

Określanie skuteczności fermentacji jabłkowo-mlekowej. (Kontrola FJM)

Boguchwała 27.11.2011

Jacek Jamrozik

Spis treści

1.Cel kontroli	str. 3
2.FJM	str. 3
3.Kontrola organoleptyczna	str. 5
4.Monitorowanie kwasowości ogólnej i lotnej	str. 5
5.Oznaczanie kwasu jabłkowego	str. 7
Testy paskowe	str. 7
Chromatografia bibułowa	str. 7
Roztwór rozwijający	str. 8
Przygotowanie bibuły	str. 9
Nanoszenie kropli na bibułę	str. 9
Tworzenie chromatogramu na bibule	str. 11
6. Wnioski	str. 12

Literatura:

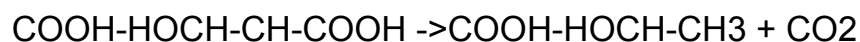
- 1.E. Pijanowski - „Zarys technologii winiarstwa” wyd. PWT Warszawa 1950
- 2.W. Wzorek, E Pogorzelski – Technologia winiarstwa owocowego i gronowego”, wyd. Sigma NOT 1998 r
- 3.R. Myśliwiec – Wino z własnej winnicy, wyd, PWRiL Warszawa 2000
- 4.W. Vogel - „Wino z winogron i innych owoców” wyd. Multico Warszawa 2008
- 5.Rozporządzenie komisji (EWG) nr 2676/90
- 6.strony internetowe o wytwarzaniu wina.

1. Cel kontroli FJM

Podjęcie decyzji o zakończeniu fermentacji jabłkowo mlekowej jest istotne z uwagi na tworzenie się w winie, w końcowej fazie tej fermentacji, produktów niepożądanych. Wzrasta wtedy stężenie kwasu octowy, ale tworzy się też kwas propionowy i masłowy. Wszystkie te kwasy dają się z wina oddestylować, w określonych warunkach, stąd nazwa kwasowość lotna. Dla uproszczenia kwasowość lotną przelicza się na kwas octowy. Wartość kwasowości lotnej, w końcowej fazie FJM szybko wzrasta. Nadmierne ilości kwasu octowego dają wyczuwalny zapach octu, co jest wadą wina. Za normalny poziom kwasowości lotnej w winach białych uznaje się ilość $<0,7$ g/l i $< 0,9$ g/l w winach czerwonych. Wino o zawartości kwasu octowego powyżej 1,08 g/l nie może być kierowane do sprzedaży. Różnica jest niewielka, ale dla jakości wina istotna.

2. FJM

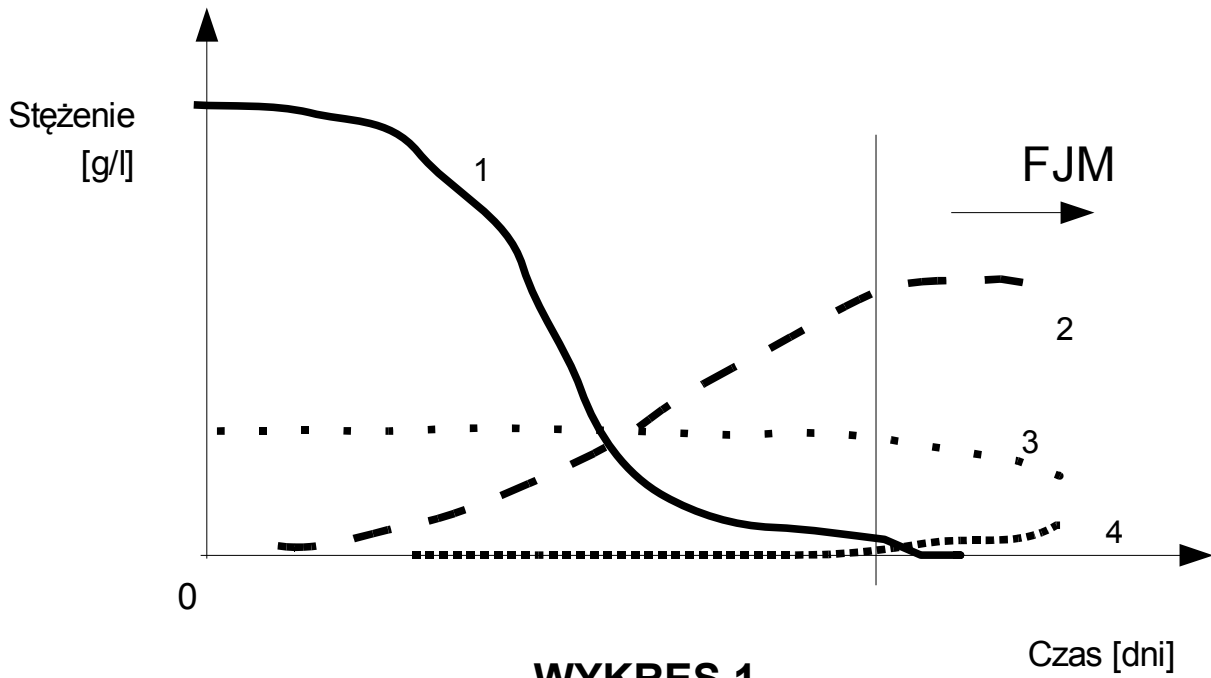
Reakcją pożądaną przy FJM jest przejście kwasu L-jabłkowego w L- mlekowy z wydzieleniem dwutlenku węgla. Wygląda to następująco:



Zatem w miejsce kwasu jabłkowego zawierającego dwie grupy kwasowe -COOH powstaje w równoważnej ilości kwas mlekowy z jedną grupą kwasową. Wpływa to na zmniejszenie kwasowości ogólnej (miareczkowej) i jest wyczuwalne w postaci łagodniejszego smaku wina.

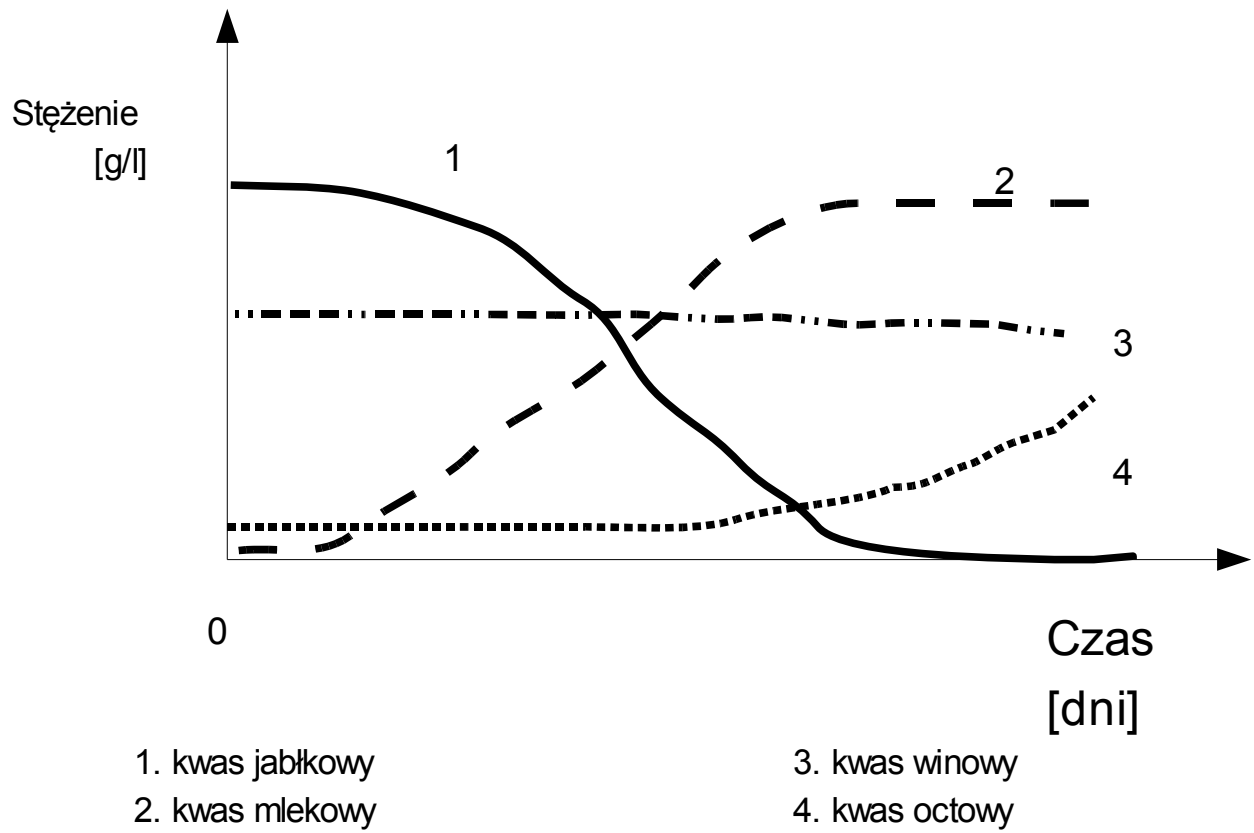
Reakcjami niepożądanymi są reakcje w wyniku których wzrasta kwasowość lotna.

Zmiany głównych parametrów wina w trakcie całego procesu fermentacji przedstawione są na wykresach:



Zmiany głównych parametrów wina w czasie całej fermentacji

1. cukier
2. alkohol
3. kwasowość ogólna
4. kwasowość lotna



WYKRES 2

Zmiany stężeń poszczególnych kwasów w trakcie FJM

3. Kontrola organoleptyczna

Ocena smaku: „doświadczony winiarz po prosu próbuje wino. Gdy smak wyraźnie łagodnieje, należy zlać wino znad osadu drożdżowego. ...gdy moszcz był mało kwaśny należy wcześniej przerwać fermentację jabłkowo-mlekową.”

Obserwacja wzrokowa: w szklanych zbiornikach fermentacyjnych, w trakcie FJM można zauważyć pęłzające ku górze drobne pęcherzyki gazowego CO₂, które rozpryskują się nad powierzchnią wina. W ten sposób wizualnie stwierdzamy trwającą FJM. Niestety wydzielanie CO₂ towarzyszy również innym reakcjom. np. tworzeniu alkoholi.

Zapach wina zmienia się podczas FJM – zanikają aromaty owocowe i tworzą się nuty malolaktyczne. Jeśli pojawia się zapach kwasu octowego, to świadczy o zbyt długo prowadzonej FJM. Ta już jest wada wina nie do usunięcia.

Metody organoleptyczne są niewątpliwie najprostszymi i najstarszymi metodami badania wina. Mają jednak znaczne ograniczenia wynikające między innymi z wrażliwości zmysłów i doświadczenia, w związku nie dają gwarancji prawidłowej oceny FJM.

W związku z tym metody organoleptyczne nie powinny być jedynym sposobem oceny przebiegu FJM, a raczej powinny stanowić uzupełnienie metod ilościowych.

4. Monitorowanie kwasowości ogólnej i lotnej

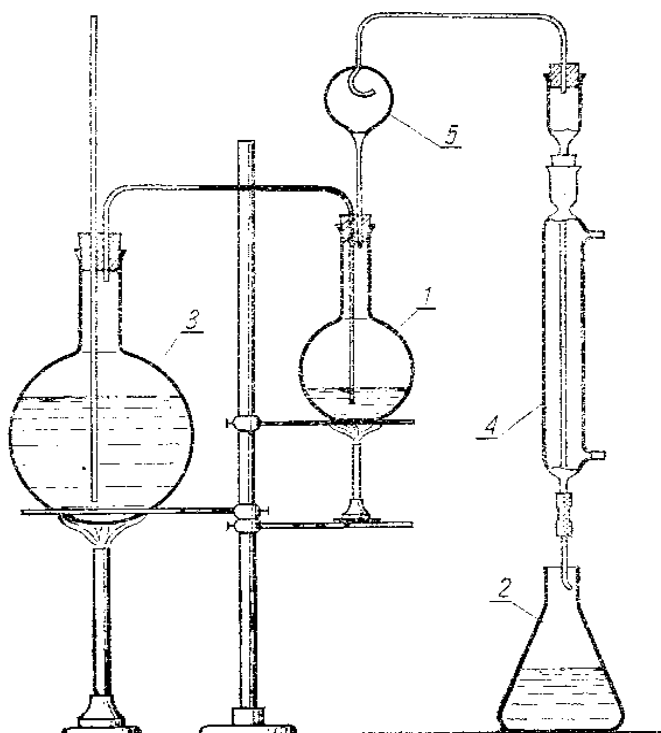
Systematyczne pomiary kwasowości ogólnej w trakcie FJM są łatwe do wykonania i nawet w amatorskich warunkach uzyskuje się wystarczającą dokładność. Tym niemniej dodatkowym problemem przy tych pomiarach, w odróżnieniu od pomiarów kwasowości ogólnej moszczu jest obecność rozpuszczonego CO₂, który zawyża wynik pomiaru.

Znacznie większym problemem jest pomiar kwasowości lotnej, gdyż wymagane jest posiadanie instalacji do destylacji z parą wodną, w której oddziela się z wina kwasy lotne. Wyodrębnione z wina kwasy oznacza się następnie analogiczną metodą jak przy określaniu kwasowości ogólnej, tj. przez miareczkowanie NaOH. Otrzymany wynik przelicza się na kwas octowy.

Wykonywane, przykładowo raz dziennie, po zainicjowaniu FJM, oba pomiary pozwalają uzyskać dane umożliwiające wykreślenie krzywych 3 i 4 przedstawionych na wykresie 1. W końcowym okresie FJM występuje szybka zmiana obu parametrów. Prowadząc takie pomiary uzyskuje się ważną informację o zbliżaniu się do granicznej wartości kwasowości lotnej tj. 1,08 g/l.

To postępowanie zostało opracowane jako jedno z pierwszych służących do kontrolowania FJM.

Klasyczna, laboratoryjna, instalacja do destylacji z parą wodną opisana w podręcznikach analizy żywności wygląda następująco:



Rys. 8-24. Zestaw do destylacji kwasów lotnych z parą wodną
 1 — kolba destylacyjna o pojemności 500 cm³. 2 — kolba stożkowa o pojemności 250 cm³
 3 — kolba destylacyjna o pojemności 1600 cm³ (wytwornica pary), 4 — chłodnica, 5 — deflegmator

Destylacja z parą wodną pozwala wydzielić z wina kwasy uznane za lotne, ale mające stosunkowo wysokie temperatury wrzenia. Octowy 118, propionowy 141, a masłowy 163 stopni Celsjusza. Z uwagi na tak wysokie temperatury nie ma możliwości zastąpienia destylacji z parą wodną destylacją prostą.

Jednoczesne śledzenie spadku kwasowości ogólnej i wzrostu kwasowości lotnej jest metodą niewątpliwie precyzyjną, bo pozwalającą na bezpieczne określenie końca FJM. Jednocześnie otrzymuje się dokładną informację o zbliżaniu się do niebezpiecznego poziomu kwasowości lotnej. Metoda ta jest jednak stosunkowo pracochłonna i wymaga zestawienia odpowiedniej aparatury laboratoryjnej. Stąd ograniczona przydatność tej metody w małym gospodarstwie winiarskim.

5. Oznaczanie kwasu jabłkowego

Z wykresu 2 wynika, że systematyczne oznaczanie kwasu jabłkowego w trakcie FJM może być uznane za wygodny sposób określenia końca FJM. Bada się tylko jeden parametr – stężenie kwasu jabłkowego. Gdy stężenie to zbliży się do zera przerywamy fermentację i w ten sposób zabezpieczamy się przed przyspieszonym powstawaniem produktów niepożądanych, w szczególności kwasu octowego.

Niestety oznaczanie kwasu jabłkowego w winie tj. w mieszaninie innych podobnych kwasów nie jest proste.

Metody analityczne oznaczania kwasu jabłkowego zostały opisane w Rozporządzeniu Komisji (EWG) określającym wspólnotowe metody analityczne. Kwas jabłkowy obecny w badanym winie poddaje się skomplikowanym reakcjom chemicznym lub biochemicznym w wyniku których powstają związki barwne. Następnie mierzy się intensywności ich

barwy przez pomiar absorbancji badanej próbki w stosunku do próbki odniesienia w spektrofotometrze przy ściśle określonej długości fali światła. Uzyskuje się przy tym bardzo dokładne wyniki pomiarów.

Należy uznać, że te metody są zbyt skomplikowane by móc je stosować w praktyce winiarza amatora.

Testy paskowe

Testy paskowe stosowane w winiarstwie służą, do pomiaru tylko jednego parametru. Badanie przeprowadza się wg instrukcji producenta. Wynik odczytuje się przez porównanie zabarwienia paska z dołączoną skalą barw.

- Test na kwas mlekowy – rozpoczęcie FJM
- Test na kwas jabłkowy - zakończenie FJM

Chromatografia bibułowa

Jest to metoda jakościowa. Nie daje wyniku ilościowego tylko odpowiada na pytanie, czy dany kwas jest w winie.

Kompletny zestaw do przeprowadzenia chromatografii bibułowej zawiera:

Roztwór rozwijający

20 arkuszy bibuły chromatograficznej

200 kapilar

4 wzorce: imitujące kwasy winowy, jabłkowy, mlekowy i kwas cytrynowy

Roztwór rozwijający

Stosujemy jeden z dwóch roztworów rozwijających (określanych również jako mieszanina rozwijająca) otrzymanych z następujących składników:

1. roztwór 1 g/l błękitu bromofenolowego w n-butanolu – 50 ml
50 % roztwór kwasu octowego – 25 ml
2. n-butanol 33 ml
woda destylowana – 33 ml
kwas mrówkowy 3,6 ml
Roztwór 1 % zieleni bromokrezolowej – 5 ml

Uwaga:

Niektóre składniki wchodzące w skład obu roztworów mają własności żrące i/ub szkodliwe. W związku z tym należy zachować ostrożność, chronić przed dziećmi, w pracy z nimi stosować ochrony indywidualne – okulary i rękawice. Po zakończeniu chromatografii resztę roztworu zlać do szczelnie zamykanego pojemnika, stosowane naczynia dobrze umyć dużą ilością wody, a pomieszczenie pracy przewietrzyć.

Materiały i urządzenia

Polecana jest **bibuła** Whatman®. Wielkość arkusza zależy od rozmiarów komory chromatograficznej (wysokości posiadanego słoja oraz średnicy jego otworu).

Komora rozwijająca w postaci wysokiego słoja Weck,a (o pojemności 1, 7 l) pozwala zmieścić zwiniętą w rulon, bibułę o maksymalnej wysokości 17 cm oraz długości ok. 20 cm.

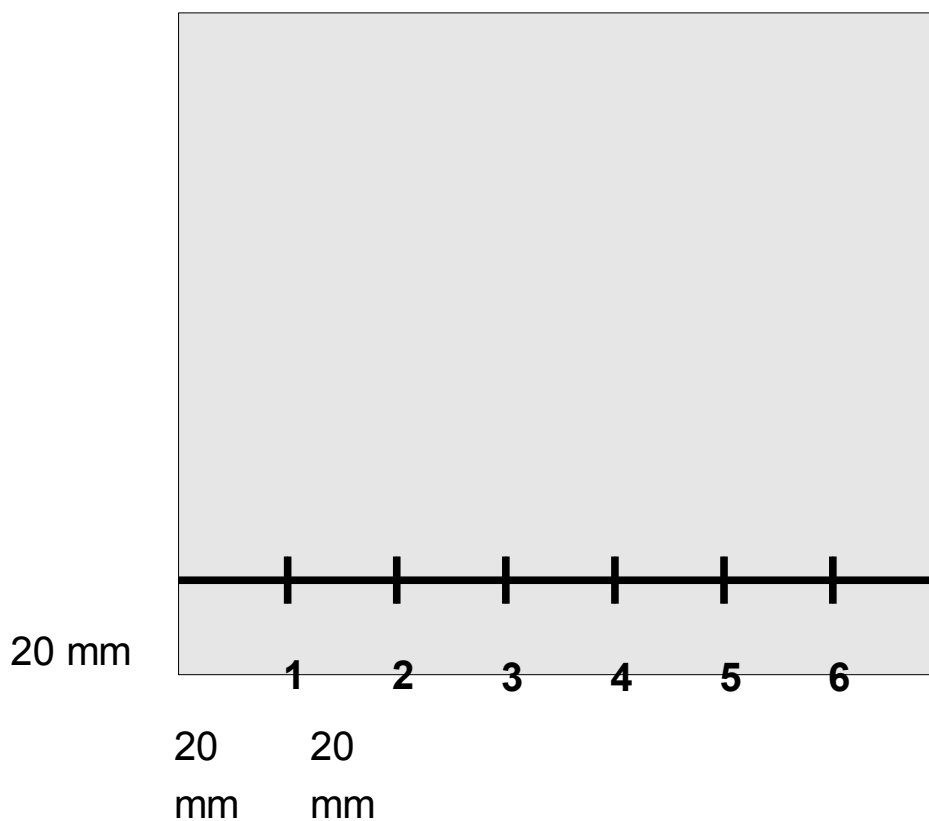
Stosowanie arkusza bibuły o wysokości poniżej 14 cm wiąże się z ryzykiem nie pełnego rozwinięcia chromatogramu. Objawia się to tym, że na tak krótkiej drodze kolorowe plamy na bibule utworzone przez poszczególne kwasy występujące w winie mogą się zlewać, co zmniejsza czytelność chromatogramu.

W związku z tym należy przyciąć bibułę do rozmiarów odpowiednich do posiadanej komory chromatograficznej.

Do dozowania próbek wina na bibułę najlepiej nadaje się **pipeta automatyczna** zapewniająca zawsze nanoszenie kropli o stałej objętości np. 5 mikrolitrów. Po nabraniu wprawy dobre wyniki można uzyskać stosując jednorazowe **kapilarki szklane**.

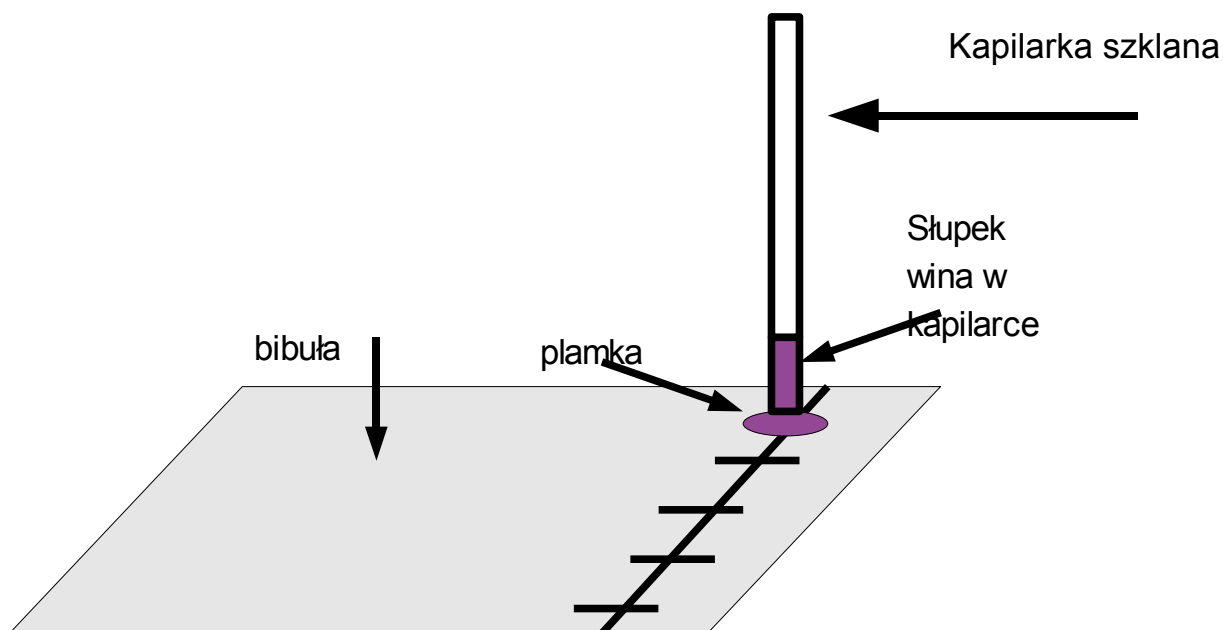
Bardzo pomocny jest **worzec**, który naniesiony na bibułę, na jedno z miejsc na linii startowych ułatwia znacząco odczyt chromatogramu.

Przygotowanie bibuły



Nanoszenie kropli na bibułę

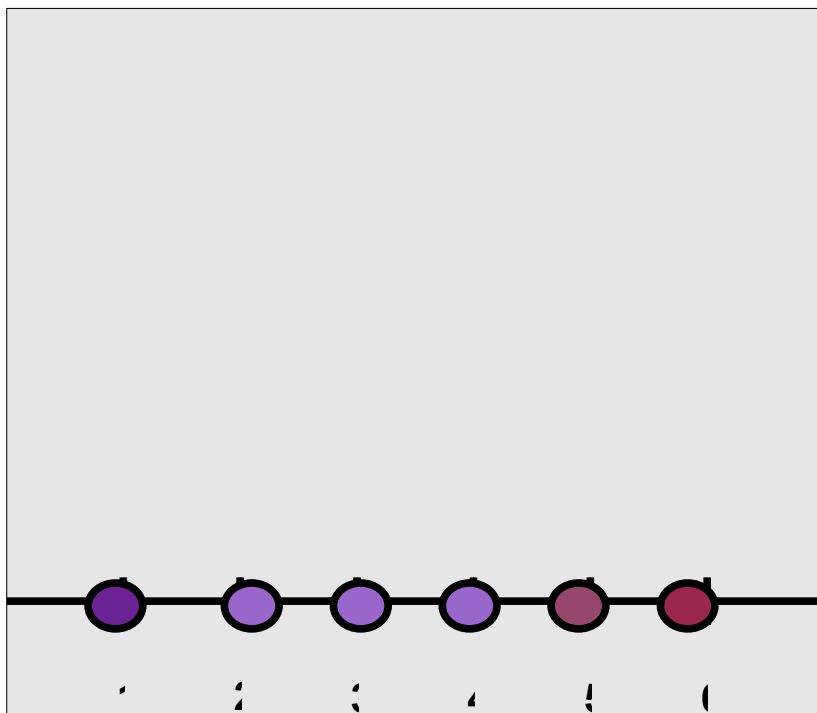
Końcówkę kapilarki szklanej z winem należy przyłożyć do wybranego miejsca na linii startowej bibuły chromatograficznej i przytrzymać w tej pozycji aż do utworzenia się na bibule plamki o wymaganym rozmiarze.



Na wybranym miejscu na linii startowej umieścić kroplę odpowiedniego wina i utworzyć plamkę o średnicy ok 8 mm, ale nie więcej niż 10 mm

Wysuszyć plamkę (suszarką do włosów)

Powtórzyć jeszcze dwukrotnie nakładanie kropli tego samego wina w to samo co poprzednio miejsce na linii startowej, w wyżej podany sposób



Przykład nanoszenie kropel na linię startową:

miejsce startowe **1**: 3 x Regent

miejsce startowe **2**: 3 x Rondo 1

miejsce startowe **3**: 3 x Rondo 2

miejsce startowe **4**: 3 x Rondo 3

miejsce startowe **5**: 3 x Leon Millot

miejsce startowe **6**: 3 x Heridan itd.

Tworzenie chromatogramu na bibule

Bibułę z naniesionymi na linię startową plamkami utworzonymi z badanych win zwijamy w rulon, w taki sposób aby linia startowa była widoczna na zewnątrz. Górne końce rulonu (te znajdujące się daleko od linii startowej) łączymy spinaczem. Dolne końce rulonu (znajdujące się przy linii startowej) w żadnym przypadku nie mogą się ze sobą stykać. W efekcie rulon przyjmuje lekko stożkowy kształt. Należy ewentualnie skorygować kształt rulonu tak, by spełniał on następujące warunki:

- musi dać się swobodnie włożyć do słoja bez dotykania do krawędzi otworu,
- po włożeniu do słoja musi pewnie stać na dnie – nie może się kiwać lub przewracać,
- linia startowa musi być równoległa do podłoża. (do dna słoja)

Po sprawdzeniu powyższego, należy wyjąć rulon z komory chromatograficznej, a następnie należy wlać jeden z roztworów rozwijających, tak aby dno było całkowicie zanurzone, na ogół wystarcza 50 ml.

Ostrożnie wsunąć rulon do komory chromatograficznej, nie dotykając nim krawędzi otworu oraz ścianek komory. Postawić go na dnie tak, aby w roztworze rozwijającym zanurzyła się cała dolna krawędź bibuły, a przy tym tak, aby linia startowa była co najmniej 1cm nad powierzchnią roztworu rozwijającego. Od tego momentu bibuła nie może się poruszyć.

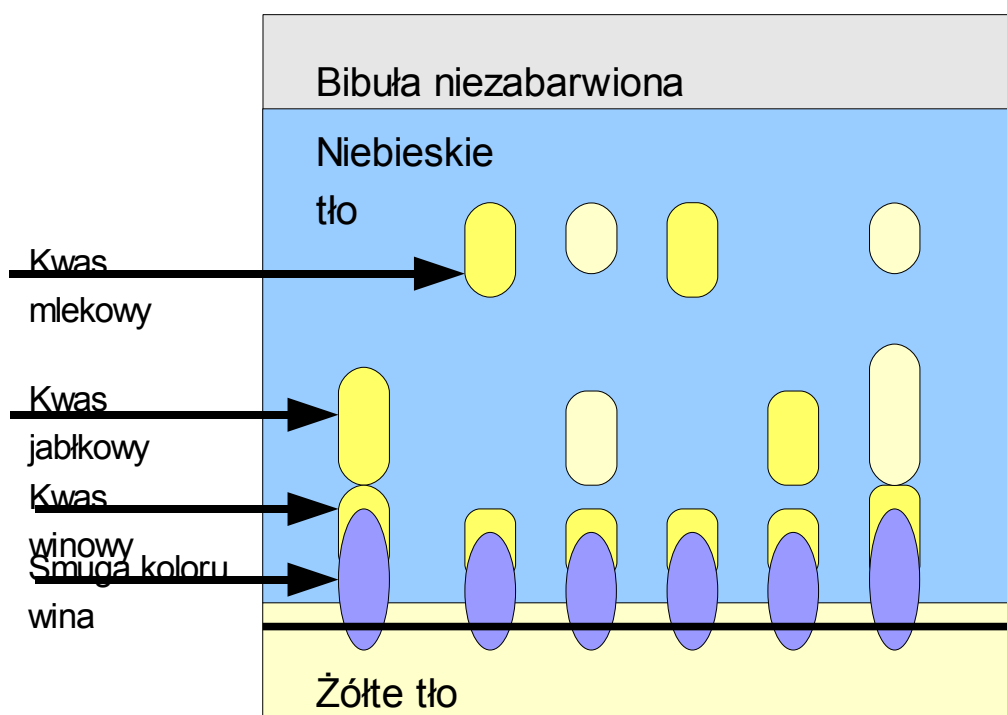
Zamknąć szczelnie pokrywką komorę rozwijającą. Zrobić to ostrożnie nie dopuszczając do poruszenia się bibuły.

W miarę upływu czasu bibuła nasącza się stopniowo roztworem rozwijającym, co przejawia się rosnącą do góry, na całej szerokości bibuły, zmianą zabarwienia na kolor żółty. Widoczne przy tym rozciągające się ku górze kolorowe plamy pochodzące od czerwonych win nie mają żadnego znaczenia. Inne skutki nie są na razie widoczne. Bibułę pozostawiamy w komorze do czasu zbliżenia się czoła chromatogramu na ok. 1 cm do górnej krawędzi bibuły. Nie należy dłużej przetrzymywać bibuły w komorze, bo nie można dopuścić by czoło chromatogramu osiągnęło górną krawędź bibuły.

Właściwie rozwinięty chromatogram należy niezwłocznie i ostrożnie wyjąć z komory, postawić pionowo na chwilę do odcieknięcia na ręczniku papierowym, a potem na nieporowatej powierzchni np. na spodku i odczekać kilka godzin.

Po tym czasie chromatogram jest już czytelny. Jeśli stosowany był roztwór rozwijający 1, to na niebieskim tle, nad każdym miejscem startowym widoczne są żółte plamy odpowiadające obecności poszczególnych kwasów w winie. Jeżeli użyty był roztwór rozwijający 2 – tło jest żółto-zielone.

Interpretacja chromatogramu



Uwaga: kolor tła zależy od użytego roztworu rozwijającego.

Wnioski

W warunkach amatorskich i/lub niedużym gospodarstwie winiarskim metoda chromatografii bibułowej jest stosunkowo łatwą, tanią i najpewniejszą metodą określania stopnia zaawansowania FJM.