

# Zastosowanie drożdży w wybranych procesach biotechnologicznych

Sylwia Bonin

## 3.1. Drożdże w fermentacji winiarskiej

---

### 3.1.1. Część teoretyczna

Historia produkcji wina jest ściśle związana z rozwojem cywilizacji. Pierwsze wina rozpoczęto wytwarzać około 6 tys. lat p.n.e., w Azji Mniejszej, na terenach dzisiejszego Iranu i Armenii, a surowcem były owoce winorośli właściwej *Vitis vinifera*. Także obecnie pojęcie wina określa napój powstały w wyniku fermentacji alkoholowej owoców lub moszczy, czyli świeżych soków, owoców winorośli właściwej. Jeżeli do produkcji użyto owoce inne niż winogrona, to napój taki jest winem owocowym, a w jego nazwie podana jest nazwa owoców, na przykład wina wiśniowe, wina jabłkowe.

W produkcji win przez tysiąclecia wykorzystywano spontaniczną fermentację i nie znano, co jest jej przyczyną. Dopiero w drugiej połowie XIX wieku Ludwik Pasteur wykazał, że za przemianę cukru z winogron w alkohol, w warunkach bez dostępu powietrza, są odpowiedzialne drożdże obecne na owocach. Następnie Emil Christian Hansen z browaru Carlsberg w Kopenhadze wyizolował czystą kulturę drożdży. Dzięki temu możliwe stało się szczepienie moszczy wyselekcjonowanymi z owoców winogron szczepami drożdży szlachetnych, co zapewniało właściwy przebieg fermentacji i uzyskiwanie produktu o powtarzalnej jakości, ponieważ pozwoliło na uniezależnienie się winiarni od rodzimej mikroflory lokalnego surowca, która zależy od warunków klimatycznych, glebowych i odmiany winorośli. Obecnie fermentacje spontaniczne stosuje się rzadko, głównie do produkcji win na małą skalę. W przemysłowej produkcji win stosuje się powszechnie dodatek czystych kultur drożdży szlachetnych.

## Charakterystyka drożdży winiarskich

Drożdże winiarskie należą do gatunków *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces bayanus*, które zalicza się do grupy określanej jako *Saccharomyces sensu stricte*. Wykorzystywane w przemyśle winiarskim szczepy drożdży zostały wyizolowane z różnych odmian owoców (głównie winogron), a także moszczy, win, urządzeń produkcyjnych, winiarni. Noszą one nazwy sławnych regionów lub typów win, takich jak na przykład: Bordeaux, Malaga, Tokay czy Riesling. Obecnie w celu pozyskania drożdży o odpowiednich właściwościach wykorzystuje się, obok selekcji nowych szczepów, mutacje adaptacyjne oraz metody inżynierii genetycznej, a symbole takich szczepów składają się ze skrótów literowych oraz liczb. Przykładowo oferowane przez firmę Fermentis drożdże to CK S102, UCLM S325, VR 44.

Przy użyciu drożdży *Saccharomyces bayanus* uzyskuje się wina o większej zawartości etanolu (nawet 19% obj.) i niższej kwasowości lotnej w porównaniu z winami otrzymywanymi przy użyciu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Drożdże *S. bayanus* są wykorzystywane do fermentacji nastawów wysokocukrowych, wznawiania zatrzymanej fermentacji i produkcji win musujących, ponieważ niektóre szczepy fermentują w niskiej temperaturze.

Na podstawie badań genetycznych gatunek *S. bayanus* podzielono na dwie grupy. Pierwsza to *S. bayanus var. bayanus*, w której skład wchodzi szczepy będące naturalnymi hybrydami dwóch lub trzech gatunków, głównie: *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. kudriavzevii*. Druga grupa to *S. bayanus var. uvarum*, powszechnie określana jako *S. uvarum*. Cechą szczepów drożdży tej grupy jest brak fragmentów DNA innych gatunków *Saccharomyces* w materiale genetycznym, zatem nie są to szczepy hybrydowe.

Badania materiału genetycznego różnych szczepów drożdży należących do gatunku *S. cerevisiae* wykazały, że niektóre szczepy mają w swym materiale genetycznym fragmenty DNA innych gatunków z rodzaju *Saccharomyces*, zatem są to szczepy hybrydowe. Są one korzystne w procesach fermentacji, ponieważ zawierają cechy różnych organizmów, w związku z czym mogą się łatwiej adaptować do różnych środowisk fermentacyjnych, a naturalna hybrydyzacja jest ważnym mechanizmem ewolucji drożdży.

Drożdże stosowane do produkcji wina muszą spełniać określone cechy, które umożliwiają uzyskanie produktu o odpowiedniej jakości. Cechy drożdży winiarskich to:

- krótki okres adaptacji do środowiska moszczu,
- szybkie zafermentowanie,
- intensywna fermentacja, o prawidłowym przebiegu,
- synteza etanolu do wymaganego poziomu, ale także oporność na podwyższone stężenie etanolu,

- wytwarzanie produktów ubocznych fermentacji, które decydują o właściwym aromacie i smaku wina,
- mała wrażliwość na niskie pH i wysokie stężenie kwasów organicznych,
- zdolność do szybkiego osadzania się po zakończeniu procesu fermentacji, co ułatwia klarowanie,
- oporność na obecność związków siarki,
- oporność na wysokie stężenia garbników (w przypadku produkcji win czerwonych),
- oporność na wysokie ciśnienie CO<sub>2</sub> (w przypadku wtórnej fermentacji, czyli produkcji win musujących).

Oczywiście poszczególne szczepy znacznie się między sobą różnią. Różnice te dotyczą: optymalnych do wzrostu i fermentacji wartości temperatury, pH moszczu, zapotrzebowania na związki azotowe, tolerancji na alkohol, SO<sub>2</sub> i garbniki, oporności na stres osmotyczny związany z obecnością znacznych stężeń cukru, a także ilości oraz rodzaju wytwarzanych produktów ubocznych i wydzielanych do środowiska enzymów. Stąd dobór szczepu drożdży do wyprodukowania wina o zamierzonej charakterystyce odbywa się poprzez uwzględnienie zawartości cukrów, kwasów organicznych oraz barwników i garbników w moszczu, temperatury i czasu fermentacji, docelowej zawartości alkoholu i planowanych walorów sensorycznych produktu.

Drożdże winiarskie są z reguły organizmami mezofilnymi, o optymalnych wartościach temperatury fermentacji w granicach 20–28°C. Natomiast w czasie produkcji czerwonych win gronowych temperatura fermentującego moszczu może dochodzić nawet do 40°C, co wymaga zastosowania odpowiednich szczepów drożdży, zdolnych do fermentacji w wysokiej temperaturze i opornych na znaczne ilości garbników i polifenoli. Możliwe jest również prowadzenie tak zwanej zimnej fermentacji, w temperaturze około 4–6°C, przy użyciu szczepów drożdży krioofilnych. Zimna fermentacja trwa dłużej, jednak otrzymuje się wina bardziej wysyczone CO<sub>2</sub>, o większej zawartości alkoholu, niższej kwasowości lotnej i o korzystniejszych walorach sensorycznych niż wina wyprodukowane przy użyciu drożdży mezofilnych.

Pod względem zawartości wytworzonego alkoholu, drożdże można podzielić na: szczepy przeznaczone do produkcji win lekkich (o zawartości 9–11% obj. etanolu) – przykładowo Riesling, Sauternes; win średniej mocy (12–15%) – Tokay, Malaga i mocnych (powyżej 15 do 19%) – na przykład Portwein, drożdże *S. bayanus*.

Drożdże, które powodują niskie stężenia alkoholu, są wrażliwe na wysokie stężenie cukrów w moszczu, stąd ich zawartość w soku powinna wynosić 16–20%. W przypadku szczepów, które wytwarzają średnie ilości alkoholu, początkowa zawartość cukrów mieści się w przedziale 21–25%. W przypadku szczepów stosowa-

nych do produkcji win mocnych oraz miodów pitnych stężenie cukrów kształtuje się na poziomie 27–35%, przy czym szczególnie odporne są szczepy osmofilne, które prowadzą fermentacje miodów.

Czyste kultury drożdży dodaje się do moszczu lub nastawu w postaci drożdży suszonych lub płynnego inokulum określanego jako „matka drożdżowa”. Otrzymuje się ją poprzez kilkietapowe namnożenie komórek drożdży, w warunkach zapobiegających zakażeniom innymi drobnoustrojami. Namnażanie drożdży prowadzi się w spasteryzowanym, ochłodzonym i wzbogaconym w pożywkę azotową moszczu, przy czym w kolejnych etapach zwiększa się jego objętość oraz zawartość cukrów i SO<sub>2</sub>. W ostatnim pasażu skład podłoża jest analogiczny, jak poddawanego fermentacji. Dobrze namnożona matka drożdżowa powinna zawierać ponad 10<sup>8</sup> komórek w 1 cm<sup>3</sup>. Dodaje się ją w ilości średnio 5% objętości nastawu, aby zapewnić dominację dodawanego szczepu nad rodzimą mikroflorą surowca. Ponieważ proces przygotowania matki drożdżowej jest pracochłonny, trwa od 1 do 2 tygodni, a w tym czasie istnieje niebezpieczeństwo zakażenia obcą mikroflorą, więc w warunkach przemysłowych stosuje się aktywne drożdże suszone. Dodaje się je w ilości 20–30 g·hl<sup>-1</sup>, po rehydratacji w letniej wodzie, o 3–5-procentowym stężeniu sacharozy, przy czym czas rehydratacji nie powinien przekraczać 45 minut. Światowa produkcja drożdży suszonych jest zdominowana przez dwie firmy – Lallemand oraz Fermentis, należące do grupy Lesaffre.

## Fermentacja winiarska

### Regulacje prawne

Polska ze względu na warunki klimatyczne i tradycję nie należy do producentów win gronowych. Szacuje się, że winnice zajmują obszar około 500 ha, a produkcja win gronowych wynosiła w 2009 roku około 600 hl. Krajowy przemysł winiarski wytwarza głównie fermentowane napoje winiarskie, do których zalicza się: wina owocowe, wina z soku gronowego, napoje winne owocowe lub miodowe, miody pitne oraz napoje niskoalkoholowe. Produkcja win owocowych (wg GUS) w ostatnich latach wynosi około 1 mln hl.

Krajowe przepisy prawne dotyczące wyrobu napojów winiarskich reguluje między innymi Ustawa „O wyrobie i rozlewie wyrobów winiarskich, obrocie tymi wyrobami i organizacji rynku wina”. Zgodnie z Ustawą wyróżnia się dwie kategorie produktów – jedna obejmuje wspomniane fermentowane napoje winiarskie, a druga to wyroby winiarskie gronowe. Wyroby gronowe mogą być produkowane jedynie z owoców winorośli właściwej *Vitis vinifera* L. lub jej krzyżówek z innymi gatunkami z rodzaju *Vitis* dopuszczonymi do uprawy w danym kraju Wspólnoty Europejskiej. Fermentowane napoje winiarskie uzyskuje się w wyniku fermentacji różnych nastawów, a gotowe produkty różnią się między innymi rzeczywistym stężeniem al-

koholu. Wspomniany nastaw jest to mieszanina sporządzona z soku lub koncentratu owocowego, ewentualnie miodu pszczelego (wówczas otrzymujemy miody pitne), oraz z wody, dozwolonych substancji słodzących, z dodatkiem pożywek azotowych, kwasów organicznych i związków zawierających  $\text{SO}_2$ . Do produkcji win owocowych i napojów winnych owocowych używa się soki lub koncentraty otrzymane z owoców, z wyjątkiem winogron, przy czym głównym surowcem są jabłka. Udział soku owocowego w nastawach do produkcji win owocowych, w zależności od użytych owoców, wynosi od 20% (np. w przypadku róży) do 60% (np. w przypadku jabłek). W przypadku produkcji wina z soku gronowego jego udział w nastawie wynosi co najmniej 75%. Dalsze informacje dotyczące szczegółów produkcji wyrobów winiarskich są zamieszczone w rozporządzeniach Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

W przypadku win gronowych dodatek wody do moszczy gronowych jest zabroniony. W zależności od strefy upraw winorośli możliwe jest wzbogacanie moszczy w celu zwiększenia naturalnej objętościowej ilości alkoholu. W strefie A, w której znajduje się Polska, do wzbogacania można stosować sacharozę, jednak jej dodatek nie może zwiększyć zawartości alkoholu w winie powyżej 3% obj. (Rozporządzenie Rady WE nr 478/2008).

Zarówno w produkcji win gronowych, jak i fermentowanych wyrobów winiarskich, stosuje się sulfitację, czyli dodatek  $\text{SO}_2$ , który hamuje rozwój niepożądanego mikroflory – drożdży „dzikich” oraz bakterii octowych. Stosowane przed rozpoczęciem fermentacji dawki  $\text{SO}_2$  wahają się pomiędzy 30 a 120  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . W procesie produkcji  $\text{SO}_2$  może być także dodawany w kolejnym etapie, czyli leżakowaniu (dojrzewaniu) wina oraz przed rozlewem. Ponieważ  $\text{SO}_2$  jest substancją alergenną, więc konieczne jest zamieszczanie na etykiecie informacji, że produkt winiarski zawiera ten związek. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia maksymalna zawartość  $\text{SO}_2$  w winach owocowych i miodach pitnych wynosi 200  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . W przypadku win gronowych obowiązują przepisy Wspólnoty Europejskiej dotyczące wspólnej organizacji rynku wina, które zezwalają w przypadku niektórych typów win na większą zawartość  $\text{SO}_2$  niż w fermentowanych napojach winiarskich.

Sok gronowy zawiera zwykle azot w ilości wystarczającej do właściwego namnożenia drożdży i prawidłowego przebiegu fermentacji, stąd wzbogacanie moszczy w dodatkowe źródła azotu nie jest tak istotne, jak w produkcji fermentowanych wyrobów winiarskich. Wykorzystywany w naszym krajowym przemyśle w największej ilości surowiec – sok jabłkowy, zawiera niewielkie ilości związków azotowych, a bogate w azot soki, na przykład porzeczkowy, mocno się rozcieńcza ze względu na wysoką kwasowość, dlatego do nastawów dodaje się sole azotowe. Stosuje się wodorofosforan dwuamoni (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> w ilości nieprzekraczającej 0,4  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  i siarczan amoni (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w ilości do 0,3  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Przy czym można dodawać jedną sól lub obie.

## Etapy fermentacji

Do właściwego przebiegu fermentacji, który pozwala na osiągnięcie wysokiego stopnia odfermentowania, należy zapewnić odpowiednie w odniesieniu do danego szczepu drożdży warunki, między innymi: stężenie cukrów, zawartość związków azotowych i pH moszczu oraz temperaturę fermentacji. Fermentację prowadzi się w zbiornikach wypełnionych średnio w 85%, ze względu na powstawanie piany. W czasie fermentacji wyróżnia się trzy etapy, które wynikają z intensywności procesu, jak: zafermentowanie, fermentację burzliwą i dofermentowanie.

Pierwszy etap to zafermentowanie, w czasie którego najpierw drożdże wykorzystują obecny w moszczu/nastawie tlen, w związku z czym zachodzi ich intensywne namnażanie się. Liczba komórek drożdży zwiększa się kilkunastokrotnie. Następnie, gdy ilość tlenu ulega zmniejszeniu, rozpoczyna się rozkład cukrów. Od 1 do 3 dni po dodaniu drożdży obserwuje się stopniowe zmętnienie moszczu i pojawienie w nim pęcherzyków dwutlenku węgla. Na powierzchni cieczy tworzą się niewielkie skupiska piany oraz grudek, które zawierają białka, pektyny, garbniki.

W czasie fermentacji burzliwej zachodzi intensywny rozkład cukrów do alkoholu, wydzielane są znaczne ilości dwutlenku węgla, co powoduje pienienie się nastawu. W tej fazie syntetyzowana jest większość alkoholu, w związku z czym następuje znaczny spadek gęstości nastawu. Wraz ze wzrostem stężenia alkoholu i zmniejszeniem ilości cukru w nastawie tempo fermentacji spada. Obserwuje się zanikanie piany. Fermentacja burzliwa trwa 1–5 tygodni.

Ostatni etap to dofermentowanie. W tym okresie następuje znaczne spowolnienie procesu fermentacji w wyniku obumierania drożdży, spowodowanego wzrostem stężenia alkoholu i zmniejszeniem zawartości cukru. Następuje powolne dofermentowanie cukrów resztkowych. W związku z niewielkim tempem procesu fermentacji na powierzchni nie występuje piana, obserwuje się wolne wydzielanie CO<sub>2</sub>. Młode wino zaczyna się klarować. Na dnie zbiornika osadzają się drożdże, nierozpuszczalne sole, pektyny, białka. Dofermentowanie trwa od 1 do 3 tygodni.

Po tym okresie ściąga się wino znad osadu. Dłuższy czas przetrzymywania wina na osadzie drożdżowym nie jest korzystny, ponieważ zachodzi autoliza drożdży. Produkty autolizy nadają niekorzystny posmak drożdżowy oraz są pożywką do rozwoju bakterii, które również negatywnie wpływają na jakość wina.

## Fermentacja spontaniczna

Dodatek do moszczu czystych kultur drożdży szlachetnych znacząco przyspiesza rozpoczęcie burzliwej fermentacji oraz skraca jej czas. Ogranicza to ryzyko wystąpienia „chorób” wina oraz pozwala otrzymać produkt o zamierzonym składzie, ponieważ zapewnia stabilność procesu i sprawia, że jego przebieg jest bardziej przewidywalny i łatwiejszy do kontrolowania. Mimo to w wielu regionach świata,

przy produkcji win na małą skalę, nadal stosuje się fermentację spontaniczną. Ma to związek zarówno z lokalną tradycją, jak i dbałością o właściwe dla produkowanego wina – smak i bukiet, które wytwarzane są dzięki mikroflorze występującej w danym rejonie.

Fermentacja spontaniczna prowadzona jest przez drobnoustroje, które dostają się do moszczu z powierzchni użytych do jego produkcji owoców. Aby mikroorganizmy te mogły się swobodnie namnażać, moszczy nie szczepi się drożdżami szlachetnymi, nie pasteryzuje ani nie siarkuje. W początkowej fazie fermentacji spontanicznej biorą udział tak zwane drożdże dzikie: *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora* i *Zygosaccharomyces*. Większość z nich obumiera już po dwóch czy trzech dniach fermentacji, a dalszą fermentację prowadzą bardziej wytrzymałe na obecność etanolu drożdże z rodzaju *Saccharomyces*. Jednak niektóre gatunki nieszlachetne mają również wpływ na dalsze etapy procesu. Bogata mikroflora fermentacji spontanicznych wytwarza szerszy zakres enzymów, należących do grup proteaz, glukozydaz, pektynaz, lipaz, esteraz, niż jest w stanie wytworzyć pojedynczy szczep drożdży winiarskich. Enzymy te wspomagają ekstrakcję związków aromatycznych z owoców podczas fermentacji w miazdze i powodują ich przemiany, a także korzystnie wpływają na klarowność win. Ponadto drobnoustroje obecne podczas fermentacji spontanicznej syntetyzują większą liczbę związków smakowo-zapachowych niż drożdże szlachetne.

Jednak drobnoustroje występujące na powierzchni owoców mogą być również przyczyną wad i „chorób wina”. Ponieważ obecność wśród nich drożdży szlachetnych jest stosunkowo niewielka (około  $10^2$  jtk·g<sup>-1</sup>), więc środowisko fermentacyjne może zostać opanowane przez liczniej występujące (powyżej  $10^6$  jtk·g<sup>-1</sup>) drożdże dzikie, co w związku z ich mniejszą tolerancją na etanol nie pozwoli osiągnąć odpowiedniego stopnia odfermentowania, a także może negatywnie wpłynąć na smak, wskutek zbyt wysokiej koncentracji ich metabolitów. Ponadto w przypadku dominacji drożdży dzikich tempo fermentacji jest wolniejsze, przez co ułatwiony jest rozwój pleśni, mogących doprowadzić do zniszczenia partii wina. Na owocach obecne są także bakterie, na przykład z rodzajów: *Acetobacter*, *Lactobacillus* i *Oenococcus*. Niskie stężenie alkoholu może doprowadzić do nadmiernego rozwoju tych bakterii, a w efekcie do niepożądanego wzrostu stężenia kwasów mlekowego i octowego oraz mannitolu. Bakterie przyczyniają się także do zmniejszenia zawartości alkoholu i cukru, śluzowacenia wina oraz wystąpienia mysiego posmaku.

Należy zaznaczyć, że bakterie z rodzajów *Oenococcus* i *Lactobacillus* mogą także odgrywać korzystną rolę w kształtowaniu smaku i zapachu win, głównie win gronowych i cydrów. Mikroorganizmy te są odpowiedzialne za proces fermentacji jabłkowo-mlekowej, który polega na przekształceniu kwasu jabłkowego w kwas

mlekowy, i określany jest jako biologiczne odkwaszanie win. Rozkład 2 g kwasu jabłkowego powoduje zmniejszenie kwasowości ogólnej o  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , w przeliczeniu na kwas winowy. Wina, które zawierają większe ilości kwasu mlekowego, w stosunku do innych kwasów, charakteryzują się pełniejszym i bardziej łagodnym smakiem. Ponadto obecność kwasu mlekowego wzmacnia kolor i zapach wina.

Możliwe jest łączenie winiarskiej fermentacji spontanicznej z fermentacją prowadzoną przy użyciu czystych kultur drożdży. Można to osiągnąć poprzez wzbogacenie składu matki drożdżowej o dodatkowe, wyselekcjonowane z fermentacji spontanicznej gatunki. Inną metodą, pozwalającą na połączenie zalet fermentacji spontanicznej i szczepienia moszczy, jest przeprowadzenie fermentacji dwuetapowo. Na początku procesu prowadzi się kilkudniową fermentację spontaniczną, do osiągnięcia około 3–4% obj. alkoholu, a następnie szczepi się zafermentowany moszcz drożdżami szlachetnymi.

### Cechy sensoryczne win

Smak, zapach i barwę wina kształtują z jednej strony substancje zawarte w surowcu, a z drugiej strony – związki, powstające pod wpływem działalności drożdży w czasie procesu fermentacji, które określa się jako produkty uboczne fermentacji. Ilość i skład tych związków zależą od szczepu drożdży i warunków fermentacji. Jednak na ostateczny charakter wina wpływają także substancje, które powstają w wyniku przemian zachodzących w winie w czasie leżakowania.

Związkiem, który nadaje winom charakterystyczny aksamitny smak, cechy większej ekstraktywności i pełni smakowej oraz większej lepkości jest glicerol. Jest to trzeci pod względem ilościowym, po etanolu i  $\text{CO}_2$ , związek wytwarzany podczas fermentacji alkoholowej. W ilości powyżej  $5,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  przyczynia się on do zwiększenia odczucia słodczy, szczególnie win wytrawnych. Na zawartość glicerolu w winach wpływa stężenie etanolu. Na 100 g wytworzonego alkoholu, powstaje od 6 do 14 g glicerolu, co zależy od zastosowanego szczepu drożdży. Przykładowo firma Fermentis ma w swej ofercie szczep UCLM S325, który produkuje 10 g glicerolu na  $1 \text{ dm}^3$  wina, szczep NDA 21 wytwarzający  $8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , jak również drożdże *S. cerevisiae* S.C. 22, które charakteryzują się tworzeniem glicerolu na poziomie  $4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Drożdże syntetyzują różne kwasy organiczne, na przykład octowy, mlekowy, bursztynowy, oraz przekształcają liczne kwasy do innych związków. W zależności od szczepu drożdże mogą wpływać na wzrost lub spadek kwasowości, a także na zmianę rodzaju kwasów organicznych obecnych w fermentowanym nastawie, co ma istotny wpływ na smak wina. Kwasem, który powstaje zawsze w czasie fermentacji, jest kwas octowy. Z reguły jest on wytwarzany na poziomie od  $0,2$  do  $0,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Kwas octowy oraz jego homologii w formie wolnej i związanej kształtują kwaso-



wość lotną. W przypadku fermentowanych napojów winiarskich nie powinna ona przekraczać  $1,3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , a w przypadku napojów winnych nie powinna być większa niż  $0,9 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Wyższa kwasowość świadczy o rozwoju bakterii octowych.

Innymi wytwarzanymi przez drożdże winiarskie związkami, o znaczącym wpływie na własności smakowo-zapachowe, są estry, które nadają miłe owocowe i kwiatowe aromaty, na przykład: octan etylu – jabłkowy, octan izoamylu – bananowy i gruszkowy, octan fenyletanolu – różany. Powstawanie estrów jest przeważnie katalizowane przez enzymy drożdży z grupy esteraz. Na rynku dostępne są drożdże, głównie do produkcji win białych i różowych, charakteryzujące się zdolnością syntezy znacznych ilości estrów, które nadają winom przyjemne aromaty. Przykładowo szczep CK 102 w zależności od temperatury fermentacji produkuje estry o aromacie cytrusowym lub tropikalnym, a drożdże Saint Georges nadają aromat owocowo-kwiatowy.

Istotną rolę w kształtowaniu cech sensorycznych odgrywają także aldehydy. W czasie fermentacji powstaje najczęściej aldehydu octowego. Aldehydy nadają maślane, owocowy i orzechowy aromat, niektóre zaś – ostry, gryzący, niekiedy cierpki.

Do produktów ubocznych fermentacji winiarskiej zalicza się także alkohole wyższe, na przykład: alkohol *n*-propylowy, alkohol izobutyłowy, alkohol izoamylowy. Alkohole wyższe w winach w ilości do  $0,3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  odgrywają pozytywną rolę w kształtowaniu cech smakowo-zapachowych. Natomiast wyższe stężenie tych związków może przyczynić się do pogorszenia cech win, nadając im silny i ostry zapach.

W zależności od zastosowanego szczepu otrzymujemy wina o różnym składzie związków, co w konsekwencji prowadzi do powstania win o różnych cechach sensorycznych.

### 3.1.2. Część praktyczna

#### Cel

Celem doświadczenia jest porównanie procesu fermentacji nastawu na wino owocowe prowadzonego przez różne szczepy drożdży winiarskich.

#### Materiały i podłoża

**Materiał biologiczny:** wybrane szczepy drożdży winiarskich w postaci płynnego inokulum „matek drożdżowych” oraz w postaci drożdży suszonych. Inokulum otrzymano w wyniku kilkukrotnego namnażania drożdży na podłożach o wzrastającej zawartości cukrów i  $\text{SO}_2$ . Ostatnie namnożenie prowadzono na podłożu przygotowanym analogicznie, jak nastaw poddawany fermentacji.

## Wykonanie

### Oznaczanie liczby komórek drożdży

W celu porównania fermentacji prowadzonej przez różne szczepy, ilość drożdży użyta w procesie fermentacji musi być zbliżona. W związku z tym, jeżeli drożdże jednego szczepu były namnażane w kilku kolbach, należy je zlać do jednej kolby. Przed dodaniem drożdży suszonych należy przeprowadzić ich rehydratację w 3-procentowym roztworze sacharozy przez około 20 minut.

Liczbę komórek drożdży należy oznaczyć metodą liczenia bezpośredniego w komorze Thoma. W przypadku znacznej liczby komórek, należy wykonać rozcieńczenie. W tym celu pobrać 1 cm<sup>3</sup> inokulum i dodać do 9 cm<sup>3</sup> wody. Liczbę komórek ( $n$ ) w 1 cm<sup>3</sup> inokulum obliczyć na podstawie średniej liczby komórek w 1 kratce komory ( $k$ ), z uwzględnieniem rozcieńczenia (10). W obliczeniu wykorzystać wzór, który wynika z przeliczenia objętości jednej kratki w komorze na objętość 1 cm<sup>3</sup> ( $4 \times 10^6$ ):

$$n = k \times 4 \times 10^6 \times 10$$

Liczbę komórek drożdży podać w przeliczeniu na 1 cm<sup>3</sup>.

Drożdże w postaci „matki drożdżowej” dodawane są do nastawu w ilości 2–10% jego objętości, średnio 5%, stąd w zależności od objętości nastawu należy odmierzyć właściwą objętość inokulum drożdży. Drożdże suszone są dodawane w ilości 0,1–0,4 g·dm<sup>-3</sup>, przy czym należy dodać ilość zalecaną przez producenta.

### Przygotowanie nastawu do fermentacji

Fermentacji poddawany będzie nastaw na wino jabłkowe otrzymany z soku odtworzonego z koncentratu. Minimalny udział soku w nastawie na wino jabłkowe wynosi 60%. Średnia zawartość ekstraktu soku jabłkowego to 10%, a koncentratu 70%.

Przy obliczaniu składu nastawu (ilość koncentratu, sacharozy i wody) należy ustalić, o jakiej mocy i zawartości cukrów resztkowych wino chce się otrzymać oraz jaki udział soku ma zawierać nastaw. Przykładowe obliczenia składu nastawu na wino o zawartości alkoholu 15% obj. i zawartości cukrów resztkowych 20 g·dm<sup>-3</sup>, jeżeli udział soku w nastawie będzie wynosił 60%, przedstawiają się następująco:

Przygotowując 1 dm<sup>3</sup> nastawu, w którym udział soku wynosi 60%, potrzeba 0,6 dm<sup>3</sup> soku, co odpowiada 0,6 kg soku przy założeniu, że gęstość soku jabłkowego jest równa 1. Zatem koncentratu o ekstraktywności 70% potrzeba:

$$70 \times X \text{ kg} = 10 \times 0,6 \text{ kg}$$

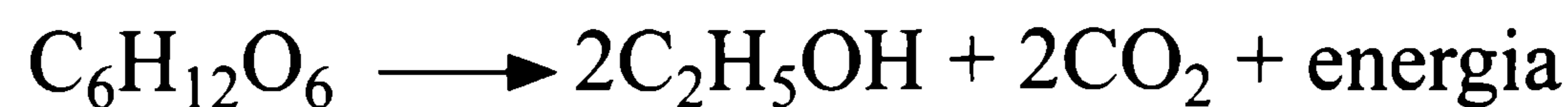
$$X = 0,086 \text{ kg koncentratu}$$

Koncentrat łatwiej jest odmierzyć w cylindrze, stąd po uwzględnieniu gęstości ( $1,347 \text{ kg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) zajmie on objętość:

$$0,086 \text{ kg} / 1,347 \text{ kg}\cdot\text{dm}^{-3} = 0,064 \text{ dm}^3 \text{ (64 cm}^3\text{)}$$

Z sokiem wprowadzany jest do nastawu cukier. Średnia zawartość cukrów w soku wynosi  $75 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , zatem do  $1 \text{ dm}^3$  nastawu wprowadza się z sokiem 45 g cukrów ( $0,6 \times 75 = 45 \text{ g}$ ).

Następnie należy obliczyć, ile cukru potrzeba dla uzyskania założonej ilości alkoholu. Punktem wyjścia jest równanie reakcji alkoholowej, w którym z cząsteczki glukozy o masie molowej 180 otrzymujemy dwie cząsteczki alkoholu, każda o masie 46, oraz dwie cząsteczki dwutlenku węgla, o masach molowych 44, oraz wydziela się ciepło.



Na podstawie powyższej reakcji ze 100 g glukozy uzyskuje się teoretycznie 51,1 g etanolu. W rzeczywistości ilość ta jest mniejsza, ponieważ fermentacja przebiega najczęściej z wydajnością 86–94%, średnio 90%, w stosunku do teoretycznej. Praktycznie powstaje więc 46 g etanolu ( $51,1 \times 0,9 = 46$ ).

Zawartość alkoholu podaje się w procentach objętościowych. Aby przedstawić 46 g w jednostkach objętościowych, należy skorzystać z gęstości alkoholu absolutnego, która wynosi:  $d = 0,7894 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Zatem 46 g zajmie objętość:  $46 / 0,7894 = 58,2 \text{ cm}^3$ . Wiedząc, że ze 100 g glukozy otrzymuje się praktycznie  $58,2 \text{ cm}^3$  alkoholu absolutnego, można obliczyć, ile glukozy potrzeba dla otrzymania 1% obj. etanolu:

$$\begin{array}{l} 100 \text{ g} - 58,2 \text{ cm}^3 \\ X \text{ g} - 1 \text{ cm}^3 \end{array} \quad X = 1,72 \text{ g}$$

W przypadku obliczeń na  $1 \text{ dm}^3$ , 1% obj. to  $10 \text{ cm}^3$ , więc w celu otrzymania 1% obj. alkoholu potrzeba 17,2 g glukozy.

Na wstępie obliczeń założono, że nastaw ma zawierać taką ilość cukrów, która umożliwi uzyskanie wina o 15% obj. alkoholu i  $20 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  cukrów resztkowych, czyli takich, które nie uległy fermentacji.

Aby uzyskać założoną ilość alkoholu, potrzeba:  $15 \times 17,2 \text{ g} = 258 \text{ g}$  glukozy. Dodatkowo cukry resztkowe to 20 g, zatem łącznie nastaw powinien zawierać 278 g cukrów.

Jak wcześniej wyliczono, z sokiem wprowadza się do nastawu 45 g cukru, zatem należy dodać  $278 - 45 = 233 \text{ g}$  cukrów prostych.

Jeżeli cukier dodawany jest w postaci sacharozy, czyli cukru konsumpcyjnego, to po uwzględnieniu współczynnika przeliczeniowego, który wynika z mas molo-

wych 1 cząsteczki sacharozy i dwóch cząsteczek glukozy ( $342/360 = 0,95$ ), sacharozy należy dodać:  $233 \times 0,95 = 221$  g.

Po rozpuszczeniu 1 kg sacharozy zajmuje on objętość  $0,63 \text{ dm}^3$ . Wyliczona ilość 221 g sacharozy zajmie objętość  $140 \text{ cm}^3$  ( $221 \times 0,63 = 140$ ).

Na koniec należy obliczyć dodatek wody:

$$1000 - 140 (\text{sacharoza}) - 64 (\text{koncentrat}) = 796 \text{ cm}^3$$

Podsumowując, aby przygotować  $1 \text{ dm}^3$  nastawu na wino o mocy 15% obj. oraz zawartości cukrów  $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , jeżeli udział soku w nastawie wynosi 60%, potrzeba:  $64 \text{ cm}^3$  koncentratu, 221 g sacharozy,  $796 \text{ cm}^3$  wody wodociągowej. Ponadto dla właściwego namnożenia drożdży należy wzbogacić nastaw w źródło azotu, optymalna dawka to 0,3 g  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  oraz 0,2 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . W celu uniemożliwienia rozwoju szkodliwej mikroflory dodać pirosiarczynu sodu  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  w ilości 80 mg, co odpowiada  $\text{SO}_2$  w ilości  $40 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

### **Nastawienie fermentacji**

Do butli wypełnionej średnio w 80% nastawem na wino owocowe wlać inokulum drożdżowy w ilości 5% objętości nastawu lub dodać drożdże suszone w ilości zalecanej przez producenta, po uprzedniej dehydratacji, przeprowadzonej zgodnie z zaleceniami producenta. Butle zamknąć korkiem z waty.

### **Porównanie fermentacji**

W czasie procesu fermentacji, co 2–3 dni, monitorować ich przebieg wagowo, poprzez określanie masy butli. Jako koniec fermentacji przyjąć bark spadku masy, oznaczający brak wydzielania się  $\text{CO}_2$ . Po fermentacji oznaczyć zawartość podstawowych składników win.

### **Oznaczenie ekstraktu pozornego**

Ekstrakt pozorny jest wypadkową ekstraktu rzeczywistego, na który składają się substancje nielotne z parą wodną (cukry, białka, garbniki, kwasy organiczne, glicerol, sole mineralne) oraz substancje lotne (etanol,  $\text{CO}_2$ , kwasy lotne oraz inne lotne produkty uboczne fermentacji). Zawartość ekstraktu jest potrzebna do przygotowania rozcieńczenia przy oznaczaniu cukrów. W celu oznaczenia ekstraktu pozornego wlać do cylindra wino i umieścić w nim areometr Ballinga. Odczytać zawartość ekstraktu w  $^\circ\text{B}lg$ .

### **Oznaczenie zawartości alkoholu**

W oznaczeniu tym określa się zawartość etanolu oraz jego homologów, które przeszły do destylatu. Wyrażana jest ona w procentach objętościowych, w temperaturze  $20^\circ\text{C}$ , czyli w ilości  $1 \text{ cm}^3$  alkoholu absolutnego w  $100 \text{ cm}^3$  wina. Oznaczenie

wykonuje się metodą destylacji z parą wodną w aparacie typu Buchi. W tym celu należy pobrać 100 cm<sup>3</sup> wina do gilzy, dodać kilka kropel fenoloftaleiny i 1-molowy wodorotlenek wapnia lub sodu, w takiej ilości, aby lekko zobojętnić wino. Umieścić gilzę w zestawie do destylacji, jako odbieralnik podstawić kolbę miarową o objętości 100 cm<sup>3</sup> i destylować do uzyskania 90–95 cm<sup>3</sup> destylatu. Po czym uzupełnić wodą destylowaną do kreski, wymieszać, ustalić temperaturę na 20°C, przelać do cylindra i oznaczyć zawartość alkoholu areometrem Trallesa.

### Oznaczenie zawartości cukrów ogółem

Oznaczenie obejmuje określenie wszystkich cukrów, które wykazują zdolność redukcji soli miedzi w środowisku alkalicznym. Zatem jeżeli wino zawiera sacharozę, należy najpierw przeprowadzić jej hydrolizę. Zawartość cukrów określa się metodą Luffa-Schoorla, która opiera się na utlenieniu cukrów do odpowiednich kwasów, w środowisku alkalicznym i w podwyższonej temperaturze, i redukcji soli Cu (II) do Cu (I), a następnie jodometrycznym oznaczeniu miedzi (II) zredukowanej przez cukry zawarte w próbce. W badanej próbce zawartość cukrów nie może przekraczać 62 mg w 25 cm<sup>3</sup>. Oznaczenie cukrów składa się z próby ślepej i próby właściwej. W próbie ślepej określa się ilość 0,1-molowego tiosiarczanu sodu, która jest potrzebna do zmiareczkowania jodu wydzielonego przez całkowitą ilość miedzi zawartą w 25 cm<sup>3</sup> płynu Luffa. W próbie właściwej do płynu Luffa dodaje się odpowiednio rozcieńczoną badaną próbkę, która redukuje część miedzi zawartej w płynie. Na podstawie różnicy w ilości tiosiarczanu sodu zużytego do zmiareczkowania próby ślepej i właściwej z tabeli 3.1 odczytuje się zawartość cukru w miareczkowanej

**Tabela 3.1.** Ilość glukozy odpowiadająca zużyciu 0,1-molowego Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (różnica między próbą ślepa a właściwą)

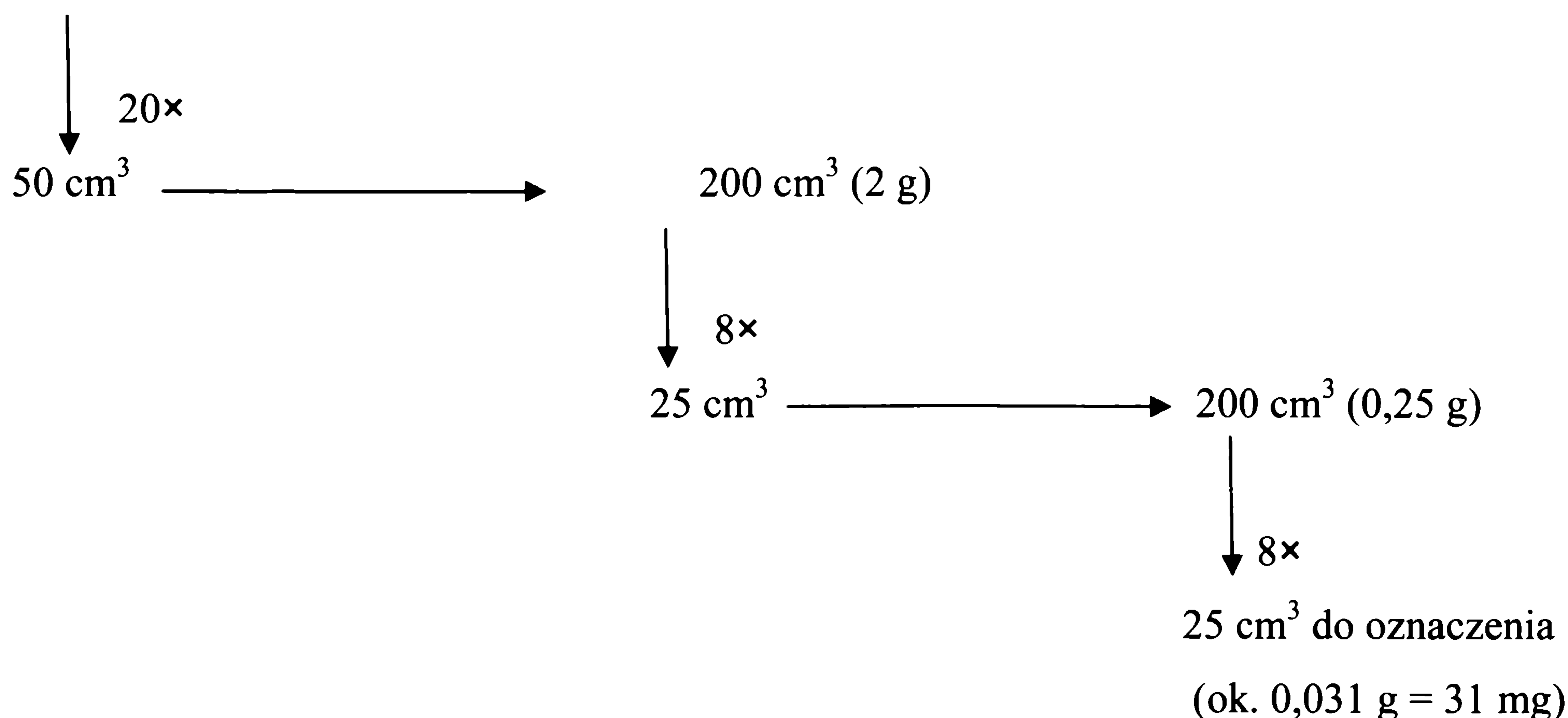
| Różnica cm <sup>3</sup> Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | Glukoza [mg] | Różnica cm <sup>3</sup> Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | Glukoza [mg] |
|---|--------------|---|--------------|
| 1   | 2,4          | 13  | 33,0         |
| 2   | 4,8          | 14  | 35,7         |
| 3   | 7,2          | 15  | 38,5         |
| 4   | 9,7          | 16  | 41,3         |
| 5   | 12,2         | 17  | 44,2         |
| 6   | 14,7         | 18  | 47,2         |
| 7   | 17,2         | 19  | 50,0         |
| 8   | 19,8         | 20  | 53,0         |
| 9   | 22,4         | 21  | 56,0         |
| 10  | 25,0         | 22  | 59,1         |
| 11  | 27,6         | 23  | 62,2         |
| 12  | 30,3         | –   | –            |

próbce. Po pomnożeniu ilości cukrów przez rozcieńczenie wylicza się zawartość cukrów w  $1 \text{ dm}^3$  i podaje się w  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , z dokładnością do jednej dziesiątej.

Przed oznaczeniem z wina należy usunąć związki, które mogą powodować błędy w oznaczaniu: alkohol i  $\text{SO}_2$  poprzez odparowanie podczas zagęszczania oraz białka, pektyny i inne koloidy poprzez klarowanie płynami Carreza.

W celu uzyskania właściwej dla metody ilości cukrów w próbce należy dokonać rozcieńczenia. Jako punkt wyjściowy zawartości cukrów przyjąć zawartość ekstraktu pozornego. Ze względu na to, że ilość cukrów otrzymana w ten sposób jest przybliżona, przyjąć, że zawartość cukrów w  $25 \text{ cm}^3$  próby do oznaczeń nie powinna przekraczać 50 mg. Przykładowy schemat rozcieńczeń przedstawiono poniżej:

$1000 \text{ cm}^3$  (około 40 g cukrów)



Rozcieńczenie =  $20 \times 8 \times 8 = 1280$

Ekstrakt pozorny wina wyniósł  $4^\circ\text{Blg}$ , zatem cukrów w winie było około 4%, czyli  $40 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

**Wykonanie oznaczenia:**  $50 \text{ cm}^3$  wina przenieść do parowniczkii, zobojętnić 1-molowym roztworem wodorotlenku sodu lub wapnia do pH około 5, następnie zagęścić na łaźni wodnej do około połowy objętości. Po zagęszczaniu zawartość parowniczkii przenieść ilościowo do kolby miarowej o objętości  $200 \text{ cm}^3$ , dodać po  $5 \text{ cm}^3$  płynu Carreza I i płynu Carreza II, aby przeprowadzić klarowanie. Uzupełnić do kreski, wymieszać i przesączyć przez karbowany sączek do kolby stożkowej. W celu przeprowadzenia hydrolizy pobrać  $25 \text{ cm}^3$  przesączu, dodać  $55 \text{ cm}^3$  wody destylowanej, a następnie – ostrożnie  $5 \text{ cm}^3$  stężonego kwasu solnego. Całość wymieszać ruchem kolistym, włożyć do kolby termometr i prowadzić hydrolizę w łaźni wodnej przez 10 minut, w temperaturze  $68\text{--}70^\circ\text{C}$  (temperatura wskazywana przez

termometr w kolbie). Następnie schłodzić kolbę, wyjąć termometr (przed wyjęciem splukując pozostałość hydrolizowanej cieczy wodą destylowaną do kolby), dodać kilka kropli oranżu metyloвого i zobojętnić 20-procentowym roztworem wodorotlenku sodu do zmiany barwy z pomarańczowoczerwonej do żółtej. Następnie zawartość kolby schłodzić, uzupełnić wodą destylowaną, wymieszać i jeżeli jest konieczność – rozcieńczyć.

**Wykonanie próby ślepej:** do kolby stożkowej pobrać 25 cm<sup>3</sup> płynu Luffa, 25 cm<sup>3</sup> wody destylowanej oraz wrzucić kilka porcelanek. Kolbę umieścić w zestawie z chłodnicą zwrotną i ogrzać do wrzenia w czasie 2 minut i utrzymywać w stanie wrzenia przez 10 minut. Następnie zdjąć kolbę z zestawu i ochłodzić, dodać 10 cm<sup>3</sup> 30-procentowego roztworu jodku potasu, a potem ostrożnie (ponieważ następuje pienienie) dodać 25 cm<sup>3</sup> 25-procentowego kwasu siarkowego. Zawartość kolby wymieszać i natychmiast miareczkować wydzielony jod 0,1-molowym roztworem tiosiarczanu sodu, wobec wskaźnika skrobiowego. Barwa roztworu będzie wówczas oliwkowa. Jako koniec miareczkowania przyjąć zmianę szarej barwy roztworu na mleczną. W próbie ślepej ilość zużytego tiosiarczanu mieści się w granicy 24–25 cm<sup>3</sup>.

**Próba właściwa:** wykonać ją identycznie jak próbę ślepa, tylko zamiast wody do kolby dodać 25 cm<sup>3</sup> badanego roztworu.

### Oznaczenie kwasowości ogólnej

Kwasowość ogólna jest sumą kwasów oznaczanych przez miareczkowanie próbki wina do pH 7,0. Przelicza się ją na kwas jabłkowy lub kwas winowy, przyjmując, że 1 mol NaOH odpowiada 1/2 mola C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub> lub C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>6</sub> i podaje w g·dm<sup>-3</sup>, z dokładnością do jednego miejsca po przecinku. Oznaczenie prowadzi się metodą miareczkowania wobec elektrody pehametru lub miareczkowania z błękitem bromotymolowym, który w pH 7,0 ma barwę zieloną, w kwaśnym – żółtą, a zasadowym – niebieską.

Do oznaczania kwasowości **metodą potencjometryczną** należy pobrać do zlewki 20 cm<sup>3</sup> wina, włożyć mieszadełko magnetyczne, umieścić zlewkę na mieszadle elektromagnetycznym, włożyć elektrodę i włączyć mieszadło na najniższe obroty, a następnie miareczkować 0,1-molowym NaOH do pH 7,0.

W czasie oznaczania kwasowości **metodą z błękitem bromotymolowym** należy wykonać próbę wstępną, która stanowi wzorzec barwy, i próbę właściwą.

**Próba wstępna:** do kolby stożkowej pobrać 25 cm<sup>3</sup> wygotowanej wody destylowanej, dodać około 1 cm<sup>3</sup> błękitu bromotymolowego oraz 5 cm<sup>3</sup> wina, a następnie miareczkować 0,1-molowym NaOH do barwy zielonej. Po uzyskaniu barwy dodać 5 cm<sup>3</sup> buforu o pH 7,0 i pozostawić jako wzorzec barwy. W tym miareczkowaniu nie jest ważna ilość zużytej do miareczkowania zasady.

**Próba właściwa:** do drugiej kolby stożkowej pobrać  $30\text{ cm}^3$  wygotowanej wody destylowanej, dodać około  $1\text{ cm}^3$  błękitu bromotymolowego oraz  $5\text{ cm}^3$  wina, a następnie miareczkować 0,1-molowym NaOH do barwy identycznej jak wzorzec.

### Oznaczenie kwasowości lotnej

Kwasowość lotna odpowiada zawartości kwasu octowego i jego homologów. Oznaczenie polega na wydzieleniu kwasów lotnych z wina metodą destylacji z parą wodną i miareczkowaniu na gorącą 0,1-molowym roztworem NaOH. W przypadku obecności  $\text{SO}_2$  należy wprowadzić poprawkę na jego obecność, ponieważ kwas siarkowy (IV) przechodzi do destylatu i ulega zobojętnieniu miareczkowaną zasadą. W tym celu po zmiareczkowaniu destylatu NaOH należy próbkę ochłodzić, zakwaszyć w celu przekształceniu soli kwasu siarkowego (IV) w wolny kwas siarkowy, a następnie oznaczyć zawartość  $\text{SO}_2$  metodą jodometryczną. Ilość zużytego jodu należy odjąć od ilości wodorotlenku sodu, po uprzednim przeliczeniu na takie same normalności obu związków. Kwasowość lotną przelicza się na kwas octowy, przyjmując, że 1 mol NaOH odpowiada 1 molowi  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , i podaje w  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , z dokładnością do dwóch miejsc po przecinku.

Do oznaczenia kwasowości pobrać  $20\text{ cm}^3$  wina do gilzy destylacyjnej. Destylację wykonać w aparacie do destylacji typu Buchi. Jako odbieralnik użyć kolbę stożkową, do której zebrać około  $120\text{ cm}^3$  destylatu. Destylat ogrzać do wrzenia, dodać 2–3 krople fenoloftaleiny i na gorąco miareczkować 0,1-molowym NaOH do lekko różowego zabarwienia. Następnie kolbę ochłodzić, dodać kilka kropli 1-molowego  $\text{H}_2\text{SO}_4$  do odbarwienia i natychmiast miareczkować 0,01-molowym roztworem jodu w obecności wskaźnika skrobiowego do barwy niebieskogrnatowej.

### Oznaczenie zawartości $\text{SO}_2$ w winie

$\text{SO}_2$  występuje w winie w formie wolnej i związanej z grupami aldehydowymi związków organicznych. Zawartość oznacza się metodą jodometryczną. Wolny  $\text{SO}_2$  oznacza się przez bezpośrednie miareczkowanie próbki. W celu oznaczenia  $\text{SO}_2$  związanego próbkę alkalizuje się celem rozłożenia  $\text{SO}_2$  związanego do formy wolnej. Po 10–15 minutach próbkę zakwasza się, ponieważ reakcja jodometrycznego oznaczania  $\text{SO}_2$  przebiega w środowisku kwaśnym. Na podstawie zużytego jodu oblicza się ilość  $\text{SO}_2$  w winie, przyjmując, że 1 mol jodu odpowiada cząsteczce  $\text{SO}_2$ . Zawartość  $\text{SO}_2$  podaje się w  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Oddzielnie oblicza się ilość dwutlenku siarki wolnego i związanego, a całkowitą zawartość  $\text{SO}_2$  oblicza się jako sumę formy wolnej i związanej.



W celu **oznaczenia SO<sub>2</sub> wolnego** pobrać do kolby stożkowej 10 cm<sup>3</sup> wina, dodać około 1 cm<sup>3</sup> wskaźnika skrobiowego i niezwłocznie miareczkować 0,01-molowym jodem do barwy granatowej. Na podstawie ilości zużytego jodu obliczyć zawartość SO<sub>2</sub> wolnego. Próbkę pozostawić do oznaczenia w niej ilości SO<sub>2</sub> związanego.

W celu **oznaczenia SO<sub>2</sub> związanego** do uprzednio zmiareczkowanej próbki dodać 10 cm<sup>3</sup> 1-molowego NaOH, wymieszać i odstawić na 10–15 minut. Po tym czasie dodać 6–8 cm<sup>3</sup> 1-molowego H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, następnie dodać około 1 cm<sup>3</sup> wskaźnika skrobiowego i niezwłocznie miareczkować 0,01-molowym jodem do barwy granatowej. Na podstawie ilości zużytego jodu obliczyć zawartość SO<sub>2</sub> związanego.

### Wykonanie oceny sensorycznej

Ocena sensoryczna jest ważną informacją o jakości wina. Cechy sensoryczne win zależą od surowca, szczepu drożdży i warunków fermentacji. W tych samych warunkach procesu możemy uzyskać wina o zupełnie innym smaku i zapachu w zależności od zastosowanego szczepu drożdży. W ocenie win bierze się pod uwagę następujące cechy: klarowność, barwę, zapach i smak. Stosowane są różne skale oceniania. Najłatwiejsza to system 5-punktowy, z możliwością oceny co pół punktu, co pozwala na uzyskanie 9 poziomów jakości. Poszczególne punkty odpowiadają następującym określeniom: 5 – jakość bardzo dobra, 4 – dobra, 3 – dostateczna, 2 – niedostateczna, 1 – zła. Ponieważ poszczególne cechy w różnym stopniu wpływają na końcową ocenę, więc przy wyliczaniu oceny ogólnej stosuje się współczynniki ważkości dla każdej cechy, na przykład: klarowność – 1, barwa – 1, zapach – 2, smak – 6. Ocenę ogólną wylicza się wówczas jako średnią ważoną, to znaczy sumuje się oceny każdej cechy po wcześniejszym pomnożeniu przez współczynnik ważkości i podzieleniu przez sumę współczynników ważkości:

$$\text{ocena ogólna} = \frac{\text{klarowność} \times 1}{10} + \frac{\text{barwa} \times 1}{10} + \frac{\text{zapach} \times 2}{10} + \frac{\text{smak} \times 6}{10}$$

Przy czym ocena każdej cechy jest to średnia arytmetyczna z ocen poszczególnych członków komisji oceniającej.

Przeprowadzić analizę wina, oceniając komisyjnie barwę, zapach i smak w skali 5-punktowej, o 9 poziomach jakości. W przypadku win bezpośrednio po procesie fermentacji, ze względu na brak procesu klarowania, nie ocenia się klarowności win. Ocenę ogólną obliczyć jako średnią ważoną, przyjmując współczynniki ważkości: barwa – 1, zapach – 2, smak – 6.

### 3.1.3. Literatura

- BONIN S., WZOREK W., 2005: Wybrane zagadnienia z technologii winiarstwa. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- BURKOT P., 2010: Wino gronowe z polskich winnic, <http://www.agroplony.pl/produkcja-rolna/produkcja-roslinna/267-wino-gronowe-z-polskich-winnica>, pobrane 22.09.2010.
- Charakterystyka drożdży winiarskich oferowanych przez firmę Fermentis: <http://www.fermentis.com/winemaking/product-range/<http://www.fermentis.com/FO/10-Home/home.asp>> [data pobrania 16.12.2012].
- Charakterystyka drożdży winiarskich oferowanych przez firmę Lallemand: [http://www.lallemandwine.com/spip.php?rubrique3&id\\_mot=19&lang=en](http://www.lallemandwine.com/spip.php?rubrique3&id_mot=19&lang=en) [data pobrania 16.12.2012].
- ESTEVE-ZAROS B., MANZANARES P., RAMON D., QUEROL A., 1998: The role of non-Saccharomyces yeast in industrial winemaking. *Internatl. Microbiol.* 1, 143–148.
- LUBBERS S., VERRET C., VOLLEY A., 2001: The effect of glycerol on the perceived aroma of a model wine and a white wine. *Lebensm. Wissen. Technol.* 34, 262–265.
- MOLINA A.M., SWIEGERS J.H., VARELA CH., PRETORIUS I. S., AGOSIN E., 2007: Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 675–687.
- ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI z dnia 9 grudnia 2004 roku w sprawie szczególnych rodzajów fermentowanych napojów winiarskich oraz szczegółowych wymagań organoleptycznych, fizycznych i chemicznych dla tych napojów (Dz.U. nr 272, poz. 2696).
- ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI z 2 maja 2005 roku w sprawie szczegółowego sposobu wyrobu fermentowanych napojów winiarskich oraz metod analiz tych napojów do celów urzędowej kontroli pod względem jakości handlowej (Dz.U. nr 88, poz. 748).
- ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA z 22 listopada 2010 roku w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych (Dz.U. nr 232, poz. 1525).
- ROZPORZĄDZENIE RADY WE nr 478/2008 z 29 kwietnia 2008 roku w sprawie wspólnej organizacji rynku wina.
- TORREA D., FRAILE P., GARDE T., ANCÍN C., 2003: Production of volatile compounds in the fermentation of chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. *Food Control* 14, 565–571.
- USTAWA z 12 maja 2011 roku o wyrobie i rozlewie wyrobów winiarskich, obrocie tymi wyrobami i organizacji rynku wina (Dz.U. nr 120, poz. 690).
- WZOREK W., POGORZELSKI E., 1998: Technologia winiarstwa owocowego i gronowego. SIGMA-NOT, Warszawa.