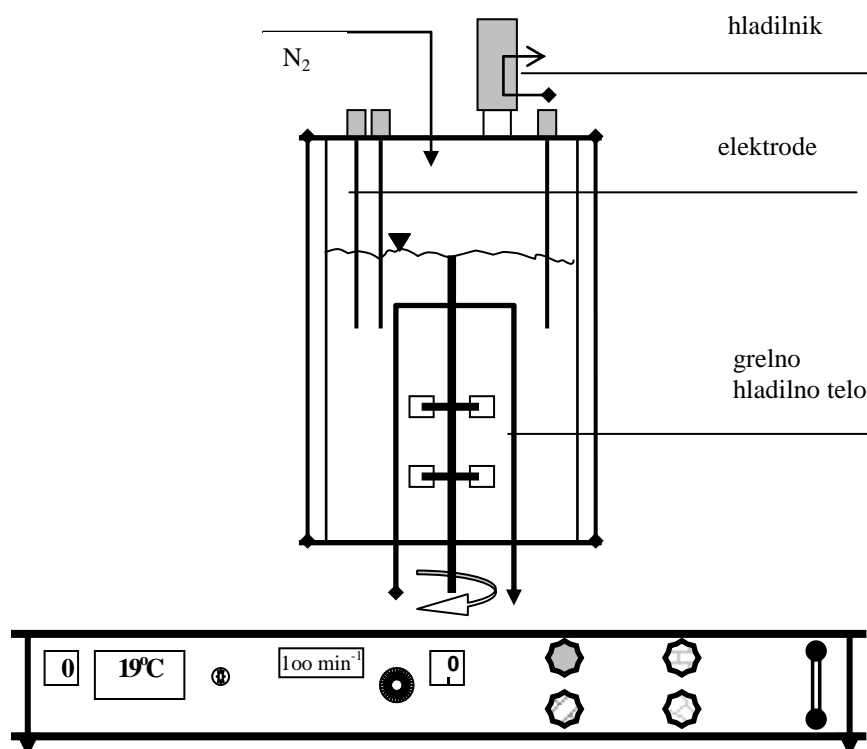
- SHIVA (Bia d.o.o., Slovenija).
- Genie (Advantech, Taiwan).



Slika 13.: Advantech Genie Task designer, orodje za zajem in obdelavo podatkov



Slika 14.: Bioreaktor Infors AG, Švica s kontrolnim sistemom in programom za zajem podatkov Shiva (BIA, Ljubljana)



Slika 15.: Shema reaktorja Chemap AG Švica (Komel, 2004)

3.2.5 TEHTNICA SARTORIUS

model 1872 MP 8-2, Švica.

3.2.6 HPLC IZOKRATSKI SISTEM

HPLC črpalka tipa 364.00, injekcijski ventil z 20 µL injekcijsko zanko, UV-VIS detektor št. A0293 (Knauer, Berlin, Nemčija). Sistem je bil podprt z računalnikom s programsko opremo za zajemanje in obdelavo podatkov Eurochrom 2000.

3.2.7. PLINSKI KROMATOGRAF - HEWLETT PACKARD 6890

(GC System G1530A; serial No: DE00003468, Nemčija). Sistem je bil podprt z računalnikom s programsko opremo za zajemanje in obdelavo podatkov Instrument 1.

3.3. STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

3.3.1 POVPREČNA VREDNOST

Eksperimente smo izvajali v treh paralelkah. Izračunali smo povprečne vrednosti posameznih rezultatov X:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (3.3.1.)$$

n....število vzorcev

X_i...vrednost i-te meritve

3.3.2 STANDARDNI ODKLON IN KOEFICIENT VARIABILNOSTI

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (3.3.2.)$$

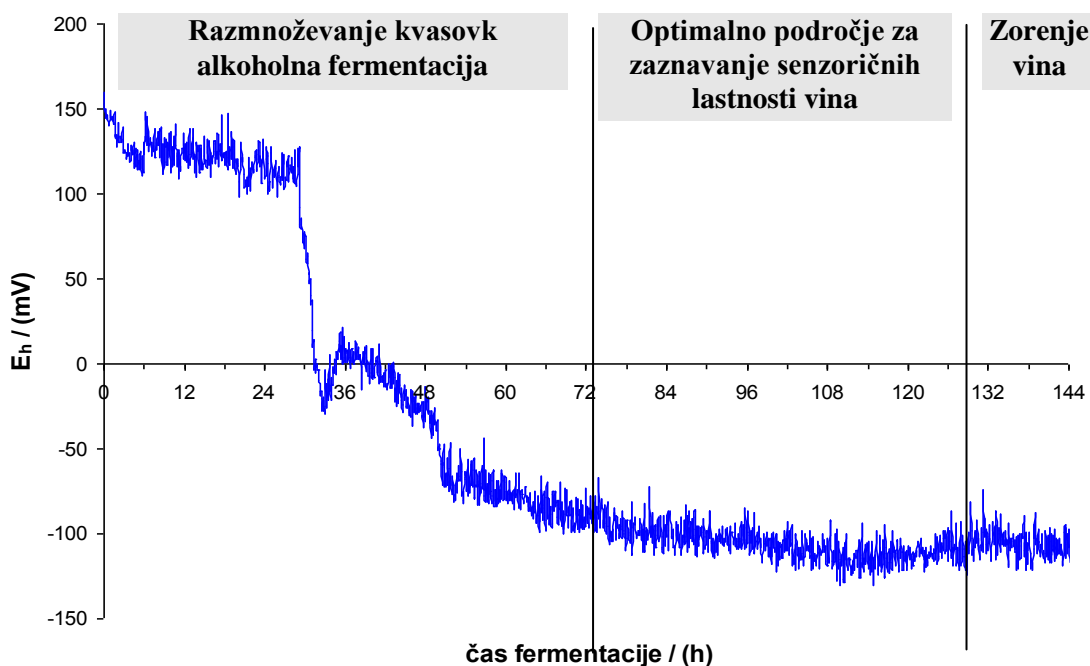
s standardni odklon

(Ferligoj, 1993)

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 ALKOHOLNA FERMENTACIJA GROZDNEGA MOŠTA S SPREMLJANJEM REDOKS POTENCIALA

Uporaba redoks potenciala v tehnologiji vinarstva predstavlja tehnološko uporabno indikacijo fiziološke aktivnosti mikroorganizma. Na vrednost redoks potenciala med procesom fermentacije v največji meri vplivajo produkti metabolizma vinske kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*, ostale oksido-reduktivne komponente pa prispevajo pri tem manjši delež ozadja. Z ozirom na reduktivnost in oksidativnost v moštih in vinih, lahko meritev redoks potenciala omogoči relativno enostaven in hiter vpogled v stanje stabilnosti vina. Redoks potencial predstavlja stabilen in karakterističen signal poteka fermentacije. V alkoholni fermentaciji grozdnega mošta sem podrobno proučila povezavo med potekom fermentacijskega procesa, kakovostjo končnega produkta in potekom redoks potenciala. Dobljene podatke sem uredila in uporabila za vodenje procesa fermentacije. Redoks potencial izraža razmerje aktivnosti med reducirajočo snovjo in oksidirajočo snovjo. V vinu potekajo oksidacijsko-redukcijske reakcije, kjer se vrednosti redoks potenciala med fermentacijo znižajo tudi do -150 mV in se v odvisnosti od sorte, oblikuje aroma vina v območju od 0 do 100 mV, v rahlo reduktivnem okolju, na kar kažejo rezultati opravljenih eksperimentov.



Graf 11.: Redoks potencial med fermentacijo grozdnega mošta brez dodatka SO_2 pri 18°

Graf 11. prikazuje redoks potencial, kot razliko potencialov Pt elektrode in SCE referenčne elektrode med fermentacijo grozdnega mošta v laboratorijskem merilu. Fermentacija je potekala z mešanjem, brez dodatka SO_2 pred začetkom fermentacije, s temperaturo kontrolo na 18°C .

Vpliv zunanjih dejavnikov, kot so temperatura, mešanje, dodatek SO₂ in temperaturni šoki, na redoks potencial, prikazujem v naslednjih poglavjih. Na osnovi dobljenih eksperimentalnih podatkov in *on-line* meritev redoks potenciala, lahko že med fermentacijo sledimo in kontroliramo potek metabolizma in s tem pravočasno vplivamo na morebitne nepravilnosti ali napake, ki bi v kvasnem metabolizmu povzročile upočasnitev ali predčasno zaustavitev fermentacije.

Redoks potencial prehaja med procesom alkoholne fermentacije skozi štiri faze, ki odražajo fiziološka stanja mikroorganizma in metabolne produkte v ciklu fermentacije. Med fermentacijo grozdnega mošta lahko krivuljo redoks potenciala razdelim na štiri faze, ki jih določa značilen redoks potencial:

1. **Aerobni proces - endotermni proces:** Po postopkih, ki si sledijo od trganja grozdja, prevoza do stiskalnic, stiskanja in pretoka mošta v vrelni posode, se v moštu raztopi tudi do 200 mgL⁻¹ kisika (Wondra, 1997). Učinek raztapljanja kisika v moštu je odvisen od časa kontakta kisika z moštom, njegove topnosti in kemijske sestave mošta, temperature mošta in vina ter prisotnosti encimov. Redoks potencial mošta kmalu po stiskanju grozdja se giblje, odvisno od tega, koliko kisika se je v moštu raztopilo, v mejah od 150 do 200 mV in naraste v naslednjih nekaj urah izpostavljenosti zraku tudi do 250 mV. Zanimivo je, da redoks potencial mošta, ki je izpostavljen zraku, ne naraste takoj, ampak 3 – 4 ure po pretoku mošta v bioreaktor, odvisno od časa izpostavljenosti mošta kisiku in od količine raztopljenega kisika v moštu. V prvi fazi se kisik iz zraka v moštu raztaplja, medtem ko se v drugi fazi kemijsko veže na skupino polifenolov. Fenoli se zaradi oksidacije kondenzirajo v večje molekule in se med alkoholnim vrenjem delno izločijo. Ta kemijska vezava kisika pa vpliva na dvig redoks potenciala. Pri pridelavi belih vin, kjer polifenoli niso zaželeni, oziroma ti prizadenejo kakovost vina, lahko to izločanje štejemo za zelen proces (Šikovec, 1993). Kvasovke se ob prisotnosti kisika v začetni fazi hitreje razmnožujejo in posledično hitreje začnejo z alkoholnim vrenjem.

Preklop na anaerobni proces: Ko kvasovke porabijo ves prisotni kisik za razmnoževanje in se del kisika veže na sestavine mošta, redoks potencial ponovno pade na vrednost, podobno začetni, od 150 do 200 mV. V tej fazi kvasovka preide iz aerobnega v anaerobno območje delovanja in prične reduktivni proces alkoholnega vrenja.

2. **Anaerobni proces – eksotermni proces:** Faza alkoholnega vrenja je faza, v kateri se redoks potencial močno zmanjša tudi pod vrednosti, ki jih smatrajo za optimalne za razvoj cvetice in arome vina (Malik in Minarik, 1984). Alkoholna fermentacija poteka pri nizkih redoks potencialih, v močno reduktivnem okolju. Predvsem se to zgodi zaradi nastanka in kopičenja reduktivnih komponent, ki nastajajo v ciklu kvasnega metabolizma in se iz kvasne celice izločajo v vino. Redoks komponente organske narave v vinu so predvsem etanol, oksikislina, askorbinska kislina, polifenoli. Redoks sistemi prehajajo iz oksidativne v reduktivno obliko in obratno s sprejemanjem in oddajanjem vodikovega protona. Oksidoreduktivne reakcije se odvijajo pod vplivom delovanja encimov. Encimi predstavljajo osnovo biokemijskih in mikrobioloških sprememb (Muštović, 1985). Intenzivna rast celic, skupaj s sproščanjem CO₂ in nastankom reduktivnih komponent, so vzroki za velik padec redoks potenciala v

2. fazi procesa. Redoks potencial pade, odvisno od zunanjih fizikalnih pogojev (temperatura, mešanje, dodatek SO_2), tudi do vrednosti -150 mV. Kvasovke del kisika porabijo za razmnoževanje, preostali delno topni kisik se izgubi, ker ga nastali CO_2 pri pretvorbi sladkorja, izrine iz mošta. Hiter začetek alkoholnega vrenja omogoča kvasovkam metabolizem sladkorjev, kjer v začetni fazi nastaja čim manj piruvata in acetaldehida. Ugotovljena je bila povezava med padcem redoks potenciala in nastankom glicerola, kot sekundarnega produkta fermentacije. Nastanek glicerola je v pozitivni povezavi z znižanjem vrednosti redoks potenciala med in po alkoholni fermentaciji, kar pomeni, da večji padec redoks potenciala pomeni nastanek večjih količin glicerola (Kukec *in sod.*, 2002). Čas trajanja druge faze je odvisen od pogojev, pri katerih fermentacija poteka in traja od 60 do 120 ur v laboratorijskem merilu. V drugi fazi poteka razgradnja reducirajočih sladkorjev, nastajajo etanol, CO_2 , glicerol in drugi sekundarni produkti fermentacije. Prav tako v tej fazi nastajajo kisline Krebsovega cikla, zaradi izločanja vinskega kamna se zmanjšuje koncentracija vinske kisline. Zmanjšuje se tudi koncentracija jabolčne kisline, ki se v procesu metabolizma delno pretvarja v jantarno kislino, delno pa iz nje nastaja etanol (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 2000). Faza intenzivnega padca redoks potenciala je faza, v kateri poteka in se zaključuje večina za kakovost vina pomembnih procesov. Od poteka te faze je torej v veliki meri odvisen potek alkoholnega vrenja in s tem povezana končna kakovost vina.

3. **Faza zorenja vina:** faza po končanem intenzivnem vrenju in zaključeni eksponencialni fazi rasti kvasovk; je faza, v kateri začne redoks potencial naraščati. S tem nastopi zorenje vina. V tej fazi potekajo za kakovost vina pomembne transformacije. Zelo pomembno je, da ta faza poteka v dovolj reduktivnem območju, kar pomeni, da se redoks potencial ne sme dvigniti preko vrednosti 180 mV, kar bi vplivalo na prehitro staranje vina. Tako se pri redoks potencialu nad 180 mV pričnejo kazati prvi znaki nepravilnega staranja, oziroma oksidacije vina, kot so temnejša barva vina, oksidiran okus vina, miševina in očetni cik vina. V tej fazi kot v predhodni anaerobni fazi, je kisik nezaželen in za kakovost vina škodljiv faktor. Zato v času po končani fermentaciji, pred pričetkom zorenja in staranja vina dodajamo v vino reducente, kot sta askorbinska kislina in SO_2 , ki v sistemu znižujeta redoks potencial. Zaradi narave delovanja, askorbinsko kislino in SO_2 uvrščamo v skupino redoks regulatorjev.

Vina, ki se starajo v lesenih sodih kažejo višje vrednosti redoks potenciala v primerjavi z vstekleničenimi vini. To lahko razlagamo s poroznostjo lesa v lesenih sodih in s tem povezano prepustnostjo za kisik iz zraka (Dikanović-Lučan, 1995). Pomembno je torej, da s poznavanjem in kontrolo redoks potenciala poskrbimo za pravilno staranje vina (Malik, 1998).

Obstaja torej povezava med redoks potencialom in kakovostjo vina. Redoks potencial ima prav tako velik pomen za senzorične lastnosti vina. Optimalne vrednosti redoks potenciala pa se razlikujejo v odvisnosti od sorte vina in od področja pridelave grozdja, kot surovine za pridelavo vina. Fizikalni dejavniki, kot so temperatura, tlak, mešanje, dodatek SO_2 in temperaturni šoki so dejavniki, ki vplivajo na potek procesa in s tem na spremembo poteka redoks potenciala. Ti dejavniki vplivajo tudi na topnost kisika v moštu in vinu, kar vpliva na metabolne in encimske aktivnosti kvasovk med alkoholno fermentacijo.

4.2. MERITVE REDOKS POTENCIALA IN VITRO

V laboratoriju sem *in vitro* izvedla nekaj eksperimentov v čaši, s katerimi sem želela preveriti vpliv koncentracije reducirajočih spojin v vodni raztopini na vrednost redoks potenciala. Vse eksperimente sem izvedla brez prisotnosti mikroorganizma.

4.2.1. SPREMINJANJE KONCENTRACIJE ETANOLA

Eksperimentalni pogoji – sestava osnovnega substrata:

200 mL vode

4gL⁻¹ vinske kisline

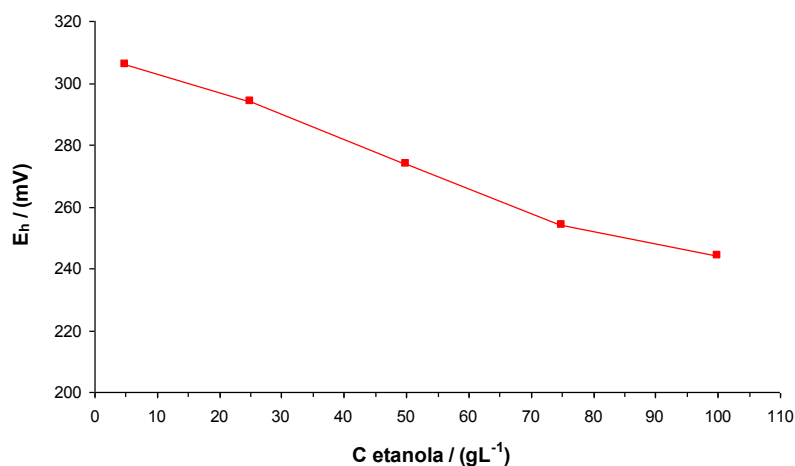
4gL⁻¹ jabolčne kisline

0,04 gL⁻¹ acetaldehida

pH = 2,8; E_h = 309 mV; T = 24 °C; N = 100 rpm

Tabela 3.: Koncentracije etanola in vrednosti E_h.

C etanola (gL ⁻¹)	E _h (mV)
5	306
25	294
50	274
75	254
100	244



Graf 12.: Spreminjanje vrednosti E_h v odvisnosti od spremembe koncentracije etanola.

Z zviševanjem koncentracije etanola od 0 do 100 g/L v raztopini s konstantnim pH = 2,8 vrednost redoks potenciala pada, vendar je padec $\Delta E = 62$ mV majhen v primerjavi s padcem redoks potenciala med fermentacijo grozdnega mošta *in vivo* s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae*, kjer pride med fermentacijo pri temperaturi 24 °C do spremembe redoks potencial pade za 400 mV.

4.2.2. SPREMINJANJE KONCENTRACIJE ETANOLA IN REDUCIRAJOČIH SLADKORJEV (GLUKOZE IN FRUKTOZE)

Eksperimentalni pogoji – sestava osnovnega substrata:

200 mL vode

4gL⁻¹ vinske kisline

4gL⁻¹ jabolčne kisline

0,04 gL⁻¹ acetaldehida

pH = 2.8; E_h = 270 mV;

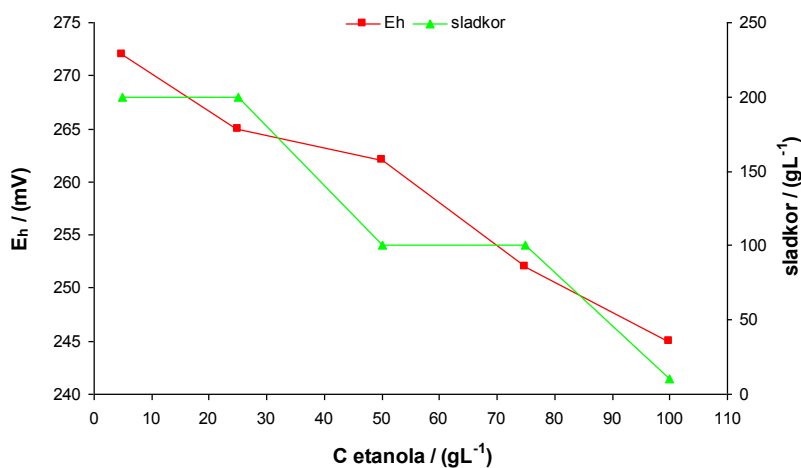
T = 24 °C;

N = 100 rpm

Dodatki: reducirajoči sladkorji (glukoza in fruktoza)

Tabela 4. Koncentracija reducirajočih sladkorjev in etanola v substratu in vrednosti E_h:

red. sladkorji (gL ⁻¹)	etanol (gL ⁻¹)	E _h (mV)
200	5	272
200	25	265
100	50	262
100	75	252
0	100	245



Graf 13. Spreminjanje vrednosti E_h v odvisnosti od spremembe koncentracij reducirajočih sladkorjev in etanola v substratu.

Tudi v primerju zviševajna koncentracije etanola, ob hkratnem zniževanju koncentracije reducirajočih sladkorjav (glukoze in fruktoze), pri konstantnem pH, se vrednost redoks potenciala ni spremenila primerljivo spremembi vrednosti med fermentacijo grozdnega mošta z mikroorganizmom.

4.2.3. SPREMINJANJE KONCENTRACIJE GLICEROLA

Eksperimentalni pogoji – sestava osnovnega substrata:

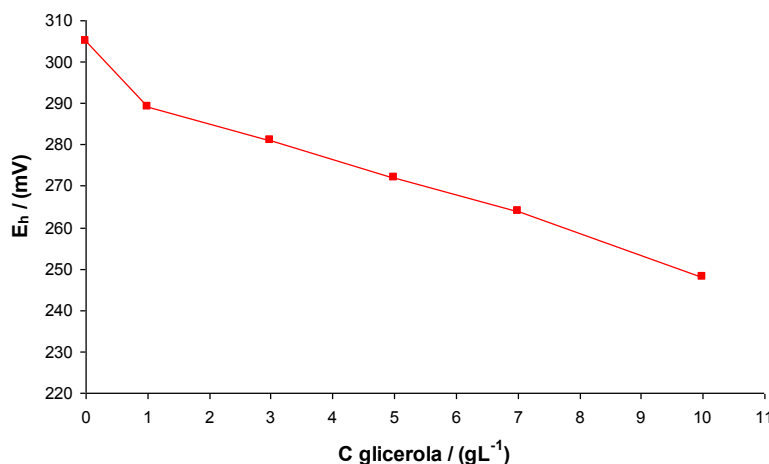
200 mL vode
4 gL⁻¹ vinske kisline
4 gL⁻¹ jabolčne kisline
50 gL⁻¹ glukoze
50 gL⁻¹ fruktoze
0,04 gL⁻¹ acetaldehida

pH = 2,8; E_h = 305 mV; T = 24 °C; N = 100 rpm

Dodatki: glicerol

Tabela 5.: Koncentracija glicerola v substratu in vrednosti E_h

C glicerola (gL ⁻¹)	E _h (mV)
0	305
1	289
3	281
5	272
7	264
10	248



Graf 14.: Spreminjanje vrednosti E_h v odvisnosti od spremembe koncentracije glicerola v substratu.

Tudi zviševanje koncentracije glicerola v raztopini sladkorjev (100 g/L), s konstantno vrednostjo pH = 2,8 ni povzročilo za fermentacijo grozdnega mošta s kvasovkami značilnega padca redoks potenciala. V primeru zvišanja koncentracije od 0 do 10 g/L, je redoks potencial padel za 57 mV.

4.2.4. SPREMINJANJE KONCENTRACIJSKEGA RAZMERJA ACETALDEHIDA V ETANOLU

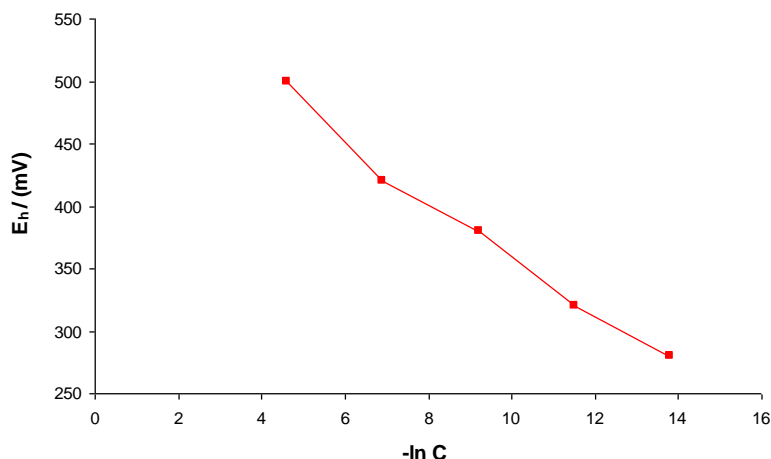
Aa...acetaldehid

Et etanol

C (Aa:Et) – razmerje volumskih koncentracij acetaldehida:etanolu

Tabela 6.: Spreminjanje volumskega razmerja koncentracij acetaldehida in etanola in vrednosti E_h

C (Aa:Et)	$-\ln C$	E_h (mV)
0,01	4,61	500
0,001	6,91	420
0,0001	9,21	380
0,00001	11,51	320
0,000001	13,82	280



Graf 15.: Meritve vrednosti E_h ob spreminjanju koncentracijskega volumskega razmerja acetaldehida v etanolu

Pri eksperimentu številka 4 sem simulirala pretvarjanje acetaldehida v etanol. Acetaldehid nastaja kot vmesni produkt fermentacije grozdnega mošta v fazi rasti kvasovk in se ob aktivaciji encima alkoholdehidrogenaza pretvarja v etanol (Ribereau-Gayon *in sod.*, 1999, Martinez *in sod.*, 1997). Med eksperimentom sem v raztopini zniževala koncentracijo acetaldehida in ob hkratnem zvišanju koncentracije etanola. Padec redoks potenciala iz začetnih 500 mV na končnih 280 mV pri spremembi koncentracijskega razmerja iz $1 \cdot 10^{-2}$ na $1 \cdot 10^{-6}$ volumskega razmerja koncentracij acetaldehida:etanolu, pa kaže na to, da pretvarjanje acetaldehida v etanol ob aktivaciji encima alkoholdehidrogenaza, med procesom vinske fermentacije vpliva na padec redoks potenciala med fermentacijo.

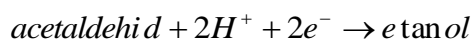
Meritve v redoks potenciala v vodni raztopini sladkorjev, s konstantnim pH = 2,8 in z povečevanjem koncentracije reduktivnih komponent med posameznimi eksperimenti, ki se nahajajo v vinu (acetaldehid, glicerol, etanol), so pokazale, da se vrednost redoks potenciala z zviševanjem koncentracije reduktivnih komponent znižuje, vendar pa to znižanje redoks potenciala manjše, kot je padec redoks potenciala med fermentacijo grozdnega mošta *in vivo* s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae*. Največjo spremembo redoks potenciala *in vitro* sem izmerila v primeru spreminjanja koncentracijskega razmerja acetaldehida in etanola, s katerim sem simulirala proces pretvorbe acetaldehida v etanol med fermentacijo s kvasovkami. Ob spremembi razmerja volumskih koncentracij acetaldehida in etanola, pri kateri sem zniževala koncentracijo acetaldehida in zviševala koncentracijo etanola, je redoks potencial padel za 220 mV. V primeru fermentacije na padec redoks potenciala *in vivo* na intervalu od 200 mV do -300 mV, pomembno in odločujoče vpliva kvasna fiziologija ter številne kompleksne oksidativne in reduktivne komponente, ki v ciklu kvasnega metabolizma nastajajo ali se spreminjajo iz ene v drugo obliko. Razlog tako velikim spremembam je aktivacija encimatske verige, ki sodeluje v procesu alkoholne fermentacije grozdnega mošta v vino. Povečanje koncentracije etanola in glicerola, kot pomembnih reduktivnih produktov fermentacije grozdnega mošta v vino ter spremembe koncentracij organskih kislin, prispevajo k znižanju redoks potenciala med fermentacijo le manjši del. Večji del prispeva pretvorba acetaldehida v etanol, največji del pa prispeva mikroorganizem in njegov aktivni metabolni sistem.

4.2.5. E_h IZRAČUNANI PO NERNSTOVI ENAČBI IZ PODATKOV, DOBLJENIH MED FERMENTACIJAMI PRI RAZLIČNIH TEMPERATURAH

Tabela 7.: Koncentracije acetaldehida in etanola, dobljene z meritvami med fermentacijami pri temperaturah 15, 18 in 24 °C.

		0	24	48	72	96	120	144	168	192
acetaldehid (24°C)	0	0,0326	0,0385	0,03	0,028	0,027	0,024	0,022	0,021	0,021
acetaldehid (18°C)	0	0,0027	0,0263	0,028	0,023	0,021	0,02	0,0182	0,018	0,018
acetaldehid (15°C)	0	0,002	0,0208	0,0216	0,0205	0,0184	0,012	0,012	0,012	0,01
		0	24	48	72	96	120	144	168	192
etanol (24°C)	0	4,986	25,335	63,152	81,273	92,382	92,082	91,263	91,263	91,263
etanol (18°C)	0	0,11	7,145	41,963	63,422	80,026	86,508	85,947	86,662	86,662
etanol (15°C)	0	0	0,359	11,816	37,233	58,062	70,436	71,845	79,224	79,224

Vrednosti E v tabeli 7so izračunane po Nernstovi enačbi za reakcijo:



$$E_h = E_o + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}}$$

E_oizračunani redoks potencial (mV)

E_h E , korigiran s standardnim potencialom kalomelove elektrode (SCE) $E_{SCE} = -0,245V$

E_o'standardni potencial sistema pri 25 °C (mV)

E_{SCE}potencial kalomelove elektrode (mV)

$$E_h = E - E_{sce}$$

$E_o' = -0,197 \text{ V}$ pri $\text{pH} = 7,0$

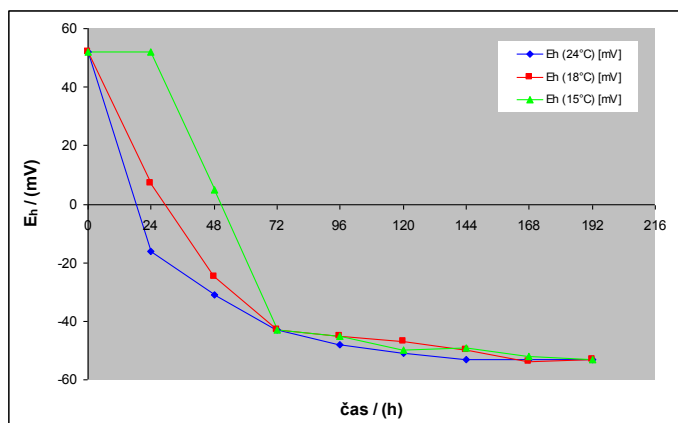
Tabela 8.: Vrednosti E izračunane po Nernstovi enačbi in vrednosti E_h , korigirane s potencialom E_{SCE}

		0	24	48	72	96	120	144	168	192
E (24°C) [mV]		-197	-265	-280	-292	-299	-301	-303	-303	-303
E (18°C) [mV]		-197	-242	-274	-292	-294	-296	-299	-303	-302
E (15°C) [mV]		-197	-197	-244	-280	-294	-299	-298	-301	-302
		0	24	48	72	96	120	144	168	192
E_h (24°C) [mV]		52	-16	-31	-43	-48	-51	-53	-53	-53
E_h (18°C) [mV]		52	7	-25	-43	-45	-47	-50	-54	-53
E_h (15°C) [mV]		52	52	5	-43	-45	-50	-49	-52	-53

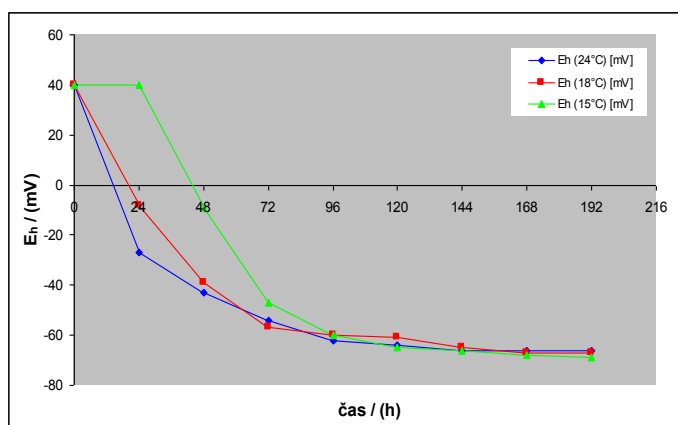
$E_o' = 0,044 \text{ V}$ v vinu pri $\text{pH} = 3,5$

Tabela 9.: Vrednosti E_h izračunane iz Nernstove enačbe z $E_o' = 0,044 \text{ V}$

		0	24	48	72	96	120	144	168	192
E_h (24°C) [mV]		40	-27	-43	-54	-62	-64	-66	-66	-66
E_h (18°C) [mV]		40	-8	-39	-57	-60	-61	-65	-67	-67
E_h (15°C) [mV]		40	40	-9	-47	-60	-65	-66	-68	-69



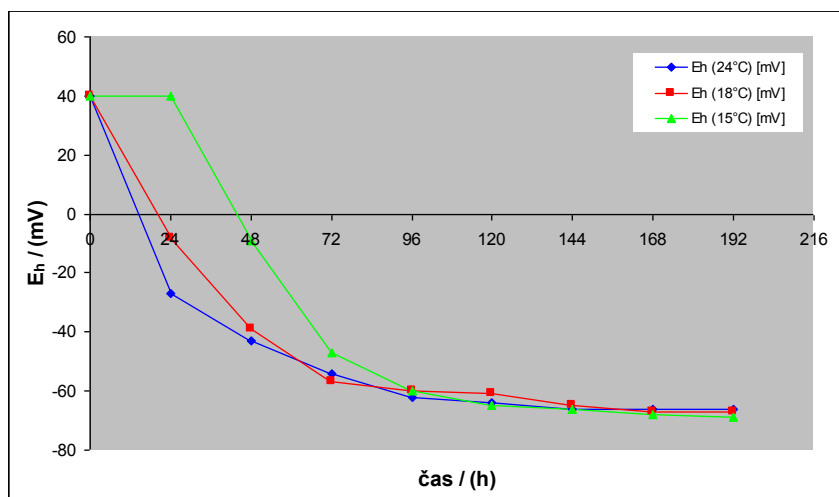
Graf 16.: E_h izračunani po Nernstovi enačbi pri $E_o = -0,197 \text{ V}$ (pri $\text{pH} = 7$)



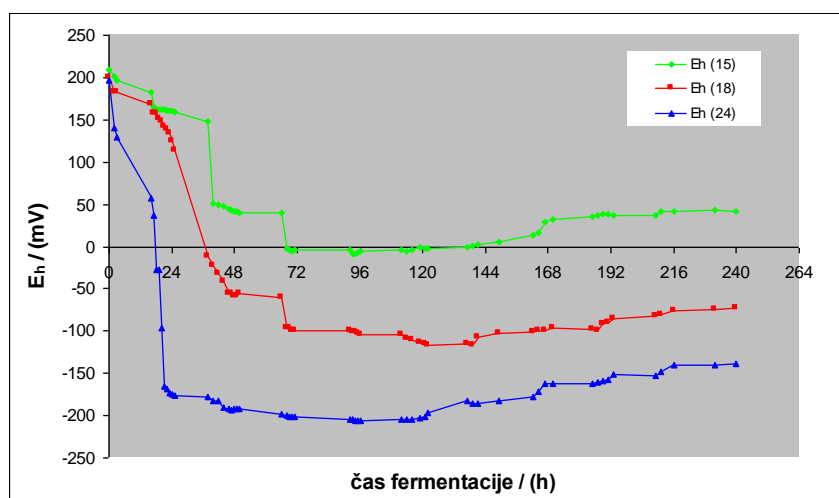
Graf 17.: E_h izračunani po Nernstovi enačbi pri $E_o = 0,044 \text{ V}$ (v vinu pri $\text{pH} = 3,5$)

Grafa 16 in 17 prikazujeta redoks potenciala izračunane iz Nernstove enačbe. Podatki o koncentracijah acetaldehida in etanola, so dobljeni z meritvami med fermentacijami grozdnega mošta pri temperaturah 15, 18 in 24 °C. Podatke dobljene med meritvami fermentacij pri različnih temperaturah, sem uporabila za izračun redoks potenciala iz Nernstove enačbe. Padec redoks potenciala je primerljiv z dejanskim padcem redoks potenciala, merjenega med fermentacijami, le končne vrednosti so nižje. Za izračun sta upoštevani le koncentracija acetaldehida in etanola. Na dejansko vrednost redoks potenciala med fermentacijo grozdnega mošta s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* pa vplivajo še nekatere aminokisliline (cistein, glutation) s SH (tiolnimi) skupinami, askorbinska kislina, ki prav tako deluje reduktivno, nastali CO₂) (Muštović, 1985) v kompleksni sestavi vina, ki nastajajo v ciklu kvasnega metabolizma.

Graf 18 in 19 prikazujeta primerjavo redoks potencialov, izračunanih iz Nernstove enačbe in redoks potencialov, izmerjenih med fermentacijami pri različnih temperaturah.



Graf 18: E_h izračunani po Nernstovi enačbi



Graf 19.: E_h izmerjeni med fermentacijami

4.3.VPLIV TEMPERATURE NA POTEK FERMENTACIJSKEGA PROCESA

Med pomembnejšimi procesnimi količinami, ki vplivajo na fermentacijo in kakovost končnega produkta so temperatura, koncentracija sladkorjev, parcialni tlak raztopljenega kisika in CO₂ ter mešanje. Pri razgradnji reducirajočih sladkorjev v procesu metabolizma vinskih kvasovk nastajajo številni metabolni produkti kot so etanol, višji alkoholi in trikarboksilne kisline TCA cikla. Njihova prisotnost vpliva na kakovost vina, njihov nastanek in prisotnost pogojujeta aktivnost cikla metabolizma in fiziološko stanje mikroorganizma.

Temperatura, pri kateri poteka proces fermentacije, vpliva na metabolizem kvasovk in s tem na sam potek vinske fermentacije. Optimalna temperatura, kot tudi temperaturni minimum in maksimum, ki ju kvasovke še lahko tolerirajo, so različni glede na to, kateri proces spremljamo, naj bo to dihanje, fermentacija, celična rast ali alkoholna toleranca. Temperaturni optimum je delno odvisen tudi od sestave fermentacijskega medija. Previsoke temperature povzročijo odmiranje kvasnih celic, vodijo do zaustavitve fermentacije. Nizke temperature lahko povzročajo probleme z začetkom fermentacije, kot je na primer adaptacija mikroorganizma na obstoječe pogoje in s tem podaljšanje lag-faze rasti mikroorganizma. Ne glede na optimum za celično rast ali fiziološko aktivnost mikroorganizma kvasovke, moramo najti ustrezno temperaturo, pri kateri ne prihaja do zastojev fermentacije ali do izgub alkohola in aromatičnih snovi pri nizkih ali visokih temperaturah.

Fermentativni metabolizem kvasnih celic lahko poteka znotraj dokaj velikega temperaturnega intervala. Maksimalna fermentacijska temperatura za kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* se giblje blizu 40 – 45 °C, minimalna temperatura pa lahko doseže celo 0 °C. V temperaturnem območju od 15 °C do 35 °C velja pravilo, da višja temperatura povzroča hitrejši potek fermentacije in s tem hitrejši metabolizem sladkorjev in zaključek fermentacije. Nižje temperature so vzrok za večje število delujočih kvasnih celic ob koncu fermentacije. Iz tega sledi, da je ostanek reducirajočih sladkorjev ob koncu fermentacije obratno proporcionalen s fermentacijsko temperaturo (Boulton *in sod.*, 1996).

V zadnjem času so ponekod uvedli postopek fermentacij vin pri nižji temperaturi, da bi tako zmanjšali izhlapevanje in izgubo lahkih spojin, ki predstavljajo komponente cvetice vina. Kjer obstaja možnost, da temperatura prekorači 30 °C, je uravnavanje fermentacijske temperature s hlajenjem odločilnega pomena pri fermentacijah. Občutljivost kvasovk vrste *S. cerevisiae* na visoke fermentacijske temperature, se pri temperaturah nad 30 °C močno poveča, kar lahko privede do predčasne prekinitve bioprocasa (Van Uden, 1989).

Občutljivost kvasovk na fermentacijsko temperaturo je odvisna tudi od količine med fermentacijo nastalega etanola, ki zavira rast celic (inhibicija rasti s produktom). Ta negativni efekt, ki vpliva na celično rast, sekundarno vpliva na produkcijo etanola, je večji pri višji temperaturi. Temperatura vpliva tudi na nastanek sekundarnih produktov fermentacije, kot so glicerol, jantarna in citronska kislina (Kukec *in sod.*, 2003). Z višanjem temperature v intervalu od 15 °C do 35 °C, se povečujejo tudi koncentracije nastalega glicerola, acetoina, 2,3-butandiola in acetaldehida. Koncentracija oetne kisline in drugih hlapnih kislin, so se izkazale za višje pri temperaturi 25 °C, kot pri temperaturah 15 °C ali 35 °C. Višje temperature

prav tako vodijo do biosinteze višjih koncentracij pirogrozdne in α -ketoglutarjeve kisline. Koncentracija pirogrozdne kisline je trikrat večja pri temperaturi 35 °C, kot pri temperaturi 20 °C (Peynaud 1984). Tudi nastanek višjih alkoholov je temperaturno pogojen. Pri višjih temperaturah nastajajo večje koncentracije višjih alkoholov. Maksimum je nekje pri 20 °C (Dittrich *in sod.*, 1976). Vrednosti izmerjene pri 35 °C dosegajo le še $\frac{1}{4}$ vrednosti izmerjenih pri 20 °C (Peynaud, 1984). Podobne raziskave izvedene v temperaturnem intervalu med 10 in 35 °C so pokazale, da najvišje koncentracije izoamil alkohola, aktivnega amil alkohola in izobutanola nastajajo pri 24 °C, medtem ko n-propanol dosega pri tej temperaturi najnižje koncentracije (Ough, 1980).

V prvem delu raziskovalnega dela sem študirala vpliv temperature na potek fermentacije grozdnega mošta in na fiziologijo kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*, med fermentacijo mošta sorte sauvignon. Potek procesa fermentacije sem spremljala s pomočjo *on-line* meritev redoks potenciala. Istočasno sem spremljala *on-line* meritve parcialnega tlaka raztopljenega kisika in pH. Merila sem spreminjanje koncentracije biomase in spreminjanje koncentracije reducirajočih sladkorjev (glukoze, fruktoze) in drugih za proces pomembnih komponent metabolizma kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*: etanola, organskih kislin, kislin TCA cikla, glicerola, acetaldehida ter njihovo odvisnost od kinetičnih parametrov, pomembnih za potek procesa in kakovost končnega produkta.

Temperatura ima na potek fermentacije pomemben vpliv. Na podlagi Arrheniusove enačbe je dejavnik, ki do mejne vrednosti 45 °C pozitivno vpliva na hitrost kemijskih reakcij. Iz rezultatov eksperimentov vodenja fermentacij pri različnih temperaturah je dobro razvidno naraščanje encimske in metabolne aktivnosti z dvigom temperature fermentacije.

V prvem sklopu eksperimentov sem spremljala vpliv temperature na potek fermentacije grozdnega mošta, brez dodatka SO₂. Meritve so potekale pri različnih temperaturah fermentacije grozdnega mošta. Temperatura je bila med fermentacijo vzdrževana na konstantni vrednosti. Fermentacije so potekale pri 15, 18 in 24 °C. Kot fermentacijski medij sem uporabila grozdni mošt sorte sauvignon, ki sem ga dobila v času trgateg v vinski kleti Jeruzalem Ormož VVS d.d. v Ormožu. Potek dela je obsegal sledeče stopnje:

1. **Priprava mošta:** moštu sem dodala (3,5 g/10 L mošta) spodbujevalec fermentacije Fermaid E (diamonijev fosfat, amonijev sulfat, tiamin hidroklorid, silika gel).
2. **Priprava vcepka:** vcepek sem pripravila tako, da sem 3 g starter kulture *Saccharomyces cerevisiae* (liofilizirana vinska kvasovka) - Uvaferm SLO rehidrirala v 50 – 100 mL mošta, s temperaturo 25 – 30 °C, 20 minut.
3. **Kalibracija redoks in pH elektrod** s pomočjo kalibracijskih pufrov (E_h 220/468 mV; pH 2/4) po dvotočkovnem postopku s pomočjo programa Shiva.
4. **Inokulacija substrata:** predhodno pripravljen grozdni mošt sem vnesla v bioreaktor in počakala, da se je segrel na temperaturo, pri kateri je potekala fermentacija in nato medij inokulirala z rehidrirano starter kulturo.
5. **Pogoji fermentacije:** T = 15, 18 in 24 °C; N = 100 rpm
Površino nad substratom sem preprihovala z dušikom in s tem preprečila dostop kisika v grozdni mošt. Fermentacija je potekala 10 – 14 dni. Vzorce za analize sem odvezemala vsakih 24 ur. S programom Shiva sem vodila *on-line* meritve E_h in pH vrednosti ter parcialnega tlaka raztopljenega kisika.

Med eksperimenti pri treh različnih temperaturah (15, 18, 24 °C) je potekala največja metabolna aktivnost kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* pri temperaturi 24 °C. Naraščanje se je odražalo v hitrosti rasti biomase in s tem vzporedno v naraščanju hitrosti tvorbe etanola in ostalih produktov metabolizma. Etanol, ki kot produkt primarnega metabolizma poleg CO₂ nastaja v procesu fermentacije, je lahko pokazatelj hitrosti bioprocesa. Največja metabolna aktivnost in hitrost generacije energije (v obliki ATP molekul) je v produkciji etanola pri temperaturi 24 °C (Graf 23.).

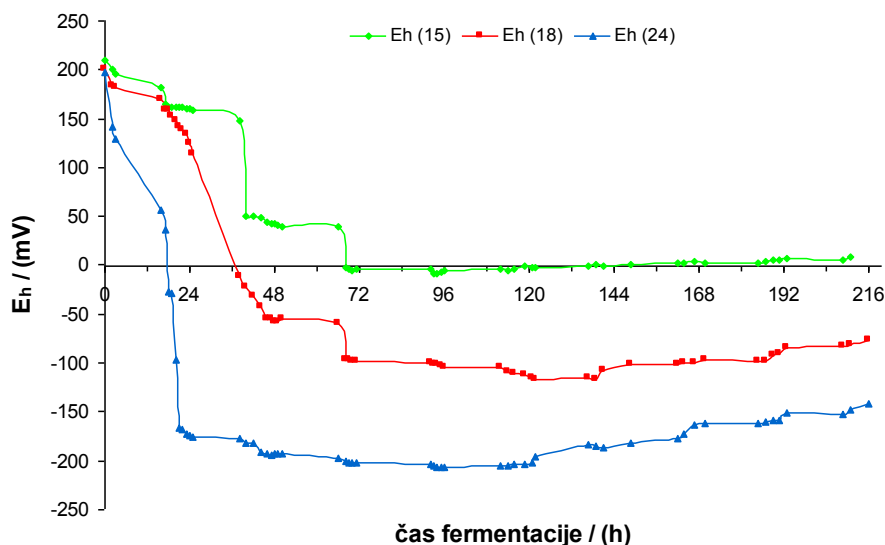
Temperatura je dejavnik, ki vpliva pri alkoholni fermentaciji na začetek, potek in zaključek fermentacije, torej na čas trajanja fermentacije. Tabela 3. prikazuje čas, po katerem je kvasovka prešla iz lag faze v eksponencialno fazo rasti. S tem se je začel anaerobni metabolizem, nastajanje etanola in CO₂. Optimalna temperatura za začetek fermentacije, ni nujno tudi optimalna temperatura za intenziteto fermentacije in njen zaključek.

Tabela 10.: Vpliv temperature na začetek, potek in zaključek alkoholne fermentacije

T [°C]	Začetek fermentacije po dodatku vcepka [h]	Čas trajanja fermentacije [h]	Količina nastalega alkohola po zaključku fermentacije [gL⁻¹]
15	44	138	80,2
17	38	140	82,4
18	22	144	85,9
23	18	116	87,7
24	16	96	92,2

Redoks procesi v celicah se odvijajo s pomočjo delovanja encimskega sistema mikroorganizma, prenosa vodika in aktivacijo spojin, ki sodelujejo pri fermentaciji. Ti sistemi predstavljajo osnovo biokemijske in mikrobiološke narave. Spremembe metabolne aktivnosti kvasovk med fermentacijo z naraščajočo temperaturo se dobro odraža na krivuljah redoks potencialov med fermentacijo (Graf 20.). Začetni redoks potencial grozdnega mošta, v laboratorijskem bioreaktorju pred dodatkom kvasovk, odvisno od oksidacijskega stanja mošta, je znašal med 150 in 250 mV. V času od trgatve grozdja do začetka alkoholnega vrenja potekajo številni tehnološki postopki, med katere sodijo: trganje in transport grozdja do stiskalnic, stiskanje grozdja in polnjenje vrelnih tankov z moštom. Odvisno od tehnoloških postopkov in časa izpostavljenosti mošta kisiku iz zraka, imajo mošti pred začetkom alkoholnega vrenja različen oksidacijsko-redukcijski potencial.

V tretji fazi, po polnjenju bioreaktorja z moštom in preprihovanju praznega prostora nad moštom z dušikom, v odvisnosti od temperature fermentacije, je redoks potencial začel padati. Hiter začetek alkoholnega vrenja, ugodna kemijska sestava mošta ter ustrezna temperatura, omogočajo kvasovkam ustrezen metabolizem, pri katerem nastane čim manj aldehydov, zlasti acetaldehida in piruvata, ki sta velika porabnika žvepla.



Graf 20.: Redoks potencial med procesom fermentacije pri temperaturah 15, 18 in 24 °C
 (Kukec *in sod.*, 2002)

Graf 20. prikazuje *on-line* redoks potencialne fermentacij pri temperaturah 15, 18 in 24 °C. Pri fermentaciji pri najvišji temperaturi 24 °C, je redoks potencial začel padati po 2 urah od dodatka vcepka v mošt in dosegel najnižjo končno vrednost -200 mV ter največjo razliko med začetnim in končnim redoks potencialom, $\Delta E_h(24) = 400$ mV, po 72 urah od začetka fermentacije.

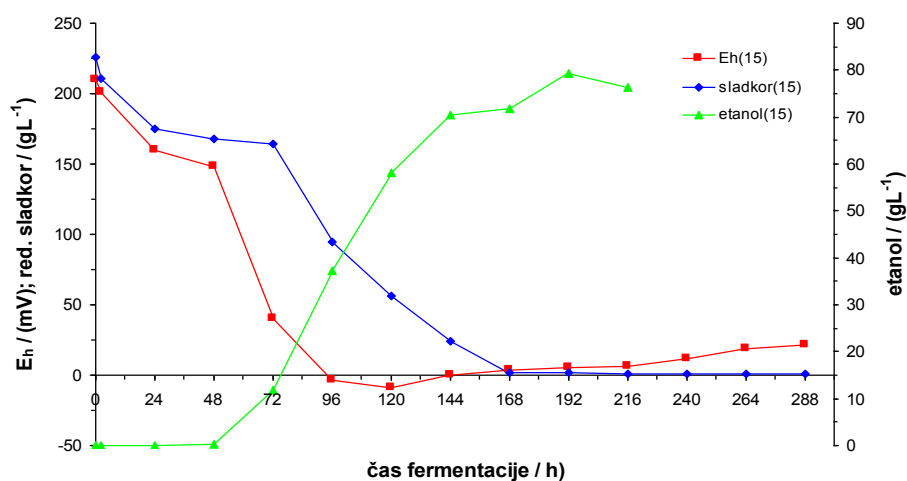
Rezultati meritev redoks potenciala pri različnih temperaturah fermentacije kažejo, da dvig temperature fermentacije vpliva na znižanje redoks potenciala med procesom in na večanje nastale razlike med začetnim in končnim redoks potencialom. Vzrok hitrejšemu padcu redoks potenciala je večja mikrobnost aktivnost pri višji temperaturi fermentacije. Nižja temperatura fermentacije (18 °C) se je odražala na manjšem padcu redoks potenciala do -150 mV, $\Delta E_h(18) = 350$ mV. Med fermentacijo pri 15 °C je redoks potencial padel še za -140 mV manj, kot pri 18 °C in najnižja vrednost je znašala -10 mV in $\Delta E_h(15) = 220$ mV. Nižje končne vrednosti redoks potenciala, oziroma večja razlika med končnim in začetnim redoks potencialom pa je odraz nastanka večjih količin reduktivnih komponent v sistemu.

Tabela 11. Začetne in končne vrednosti redoks potenciala pri različnih temperaturah

T [°C]	začetni E_h [mV]	končni E_h [mV]	ΔE_h [mV]
15	210	-10	220
18	200	-150	350
24	200	-200	400

V seriji eksperimentov pri temperaturi 15 °C je bila zaradi nizke začetne temperature faza prilagajanja mikroorganizma na pogoje v okolju najdaljša, eksponencialna faza rasti se je pričela 48 ur po dodatku kvasovk v mošt. V času 24 ur od začetka procesa se je odvijala

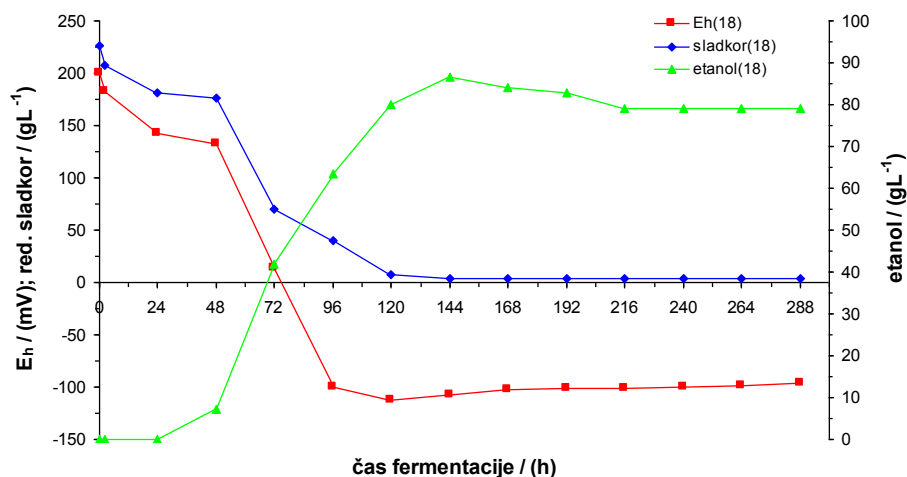
aerobna faza, v kateri so kvasovke prisotni kisik za razmnoževanje porabile. Vrednost redoks potenciala se je med aerobno fazo in fazo prehoda iz aerobnega v anaerobni del procesa znižala od 200 mV do 150 mV, ΔE_h je znašal 50 mV in v tem času se je razgradilo 36 gL⁻¹ sladkorjev. Ker se encim alkoholdehidrogenaza še ni aktiviral, v tej fazi etanol iz acetaldehida še ni pričel nastajati. Encim alkoholdehidrogenaza se v primeru fermentacije pri 18 °C aktivira pri redoks potencialu 140 mV, ko začne nastajati etanol. Prehodna faza, v kateri je mikrobn metabolizem prešel iz aerobne v anaerobno fazo fermentacije, je bila zaznana v času od 24 do 48 ur po dodatku kvasovk v mošt. Prišlo je do majhne spremembe redoks potenciala (10 mV). Zaznana je bila majhna metabolna aktivnost kvasovk. V času aerobnega dela procesa se je koncentracija sladkorjev (glukoze in fruktoze) zmanjšala iz začetnih 206,8 gL⁻¹ na 170 gL⁻¹, predvsem zaradi porabe sladkorja v anabolnem metabolizmu kvasovk, med katerimi je intenzivno nastajala biomasa. Po nekaj urnem obdobju konstantnega redoks potenciala, ki predvidoma nastane zaradi preklopa metabolizma v nastajanje glicerola, s katerim kvasovke uravnavajo nastalo razliko redoks potenciala zaradi začetnega padca (Kukec *in sod.*, 2003), so kvasovke prešle v eksponencialno fazo rasti in redoks potencial je začel naglo padati, dokler ni bila dosežena minimalna vrednost -4 mV po 96 urah fermentacije. Nagel padec vrednosti redoks potenciala je znak burne fermentacije. Mikrobn aktivnost in porušenje redoks ravnotežja kvasovk v tej fazi se je uravnavalo z nastankom glicerola. Po 96 urah trajanja fermentacije je sprememba redoks potenciala od -4 na -10 mV nakazovala, da sta mikrobn aktivnost in rast kvasovk prešli v stacionarno fazo, v kateri je koncentracija biomase dosegla maksimum pri 6,5 gL⁻¹. Po 168 urah od začetka fermentacije, se je koncentracija reducirajočih sladkorjev znižala od 207 gL⁻¹ na vrednost 1,8 gL⁻¹, koncentracija etanola pa je dosegla najvišjo vrednost 79,2 gL⁻¹. (Graf 21.)



Graf 21.: Redoks potencial, poraba reducirajočih sladkorjev in nastanek etanola pri 15 °C.

Pri 18 °C je bila rast kvasovk bolj intenzivna v primerjavi s fermentacijo pri 15 °C. V lag fazi, ki je trajala od dodatka vcepka naprej 24 ur, je bilo prilagajanje mikroorganizma na pogoje v okolju, zaradi višje fermentacijske temperature medija, krajše. Tej fazi je sledila faza padca redoks potenciala iz začetnih 200 mV na 142 mV. Faza prehoda iz aerobnega v anaerobni metabolizem je bila identificirana v času od 24 do 48 ur od začetka fermentacije. V tem delu

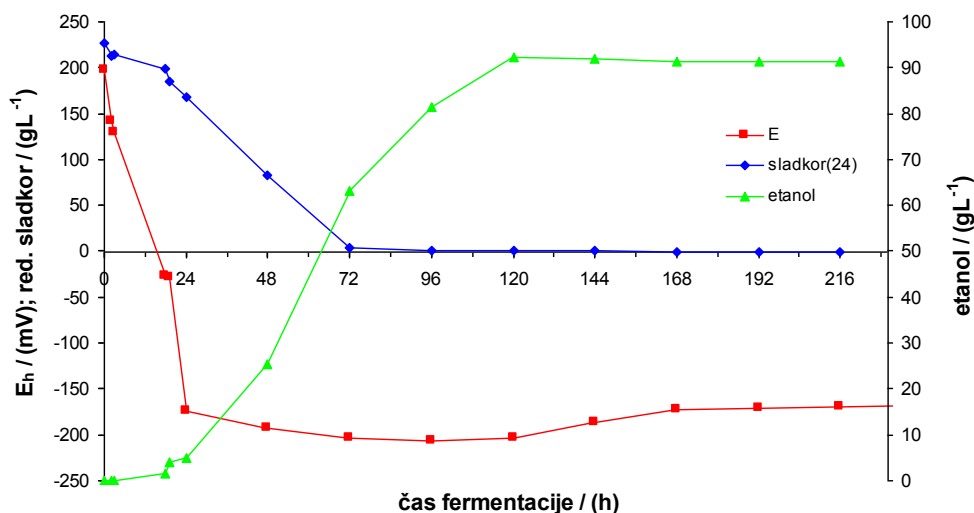
je prišlo do neznatne spremembe redoks potenciala za 10 mV. Zaznana je bila nizka metabolna aktivnost kvasovk. Koncentracija sladkorjev se je v času trajanja anabolnih procesov znižala iz začetnih 207 gL^{-1} na 175 gL^{-1} . Padec redoks potenciala, ki je povzročil spremembo redoks ravnotežja kvasovk, je bil uravnotežen z nastankom glicerola. Sledila je eksponencialna faza rasti in intenzivna razgradnja sladkorjev v ciklu anaerobnega metabolnega procesa kvasovk, ki je trajal od 24 do 120 ure. V tej fazi je pričel nastajati etanol in redoks potencial je padel iz 142 na -100 mV . Od 96 do 120 ure fermentacije, je manjši padec redoks potenciala od -100 na -120 mV kazal, da metabolizem počasi prehaja v stacionarno fazo rasti. V tem času je koncentracija reducirajočih sladkorjev padla na vrednost $4,3 \text{ gL}^{-1}$ in je po tem času le še neznatno padla do končne vrednosti $3,3 \text{ gL}^{-1}$. Nastali etanol je po 144 urah dosegel koncentracijo $86,5 \text{ gL}^{-1}$. Etanol je pričel zavirati rast in metabolne aktivnosti kvasovk. Avtoliza kvasovk se je začela po 144 urah od začetka fermentacije in je trajala do 216 ure. Vrednost redoks potenciala je v stacionarni fazi ostala praktično konstantna pri vrednosti -100 mV . Po 192 urah pa je redoks potencial začel počasi naraščati, kar pomeni, da je se zaključil proces alkoholne fermentacije, v katerem je potekla razgradnja reducirajočih sladkorjev ter nastanka etanola in drugih metabolitov in da se je pričel proces zorenja in staranja vina, v katerem je redoks potencial počasi naraščal (Graf 22.).



Graf 22.: Redoks potencial, poraba reducirajočih sladkorjev in nastanek etanola pri 18 °C

Najvišja temperatura fermentacije 24 °C je vplivala na hitrejšo rast mikroorganizma in njegove metabolne aktivnosti, kar se je odražalo na hitrejšem padcu redoks potenciala, hitrejši razgradnji glukoze in fruktoze in hitrejšem nastanku etanola, glicerola in drugih sekundarnih metabolitov in s tem povezano na hitrejšem zaključku alkoholne fermentacije. V tem primeru je bil praktično direkten prehod v eksponencialno fazo rasti, takoj po dodatku vcepka v grozdni mošt. Lag faze v tem primeru nisem zaznala. Vrednost redoks potenciala je začela naglo padati dve uri po dodatku vcepka in je po 24 urah dosegla minimum pri -174 mV . V naslednjih 72 urah je redoks potencial padel do vrednosti -206 mV , kar je bila najnižja izmerjena vrednost. V fazi prehoda iz aerobnega v anaerobni del procesa, je bila koncentracija kisika nižja kot v eksperimentih pri 15 in 18 °C. Prehodna faza je zaradi velike aktivnosti mikroorganizma ostala praktično nezaznavna v meritvah redoks potenciala, kot tudi v porabi

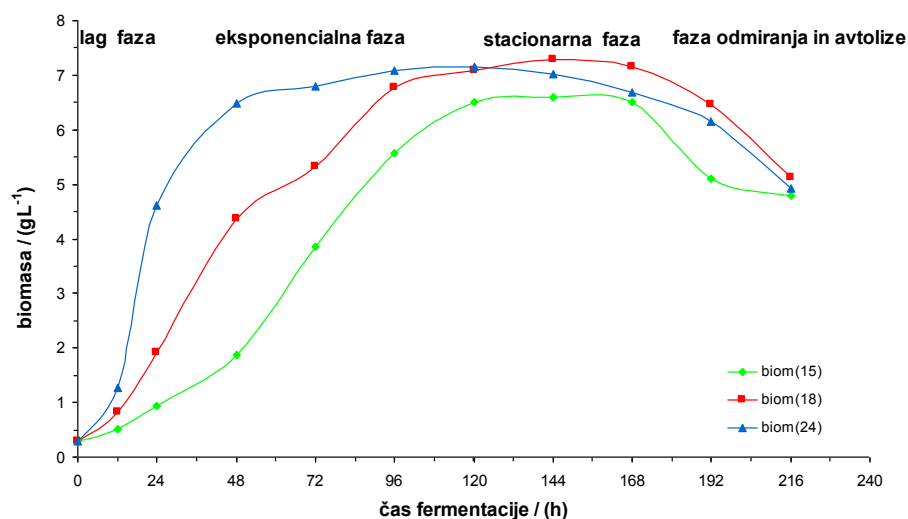
glukoze in fruktoze. Koncentracija reducirajočih sladkorjev je padla od vrednosti 206 gL^{-1} na najnižjo izmerjeno vrednost 3 gL^{-1} v 72 urah, ko je tudi redoks potencial padel na minimalno vrednost -206 mV . Največja koncentracija etanola $92,4 \text{ gL}^{-1}$ je bila izmerjena po 120 urah. V tem primeru je nastala največja količina glicerola $7,1 \text{ gL}^{-1}$, s katerim je kvasovka uravnala nastalo razliko padca redoks potenciala. Po tem času je potencial ostal konstanten za čas nekaj ur, potem pa je začel počasi naraščati in proces je prešel iz stacionarne faze v fazo zorenja in staranja vina (Graf 23.).



Graf 23.: Redoks potencial, poraba reducirajočih sladkorjev in nastanek etanola pri $24 \text{ }^\circ\text{C}$

Vrednosti redoks potenciala v začetni fazi procesa so odvisne predvsem od količine raztopljenega kisika v moštu. V tej fazi je biomasa v vseh primerih dosegla maksimum v rasti in proces je prešel iz aerobne v anaerobno fazo fermentacije. Ves razpoložljivi sladkor je bil porabljen v času padca redoks potenciala do minimalne vrednosti. Pri $24 \text{ }^\circ\text{C}$ je bil sladkor porabljen po času 72 ur, pri $18 \text{ }^\circ\text{C}$ po 144 urah in pri $15 \text{ }^\circ\text{C}$ po 168 urah od začetka fermentacije.

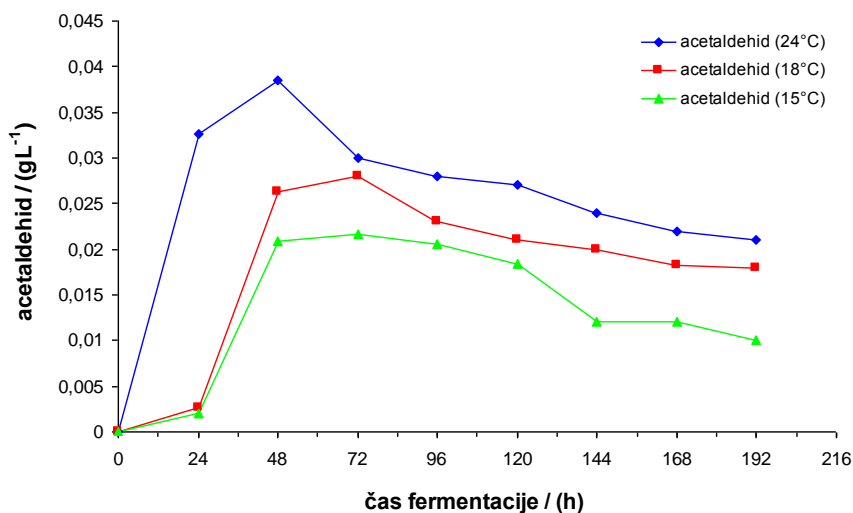
V fermentaciji pri $15 \text{ }^\circ\text{C}$ in $18 \text{ }^\circ\text{C}$ je bila v meritvi redoks potenciala zaznana prehodna faza, v kateri kvasni metabolizem prehaja iz aerobnega v anaerobni metabolizem. To se odraža v delu krivulje redoks potenciala, kjer se intenziteta padanja redoks potenciala zmanjša. V obeh primerih (pri 15 in $18 \text{ }^\circ\text{C}$) se je redoks potencial ustalil po 24 – 48 urah. V tem času je redoks potencial padel za 10 mV. Pri $24 \text{ }^\circ\text{C}$ meritev redoks potenciala odraža pospešeno rast kvasovk in hitrejši metabolizem in v tem primeru je bila prehodna faza tako kratka, da je z meritvijo redoks potenciala nisem zaznala. Trajala le eno uro in v tem času je redoks potencial padel za 11 mV. Prehodni fazi je sledila faza intenzivnega padca redoks potenciala zaradi začetka anaerobnega procesa alkoholne fermentacije.



Graf 24: Rastna krivulja kvasovk pri različnih temperaturah fermentacije

Rast in fiziološke aktivnosti kvasovk med alkoholno fermentacijo, so zelo specifične. Model rasti lahko opišemo s štirimi specifičnimi fazami: lag, eksponencialna, stacionarna faza in faza odmiranja in avtolize. Rastno krivuljo kvasovk, prikazano na grafu 16., lahko za primere alkoholne fermentacije pri različnih temperaturah opišem s fazami:

1. **Lag faza ali faza prilagajanja** kvasnih celic na pogoje v okolju je pri vseh temperaturah kratka. Z naraščajočo temperaturo fermentacije, se lag faza krajša in je v primeru fermentacije pri 24 °C ni mogoče zaznati. Kvasovke sem pred dodajanjem v bioreaktor rehidrirala v 50 – 100 mL mošta in jih še le po adaptaciji na substrat in po pričetku razmnoževanja dodala v mošt v bioreaktorju. Adaptacija mikroorganizma na nove življenjske pogoje v bioreaktorju je torej v vseh primerih potekla hitro. Na grafu 16. lahko opazimo, da je v primeru fermentacije pri 15 °C lag faza trajala 24 ur, v primeru fermentacije pri 18 °C pa je trajala 12 ur.
2. **Eksponencialna faza rasti** je odvisno od temperature fermentacije potekala 72 do 144 ur. V tem času je koncentracija biomase dosegla maksimalno vrednost, odvisno od temperature fermentacije, pri 15 °C 6,6 gL⁻¹ po 144 urah, pri 18 °C 7,3 gL⁻¹ po 120 urah in pri 24 °C 7,2 gL⁻¹ po 96 urah. S pričetkom eksponencialne faze rasti, se je vrednost redoks potenciala začela zmanjševati. Do te spremembe redoks potenciala je prišlo zaradi porabe prisotnega kisika za začetek rasti mikroorganizma. Redoks potencial je padel med eksperimentom zaradi tvorbe reducirajočih spojin, predvsem etanola in izločanja CO₂. Zmanjšanje vrednosti je odvisno od specifične hitrosti rasti in od fiziološke aktivnosti kvasovke. Po začetnem strmem padcu, se je redoks potencial stabiliziral za kratek čas. Ena možnih razlag za stabilnost redoks potenciala je, da se v tem času zaključi eksponencialna faza rasti in se zgodi prehod v stacionarno fazo rasti kvasovk in se prične izločati acetaldehid, ki se izloča predvsem v fazi rasti mikroorganizma (Martinez in Whitaker, 1997). Velike koncentracije acetaldehida povzročajo inhibicijo rasti kvasovk in zastoj v metabolizmu glukoze. Zaradi pomanjkanja encima alkoholdehidrogenaze, se acetaldehid v tej stopnji še ne reducira do etanola.

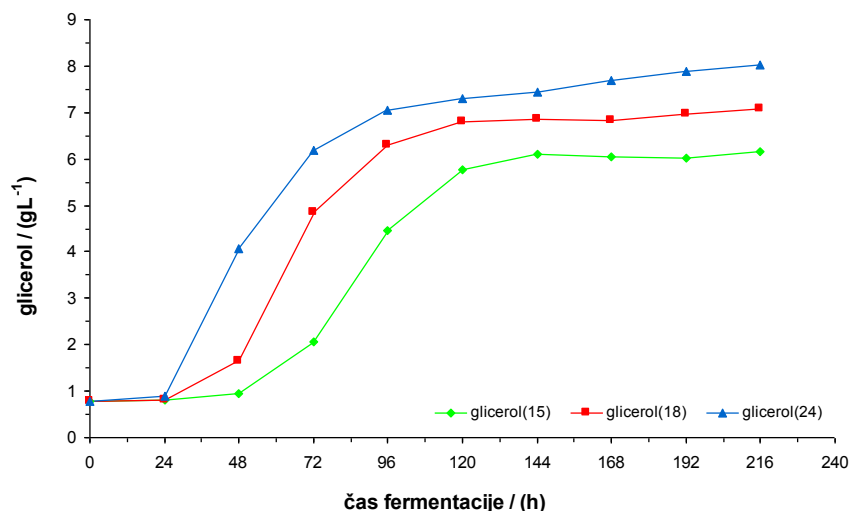


Graf 25.: Nastajanje acetaldehida med fermentacijami pri 15, 18 in 24 °C

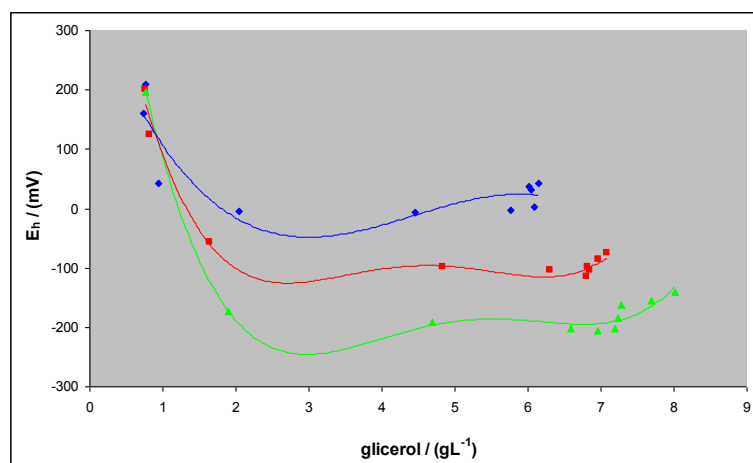
- 3. Stacionarna faza rasti**, ki je sledila eksponencialni fazi rasti, je trajala 120 do 144 ur, krajši čas v primeru nižje temperature in daljši čas pri višji temperaturi. Ko so kvasovke prešle v stacionarno fazo rasti, se je v vseh primerih ustalila tudi vrednost redoks potenciala, ki je potem za nekaj časa ostala konstantna. Metabolizem reducirajočih sladkorjev se je nadaljeval. Rast kvasovk se je zaključila, ko se je v rastnem mediju nakopičila večja količina etanola, ki je povzročila inhibicijo rasti. Redoks potencial je padel na najnižjo vrednost, odvisno od temperature fermentacije. Prenehanje metabolnih aktivnosti je lahko posledica izčrpanja celičnih zalog ATP in akumulacije večjih koncentracij etanola znotraj celice – zaradi težav pri transportu čez celično membrano, ki ga povzroča pomanjkanje celičnih sterolov. Ta fenomen ima številne tehnološke posledice, kot so zaustavitev fermentacije (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998).
- 4. Faza odmiranja**, ki sledi stacionarni fazi rasti, lahko traja tudi do več tednov. Razlike v količini nastale biomase med fermentacijami pri različnih temperaturah, so bile zelo majhne. Razlika med koncentracijo biomase pri 15 °C in koncentracijo biomase pri 24 °C je znašala le 0,7 gL⁻¹.

V začetni fazi, ko je v sistemu še prisotna manjša koncentracija kisika, potekata intenzivnejša rast in razmnoževanje kvasovk, ob tem nastaja količina biomase, ki fermentira po anaerobni poti glukozo in fruktozo v etanol in ostale alkohole. Kvasovke v tem času veliko bolje izkoriščajo energijo kot kasneje, ko poteče anaerobni proces. V tem primeru se z razgradnjo ene molekule sladkorja sprošča 673 kal energije (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998).

V eksponencialni fazi rasti kvasovk, je bil padec redoks potenciala uravnotežen z intenzivnejšim izločanjem glicerola (Graf 25.). Količina nastalega glicerola je povezana z razliko med začetnim in končnim redoks potencialom. Pri različnih temperaturah fermentacije nastane največ glicerola v primeru, ko je razlika med začetnim in končnim redoks potencialom največja, kar se v primeru fermentacij pri 15, 18 in 24 °C, zgodi pri 24 °C.



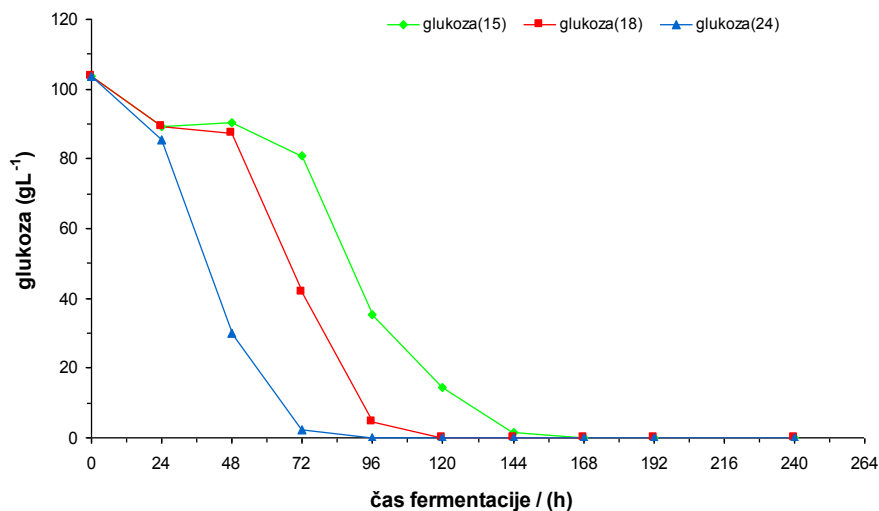
Graf 26: Nastajanje glicerola pri različnih temperaturah fermentacije (Kukec *in sod.*, 2002)



Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* izloča večje količine glicerola, kot osmoregulatorja, s katerim regulira spremembe redoks potenciala v procesu biosinteze etanola. Kinetika nastanka glicerola je dvofazna, z visoko stopnjo nastajanja med fazo rasti kvasovk in manj intenzivno fazo nastajanja v stacionarni fazi rasti kvasovk. Količina nastalega glicerola je povezana z razliko vrednosti med začetnim in končnim redoks potencialom in sicer se največ glicerola izloči v primeru, ko je padec vrednosti redoks potenciala med fermentacijo največji (Graf 20. in Graf 26.) (Kukec *in sod.*, 2002).

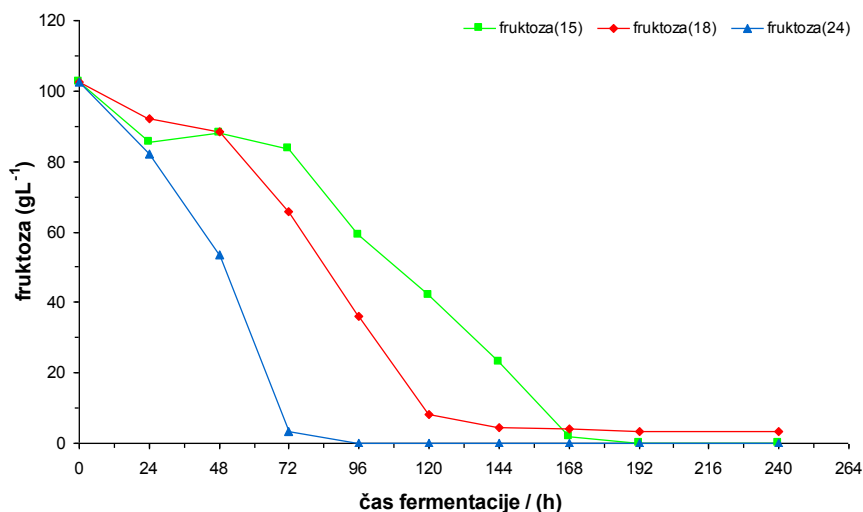
V času, ko je bil kvasni metabolizem prekinjen med fermentacijami pri 15 in 18 °C (prehodna faza iz aerobnega v anaerobni metabolizem), je začel nastajati glicerol. Prve merljive koncentracije glicerola so bile izločene med prvim in tretjim dnevom fermentacije, odvisno od temperature fermentacije. Po 48 urah je bila pri 15 °C izmerjena prva zaznavna koncentracija glicerola, ki je znašala 0,9 gL⁻¹, pri 18 °C 1,6 gL⁻¹ in pri 24 °C je po 48 urah od dodatka vcepka koncentracija glicerola dosegla vrednost 4,1 gL⁻¹. Začetek nastajanja glicerola je v vseh primerih sovpadal z začetkom intenzivnega padanja redoks potenciala, ki se je v primeru fermentacije pri 15 °C in pri 18 °C pričel po 48 urah in pri 24 °C po 3 urah od dodatka vcepka in je pomenil začetek anaerobnega procesa fermentacije.

Največ glicerola ($8,0 \text{ gL}^{-1}$) je tako nastalo v primeru fermentacije pri $24 \text{ }^\circ\text{C}$, ko je razlika med začetnim in končnim izmerjenim redoks potencialom bila največja 400 mV . Pri $18 \text{ }^\circ\text{C}$ je bila razlika $\Delta E_h = 350 \text{ mV}$ in v tem primeru je nastalo $7,1 \text{ gL}^{-1}$ glicerola. V primeru fermentacije pri $15 \text{ }^\circ\text{C}$, ko je bila izmerjena koncentracija glicerola $6,1 \text{ gL}^{-1}$, je redoks potencial v času fermentacije padel za 220 mV (Graf 20. in Graf 26.).



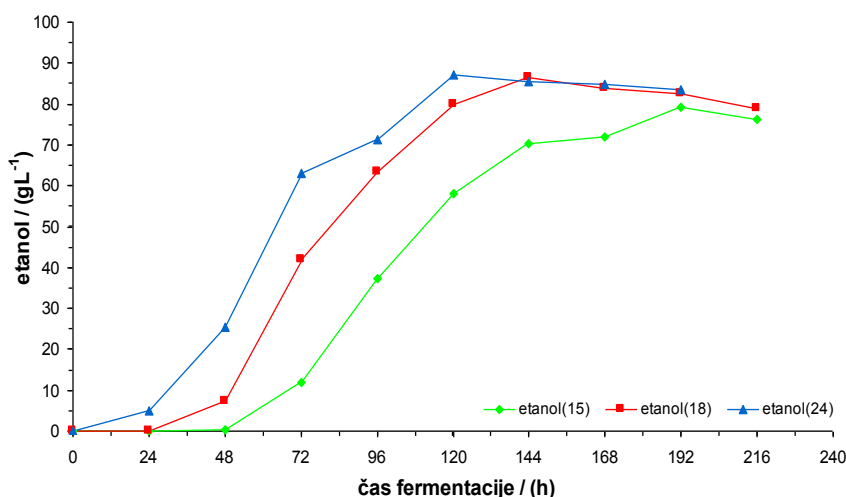
Graf 27.: Poraba glukoze pri različnih temperaturah fermentacije

Poraba reducirajočih sladkorjev je odvisna od fermentacijske temperature in se z višanjem temperature večja. Poraba glukoze je v začetni fazi večja kot poraba fruktoze. V vseh primerih se je glukoza začela razgrajevati pred fruktozo in se je tudi razgradila v krajšem časovnem obdobju. Pri $24 \text{ }^\circ\text{C}$ praktično sovpadata razgradnja glukoze in fruktoze; zamik v časovnem poteku razgradnje sladkorjev se pokaže pri nižjih temperaturah. Ob koncu fermentacije se je v vseh primerih razgrajevala le še fruktoza (Graf 27. in 28.).



Graf 28.: Poraba fruktoze pri različnih temperaturah fermentacije

Skladno z razgradnjo sladkorjev je odvisno od temperature fermentacije nastajal etanol in to najhitreje med fermentacijo pri 24 °C in sicer po 24 urah. Po 48 urah je pričel etanol nastajati pri 18 °C in po 72 pri 15 °C. Končna količina nastalega etanola se ni bistveno razlikovala glede na različne temperature fermentacije (Graf 29.)



Graf 29.: Nastajanje etanola pri različnih temperaturah fermentacije

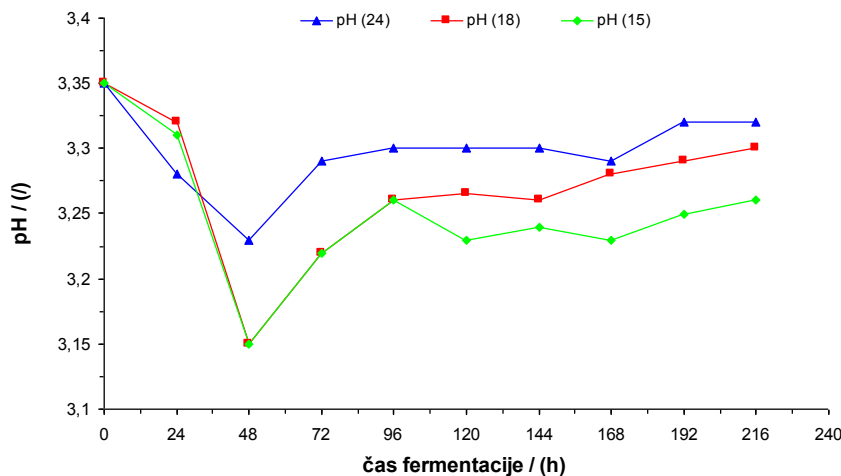
Z zvišanjem temperature lahko predvsem v začetni fazi fermentacije povečamo aktivnost in učinkovitost kvasnih celic v njihovem metabolizmu. Proces rasti kvasovk lahko pospešimo tudi z dostopom kisika iz zraka v majhnih količinah. S tem skrajšamo lag fazo in povišamo hitrosti razgradnje sladkorjev in nastanka etanola.

4.3.1. VPLIV TEMPERATURE NA pH MED FERMENTACIJO

V vinarstvu se pogosteje kot meritve pH uporabljajo meritve skupnih in hlapnih kislin. Ker se izražajo v koncentraciji vinske ali žveplove(VI) kisline, iz njih lažje sklepamo o dejanski prisotnosti kislin v moštu in vinu (Šikovec, 1993).

Med fermentacijami pri različnih temperaturah (15, 18 in 24 °C) sem merila vrednosti pH ter z meritvami koncentracije spremljala nastajanje in razgradnjo nekaterih organskih kislin (jabolčna, vinska, citronska, jantarna in očetna kislina). Tako sem dobila vpogled v dogajanje v sistemu, glede na spreminjanje pH vrednosti in spreminjanje koncentracij kislin (vinske, jabolčne, jantarne, citronske, očetne in mlečne kisline) v moštu in vinu ter zaznala nezaželene spremembe v sistemu, ki se odražajo na pH. Ena takšnih je vdor za fermentacijo škodljivih mikroorganizmov iz okolice v sistem.

Najvišje vrednosti pH so bile izmerjene pri najvišji temperaturi 24 °C. pH je med fermentacijo padel iz začetne vrednosti 3,35 v prvih 48 urah fermentacije na vrednost pH 3,28 in nato v naslednjih 168 urah ponovno zrasla in dosegla končno vrednost 3,32. Pri 18 °C in 15 °C je pH v 48 urah padel iz začetnih 3,35 na 3,15 in ponovno narasel in sicer pri 15 °C na 3,26 in pri 18 °C na 3,28 po 216 urah. Kljub razlikam poteka padca in naraščanja pH vrednosti pri različnih temperaturah, nisem zaznala bistvene razlike končnih pH vrednosti pri različnih temperaturah fermentacije (Graf 30.).

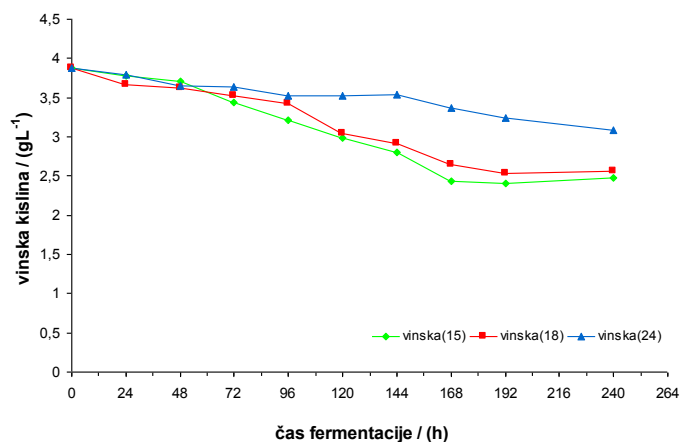


Graf 30.: pH vrednosti med fermentacijami pri različnih temperaturah

Predvidevam, da pH v začetku fermentacije pada zaradi nastajanja citronske, jantarne, očetne kisline. Kasneje, ko se je vinska kislina začela izločati v obliki kalijevih in kalcijevih soli in se je začela razgrajevati jabolčna kislina, pa je pH začel naraščati. Začetni padec in ponovno naraščanje pH vrednosti med procesom fermentacije sem poskusila razložiti s spremembami koncentracij za proces pomembnih kislin (vinske, jabolčne, jantarne, citronske in očetne kisline).

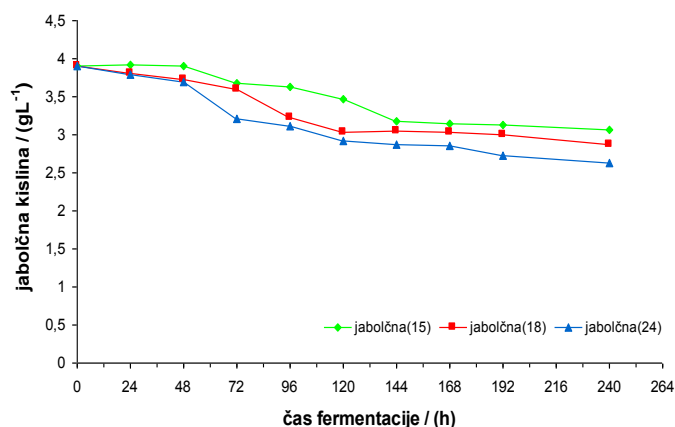
V grafih 31. – 34. so prikazani poteki razgradnje, oziroma nastajanja organskih kislin med fermentacijo pri različnih temperaturah fermentacije. Koncentraciji vinske in jabolčne kisline sta se med alkoholnim vrenjem znižali pri vseh temperaturah 15, 18 in 24 °C (Grafa 31. in 32.). Koncentracija vinske kisline je padla, ker je zaradi nastalega alkohola, velik del topnega kalijevega hidrogenatratata prešel v netopno obliko in se med procesom fermentacije izločil ob stene posode v obliki vinskega kamna. Izločanje vinske kisline v obliki kalijevih soli se stopnjuje z znižanjem temperature fermentacije. Koncentracija vinske kisline je intenzivneje začela padati po 24 urah, kar sovпада z začetkom nastajanja etanola. Najhitreje je vinska kislina padala med fermentacijo, ki je potekala pri 15 °C, najpočasneje pa pri 24 °C, kar govori v prid dejstvu, da je izločanje vinskega kamna intenzivnejše pri nižjih temperaturah. Zaradi izločanja soli vinske kisline pa prihaja tudi do znižanja kislosti vina. Tako je koncentracija vinske kisline najbolj padla v primeru fermentacije pri 15 °C, kjer se je koncentracija znižala iz 3,87 gL⁻¹ na 2,47 gL⁻¹. Pri 18 °C se je koncentracija iz začetnih 3,87 gL⁻¹ znižala na 2,56 gL⁻¹. Najmanj se je koncentracija vinske kisline zmanjšala v primeru fermentacije pri 24 °C in sicer iz 3,87 gL⁻¹ na 3,09 gL⁻¹ (Graf 31.).

Padec koncentracije vinske in jabolčne kisline se je odražal na zvišanju vrednosti pH v procesu fermentacije, saj se je najintenzivnejši padec koncentracije vinske kisline zgodil v času, ko je pri vseh temperaturah naraščala vrednost pH, to je od 48 ure do zaključka procesa fermentacije.



Graf 31.: Zmanjševanje koncentracije vinske kisline med fermentacijo pri T = 15, 18 in 24 °C

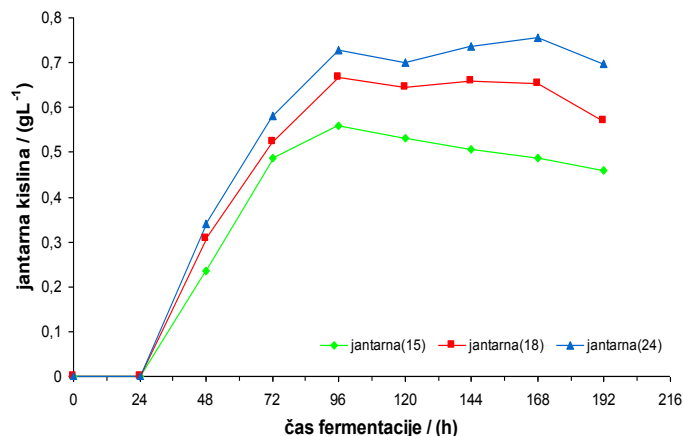
Koncentracija jabolčne kisline je začela padati po približno 48 urah od začetka fermentacije v vseh primerih, pri 15, 18 in 24 °C. Najhitreje se je jabolčna kislina razgrajevala pri 24 °C, najpočasneje pa pri 15 °C. Največji padec koncentracije jabolčne kisline sem zasledila pri temperaturi 24 °C, ko je koncentracija padla iz 3,90 gL⁻¹ na 2,63 gL⁻¹ jabolčne kisline. Pri 18 °C je koncentracija jabolčne kisline padla iz 3,90 gL⁻¹ na 2,87 gL⁻¹ in najmanjši padec sem izmerila pri 15 °C, ko se je koncentracija zmanjšala iz 3,90 gL⁻¹ na 3,06 gL⁻¹. Večji padec v koncentraciji jabolčne kisline se je zgodil pri višji temperaturi fermentacije, ki ugodno vpliva na encimske reakcije dekarboksilacije jabolčne kisline do acetaldehida in naprej do etanola (Graf 32.).



Graf 32.: Razgrajevanje jabolčne kisline pri temperaturah 15, 18 in 24 °C

Kvasovke so med fermentacijo sposobne razgraditi 3 – 45 % jabolčne kisline, odvisno od seva uporabljene kvasovke (Fleet, 1991). Jabolčna kislina se po oksidativni poti dekarboksilira do piruvata s pomočjo encimov, piruvat pa se nadalje dekarboksilira do acetaldehida, ki prehaja v etanol. Ta oksidativna dekarboksilacija zahteva NAD⁺. Proces med fermentacijo znižuje kislost vina. Nekaj jabolčne kisline pa se med fermentacijo spreminja v jantarno kislino. Na razgradnjo jabolčne kisline pa imajo močan vpliv mlečnokislinske bakterije, ki imajo optimalno temperaturo rasti okoli 25 °C. Že v začetni fazi fermentacijskega procesa je po 24 urah začela pri vseh temperaturah nastajati jantarna kislina. Jantarna kislina

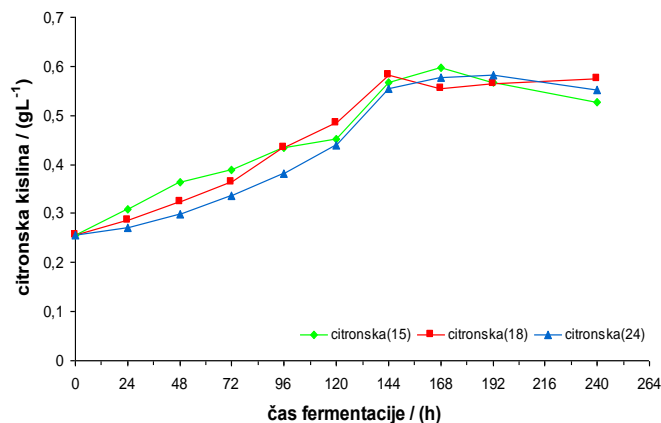
nastaja med potekom reakcij Krebsovega cikla. Sinteza poteka po oksidativni poti (preko sukcinil-CoA). Encim Krebsovega cikla 2-oksoglutaratdehidrogenaza je tisti encim, ki povzroča sproščanje jantarne kisline z oksidativnimi reakcijami. Manjše količine jantarne kisline nastanejo tudi iz jabolčne kisline preko oksalacetata, malata in fumarata, s pomočjo encimov reduktivne poti (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998).



Graf 33.: Nastajanje jantarne kisline pri temperaturah 15, 18 in 24 °C

Nastajanje jantarne kisline se je pri 15, 18 in 24 °C začelo po 24 urah. V času 72 ur je pri 15 °C nastalo 0,56 gL⁻¹ jantarne kisline, pri 18 °C je nastalo 0,67 gL⁻¹ jantarne kisline in pri 24 °C 0,73 gL⁻¹. Ugotovila sem, da ni bistvene razlike v časovnem poteku nastajanja jantarne kisline, kar pomeni da temperatura fermentacije ne vpliva bistveno na čas nastajanja jantarne kisline, vpliva pa na končno koncentracijo (Graf 33.).

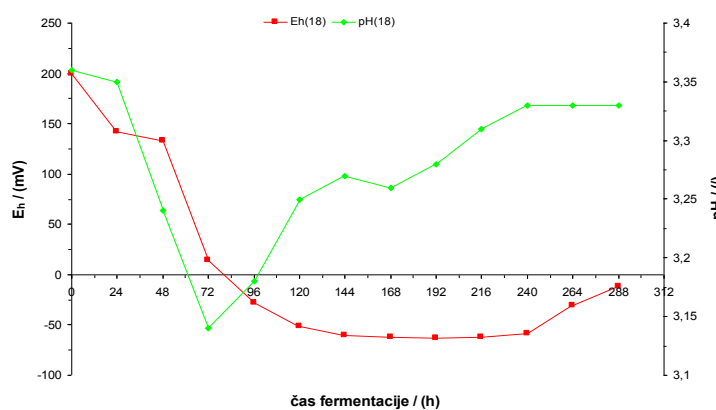
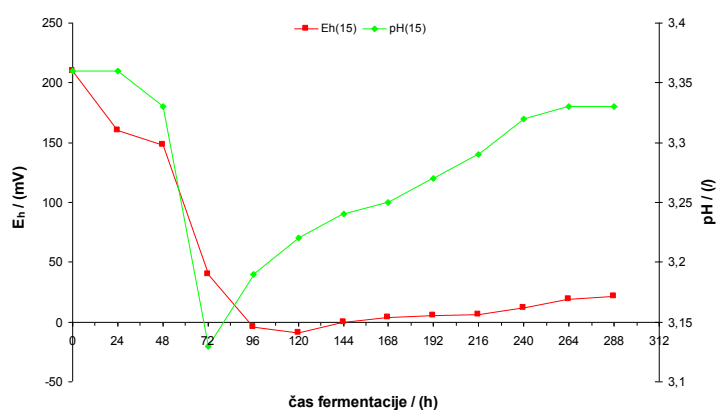
Tudi koncentracija citronske kisline se je opazno povežala že v začetni fazi alkoholne fermentacije in sicer najhitreje pri temperaturi 15 °C, 12 ur po dodatku vcepka v mošt. Bistvene razlike v končnih koncentracijah citronske kisline nisem zaznala. Smatram, da v primeru nastanka citronske kisline med fermentacijo temperatura procesa nima bistvenega vpliva proces nastajanja, kot tudi ne na vsebnost nastale citronske kisline (Graf 34.).

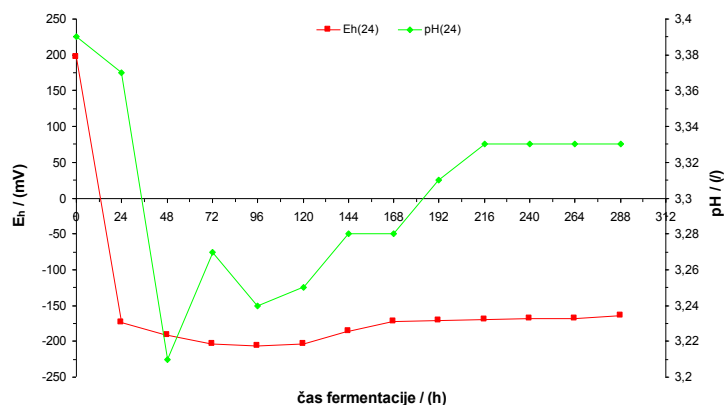


Graf 34.: Nastajanje citronske kisline pri temperaturah 15, 18 in 24 °C

Na grafih 35. a,b,c so prikazane odvisnost redoks potenciala in pH pri različnih temperaturah fermentacije (15, 18 in 24 °C). V začetni fazi redoks potencial strmo pade pri vseh temperaturah. Padec in časovni interval v katerem redoks potencial pada, sta odvisna od temperature fermentacije. Z njim pada tudi pH v sistemu in z zaključkom strmega padca redoks potenciala, ki se zaključi ob različnih časih, odvisno od temperature fermentacije, neha padati pH. To se zgodi v primeru fermentacije pri 15 °C in pri 18 °C po 72 urah in v primeru fermentacije pri 24 °C po 48 urah. Metabolni cikel spremembe organskih kislin v procesu fermentacije vplivajo na spremembe redoks potenciala v sistemu, saj so prav tako kot presnova sladkorjev in nastanek primarnih in sekundarnih produktov fermentacije, rezultat aktivnosti kvasovk v ciklu kvasnega metabolizma.

Sprememba vrednosti pH je posledica sprememb v metabolizmu kvasovk in izločanja vinske kisline v obliki vinskega kamna. V začetni fazi, ko je v sistemu še prisotna manjša količina kisika, piruvat vstopa v mitohondrije, kjer se oksidativno dekarboksilira v acetil-CoA s skupino encimov piruvat dekarboksilaze. Ta reakcija preusmeri glikolizo v cikel trikarboksilnih kislin (TCA cikel), v katerem nastaja citronska in delno tudi jantarna kislina. To je vzrok za zniževanje pH v prvem delu alkoholne fermentacije. Jantarna kislina nastaja med celotnim procesom fermentacije, saj nastaja tudi med anaerobnim metabolizmom kvasovk, ko se piruvat dekarboksilira do oksalacetata in se ta pretvarja naprej v jantarno kislino (http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biology/03_Metabolism.htm).





Grafi 35. a, b in c: Meritve redoks potenciala in pH med fermentacijami pri temperaturah 15, 18 in 24 °C

Na osnovi analize rezultatov opravljenih meritev sklepam, da je pH meritev med procesom fermentacije smislen pokazatelj dogajanja v procesu, saj odraža dogajanje v sistemu, v smislu nastajanja, razgradnje in izločanja organskih kislin in s tem vpliva na kislost in z njo povezane organoleptične lastnosti vina. Ob poznavanju poteka spreminjanja pH vrednosti med procesom in pH območja ugodnega za kvasni metabolizem, nam pH meritev med procesom fermentacije omogoča dober vpogled v proces in možnost pravočasnega ukrepanja ob morebitnih napakah v procesu, ki bi se odražale na pH, istočasno pa nam daje podatek o tem, kdaj se je v sistemu začela izločati vinska kislina in kdaj je čas za zaustavitev procesa.

4.3.2. VLOGA KISIKA V TEHNOLOGIJI PREDELAVE VINA

Mnenje, da je kisik v vseh razvojnih fazah vina škodljiv, deloma drži, vendar je njegov učinek na potek oksidacijskih procesov odvisen predvsem od časa kontakta z moštom, njegove topnosti, kemijske sestave mošta, prisotnosti encimov in temperature mošta. Pozitivna vloga kisika pri fermentaciji se kaže v pospeševanju fermentacije, tako da v začetni fazi procesa ugodno vpliva na rast in razmnoževanje kvasovk. Prav tako deluje kisik pozitivno tudi v procesu formiranja kakovosti vina z vezavo nekaterih nestabilnih snovi v procesu spontanega bistrenja vina, to je po končani alkoholni fermentaciji (beljakovine, fenolne spojine, soli težkih kovin...). Negativno delovanje kisika se kaže v barvi in aromi vina, kot tudi na okusu, ki je moten s prisotnostjo O₂. Količina prisotnega O₂ je odvisna od temperature. Z naraščajočo temperaturo topnost kisika pada (Wondra, 1997).

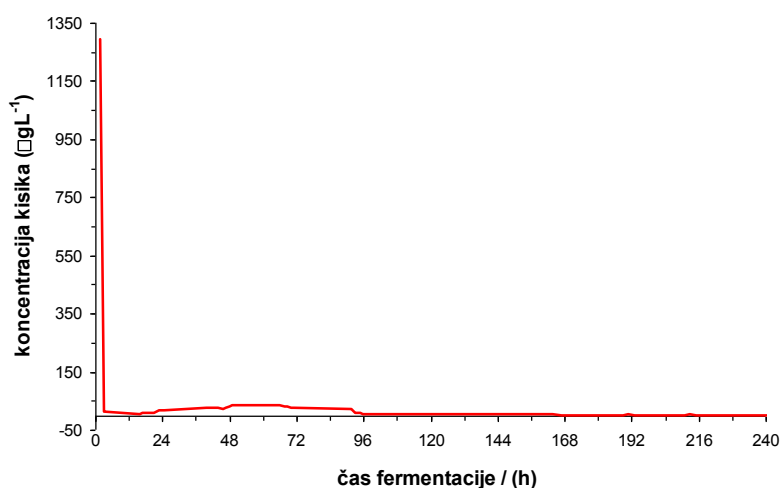
V vseh fazah predelave grozdja in pridelave vina je v večji ali manjši meri prisoten kisik, katerega bolj ali manj škodljiv vpliv se kaže v reakcijah oksidacije kemijskih snovi ob nastanku produktov, ki vplivajo na senzorično kakovost (intenzivna barva, izguba sortnega značaja vina in aromatičnih snovi) in zmanjšanje antioksidativnih lastnosti. Hitrost in obseg oksidacijskih procesov sta odvisna tako od fizikalno – kemijskih lastnosti vina in od temperature pri kateri proces poteka. Padeč redoks potenciala je odvisen od porabe kisika, ki se v grozdnem moštu raztopi v začetni fazi fermentacije. Razpoložljivi raztopljeni kisik kvasovke porabijo v času rasti in razmnoževanja in koncentracija nato hitro pade.

Preostali del topnega kisika se izgubi zaradi nastalega ogljikovega dioksida, ki ga izrine iz mošta. Mošt je zaradi nastalega ogljikovega dioksida zaščiten pred dodatnim raztapljanjem kisika. Istočasno poteka tudi metabolizem sladkorjev, ki je tipično reduktivnega značaja in povzroči padec redoks potenciala. Redoks potencial je tako lahko tudi indikator porabe kisika v fermentacijskem mediju in omogoča kontrolo nad oksidacijskim stanjem mošta in kasneje vina. Tako lahko pravočasno preprečimo nezaželene oksidacijske procese v vinu.

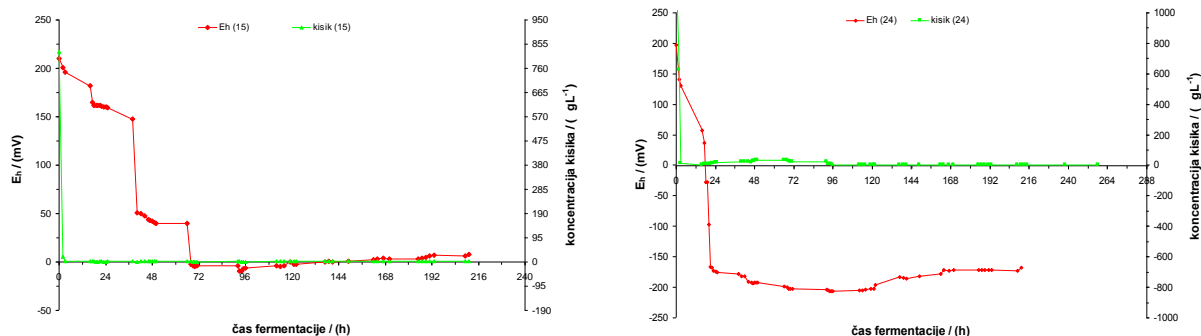
V prezračnem moštu je izguba CO₂ in hlapnih kislin večja, kar prav tako omogoča večje razmnoževanje kvasovk in s tem burnejše vrenje. Rezultati nekaterih raziskav kažejo, da se pri prezračnem moštu izkoristi le 75 % sladkorja za alkoholno vrenje, pri neprezračnem pa 90 %. V industriji pridelave vina, se v smislu čim boljšega izkoristka substrata, prezračevanje omejuje (Judež, 1981).

Koncentracija kisika takoj po pretoku mošta v reaktor strmo pade in ostane nizka vse do konca fermentacije. To pomeni, da proces poteka pod anaerobnimi pogoji, v močno reduktivnem okolju, tako da koncentracija kisika ne vpliva na meritev redoks potenciala med fermentacijo (Graf 29.).

Koncentracija raztopljenega ima direktni vpliv na rast biomase in s tem na metabolne aktivnosti kvasovk, ki so pri različnih koncentracijah raztopljenega kisika različne. Večji vpliv zato pripisujem metabolnemu procesu in odvisnosti raztapljanja kisika od temperature fermentacije. Koncentracija kisika najhitreje pade pri fermentaciji, ki je potekala pri najnižji temperaturi 15 °C in sicer po 3 urah doseže koncentracija vrednost 1,6 µgL⁻¹. V primeru fermentacije pri 24 °C doseže koncentracija raztopljenega kisika v sistemu vrednost 4,7 µgL⁻¹ po 12 urah. Šele čez čas se prične intenzivno alkoholno vrenje, kar nam kaže nenadni padec redoks potenciala.



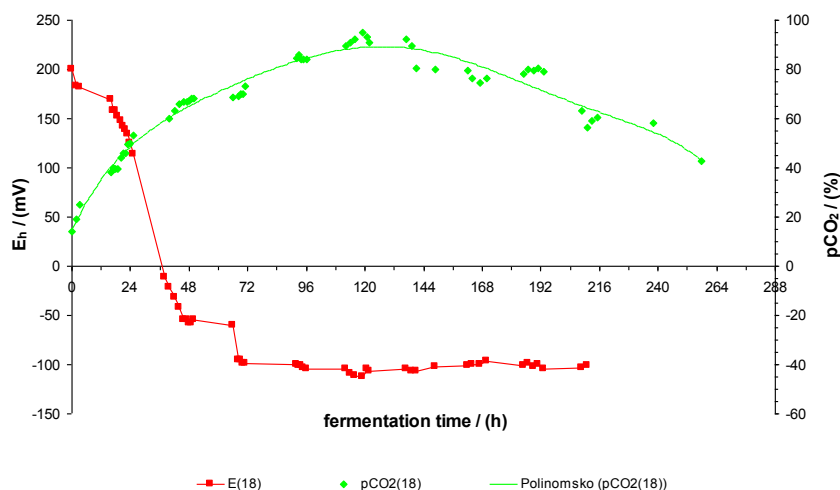
Graf 36.: Koncentracija raztopljenega kisika v moštu med fermentacijo pri 24 °C



Graf 37 in 38.: Koncentracija raztopljenega kisika in redoks potencial pri 15 °C in pri 24 °C

4.3.4 VPLIV CO₂

CO₂ nastopa v procesu mikrobnega metabolizma v dveh vlogah in sicer: v manjši meri v reakcijah karboksilacije ali v večji meri kot metabolni produkt iz reakcij dekarboksilacije med produkcijo etanola in v TCA ciklu. Prisotnost CO₂ v tekočem substratu deluje inhibično na rast in metabolizem kvasnih celic. Velikost inhibicije je odvisna od temperature in od tlaka. Z nižanjem temperature in višanjem tlaka, se močno povečuje topnost CO₂ v substratu in s tem inhibicija kvasnega metabolizma (Rodney *in sod.*, 1982).



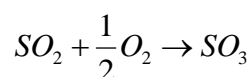
Graf 39.: Redoks potencial in parcialni tlak ogljikovega dioksida v % nasičenja pri 18 °C

CO₂ izpodriva zrak, ki je v sistemu še prisoten v aerobni fazi procesa iz sistema in tako ščiti mošt oziroma vino pred morebitno oksidacijo. Na grafu 32. je prikazana odvisnost redoks potenciala in nastanka CO₂ v sistemu. Povečanje količine nastalega CO₂ sovпада z eksponencialno fazo rasti mikroorganizma, ki se odraža na padcu redoks potenciala v tem časovnem obdobju. Ko koncentracija CO₂ doseže maksimalno nasičenje 95 % je tudi vrednost redoks potenciala že padla na vrednost – 113 mV. Sistem je v tem trenutku nasičen s CO₂ raztopljenim v vinu.

4.4. VPLIV DODATKA SO₂ NA POTEK FERMENTACIJSKEGA PROCESA

Žveplo se je v kletarstvu ohranilo še iz grških in rimskih časov in je najstarejše enološko sredstvo, brez katerega nam vse do danes, kljub številnim poskusom, ni uspelo pridelati sortno značilnega in obstojnega vina. V zadnjih nekaj letih se v mednarodnih znanstvenostrokovnih krogih postavlja v ospredje vprašanje zmanjšanja uporabe enoloških sredstev, predvsem zdravju škodljivega žvepla. V sled temu iščejo ustrezne postopke predelave grozdja in pridelave vina, raziskujejo vpliv kisika v posameznih tehnoloških fazah (Šikovec, 1993). Prisotnost SO₂ v obliki žveplove(IV) kisline v moštu močno vpliva na vrenje mošta. SO₂ v procesu alkoholne fermentacije deluje kot (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 1998):

1. **Antioksidant:** ob prisotnosti katalizatorjev se SO₂ veže z raztopljenim kisikom:



2. Reakcija poteka počasi. Vina ščiti pred kemijsko oksidacijo, nima pa vpliva na encimske oksidacije, ki so zelo hitre. SO₂ torej ščiti mošt in vino pred prekomerno intenzivnimi oksidacijami polifenolnih komponent in pomembnih elementov arome. SO₂ je pomemben tudi pri vzpostavitvi in vzdrževanju nizkega oksidacijsko-redukcijskega potenciala, ki ugodno vpliva na razvoj arome in okusa v času zorenja vina. SO₂ konstantno inhibira delovanje oksidacijskih encimov (tirozinaze, lakaze). Na ta način ščiti mošt pred fermentacijo pred oksidacijo, ki poteka s pomočjo encimov oksidaz.
3. **Antiseptik:** preprečuje rast in razmnoževanje neželenih mikroorganizmov. Ima močnejše inhibitorno delovanje na bakterije, kot na kvasovke.
4. **Veže acetaldehid** in ostale podobne produkte in tako ugodno vpliva na aromo vina.



Vsebnost SO₂ v moštu tudi neugodno vpliva na vcepke:

- podaljšuje lag-fazo selekcionirane kulture,
- zmanjšuje hitrost rasti selekcionirane kulture oziroma vseh kvasovk,
- podaljšuje celoten proces fermentacije,
- pospešuje odmiranje kvasovk.

Vino, prefermentirano v prisotnosti SO₂, ima običajno večjo vsebnost vezanega acetaldehida, ker se SO₂ veže na acetaldehid, zavira reoksidacijo NADH molekul in pretvorbo acetaldehida v etanol (Herraiz *in sod.*, 1989). Žveplo lahko v mošt dodajamo v več oblikah, to je lahko uvajanje plinastega SO₂ iz jeklenke ali 5 do 6 % raztopine žveplove(IV) kisline oziroma raztopljeni kalijev metabisulfit (K₂S₂O₅). Za študij vpliva dodanega žveplovega dioksida sem v svojih eksperimentih uporabila dodatek 5 – 6 % raztopine žveplove(IV) kisline pred

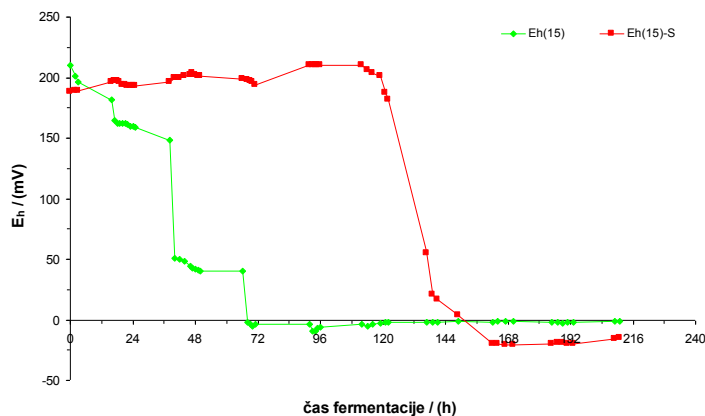
začetkom fermentacije. Žveplovo(IV) kislino sem dodala v mošt pred dodatkom vcepka kvasovk. Želela sem preučiti vpliv dodatka žveplove kisline na začetek, potek in trajanje procesa alkoholne fermentacije in ugotoviti kako se ta vpliv odraža na *on-line* meritvah redoks potenciala in pH. Za študij vpliva dodanega žveplovega dioksida sem v svojih eksperimentih uporabila dodatek 50 mg 6 % žveplove(IV) kisline na liter mošta, pred začetkom fermentacije.

Vpliv dodatka žveplove(IV) kisline je viden iz meritve redoks potenciala v pilotnem merilu, v primerjavi z redoks potencialom fermentacije v laboratorijskem bioreaktorju (Graf 21.). Fermentacija zaradi dodatka SO₂ poteka počasneje in manj intenzivno. Dodatek SO₂ zahteva prilagajanje kvasovk na nove pogoje v okolju in s tem podaljšuje lag fazo in upočasnjuje rast in metabolizem kvasovk. Redoks potencial je med fermentacijo z dodanim SO₂ nižji in krivulja je zamaknjena v bolj reduktivno območje. Proces fermentacije poteka v bolj reduktivnem okolju v primerjavi s procesom brez dodanega SO₂.

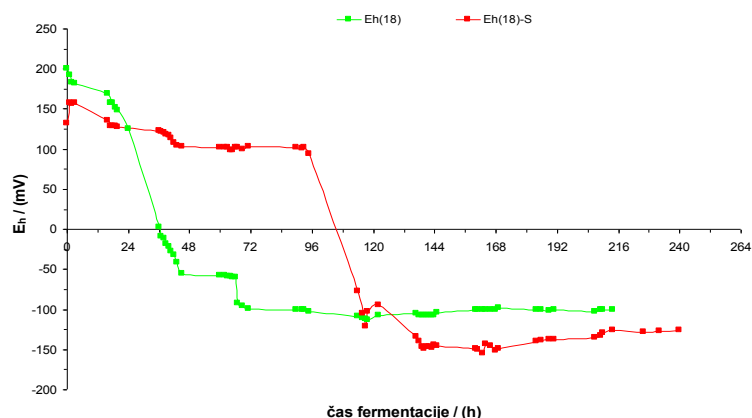
Dodatek žveplove(IV) kisline ali SO₂ v mošt pred začetkom fermentacije, med fermentacijo ali po zaključku fermentacije, zavira delovanje alkohol dehidrogenaze in tako se acetaldehid ne pretvarja v etanol (Boulton *in sod.*, 1996) ali pa se veže z acetaldehidom in tako zmanjšuje količino acetaldehida, ki bi se v nadaljnjih reakcijah spremenil v etanol (Paul, 1975).

Pri eksperimentih izvedenih v laboratorijskem bioreaktorju pri različnih temperaturah (15, 18 in 24 °C), sem ugotovila, da se je v primeru dodane žveplove(IV) kisline pred začetkom fermentacije, pojavila časovna zakasnitev začetka procesa fermentacije, ki je odvisno od temperature trajala od 120 ur pri 15 °C, 72 ur pri 18 °C in 36 ur pri 24 °C. Vzrok zato je vpliv dodanega žveplovega dioksida na delovanje mikroorganizma in pa ustvarjeni reduktivni pogoji v sistemu pred začetkom fermentacije.

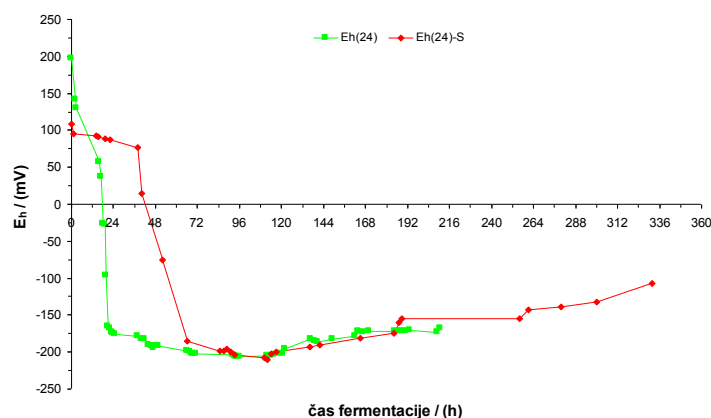
Grafi 33. do 35. prikazujejo vrednosti redoks potencialov med fermentacijami z dodanim žveplovim dioksidom in brez. Fermentacije so v obeh primerih potekale pri enakih pogojih, pri temperaturah 15, 18 in 24 °C. SO₂ podaljšuje lag fazo in s tem začetek procesa anaerobne fermentacije. Z višjo temperaturo se razlike v časovni zakasnitvi manjšajo. Mikroorganizem kompenzira prisotnost inhibicije SO₂ s temperaturo. Pri višji temperaturi je inhibicija metabolizma z dodatkom žveplove(IV) kisline manjša.



Graf 40.: Redoks potencial fermentacije z dodanim SO₂ v primerjavi z redoks potencialom fermentacije brez dodanega SO₂; T=15 °C.



Grafi 41.: Redoks potencial fermentacije z dodanim SO₂ v primerjavi z redoks potencialom fermentacije brez dodanega SO₂; T=18 °C.



Grafi 42.: Redoks potencial fermentacije z dodanim SO₂ v primerjavi z redoks potencialom fermentacije brez dodanega SO₂; T=24 °C.

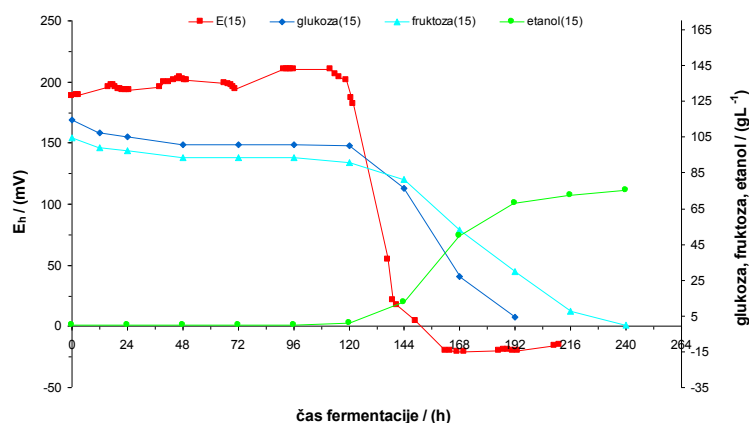
Krivulje redoks potenciala fermentacij z dodanim SO₂ kažejo časovne zakasnitve v začetku anaerobnega dela fermentacije, ki se pričinja z razgradnjo sladkorjev in nastankom etanola in CO₂, kot primarnih produktov fermentacije in nastankom glicerola, kot komponente za izravnavo novonastale razlike redoks potencialov (Graf 40., 41. in 42.).

Inhibicija SO₂ na kvasovke se kaže toliko časa, kolikor je prisotna prosta oblika SO₂. Ko je leta vezana na acetaldehid, kar je značilno prej pri višji fermentacijski temperaturi, se lahko značilno hitro zmanjša tudi vrednost redoks potenciala.

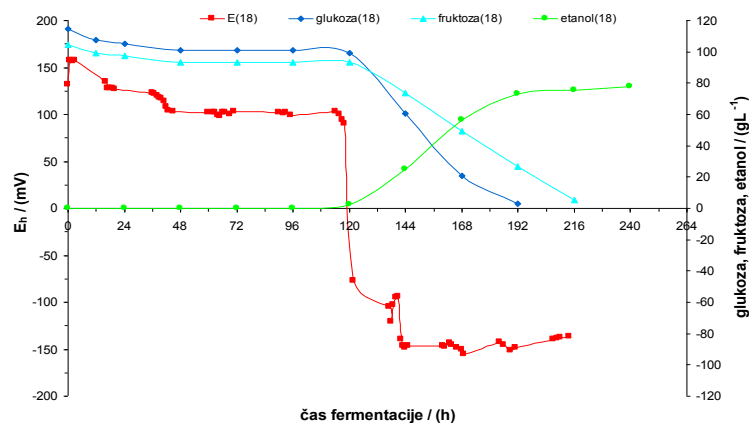
Poraba reducirajočih sladkorjev in nastanek etanola med fermentacijo z dodano žveplovo(IV) kislino sta upočasnjena, v primerjavi s fermentacijo brez žveplanja. Podobno kot pri krivuljah redoks potencialov, se je kljub dodatku žveplove(IV) kisline fermentacija začela hitreje v primeru višje temperature. Kvasovke so inhibicijo rasti in metabolizma z dodatkom kisline kompenzirale s hitrejšim metabolizmom pri višji temperaturi. (Graf 43. – 45.)

V začetni fazi porabe sladkorja, nastajajo le manjše količine etanola, kar kaže na to, da ga v tej fazi kvasovke porabljajo predvsem za rast in razmnoževanje. Ko ni več prisotnega kisika, se začne anaerobni metabolizem in intenzivnejše izločanje etanola. V času, ko so kvasovke pričele metabolizem sladkorjev in je začel nastajati etanol, se je to odražalo na meritvi redoks potenciala, ki je začel močno padati.

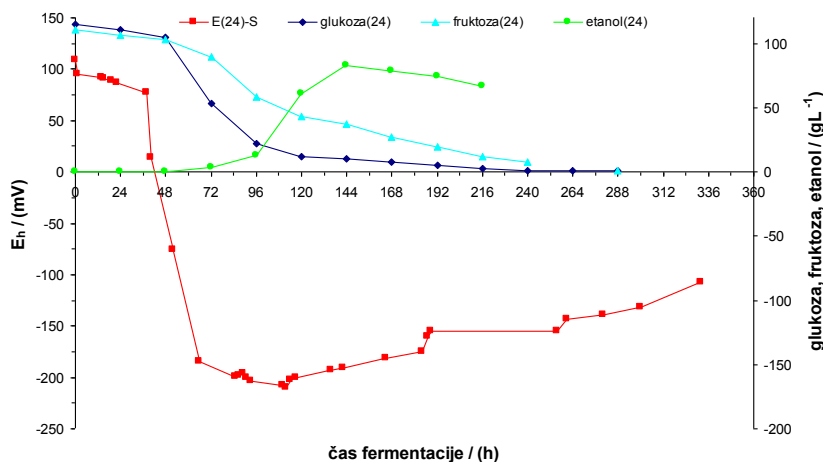
Pri 15 °C se je metabolizem reducirajočih sladkorjev začel po 120 urah od dodatka vcepka v mošt. Istočasno je začel nastajati etanol, kar pomeni, da je proces prešel iz aerobne faze v anaerobno in so kvasovke mehanizem delovanja prilagodile novonastalim pogojem, ki so nastali z dodatkom žveplove(IV) kisline v mošt. Padec redoks potenciala do minimalne vrednosti -15 mV, pri kateri se je ustalil, je bil pokazatelj, da se je presnova sladkorjev zaključila. Etanol je dosegel maksimalno koncentracijo. (Graf 43.) 120-urno, podaljšano lag fazo, sem zaznala tudi pri fermentaciji pri 18 °C, zaradi dodatka žveplove(IV) kisline. Potek procesa presnove sladkorjev in nastanka etanola se odraža na meritvi redoks potenciala in sicer z začetkom padanja in dosego minimuma (Graf 44.). Višja temperatura 24 °C je skrajšala lag fazo na 48 ur. Presnova sladkorjev z nastankom etanola je povzročila padec redoks potenciala po 48 urah iz vrednosti 90 mV na -210 mV (Graf 45.).



Graf 43.: Poraba reducirajočih sladkorjev in nastanek etanola v primerjavi z redoks potencialom pri fermentaciji z dodano žveplove(IV) kislino pri 15 °.

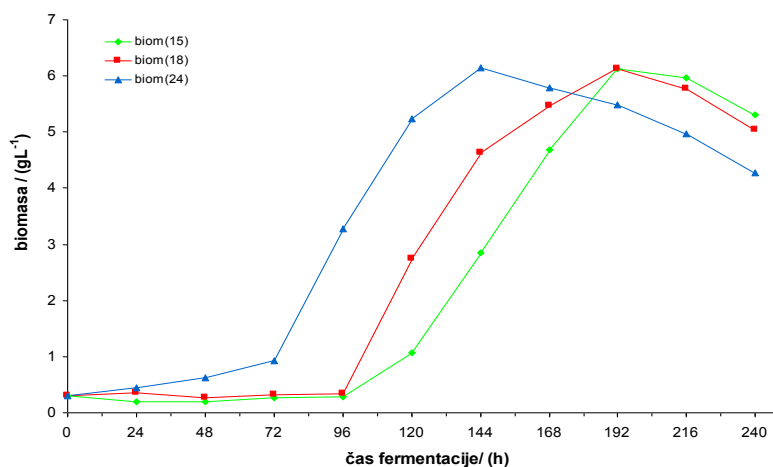


Grafi 44.: Poraba reducirajočih sladkorjev in nastanek etanola v primerjavi z redoks potencialom pri fermentaciji z dodano žveplove(IV) kislino pri 18 °C



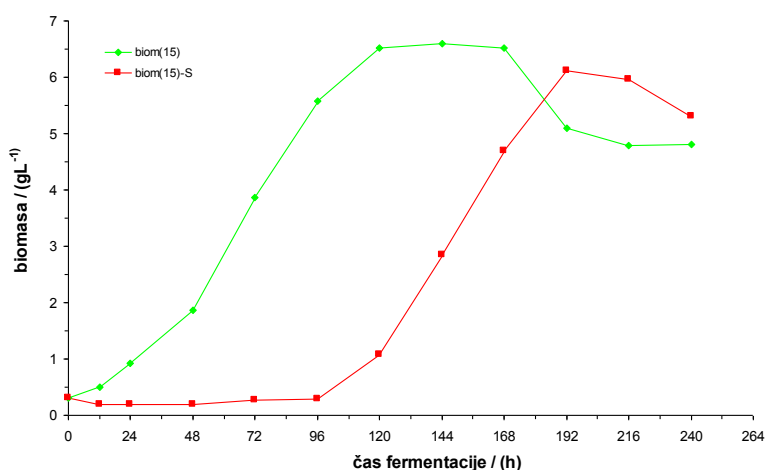
Graf 45.: Poraba reducirajočih sladkorjev in nastanek etanola v primerjavi z redoks potencialom pri fermentaciji z dodano žveplovo(IV) kislino pri 24 °C

Kot sta upočasnjena začetek in potek fermentacije v primeru dodatka žveplove(IV) kisline, je upočasnjena tudi rast mikroorganizma, kar je tudi vzrok za počasnejši potek in posledično poznejši zaključek fermentacije (Graf 46.). Tudi končna koncentracija biomase je zaradi dodatka žveplove(IV) kisline manjša (Grafi 47., 48. in 49.). Upočasnjena rast mikroorganizma se odraža tudi na kasnejšem začetku fermentacije, kot tudi na samem poteku in času trajanja fermentacije, kar je razvidno iz prikaza vrednosti redoks potencialov med fermentacijami. V tem primeru se redoks potencial izkaže kot pokazatelj dogajanja v sistemu in redoks stanja, v katerem se mošt oziroma vino nahajata. Poznavanje vrednosti redoks potenciala omogoča kontrolo poteka procesa in kaže na eventualno zaustavitev ali prekinitev fermentacije. Prevelike količine dodanih žveplovih spojin lahko zaustavijo potek fermentacije ali pa zaradi inhibicije kvasnega delovanja sploh ne pride do začetka fermentacije.

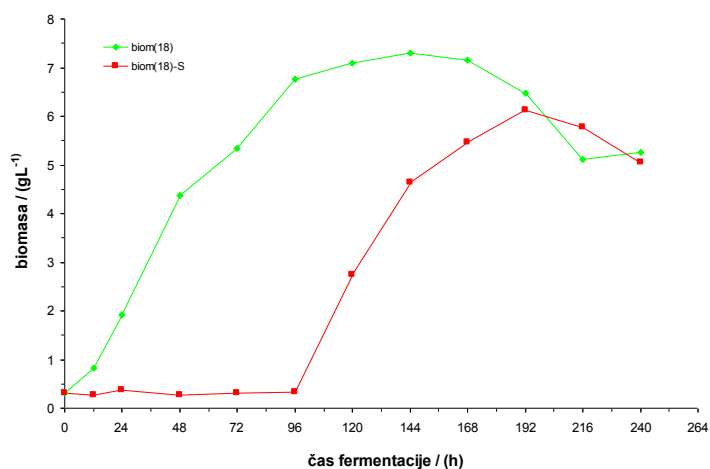


Graf 46.: Rast biomase med fermentacijami z dodano žveplovo(IV) kislino pri temperaturah fermentacije 15, 18 in 24 °C

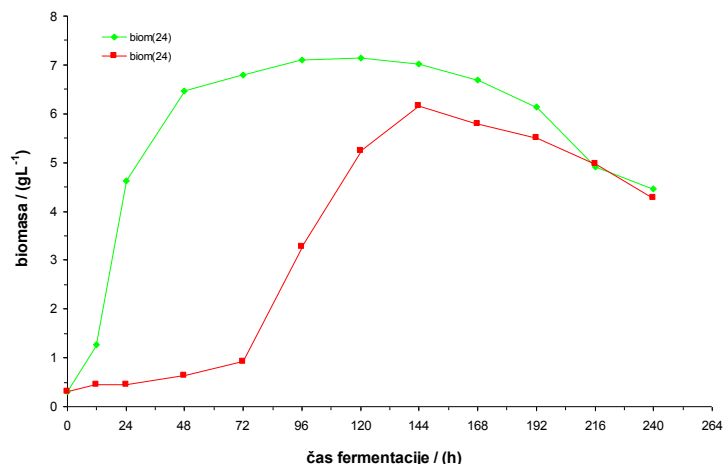
Primerjava rasti biomase med fermentacijami pri 15, 18 in 24 °C z dodano žveplovo(IV) kislino in brez, prikazana na grafih 39., 40. in 41., kaže podaljšanje lag faze ali časovno zakasnitev v začetku rasti in manjšo končno koncentracijo biomase v moštu. Pri 15 °C je pri fermentaciji z dodano kislino lag faza trajala 96 ur in najvišja koncentracija biomase je znašala 6,12 gL⁻¹, medtem ko je v primeru fermentacije brez žveplove(IV) kisline lag faza trajala le 12 ur in je najvišja koncentracija biomase znašala 6,61 gL⁻¹. Pri 18 °C je med fermentacijo z dodano kislino, biomasa začela rasti prav tako po 96 urah in dosegla koncentracijo 6,12 gL⁻¹ po 192 urah. V primerjavi s fermentacijo brez dodane žveplove(IV) kisline, je lag faza trajala 60 ur dlje in dosegla za 1,17 gL⁻¹ nižjo koncentracijo biomase. Tudi pri 24 °C se je, kljub za rast kvasovk ugodni višji temperaturi, lag faza podaljšala za 48 ur, medtem ko je pri fermentaciji brez žveplove kisline sploh nisem zaznala. Končna koncentracija je bila zaradi dodatka žveplove(IV) kisline za 1 gL⁻¹ nižja, kot pri fermentaciji brez SO₂.



Graf 47. : Primerjava rasti biomase pri 15 °C med fermentacijo z in brez dodanega žvepla

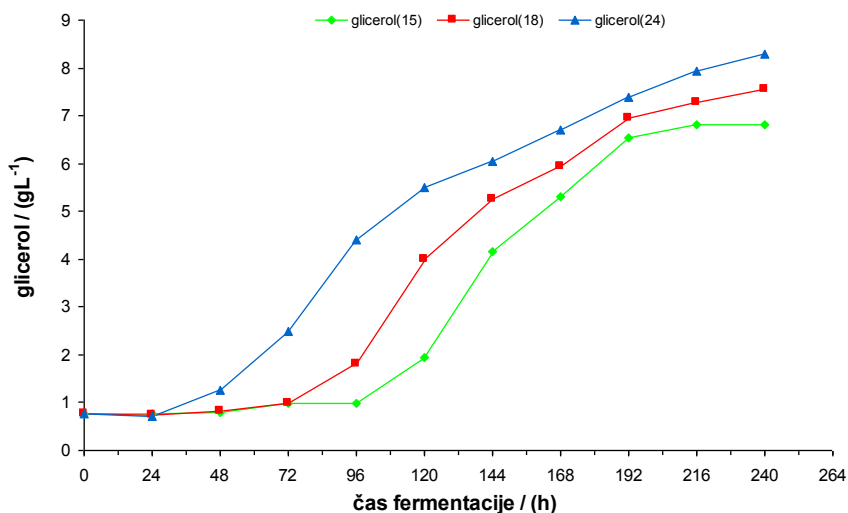


Graf 48.: Primerjava rasti biomase pri 18 °C med fermentacijo z in brez dodanega žvepla



Graf 49. Primerjava rasti biomase pri 24 °C med fermentacijo z in brez dodanega žvepla

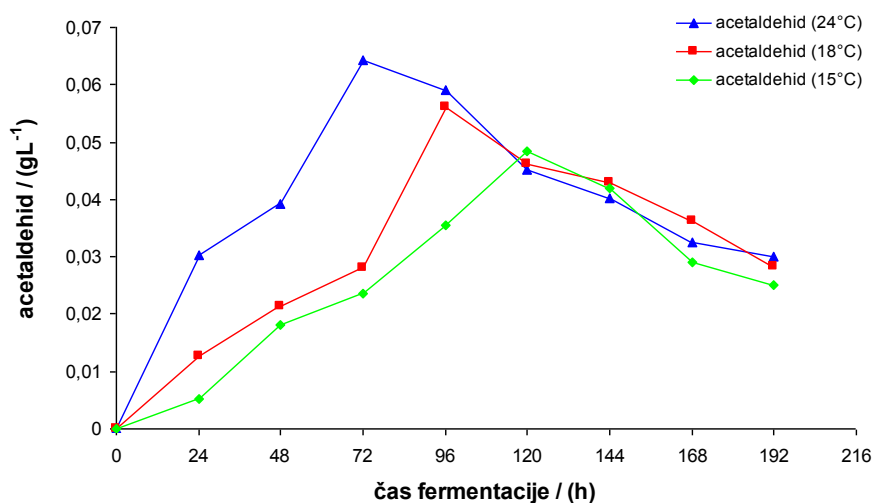
Dodatek SO_2 v mošt pred začetkom fermentacije ima zaradi vpliva na rast in celotni metabolni sistem kvasovk, vpliv na izločanje sekundarnih metabolitov alkoholne fermentacije in s tem tudi na nastanek glicerola. Odvisno od temperature fermentacije, je glicerol začel nastajati po prehodu iz aerobnega v anaerobni del procesa fermentacije, ki se je zaradi daljšega časa prilagajanja kvasovk na dane pogoje v sistemu, zgodil kasneje, kot v primeru fermentacij brez dodanega SO_2 . Pri 15 °C se je izločanje glicerola začelo po 96 urah, kar je 48 ur kasneje, kot v primeru fermentacije brez SO_2 . Pri 18 °C se je glicerol zaradi dodatka SO_2 začel izločati po 72 urah (brez SO_2 že po 36 urah) in pri 24 °C s 24-urno zakasnitvijo v primerjavi z izločanjem glicerola med fermentacijo pri 24 °C brez dodanega SO_2 . Nizka temperatura (15 °C) in dodatek SO_2 sta povzročila 120 urno časovno zakasnitev v začetku anaerobnega dela fermentacije, razgradnje sladkorja in nastanka primarnih in sekundarnih metabolitov (Graf 50.).



Graf 50. Nastanek glicerola pri fermentacijah z dodano žveplovo(IV) kislino pri temperaturah 15, 18 in 24 °C

Glicerol je začel pri fermentacijah z dodanim SO₂, odvisno od temperature fermentacije, nastajati po času 48 (24 °C), 72 (18 °C) ali 96 ur (15 °C), od dodatka kvasovk v mošt. Začetek izločanja glicerola sovпада z začetkom fermentacije, ki jo kaže padec redoks potenciala. Končna koncentracija glicerola, ki v primeru fermentacije pri 15 °C znaša 6,8 gL⁻¹ nastane po 216 urah od začetka procesa fermentacije. V primerjavi s koncentracijo glicerola, ki je nastala pri 15 °C, vendar brez dodatka SO₂, je v tem primeru koncentracija glicerola za 10 % višja. Pri temperaturi 18 °C je kljub dodatku SO₂ glicerol začel nastajati hitreje in sicer po 72 urah. Po 192 urah je koncentracija glicerola pri 18 °C dosegla 7,6 gL⁻¹ (za 6,6 % več, kot brez dodatka SO₂). Povišana temperatura fermentacije na 24 °C je še pospešila nastajanje glicerola in v tem primeru je po 192 urah nastalo 8,1 gL⁻¹ glicerola, kar je 2,5 % več, kot med fermentacijo pri enakih pogojih, brez dodanega SO₂ (Graf 50.)

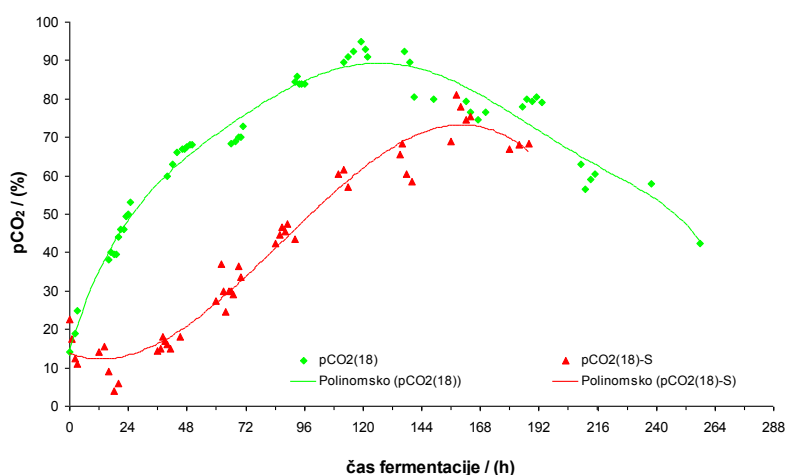
Alkohol dehidrogenaza je encim, ki zmanjšuje koncentracijo acetaldehida, kot intermediata pri nastajanju etanola. Koncentracija in aktivnost encima sta odvisni od vrste kvasovk, od faze rasti kvasovk, stopnje fermentacije in od fermentacijske temperature. Kadar SO₂ inhibira delovanje alkohol dehidrogenaze, koncentracija acetaldehida začne naraščati. Prosti SO₂ se veže z nastalim acetaldehidom in preprečuje regeneracijo NAD⁺ iz NADH preko redukcije acetaldehida do etanola. To vodi do inhibicije v metabolni poti od gliceraldehid-3-fosfata do piruvata, ker je NAD⁺ potreben za potek te reakcije. To lahko vodi do alternativne metabolne poti, po kateri nastaja glicerol iz glicerolfosfata (Frivik in Ebeler, 2003).



Graf 51.: Nastajanje acetaldehida med fermentacijami z dodano žveplovo(IV) kislino pri temperaturah 15, 18 in 24 °.

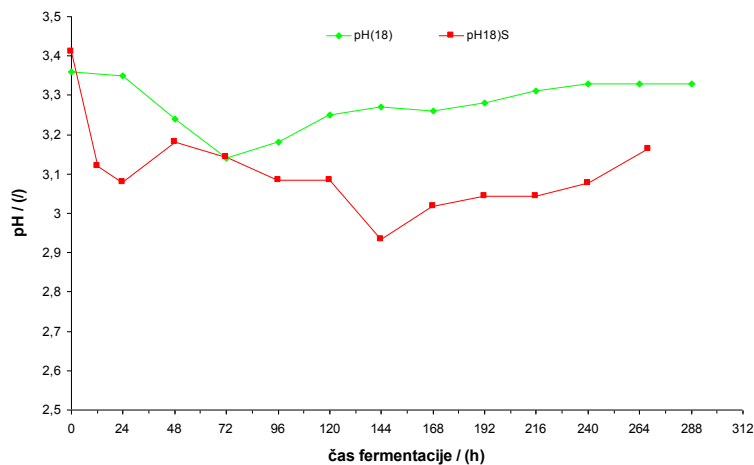
Acetaldehid je zaradi dodane žveplove kisline skladno z zakasnjениm metabolizmom, naraščal počasneje, ampak je dosegel višjo končno vrednost pri posameznih temperaturah fermentacije, kot v primeru fermentacij brez dodane žveplove(IV) kisline. Hiter padec koncentracij acetaldehida posledica nastanka etanola in vezave prostega SO₂ z acetaldehidom. Temperatura nima bistvenega vpliva na končno koncentracijo acetaldehida v vinu. Končne koncentracije acetaldehida v vinu so v primeru dodatka žveplove(IV) kisline v mošt višje in sicer pri 15 °C za 15 mgL⁻¹ in pri 18 °C in 24 °C za 10 mgL⁻¹ (Graf 51.).

Nastajanje CO₂ je med fermentacijo upočasnjeno, kot posledica upočasnjenih metabolnih aktivnosti kvasovk zaradi dodatka SO₂ v mošt. CO₂ je začel nastajati po 48 urah, kar sovpada z začetkom metabolizma sladkorjev in nastanka etanola pri 18 °C. V primerjavi s fermentacijo brez dodanega SO₂ je nastalo za 14 % manj CO₂. Maksimum (81 % nasičenje) je pCO₂ dosegel po 168 urah od začetka fermentacije, kar se je v primeru fermentacije brez SO₂ zgodilo že po 120 urah, pCO₂ pa je ob tem času znašal 95 % nasičenja (Graf 52.).



Graf 52.: Nastanek CO₂ med fermentacijo brez dodanega SO₂ in z dodanim SO₂ (T = 18 °C)

Nižji pH v primeru fermentacije z dodano žveplovo(IV) kislino pripisujem prisotnosti žveplove(IV) kisline v moštu, ki je že v začetni fazi znižala pH vrednost mošta. Opazila sem, da je zaradi prisotnosti žveplove(IV) kisline pH že takoj v začetku procesa močno padel in prvi minimum pH 3,08 dosegel po 24 urah, v primerjavi s prvim minimumom pH fermentacije brez SO₂ pri enaki temperaturi (T = 18 °C), ki je znašal 3,16 in je bil dosežen po 72 urah. Nadaljnji potek krivulje je odvisen od metabolizma organskih kislin in je odraz sprememb koncentracije vinske, jabolčne, citronske in jantarne kisline. Drugi minimum pH je znašal 2,92 in je bil izmerjen po 144 urah. Končna vrednost pH pri fermentaciji z SO₂ je znašala 3,16 in pri fermentaciji brez SO₂ 3,33. (Graf 53.)

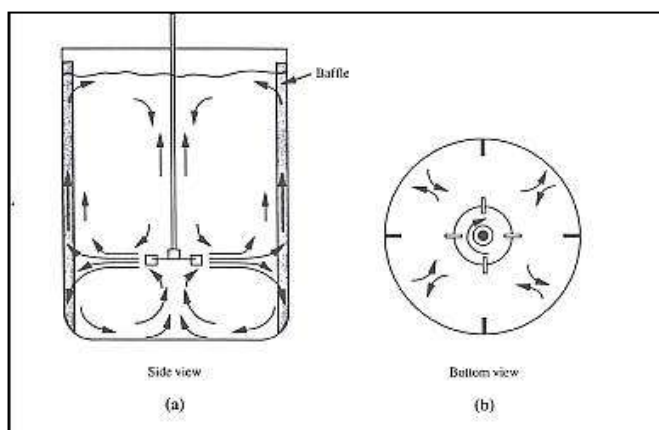


Graf 53.: Primerjava pH med fermentacijo z in brez dodane žveplove (IV) kisline pri 18 °C.

4.5. VPLIV MEŠANJA IN TEMPERATURNE KONTROLE NA POTEK FERMENTACIJSKEGA PROCESA

V tretjem sklopu eksperimentov sem spremljala potek vinske fermentacije brez SO_2 , pri kateri sem uporabila mešanje v sistemu in temperaturo vzdrževala na konstantni temperaturi $18\text{ }^\circ\text{C}$ ter ga primerjala s potekom vinske fermentacije v sistemu brez uporabljenega mešanja in brez temperaturne kontrole. Vsi eksperimenti so potekali na 10 L sistemih.

Pri kvasnih fermentacijah namestimo prvo turbino tako visoko (druga četrtina višine tekočine) in mešamo s takimi vrtljaji, da tokovnice ne dosežejo dna posode. Pri STC konfiguraciji posode je to 100 vrtljajev na minuto. S tem omogočimo, da se slabe kvasovke in nečistoče, ki jih nismo odstranili s filtriranjem, lahko usedejo in jih nato že med samo fermentacijo odstranimo skozi izpust na dnu posode.



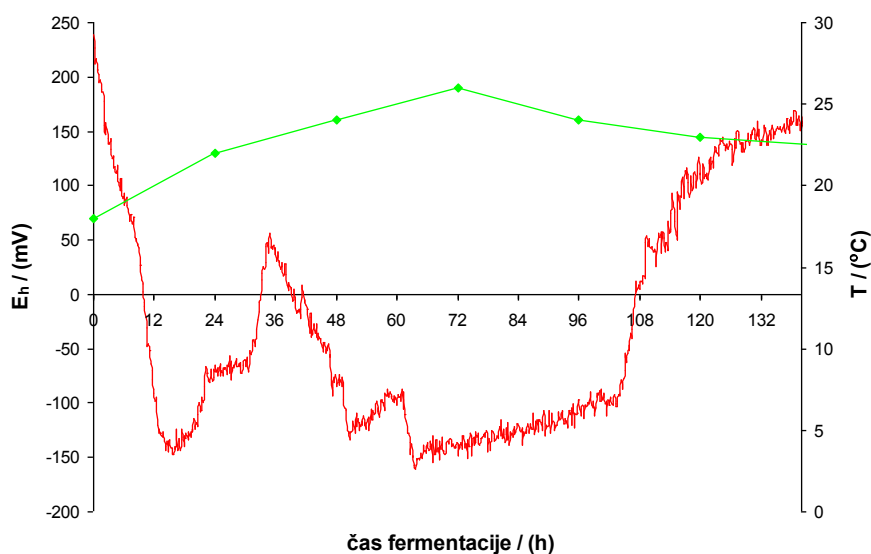
Slika 16: Vzorci tokovnic pri radialnem mešalu z lopaticami v STC posodi z ovirami (Doran, 1995)

Meritve med fermentacijo brez mešanja sem izvajala pri enakih zunanjih pogojih, brez temperaturne kontrole, pri sobni temperaturi, kar je v bistvu simulacija procesa v pilotnem merilu, v vrelnih posodah vinskih kleti.

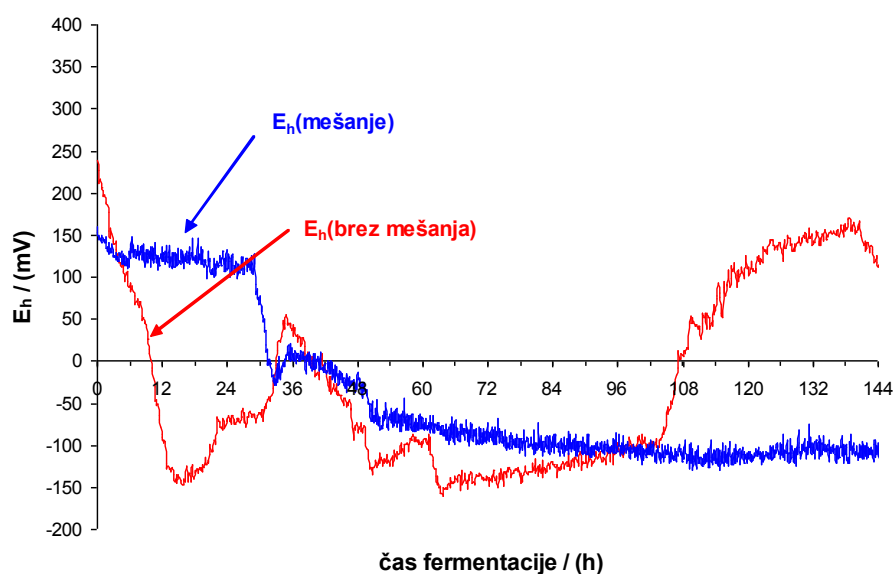
Začetni redoks potencial je v primeru fermentacije brez mešanja in temperaturne regulacije znašal 240 mV , kar je v primerjavi z redoks potencialom fermentacije z mešanjem za 90 mV več. Do te razlike začetnih redoks potencialov pride zaradi prisotnosti kisika v primeru fermentacije brez mešanja, kjer površine nad tekočim substratom nismo preprihovali s plinastim dušikom in zaradi tega mošt prišel v stik z večjo količino kisika. Takoj po dodatku vcepka v mošt je redoks potencial padel, kar kaže na to, da se je fermentacija hitro začela. Nekaj ur po dodatku vcepka v mošt, je fermentacija stekla. (Graf 54.). Redoks potencial je začel padati po 6 urah in po 12 urah dosegel svoj prvi minimum pri -140 mV . Po hitrem padcu redoks potenciala, je sledil nenadni dvig redoks potenciala po 18 urah, ki je dosegel vrednost 40 mV po 36 urah. Predvidevam, da pride do dviga potenciala zaradi intenzivnega sproščanja CO_2 v času burne fermentacije in s tem do nekontroliranega mešanja – naravne konvekcije v sistemu, ki se odraža na signalu redoks potencial meritve. V tem času je koncentracija acetaldehida dosegla maksimum in nato začela padati, kar pomeni, da se je

aktiviral encim alkoholdehidrogenaza, ki je nastali acetaldehid začel pretvarjati v etanol (Graf 56.). Po drugem maksimumu redoks potenciala, je sledil ponovni padec, ki je po 65 urah dosegel drugi minimum pri -160 mV. Razgradnja sladkorjev, ki pomeni zaključek procesa fermentacije, se je zaključila po 96 urah, etanol je maksimalno koncentracijo dosegel po 112 urah, vendar je v času od 90. do 118. ure koncentracija nartasla le še za 5 gL⁻¹ etanola (Graf 57. in 58.).

Temperatura se je zaradi eksotermne reakcije pretvorbe sladkorjev v etanol med procesom zvišala iz začetnih 18 °C na 26 °C po 72 urah fermentacije in potem ponovno padla na 22 °C do konca procesa (Graf 54.).



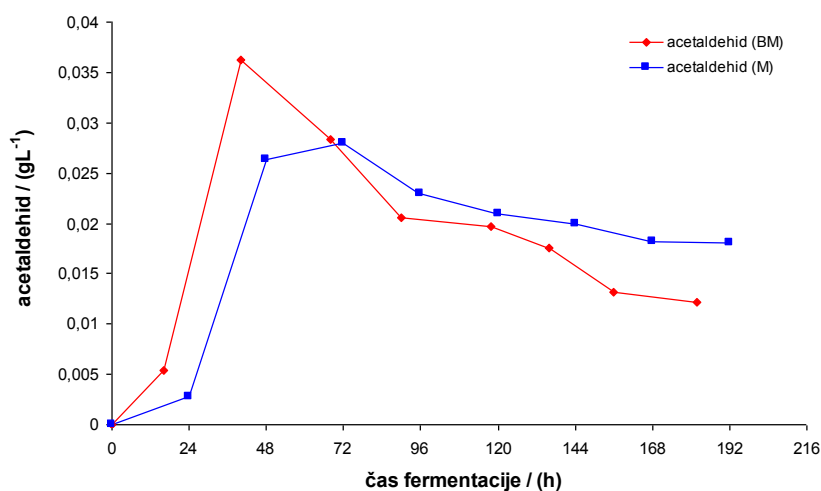
Graf 54.: On-line redoks potencial fermentacije brez mešanja in temperaturne regulacije ter temperaturni profil fermentacije.



Graf 55.: Redoks potenciala fermentacije pri 18 °C z mešanjem in redoks potencial fermentacije brez mešanja in temperaturne regulacije.

Krivulji redoks potenciala na grafu 48. prikazujeta vrednosti *on-line* meritve med fermentacijo pri 18 °C z mešanjem in med fermentacijo brez mešanja in temperaturne regulacije. Krivulja redoks potenciala fermentacije z mešanjem sledi 4 fazam, opisanih v poglavju 4.1. V prvi fazi procesa, ki je trajala 30 ur je vrednost redoks potenciala padla iz začetne vrednosti 150 mV in ostala za čas 30 ur konstantna, oziroma je nihala med 120 in 130 mV. Po prehodu v anaerobno fazo in začetku presnove sladkorjev, redoks potencial strmo pade in 36 ur po začetku procesa doseže prvi minimum – 25 mV. Sledi dvig redoks potenciala na 10 mV v času dveh ur in ponoven padec do drugega minimuma redoks potenciala pri – 120 mV po času 120 ur, ki pa pomeni zaključek razgradnje sladkorjev in s tem konca procesa fermentacije (Graf 55.). V času dviga redoks potenciala na 10 mV od 30. do 40. ure od začetka fermentacije, je koncentracija acetaldehida intenzivno naraščala in dosegla maksimalno koncentracijo po 48 urah. Po tem času je koncentracija acetaldehida začela padati, kar pomeni, da se je acetaldehid začel s pomočjo encima alkoholdehidrogenaza pretvarjati v etanol (Graf 56.)

Zaradi hitrejšega in intenzivnejšega presnavljanja sladkorjev, ki predstavljajo glavni substrat za nastanek acetaldehida, med fermentacijo brez mešanja in temperaturne kontrole, je v tem primeru tudi acetaldehid začel nastajati hitreje, kot med fermentacijo z mešanjem in temperaturno kontrolo. Po 40 urah je dosegel koncentracijo 36 mgL⁻¹. Med fermentacijo z mešanjem, je koncentracija acetaldehida narasla v 72 urah do vrednosti 28 mgL⁻¹. Intenzivnejše nastajanje etanola v obeh primerih sovпада z zmanjševanjem koncentracije acetaldehida, kar pomeni, da se je ob aktivaciji encima alkoholdehidrogenaza, acetaldehid začel pretvarjati v etanol. Končna koncentracija acetaldehida med fermentacijo brez mešanja je bila 12 mgL⁻¹, med fermentacijo z mešanjem pa 18 mgL⁻¹ (Graf 56.).



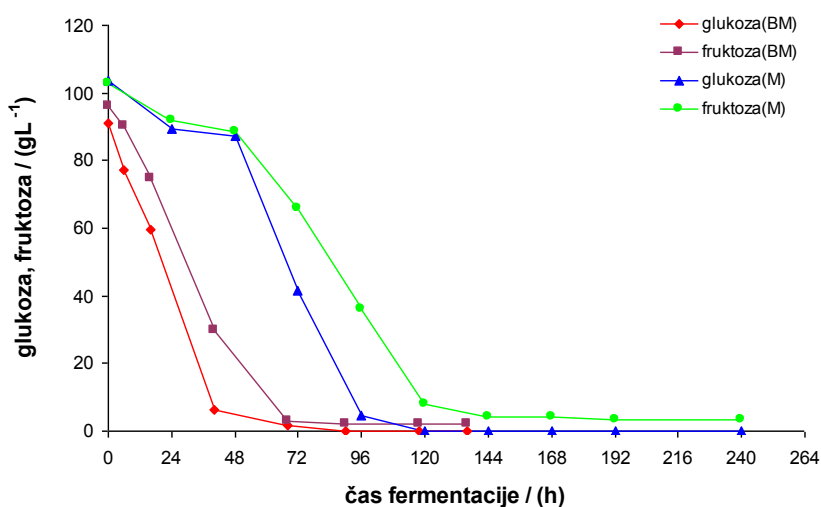
Graf 56.: Nastajanje acetaldehida med fermentacijo z mešanjem in brez mešanja

V primerjavi z redoks potencialom fermentacije z mešanjem in kontrolo temperature na 18 °C, kjer je redoks potencial začel padati po 36 urah od začetka procesa, je redoks potencial fermentacij brez mešanja in temperaturne kontrole začel padati že po 6 urah od dodatka kvasovk v mošt. Anaerobna fermentacija se je pričela veliko hitreje, na kar kaže tudi hitrejša poraba reducirajočih sladkorjev in nastanek etanola (Graf 57. in 58.). Prva faza, v kateri kvasovke še porabljajo prisoten kisik za svoje razmnoževanje in rast, je v primeru

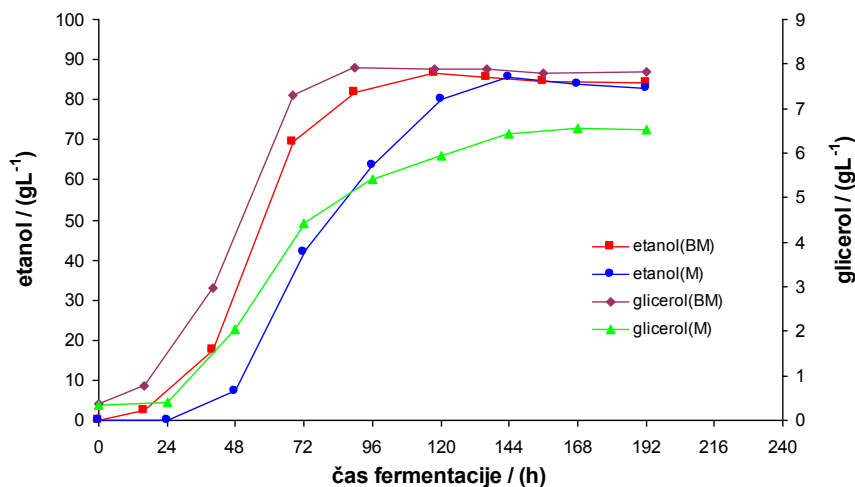
fermentacije brez mešanja veliko krajša in traja le do 6 ur. Sklepam, da so bili pogoji za rast in razmnoževanje kvasovk v tem primeru ugodnejši, zato so se kvasovke razmnoževale hitreje in intenzivneje razgrajevale sladkor v procesu anaerobne fermentacije. Ker je v tem primeru fermentacija potekala brez temperaturne regulacije, se je temperatura mošta med fermentacijo dvignila tudi do 26 °C, kar je ugodno vplivalo na rast kvasovk, kot tudi na povečanje hitrosti metabolnih aktivnosti.

Grafa 57. in 58. prikazujeta primerjavo med razgradnjo glukoze in fruktoze ter nastanek etanola in glicerola med fermentacijami brez mešanja (BM) in temperaturne kontrole in med fermentacijo z mešanjem (M) in kontrolo temperature na 18 °C. Poraba sladkorja se prične približno istočasno, vendar hitreje poteče fermentacija sladkorjev v primeru, ko nisem uporabila mešanja in temperaturne kontrole med fermentacijo. Pri fermentaciji z mešanjem pride do krajšega zastoja, oziroma motnje v razgradnji sladkorjev v času med 24. in 48. uro, ko je koncentracija sladkorjev padla le za 5 gL⁻¹. V primeru fermentacije brez mešanja in temperaturne regulacije, se je zaradi eksotermnosti reakcij glikolize v začetku temperatura dvignila do 26 °C, kar je povzročilo hitrejšo rast kvasovk in s tem tudi hitrejši kvasni metabolizem in razgradnjo sladkorjev. Razgradnja glukoze in fruktoze je bila zaključena po 96 urah, medtem ko je bila v primeru fermentacije pri konstantni temperaturi 18 °C in uporabljenem mešanju razgradnja zaključena po 120 urah. V obeh primerih je fermentacija potekla do konca.

Etanol in glicerol sta nastajala istočasno v obeh primerih. Naraščanje koncentracije obeh se je pričelo po 24 urah od začetka fermentacije. Naraščanje je potekalo počasneje v primeru fermentacije z mešanjem, ko so bile tudi maksimalne koncentracije etanola in glicerola manjše, kot med fermentacijo brez mešanja. Med fermentacijo brez mešanja je nastalo 86,5 gL⁻¹ etanola, med fermentacijo z mešanjem pa 82,6 gL⁻¹ etanola. Podobno je tudi v primeru glicerola, kjer je koncentracija glicerola višja v primeru fermentacije brez mešanja dosegla 7,9 gL⁻¹, med fermentacijo z mešanjem 6,5 gL⁻¹ glicerola. Tudi tu gre za vpliv povišane temperature v začetni fazi fermentacije. Ta dvig temperature je povzročil hitrejši začetek kvasnega metabolizma, ki se je odrazil v padcu redoks potenciala v začetni fazi fermentacije, kar pa je vplivalo na povečano izločanje glicerola (Graf 58.).

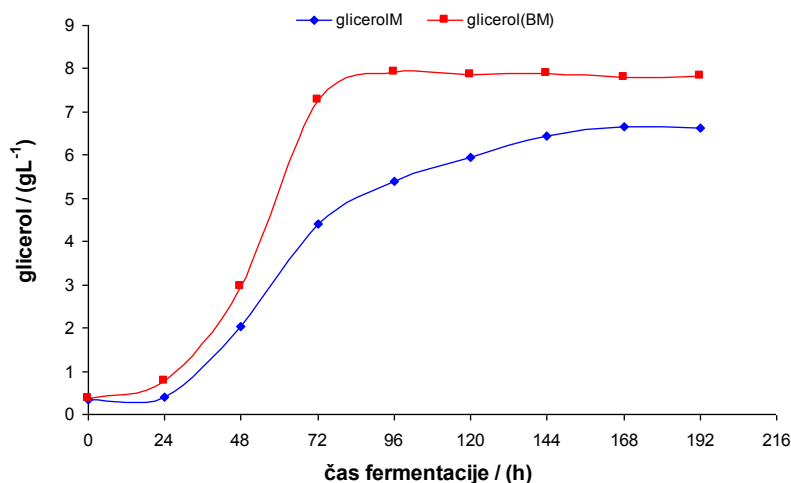


Graf 57.: Poraba glukoze in fruktoza med fermentacijo z mešanjem (M) in temperaturno kontrolo pri 18 °C in brez mešanja (BM) in temperaturne kontrole



Graf 58.: Nastajanje etanola in glicerola med fermentacijo z mešanjem (M) in brez mešanja (BM)

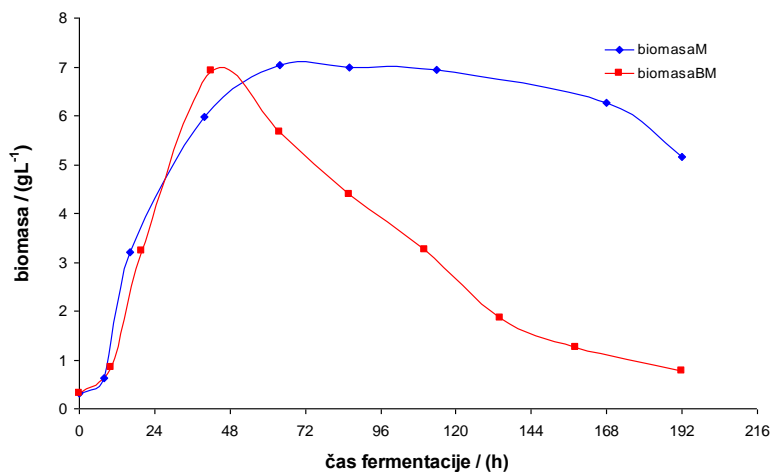
Padec redoks potenciala je bil v primeru obeh fermentacij uravnotežen z nastankom glicerola. Glicerol je med fermentacijo brez mešanja začel nastajati po 24 urah, kot tudi v primeru fermentacije z mešanjem, le da je v tem primeru glicerol nastajal počasneje. Končna koncentracija glicerola $6,6 \text{ gL}^{-1}$ je bila pri fermentaciji z mešanjem dosežena po 168 urah, v primeru fermentacije brez mešanja pa je po 96 urah nastalo $7,9 \text{ gL}^{-1}$ glicerola (Graf 59.).



Graf 59.: Nastajanje glicerola med fermentacijama z mešanjem in brez mešanja.

Graf 60. prikazuje primerjavo med rastnimi krivuljami biomase fermentacije brez temperature kontrole in brez mešanja (BM) ter krivuljo rasti biomase med fermentacijo z mešanjem (M) pri $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Po prehodu v eksponencialno fazo rasti so kvasovke hitro rasle in se razmnoževale ter v primeru fermentacije brez mešanja dosegle maksimalno koncentracijo $6,9 \text{ gL}^{-1}$ po 48 urah od dodatka vcepka v mošt. Takoj po doseženem maksimumu, je začela koncentracija biomase padati. Ker je fermentacija potekala brez mešanja, se je hitreje začel proces usedanja kvasovk na dno posode. V času, ko se tudi CO_2 več ni izločal intenzivno in ni potekala naravna konvekcija s CO_2 , se je pričel proces intenzivnega usedanja kvasovk na dno

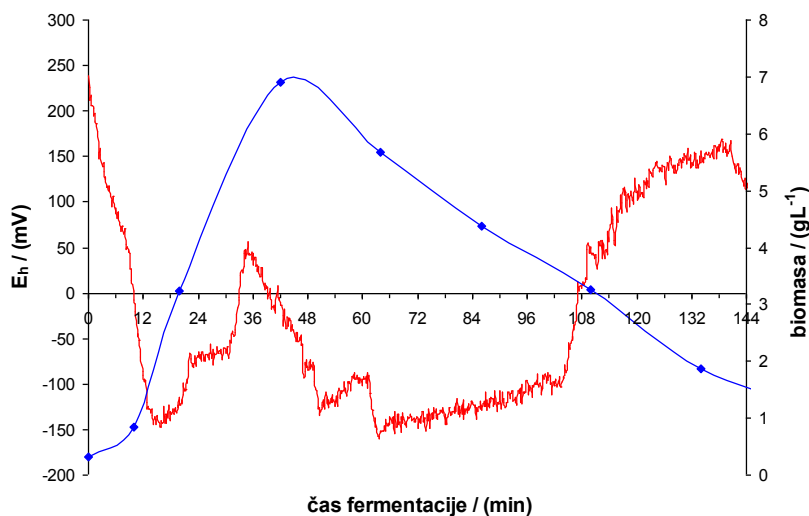
reaktorja. Smatram, da se je zaradi tega tudi fermentacija sladkorjev začela zaključevati hitreje, kot pa v primeru fermentacije z mešanjem. Po 192 urah je koncentracija kvasovk, pri fermentaciji brez mešanja, padla praktično na vrednost nič. Hitreje se je pričel proces avtolize ali encimske razgradnje kvasnih celic, ki nastopi takoj po odmrtnju celic. V primeru fermentacije z mešanjem, je ves čas potekala homogenizacija kvasnih celic in zato se je koncentracije biomase zmanjševala počasneje. V stacionarno fazo so kvasovke prešle po 72 urah in dosegle maksimalno koncentracijo $7,0 \text{ gL}^{-1}$. Po 120 urah je koncentracija kvasovk počasi začela padati in po 240 urah je znašala $5,2 \text{ gL}^{-1}$.



Graf 60.: Biomasa med fermentacijo brez mešanja (BM) in temperaturne kontrole in z mešanjem (M)

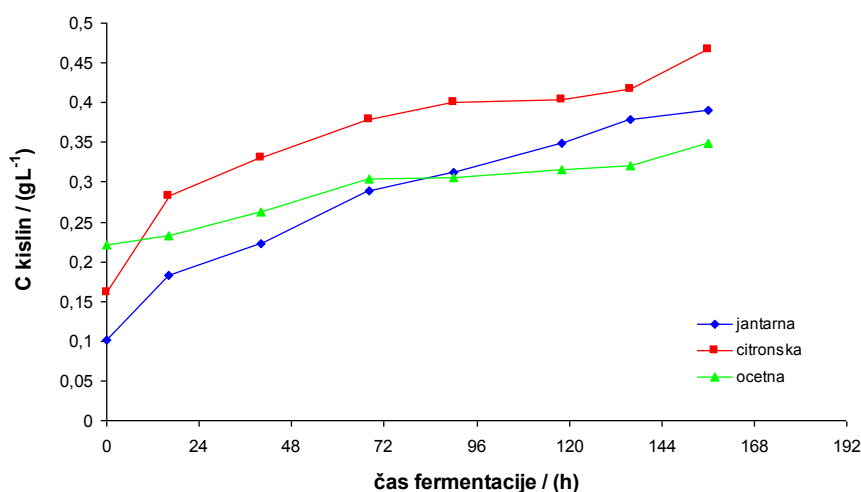
Če primerjam rast biomase med fermentacijo brez mešanja in temperaturne kontrole z rastjo biomase med fermentacijo z mešanjem, lahko opazim, da je potek naraščanja biomase enak in sledi eksponencialni rasti ter se prične ob približno enakem času. Lag faza je bila praktično nezaznavno kratka in je v obeh primerih trajala 8 – 10 ur, eksponencialna faza rasti je trajala 48 do 72 ur, ko je bila v obeh primerih dosežena maksimalna koncentracije. Po 48 urah je začela koncentracija biomase v primeru fermentacij brez mešanja, padati veliko hitreje in bolj intenzivno, kot v primeru fermentacije z mešanjem.

Da bi ovrednotila povezavo med rasto krivuljo biomase in redoks potencialom sem primerjala rast biomase, posledica katere je tudi intenziteta fermentativne razgradnje sladkorjev in krivuljo redoks potenciala. Opazila sem povezavo med potekom redoks potenciala in raste krivulje kvasovk fermentacije brez mešanja in temperaturne kontrole. Rast biomase se prične takoj po dodatku kvasovk v fermentacijski medij in steče brez zaznavne lag faze. V tem času je redoks potencial v fazi počasnega padanja, oziroma ostaja konstanten. Eksponencialna faza rasti traja med intenzivnim padanjem redoks potenciala in doseže maksimum v času, ko je redoks potencial dosegel drugi maksimum. Po tem drugem maksimumu redoks potenciala, koncentracija biomase začne padati in kvasovke brez zaznavne stacionarne faze preidejo v fazo odmiranja in avtolize. V primeru fermentacije brez mešanja, se je razgradnja sladkorjev začela takoj po dodatku kvasovk v mošt in je bila končana po času 72 ur, ko je ostalo še $1,8 \text{ gL}^{-1}$ glukoze in $2,8 \text{ gL}^{-1}$ fruktoze. V istem času je nastala maksimalna koncentracija etanola $86,5 \text{ gL}^{-1}$ in glicerola $7,9 \text{ gL}^{-1}$. Redoks potencial je po 72 urah dosegel svoj minimum pri -150 mV in po tem času začel naraščati, kar je bil znak zaključka reduktivnih procesov in izločanja CO_2 in nastopa oksidativnih procesov v fazi zorenja vina (Graf 61.)



Graf 61.: Rastna krivulja biomase in redoks potencial fermentacije brez mešanja

Zaradi ovrednotenja vpliva mešanja na kvasni metabolizem kislin, sem med procesom fermentacije merila še koncentracije jantarne, citronske (kislini TCA cikla) in oetne kisline. Jantarna kislina je začela nastajati v eksponencialni fazi, kar je povezano z vstopom nastalega piruvata v cikel trikarboksilnih kislin, v katerem nastaja jantarna kislina. Za to pot je potrebna prisotnost manjših količin kisika, ki so v tej fazi še prisotne, saj se ves kisik še ni vezal s sestavinami mošta in ni bil izpodrinjen iz sistema, zaradi nastanka CO_2 . Po 144 urah je nastalo $1,04 \text{ gL}^{-1}$ jantarne kisline. Večje količine hlapnih kislin nastajajo med alkoholnim vrenjem pri višjih temperaturah, pri dostopu zraka, pomanjkanju nehlapnih kislin, preveč zavlečenemu vrenju in velikemu odstotku sladkorja (Judež, 1981). V primeru fermentacije brez mešanja in temperaturne kontrole je prišlo zaradi eksotermnosti reakcije do dviga temperature v eksponencialni fazi rasti kvasovk, ko so se kvasovke nahajale v fazi intenzivnega vrenja. Povišana temperatura med fermentacijo je bila vzrok za povišanje koncentracij oetne kisline (Graf 62.).



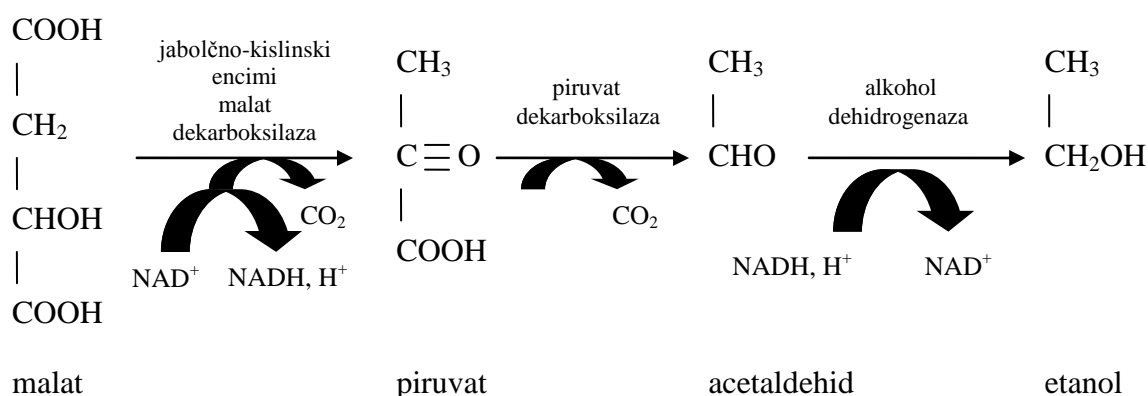
Graf 62.: Nastajanje jantarne, citronske in oetne kisline med fermentacijo brez mešanja

Proporcionalno z nastajanjem etanola, nastaja v določenem obsegu tudi očetna kislina. Povišana temperatura, ki vpliva na povečanje koncentracije etanola, torej vpliva tudi na povečevanje koncentracije očetne kisline v vinu. Acetaldehid je prekursor za nastanek etanola, kot tudi za nastanek očetne kisline. Večja kot je koncentracija acetaldehida v moštu, manj je očetne kisline.

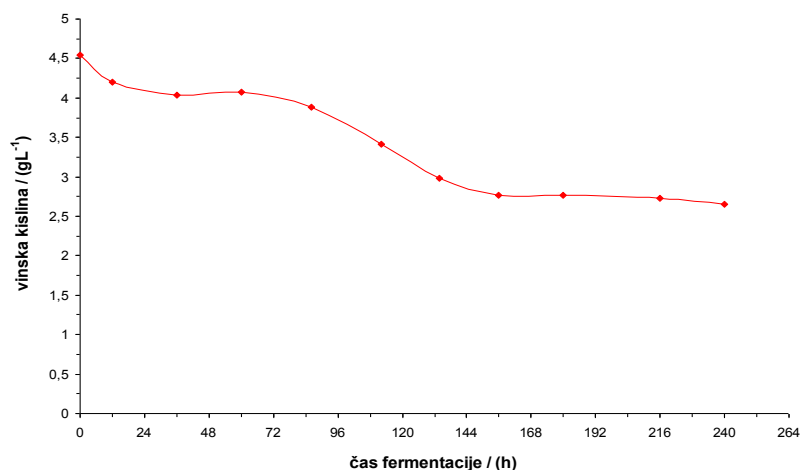
Študij zmanjšanja vinske in jabolčne kisline je pokazal, da se je koncentracija vinske kisline med fermentacijami brez mešanja in temperaturne kontrole zmanjšala za skoraj 40 %, glede na začetno koncentracijo v moštu. Končna koncentracija vinske kisline v vinu je znašala $2,6 \text{ gL}^{-1}$ (Graf 63.).

Koncentracija jabolčne kisline je bila ob koncu fermentacije $2,1 \text{ gL}^{-1}$. V času fermentacije se je del jabolčne kisline pretvoril v jantarno kislino, del pa se je po biološki poti razgradil do mlečne kisline. Proces poteka po končanem alkoholnem vrenju, ko mlečnokislinske bakterije v nepretočenem in nežveplanem vinu pretvarjajo jabolčno kislino v mlečno kislino – malolaktična fermentacija. To je v primeru pridelave belih vin neželen proces in ga preprečimo tako, da vino pretočimo, žveplamo ali znižamo temperaturo po končanem alkoholnem vrenju (Graf 64.).

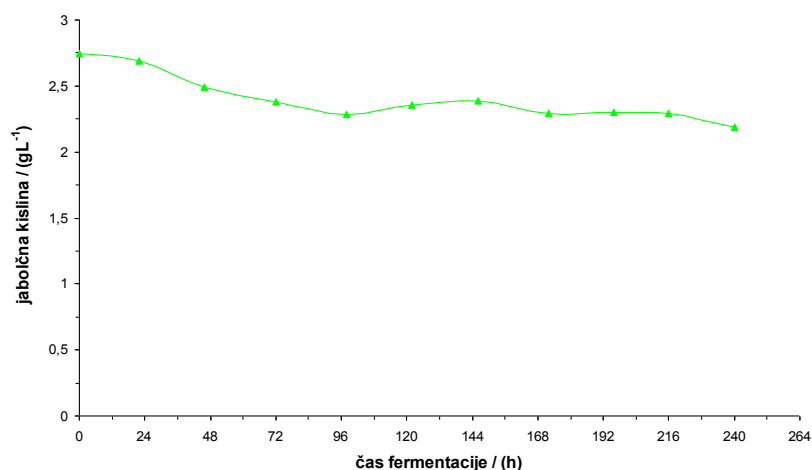
Do procesa malolaktične fermentacije v primeru eksperimentov, ki so bili predmet mojega raziskovalnega dela, ni prišlo, saj sem vino takoj po končani fermentaciji pretočila. Koncentracija jabolčne kisline je v primerih fermentacij brez mešanja in temperaturne kontrole padla za 23 do 26 % v času trajanja alkoholne fermentacije. Pirogrozdna kislina, ki med transformacijo jabolčne kisline nastaja, ob prisotnosti manjših količin kisika vstopa v cikel trikarboksilnih kislin, v katerem nastajata citronska in jantarna kislina ali pa se dekarboksilira v acetaldehid, ta pa se reducira do etanola (Slika 17.). Pri tem sodelujejo encimi jabolčno kislinske transformacije, ki so odgovorni za pretvorbo jabolčne kisline v pirogrozdno kislino (Fuck in Radler, 1972).



Slika 17.: Razgradnja jabolčne kisline s kvasovkami med alkoholno fermentacijo (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 2000)

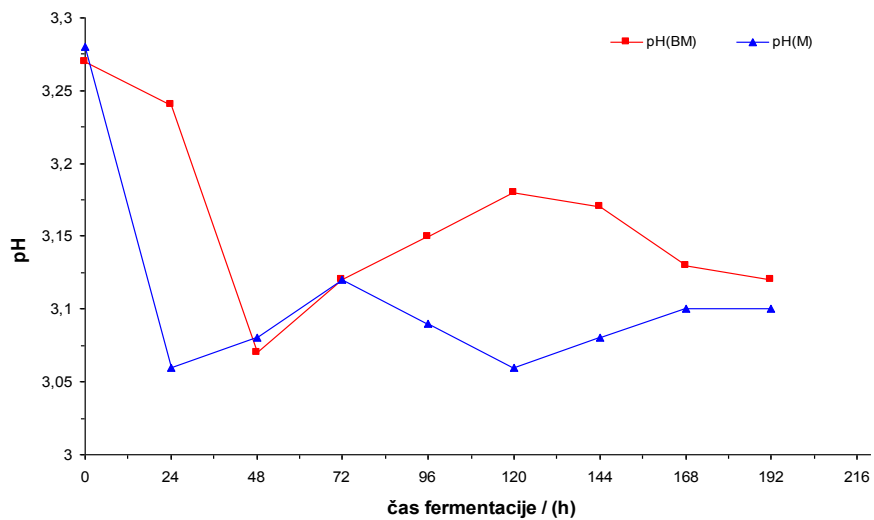


Grafi 63: Vinska kislina med fermentacijo brez mešanja in temperaturne kontrole



Graf 64: Jabolčna kislina med fermentacijo brez mešanja in temperaturne kontrole

pH vrednost je v začetni fazi fermentacije močno padla v obeh primerih fermentacij, tako fermentacije z mešanjem, kot tudi brez mešanja. V primeru fermentacije z mešanjem in temperaturno kontrolo je pH padel časovno hitreje, kot v primeru brez mešanja. Ta padec pH se je zgodil zaradi nastanka kislin v začetni fazi fermentacije (TCA cikel), ko nastajajo jantarna, citronska in druge kisline cikla trikarboksilnih kislin. V drugi fazi pH v obeh primerih naraste in sicer se v primeru fermentacije z mešanjem dvigne iz 3,05 na 3,12 in v primeru brez mešanja iz 3,06 na 3,18. Zaradi mešanja je izločanje vinskega kamna potekalo nekoliko počasneje in se je to odražalo na manjšem dvigu vrednosti pH, med tem, ko je v primeru fermentacije brez mešanja poteklo intenzivnejše izločanje vinskega kamna in se je pH zaradi tega dvignil do višje vrednosti. Po tem dvigu je pH v obeh primerih padel in dosegel končne vrednosti 3,12 v primeru brez mešanja in 3,10 v primeru z mešanjem. Skupni padec pH med celotno fermentacijo je znašal 4,5 oziroma 5 %. (Graf 65.)



Graf 65.: pH vrednosti med fermentacijo z mešanjem (M) in temperaturno kontrolo pri 18 °C in brez mešanja in temperaturne kontrole (BM).

4.6. VPLIV TEMPERATURNIH ŠOKOV NA POTEK FERMENTACIJSKEGA PROCESA IN NASTANEK GLICEROLA

Ker sem v okviru opravljenih eksperimentov ugotovila zanimivo povezavo med povišano temperaturo, padcem redoks potenciala, ki sovпада s hitrejšim začetkom kvasnega metabolizma sladkorjev pri višji temperaturi in izločanjem glicerola, kot posledico uravnavanja nastale redoks razlike v sistemu, sem v naslednjem delu študirala vpliv hitrih sprememb temperature v zgodnji eksponencialni fazi rasti, ki vplivajo na spremembe v metabolizmu in na povečano sintezo glicerola.

Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* izloča glicerol kot osmoregulator, s katerim regulira spremembo redoks potenciala pri zelo nizkih razpoložljivih koncentracijah kisika (Costenoble *in sod.*, 2000). Znano je tudi, da kvasovka *S. cerevisiae* proizvaja večje količine glicerola, kadar je izpostavljena različnim šokom iz okolja ali veliki koncentraciji sladkorja v okoliškem mediju. Aktivnost encima glicerol-3-fosfatdehidrogenaze (GPDH), izpostavljenega temperaturnemu šoku, naraste za 1,15- do 1,25-krat, v primerjavi z aktivnostjo encima, ki ni bil izpostavljen temperaturnemu šoku (Omori *in sod.*, 1996).

Rezultati eksperimentov, izvedenih v nizu fermentacij pri različnih temperaturah, ki sem jih opisala v poglavju 4.1., so pokazali, da je količina nastalega glicerola sorazmerna z zvišanjem fermentacijske temperature in z nižjo končno vrednostjo redoks potenciala po končani fermentaciji. Ob višji temperaturi fermentacije in večji spremembi med začetno in končno vrednostjo redoks potenciala, kvasovke izločajo večjo količino glicerola in tako uravnavajo nastalo razliko redoks ravnotežja v sistemu (Kukec *in sod.*, 2003).

Potek dela je obsegal tri sklope eksperimentov. V prvem sklopu sem izvedla serijo eksperimentov pri konstantni temperaturi 18 °C. Pripravila sem 10 litrov vinskega mošta sorte sauvignon, ki sem ga termostatirala na 18 °C in mešala z lopatičastim Rustonovim mešalom z intenzivnostjo mešanja 100 obr./min ob preprihovanju površine nad tekočim substratom s plinastim dušikom. Mošta pred tem nisem žveplala. Tako kondicioniranemu moštu sem dodala vcepek 0,3 gL⁻¹ vinskih kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* (Uvaferm SLO), ki sem jih predhodno rehidrirala v grozdnem moštu sorte sauvignon, pri temperaturi 25 – 30 °C. Nadaljni proces fermentacije sem vodila pri konstantni, regulirani temperaturi 18 °C in mešanju z lopatičastim Rustonovim mešalom ob preprihovanju površine nad tekočim substratom s plinastim dušikom, do konca fermentacije.

V drugem sklopu so potekali eksperimenti z enim temperaturnim šokom v zgodnji eksponencialni fazi rasti kvasovk. Mošt sem pripravila po zgoraj opisanem postopku in mu dodala vcepek 0,3 gL⁻¹ vinskih kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*, ki sem jih predhodno rehidrirala. Nadaljni proces fermentacije sem vodila 12 ur pri temperaturi 18 °C in mešanju z lopatičastim Rustonovim mešalom z intenzivnostjo mešanja 100 obr./min ob preprihovanju površine nad tekočim substratom z N₂. Po 12 urah od dodatka kvasovk v grozdnim moštu sem povišala temperaturo fermentacije iz 18 °C na 34 °C, ter vzdrževala proces fermentacije pri tej temperaturi naslednjih 24 ur. Po tem sem ohladila fermentacijo na 18 °C in nadaljnji proces fermentacije vodila pri temperaturi 18 °C do konca fermentacije, ki sem jo zaključila odvisno od posameznega primera po približno 240 urah.

V tretjem sklopu eksperimentov sem študirala vpliv dveh zaporednih temperaturnih šokov na potek fermentacijskega postopka. Mošt sem pripravila po že opisanem postopku. Nadaljnji proces fermentacije sem vodila 6 ur pri temperaturi 18 °C in mešamo z lopatičastim Rustonovim mešalom ob preprihovanju površine nad tekočim substratom s plinastim dušikom. Po 4 urah sem povišala temperaturo fermentacije iz 18 °C na 34 °C, ter vzdrževala proces fermentacije pri tej temperaturi naslednjih 6 ur. Po tem sem ohladila fermentacijo na 18 °C in ob tem ves čas mešala z lopatičastim Rustonovim mešalom ob preprihovanju površine nad tekočim substratom s plinastim dušikom. Na tej temperaturi sem fermentacijo vodila naslednjih 6 ur. Po ohladitvi na temperaturo 18 °C sem ponovila postopek, povišala temperaturo fermentacije iz 18 °C na 34 °C, ter vzdrževala proces fermentacije pri tej temperaturi naslednjih 6 ur. Po tem sem ohladila fermentacijo na 18 °C. Postopek fermentacije sem vodila naprej pri temperaturi fermentacije 18 °C.

Pri vseh opisanih eksperimentih sem ves čas fermentacije uporabljala povratni hladilnik, priključen na pokrovu fermentorja. Temperatura hladilne tekočine v povratnem hladilniku je bila od 2 °C.

Glicerol je sladek alkohol, ki nastaja kot stranski produkt fermentacije s kvasovko *S cerevisiae*. V vinu se koncentracija glicerola giblje v mejah od 1 do 15 gL⁻¹. Obsežnejše študije so pokazale, da se odvisno od seva kvasovk, medija in procesnih pogojev, 4 – 10 % ogljika spremeni v glicerol, kar predstavlja 7 do 10 % koncentracije nastalega etanola. Višje koncentracije vplivajo na viskoznost in gladkost vina (Cianni in Ferraro, 1996). V fizioloških procesih kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* igra glicerol pomembno vlogo. Z izločanjem glicerola kvasovke kompenzirajo osmotski tlak, nadzirajo raven fosfata v citosolu in vzdržujejo NAD⁺/NADH redoks ravnotežje (Hohmann, 1997). Regulacija redoks ravnotežja pri *Saccharomyces cerevisiae* poteka preko glicerol-3-fosfat-dehidrogenaze (Hemming in Adler, 1991). Povišana produkcija glicerola ugodno vpliva tudi na senzorične lastnosti vina (Pretorius in Wan der Westhuizen, 1991).

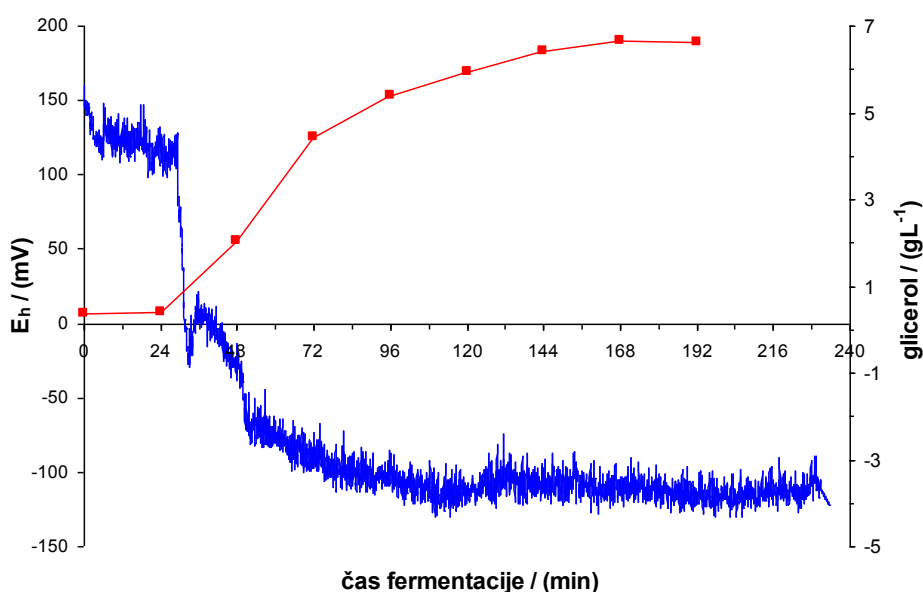
V nizu eksperimentov sem preizkusila možnosti povečanja tvorbe glicerola v fermentaciji vina z uporabo temperaturnih šokov pri 34 °C. Temperaturni šoki omogočajo povečanje tvorbe glicerola od 80 % do 100 %, oziroma od 6 do 12 gL⁻¹. Ta postopek povečanja tvorbe glicerola je mogoče uporabiti pri vseh sortah mošta in za vse vrste vin (Berovič *in sod.*, 2004).

Eksperimenti v tem sklopu so potekali po postopku pri temperaturi 18 °C, s povzročanjem enojnega ali dvojnega temperaturnega šoka z dvigom fermentacijske temperature v začetni eksponencialni fazi rasti kvasovke, na 34 °C. S temi eksperimenti sem želela celovito prikazati vpliv povišane temperature in temperaturnega šoka na biosintezo glicerola. Povišanje temperature fermentacije v eksponencialni fazi rasti vpliva na povišanje hitrosti kvasnega metabolizma, s tem na hitrejši potek sinteze etanola, sočasno pa tudi na povišano sintezo glicerola, ki postane intenzivnejša v primeru uporabe temperaturnih šokov. (Omori *in sod.*, 1996). Na ta način deluje nastali glicerol kot substanca, ki jo mikroorganizem izloča za vzpostavitev redoks ravnotežja. Količina glicerola, ki ob tem nastaja, je odvisna od konstantne fermentacijske temperature mošta. V primeru uporabe temperaturnih šokov, ko v prvi tretjini faze eksponencialne rasti kvasovk pride do prvega temperaturnega šoka, mikroorganizem izpade iz svojega redoks ravnotežja in začne ob tem intenzivno tvoriti glicerol kot sredstvo za vzpostavitev novo nastalega redoks ravnotežja. S tem se prilagodi novemu okolju. Po naslednjem, drugem zaporednem temperaturnem šoku, mikroorganizem ponovno reagira s

povečano tvorbo glicerola, ki pa je manjše intenzitete, kot pri predhodnem šoku. To velja enako za vse nadaljnje nenadne temperaturne šoke, ki si sledijo v zaporedju. (Berovič *in sod.*, 2004; Kukec *in sod.*, 2003)

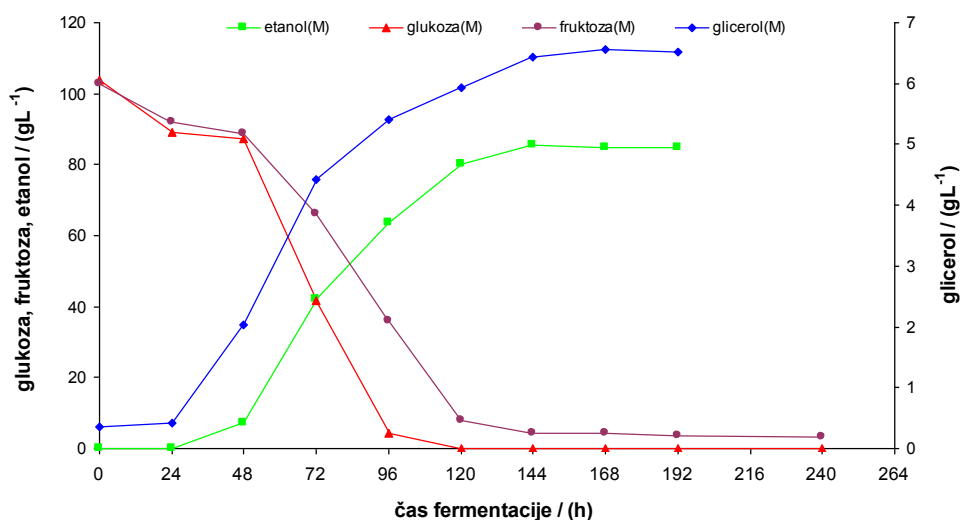
Pri temperaturi fermentacije 18 °C so bile pri enakih pogojih količine nastalega glicerola enake. Do manjših časovnih zakasnitev pri izločanju glicerola v posameznih primerih prihaja zaradi same narave biotehnološkega procesa, ki je spremenljiv in je odvisen od sestave mošta in od začetka razmnoževanja kvasovk in s tem povezano z metabolizmom kvasovk. Glede na časovne zakasnitve v metabolnem procesu kvasovke, se je skladno s kasnejšim padcem redoks potenciala, tudi nastajanje glicerola pričelo kasneje.

Začetni izmerjeni redoks potencial fermentacije pri 18 °C je znašal 150 mV. Do te stopnje se je med pretokom mošta v bioreaktor raztopila manjša količina kisika. Redoks potencial je za 2–3 ur ostal na konstantni vrednosti 140 mV. V tem času je kvasovka pričela proces razmnoževanja in rasti. V naslednjih 24 urah se je vrednost redoks potenciala gibala med 120 in 130 mV. Kvasni metabolizem je prešel iz aerobne začetne faze, v kateri je potekalo intenzivno razmnoževanje kvasovk in s tem nastanek biomase, v anaerobni metabolizem, ko se je pričela anaerobna razgradnja sladkorjev in nastajanje etanola. Po 30 urah je redoks potencial začel sunkovito padati in po 36 urah dosegel prvi minimum pri -25 mV. Sledil je dvig potenciala na 10 mV in ponoven padec. Po 120 urah od dodatka vcepka v mošt je redoks potencial padel za $\Delta E_h = 270$ mV. V tem času je potekala intenzivna fermentacija sladkorjev po glikolitični poti. Po doseženi minimalni vrednosti redoks potenciala pri -120 mV, je redoks potencial ostal konstanten, oziroma je začel počasi naraščati, kar je pomenilo, da se je alkoholna fermentacija zaključila po 120 urah in se je pričelo zorenje vina. V času, ko je redoks potencial močno padel, so kvasovke za izravnano redoks ravnotežja začele izločati glicerol. 24 ur po začetku procesa, je začel nastajati glicerol in v naslednjih 24 urah sem izmerila prvo povečanje koncentracije glicerola iz začetnih $0,4 \text{ gL}^{-1}$ na $2,0 \text{ gL}^{-1}$. Maksimalna koncentracija glicerola $6,65 \text{ gL}^{-1}$ je bila dosežena 144 ur po začetku fermentacije, ko je redoks potencial že dosegel minimum -120 mV (Graf 66.).



Graf 66.: Redoks potencial in glicerol med fermentacijo pri konstantni temperaturi 18 °C

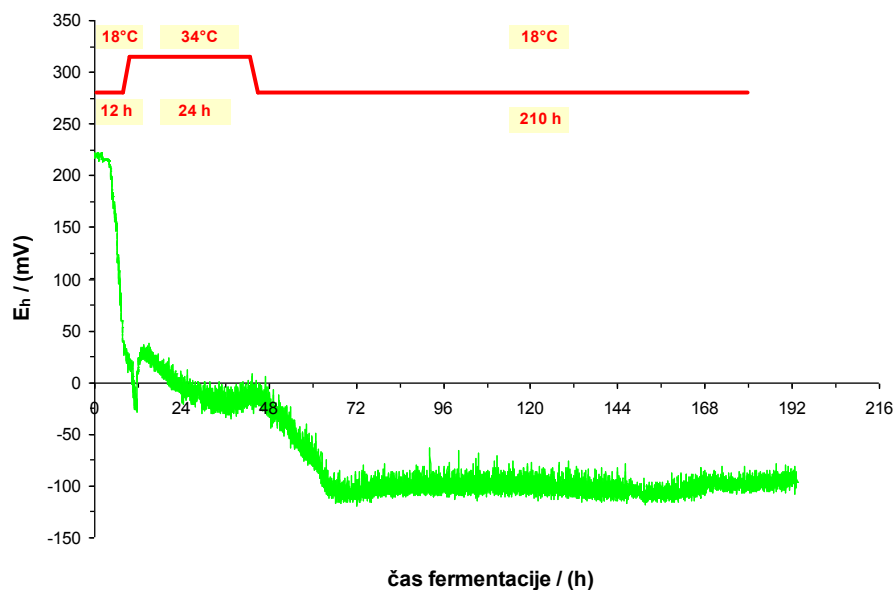
Anaerobni metabolizem glukoze in fruktoze se je začel 24 ur po dodatku vcepka v mošt, ko je redoks potencial je začel intenzivno padati. Po razgradnji $25,2 \text{ gL}^{-1}$ sladkorja, pride do krajšega zastoja, oziroma motnje v razgradnji sladkorjev v času med 24. in 48. uro, ko je koncentracija sladkorjev padla le za 5 gL^{-1} . Po 48 urah sta se glukoza in fruktoza razgrajevali hitreje in po 120 urah je koncentracija sladkorja dosegla končno koncentracijo $5,1 \text{ gL}^{-1}$. V naslednjih 24 urah je koncentracija padla za $0,8 \text{ gL}^{-1}$. V tem času je redoks potencial dosegel minimalno vrednost -130 mV . Koncentracija etanola je po 120 urah znašala $80,02 \text{ gL}^{-1}$ in je v naslednjih 24 urah zrasla le še za $5,5 \text{ gL}^{-1}$. Tudi glicerol je najvišjo koncentracijo $6,2 \text{ gL}^{-1}$ dosegel po 144 urah. Intenzivna fermentacija se je zaključila skladno z doseženim minimumom redoks potenciala po 120 urah in po tem času so nastajale le še manjše količine primarnih (etanola) in sekundarnih (glicerola) metabolitov (Graf 67.).



Graf 67.: Razgradnja sladkorjev ter nastanek etanola in glicerola med fermentacijo pri $18 \text{ }^{\circ}\text{C}$

Graf 68. prikazuje potek *on-line* meritve redoks potenciala in temperaturni profil med fermentacijo z enim temperaturnim šokom na $34 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Nenadna sprememba temperature po 6. urah od dodatka vcepka v mošt, je povzročila motnjo v kvasnem metabolizmu in zahtevala prilagoditev mikroorganizma na novonastale pogoje v okolju. Zaradi spremembe v metabolnem procesu, je redoks potencial začel padati in je v času 6 ur padel iz začetne vrednosti 220 mV na -25 mV . Prvi minimum pri -25 mV je redoks potencial dosegel po 12. urah od začetka fermentacije.

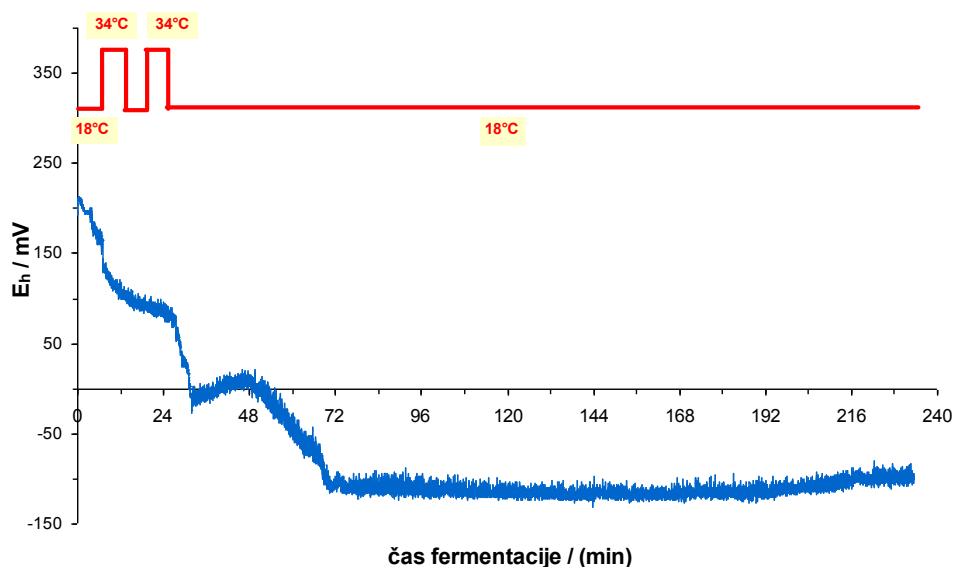
Sprememba temperature je povzročila motnjo metabolizma kvasovk in povzročila spremembo redoks ravnotežja. Zaradi šoka z dvigom temperature, morajo kvasne celice razviti mehanizem, da bi se tako uprle šoku in preživele. Da bi kvasne celice preprečile hitro difuzijo vode iz celice v okoliški medij, izločajo glicerol, ki regulira intra- in ekstracelularno okolico. (Larsson, 1986). Hitra sprememba temperature povzroča aktivacijo encima triozafosfat izomeraze, ki ima večjo afiniteto do dihidroksiacetonfosfata, kot do glicerolaldehid-3-fosfata. Dihidroksiacetonfosfat se v dvostopenjski reakciji spremeni v glicerol. Na ta način kvasne celice uravnavajo redoks ravnotežje in se odzivajo na hiperosmotski stres (Scanen *in sod.*, 1998).



Graf 68.: On-line meritev redoks potenciala in temperaturni profil med fermentacijo z enim temperaturnim šokom

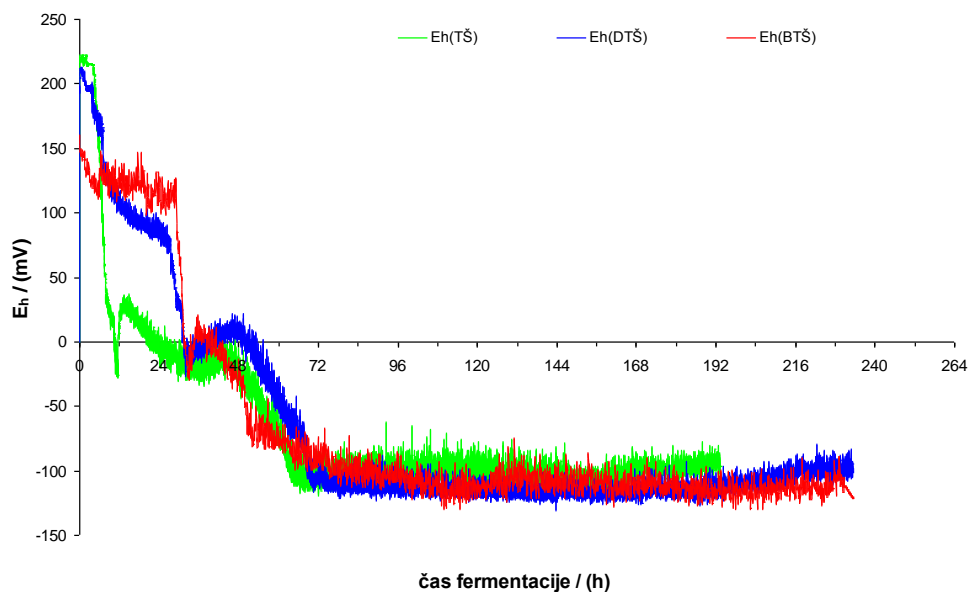
Prvemu padcu redoks potenciala, zaradi spremembe v metabolizmu, ki jo je povzročil dvig temperature na 34 °C, je sledil dvig na 35 mV in ponoven padec do – 25 mV (36 ur po dodatku vcepka). Po kratkem obdobju konstantnega redoks potenciala (vrednosti med – 25 in – 20 mV), ki je trajalo 6 ur, je sledil naslednji padec redoks potenciala. Redoks potencial je padel in dosegel drugi minimum – 110 mV po 72 urah. V naslednjih 24 urah je redoks potencial padel le za 5 mV. Stabilizacija signala redoks potenciala okrog vrednosti – 125 mV je bila znak, da se je proces fermentacije zaključil (Graf 68.).

Graf 69. prikazuje redoks potencial in temperaturni profil med fermentacijo z dvema zaporednima temperaturnima šokoma na 34 °C po 6. in po 18. urah od dodatka vcepka v mošt. Prvi padec redoks potenciala iz 210 mV na 130 mV sovpada s prvim dvigom temperature na 34 °C, 6 ur po dodatku vcepka v mošt. Ko sem temperaturo spustila nazaj na 18 °C je vrednost redoks potenciala padala z manjšo intenziteto ($\Delta E = 2,5$ mV/h), kar pomeni, da je bila sprememba redoks potenciala v časovni enoti manjša, kot v začetnem delu fermentacije ($\Delta E = 12$ mV/h). Redoks potencial je v naslednjih 6. urah padel iz 130 mV na 115 mV. Po drugem šoku od 18 na 34 °C (18 ur od začetka fermentacije), je redoks potencial ponovno padel do vrednosti – 20mV, ki jo je dosegel po 30 urah od začetka fermentacije. Sledilo je obdobje manjšega naraščanja E_h , ki je trajalo 18 ur in v katerem je redoks potencial narasel do 10 mV. Ponovni padec do -120 mV, kar je tudi najnižja vrednost se je zgodil v naslednjih 48 urah (Graf 69.)

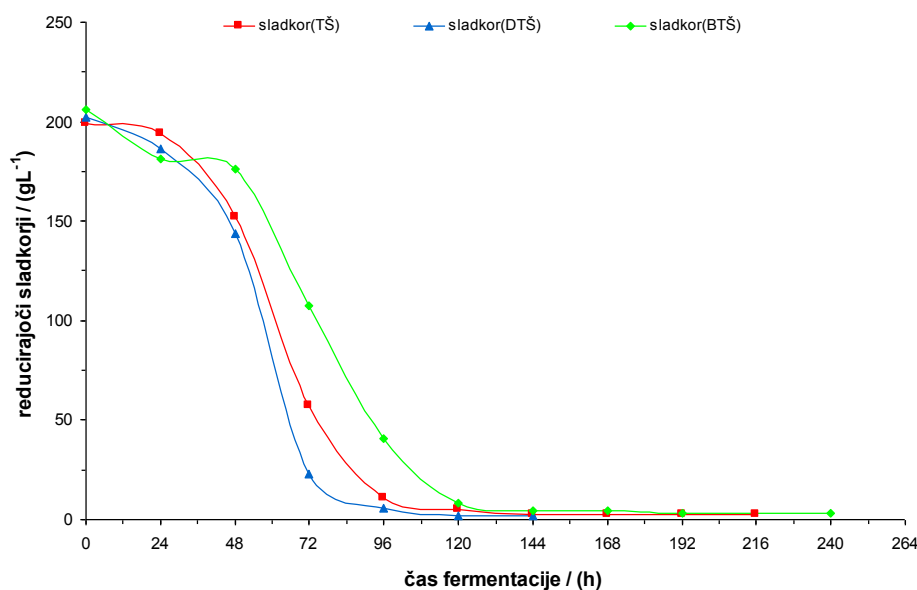


Graf 69.: Redoks potencial med fermentacijo z dvema temperaturnima šokoma na 34 °C

Graf 70. prikazuje primerjavo redoks potencialov fermentacije pri konstantni temperaturi 18 °C (BTŠ), fermentacije z enim temperaturnim šokom na 34 °C (TŠ) ter fermentacije z dvema temperaturnima šokoma (DTŠ). Spremembe vrednosti redoks potencialov so bile zaznane v povezavi s kvasnim metabolizmom in s tem s spreminjanjem koncentracije sladkorjev, etanola, glicerola in drugih metabolitov v sistemu ter ravnega cikla kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Profil krivulj redoks potenciala odraža fiziološko stanje mikroorganizma.



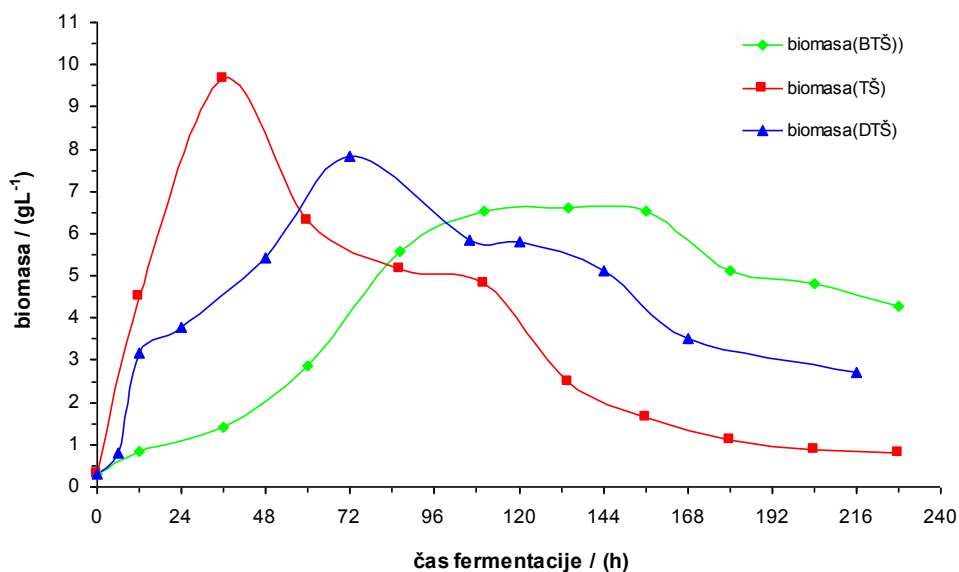
Graf 70.: On-line redoks potenciali fermentacij brez temperaturnega šoka pri 18 °C (BTŠ), z enim temperaturnim šokom (TŠ) in z dvema temperaturnima šokoma na 34 °C (DTŠ).



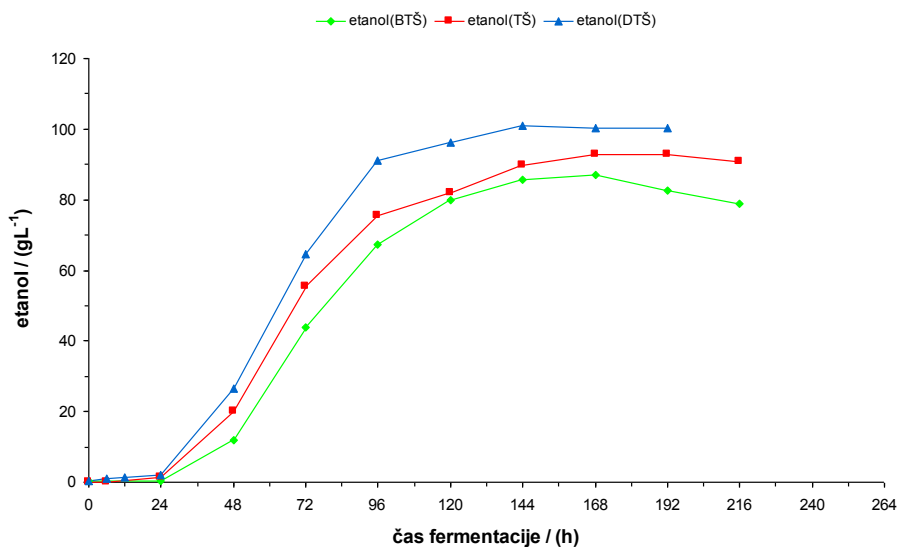
Graf 71.: Poraba reducirajočih sladkorjev med fermentacijami brez temperaturnega šoka (BTŠ), z enim temperaturnim šokom (TŠ) in z dvema temperaturnima šokoma (DTŠ)

Presnova reducirajočih sladkorjev se je v primeru fermentacij z enim in z dvema temperaturnima šokoma pričela hitreje, kot v primeru fermentacije pri konstantni temperaturi. Na hitrejši metabolizem je vplivala povišana temperatura v začetni fazi procesa razmnoževanja kvasovk in fermentacije. Na hitrejši kvasni metabolizem kaže tudi hitrejši padec redoks potenciala v primeru temperaturnih šokov (Graf 70.). V obeh primerih se je fermentacija sladkorjev zaključila po 96 urah in po tem času je fermentiralo le še 3 g L⁻¹ sladkorja. V primeru fermentacije pri konstantni temperaturi 18 °C se je metabolizem sladkorjev zaključil po 120 urah (Graf 71.). Zaključek fermentacij je v vseh primerih opaziti tudi iz padca in ustalitve redoks potencial vrednosti pri minimalnem doseženem potencialu (Graf 70.).

Po kratki lag fazi, so kvasovke v primeru fermentacije s temperaturnim šokom, prešle v eksponencialno fazo rasti po 6 urah in do 36. ure od začetka fermentacije zrasle do maksimalne koncentracije 9,7 g L⁻¹. Po prehodu iz aerobnega v anaerobni metabolizem, se je razgradnja sladkorjev pričela po 24 urah, to je v eksponencialni fazi rasti. Ko je rast biomase dosegla maksimum. Zaradi motnje kvasnega metabolizma, povzročene s temperaturnim šokom, je alkoholna fermentacija stekla, ko je nastala večja količina biomase in so se kvasovke prilagodile mehanizem delovanja v novonastalih pogojeih v okolju. V primeru fermentacije z dvojnimi temperaturnimi šokoma, se je rast biomase pričela prav tako po 6. urni lag fazi. Po 12. urah je vidna motnja v rasti, ki se odraža na prekinjeni eksponencialni fazi rasti, kateri pa je sledilo ponovno nadaljevanje rasti, do maksimuma 7,8 g L⁻¹ po 72 urah. Pri konstantni temperaturi je rast kvasne biomase dosegla maksimum 6,5 g L⁻¹ po 120 urah (Graf 72.). Temperaturni šok je torej vplival na pospešeno rast in razmnoževanje biomase, kasneje pa tudi na hitrejši metabolizem reducirajočih sladkorjev.



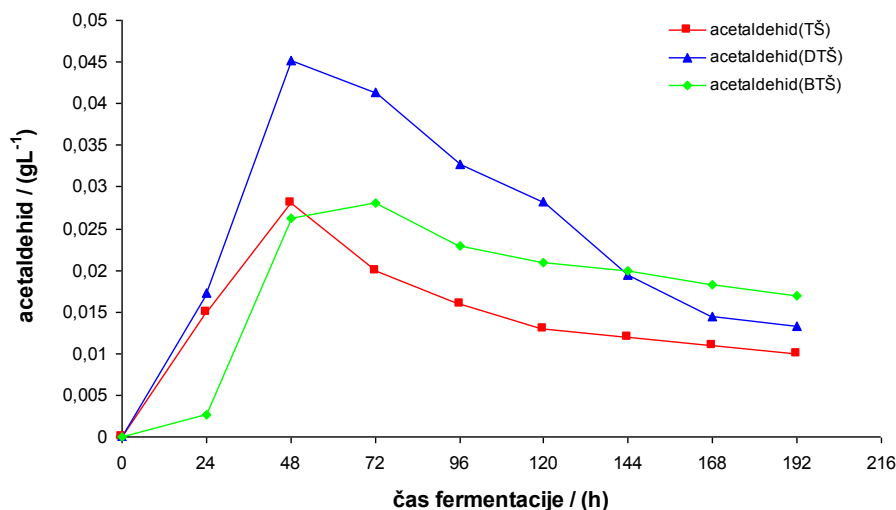
Graf 72.: Rast biomase pri fermentacijah brez temperaturnega šoka (BTŠ), z enim temperaturnim šokom (TŠ) in z dvema temperaturnima šokoma (DTŠ).



Graf 73.: Nastajanje etanola med fermentacijami brez temperaturnega šoka (BTŠ), z enim temperaturnim šokom (TŠ) in z dvema temperaturnima šokoma (DTŠ)

Razgradnja sladkorjev in nastajanje etanola sta zaradi dviga temperature v začetni fazi, v primeru povzročitve temperaturnih šokov stekli hitreje, kot pri konstantni temperaturi. Čeprav je etanol v vseh primerih začel nastajati že po 24 urah od začetka fermentacije, je bilo nastajanje etanola hitrejše v primeru fermentacij s temperaturnim šokom. Maksimalna koncentracija etanola je bila v primeru dvojnega temperaturnega šoka izmerjena po 144 urah in je znašala 101,1 gL⁻¹. Pri enojnem temperaturnem šoku je največja koncentracija etanola nastala prav tako po 144 urah in je znašala 92,8 gL⁻¹. Najmanj etanola je nastalo pri konstantni temperaturi in sicer 86,9 gL⁻¹ po 168 urah (Graf 73.)

Acetaldehid je najpomembnejši aldehid v vinu in je ena najpomembnejših komponent v sestavi mošta in vina. Več načinov nastanka, močna reaktivnost (-CHO radikal ima močno kemijsko afiniteto), afiniteta vezave žveplovega dioksida pri nizkih temperaturah in senzorične lastnosti, ki negativno vrednotijo prisotnost acetaldehida, so lastnosti, ki uvrščajo acetaldehid med zelo pomembne komponente v sestavi vina. Prisotnost acetaldehida, ki nastane z oksidacijo etanola, je rezultat oksidacijsko-redukcijskih procesov (Ribéreau-Gayon *in sod.*, 2000).



Graf 74.: Koncentracije acetaldehida med fermentacijami brez temperaturnega šoka (BTŠ), z enim temperaturnim šokom (TŠ) in z dvema temperaturnima šokoma (DTŠ)

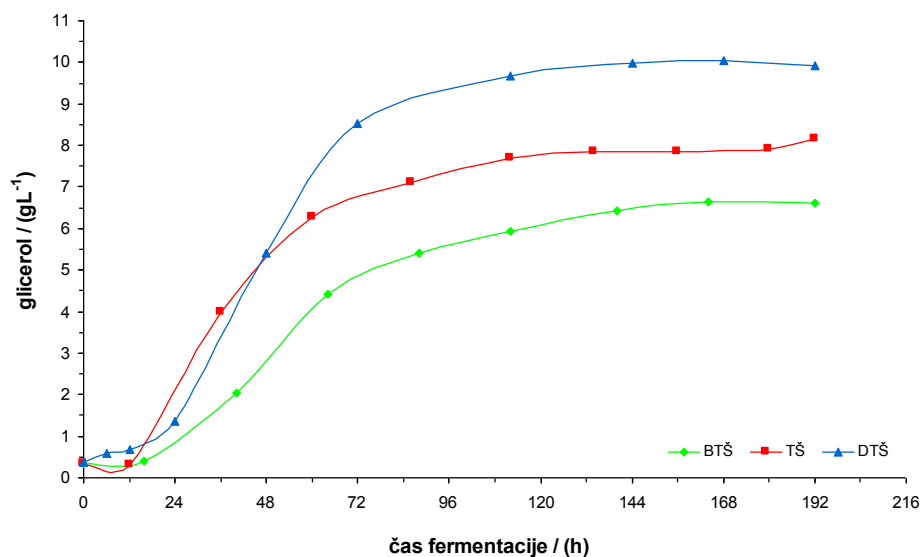
Acetaldehid se izloča zlasti v prvi fazi rasti in razmnoževanja kvasovk, t.j. v začetni fazi alkoholnega vrenja. V tej fazi se mikroorganizem adaptira na pogoje iz okolice. Čim krajša je predfermentativna faza, tem manj acetaldehida bo nastalo. Velike koncentracije acetaldehida povzročajo inhibicijo rasti kvasovk in zastoj v metabolizmu glukoze. Zaradi pomanjkanja encima alkoholdehidrogenaze, se acetaldehid v tej stopnji še ne reducira do etanola. Acetaldehid je skladno s hitrejšim metabolizmom zaradi povišanja temperature, hitreje nastajal med fermentacijama s temperaturnim šokom. Maksimum je v obeh primerih fermentacij z dvigom temperature dosegel po 48 urah. Pri konstantni temperaturi je maksimum v koncentraciji glicerol dosegel po 72 urah. Zaradi dveh zaporednih dvigov temperature, je največ acetaldehida med fermentacijo nastalo pri fermentaciji z dvojnimi temperaturnimi šokoma in sicer 45 mgL⁻¹. Po doseženem maksimumu in ob aktivaciji encima alkoholdehidrogenaza, se je acetaldehid začel pretvarjati v etanol. Acetaldehid namreč nastaja med alkoholnim vrenjem, kot vmesni produkt v kvasnem metabolizmu, ki nato prehaja v etanol. Koncentracija acetaldehida je začela padati in je dosegla minimum ob koncu fermentacije. Na koncu je ostalo v vinu 17 mgL⁻¹ acetaldehida pri fermentaciji brez temperaturnega šoka. Manjša količina acetaldehida v vinu je bila prisotna po končani fermentaciji z enim temperaturnim šokom in sicer 10 mgL⁻¹ in pri fermentaciji z dvema temperaturnima šokoma 13 mgL⁻¹ (Graf 74.).

Redukcija acetaldehida do etanola je reakcija v kvasnem metabolizmu, ki pomembno vpliva na padec vrednosti redoks potenciala med fermentacijo.

V primeru uporabe enega ali dveh temperaturnih šokov v začetni eksponencialni fazi je sledil padec redoks potenciala že v začetni eksponencialni fazi rasti. Motnja v kvasnem metabolizmu in s tem povezana sprememba redoks ravnotežja v sistemu je bila uravnotežena z intenzivnejšim izločanjem glicerola, ki se je pričelo z zamikom nekaj ur po temperaturnem šoku. Količina nastalega glicerola je povezana z razliko vrednosti med začetnim in končnim redoks potencialom (ΔE_h), kjer nastane največ glicerola v primeru, ko je razlika med začetnim in končnim redoks potencialom največja. Končna koncentracija glicerola v vinu je pri fermentaciji s temperaturnim šokom veliko večja od koncentracije glicerola, nastalega med fermentacijo pri konstantni temperaturi. ΔE_h med fermentacijo z enim in dvema temperaturnima šokoma je enak, količina nastalega glicerola pa je v primeru fermentacije z dvema temperaturnima šokoma večja, kot pri fermentaciji z enim šokom (Graf 75.)

V času, ko se je glicerol že začel izločati, je prišlo do krajšega zastoja v padcu redoks potenciala med fermentacijama z dvigi temperature. Vrednost redoks potenciala se je za krajši čas stabilizirala na konstantni vrednosti, oziroma v določenih primerih celo narasla. Zastoj oziroma stabilizacijo redoks signala bi lahko razložila s spremembo kvasnega metabolizma zaradi povzročene stresa z dvigom temperature. Kvasovke so nastali padec redoks potenciala oziroma porušenje redoks ravnotežja uravnavale z izločanjem glicerola. Ko se je pričel glicerol izločati, se je zmanjšala intenziteta padanja redoks potenciala. To se je v primeru enojnega temperaturnega šoka zgodilo po 12. urah od začetka fermentacije, ko je redoks potencial narasel za 50 mV v dveh urah. Naraščanje redoks potenciala po 12 urah sovпада z začetkom izločanja glicerola. Do časa 48 ur od dodatka vcepka, ko je redoks potencial začel intenzivno padati drugič, je koncentracija glicerola dosegla $6,3 \text{ gL}^{-1}$. Do konca fermentacije je koncentracija zrastle le še za $1,9 \text{ gL}^{-1}$. Razlika v vrednosti redoks potenciala med začetno in končne vrednosti je v primeru enojnega temperaturnega šoka znašala 335 mV.

Pri fermentaciji z dvojnimi temperaturnimi šokoma je prišlo do prve prekinitve padca redoks potenciala v osmih urah od začetka fermentacije, ko se je naglo padanje redoks potenciala za nekaj časa prekinilo in začelo ponovno padati po približno 20 urah. Tudi v tem primeru se je vrednost redoks potenciala stabilizirala, ko so kvasovke začele izločati glicerol. Z izločanjem glicerola je kvasni metabolizem odreagiriral na temperaturni šok, povzročeni z dvigom temperature na $34 \text{ }^\circ\text{C}$ 6 ur po začetku fermentacije. Še ena prekinitve padanja je sledila po naslednjih 6 urah ali 32 ur (po drugem dvigu temperature na $34 \text{ }^\circ\text{C}$) od dodatka vcepka v mošt, ko je vrednost redoks potenciala v naslednjih 16 urah naraščala od vrednosti -3 do 10 mV in potem začela zopet padati. Tudi ta prekinitve v padanju redoks potenciala je nastala zaradi spremembe v kvasnem metabolizmu, zaradi temperaturnega šoka. Minimalno vrednost -120 mV je redoks potencial dosegel po 72. urah. Razlika od začetnega do končnega redoks potenciala ΔE_h je v tem primeru znašala 350 mV. Razlika vrednosti redoks potenciala med začetno in končno vrednostjo (ΔE_h) je med fermentacijo pri konstantni temperaturi $18 \text{ }^\circ\text{C}$ znašala 270 mV. (Graf 70.) Glede na največjo doseženo razliko v vrednostih redoks potenciala ΔE_h v primeru dvojnega temperaturnega šoka, je tudi količina izločenega glicerola v tem primeru najvišja (Graf 74.).



Graf 75.: Koncentracije glicerola med fermentacijami brez temperaturnega šoka (BTŠ), z enim temperaturnim šokom (TŠ) in z dvema temperaturnima šokoma (DTŠ).

V primeru fermentacije z dvema temperaturnima šokoma se je izločanje glicerola zaradi motnje metabolizma kvasovk z nenadnim dvigom temperature in s tem porušitve redoks ravnotežja, pričelo takoj po prvem temperaturnem šoku in sicer 6 ur po začetku fermentacije. V času 12 ur po začetku fermentacije je tudi redoks potencial padel iz 220 na 110 mV. Glicerol se je izločal najhitreje in dosegel končno koncentracijo $10,4 \text{ gL}^{-1}$ po 144 urah. Zanimivo je, da se je v času 6 ur po prvem temperaturnem šoku, pričel intenzivneje izločati glicerol, redoks potencial pa se je za nekaj časa ustalil na vrednosti med 80 in 100 mV ter kasneje, po drugem temperaturnem šoku, začel ponovno padati. V času, ko so kvasovke začele izločati glicerol zaradi porušitve redoks ravnotežja, se je padanje redoks potenciala ustalilo, saj je kvasovka nastala razlika uravnavala s produkcijo glicerola. Tudi po drugem temperaturnem šoku je prišlo do krajše prekinitve padanja redoks potenciala, ki je trajala od 32 do 48 ure od dodatka kvasovk v mošt in v tem času je redoks potencial narasel od vrednosti -25 do 10 mV . Po 144 urah fermentacije je bila dosežena najnižja vrednost redoks potenciala (-125 mV) in najvišja koncentracija glicerola ($10,4 \text{ gL}^{-1}$). Intenzivno izločanje glicerola se je med fermentacijo z enim temperaturnim šokom pričelo že 24 ur po začetku fermentacije in po 120 urah doseglo končno koncentracijo $7,5 \text{ gL}^{-1}$. V primeru fermentacije pri konstantni temperaturi se je intenzivnejše izločanje glicerola pričelo po 48. urah in doseglo končno koncentracijo $6,65 \text{ gL}^{-1}$ po 168 urah od začetka fermentacije. Tudi v tem primeru se je v času intenzivnega izločanja glicerola vrednost redoks potenciala med 32 in 40 uro ustalila okrog vrednosti -10 mV , oziroma naraščala od vrednosti -25 mV do 5 mV in po 40 urah ponovno padla. Najnižji redoks potencial (-115 mV) je bil izmerjen 144 ur od dodatka vcepka v mošt, ko je tudi koncentracija izločenega glicerola dosegla maksimum (Graf 70. in Graf 75.).

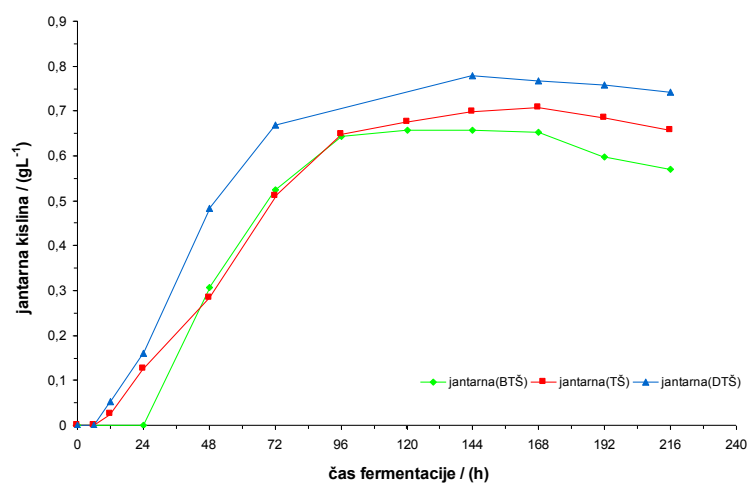
Izločanje glicerola se je zaradi enega temperaturnega šoka povečalo za 25 % v primerjavi z glicerolom izločenim pri konstantni temperaturi. V primeru dvojnega temperaturnega šoka je končna koncentracija glicerola narasla za približno 65 %.

Tabela 12.: Koncentracije metabolitov ob koncu alkoholne fermentacije, čas trajanja fermentacije in razmerje koncentracij glicerola in etanola za fermentacije brez temperaturnega šoka (BTŠ), z enim (TŠ) in z dvema temperaturnima šokoma (DTŠ)

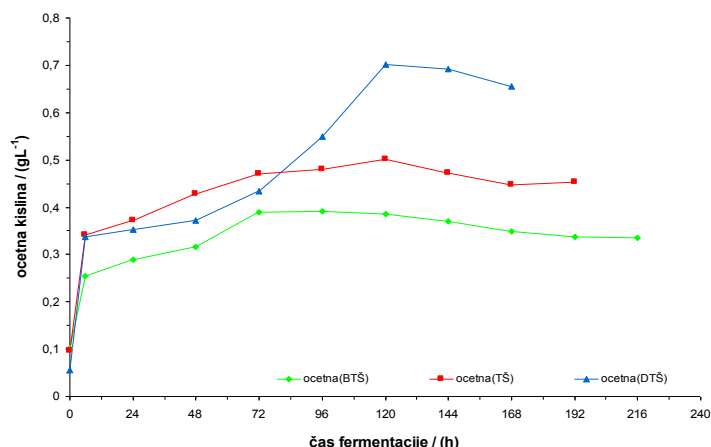
	<i>BTŠ</i>	<i>TŠ</i>	<i>DTŠ</i>
reducirajoči sladkorji	4,4 gL ⁻¹	2,6 gL ⁻¹	2,0 gL ⁻¹
glicerol	6,65 gL ⁻¹	7,5 gL ⁻¹	10,5 gL ⁻¹
etanol	86,9 gL ⁻¹	92,8 gL ⁻¹	101,1 gL ⁻¹
čas trajanja alkoholne fermentacije	156 ur	144 ur	120 ur
glicerol:etanol	7,65 %	8,08 %	10,39 %
izoamilalkohol	240 mgL ⁻¹	330 mgL ⁻¹	500 mgL ⁻¹
1-propanol	10 mgL ⁻¹	30 mgL ⁻¹	37 mgL ⁻¹
acetaldehid	17 mgL ⁻¹	10 mgL ⁻¹	13 mgL ⁻¹

Zaradi predpostavke, da povišanje fermentacijske temperature vpliva tudi na povečano izločanje sekundarnih produktov fermentacije grozdnega mošta, kot sta jantarna in očetna kislina, sem želela ovrednotiti vpliv temperaturnih šokov na metabolizem le-teh, za aromo in končno kakovost vina, pomembnih kislin.

Prekinitev oziroma motnja v metabolizmu kvasovk z nenadnim dvigom temperature, se je podobno kot na hitrosti razgradnje reducirajočih sladkorjev, ter izločanja glicerola in etanola, odražala tudi na hitrosti nastajanja jantarne in očetne kisline (Graf 76. in Graf 77.). Med fermentacijo pri temperaturi pri 18 °C je jantarna kislina začela nastajati 24 ur po dodatku kvasovk. Po času 120 ur je dosegla koncentracijo 0,66 gL⁻¹. En temperaturni šok je pospešil nastajanje jantarne kisline, saj je v tem primeru jantarna kislina začela nastajati 12 ur po začetku fermentacije, to je 6 ur po prvem temperaturnem šoku. Po istem času je začela nastajati jantarna kislina tudi v primeru dvojnega temperaturnega šoka, ko je bilo nastajanje še intenzivnejše in je nastala večja količina jantarne kisline. V prvem primeru enega temperaturnega šoka je po 120 urah nastalo 0,70 gL⁻¹ jantarne kisline, medtem, ko je v primeru dveh temperaturnih šokov nastalo 0,78 gL⁻¹ jantarne kisline v času 144 ur. Dve zaporedni motnji metabolizma sta vplivali na intenziteto nastajanja jantarne kisline, kot sekundarnega produkta alkoholne fermentacije (Graf 78.).



Graf 76.: Nastanek jantarne kisline pri konstantni temperaturi 18 °C (BTŠ), pri fermentaciji z enim temperaturnim šokom (TŠ) in z dvema temperaturnima šokoma (DTŠ)



Graf 77.: Nastanek očetne kisline pri konstantni temperaturi 18 °C (BTŠ), pri fermentaciji z enim temperaturnim šokom (TŠ) in z dvema temperaturnima šokoma (DTŠ)

V primerjavi s koncentracijo, ki jo je očetna kislina dosegla med fermentacijo pri konstantni temperaturi ($0,39 \text{ gL}^{-1}$), sta se koncentraciji pri fermentacijah z enim ali z dvema temperaturnima šokoma zvišali za 22 % (TŠ), oziroma za 45 % (DTŠ) (Graf 77.).

Večina višjih alkoholov nastaja med alkoholno fermentacijo in dosega koncentracije v mejah med 150 in 550 mgL^{-1} . Višji alkoholi so prekursorji za tvorbo arome vina. Višji alkoholi in njihovi estri imajo intenzivni vonj in igrajo pomembno vlogo pri nastajanju arom vina. Med najbolj zastopanimi sta: izoamil alkohol in 1-propanol. V nizkih koncentracijah, manj kot 300 mgL^{-1} , sodelujeta pri kompleksnosti arom vina. Višji alkoholi nastajajo v ciklu kvasnega metabolizma direktno iz sladkorjev ali pa iz amino kislin grozdja po Erlichovi reakciji. Ta reakcija je posledica aktivnosti FAD^+ dehidrogenaze, ki oksidira aminokislino v iminokislino. Te se hidrolizirajo v α -ketokislino, ki je v nadaljevanju izpostavljena delovanju dekarboksilaze s pomočjo koencima tiaminpirofosfat (TPP). Po tej poti iz levcina nastaja izoamil alkohol. (Ribéreau – Gayon *in sod.*, 2000).

Na nastanek večjih količin višjih alkoholov med fermentacijo vplivajo fermentacijski pogoji in vrsta oziroma sev kvasovke. Dejavniki, ki vplivajo na povišanje fermentacijske hitrosti so kvasna biomasa, vpliv oksidacije, višjih temperatur in prisotnost trdnih delcev v fermentacijski brozgi. Prav ti faktorji pa vplivajo tudi na zvišanje koncentracije višjih alkoholov. Ker povišana temperatura vpliva na večje izločanje višjih alkoholov, sem v seriji eksperimentov želela ovrednotiti vpliv enega in dveh zaporednih temperaturnih šokov na izločanje. Iz vpliva povzročene motnje na izločanje izoamil alkohola in 1-propanola, lahko sklepam na izločanje ostalih v moštu in vinu nastajajočih in prisotnih višjih alkoholov.

Hitrost nastajanja 1-propanola in izoamilalkohola (Grafa 78. in 79.) se je skupaj s hitrostjo naraščanja biomase povečala z dvigom temperature. Podobnost grafov višjih alkoholov z grafom biomase med potekom fermentacije je posledica delovanja encimov, ki so udeleženi v procesih sinteze višjih alkoholov in v okviru anabolizma aminokislin. Višji alkoholi nastajajo v procesih anabolizma sladkorjev ali pa v procesih transaminacij aminokislin. Encimatske aktivnosti se večajo z višanjem temperature fermentacije. Med procesom naraščanja biomase poteka anabolizem aminokislin. Kot stranski produkt sinteze aminokislin nastaja tudi 1-

propanol. V reakcijah deaminacije treonina nastane α -keto butirac, ki se naprej dekarboksilira v n-propan aldehyd in CO_2 ter nadalje ob hkratni reoksidaciji NADH v NAD^+ reducira v 1-propanol. Oblika grafov produkcije 1-propanola je podobna grafom produkcije biomase zaradi izrabe skupnih encimov za sintezo aminokislin in 1-propanola.

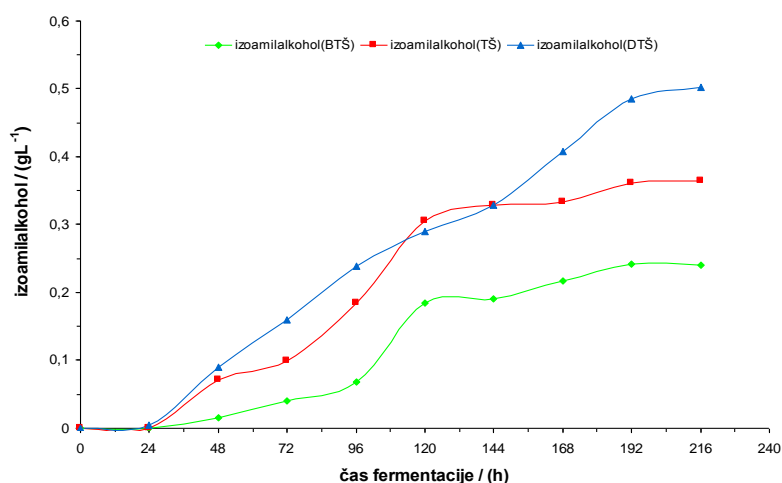
Izoamilalkohol nastane s pomočjo encimov transaminaz (prisotnih v bioprocesih sinteze aminokislin). Sintetizira se iz piruvata (produkt glikolize), preko organskih kislin α -keto-izovalerata, α -keto-izokaproata ob sočasni reoksidaciji NADH molekul.

Koncentraciji izoamil alkohola in 1-propanola sta se povečevali z višanjem temperature. Glede na to, da zvišanje temperature vpliva na večje izločanje višjih alkoholov, sem predpostavila, da se koncentraciji zvišujeta tudi s temperaturnim šokom oziroma motnjo v metabolizmu kvasovk v zgodnji eksponencialni fazi procesa.

V primeru fermentacije pri konstantni temperaturi $18\text{ }^\circ\text{C}$, ki je bila kontrolna fermentacija, se je izoamilalkohol začel nastajati po 24 urah od začetka fermentacije in je naraščal več čas trajanja fermentacije. Končna koncentracija izoamilalkohola je po 192 urah znašala $0,24\text{ gL}^{-1}$. (Graf 78.) V enakem času se je zaključila tudi fermentacija sladkorjev.

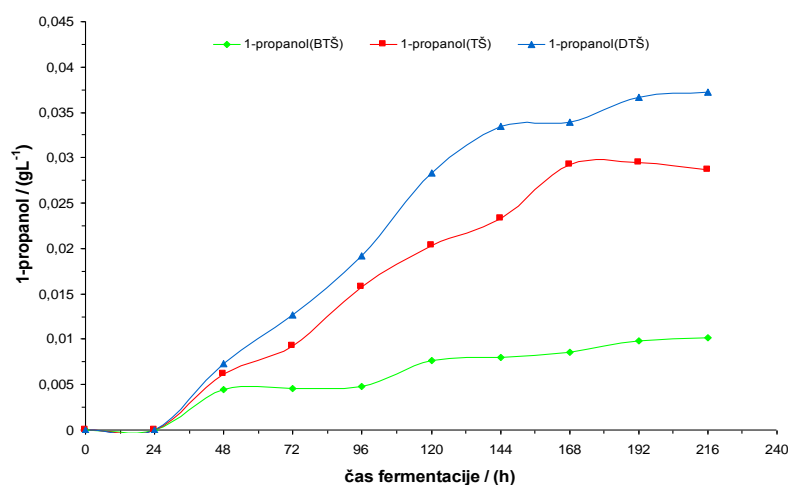
En temperaturni šok v začetni fazi fermentacije, je povzročil nekoliko hitrejše nastajanje izoamilalkohola, ki se je pričelo prav tako po 24 urah od začetka fermentacije. Po 144 urah je koncentracija dosegla $0,33\text{ gL}^{-1}$, kar je za 36,4 % več, kot v primeru fermentacije pri temperaturi $18\text{ }^\circ\text{C}$.

Najvišjo koncentracijo $0,50\text{ gL}^{-1}$ je izoamil alkohol dosegel v primeru fermentacije z dvema temperaturnima šokoma. Izoamilalkohol je pričel nastajati z razgradnjo sladkorjev po 24 urah od začetka fermentacije. Koncentracija je naraščala ves čas alkoholne fermentacije in dosegla maksimum po 216 urah. Uporaba enega ali dveh temperaturnih šokov je vplivala na povečano izločanje izoamil alkohola in sicer se je v primeru enega temperaturnega šoka koncentracija izoamil alkohola povečala za 36,4 % in v primeru dvojnega temperaturnega šoka za 52 % v primerjavi s koncentracijo izoamil alkohola pri $18\text{ }^\circ\text{C}$ (Graf 78.).



Graf 78.: Nastajanje izoamilalkohola pri konstantni temperaturi $18\text{ }^\circ\text{C}$ (BTŠ), pri fermentaciji z enim (TŠ) in z dvema temperaturnima šokoma (DTŠ)

Koncentracije 1-propanola običajno dosegajo več kot 10-krat nižje koncentracije od izoamilalkohola. Med fermentacijo pri 18 °C je koncentracija 1-propanol-a naraščala zelo počasi do 0,01 gL⁻¹ po 192 urah. En temperaturni šok je pospešil nastajanje 1-propanol-a in v tem primeru so koncentracije dosegle tudi do 2 krat večje koncentracije kot v primeru fermentacije pri 18 °C. Dva zaporedna temperaturna šoka sta prav tako vplivala na povečanje koncentracije 1-propanola. Koncentracija 1-propanola se je povečala za 30 % v primerjavi s fermentacijo z enim temperaturnim šokom in za 73 % v primerjavi s fermentacijo pri 18 °C. Najvišja koncentracija je znašala 0,037 gL⁻¹ (Graf 79.).



Graf 79.: Nastajanje 1-propanola pri konstantni temperaturi 18 °C (BTŠ), pri fermentaciji z enim (TŠ) in z dvema temperaturnima šokoma (DTŠ)

Ob dvigu temperature od 18 na 34 °C je zaradi intenzivnega vrenja potrebno uporabiti na vrhu fermentorja reflux hladilnik s hlajenjem na temperaturo 4 °C. Ta dodatek preprečuje izgubo aromatičnih snovi in vlage, ki tvorijo bogastvo vinske cvetice in bi jih intenziven tok 100 % vlažnega ogljikovega dioksida odnašal iz nastajajočega vina (Kukec *in sod.*, 2002).

Z ozirom na vpliv temperature na rast kvasovk in metabolizem, višje temperature vplivajo na povišanje hitrosti metabolizma. Hkrati pa višje temperature tudi vplivajo na izgubo hlapnih komponent iz fermentirajočega mošta oziroma vina. Hlapne komponente, ki vplivajo na aromo vina so višji alkoholi, aldehidi, ketoni, estri in kisline. V večji meri so zastopani višji alkoholi, kisline in estri (Stashenko *in sod.*, 1992). Nastanek in obstanek višjih alkoholov in drugih hlapnih komponent, ki vplivajo na aromatične lastnosti vina, je v veliki meri odvisen od temperature fermentacije. Tako temperature nad 20 °C lahko vplivajo na izgubo primarnih arom in zelenih estrov ter vodi v tvorbo neželenih višjih alkoholov (Peynaud, 1984).

4.7. KONTROLIRANA FERMENTACIJA GROZDNEGA MOŠTA Z REGULACIJO REDOKS POTENCIALA S POMOČJO SPREMINJANJA TEMPERATURE IN VPIHOVANJA CO₂

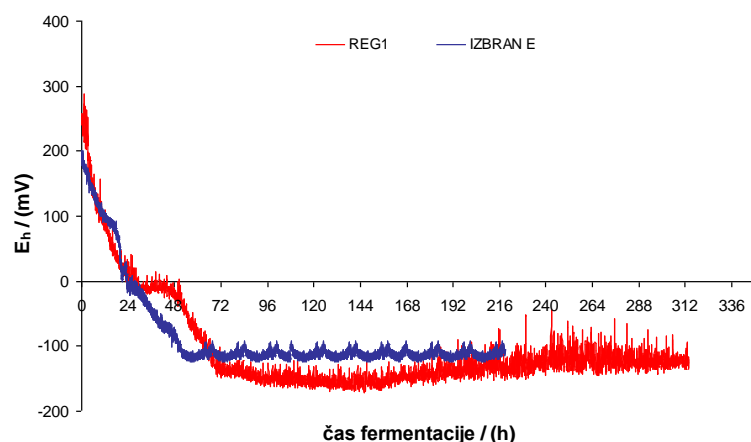
Ker smo v prvem in drugem delu našega raziskovalnega dela ugotovili, da *on-line* meritev redoks potenciala omogoča dober vpogled v oksidacijsko-redukcijske sposobnosti vina in ga lahko uporabimo kot kvalitativni faktor za spremljanje dogajanja tekom procesa fermentacije vina, smo v tretjem delu želeli preveriti tudi možnost regulacije redoks potenciala, glede na rezultate predhodnih meritev. S tem smo želeli preveriti ali se lahko s pomočjo *on-line* vrednosti redoks potenciala, kot pokazatelja dogajanja tekom procesa fermentacije, približamo izbranemu profilu redoks potenciala, ki bi predstavljal čim bolj optimalen potek fermentacije, glede na vhodne spremenljivke in na končno kakovost vina.

Regulacijo smo izvedli s pomočjo spreminjanja temperature in uvajanja CO₂, ki smo jo tekom procesa zviševali in zniževali in s tem vodili potek procesa. Dogajanje smo spremljali s pomočjo *on-line* meritve redoks potenciala in pH-ja ter meritev porabe in nastajanja za proces in za kakovost vina pomembnih komponent (glukoza, fruktoza, etanol, glicerol, vinska, jabolčna, jantarna, citronska in očetna kislina).

Temperetura ima na potek fermentacije pomemben vpliv. Na podlagi Arrheniusove enačbe je dejavnik, ki pozitivno vpliva na kvasni metabolizem in s tem na hitrost kemijskih reakcij. Iz rezultatov eksperimentov vodenja fermentacij pri različnih temperaturah je razvidno naraščanje encimske aktivnosti z dvigom temperature.

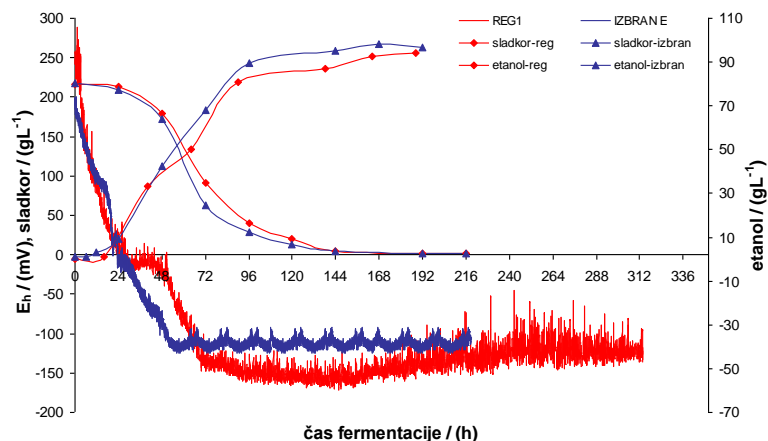
Ogljikov dioksid zavira metabolno aktivnost kvasovk. CO₂ je produkt fermentacije. V procesu katabolizma sladkorja se sprošča v encimatskih reakcijah dekarboksilacije s pomočjo encimov dekarboksilaz. Vnos CO₂ v sistem najverjetneje povzroča inhibicijo encimov (dekarboksilaz) s produktom. Z vnosom CO₂ se med fermentacijo vrši pritisk proti dekarboksilaciji piruvata (piruvat dekarboksilaza) v acetaldehid. Posledica je ovirana reoksidacija NADH koencimov in nadalje reakcije encimov (dehidrogenaz), kjer igra NAD⁺ vlogo prejemnika elektronov. Tako je posredno upočasnjen metabolizem kvasovk.

Izkazalo se je, da je s pomočjo spreminjanja temperature moč vplivati na spreminjanje redoks potenciala in s tem na potek fermentacijskega procesa, vendar pa ni možno v celoti slediti določeni redoks krivulji, ki smo jo izbrali, kot optimalno za proces. Razlika, ki v tem primeru nastane med izbrano in regulirano krivuljo redoks potenciala, pa je zanemarljiva, če primerjamo še rezultate kinetike razgradnje in nastanka za proces pomembnih reaktantov in produktov. Regulacija s pomočjo temperature in opazovanja oziroma zasledovanja izbrane krivulje redoks potenciala je torej možna, izboljšali pa bi jo lahko še s spreminjanjem drugih parametrov, ki vplivajo na proces.



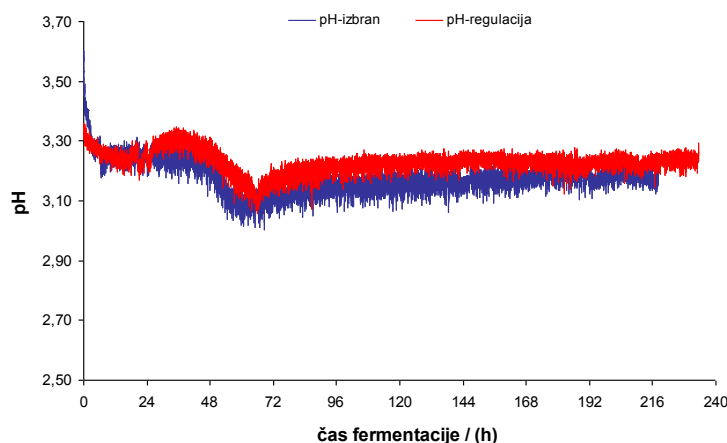
Graf 80: Krivulja *on-line* redoks potenciala, ki smo ga izbrali in krivulja dobljena s pomočjo regulacije s spreminjanjem temperature in uvajanjem CO₂ tekom procesa fermentacije.

Ker je fermentacija, ki smo jo izbrali kot vzorčno fermentacijo, potekala pri 18 °C, smo tudi regulirano fermentacijo začeli pri 18 °C. Ker jeredoks potencial po 12 urah od dodatka vcepka začel padati nekoliko hitreje, kot redoks potencial izbrane fermentacije, sem temperaturo znižala na 16 °C. Upočasnitev se je odrazila na zastoju med 24 in 48 uro procesa. Znižanje fermentacijske temperature je upočasnilo kvasno fiziologijo in to se je odrazilo na zastoju, ki je viden na grafu redoks potenciala (Graf 1). Redoks potencial izbrane fermentacije je padel do vrednosti -120 mV po 72 urah. Med fermentacijo, ki smo jo regulirali s spreminjanjem temperature, pa je redoks potencial dosegel minimalno vrednost -160 mV po 120 urah. Zastoj, oziroma upočasnitev kvasnega metabolizma opazim tudi na grafu 2, ki prikazuje porabo sladkorjav in nastanek etanola med obema fermentacijama. V času po 48 urah je opaziti upočasnjeno nastajanje etanola, kar bi lahko bilo odraz znižane kvasne aktivnosti, zaradi znižanja temperature. Po zvišanju temperature na 22 °C po 24 urah, med fermentacijo z regulacijo, sem želela pospešiti kvasno aktivnost, ki je zastala v času od 24 do 48 ur. Povišanje temperature se je odrazilo na ponovnem padcu redoks potenciala po 48 urah. Zaradi zvišanja temperature je fermentacija stekla hitreje in dosežen je bil nižji redoks potencial, kot med fermentacija pri konstantni temperaturi 18 °C.



Graf 81: Redoks potencial regulirane in izbrane fermentacije, poraba sladkorjev in nastajanje etanola.

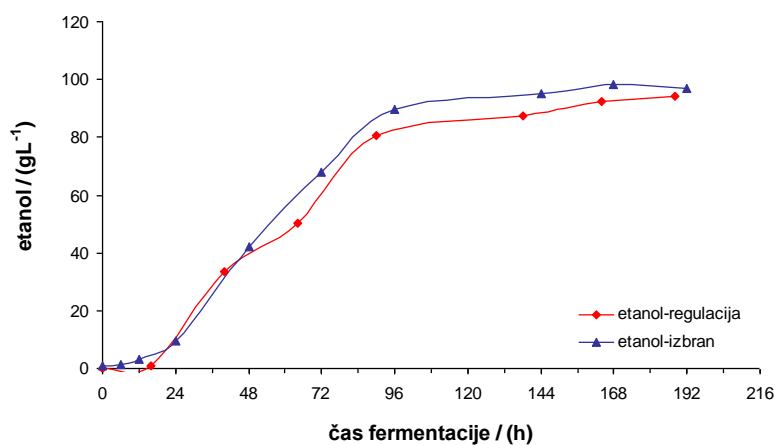
Hitrost produkcije etanola in glicerola (vezanih na rast biomase) v primeru spreminjanja temperature in vnašanja plina CO₂ pade v primerjavi s fermentacijo brez regulacije. Hitrost porabe sladkorjev je v okviru upočasnjene fermentacijske faze in glikolize v primeru regulirane fermentacije s spreminjanjem temperature in vnosom plina manjša (Graf 81.).



Graf 82: Krivulji *on-line* pH vrednost med izbrano in regulirano fermentacijo.

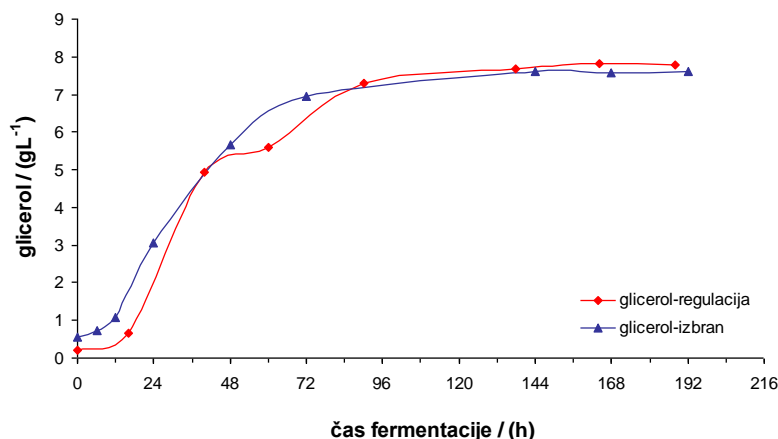
pH vrednost mošta v obeh eksperimentih (z in brez regulacije) v prvih 24 urah najprej pade, zaradi metabolne aktivnosti kvasovk in produkcije CO₂, ki se raztaplja v mediju. Po 24 urah fermentacije prične pH vrednost postopoma naraščati zaradi produkcije etanola in izločanja vinske kisline (Graf 82.).

Med primerjavo kinetik nastajanja primarnih in sekundarnih produktov fermentacij in porabe glukoze in fruktoze, nisem opazila bistvenih razlik. Končna koncentracija etanola je bila v primeru s temperaturo regulirane fermentacije nižja za 2 gL⁻¹, kar je za končno koncentracijo etanola v vinu praktično zanemarljiva razlika. Omeniti velja še motnjo v nastajanju etanola v času med 36 in 60 uro, ki bi jo lahko povzročilo nenadno znižanje temperature fermentacije iz začetnih 18 na 16 °C.



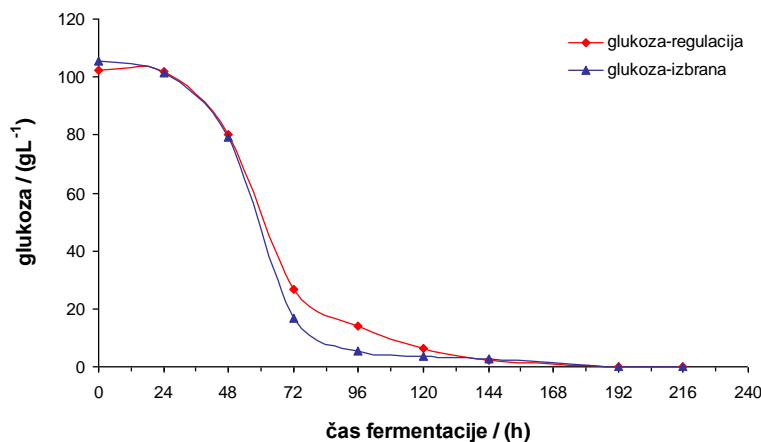
Graf 83: Nastajanje etanola med fermentacijo, regulirano s pomočjo spreminjanja temperature v primerjavi z nastajanjem etanola med izbrano fermentacijo.

Kinetika nastanka glicerola, kot glavnega sekundarnega produkta fermentacije je med fermentacijama podobna. V primeru s temperature regulirane fermentacije je opazna motnja v naraščanju koncentracije glicerola v času med 36 in 60 uro. Tudi v tem primeru je lahko do zastoja prišlo zaradi znižanja temperature fermentacije, kot v primeru nastajanja etanola. Končna koncentracija glicerola je v primeru fermentacije s temperaturno regulacijo višja za 0,2 g/L (Graf 84).

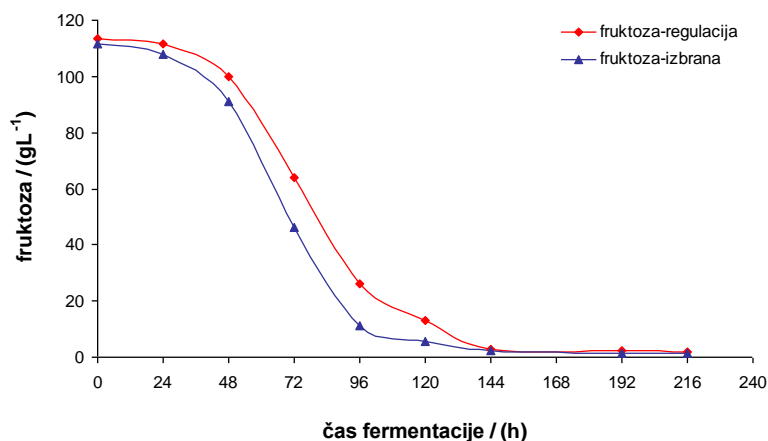


Graf 84: Nastajanje glicerola med fermentacijo, regulirano s pomočjo spreminjanja temperature v primerjavi z nastajanjem glicerola med izbrano fermentacijo.

Fermentacija sladkorjev (glukoze in fruktoze) se v primeru izbrane fermentacije zaključi po 96 urah in v primeru fermentacije z regulacijo temperature po 120 urah. Znižanja temperature med fermentacijo iz 18 na 16 °C pri kinetiki razgradnje sladkorjev ni mogoče opaziti. Končne koncentracije glukoze (1,6 g L⁻¹) in fruktoze (2,1 g L⁻¹) so enake v primeru obeh fermentacij. Zaključim lahko, da je fermentacija v obeh primerih potekla do konca.

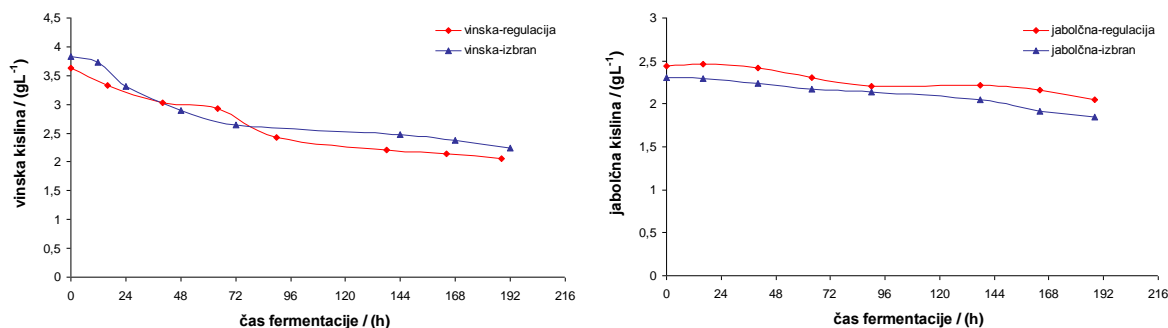


Graf 85: Poraba glukoze med fermentacijo, regulirano s pomočjo spreminjanja temperature v primerjavi s porabo glukoze med izbrano fermentacijo.

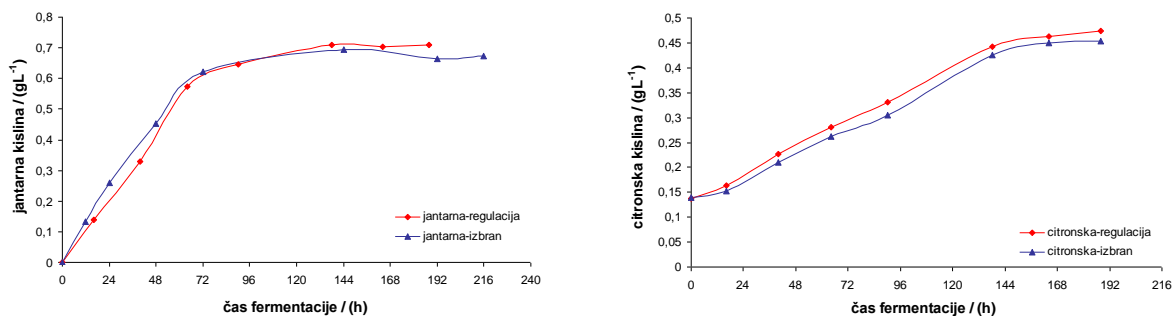


Graf 86: Poraba fruktoze med fermentacijo, regulirano s pomočjo spreminjanja temperature v primerjavi s porabo fruktoze med izbrano fermentacijo.

Zmanjšanje koncentracij vinske in jabolčne kisline med fermentacijama in končna razlika v koncentracijah le zelo malo vplivata na spremembo pH in senzorične lastnosti vina. V primeru vinske kisline se končna koncentracija razlikuje za 0,2 gL⁻¹ in v primeru jabolčne kisline prav tako za 0,2 gL⁻¹.

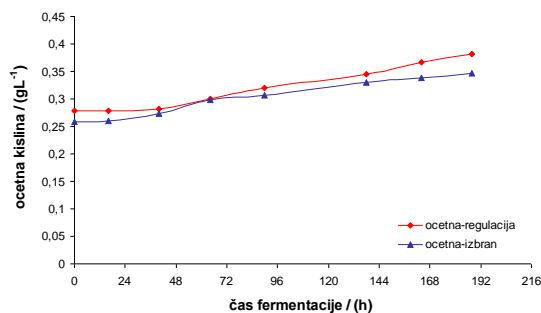


Graf 87 in 88: Vinska in jabolčna kislina med izbrano in regulirano fermentacijo.



Graf 90 in 91: Jantarna in citronska kislina med izbrano in regulirano fermentacijo

Končni koncentraciji jantarne in citronske kisline sta v primeru regulirane fermentacije višji. Maksimalna koncentracija jantarne kisline je v primeru regulirane fermentacije dosegla končno vrednost $0,70 \text{ gL}^{-1}$, med fermentacijo, ki smo jo izbrali pa $0,67 \text{ gL}^{-1}$. Razlika v koncentracijah je v sensoriki vin nezaznavna. Razlika koncentracij citronske kisline 40 mgL^{-1} je prav tako za končno sestavo in senzorične lastnosti vina nepomembna. Povišani koncentraciji obeh kislin v primeru regulirane fermentacije, pa sta lahko nastali zaradi povišanja temperature iz 16 na $22 \text{ }^\circ\text{C}$ po 36 urah od začetka fermentacije.



Graf 92: Očetna kislina med izbrano in regulirano fermentacijo

Ker večja količina očetne kisline med fermentacijo nastaja v za kvasovko stresnih pogojih in zato podaljšani fermentaciji, je v primeru fermentacije z regulacijo temperature, zaradi sprememb temperature nastalo več očetne kisline in sicer v primerjavi z izbrano fermentacijo, pri kateri je nastalo 346 mgL^{-1} očetne kisline, je med regulirano fermentacijo nastalo 382 mgL^{-1} očetne kisline.

Iz rezultatov eksperimentov sem ugotovili, da je mogoče spreminjati hitrost fermentacije mošta z regulacijo temperature fermentacije in s pomočjo vpihovanja CO_2 . Vpihovanje CO_2 med bioprosesom ima zaviralen učinek na hitrost poteka vrenja. Z vnosom ogljikovega dioksida v bioproses fermentacije lahko prekinemo ali upočasnimo potek fermentacije, kar je posebej primerno v tehnologiji pridelave sladkih in polsladkih vin z ustrezno (omejeno) vsebnostjo etanola. Z uporabo vnosa ogljikovega dioksida bi z zaviranjem metabolne aktivnosti biomase lahko preprečevali preintenzivno fermentacijo in pregrevanje mošta. Uporaba CO_2 bi lahko bila s stališča znižanja stroškov porabe energije za hlajenje bioprosesa v okviru vinarstva ugodnejša tehnološka rešitev kot hladilni sistemi, ki so danes v uporabi.

Raziskave na področju regulacije fermentacije imajo velik pomen v okviru vinarstva. Možnost regulacije fermentacije mošta nam omogoča doseganje visokokakovostnih končnih produktov.

Temperatura je v okviru fermentacije vina med najpomembnejšimi fizikalnimi parametri, ki vplivajo na hitrost bioprosesa. V okviru zaključka svojega raziskovalnega dela sem preučila vpliv spreminjanja temperature med procesom fermentacije in vpliv vpihovanja ogljikovega dioksida na fiziologijo kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* med fermentacijo mošta sorte sauvignon in s tem na spremembo redoks potenciala tekom procesa. Izvedla sem eksperimente fermentacij vodenih pri različnih temperaturah ter fermentacij med katerimi sem spreminjala temperaturo in vpihovala ogljikov dioksid, da bi se približala izbrani krivulji redoks potenciala, izmerjeni med procesom fermentacije. Med eksperimenti sem spremljala v

okviru *on-line* meritev spreminjanje redoks potenciala v drozgi in spreminjanje pH vrednosti ter izvajala s pomočjo HPLC in plinske kromatografije *off-line* analizo višjih alkoholov, glicerola, organskih kislin, sladkorjev in etanola.

Iz rezultatov eksperimentov sem ugotovila, da je mogoče spreminjati hitrost fermentacije mošta z regulacijo temperature fermentacije s pomočjo vpihovanja CO₂. Vpihovanje CO₂ med bioprosesom ima zaviralen učinek na hitrost poteka vrenja, zvišanje temperature pa zvišuje encimsko aktivnost in s tem pospešuje proces razgradnje reducirajočih sladkorjev in s tem proces fermentacije grozdnega mošta v vino.

5. DISKUSIJA

Vino je kompleksen sistem, sestavljen iz številnih komponent, ki v vinu obstajajo v oksidirani ali reducirani obliki – redoks pari. Tako redukcija ene komponente povzroči oksidacijo druge, dokler ni doseženo ravnotežje v sistemu. Med fermentacijo grozdnega mošta, ki poteka brez prisotnosti kisika nastajajo v seriji biokemijskih reakcij glikolitične poti razgradnje sladkorja, številne reduktivne komponente, ki vplivajo na spremembo redoks potenciala. Obstaja torej povezava med elektrodnim potencialom in nastankom produktov v seriji redoks reakcij, ki potekajo med procesom glikolize. Zaradi obstoja reverzibilnih redoks parov in nastanka ireverzibilnih redoks komponent se med procesom spreminjajo vrednosti redoks potenciala.

Meritve v redoks potenciala v vodni raztopini sladkorjev, s konstantnim pH = 2,8 in z povečevanjem koncentracije reduktivnih komponent med posameznimi eksperimenti, ki se nahajajo v vinu (acetaldehid, glicerol, etanol), so pokazale, da se vrednost redoks potenciala z zviševanjem koncentracije reduktivnih komponent znižuje, vendar pa to znižanje redoks potenciala manjše, kot je padec redoks potenciala med fermentacijo grozdnega mošta *in vivo* s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae*.

V primeru fermentacije grozdnega mošta na padec redoks potenciala *in vivo* na intervalu od 200 mV do – 300 mV, pomembno in odločujoče vpliva kvasna fiziologija ter številne kompleksne oksidativne in reduktivne komponente, ki v ciklu kvasnega metabolizma nastajajo ali se spreminjajo iz ene v drugo obliko. Razlog tako velikim spremembam je aktivacija encimatske verige, ki sodeluje v procesu alkoholne fermentacije grozdnega mošta v vino. Povečanje koncentracije etanola in glicerola, kot pomembnih reduktivnih produktov fermentacije grozdnega mošta v vino ter spremembe koncentracij organskih kislin, prispevajo k znižanju redoks potenciala med fermentacijo le manjši del. Večji del prispeva pretvorba acetaldehida v etanol, največji del pa prispeva mikroorganizem in njegov aktivni metabolni sistem.

Anaerobna konverzija glukoze v etanol s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* je redoks nevtralna in NAD^+ , ki se porablja v začetku Embden-Meyerhof-Parnas metabolne poti, se regenerira ob nastanku etanola. Kadar intermediati EMP metabolne poti postanejo prekursorji za sintezo celičnega materiala, je to ravnotežje porušeno. Presežek nastalega NADH se ne spreminja nazaj v NAD^+ . To lahko povzroči zaustavitev metabolizma, če ne obstaja proces, pri katerem se NAD^+ regenerira. Med anaerobno rastjo se NADH ne more oksidirati s kisikom, ampak se regenerira z nastankom sekundarnih produktov, kot je glicerol v primeru *Saccharomyces cerevisiae* (Oura, 1977). Reducirajoča moč NADH, ki nastane pri glikolizi, se mora transformirati v elektron akceptor, ki regenerira NAD^+ . Pri alkoholni fermentaciji je to acetaldehid. Med alkoholno fermentacijo kvasovke reoksidirajo NADH v NAD^+ v dvostopenjski reakciji od piruvata, ki se dekarboksilira do acetaldehida. Temu sledi redukcija acetaldehida, katalizirana z alkohol dehidrogenazo, ki vodi do nastanka etanola.

Presežek NADH se med anaerobnim procesom regenerira z nastankom glicerola, kar zagotavlja nastanek NAD^+ . Glicerol tako nastaja v začetku fermentacije, preden nastanejo večje količine acetaldehida. S pojavom acetaldehida, se prosti vodikovi ioni H^+ začnejo porabljati za njegovo redukcijo do etanola in ne za redukcijo glicerolaldehid-3-fosfata do nastanka glicerola.

Zaradi serije reduktivnih reakcij v ciklu anaerobnega kvasnega metabolizma, se vrednost redoks potenciala med procesom alkoholne fermentacije znatno znižuje. Padeč redoks potenciala je predvsem očiten v fazi, ko kvasovke preidejo iz aerobne faze rasti v anaerobno fazo, kjer se aktivirajo encimski kompleksi kvasovk in steče presnova sladkorjev po glikolitični poti. Med procesom glikolize pride do padca vrednosti redoks potenciala zaradi nastajanja reduktivnih komponent, ki nastajajo v ciklu kvasnega metabolizma in se iz kvasne celice izločajo v vino (acetaldehid, etanol, glicerol, redoks sistemi, ki jih tvorijo aminokisliline s SH (tiolnimi) skupinami, askorbinska kislina, fenoli in polifenoli v vinu...)

Aktivacija encimskega kompleksa kvasovk v kvasnem metabolizmu in nastanek reduktivnih komponent so vzrok za padeč redoks potenciala v procesu presnove sladkorjev s kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. V primeru fermentacije grozdnega mošta v vino, na padeč redoks potenciala *in vivo* na intervalu od + 200 mV do - 200 mV, pomembno in odločujoče vpliva kvasna fiziologija ter številne kompleksne oksidativne in reduktivne komponente, ki v ciklu kvasnega metabolizma nastajajo ali se spreminjajo iz ene v drugo obliko. Razlog tako velikim spremembam je aktivacija encimatske verige, ki sodeluje v procesu alkoholne fermentacije.

Pomembnejše redoks spojine, ki jih najdemo v vinu in prav tako vplivajo na spremembe vrednosti redoks potenciala, so še SO₂, askorbinska kislina in fenoli. Te spojine lahko reagirajo ali se vežejo s kisikom in tako znižajo redoks potencial v sistemu. Redoks reakcije s transferjem elektronov med kemijskimi komponentami v moštu in vinu, potekajo ves čas fermentacije. Spremembe v ekstracelularnem mediju, ki nastanejo z izločanjem primarnih in sekundarnih metabolnih produktov, povzročajo spremembe redoks potenciala.

Med fermentacijo grozdnega mošta krivuljo redoks potenciala razdelimo na štiri faze:

- *1.faza – faza aerobne rasti biomase*

je faza kjer je v moštu prisoten kisik iz zraka in je oksidacijsko - redukcijski potencial odvisen od koncentracije kisika v moštu. V tej fazi se vrednost redoks potenciala giblje v mejah, od 150 do 200 mV. Odvisno od tehnologije predelave se namreč v moštu raztapljajo različne količine kisika. V naslednjih nekaj urah lahko ob nadaljnji izpostavljenosti mošta zraku, redoks potencial naraste tudi do vrednosti 350 mV, zaradi s prisotnim kisikom povzročene oksidacije in nastanka peroksidnih komponent. Kvasovke se ob prisotnosti kisika v začetni fazi, hitreje razmnožujejo in posledično hitreje začnejo z alkoholnim vrenjem. Faza razmnoževanja kvasovk traja od 48 do 120 ur.

- *2.faza – faza prehoda iz aerobnega v anaerobno območje delovanja*

Ko kvasovke porabijo prisotni kisik za razmnoževanje in se del kisika veže na sestavine mošta, se redoks potencial zniža na začetno vrednost mošta od 150 do 200 mV. V tej fazi kvasovke preidejo iz aerobnega v anaerobno območje delovanja in začne se reduktivni proces alkoholnega vrenja. V tej fazi se porabi ves prisoten kisik in parcialni tlak kisika močno pade.

- *3.faza – anaerobna faza - proces alkoholne fermentacije*

Faza, v kateri se začne proces alkoholnega vrenja je faza, v kateri redoks potencial pade tudi pod vrednosti med 0 in 100 mV, ki jih smatramo za optimalne za razvoj cvetice in arome

vina. Za dobra vina je potrebno da alkoholna fermentacija poteka pri zelo nizkih redoks potencialih od 150 do -150 mV, v močno reduktivnem okolju. To nastane zaradi nastajanja reduktivnih komponent, v ciklu kvasnega metabolizma, ki se iz kvasne celice izločajo v vino.

V primeru glikolize ima redoks par NAD^+/NADH zelo nizek redoks potencial ($E_0 = -0,32$ V) zato oddaja elektrone elektron akceptorjem v isti verigi reakcij. Reducirajoča moč NADH, ki nastane pri glikolizi, se mora transformirati v elektron akceptor, ki regenerira NAD^+ . Pri alkoholni fermentaciji je to acetaldehid. NAD^+ v tem primeru deluje kot prenašalec elektronov. Prenos elektronov tako poteka iz NADH na acetaldehid, ki se nato reducira do etanola.

Intenzivna aktivnost kvasnih celic, ob porabi razpoložljivega kisika, skupaj s sproščanjem CO_2 in nastankom reduktivnih komponent, so vzroki za velik padec redoks potenciala v tretji fazi procesa. Redoks potencial pade do vrednosti -150 mV. Kvasovke del kisika porabijo za svoje razmnoževanje, preostali kisik pa nastali CO_2 izrine iz mošta. Hiter začetek alkoholnega vrenja omogoča metabolizem sladkorjev, kjer v začetni fazi nastaja čim manj piruvata in acetaldehida.

Trajanje tretje faze je odvisno od pogojev, pri katerih poteka fermentacija in poteka od 60 do 120 ur v laboratorijskem merilu oziroma od 10 do 30 dni v pilotnem merilu. V tretji fazi poteka razgradnja reducirajočih sladkorjev, nastane etanol, CO_2 , glicerol in drugi sekundarni produkti fermentacije. Ugotovila sem povezavo med padcem redoks potenciala in nastankom glicerola, sekundarnega produkta fermentacije. Večji razlika med začetnim in končnim redoks potencialom pomeni nastanek večjih količin glicerola. Prav tako v tej fazi nastajajo kisline Krebsovega cikla. Zaradi izločanja vinskega kamna se zmanjšuje koncentracija vinske kisline in pada koncentracija jabolčne kisline, ki se v procesu metabolizma delno pretvarja v jantarno kislino, delno pa iz nje nastaja etanol. V tej fazi se zaključuje večina za kakovost vina pomembnih biokemijskih reakcij.

Upočasnitev ali zaustavitev fermentacije je posledica porabe sladkorjev, inhibicije kvasnega metabolizma z nastankom etanola ter zmanjšanja vsebnosti dušika, zaradi česar je otežen in upočasnjen transport sladkorjev v celico.

- *4.faza – faza zorenja vina*

je faza, ko začne redoks potencial ponovno naraščati. To fazo imenujemo faza zorenja vina ali pojemajoča faza rasti kvasovk. Fazo zorenja vina lahko okarakteriziramo kot proces oksidacije, v odvisnosti od temperature in pH vrednosti. Začne se po končanem alkoholnem vrenju, ko potekajo pomembne kemijske spremembe, ki jih povzročajo povečano raztapljanje kisika. V tem delu potekajo za kakovost vina pomembne transformacije. Zelo pomembno je, da ta faza poteka v dovolj reduktivnem območju, kar pomeni, da se redoks potencial ne sme dvigniti preko vrednosti 180 mV, kar bi vplivalo na prehitro staranje vina. Pri redoks potencialu nad 180 mV se pričnejo kazati prvi znaki nepravilnega staranja, oziroma oksidacije vina, kot so temnejša barva vina, oksidiran okus vina. V tej fazi je kisik nezaželen faktor, zato se v času po končani fermentaciji, pred začetkom zorenja in staranja vina dodajajo v vino reducenti, kot sta askorbinska kislina in SO_2 , ki v sistemu znižujeta redoks potencial in ju zaradi narave delovanja uvrščamo v skupino redoks regulatorjev. Ta faza lahko traja tudi več tednov.

Med zorenjem, stekleničenjem in staranjem vina, imajo oksidacijsko-redukcijski procesi pomembno vlogo, ker vplivajo na karakter in na okus vina v znatnem obsegu. Stekleničenje vina poteka pri redoks potencialu v mejah med 0 in 140 mV, idealno območje pa je med 100 in 140 mV.

Vpliv temperature

Temperatura v skladu z Arrheniusovo enačbo pozitivno vpliva na hitrost kemijskih reakcij. Iz rezultatov eksperimentov poteka fermentacij pri različnih temperaturah je z dvigom temperature fermentacije vidno naraščanje encimske in metabolne aktivnosti. Naraščanje metabolne aktivnosti se dobro odraža na krivuljah redoks potenciala izmerjenih med različnimi fermentacijami.

Med eksperimenti pri treh različnih temperaturah (15, 18, 24°C) je potekala največja metabolna aktivnost kvasovke *Sacharomyces cerevisiae* pri temperaturi 24°C. Večanje metabolne aktivnosti kvasovk z večanjem temperature se je v sistemu odražalo kot večanje hitrosti rasti biomase in vzporedno večanje hitrosti razgradnje sladkorjev (glukoze in fruktoze in produkcije etanola. Etanol je produkt primarnega metabolizma, ki poleg CO₂ nastaja v procesu fermentacije in je lahko pokazatelj hitrosti bioprocasa. Največja metabolna aktivnost in hitrost generacije energije (v obliki ATP molekul) je v primeru produkcije etanola pri temperaturi 24°C, kar se odraža tudi v najhitrejši produkciji biomase, najhitrejši razgradnji reducirajočih sladkorjev in nastanku sekundarnih produktov.

Hitrost porabe substrata se je s povečanjem temperature fermentacije povečala. Hitrosti porabe glukoze med fermentacijami pri različnih temperaturah so nekoliko večje od hitrosti porabe fruktoze. Razlog je v nekoliko višji afiniteti transportnih encimov do glukoze v primerjavi s fruktozo.

Saccharomyces cerevisiae izloča večje količine glicerola, s katerim regulira spremembe redoks potenciala v procesu sinteze etanola. Kinetika nastanka glicerola je dvofazna, z visoko stopnjo nastajanja glicerola med fazo rasti kvasovk in manj intenzivno fazo nastajanja v stacionarni fazi rasti kvasovk. Večje količine glicerola nastajajo pri višji temperaturi fermentacije. Količina glicerola se povečuje z znižanjem vrednosti redoks potenciala med in po končani fermentaciji, kar pomeni, da se največ glicerola izloči pri temperaturi 24 °C, v primeru, ko je padec vrednosti redoks potenciala med fermentacijo največji.

Vpliv dodatka SO₂

Proučila sem vpliv dodatka žveplove(IV) kisline na kvasni metabolizem na začetek, potek in trajanje procesa alkoholne fermentacije. Metabolizem kvasovk zaradi dodatka žveplove(IV) kisline poteka nekoliko počasneje in manj intenzivno. Redoks potencial je v primerjavi z vrednostmi redoks potenciala pri fermentaciji, pod enakimi pogoji, v nežveplanem moštu, nižji in celotna krivulja je zamaknjena v bolj reduktivno območje. Dodatek žveplovega dioksida namreč zahteva prilagajanje kvasovk na nove pogoje v okolju, kar upočasnjuje rast in metabolne aktivnosti mikroorganizma in se odraža na znižanih vrednostih redoks potenciala in kasnejšemu začetku 3. faze redoks krivulje.

Inhibitorno delovanje žveplovega dioksida v moštu in vinu je posledica prisotnosti molekularne oblike SO₂, ki zaviralno vpliva na kvasovke, kar se kaže v upočasnjeni rasti in razmnoževanju. Inhibicija SO₂ je prisotna toliko časa, kolikor je prisotna prosta oblika SO₂. Ko je le ta vezana na acetaldehid, kar je značilno prej pri višji temperaturi fermentacije, se lahko zmanjša tudi redoks potencial, kot odraz začetka redukativnega procesa kvasnega metabolizma reducirajočih sladkorjev. Dodatek žveplove(IV) kisline povečuje koncentracije nastalega glicerola v vinu, ker veže nastali acetaldehid, ki bi odstranjeval NADH, potreben za produkcijo etanola. Presežek NADH se oksidira vzporedno z redukcijo dihidroksiaceton fosfata v glicerol-3-fosfat in se potem defosforilira v glicerol (Gardner *in sod.*, 1993).

Po zaključenem procesu alkoholne fermentacije se začenja faza zorenja in staranja vina, ki ima velik pomen za razvoj in ohranjanje senzoričnih kakovosti vina. Sestava vina se s časom spreminja in s tem se spreminja sestava fizikalno-kemijskega ravnotežja in stabilnosti vina zaradi premajhne zaščite pred oksidacijskimi procesi. To vodi v poslabšanje senzorične kakovosti vina. Zmanjšanje koncentracije prostega žveplovega dioksida v vinu vodi v povečanje vrednosti redoks potenciala. Naglo povečanje redoks potenciala preko vrednosti 150 mV opozarja na prisotnost kisika v vinu. Z dodatkom reducirajočih snovi, lahko preprečimo neželjeno oksidacijo vina.

Vpliv mešanja in temperaturne kontrole

Primerjava intenzitete in hitrosti poteka kvasnega metabolizma med fermentacijo z mešanjem in fermentacijo brez mešanja je pokazala, da je zaradi homogenizacije substrata, metabolizem poteka hitreje. Zaradi homogenizacije medija in boljšega snovnega prenosa kisika, je v tem primeru rast biomase potekala hitreje, kot v primeru stacionarnih pogojev. Ko je v zaradi metabolne presnove sladkorjev začel intenzivno nastajati CO₂, je prišlo do naravne konverzije, ki je pospešila kvasni metabolizem in izločanje redukativnih komponent v medij in s tem vplivala na padec redoks potenciala.

Vpliv temperaturnih šokov

Stresni parametri, kot so osmotski stres, oksidativni stres, temperaturni šok, pomanjkanje hranilnih snovi in toksičnost etanola in antimikrobnih snovi, zahtevajo specifično adaptacijo mikroorganizma za zagotovitev celične rasti in preživetja. Prvi stres predstavlja že rehidracija in inokulacija starter kulture, ki sta povezani s hiperosmotskim tlakom. Po adaptaciji celic na novo okolje sledijo stresni pogoji, vezani na samo alkoholno fermentacijo.

Da bi preprečile posledice temperaturnega šoka na fiziološke lastnosti in s tem na potek metabolizma, kvasovke razvijejo mehanizme, s katerimi v okolico izločajo snovi ki uravnavajo redoks ravnotežje. Kvasovke tako v primeru temperaturnega šoka v začetni fazi fermentacije začnejo izločati glicerol, ki regulira intra in ekstra celularno okolico, kar je nujno za rast in delovanje pri stresnih pogojih.

V eksperimentih vpliva temperature na potek kvasnega metabolizma sem ugotovila, da večje količine glicerola nastajajo pri višji temperaturi, ko je tudi padec redoks potenciala večji.

Ugotovitev mi je narekovala sklop meritev, s pomočjo katerih sem želela preveriti prilagajanje metabolizma kvasovk v stresnih pogojih z dvigom temperature na 34 °C. Če v eksponencialni fazi rasti pride do nenadnega povišanja temperature fermentacije ali temperaturnega šoka, mikroorganizem izpade iz svojega redoks ravnotežja in začne, za izravnavanje novo nastale redoks situacije, kot sredstvo za vzpostavitev ravnotežja, intenzivno tvoriti glicerol. Na ta način se prilagodi novemu okolju. Če pride ponovno do temperaturnega šoka, mikroorganizem reagira s produkcijo glicerola, ki pa ni več tako intenzivna, kot v prvem primeru. Ob motnji v procesu metabolizma s hitro spremembo fermentacijske temperature, je sprememba redoks potenciala uravnotežena z nastankom glicerola. To dejstvo je najbolj opazno v primeru dvojnega temperaturnega šoka.

Poskus regulacije fermentacijskega procesa v smeri zelenega redoks potenciala, ki sem ga izvedla s pomočjo spreminjanja temperature tekom procesa in s pomočjo vpihovanja CO₂ v substrat, je pokazal, da je moč vplivati na spreminjanje redoks potenciala in s tem na potek fermentacijskega procesa, vendar pa ni možno v celoti slediti določeni redoks krivulji, ki smo jo izbrali, kot optimalno za proces. Razlika, ki v tem primeru nastane med izbrano in regulirano krivuljo redoks potenciala, pa je zanemarljiva, če primerjamo še rezultate kinetike razgradnje in nastanka za proces pomembnih reaktantov in produktov. Regulacija s pomočjo temperature in vpihovanja CO₂ v smeri zasledovanja izbrane krivulje redoks potenciala je torej možna, izboljšali pa bi jo lahko z avtomatizacijo regulacijskega sistema.

6. ZAKLJUČKI

- ❖ V sodobni biotehnologiji predstavlja kvantifikacija in interpretacija intenzivnosti življenjskih procesov enega izmed osrednjih problemov tehnološkega razvoja postopkov. Tehnološka perfekcija inženirskih obratovalnih parametrov in naprav v mikrobioloških procesih pogosto ne vključuje celičnega metabolizma ali fizioloških potreb mikroorganizma v najpomembnejših fazah razvoja. *On-line* meritve redoks potenciala, ali meritve razmerja aktivnosti oksidantov in reducentov, ki se med procesom razvoja in rasti mikroorganizma sproščajo pri tem predstavlja tisto indikacijo, ki v vsakem bioprocesu aerobnem ali anaerobnem prikazuje odmev utripa življenja. Tako tudi v alkoholni fermentaciji grozdnega mošta v vino lahko uporabimo meritev redoks potenciala kot uporabno meritev, indikacijo, ki prikazuje vpliv zunanjih fizikalnih (temperatura, mešanje itd) ali kemijskih parametrov fermentacije na mikrobnem metabolizmu in njegovo fiziologijo. Temu pa so podrejeni produkti metabolizma, ki jih želimo čim več ali čim bolj kvalitetno proizvesti v čim krajšem tehnološkem procesu. Rezultate raziskav smo objavili v članku :
Kukec A., M. Berovič, Š. Čelan, M. Wondra. **2002** The role of on-line redox potential measurement in *Sauvignon blanc* fermentation. *Food technol biotech* 40 (1): 49-55.
- V predstavljenem doktorskem delu smo raziskali vpliv temperature, mešanja dodatka žveplovega dioksida in pulzev ogljikovega dioksida na meritve redoks potenciala v procesu metabolizma alkoholne fermentacije grozdnega mošta. Ugotovili smo, da meritev redoks potenciala dejansko predstavlja odraz aktivnosti encima sistema celičnega metabolizma, ki v primeru *in-vivo* dejansko presega potencialne posameznih oksido-reduktivnih produktov procesa, ki smo jih simulirali v primeru *in-vitro* simulacij. Ta ugotovitev dokazuje pomembnost uporabe meritev redoks potenciala kot najpomembnejše indikacije v tehnologiji fermentacije in nastajanju vina.
- ❖ Dodatek žveplovih spojin se uporablja v vinarstvu kot antioksidant in inhibitor mikrobiološke aktivnosti. Antimikrobno delovanje žveplovega dioksida v moštu je posledica prisotnosti molekularne oblike, ki vpliva zaviralno na kvasovke. Antimikrobno delovanje se kaže v upočasnjeni rasti in razmnoževanju kvasovk. Dodatek žveplove(IV) kisline v mošt povzroča inhibicijo kvasnega metabolizma, ter znižanje vrednosti redoks potenciala v sistemu. Ta se zgodi zaradi sodelovanja žveplovega dioksida v redoks reakcijah in vezave proste SO₂ na acetaldehid, kar onemogoča porabo NADH za nastanek etanola. Presežek NADH se zato oksidira v glicerol-3-fosfat in se defosforilira v glicerol, kar pa povzroči padec redoks potenciala. Inhibicija SO₂ na kvasovke v začetni fazi procesa se kaže s kasnejšim začetkom metabolizma, ki se odraža na podaljšanju lag faze rasti kvasovk in kasnejšem začetku 3. faze procesa, ki se začneja z intenzivnim padcem redoks potenciala. Žveplovim spojinam lahko zaradi antioksidativnega delovanja pripišem vlogo redoks regulatorja v procesu vinske fermentacije.
- ❖ Nastajanje glicerola drži v ravnotežju kvasni endocelularni oksidacijsko-redukcijski potencial ali celično NAD⁺/NADH redoks ravnotežje in tako preprečuje presežek NADH. Glicerol nastaja v začetku fermentacije, preden nastanejo večje količine acetaldehida. S pojavom acetaldehida, se prosti vodikovi ioni (H⁺) začnejo porabljati za njegovo

redukcijo do etanola in ne za redukcijo glicerolaldehid-3-fosfata do nastanka glicerola. Biosinteza glicerola se začne v eksponencialni fazi in se nadaljuje tudi v stacionatni fazi rasti kvasovk.

- ❖ Na osnovi temperaturnega šoka oziroma primeru temperaturne motnje kvasnega metabolizma z nenadno spremembo fermentacijske temperature smo izdelali učinkovito in enostavno metodo za povišanje produkcije glicerola v vinih. Koncentracija izločenega glicerola se je v primeru enojnega temperaturnega šoka povečala za 25 % in v primeru dvojnega temperaturnega šoka za 60 % v primerjavi z glicerolom, izločenim pri konstantni temperaturi. Pri dvojnem temperaturnem šoku v zgodnji eksponencialni fazi, so bile izmerjene višje koncentracije izločenega glicerola, do $11,0 \text{ gL}^{-1}$. Z uporabo enega temperaturnega šoka je nastalo $8,2 \text{ gL}^{-1}$ glicerola, med tem ko je v primeru fermentacije pri konstantni temperaturi nastalo $6,6 \text{ gL}^{-1}$ glicerola.

S to novo metodo, za katero je že precej zanimanja v tehnologiji vinarstva je mogoče pridelati suha vina z visko koncentracijo glicerola, kar predstavlja zelo pomemben tehnološki in kvalitativni dosežek. Postopek smo objavili v članku :

Kucec A, M. Berovič, M. Wondra, Š. Čelan, T. Košmerl. **2003**. Influence of temperature shock on the glycerol production in cv. *Sauvignon blanc* fermentation. *Vitis* 42 (4): 205-2

in ga zaščitili z patentom : Berovič M., A. Kucec, M. Wondra, T. Košmerl, Š. Čelan. **2004** Postopek povečanja tvorbe glicerola v fermentaciji vina z uporabo temperaturnih šokov ter naprave in instrumenti v zvezi s tem : S.I.P-200400108.

- ❖ Z ozirom na predhodno ugotovitev smo skušali rezultate raziskav aplicirati v vodenju tehnološkega procesa vinske fermentacije na osnovi indikacije redoks potenciala. Ob tem smo ugotovili, da je v primeru kontrolirane alkoholne fermentacije možno krmiliti proces oziroma ga pospeševati z povišanjem temperature ali pa ga zavirati z znižanjem temperature ali dodatnimi pulzi ogljikovega dioksida. Regulacija procesa fermentacije z različnimi dodatki oksidantov in reducentov seveda v primeru vina kot živila ne pride v poštev.

Ob tem smo ugotovili, da je možno, z ozirom na zbrano banko podatkov redoks potencialov alkoholnih fermentacij grozdnega mošta pri različnih letnikih vina v vino in analitskih in senzoričnih podatkov izbrati optimalni trajektorij redoks potenciala, ki ga moramo med procesom fermentacije z regulacijo temperature in pulzov ogljikovega dioksida slediti in s tem usmerjati proces fermentacije k čimboljšem izkoristku. Ob tem je jasno, da ni pričakovati velikih vin iz slabih letnikov, možno pa je iz slabih, na osnovi te tehnologije povišati uspeh fermentacije in njen kvalitativni izkoristek.

7. LITERATURA

- Adamič J. **1992**. Glive, Iz: Biotehnologija, Ur. P. Raspor, BIA d.o.o., Ljubljana, , str.: 54-70.
- Akashi K., S. Ikeda, H. Shibai, K. Kobayashi, Y. Hirose. **1978**. Determination of redox potential levels critical for cell respiration and suitable for L-leucine production. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 27-41.
- Alexandre H., I. Rousseaux, C. Charpentier. **1994**. Ethanol Adaptation Mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Appl Bioc* 20: 173-183
- Amerine, M. A. **1980**. Major changes in the processing of wines in California,. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.* 180: 1860–1960
- Amerine, M. A. **1985**. Winemaking. Iz: Koprowski, H. ed. / Plotin, S.A. ed. *Worlds Debt. To Pasteur.* New York, Alan R. Liss Inc., str. 67-81.
- André L., A. Hemming, L. Adler. **1991**. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS Lett.* 286: 13-17.
- Bagramyan K., A. Galstyan, A. Trchounian. **2000**. Redox potential is a determinant in the *Escherichia coli* anaerobic fermentative growth and survival effects of impermeable oxidant. *Bioelectrochem.* 51 (2): 151-156.
- Balakireva, L.M., V.M. Kantere, I.L. Rabotnova. **1974**. The redox potential in microbiological media. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.* No. 4: 769-780.
- Bandel G. **1996**. Vpliv rH vrednosti na kakovost vina. Diplomsko naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.
- Barron E.S.G., S. Levine. **1952**. Oxidations of alcohols by yeast alcohol dehydrogenase and by the living cell. The thiol groups of the enzyme. *Arch Microbiol* 41: 175-187.
- Bauer F.F., I.S. Pretorius. **2000**. Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency: How to Survive the Making of Wine – A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, Vol. 21, Special Issue: 27–51.
- Beck S., B. Schink. **1995**. Acetate oxydation through a modified citric acid cycle in *Propionibacterium-Freudenreichii*. *Arch Microbiol* 3: 182-187.
- Bely M. J.M. Sablayrolles, P. Barre. **1990**. Description of alcoholic fermentation kinetics; its variability and significance. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 41: 319-324.
- Benda I. **1982**. Wine and Brandy. Iz: Reed, G. ed. *Prescott and Dunn's industrial microbiology.* Westport, AVI Publishing Company, str. 293-402.
- Berovič M., A. Cimerman. **1982**. The redox potential of submerged citric acid fermentation on beet molasses. *Eur. J. Appl. Microbiol* 16: 185-188.
- Berovič M., A. Cimerman, P. Raspor. **1986**. Performance of stirred tank reactor and bubble column reactor in submerged citric acid fermentation. Iz: Lakota A. (ur.), Pavko A. (ur.). *Proceedings of*

- the 5th Yugoslavian-Austrian-Italian Chemical Engineering Conference, Portorož, Yugoslavia, September 16-18, 1986. Ljubljana: University, Department of Chemistry and Chemical Technology, str. 613-620.
- Berovič M. **1987**. Measurement of Redox Potential. Iz: Boris Kidrič Institute of Chemistry, Bioreactor Engineerin Course, Otočec, Okt. 5. – 11. 1987, str.: 327-345.
- Berovič M., A. Cimerman. **1998**. Postopek za submerzno biosintezo citronske kisline z glivo *Aspergillus niger* na substratu iz melase sladkorne pese: številka patenta 9111816, datum objave 28.II.1998: številka prijave 1816/91, datum prijave 20.XI.1991. Ljubljana: Urad Republike Slovenije za intelektualno lastnino.
- Berovič M. **1999** Scale-up of citric acid fermentation by redox potential control. *Biotechnology and Bioengineering*. 64 (5): 552-557.
- Berovič M., A. Kukec, M. Wondra, T. Košmerl, Š. Čelan. **2004** Postopek povečanja tvorbe glicerola v fermentaciji vina z uporabo temperaturnih šokov ter naprave in instrumenti v zvezi s tem : S.I.P-200400108.
- Berovič M., M. Rošelj, M. Wondra. **2000**. Possibilities of redox potential regulation in submerged citric acid bioprocessing on beet molasses substrate *Food technol. biotechnol.* Vol.38, (3): 93-201.
- Biorad. **1997**. Guide to Aminex HPLC Coloumns for Food and Beverage Analysis, Bio-Rad, Chemical Division, Richmond, CA, USA, str:17-24.
- Bisson L.F., **1993**. Yeast-Metabolism of sugars, Iz: Wine microbiology and biotechnology, G.H. Fleet, Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland. str.: 55 – 75.
- Bisson L.F., **1999**. Stuck and sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50 (1): 107-119.
- Blomberg A., L. Adler. **1989**. Roles of glycerol and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyce cerevisiae*. *J: Bacteriol.* 171: 1087-1092.
- Blomberg A., L. Adler. **1992**. Physiology of osmotolerance in funghi. *Adv. Microbial Phys.* 33: 145-212.
- Boulton R.B., V.L. Singleton, L.F. Bisson, R.E. Kunkee. **1996**. Principles and practices of winemaking. New York, Champman & Hall, str.: 604.
- Brock T.D., M.T. Madigan, J.M. Martinko, J. Parker. **1994**. Iz: Biology of microorganisms. 7th ed. London, Prentice-Hall International Inc., str.: 849.
- Brown A.D. **1976**. Microbial waterstress. *Bacteriol. Rev.* 40: 803-846.
- Bühler H., H. Galster. **1980**. Iz: Redox Measurement-Principles and Problems Dr. W. Ingold AG. Zürich.
- Camarasa C., JP. Grivet, S. Dequin. 2003. Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiol*, 149: 2669-2678.

- Charpentier C., M. Feuillat. **1993**. Yeasts autolysis. Iz: Fleet, G.H. ed. Wine-microbiology and biotechnology. Chur, Harwood Academic Publishers, str.: 225-242.
- Ciani M, L. Ferraro. **1996**. Enhanced glycerol content in wines made with immobilized *Candida stellata* cells. *Appl. Environ. Microb.* 62 (1): 128-132.
- Clark W.M. **1923**. Cohen B. Publ.Hilth. Rep. Wash. 1923, 38: s. 666.
- Colagrande O.; V. Mazzoleni. **1979**. New developments in red winemaking. *Industrie-delle-Bevande* ; 9 (6) 474-485.
- Costenoble R., H. Valadi, L. Gustafsson, C. Niklasson, C.J. Franzen. **2000**. Microaerobic glycerol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 16: 1483-1495.
- Cottrell T.H.E., McLellan. **1986**. The effect of the fermentation temperature on chemical and sensory characteristics of wines from seven grape cultivars grown in New York State. *Am J Enol Vitic.*, 37: 190–194.
- Charpentier C. M. Feuillat. **1993**. Yeasts autolysis. Iz: Fleet, G.H. ed. Wine-microbiology and biotechnology. Chur, Harwood Academic Publishers, str.: 225-242.
- Dahod S. K. **1982**. Redox potential as a better substitute for dissolved oxygen in fermentation process control. *Biotechnol. Bioeng.* 24 (9): 2123-2125.
- Deibner L. Mourgues, J. **1969**. Mitt. Rebe. Wein, *Obstbau Fruchtverwert* 19: 289.
- Delfini C., A. Costa. **1992**. Effects of the grape must lees and insoluble materials on the alcoholic fermentation rate and the production of acetic-acid, pyruvic-acid and acetaldehyde. *Am J Enol Viticult* 44 (1): 86-92.
- Deok-Kun O., K. Sang-Yong, K. Jung-Hoe. **1997**. Increase of xylitol production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*. *Biotechnol. Bioeng.* 58 (4): 440-444.
- Dikanović-Lučan Ž., A. Palić. **1995**. Redox potential in wine making process: a review. *Bulletin de L'O.I.V.*: 762-779.
- Dikanović-Lučan Ž., A. Palić. **1992**. Redox-potential of wines from Croatian market. *Z Lebensm Unters Forsch* 195: 133-136.
- Dittrich H. H., A. Wedler, W.R. Sponholz. **1976**. Über seltene Zucker in Mosten aus gesunden und Botrytis – infizierten Traubenbeeren, wie in den daraus gewonnen Weinen. *Wein-Wiss*, 35: 25-31.
- Doran P.M.. **1995**. In: *Bioprocess Engineering Principles*, Academic press limited.
- Du Prez J.C., B. Van Driessel, B.A. Prior. **1989**. The relation between redox potential and D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Biotechnol. Lett.* 10: 901-906.
- Eyer K., E. Heinzle. **1996**. On-line estimation of viable cells in a hybridoma culture at various DO levels using ATP balancing and redox potential measurement. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 277-283.
- Eustace R., R.J.Thornton. **1987**. Selective hybridization of wine yeasts for higher yields of glycerol. *Can. J Microbiol.* 33: 112-117.

- Farkaš J. **1988**. Iz: Technology and biochemistry of wine. Vol 1 & 2 Gordon and Breach Science Publishers S.A. Montreaux, SNTL Praha, Alfa Bratislava.
- Ferligoj A. **1993**. Naloge iz statistike, Ljubljana, Biografika BORI, p.o.
- Fiechter A. **1975**. Iz: Methods in Cell Biology, D.M. Prescott, Ed. Academic, New York. Vol. 11. str.: 97.
- Fleet G.H. **1991**. Cell wall. Iz: The Yeast, Vol.4: Yeasts Organelles, Academic Press, London. str.: 199-277.
- Fleet G.H., G.M.Heard. **1993**. Yeasts–growth during fermentation. Iz: Fleet G.H. ed. Wine-microbiology and biotechnology. Chur, Harwood Academic Publishers, str.: 27-54.
- Frivik S.K. in S.E. Ebeler. **2003**. Influence of Sulfur Dioxide on the Formation of Aldehydes in White Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 54: 31-38.
- Fuck, E., in F. Radler. **1972**. Malic acid metabolism of *Saccharomyces*. 1. The anaerobic decomposition of malic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 87:149-164.
- Fugelsang C.K. **1997**. Iz: Wine microbiology. New York, Champman & Hall, str.: 3-21.
- Furukawa K., E. Heinzle, I.J. Dunn. **1983**. Influence of oxygen on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *Biotechnol.Bioeng.* Vol. 25: 2293-2317.
- Gardner N., N. Rodrigue, C.P. Champagne. **1993**. Combined effects of sulfites, temperature and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2022-2028.
- Genevois L. **1936**. Acide succinique et glyc'erine dans la fermentation alcoolique. *Bull Soc. Chimie. Biol.* 18: 295-299.
- Genevois L. **1961**. Die Sekundärproducte der alkoholischen Gärung. *Brauwissenschaft* 14: 52-55.
- Graindorge P., S. Charbonnier, J.P. Magnin, C. Mauvy, A. Cheruy. **1994**. A software sensor of biological-activity based on a redox probe for the control of thiobacillus-ferrooxidans cultures. *J. Biotechnol.* 35 (1): 87-96.
- Hemming L.A.A., L. Adler. **1991**. FEBS Lett. 286: 13-17
- Henick-Kling T., J.H. Park. **1994**. Considerations for the use of yeast and bacterial starter cultures: SO₂ and timing of inoculation. *Am. J. Enol. Vitic.* 45: 464-469.
- Heppner B., G. Zellner, H. Diekmann. **1992**. Start-up and operation of a propionate degrading fluidized bed reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 36: 810-816.
- Herrmann, K. **1976**. Flavonols and flavones in food plants. *J. Food Technol.*, 11: 433-448.
- Herraiz T., P.J. Martin-Alvarez, G. Reglero, M. Herraiz, M.D. Cabezudo. **1989**. Differences between wines fermented with and without sulphur dioxide using selected yeasts. *J. Sci. Food Agric.*, 49: 249-258.

- Hewitt L.F. **1950**. Oxidation-reduction potentials in bacteriology and biochemistry, 6th ed. Edinburgh: Livingstone.
- Higerada A.E., L.D. Possani, O.T. Ramirez. **1997**. The use of culture redox potential and oxygen uptake rate for assessing glucose and glutamine depletion in hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 56: 555-563.
- Hill R. **1973**. A note of some old and some possible new redox indicators. *Bioenergetics* 4: 229-237.
- Hohmann S. **1997**. Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. Iz: *Yeast stress Response* ed. Hohmann, S. and Mager, W.H. Austin, TX: R.G. Landes. str.: 101-145
- Hohmann S. **1998**. Shaping up: The response of yeast osmotic stress. Iz: S.Hohmann, W.H.Mager (Eds.): *Yeast stress responses*, Springer, New York, str.: 101-145.
- Holzer H., W. Bernhardt, S. Schneider. **1963**. Zur Glycerinbildung in Bäckerhefe. *Biochem Z.* 336: 495-509.
- Hwang C., A.J. Sinskey. **1991a**. Iz: Spier RE, Griffiths JG, Meignier B, Ed. *Production from biological animal cells in culture*. Oxford: Butterworth-Heinemann.
- Hwang C., A.J. Sinskey. **1991b**. The role of oxidation-reduction potential in monitoring growth of cultured mammalian cells". Iz: R.E. Spier, J.F. Griffiths and B. Meignier (eds.), *Production of biologicals from animal cells in culture*. Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, str.: 548-568.
- Ishizaki A., H. Shibai, Y. Hirose. **1974**. Basic aspects of electrode potential change in submerged fermentation. *Agric. Biol. Chem.* 38: 2399-2406.
- Jacob H.E. **1970**. Iz *Methods in Microbiology* Vol. 2. Ed. J.R. Norris, D.W. Ribbons, Academic Press, London.
- Jacob H.E. **1971**. Das Redoxpotential in Bakterienkulturen. *Z. Allg. Mikrobiol.* 11: 691-734.
- Jacob H.E. **1974**. Reasons for the redox potential in microbial cultures. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* No. 4: 781-788.
- Judež M. **1981**. Vinarstvo. Maribor, Založba Obzorja.
- Kaake R.H., D.J. Roberts, T.O. Stevens, R.L. Crawford, D.L. Crawford. **1992**. Bioremediation of soils contaminated with the herbicide 2-sec-butyl-4,6-dinitrophenol (dinoseb). *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (5): 1683-1689.
- Kjaergaard L., B.B. Joergensen. **1976**. Maintenance of a constant redox potential during fermentation by automatic addition of glucose. Proceedings of the 5th International Fermentation Symposium, Berlin, str. 45-53.
- Kjaergaard L. **1977**. The Redox Potential: Its Use and Control in Biotechnology *Advances in Biochemical Eng.* 7: 131-150.
- Kramli A., S. Szabo. **1959**. *Acta. Biol. Acad. Sci. Hung.* 185-188.
- Kwong S.C.W., G. Rao. **1991**. Utility of Culture Redox Potential for Identifying Metabolic State Changes in Amino Acid Fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 38: 1034-1040.

- Kwong S.C.W., G. Rao. **1992**. Effect of Reducing Agents in an Aerobic Amino Acid fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, 40: 851-857.
- Kudo M., P. P. Vagnoli, L.F. Bisson. **1998**. Imbalance of pH and potassium concentration as a cause of stuck fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49: 295-301.
- Kukec A., M. Berovič, Š. Čelan, M. Wondra. **2002** The role of on-line redox potential measurement in *Sauvignon blanc* fermentation. *Food technol biotech* 40 (1): 49-55.
- Kukec A, M. Berovič, M. Wondra, Š. Čelan, T. Košmerl. **2003**. Influence of temperature shock on the glycerol production in cv. *Sauvignon blanc* fermentation. *Vitis* 42 (4): 205-206.
- Lafon-Lafourcade S. **1983**. Wine and Brandy, Iz: *Biotechnology*, H.J. Rehm et G. Reed, Verlag Chemie, Weinheim, str.: 83-163.
- Larson H. **1986**. Halophilic and halotolerant microorganisms – an overview and historical perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 3-7.
- Linko S. **1992**. Production of *Phanerochaete-chrysosporium* lignin peroxidase. *Biotechnol. Adv.* 10 (2): 191-236.
- Linnet N. **1970**. pH measurement in theory and practice. *Copenhagen: Radiometer A/S*, str.: 47-179.
- Mager W.H., S. Hohmann, **1997**. Stress response mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Iz: Hohmann, S. & Mager, W.H. (eds.). *Yeast stress response*. R. G. Landes Company, Austin. str.: 1-5.
- Malik F., E. Minárik. **1984**. Leihovarnictvo, droždiarstvo, vinárstvo. Iz: *Vinárstvo*. Bratislava, ES SVŠT, str.: 19-31.
- Malik F. **1998**. Bases of enology. Iz: Berovič, M. ed. Bioprocess engineering course, Brač, 27. 9.-2. 10. 1998. Ljubljana, National Institute of Chemistry, str.: 182-206.
- Martinez M.V., J.R. Whitaker. **1997**. The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Sci. Technol.*, 6(6): 195-200.
- Matkovicz B., E. Kovacz. **1957**. Untersuchung der zitronensäureproduction und der potentialveränderung in oberflächen and tiefkulturen. *Naturwissenschaften* 44: 447-451.
- Mavri J. **2000**. Vpliv temperature in CO₂ na fermentacijo v modelnih moštih rdečega vina, diplomsko delo, Ljubljana, str.: 3-19.
- Memmert K., C. Wandrey. **1987**. Continuous production of Bacillus exoenzymes through redox regulation. *An.n Acad Sci.* 506: 631-636.
- Mosey F. **1985**. Redox potentials in waste water treatment *Chem. Eng.* 414: 21-24.
- Muštovič S. **1985**. In *Vinarstvo sa enohemijom i mikrobiologijom*. Privredni pregled, OOUR grafička delatnost – Beograd.

- Nevoigt E., U. Stahl. **1997**. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 231-241.
- Nilov V.V. **1975**. Vinogradarstvo I Vinodelie. *Resp. Mezhved. Temat. Nauch. Sb.* : 18:26.
- Oh D.K., S.Y. Kim, J.H. Kim. **1998**. Increase of xylitol production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*. *Biotechnol. Bioeng.* 58 (4): 440-444.
- Oktyabrsky O.N., G.V. Smirnova. **1988**. Changes in the redox potential and number of accessible SH groups in cultures of *Escherichia coli* and *Bacillus Subtilis* during transient process. *Biochem. USSR* 53: 1749-1755.
- Oktyabrsky O.N., G.V. Smirnova. **1989**. Dynamics of redox potential in bacterial cultures growing on medium containing different sources of carbon, energy and nitrogen. *Acta Biotechnol.* 9: 203-209.
- Omori T., T. Ogawa, Y. Umemoto, K. Yuki, Y. Kajihara, M. Shimoda, H. Wada. **1996**. Enhancement of Glycerol Production by Brewing Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with Heat Shock Treatment. *J. Ferm and Bioeng.* 82 (2): 187-190.
- Ough C.S., D. Fong, M.A. Amerine. **1972**. Glycerol in wine: determination and some factors affecting. *Amer. J Enol Viti.* 23: 1-5.
- Ough C.S., **1980**. Vineyard and fermentation practices affecting wine. *Calif Agr* 34 (7): 17-18
- Ough C.S., M. Davenport, K. Joseph. **1989**. Effects of certain vitamins on growth and fermentation rate of several commercial active dry wine yeasts. *Amer. J. Enol., Vitic.* 40: 208-213.
- Oura E. **1973**. Energetics of yeast growth under different intensities of aeration. *Biotechnol Bioeng Symp* 0(4-1):117-127.
- Oura E. **1977**. Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochem.* 12: 19-21.
- Paul F. **1975**. SO₂ relationship in fermenting red wine mashes and must. V: Fourth International Enological Symposium, Valencia/Spain. E. Lemperle in J. Frank (Eds.), s: 76-85.
- Peck M., DP. Choweth. **1992**. On-line fluorescent monitoring of the metanogenic fermentation. *Biotechnol Bioeng* 39: 1151-1160.
- Peynaoud E. **1987**. Criteria of Quality of Wine. *Ann Technol Agr* 27 (1): 337-347.
- Peynaoud E., **1984**. Conditions for Development of Yeast-Conducting Alcohol Fermentation. Iz: *Knowing and Making Wine*. John Willey and Sons, Inc. s. 107-108.
- Pretorius I.S., T.J. Van der Westhuizen. **1991**. The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry – A review. *S Afr.J.Enol.Vitic.* 12, s. 3-31.
- Prior, B.A., S. Hohmann. **1997**. Glycerol production and osmoregulation. In F.K. Zimmermann & Entian, K: (eds.). *Yeast sugar metabolism: Biochemistry, genetics and applications*. Technomic Publ. CO. Lanchester. PA. str.: 313-337.
- Rabotnova I.L. **1963**. Die Bedeutung physikalisch – chemischer Faktoren für die Lebenstätigkeit der Bakterien, Fischer-Verlag, Jena.

- Radjai M.K., R.T. Hatch, T.W. Cadman. **1984**. Optimization of amino acid production by automatic self-tuning digital control of redox potential. *Biotechnol Bioeng Symp.* 14: 657-679.
- Radler, F., H. Schütz. **1982**. Glycerol production in various strains of *Saccharomyces*. *Am. J Enol Vitic.* 33: 36-40.
- Radovanović V. **1986**. Tehnologija vina, 2. predelana in dopolnjena izdaja, Beograd: Građevinska knjiga.
- Rankine BC., **1977**. Developments in Winemaking Technology. *Search* 8 (10): 354-360
- Rapp, A, 1989. Stickstoffverbindungen. Iz: Würdig, G. ed. Woller, R. ed. *Chemie des Weines*. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer, str.: 76-90.
- Raspor P. **1996**. Kvasovke. Iz: Biotehnologija osnovna znanja, Ur: P. Raspor, BIA d.o.o., Ljubljana, str.: 70-90.
- Ribéreau-Gayon, J. **1973**. “*Sciences et Techniques du Vin, Tome III*, Dunod, Paris. P.:646.
Singleton, V.L. Draper, D.E. 1963. *Am. J. Enol.Viticul.* 14:23.
- Ribéreau-Gayon P., S. Lafon-Lafourcade, D. Dubordieu, V. Lucmaret, F. Larue. **1979**. C.R. Acad. Sc., 289 D, s 441.
- Ribéreau-Gayon P., G. Seguin. **1980**. *Botrytis cinerea* in enology. Iz: Coley – Smith, J.R. ed. Verhoeff, K. ed. Jarvis, W.R. ed. *The biology of Botrytis*. New York, Academic Press, str.: 251-274.
- Ribéreau-Gayon P., D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvaud. **1998**. Handbook of Enology, Vol. 1, *The Microbiology of Wine and Vinifications*. New York, John Wiley & Sons.
- Ribéreau-Gayon P., D. Dubourdieu, B. Donèche, A. Lonvaud. **2000a** Handbook of Enology, Vol. 1, *The Microbiology of Wine and Vinifications*. New York, John Wiley & Sons.
- Ribéreau-Gayon P., Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu. **2000b** *Handbook of Enology, Vol. 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. New York, John Wiley & Sons.
- Robinow C.F. B.F. Johnson. **1991**, The Yeasts, Vol. 4.2nd ed., Yeast Cytology: An Overview, (A.H. Rose and J.S. Harisson, eds.), Academic Press, London, str. 373-395.
- Rodney P.J., P.F. Greenfield. **1982**. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme Microb Technology*, 4: 210-223.
- Rose H.A., J.S. Harrison. **1998**. Iz: The yeasts. Metabolism and physiology of yeasts. Volume 3, 2nd edition. London, Academic press, str.: 224-230.
- Russu E.I., A.S. Maksimova. **1992**. *Sadovod. Vinograd. Vinodel. Mold.* 7-9:25.
- Salmon J.M. **1989**. Effect of sugar transport inactivation in *saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 55: 953–958.
- Salmon J.M., O. Vincent, J.C. Mauricio, M. Bely. **1993**. Sugar-transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of anological fvermentations. *Am J Enol Viticul.* 44 (1): 56-64.

- Scanes K.T., S. Hohmann, B.A. Prior. **1998**. Glycerol Production by yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its Relevance to Wine: A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 19: 17-24.
- Schuldiner S., B.J. Piersma, T.B. Warner. **1966**. Potential of a platinum electrode at low partial pressure of hydrogen and oxygen. II. An improved gas-tight system with a negligible oxygen leak. *J Electrochem Soc.* 113: 573-577.
- Schulze U. **1995**. Anaerobic Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. Ph.D. Thesis. Department of Biotechnology. Technical University of Denmark.
- Shibai H., A. Ishizaki, K. Kobayashi, Y. Hirose. **1974**. Simultaneous measurement of dissolved oxygen and oxidation-reduction potentials in the aerobic culture. *Agric Biol Chem* 38: 2407-2411.
- Shibai H., A. Ishizaki, Y. Hirose. **1975**. *Proceedings of the First International Congress of the IAMS*, Business Center for Academic Societies, Japan Press, 5:154.
- Sols A. **1967**. Iz: *Aspects of Yeast Metabolism*, A.K. Mills and H.A. Krebs, Eds. Blackwell, Oxford. str.:47.
- Sponholz W. R. **1989**. Der Traubenmost. Iz: *Chemie des Weines*. Stuttgart, Verlag Eugen Ulmer, str.: 45-183.
- Stashenko H., C. Macku, S. Takayuki. **1992**. Monitoring volatile chemicals formed from must during yeast fermentation. *J Agric Food Chem* 40: 2257-2259.
- Streeter L. **1988**. Biochemistry. 3rd Ed. New York. Freeman and Company.
- Sukharevich V.I., E.P. Yakovljeva, V.A Tsyganov, N.N Shvezova. **1970**. The effect of aeration and redox potential of the medium on biosynthesis of levorin A and B. *Mikrobiologiya* 3: 981-985.
- Šantek M. **1993** Uvod u fiziku vina, Školska knjiga, Zagreb.
- Šikovec S. **1980**. Sodobno kletarjenje. Druga – dopolnjena izdaja. Ljubljana, ČZP Kmečki glas.
- Šikovec S. **1993**. Vinarstvo od grozdja do vina, ČZP Kmečki glas, Ljubljana.
- Tengerdy R.P: **1961**. Redox potential changes in 2-keto-L-gulonic acid fermentation. Correlation between redox potential and dissolved oxygen concentration. *Biotechnol Bioeng* 3: 255-272.
- Tomlinson J.W., P.A. Klimartin. **1997**. Measurement of the redox potential of wine. *Journal of Applied Electrochemistry* 27: 1125-1134.
- Van Dijken J.P., W.A. Scheffers. **1986**. Redox balances in the metabolism of sugars by yeast. *FEMS Microbiol Rev* 32: 199-224.
- Van Uden N. **1989**. Effect of alcohols on the temperature relations of growth and death in yeasts. V: Van Uden, Iz. ed. *Alcohol toxicity in yeasts and bacteria*. Boca Raton, CRC Press Inc., str.: 77-88.
- Van Vuuren H.J.J., J. Jacobs. **1992**. Killer yeasts in the wine industry. *Am J Enol Vitic*, 43: 119-123.
- Vannini L., Simone, G. de, Norscia, P., Romano, P., Suzzi, G. **1994**. *Ind. Bevande* 23: 414-417.

Verdhuyn C., E. Postma, W.A. Scheffers, J.P. Van Dijken. **1990.** *J. Gen. Micro.* 136: 359-403.

Vivas N., F. Zamora, Y. Glories. **1992.** Etude des phénomènes d'oxydoréduction dans les vins. Mise au point d'une méthode rapide de mesure du potentiel d'oxydoréduction. *J. Int. Sc. Vigne Vin*, 26 (4): 271-285

Vivas N., Y. Glories, A. Bertrand, F. Zamora. **1996.** Principe et méthode de mesure du potentiel d'oxydoréduction dans les vins. *Bull. OIV*, 69: 617-633.

Wales, D. S., Cartledge, T. G. & Lloyd, D. **1980.** Effects of glucose repression and anaerobiosis on the activities and subcellular distribution of tricarboxylic acid cycle and associated enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* 116, 93-98.

Wondra M. **1997.** Vpliv oksidantov na prehitro staranje stekleničnega vina. Iz: Bitenčevi živilski dnevi '97. Ljubljana 12.-13. junij 1997, str.: 212-217.

Young T.W. **1987.** Killer yeasts. Vol. 2. London, Academic Press, str.: 131-164.

Zinser E., G. Daum. **1995,** Isolation and biochemical characterisation of organelles from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 11: 493-536.

Zoecklein W.B., K.C. Fugelsang. H.B. Gump, S.F. Nury. **1995.** Wine analysis and production. New York, Champman & Hall, str.: 220-223.

Žorž M., **1991.** HPLC, samozaložba, Ljubljana.

<http://www.info.bio.cmu.edu/Courses/03231/LecF01/Lec05>

<http://www.bio.cmu.edu/courses/03231/LecF03/Lec32/Redox.html>