

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Ana MIKLAVČIČ

**PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTOV
LIOFILIZIRANIH VIN**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF LYOPHILIZED
WINE EXTRACTS**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno na Katedri za kemijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Analize hlapnih komponent vin in rekonstituiranih liofilizatov so bile opravljene na Katedri za analizo kemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani. Senzorična analiza je bila opravljena na Katedri za tehnologijo vina Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Blaža Cigića, za somentorico doc. dr. Tatjano Košmerl in za recenzenta doc. dr. Mojmirja Wondro.

Mentor: doc. dr. Blaž Cigić

Somentorica: doc. dr. Tatjana Košmerl

Recenzent: doc. dr. Mojmir Wondra

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ana Miklavčič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 663.253:663.256(043)=163.6
KG vino/liofilizacija vina/polifenoli/etanol/glicerol/antioksidacijski potencial/hlapne komponente/senzorične lastnosti
- AV MIKLAVČIČ, Ana
SA CIGIČ, Blaž (mentor)/ KOŠMERL, Tatjana (somentorica)/ WONDRA, Mojmir (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2008
IN PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTOV LIOFILIZIRANIH VIN
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIV, 92 str., 30 pregl., 36 sl., 5 pril., 79 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Polifenoli, s katerimi so bogata rdeča vina, so izredno pomembni za preprečevanje kardiovaskularnih boleznih in raka. Vendar se pitje vina zaradi vsebnosti etanola omejuje. Zato smo vinom z liofilizacijo odstranili etanol. Nato smo z etanolom, 10 vol. % etanolom in vodo pripravili ekstrakte z enako koncentracijo suhe snovi, kot jo je imelo prvotno vino. V predstavljenem delu smo preučevali, kako se pripravljene frakcije razlikujejo med sabo in z vinom, iz katerega smo jih pripravili. Ugotavljali smo razlike v vsebnosti polifenolov, antioksidacijskem potencialu ter v vsebnosti hlapnih komponent. Preučevanim vzorcem smo določili tudi vsebnost etanola, glicerola, barvne parametre in jih senzorično ocenili. Rezultati so pokazali, da liofilizacija bistveno ne vpliva na vsebnost antioksidantov. Liofilizati, ekstrahirani z 10 % raztopino etanola ali vodo, imajo praktično enako vsebnost polifenolov in antioksidacijski potencial kot vino. Pri etanolnih ekstraktih so bile vsebnosti bistveno manjše. Intenziteta barve rekonstituiranih liofilizatov se je zmanjšala, medtem ko so bile druge vrednosti barvnih parametrov sortno značilne. Vsebnost večine hlapnih komponent se je z liofilizacijo zmanjšala. Čeprav so kemijske analize pokazale, da liofilizacija bistveno ne osiromaši vina glede na polifenole in glicerol, smo s senzorično analizo ugotovili, da proces liofilizacije in ponovne ekstrakcije ključno vpliva na okus. Bolje kot je bilo senzorično ocenjeno vino, večje so bile izgube z liofilizacijo. Vsebnost etanola je pomembno vplivala na okus in aromo. Tako smo prišli do zaključka, da bi bilo smiselno liofilizirati nižje kakovostna namizna rdeča vina in pripraviti pijačo z nizko vsebnostjo alkohola.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 663.253:663.256(043)=163.6
CX wines/lyophilized wine/polyphenols/ethanol/glycerol/antioxidant potential/volatiles/sensory properties
- AU MIKLAVČIČ, Ana
AA CIGIČ, Blaž (supervisor) / KOŠMERL, Tatjana (co-advisor) / WONDRA, Mojmir (reviewer)
PP SI-100 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2008
TI PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF LYOPHILIZED WINE EXTRACTS
DT Graduation thesis (University studies)
NO XIV, 92 p., 30 tab., 36 fig., 5 ann., 79 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Polyphenols present in the red wines have an important role in the protection against coronary heart disease and cancer. The ethanol present in wine, limits the amounts of wine to be safely consumed. We applied the freeze-drying method on red wine in order to remove the ethanol from wine. We reconstituted lyophilisates with ethanol, 10 vol. % ethanol and water. The present study shows how the prepared fractions differ from each other and from the original wine. We studied the differences of the amounts of polyphenols, of the antioxidant potential and in the amounts of volatiles. The amounts of ethanol, glycerol and color parameters were also determined. In addition we also sensorically evaluated the studied samples. Results showed, that lyophilization does not have the considerable effect on the amount of polyphenols. Lyophilisates that were reconstituted with 10 vol. % ethanol and water had practically the same amounts of polyphenols and antioxidant potential. Major differences were exposed in the ethanol fractions. The color intensity of reconstituted lyophilisates was lower than in original wines. Other color parameters vary according to the sort of wine. Most of aroma components were present at a significantly lower concentration than in original wines. Even though chemical methods showed that lyophilization does not significantly reduce the amount of polyphenols and glycerol, the sensory method showed that the lyophilization has a considerable effect on wine taste. The better that the wine had been estimated the bigger was the loss with the lyophilization. The amount of ethanol had an important effect on taste and aroma. Therefore, it has been concluded that it would be logical to lyophilize only cheap, low quality red wines in order to prepare a beverage with low alcohol amount.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	X
Kazalo prilog	XII
Okrajšave in simboli	XIV
1 UVOD	1
1.1 CILJ DELA	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 FENOLNE SPOJINE V VINU	3
2.1.1 Delitev fenolnih spojin glede na njihovo kemijsko zgradbo	3
2.1.1.1 Flavonoidni fenoli	3
2.1.1.2 Neflavonoidni fenoli	7
2.1.2 Taninski fenoli	8
2.2 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJIN V VINU	10
2.2.1 Antioksidativni mehanizem	10
2.2.1.1 Reaktivne spojine kisika	10
2.2.1.2 Antioksidanti	10
2.3 VPLIV VINA NA ZDRAVJE	11
2.3.1 Vpliv etanola na zdravje	13
2.3.2 Vpliv polifenolov na zdravje	14
2.3.2.1 Zaščita pred kardiovaskularnimi boleznimi	14
2.3.2.2 Antikarcinogena in antimutagena sredstva	14
2.3.2.3 Protimikrobna sredstva	15
2.4 LIOFILIZACIJA	15
2.5 POMEMBNE SORTNE ZNAČILNOSTI IZBRANIH VZORCEV VIN	16
2.5.1 Modri pinot	16
2.5.2 Modra frankinja	16
2.5.3 Cabernet sauvignon	16
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 POTEK POSKUSA	18
3.1.1 Materiali	18
3.1.1.1 Vzorci	18
3.1.1.2 Laboratorijska oprema	19
3.1.2 Reagenti	19
3.2 METODE DELA	21
3.2.1 Liofilizacija vin	21

3.2.1.1	Postopek liofilizacije	21
3.2.1.2	Določanje preostanka po liofilizaciji	21
3.2.2	Ekstrakcija polifenolov	21
3.2.3	Določanje etanola v ekstraktu	21
3.2.4	Spektrofotometrične metode	22
3.2.4.1	Določanje masne koncentracije skupnih fenolov	22
3.2.4.2	Določanje masne koncentracije netaninskih fenolov	23
3.2.4.3	Določanje masne koncentracije neflavonoidov	24
3.2.4.4	Določanje antioksidacijskega potenciala (AOP)	25
3.2.4.5	Določanje antioksidacijskega potenciala vin in fenolnih frakcij	26
3.2.4.6	Določanje antioksidacijskega potenciala netaninov	27
3.2.4.7	Določanje antioksidacijskega potenciala neflavonoidov	28
3.2.4.8	Določanje kinetike reakcije z radikalom DPPH [•]	29
3.2.4.9	Določanje masne koncentracije antocianov	29
3.2.4.10	Določanje barvnih parametrov	30
3.2.5	Določanje fenolov s tekočinsko kromatografijo	32
3.2.6	Določanje hlapnih komponent vin in rekonstituiranih liofilizatov s plinsko kromatografijo	32
3.2.7	Senzorična analiza	32
4	REZULTATI	34
4.1	PREOSTANEK PO LIOFILIZACIJI	34
4.2	VSEBNOST ETANOLA IN GLICEROLA	34
4.3	REZULTATI DOLOČANJA MASNIH KONCENTRACIJ FENOLOV	35
4.3.1	Masne koncentracije skupnih fenolov	35
4.3.2	Masne koncentracije taninskih fenolov	36
4.3.3	Masne koncentracije flavonoidov	37
4.3.4	Fenolna sestava posameznih frakcij	38
4.3.5	Ponovljivost rezultatov	38
4.4	REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDACIJSKA POTENCIALA	40
4.4.1	Optimizacija metode	40
4.4.1.1	Absorbanca DPPH [•] v odvisnosti od vrste medija	40
4.4.1.2	Absorbanca popolne redukcije DPPH [•] z askorbinsko kislino v odvisnosti od vrste medija	40
4.4.2	Antioksidacijski potencial skupnih fenolov	41
4.4.3	Antioksidacijski potencial taninov	42
4.4.4	Antioksidacijski potencial flavonoidov	43
4.4.5	Fenolna sestava posameznih frakcij glede na AOP fenolnih snovi	44
4.4.6	Ponovljivost rezultatov	44
4.4.7	Spremljanje hitrosti reakcije antioksidantov v vinu s prostim radikalom DPPH[•]	45
4.4.7.1	Spremljanje hitrosti reakcije standardov s prostim radikalom DPPH [•]	45
4.4.7.2	Spremljanje hitrosti reakcije skupnih fenolov s prostim radikalom DPPH [•]	47
4.4.7.3	Spremljanje hitrosti reakcije netaninov s prostim radikalom DPPH [•]	48
4.4.7.4	Spremljanje hitrosti reakcije neflavonoidov s prostim radikalom DPPH [•]	49
4.4.7.5	Primerjava rezultatov spremljanja hitrosti reakcije fenolnih spojin s prostim radikalom DPPH [•]	50

4.5	DOLOČEVANJE MASNE KONCENTRACIJE ANTOCIANOV	51
4.6	REZULTATI DOLOČANJA BARVNIH PARAMETROV	52
4.6.1	Ton barve	52
4.6.2	Intenziteta barve	53
4.6.3	Delež rdeče barve	54
4.6.4	Delež barve pri posameznih valovnih dolžinah	55
4.7	REZULTATI PRIMERJAVE VSEBNOSTI POLIFENOLOV S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO	58
4.8	REZULTATI DOLOČANJA Hlapnih komponent vin in rekonstituiranih liofilizatov s plinsko kromatografijo	60
4.9	REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE	63
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	66
5.1	RAZPRAVA	66
5.2	SKLEPI	72
6	POVZETEK	75
7	VIRI	77
	ZAHVALA	85
	PRILOGE	86

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Delitev fenolnih spojin (Vrhovšek, 1996).....	3
Preglednica 2: Derivati katehina (Plahuta, 2004: 231).....	5
Preglednica 3: Strukturne formule nekaterih antocianidinov v grozdju in vinu (Vrhovšek, 1996: 127).....	6
Preglednica 4: Flavonoli grozdja in vina (Vrhovšek, 2006: 128).....	7
Preglednica 5: Reaktivne spojine kisika (Radovič, 2002: 6).....	10
Preglednica 6: Pozitivni vplivi rdečega vina na zdravje v primerjavi z drugimi alkoholnimi pijačami (Tomera, 1999: 133).	12
Preglednica 7: Negativni vplivi rdečega vina na zdravje v primerjavi z drugimi alkoholnimi pijačami (Tomera, 1999: 133).	13
Preglednica 8: Uporabljeni reagenti pri posameznih analizah	19
Preglednica 9: Končni razredčitveni faktorji posameznih vzorcev pri določanju masne koncentracije skupnih fenolov.....	23
Preglednica 10: Končni razredčitveni faktorji posameznih vzorcev pri določanju netaninskih fenolnih spojin.....	24
Preglednica 11: Končni razredčitveni faktorji posameznih vzorcev pri določanju neflavonoidnih fenolnih spojin.....	24
Preglednica 12: Končni razredčitveni faktorji vzorcev pri določanju antioksidacijskega potenciala fenolnih spojin.....	27
Preglednica 13: Končni razredčitveni faktorji pri določanju antioksidacijskega potenciala netaninskih fenolov	28
Preglednica 14: Končni razredčitveni faktorji pri določanju antioksidacijskega potenciala neflavonoidnih fenolov.....	28
Preglednica 15: Končni razredčitveni faktorji pri določanju kinetike reakcije standardov z radikalom DPPH [*]	29
Preglednica 16: Končni razredčitveni faktorji pri določanju barvnih parametrov	30
Preglednica 17: Ocenjevanje lastnosti vin po 100-točkovni metodi (O.I.V., 1998).....	33
Preglednica 18: Vsebnost suhega preostanka po liofilizaciji vin	34
Preglednica 19: Koncentracija etanola v vodnih frakcijah vzorcev glede na vina.....	34
Preglednica 20: Koncentracija glicerola v vodnih frakcijah glede na vino	34
Preglednica 21: Delež taninov in flavonoidov v vinu in posameznih frakcijah, kjer masna koncentracija skupnih fenolov v posamezni raztopini predstavlja 100 %.....	38
Preglednica 22: Primerjava med koeficientom variabilnosti meritev masne koncentracije skupnih fenolov, ki zajema tri ponovitve ekstrakcije in koeficientom variabilnosti znotraj ene ekstrakcije	38
Preglednica 23: Primerjava med koeficientom variabilnosti meritev masne koncentracije netaninskih in neflavonoidnih fenolov, ki zajema štiri ponovitve priprave vzorca, in koeficientom variabilnosti znotraj enega vzorca in tremi meritvami.	39
Preglednica 24: Absorpcija DPPH [*] v odvisnosti od medija in pri valovni dolžini 517 nm.	40
Preglednica 25: Absorbanca popolne redukcija DPPH [*] z askorbinsko kislino v različnih medijih.....	40
Preglednica 26: Delež antioksidacijskega potenciala taninov in flavonoidov v vinu in posameznih frakcijah.....	44

Preglednica 27: Primerjava med koeficientom variabilnosti meritev antioksidacijskega potenciala skupnih fenolov, ki zajema tri ponovitve ekstrakcije, in koeficientom variabilnosti znotraj ene ekstrakcije	44
Preglednica 28: Primerjava med koeficientom variabilnosti meritev antioksidacijskega potenciala netaninskih in neflavonoidnih fenolov (zajema štiri ponovitve obarjanja) in koeficientom variabilnosti znotraj enega obarjanja.....	45
Preglednica 29: Delež DPPH [•] , ki je reagiral po štirih urah v primerjavi s 23 urami za vina in rekonstituirane liofilizate modri pinot (P), modra frankinja (F) in cabernet sauvignon (C).....	50
Preglednica 30: Relativne vrednosti hlapnih komponent 10 vol. % etanolnih frakcij in vodnih frakcij vin sort modra frankinja in cabernet sauvignon glede na vino	62

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram in Simčič, 1997; Abram 2000: 577).....	4
Slika 2: Strukturna formula katehina (Plahuta , 2004: 230).....	4
Slika 3: Splošna strukturna formula antocianidinov (Vrhovšek, 1996: 127)	5
Slika 4: Splošna strukturna formula flavonolov (Vrhovšek, 1996: 128).....	6
Slika 5: Strukturni formuli hidroksicimetnih kislin grozdja in vina: A (R=OH kaftarna kislina, R=H kutarna kislina, R=OCH ₃ fertarna kislina), B (R=OH kavna kislina, R=H p-kumarna kislina, R=OCH ₃ ferulna kislina) (Vrhovšek, 1996: 128)	7
Slika 6: Strukturne formule hidroksibenzojskih kislin v grozdju in vinu: A (galna kislina), B (vanilijeva kislina), C (siringinska kislina) (Vrhovšek, 1996: 129)	8
Slika 7: Strukturne formule izomer resveratrola: A (cis-resveratrol), B (trans-resveratrol) (Vrhovšek, 1996: 130).....	8
Slika 8: Potek eksperimentalnega dela	18
Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje masne koncentracije fenolov	22
Slika 10: Umeritvena krivulja za določanje antioksidacijskega potenciala z DPPH [•]	26
Slika 11: Grafični prikaz masne koncentracije skupnih fenolov v vinu in rekonstituiranih liofilizatih	35
Slika 12: Grafični prikaz masne koncentracije taninskih fenolov v vinu in rekonstituiranih liofilizatih	36
Slika 13: Grafični prikaz masne koncentracije flavonoidnih fenolov v vinu in rekonstituiranih liofilizatih	37
Slika 14: Grafični prikaz antioksidacijskega potenciala skupnih fenolov v vinu in rekonstituiranih liofilizatih	41
Slika 15: Grafični prikaz antioksidacijskega potenciala taninov v vinu in rekonstituiranih liofilizatih	42
Slika 16: Grafični prikaz antioksidacijskega potenciala flavonoidov v vinu in rekonstituiranih liofilizatih	43
Slika 17: Grafični prikaz časovno odvisne redukcije DPPH [•] s standardi.....	46
Slika 18: Grafični prikaz časovno odvisne redukcije DPPH [•] s fenoli vina in rekonstituiranih liofilizatov	47
Slika 19: Grafični prikaz časovno odvisne redukcije DPPH [•] z netaninskimi fenoli vina in rekonstituiranih liofilizatov	48
Slika 20: Grafični prikaz časovno odvisne redukcije DPPH [•] z neflavonoidnimi fenoli vina in rekonstituiranih liofilizatov	49
Slika 21: Grafični prikaz masne koncentracije antocianov v vinih in rekonstituiranih liofilizatih	51
Slika 22: Grafični prikaz tona barve v vinih in rekonstituiranih liofilizatih	52
Slika 23: Grafični prikaz intenzitete barve v vinih in rekonstituiranih liofilizatih.....	53
Slika 24: Grafični prikaz deleža rdeče barve v vinih in rekonstituiranih liofilizatih	54
Slika 25: Grafični prikaz deleža barve v vinih in rekonstituiranih liofilizatih pri valovni dolžini 420 nm.....	55
Slika 26: Grafični prikaz deleža barve v vinih in rekonstituiranih liofilizatih pri valovni dolžini 520 nm.....	56

Slika 27: Grafični prikaz deleža barve v vinih in rekonstituiranih liofilizatih pri valovni dolžini 620 nm.....	56
Slika 28: Elucijski diagram spojin v vinu sorte modri pinot in rekonstituiranih liofilizatih, ki absorbirajo v območju od 280 do 550 nm, analiziranih s HPLC.....	58
Slika 29: Elucijski diagram spojin v vinu sorte modra frankinja in rekonstituiranih liofilizatih, ki absorbirajo v območju od 280 do 550 nm, analiziranih s HPLC.....	59
Slika 30: Elucijski diagram spojin v vinu sorte cabernet sauvignon in rekonstituiranih liofilizatih, ki absorbirajo v območju od 280 do 550 nm, analiziranih s HPLC.....	59
Slika 31: Kromatogram določanja hlapnih komponent vina in rekonstituiranih liofilizotov sorte modra frankinja s plinsko kromatografijo.....	60
Slika 32: Kromatogram določanja hlapnih komponent vina in rekonstituiranih liofilizotov sorte cabernet sauvignon s plinsko kromatografijo.....	61
Slika 33: Grafični prikaz senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizotov sorte modri pinot.....	63
Slika 34: Grafični prikaz senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizotov sorte modra frankinja.....	64
Slika 35: Grafični prikaz senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizotov sorte cabernet sauvignon.....	64
Slika 36: Grafični prikaz senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizotov rdeče zvrsti.....	65

KAZALO PRILOG

Priloga A₁: Rezultati določanja skupnih fenolnih spojin v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

Priloga A₂: Rezultati določanja netaninskih fenolov v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

Priloga A₃: Rezultati določanja neflavonoidnih fenolov v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

Priloga B₁: Rezultati določanja antioksidacijskega potenciala skupnih fenolnih spojin v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

Priloga B₂: Rezultati določanja antioksidacijskega potenciala netaninskih fenolov v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

Priloga B₃: Rezultati določanja antioksidacijskega potenciala neflavonoidnih fenolov v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

Priloga C₁: Rezultati določanja masne koncentracije antocianov

Priloga C₂: Rezultati določanja tona barve v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

Priloga C₃: Rezultati določanja intenzitete barve v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

Priloga C₄: Rezultati določanja deleža rdeče barve v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

Priloga C₅: Rezultati določanja deleža barve v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih pri valovni dolžini 420 nm

Priloga C₆: Rezultati določanja deleža barve v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih pri valovni dolžini 520 nm

Priloga C₇: Rezultati določanja deleža barve v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih pri valovni dolžini 620 nm

Priloga D₁: Rezultati senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizatov sorte modri pinot

Priloga D₂: Rezultati senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizatov sorte modra frankinja

Priloga D₃: Rezultati senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizatov sorte cabernet sauvignon

Priloga D₄: Rezultati senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizatov rdeče zvrsti

Priloga E₁: Relativne vrednosti hlapnih komponent vin sort modra frankinja in cabernet sauvignon

Priloga E₂: Prisotnost hlapnih komponent v vinih in liofilizatih vin sort cabernet sauvignon (C) in modra frankinja (F)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
AOP	antioksidacijski potencial
C	cabernet sauvignon
CA	acetatna celuloza (angl. cellulose acetate)
DPPH [•]	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal
F	modra frankinja
F.C.	Folin-Ciocalteu reagent
GAE	ekvivalent galne kisline (angl. gallic acid equivalent)
LDL	lipoprotein majhne gostote (angl. low-density lipoprotein)
P	modri pinot
PF	polifenoli
PP	polipropilen
PS	polistiren
R	razredčitveni faktor
SPME	mikroekstrakcija na trdni fazi (angl. solid phase microextraction)

1 UVOD

Vse več je dokazov, da so za preprečevanje kardiovaskularnih obolenj in raka izredno pomembni polifenoli, s katerimi so bogata predvsem rdeča vina (Fantinelli in sod., 2004; Vrhovšek, 1996).

Zaradi vsebnosti etanola se prekomerno pitje vina omejuje. Že majhni odmerki alkohola zmanjšajo zmogljivost mišic in aktivirajo ali blokirajo nevrone, tako da delujejo umirjajoče kot tudi poživljajoče. Z naraščanjem alkohola v krvi se akutni učinki alkohola na centralno živčevje povečujejo. Lahko pride do nezmožnosti koordiniranih reakcij, motenj zavesti in neprištevnosti opitega. Kronično uživanje alkohola pripelje do zamaščenosti jeter in kasneje do ciroze jeter. Poleg tega pride do okvar na drugih organih, kot sta trebušna slinavka in srčna mišica. Uživanje alkohola v večjih količinah in dlje časa povečuje tudi tveganje nastanka raka v ustni votlini, žrelu, požiralniku, na dojkah in debelem črevesu (Longnecker, 1994; Thun in sod., 1997; Referenčne..., 2004). Čeprav ima alkohol tudi varovalen učinek na srce zaradi zvišanja HDL holesterola v krvi, zmanjšanja agregacije krvnih ploščic, znižanja fibrinogena in povečane fibrinolize (Referenčne..., 2004; Van Golde in sod., 1999), ne moremo trditi, da ščiti pred srčnim infarktom, saj negativni kronični učinki uživanja alkohola praviloma presegajo pozitivne učinke. Zato je za povprečne moške zdravstveno sprejemljivih samo 20 g etanola na dan, kar ustreza okoli četrtini litra vina. Pri ženskah pa je zaradi alkohola tveganje okvar organov in raka na dojkah večje kot pri moških in so zato zdravstveno sprejemljive količine etanola polovico manjše, in sicer 10 g na dan. Alkohola naj se ne bi uživalo vsak dan. Ženske med dojenjem in nosečnostjo naj ne bi uživale alkohola, da ne bi otroka izpostavljale tveganjem, kot je na primer alkoholno pogojena fetopatija (Thun in sod., 1997; Referenčne..., 2004).

Tako se je pojavila ideja, da vinu odstranimo etanol, tako da ga liofiliziramo. S pripravo liofilizata najbolje ohranimo naravno sestavo vina. Liofilizatu lahko nato povrnemo vso izgubljeno vodo. Tako dobimo ekstrakt, ki je po vsebnosti skupnih polifenolov enak prvotnemu vinu (Van Golde in sod., 2004). Marsikdo bi rekel, da je vino brez alkohola enako kot grozdni sok. Vendar temu ni tako. Čeprav grozdni sok ne vsebuje alkohola, ni primeren nadomestek za vino brez alkohola. Vsekakor je tudi grozdni sok vir polifenolov, ampak ne vsebuje polifenolov, ki so posledica fermentacije in zorenja vina. LDL antioksidativni efekt grozdnega soka nikakor ne dosega antioksidativnega efekta, ki ga ima vino brez alkohola (Van Golde in sod., 1999).

Za ekstrakcijo lahko poleg vode uporabimo tudi druga topila, ki se razlikujejo v polarnosti. Fantinelli in sod. (2004) navajajo, da imajo frakcije, ki se razlikujejo v polarnosti ekstrahiranih polifenolov različen učinek na oskrbo srčne mišice s kisikom in oksidacijo lipidov in vivo.

S polifenoli izjemno bogat liofilizat bi lahko uporabili tudi kot aromatičen dodatek raznim jedem, kot je na primer sladoled.

1.1 CILJ DELA

Glede na zgoraj omenjena dejstva je bil cilj diplomske naloge pripraviti liofilizate rdečih vin sort modra frankinja, modri pinot in cabernet sauvignon. Rekonstituirane liofilizate

smo v diplomski nalogi poimenovali frakcije. Etanolne, 10 vol. % etanolne in vodne frakcije smo nameravali primerjati z osnovnimi vini in ugotoviti, ali liofilizacija in uporaba različnih topil za raztapljanje liofilizatov vplivata na vsebnost polifenolov, hlapnih komponent, antioksidacijsko aktivnost in barvne parametre. Vina, vodne ekstrakte in ekstrakte z 10 vol. % raztopino etanola je bilo treba senzorično oceniti ter jih primerjati med sabo. Vodnem ekstraktu smo določili tudi preostali etanol.

2 PREGLED OBJAV

2.1 FENOLNE SPOJINE V VINU

Fenoli so aromatske hidroksi spojine, za katere je značilno, da imajo po eno ali več hidroksilnih skupin, vezanih neposredno na aromatsko jedro. V naravi so običajno spojine z več –OH skupinami in zato se je zanje uveljavilo tudi drugo ime polifenoli (Abram in Simčič, 1997, Kemija..., 2004). Fenolne spojine vplivajo na barvo, okus, aromo in stabilnost vina. V grozdju se nahajajo v vseh delih grozdnih jagod in v pecljih. Vsebnost fenolnih spojin v grozdnem soku je odvisna od raznovrstnosti grozdja in pogojev rasti. So indikatorji stopnje maceracije grozdnih jagod med vinifikacijo. Njihova kemijska zgradba jim omogoča, da lovijo proste radikale in zato jih uvrščamo v skupino antioksidantov. Preventivno delujejo proti boleznim srca in ožilja ter nekaterim vrstam raka. Delujejo tudi antimikrobno (Ribéreau-Gayon in sod. 2000, Kemija ..., 2004).

2.1.1 Delitev fenolnih spojin glede na njihovo kemijsko zgradbo

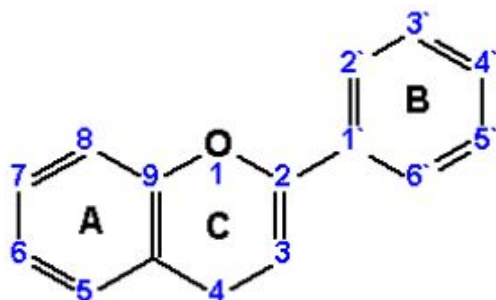
Skupne fenole delimo glede na njihovo osnovno kemijsko strukturo na flavonoidne fenole in neflavonoidne fenole (Macheix J. in sod, 1990).

Preglednica 1: Delitev fenolnih spojin (Vrhovšek, 1996)

FLAVONOIDNI FENOLI	NEFLAVONOIDNI FENOLI
<ul style="list-style-type: none">• flavan-3-oli (katehin, epikatehin)• proantocianidini (dimeri in trimeri katehina in epikatehina)• antocianidini (malvin, delphinin, peonin, cianin, pelargonin in petunin)• flavonoli (kvercetin, miricetin, rutin, izoramnetin, kampferol)	<ul style="list-style-type: none">• hidroksicimetne kisline (kaftarna kislina, kutarna kislina, fertarna kislina, kavna kislina, kumarna kislina in ferulna kislina)• hidroksibenzojske kisline (galna kislina, vaniljeva kislina in siringinska kislina)• stilbeni (resveratrol)

2.1.1.1 Flavonoidni fenoli

Flavonoidi so bolj ali manj intenzivni rumeni pigmenti, ki se razlikujejo po oksidacijski stopnji heterocikličnega obroča in po različnih substituentah na obročih (Ribéreau-Gayon in sod. 2000; Abram, 2000).

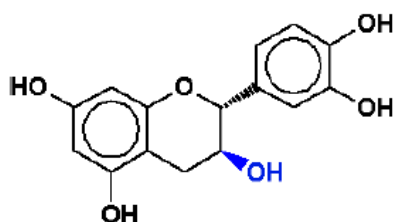


Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram in Simčič, 1997; Abram 2000: 577)

V grozdju so flavonoidi običajno glikozilirani. Na obroč imajo vezane različne monosaharide, kot so glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza, lahko pa tudi daljše verige. (Ribéreau-Gayon in sod. 2000; Abram in Simčič, 1997). Nesladkani del molekule imenujemo aglikon. Po aglikonu flavonoide ločimo na flavone, flavonole, katehine, flavanone, dihidroflavanole, flavan-3,4-diole, antocianidine, izoflavone, neoflavone, kalkone, dihidrokalkone in avrone (Brivida in Sies, 1994; Abram in Simčič, 1997; Jovanic in sod., 1997).

Vrhovšek (1996) nadalje deli flavonoidne fenole v vinu na flavan-3-ole, proantocianidine, antocianidine in flavonole.

Monomerni in oligomerni flavan 3-oli so najpomembnejši fenoli v rdečih vinih. K njim se uvrščajo monomerni fenoli, kot je katehin. Glede na položaj hidroksilnih skupin triciklične molekule ločimo katehin (trans-oblika) in epikatehin (cis-oblika). V to skupino uvrščajo tudi galokatehin, epigalokatehin in oksianidin (Plahuta, 2004). So neobarvani in učinkujejo grenko. Nahajajo se predvsem v trdih delih grozdne jagode, zato so njihove koncentracije v grozdnem soku zelo majhne. V rdeča vina pridejo s postopkom maceracije, zato je njihova koncentracija veliko večja v rdečih vinih kot v belih vinih in je odvisna od trajanja maceracije (Macheix J., 1990; Plahuta, 2004). Po Zoecklein in sod. (1994) se v belih vinih vrednosti katehina gibljejo med 20–50 g/l, epikatehina pa med 10–25 g/l, medtem ko so koncentracije v rdečih vinih občutno večje, in sicer koncentracija katehina niha med 130 in 140 mg/l, epikatehina pa 65–70 mg/l.



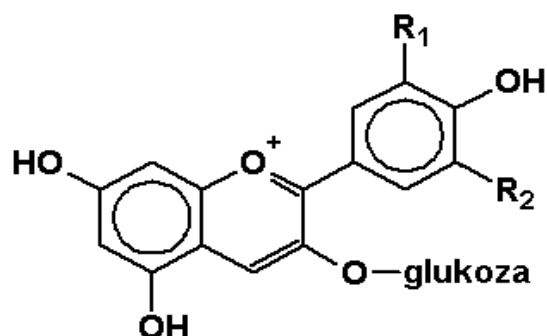
Slika 2: Strukturna formula katehina (Plahuta, 2004: 230)

Preglednica 2: Derivati katehina (Plahuta, 2004: 231)

katehin	dodatna struktura OH(-OCH ₃)	molekularna masa (g/mol)
(+)-katehin (2,3H-trans)	3', 4'	290,28
(-)-epikatehin (2,3H-cis)	3', 4'	290,28
(+)-galokatehin (2,3H-trans)	3', 4', 5'	306,28
(-)-epigalokatehin (2,3H-cis)	3', 4', 5'	306,28

Proantocianidini nastajajo s polimerizacijo flavan-3-olov, in so sicer njihovi di-, tri- in tetrameri. Ribéreau-Gayon in sod. (2000) delijo dimere flavan-3-olov v skupini A in B, trimere pa v skupini C in D. V vinu je prisotna predvsem B skupina (Plahuta, 2004). To so dimeri flavan-3-olov (C₃₀H₂₆O₁₂), ki so med seboj vezani s C₄-C₈ vezjo (razdeljeni v podskupine od B₁ do B₄) in dimeri s C₄-C₆ vezjo (razdeljeni v podskupine od B₅ do B₈) (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). Tako kot flavan-3-oli, se tudi proantocianidini nahajajo predvsem v trdnih delih grozdne jagode in so prisotni v rdečih vinih predvsem zaradi postopka maceracije. Njihova vsebnost je sortno pogojena. Pri sorti cabernet sauvignon so lahko prisotni v koncentracijah tudi do 1500 mg/l (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). Medtem ko imajo flavan-3-oli premajhno molekularno maso, da bi vezali proteine, jih proantocianidini zlahka vežejo (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Plahuta, 2004).

Antocianini ali antocijani so pigmenti, ki dajo vinu značilno barvo. Osnova njihove kemijske zgradbe je glikoziliran 3,5,7- trihidroksi benzopiran z različnim številom hidroksilnih ter metoksilnih skupin na 2-fenilnem obroču. Modri odtenek pigmentov narašča z večanjem števila hidroksi skupin, rdeči odtenek pa s številom metoski skupin. Glede na položaj hidroksilnih in metoskilnih skupin ločimo malvin, delfinin, peonin, cianin, pelargonin in petunin (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Plahuta, 2004).



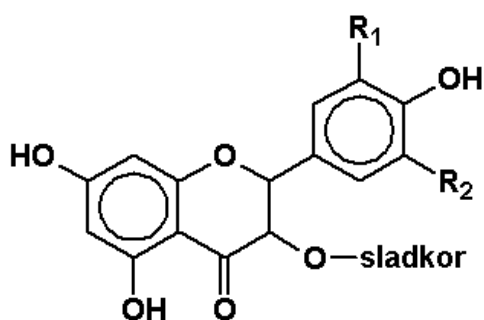
Slika 3: Splošna strukturna formula antocianidinov (Vrhovšek, 1996: 127)

Preglednica 3: Strukturne formule nekaterih antocianidinov v grozdju in vinu (Vrhovšek, 1996: 127)

	R₁	R₂
cianidin-3-monogluko­zid	H	OH
peonidin-3-monogluko­zid	H	OCH ₃
delfinidin-3-monogluko­zid	OH	OH
petunidin-3-monogluko­zid	OH	OCH ₃
malvidin-3-monogluko­zid	OCH ₃	OCH ₃

Te molekule so veliko bolj stabilne v glikozidni obliki (antocianini) kot v aglikonski obliki (antocianidini) (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). V grozdju *Vitis vinifera* se nahajajo v obliki monoglukozidov, v hibridih pa v obliki bolj stabilnih diglukozidov. Glukozni ostanki so lahko na šestem ogljikovem atomu zaestreni s p-kumarinsko, kavno ali očetno kislino. V rdečih grozdnih sortah se nahajajo v jagodnih kožicah, zato je potrebna njihova ekstrakcija. Koncentracija v mladih vinih znaša 200–500 mg/l. Barva je odvisna od pH vina, vsebnosti SO₂ v vinu, sorte, časa ekstrakcije barve in zrelosti grozdja (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Plahuta P., 2004). Fantinelli in sod. (2004) navajajo, da naj bi ravno frakcija, bogata z antocianidini in pridobljena iz rdečega vina, odločujoče zaščitno vplivala na srčne spremembe, ki so posledica ishemije (slabe prekrvavitve).

V kožicah rdečih vinskih sort so odkrili sedem oblik flavonolov, in sicer kvercetin-3-ramno­zid, miricetin-3-ramno­zid, rutin-3-ramno­gluko­zid, izoramnetin-3-gluko­zid, kampferol-3-gluko­zid, kvarcetin-3-gluko­zid in kvarcetin-3-gluko­ronid. Količinsko najbolj zastopana sta kvercetin-3-gluko­zid in kvercetin-3-gluko­ronid. Vsebnost flavonolov je močno odvisna od sorte in v rdečih vinih znaša med 2 in 17 mg/l (Plahuta P., 2004).



Slika 4: Splošna strukturna formula flavonolov (Vrhovšek, 1996: 128)

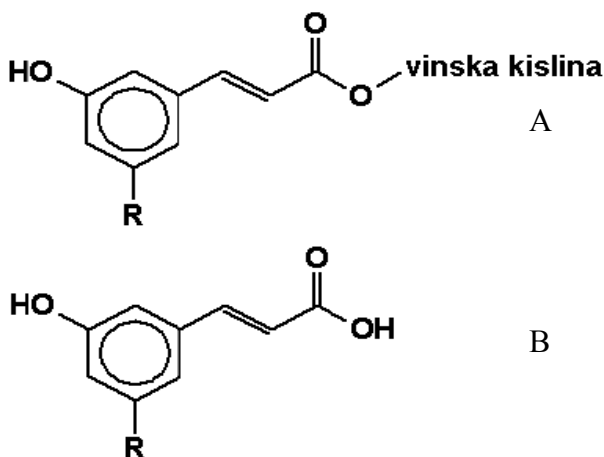
Preglednica 4: Flavonoli grozdja in vina (Vrhovšek, 1996: 128)

	R ₁	R ₂
kampferol	H	H
kvercetin	OH	H
miricitin	OH	OH
izoramnetin	OCH ₃	H

2.1.1.2 Neflavonoidni fenoli

Vrhovšek (1996) neflavonoidne fenole naprej deli na hidroksicimetne kisline, hidroksibenzojske kisline in stilbene.

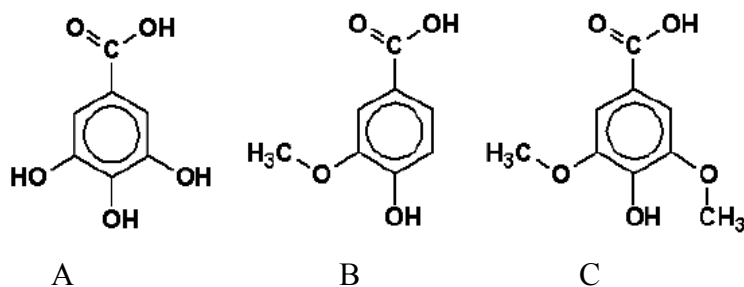
Hidroksicimetne kisline so najpomembnejša skupina neflavonoidov tako v rdečih kot tudi v belih vinih. V to skupino uvrščajo kavtarino kislino, kutarno kislino, fertarno kislino, kavno kislino, p-kumarno kislino in ferulno kislino. Kisline se nahajajo v grozdnem soku in so glavni fenoli belega vina. Prostih kislin v grozdju ni, vendar se zaradi esterazne aktivnosti tvorijo med vinifikacijo (Macheix J. in sod., 1990). V belem vinu so prisotne v koncentracijah 10 do 20 mg/l, v rdečih pa 100 do 200 mg/l. V večini vin prevladuje trans-kavtarina kislina, ki je ester kavne in vinske kisline (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Vrhovšek 1996).



Slika 5: Strukturni formuli hidroksicimetnih kislin grozdja in vina: A (R=OH kaftarna kislina, R=H kutarna kislina, R=OCH₃ fertarna kislina), B (R=OH kavna kislina, R=H p-kumarna kislina, R=OCH₃ ferulna kislina) (Vrhovšek, 1996: 128)

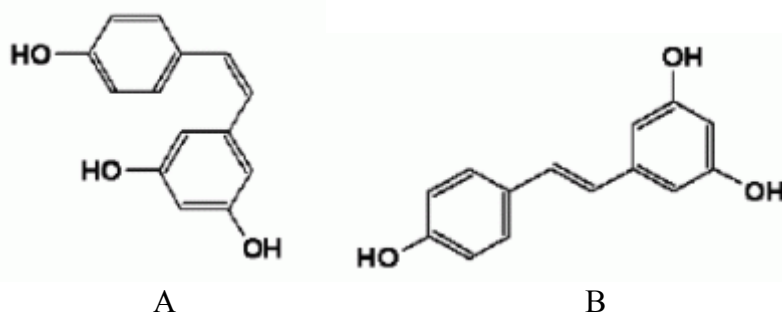
Najpomembnejše hidroksibenzojske kisline v rdečem vinu so galna kislina, vanilijeva kislina in siringinska kislina (Vrhovšek, 1996).

Galna kislina (3,4,5-trihidroksibenzojska) ima zaradi treh hidroksilnih skupin dobre antioksidativne lastnosti. V grozdju je prisotna le do največ 0,46 mg/kg. (Macheix J. in sod., 1990). V vino se izloča iz lesenih sodov ali pa pride z ekstrakcijo grozdnih pečk. Tako se v rdečih vinih njena koncentracija giblje med 2,7 in 35 mg/l (Plahuta P., 2004).



Slika 6: Strukturne formule hidroksibenzojskih kislin v grozdju in vinu: A (galna kislina), B (vaniljeva kislina), C (siringinska kislina) (Vrhovšek, 1996: 129)

Stilbeni so skupina fenolnih spojin z racionalno formulo: $C_6H_5-CH-CH-C_6H_5$. Glavni predstavnik te skupine je resveratrol. To je 3,5,4-trihidroksistilben, ki se v vinu nahaja v štirih različnih oblikah: cis- in trans-resveratrol ter cis- in trans-glukozid resveratrola. Resveratrol nastane kot stresni metabolit na vinski trti med napadom plesni, poškodbami ali med ultravijoličnim žarčenjem. Tvori se le v jagodnih kožicah, v jagodnem mesu je prisoten le v sledovih (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Plahuta P., 2004). Po Vrhovšek in sod. (1997) naj bi se vrednosti resveratrola v rdečih vinih gibale med 2,6 in 21,5 mg/l, medtem ko naj bi bile v belih vinih dosti manjše, in sicer okoli 1,8 mg/l. Vsebnost resveratrola je močno sortno pogojena. Po visoki vsebnosti resveratrola sta znani predvsem sorti modra frankinja in modri pinot (Vrhovšek in sod., 1997). Raziskave so pokazale, da je resveratrol močan antioksidant, ki deluje preventivno proti kardiovaskularnim boleznim, lahko deluje protimikrobno, protivnetno in antikarcinogeno (Frémont, 2000; Frémont in sod., 1999; Soleas in sod., 2002; Chan, 2002).



Slika 7: Strukturne formule izomer resveratrola: A (cis-resveratrol), B (trans-resveratrol) (Vrhovšek, 1996: 130)

2.1.2 Taninski fenoli

Tanini so fenolni polimeri grenkega in trpkega okusa (Plahuta P., 2004). Njihova molekulska masa se giblje med 600 in 3500 g/mol. Razlikujemo hidrolizabilne tanine in kondenzirane tanine. V centru hidrolizabilnih taninskih molekul je ogljikov hidrat (ponavadi D-glukoza), ki je zaestren z galno (galotanini) ali elagično kislino (elagitanini). Hidrolizabilne tanine lahko hidroliziramo s šibko kislino ali s šibko bazo, da dobimo

ogljikove hidrate ali fenolne kisline. Kondenzacijski tanini so polimeri flavonoidov. To so predvsem kompleksi katehinov in levkoantocianov (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). Levkoantociani ali levkoantocianini so flavan-3,4-dioli, ki se od katehina razlikujejo le po dodatni hidroksilni skupini. V belih vinih niso zaželeni, ker že v nizkih koncentracijah povzročajo trpkost. Med levkoantocianine uvrščajo cianidinol, delfinidinol, malvidinol in petudinol (Plahuta P., 2004).

Hidrolizabilni tanini v grozdnih jagodah niso prisotni. V vino pridejo z ekstrakcijo iz lesenih sodov ali pa jih dodajajo kot enološka sredstva. Kondenzirani tanini so v grozdu prisotni v jagodni kožici, peclju in pečkih (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). S stopnjevanjem zorenja grozdja se povečuje količina lahko izlučljivih taninov v jagodni kožici, zmanjšuje pa se količina ekstrahiranih taninov iz grozdnih pečk (Nemanič in sod., 1997).

Tanini se s proteini zlahka vežejo, kar povzroči njihovo usedanje na dno posode. (Plahuta P., 2004). Reagirajo tudi s prostimi antociani. Kompleksi antociani-tanini dajo vinu stabilno rdečo barvo (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Nemanič in sod., 1997).

Ker vežejo kisik, ščitijo druge komponente vina pred oksidacijo. Ovirajo tudi delovanje encimov in mikrobov. V belih vinih so prisotni v koncentracijah med 250 in 310 mg/l, v rdečih vinih pa med 390 in 1660 mg/l (Kennedy in sod., 2006). Vina, ki imajo večjo vsebnost taninov, potrebujejo daljši čas zorenja in staranja, saj manjše molekule taninov s časom polimerizirajo in tako vino izgubi agresivno grenkobo in trpkost, pridobi pa na polnosti (Košmerl, 2004; Košmerl, 2005).

2.2 ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST FENOLNIH SPOJIN V VINU

Večina fenolov v vinu ima antioksidativne lastnosti, ki so posledica ene ali več hidroksilnih skupin na benzenovem obroču (Kanner in sod., 1994). V človeškem telesu vežejo proste radikale in tako ščitijo celične komponente pred poškodbami. Zavirajo tudi nastanek kardiovaskularnih in rakastih obolenj ter procese staranja (Plahuta, 2004).

2.2.1 Antioksidativni mehanizem

2.2.1.1 Reaktivne spojine kisika

Pri normalnem procesu oksidacije se v organizmu tvorijo reaktivni prosti radikali, ki lahko reagirajo z drugimi molekulami in jih pri tem poškodujejo. Pri tem igrajo pomembno vlogo reaktivne spojine kisika, zlasti prosti radikali. To so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim nesparjenim elektronom (Korošec, 2000).

Preglednica 5: Reaktivne spojine kisika (Radovič, 2002: 6)

Radikali	Neradikalske spojine
hidroksil radikal (HO^\bullet)	vodikov peroksid (H_2O_2)
hidroperoksil radikal (HOO^\bullet)	ozon (O_3)
superoksidni anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	singletni kisik ($^1\text{O}_2$)
alkoksil radikal (RO^\bullet)	tripletni kisik ($^3\text{O}_2$)
alkilperoksil radikal (ROO^\bullet)	

2.2.1.2 Antioksidanti

Antioksidanti so spojine, ki z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov ter z odstranjevanjem in popravljenjem oksidativno poškodovanih biomolekul preprečujejo oksidativni stres. Delimo jih na tri skupine, in sicer na prave antioksidante, ki vežejo proste radikale, na reducente ter na antioksidantne sinergiste, ki povečujejo učinkovanje pravih antioksidantov (Korošec, 2000).

Fenoli (ArOH) in nekateri aromatski amini neposredno reagirajo z ustreznim radikalom, tako da pride do prenosa vodikovega atoma iz fenolne skupine na radikal (Burton in Ingold, 1989).



Nastane fenoksil radikal, ki se lahko odstrani pri reakciji z molekulo alkilperoksil radikala in nastane neradikalni produkt (Burton in Ingold, 1989).



Lahko pa se v prisotnosti askorbata ali drugih reducentov pretvori nazaj v fenol (Burton in Ingold, 1989).

Učinkovitost antioksidantov je tem večja, čim manjša je jakost vezi Ar-OH. Fenolni antioksidanti so dobri donorji vodika ali elektronov, poleg tega so njihovi radikali relativno stabilni zaradi delokalizacije nesparjenih elektronov okrog aromatskega obroča (Shahidi in Naczki, 1995).

Antioksidante delimo tudi na vodotopne (askorbinska kislina, glutation, bilirubin, sečna kislina, tioli) in topne v maščobah (ubikinol Q₁₀, vitamin E, likopen in β-karoten) (Korošec, 2000).

2.3 VPLIV VINA NA ZDRAVJE

Francozi uživajo veliko nasičenih maščob, vendar je pri njih presenetljivo malo bolezni srca in ožilja. To pripisujejo rednemu in zmernemu uživanju rdečega vina, ki naj bi ugodno vplivalo na zdravje ljudi predvsem zaradi vsebnosti določenih fenolov in etanola (Plahuta, 2004). To protislovje, imenovano tudi francoski paradoks, je bila tema 60-minutne oddaje, ki je bila na sporedu ameriške televizije v novembru 1991, in knjige, ki je izšla leta 1992. Da bi potrdili veljavnost koncepta, so v Franciji opravili vrsto epidemioloških študij in raziskav na živalih (Caen in Brun, 1994). Kot že omenjeno, so polifenoli v vinu dobri antioksidanti, ki ščitijo celice pred škodljivimi prostimi radikali in s tem delujejo preventivno proti različnim boleznim. Po zaužitju rdečega vina se antioksidativna sposobnost plazme poveča in po petdesetih minutah doseže vrh. Po zaužitju belega vina te spremembe niso opazne. Zato je dvig antioksidativne sposobnosti plazme verjetno posledica flavonoidov, ki so v primerjavi z belimi vini bistveno bolj prisotni v rdečih vinih (Košmerl in sod., 2006). Čeprav se polifenolom vsesplošno prepisuje preventiven učinek proti različnim boleznim, je njihov celoten vpliv na zdravje še vedno dvomljiv, še posebej ko gre za predoziranje, ki je posledica uživanja prehranskih dodatkov (Halliwell, 2007). V prisotnosti redoks aktivnih ionov delujejo tudi prooksidativno (Vertuani in sod., 2004).

Preglednica 6: Pozitivni vplivi rdečega vina na zdravje v primerjavi z drugimi alkoholnimi pijačami (Tomera, 1999: 133).

KLINIČNI VPLIV	RAZLAGA
POZITIVNI VPLIVI zaščita pred koronarnimi arterijskimi boleznimi	<p>Klatsky in sod. (1997) navajajo, da vino in pivo bolj učinkujeta pri zmanjšanju tveganj za koronarne bolezni v primerjavi z etanolom. Goldberg in sod. (1996) so preučevali ugodne vplive uživanja vina v primerjavi z grozdnim sokom na spreminjanje koncentracije plazemskih lipidov. Ugotovili so, da ugodno učinkuje le rdeče vino in da grozdn sok ne vpliva. Zaključili so, da naj bi bil učinek posledica etanola, čeprav drugih komponent, ki nastajajo z zorenjem vina, niso preučili.</p>
zaščita pred cerebrovaskularnimi boleznimi	<p>Zmerno pitje vina občutno vpliva na zmanjšanje cerebrovaskularnih bolezni. Uživanje vina ali žganih pijač na zmanjšanje tveganja ne vpliva.</p>
protistrjevalno sredstvo	<p>Raziskave na fibrinolitičnem encimu v človeški plazmi so pokazale, da uživanje rdečega vina inhibira ta encim, uživanje enake količine etanola, kot ga je v vinu, pa nima tega vpliva. Druga raziskava kaže (Pace-Asciak in sod., 1995b), da ima rdeče vino enak vpliv na strjevanje krvi kot belo vino. Ta raziskava zaključuje, da naj bi bil etanol glavno protistrjevalno sredstvo.</p>
vpliv na stres	<p>Rdeče vino neodvisno od etanola ne vpliva na psihoaktivne lastnosti.</p>
zmanjšanje razmerja med pasom in boki	<p>Ocenjevali so tudi razmerje v širini med boki in pasom v odvisnosti od pitja določene alkoholne pijače. Ljudem, ki so pili vino, se je to razmerje zmanjšalo, ljudem, ki so pili pivo, pa povečalo.</p>

Preglednica 7: Negativni vplivi rdečega vina na zdravje v primerjavi z drugimi alkoholnimi pijačami (Tomera, 1999: 133).

KLINIČNI VPLIV	RAZLAGA
NEGATIVNI VPLIVI	
želodčne težave	Rdeče vino naj bi povzročalo želodčne težave bolj kot coca-cola, viski in etanol. Težave naj bi bile posledica spremembe sekrecije kloridnega iona v želodcu.
histaminska indukcija bronhialnega krčenja	Po Wantke in sod. (1996) naj bi histamin v vinu inducirala bronhialno krčenje pri pacientih, ki obolevajo za histaminsko intoleranco.
presnovna motnja histamina	Pacienti, ki imajo zaradi pomanjkanja diamin-oksidge zmanjšano histaminsko presnovo, so intolerantni do vina.
migrenski glavobol	Večina rdečih vin sprošča serotonin iz krvnih ploščic. Nekatere vrste rdečih vin povzročajo intenzivnejše sproščanje serotonina kot druge.(Pattichis in sod., 1995).
rak na želodcu	Naključni kontrolni raziskavi sta potrdili tveganje za raka na želodcu v odvisnosti od količine zaužitega rdečega vina (Falcao in sod., 1994; Barra in sod., 1990).
zgaga	Uživanje zmerne količine rdečega vina pri obroku hrane povečuje izločanje želodčne kisline.

2.3.1 Vpliv etanola na zdravje

Ne glede na to, ali gre za vino, pivo ali žganje, etanol zmanjšuje tveganje za koronarne srčne bolezni s povečanjem krvne ravni lipoproteinov visoke gostote (Kapš, 1997) in preprečevanjem agregacije krvnih ploščic (Renaud in Ruf, 1996; Pace-Asciak in sod., 1995b). Alkohol intenzivno poveča tvorbo nevtralnih maščob v jetrih in hkrati preprečuje hitrejše izgorevanje teh maščob v plazmi. Zdravniki zato prepovedujejo uživanje vina bolnikom z motnjo v presnovi maščob, ljudem, ki so preboleli vnetje trebušne slinovke, in bolnikom z okvaro jeter. Bolniki s povečanim holesterolom v krvi in normalno telesno težo lahko uživajo zmerne količine vina. Zmerno pitje pomeni uživanje največ ene enote alkoholnih pijač na dan pri ženskah in največ dveh enot alkoholnih pijač na dan pri moških. Za eno enoto se smatra približno deset gramov etanola, kar ustreza kozarcu vina, 0,33l piva ali 0,04 l žgane pijače (Kapš, 1997).

Uživanje alkoholnih pijač vključno z vinom dokazano povečuje možnost nastanka različnih rakavih obolenj, kot so rak na dojki, rak v ustih, požiralniku, želodcu, pankresu in jetrih (Košmerl in sod., 2006; Jensen in sod., 1996). Uživanje alkohola je najbolj povezano

z rakavimi obolenji zgornjega prebavnega trakta. Nastanek teh bolezni je v 25 % do 80 % odvisno od uživanja alkoholnih pijač (Morris Brown, 2005). Možnost raka na dojkah se poveča za 30 % že pri eni sami enoti alkoholne pijače na dan. Z vsako nadaljnjo enoto alkoholne pijače na dan se možnost nastanka tega obolenja poveča za 10 % (Beral in sod., 2002). Po Kapš (1997) alkohol dvigne koncentracijo estrogena, ki se ga s tabletkami vnaša v kri. Pri ženskah, ki ne jemljejo hormonskih tablet, tega učinka ni. Zaradi dviga koncentracije hormona in zaradi verjetne vezave z alkoholom obstaja veliko tveganje za nastanek raka na prsni pri ženskah, ki med menopavzo in po njej jemljejo hormone. Prekomerno pitje alkohola vodi v odvisnost, ki prizadene jetra, živčni system (polinevropatija), srce (kardiomiopatija), trebušno slinovko ter želodec in črevesje. Jetra so osrednji organ za presnovo alkohola in so pri odsvnikih od alkohola najprej in najmočneje prizadeta (Kapš, 1997).

2.3.2 Vpliv polifenolov na zdravje

2.3.2.1 Zaščita pred kardiovaskularnimi boleznimi

Več kot polovico (53 %) vseh smrti v razvitih državah z izjemo Japonske povzročajo bolezni srca in ožilja. Ateroskleroza ali poapnenje žil je bolezen arterijske stene, ki povzroča infarkt srca in možganov. Na začetek te bolezni vplivajo tudi oksidirani lipoproteini majhne gostote, ki nakopičeni v žilah povzročijo nastanek ateroma oziroma zadebelitve v intimi arterije ali srčni zaklopki. Polifenoli v rdečih vinih zmanjšujejo tveganje za kardiovaskularne bolezni, tako da delujejo kot antioksidanti, ki lipoproteine z nizko gostoto (LDL) ščitijo pred oksidacijo (Kapš, 1997; Kerry in Abbey, 1997).

Pace-Asciak in sod. (1995a) poročajo o učinkih trans-resveratrola, ki jih primerjajo z kvercetinom, katehinom in epikatehinom ter antioksidanti, kot so alfa tokoferol, hidrokinon in butiliran hidroksitoluen. Dokazali so, da v odvisnosti od koncentracije transresveratrol in kvercetin inhibirata thrombin in ADP inducirano trombocidno združevanje, medtem ko etanol inhibira samo trombin-inducirano združevanje krvnih ploščic. Druge komponente, ki so jih testirali, niso bile aktivne. Iz tega sledi, da polifenoli v vinu, kot sta kvercetin in resveratrol, pripomorejo k zaščitniški vlogi vina proti aterosklerozi in koronarnim srčnim boleznim, tako da blokirajo združevanje krvnih ploščic.

2.3.2.2 Antikarcenogena in antimutagena sredstva

Vino razpolaga s kar več kot 200 različnimi biološko aktivnimi fenolnimi spojinami, ki s spremembo celičnega metabolizma nesporno upočasnjujejo razvoj rakavih obolenj (German in Walzem, 2000). Številni flavonoidi in druge fenolne spojine inhibirajo delovanje encimov, kot so lipooksigenaze, ciklooksigenaze in ksantin oksigenaze. Dokazano je, da učinkujejo predvsem v celicah gastrointestinalnega trakta, pri zadostni količini pa verjetno tudi v drugih tkivih (Halliwell, 2006). Damianaki in sod. (2000) so dokazali, da polifenoli vina, kot so katehin, epikatehin in resveratrol s svojim antioksidativnim delovanjem učinkovito inhibirajo razmnoževanje celic, ki povzročajo raka dojke. Pri zorenju rdečih vin se iz hrastovih posod v vino ekstrahira kastalagin, ki se v treh stopnjah pretvori v spojino veskalin, ki deluje antikancerogeno, tako da inhibira

topoizomeraze II (Borman, 2005). V zvezi s karcinogenezo flavonoli pomembno vplivajo na celični in molekularni mehanizem, kot je kontrola celičnega cikla in celične smrti (Neurhouser, 2004). Za kvercetin so Soleas in sod. (1997) dokazali, da inhibira rast človeških in živalskih rakavih celic levkemije, raka na dojkah, karcinoma glave in vratu, raka želodca in debelega črevesja. Neuhouer (2004) pa omenja pozitivno delovanje kvercetina v zvezi z rakom pljuč. Kljub temu je dnevno uživanje kvercetina boljša preventiva pri kardiovaskularnih obolenjih kot pri zmanjšanju rakavih obolenj (Halliwell, 2006). Tudi nekateri ostali flavonoli, kot so miricetin, morin kamferol in rutin, inhibirajo mutageno aktivnost nekaterih kancerogenih metabolitov (Huang in sod., 1983). Resveratrol poleg tega, da deluje antioksidativno in antimutageno, povečuje vsebnost encimov, ki so sposobni detoksifikacije kancerogenih snovi, predvsem pa inhibicije ciklooksigenaz. Ciklooksigenaze so odgovorne za pretvorbo arahidonske kisline v proznetne substance, ki spodbujajo rast rakavih celic (Milner in sod., 2001). Hidroksicimetne kisline, kot sta kavna in ferulna kislina, ščitijo telo pred karcinogenim delovanjem nitro spojin (Soleas in sod., 1997; Tomera, 1999).

2.3.2.3 Protimikrobna sredstva

Polifenoli v vinu so tudi učinkovita protimikrobna sredstva. Cushnie in Lamb (2005) dokazujeta protimikrobno aktivnost flavonoidov. Chan (2002) je dokazal, da je resveratrol inhibitor patogenih kožnih bakterij. Tudi hidroksibenzojskim kislinam, kot je galna kislina, je bila dokazana protimikrobna učinkovitost proti različnim bakterijam (Yamamoto in Ogawa, 2002) in glivam (Lattanzio in sod, 1994).

2.4 LIOFILIZACIJA

Liofilizacija ali sušenje z zamrzovanjem je postopek, s katerim dehidriramo hrano, krvno plazmo in ostale toplotno občutljive snovi. Snov zamrzemo in led odstranimo s sublimacijo, tako da znižamo tlak. Vodno paro odstranimo in dobimo suh nepoškodovan izdelek (Naravoslovje, 1996).

Zamrzovanje poteka pri temperaturah od $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, v nekaterih primerih tudi pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Material za zmrzovanje se nanese v čim tanjšem sloju, da zmrzovanje poteka čim hitreje brez poškodb celic. Hitrost zmrzovanja je odvisna od hladilnega medija, prenosa toplote in fizikalnih lastnosti proizvoda, ki se zamrzuje. Po zamrzovanju se material suši v visokem vakuumu in pri temperaturah do $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tako posušeni material ohranja visoko biološko aktivnost, saj sušenje poteka brez zraka in pri nizkih temperaturah (Marić, 1996). Uporabo tega postopka omejujeta visoka cena aparatur in visoki stroški sušenja. Kljub temu se postopek uporablja za sušenje različnih bioloških materialov, kot so bakterijske in kvasne startar kulture za živilsko industrijo, farmacevtskih in drugih proizvodov, ki jim še povečajo trajnost, tako da jih pakirajo v primerno vakuumirano embalažo ali v embalažo inertnega plina (Marić, 1996).

Po Van Golde in sod. (2004) ta proces sušenja rdečih vin ne povzroča antioksidativnih izgub fenolov.

2.5 POMEMBNE SORTNE ZNAČILNOSTI IZBRANIH VZORCEV VIN

2.5.1 Modri pinot

Modri pinot ali modri burgundec je rdeča sorta vinske trte *Vitis vinifera*. Izvira iz Burgundije v Franciji. Pri nas jo gojimo v posavskem vinorodnem rajonu in na Štajerskem. Sorta je primerna za hladnejša podnebja, ker zgodaj dozoreva. Občutljiva je za gojenje in kletarjenje. Daje šibko obarvano vino z značilno aromo, ki ob ustreznem zorenju lahko doseže izjemno kakovost. Pogosto se ga predela tudi v peneča vina in rosé vina (Plahuta, 2004; Nemanič, 1999; Šikovec, 1996). Grozdje je sorazmerno siromašno s tanini in povprečno obarvano. Pomanjkanje sonca pri gojenju trte se izraža v odsotnosti vonjev in mehki taninov v vinu (Nemanič, 1999). Vino je svetlejšje rubinaste rdeče barve, ki z razvojem dobiva bakrene in kavno rjave odtenke. Daje značilno, lahko razpoznavno vinsko aromo. Mlada vina imajo vonj po jagodičju in češnji, z razvojem dobijo rastlinski vonj po humusu, gomoljiki in kavi, v zadnji fazi pa se razvije živalski vonj po usnju in krznu. Uspela vina so glicerinsko bogata, skladna, polna in vsebujejo mehke tanine (Nemanič, 1999; Šikovec, 1999). Modra frankinja

2.5.2 Modra frankinja

Modra frankinja, frankinja ali frankovka je rdeča sorta vinske trte *Vitis vinifera* in je razširjena v številnih evropskih državah (Plahuta, 2004). Domnevajo, da je po poreklu s Hrvaške oziroma iz podonavskih dežel (Šikovec, 1996). Pri nas je posebej razširjena v Posavju. Modra frankinja je nezahtevna sorta, ki srednje pozno zori in daje visoke hektarske donose (Plahuta, 2004; Nemanič, 1999).

Vino je precej bogato s kislino in primerno za tipiziranje. Sorta je zastopana v metliški črnini, cvičku, rdečem bizeljčanu, virštanjčanu in rdečem konjičanu, lahko je tudi osnova penečih in rosé vin (Plahuta, 2004; Nemanič, 1999). Če grozdje doseže primerno sladkorno stopnjo, lahko daje odlična rdeča vina. Jagodna kožica je bogata s fenoli in s strokovno vodeno maceracijo lahko dobimo odlično mlado vino. Dobri letniki so primerni za daljše zorenje, po katerem dobimo krepko, intenzivno obarvano rdeče vino (Nemanič, 1999).

Intenzivna rubinasto rdeča barva dolgo ohrani mladosten videz, saj se opečnati prameni pojavijo šele po nekaj letih zorenja. Ima sortno značilen, blag, topel vonj, ki je pri mladih vinih sadnega značaja, v zrelih pa spominja na vonj po usnju, praženi kavi in čokoladi. Kakovostni letniki omogočajo vina izredno polnega okusa s harmoničnim razmerjem med tanini in kislino (Nemanič, 1999).

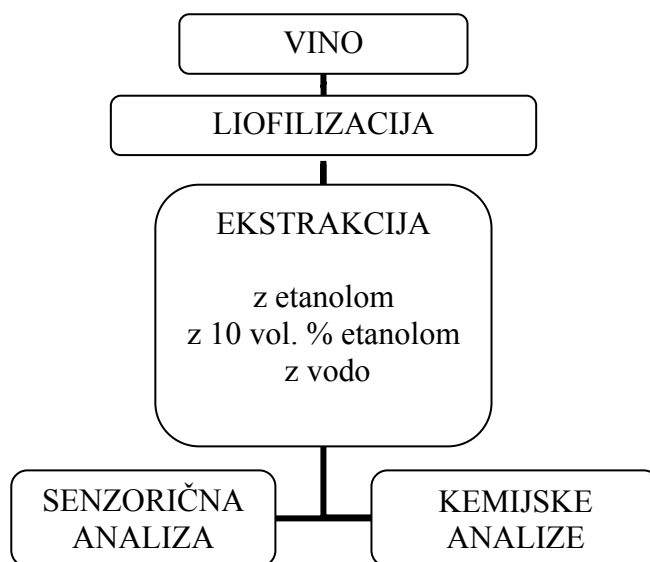
2.5.3 Cabernet sauvignon

Cabernet sauvignon je rdeča sorta vinske trte *Vitis vinifera*, ki izvira s področja Bordeaux v Franciji. Sorto so dobili tako, da so križali cabernet franc in sauvignon (Plahuta, 2004). Pri nas je razširjena na Primorskem (Šikovec, 1996). Sorta slabo rodi in je občutljiva za

bolezni, vendar lahko daje izjemno kakovostna in cenjena vina. (Plahuta, 2004; Nemanič, 1999).

Vino slovi po intenzivni rdeči barvi (Plahuta, 2004; Nemanič, 1999), pri katerem lahko zaznamo več vonjev, ki spominjajo na sadje, kot sta ribez ali oljka, na vonj po praženem, ali pa zaznamo rastlinske vonjave, kot so vonj po cedri, zeleni papriki, humusu, gomoljki, tobaku, meti ali čokoladi (Nemanič, 1999). Mlado vino daje aromo po ribezu, malinah in višnjah (Plahuta, 2004). Pri okušanju je značilno zaznavanje močne zastopanosti taninov, ki so pri mladih vinih grobi, sčasoma pa omogočijo vinu lep razvoj (Plahuta, 2004; Nemanič, 1999; Šikovec, 1996). Za to sorto se priporoča tehnologijo barrique oziroma vrenje v majhnih neovinjenih sodih za krajši čas, od koder se vino pretoči v večje lesene sode, kjer zori več let. Med zorenjem pride do izločanja taninov iz lesa, do njihove polimerizacije ter do nastanka plemenite arome (Šikovec, 1996). Sorta počasi zori in se stara ter doseže svoj vrhunec med tretjim in desetim letom (Plahuta, 2004). Dobri cabernet sauvignoni imajo optimalno razmerje med taninskimi snovmi in kislinami, kar zaznamo v zaključku po požirku (Nemanič, 1999).

3 MATERIALI IN METODE



Slika 8: Potek eksperimentalnega dela

3.1 POTEK POSKUSA

S slike 8 je razvidno, da je poskus potekal tako, da smo najprej vino liofilizirali. Nato pa smo enako količino ekstrakta, kot ga je bilo v prvotnem vzorcu, raztopili v vodi, 10 vol. % etanolu ter etanolu. Tako smo pripravili rekonstituirane liofilizate z enako vsebnostjo suhega preostanka, ki smo jih poimenovali frakcije. V vinu in frakcijah smo opravili različne kemijske analize in senzorično analizo. Če ni drugače navedeno, smo vse meritve delali v paralelkah in jim določili aritmetično sredino.

3.1.1 Materiali

3.1.1.1 Vzorci

Za poskus smo izbrali vrhunska vina letnika 2004, sort modri pinot (Agroind Vipava), modra frankinja (Vinska klet Krško) in cabernet sauvignon (Vinakoper). Poleg glavnih vzorcev smo za primerjavo liofilizirali še rdečo zvrst namiznega vina (Uvoz iz Makedonije – polni Slovin) in vrhunsko belo vino sorte rumeni moškati (Vinakoper).

3.1.1.2 Laboratorijska oprema

Za poskuse smo potrebovali:

- UV-VIS spektrofotometer,
- centrifugo,
- avtomatske pipete,
- kivete (1,5 ml, PP in PS),
- kapalke,
- analitsko tehcnico (Mettler Toledo),
- liofilizator (Freezeedryer gama, PR 1005-90, Primex),
- mešalnik VORTEX,
- štoparico,
- viala za plinsko in tekočinsko kromatografijo,
- filter (CA 0,45 μ m),
- brizge,
- mikrocentrifugirke (1,5 ml),
- centrifugirke (15 ml),
- kromatografsko kolono (RP C18, 250 mm x 4 mm),
- tekočinski kromatograf z diodno matriko (Agilent 1100)
- plinski kromatograf (Varian Star 3600CX) z masnim detektorjem (Varian Saturn 2000)
- VOCOL kapilarno kolono za plinsko kromatografijo

3.1.2 Reagenti

Preglednica 8: Uporabljeni reagenti pri posameznih analizah

Vsrta kemijske analize	Uporabljeni reagenti
Estrakcija polifenolov	<ul style="list-style-type: none"> • mili Q voda • 10 vol. % etanolna raztopina • 95 % etanol
Določanje masne koncentracije skupnih fenolov	<ul style="list-style-type: none"> • osnovna raztopina galne kisline (13,6 mg/l) • Folin-Ciocalteu reagent (razredčen z mili Q vodo v razmerju 1: 3) • 20 % raztopina Na₂CO₃ • mili Q voda
Določanje masne koncentracije netaninskih fenolov	<ul style="list-style-type: none"> • 0,4 % raztopina metil celuloze • nasičena raztopina (NH₄)₂SO₄ (80g/100 ml) • 20 % raztopina Na₂CO₃ • Folin-Ciocalteu reagent (razredčen z mili Q vodo v razmerju 1:3) • mili Q voda

se nadaljuje

nadaljevanje

Vsrta kemijske analize	Uporabljeni reagenti
Določanje masne koncentracije neflavonoidnih fenolov	<ul style="list-style-type: none"> • 2,26 % raztopina formaldehida • 37 % HCl razredčena z mili Q vodo v razmerju 1:4 • 20 % raztopina Na₂CO₃ • Folin-Ciocalteu reagent (razredčen z mili Q vodo v razmerju 1:3) • mili Q voda
Določanje antioksidacijskega potenciala vina in pripravljenih frakcij	<ul style="list-style-type: none"> • reagent DPPH[*]: 4 mg/80 ml etanola • etanol • mili Q voda • osnovna raztopina galne kisline (13,6 mg/l) • citratni pufer (pH 3,5) • acetatni pufer (pH 5,5) • askorbinska kislina
Določanje antioksidacijskega potenciala netaninskih fenolov	<ul style="list-style-type: none"> • 0,4 % raztopina metil celuloze • nasičena raztopina (NH₄)₂SO₄ (80g/100 ml) • reagent DPPH[*]: 4 mg/80 ml etanola • etanol • mili Q voda
Določanje antioksidacijske potenciala neflavonoidnih fenolov	<ul style="list-style-type: none"> • 2,26 % raztopina formaldehida • 37 % HCl razredčena z mili Q vodo v razmerju 1: 4 • reagent DPPH[*]: 4 mg/80 ml etanola • etanol • mili Q voda
Določanje kinetike reakcije fenolnih spojin z DPPH [*]	<ul style="list-style-type: none"> • vodne raztopine standardov cianidin klorida, rutina, kvercetina, katehina, epikatehina, resveratrola, oenin klorida • ostali reagenti so enaki kot pri določanju antioksidacijskega potenciala vina in pripravljenih frakcij, AOP netaninskih fenolov in AOP neflavonoidnih fenolov • mili Q voda
Določanje antocianov	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 % raztopina HCl v etanolu (0,69 ml konc, HCl smo dopolnili do 250 ml s 95 % etanolom) • 2 % raztopina HCl • citratni pufer z vrednostjo pH 3,5 • mili Q voda
Določanje intenzitete barve	<ul style="list-style-type: none"> • citratni pufer z vrednostjo pH 3,5 • mili Q voda

3.2 METODE DELA

3.2.1 Liofilizacija vin

3.2.1.1 Postopek liofilizacije

Sušenje z zmrzovanjem je potekalo v liofilizatorju, ki je imel 9 plošč. Na vsako ploščo smo odpipetirali po 1dl vina.

Liofilizacija izbranih vin je stekla točno po določenem programu. Najprej se je vino ohladilo na $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri tej temperaturi in tlaku 0,2 mbar se je sušilo 24 ur. Po 24 urah se je pri istem tlaku segrelo na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tako se je sušilo nadaljnje 4 ure. Po 28 urah smo tlak znižal na 0,009 mbara in pri isti temperaturi se je vino sušilo še dve uri. Izbrani vzorci vin so se torej sušili 30 ur.

3.2.1.2 Določanje preostanka po liofilizaciji

Z namenom, da bi lahko enako količino liofilizata, kot ga je bilo v prvotnem vzorcu, raztopili v določena topila, smo morali določiti maso suhe snovi v vinu, ki nam je ostala po liofilizaciji. To smo izvedli tako, da smo plošče, na katerih smo liofilizirali, stehali pred dodatkom vina in po končani liofilizaciji. Meritve smo delali v treh paralelkah za vsako vino. Da bi še dodatno podkrepili dobljene rezultate, smo sušenje vzporedno izvedli še z vakuumsko centrifugo v UNIVAPO 100H in nato dobljeno suho snov stehali.

3.2.2 Ekstrakcija polifenolov

Z različnimi topili, kot so etanol, voda in 10 vol. % etanol, smo ekstrahirali različne fenolne frakcije. Pripravili smo take raztopine, ki so bile glede koncentracije suhe snovi enake prvotnemu vinu.

Vsak liofilizat določene sorte vina smo zatehtali trikrat in nato v prvo 1,5 ml centrifugirno epruveto dodali etanol, v drugo 10 vol. % etanola in v tretjo vodo. Tako pripravljene raztopine smo na mešalčku mešali 3 minute.

3.2.3 Določanje etanola v ekstraktu

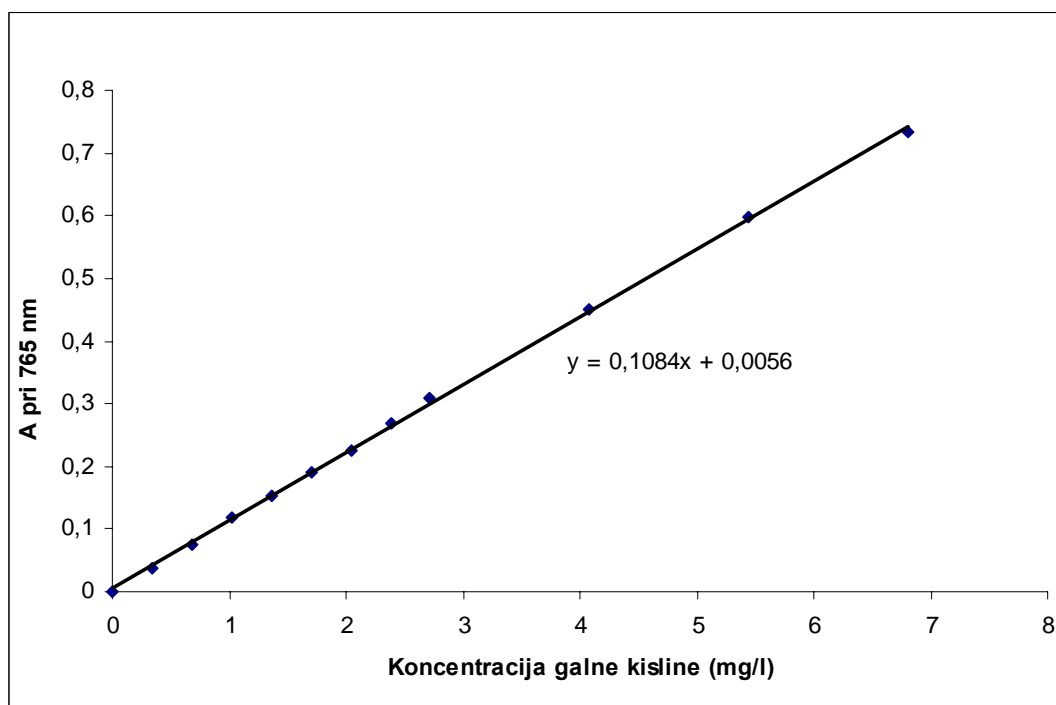
Vsebnost etanola in glicerola v vinu in vodnih frakcijah smo določili z visokotlačno tekočinsko kromatografijo. Vodne raztopine liofilizatov izbranih vrhunskih vin smo pripravili po metodi 3.2.2. Tako pripravljena vina raztopine smo prefiltrirali v vialo. Analizo so izvedli na katedri za biotehnologijo Oddelka za živilstvo BF. Analiza je potekala na HPLC sistemu (KNAUER) na AMINEX koloni. Etanol se je po izokraski eluaciji s 5 mM H_2SO_4 določil spektrofotometrično pri valovni dolžini 200 nm, glicerol pa refraktometrično.

3.2.4 Spektrofotometrične metode

3.2.4.1 Določanje masne koncentracije skupnih fenolov

Skupne fenolne spojine smo določili s spektrofotometrično metodo, tako da smo primerno razredčenim vzorcem dodali Folin-Ciocalteujevim reagent, ki v alkalni raztopini (dodatek Na_2CO_3) oksidira fenolne snovi in pri tem spremeni barvo. Reagent F.C. vsebuje vodno raztopino natrijevega volframata (VI), natrijevega molibdata (VI) in litijevega sulfata (VI). Natrijev volframat (VI) in natrijev molibdat (VI) se v alkalnem mediju, ob prisotnosti fenolov, pretvorita iz nereducirane oblike rumene barve v mešanico oksidov (W_8O_{23} , Mo_8O_{23}) modre barve. Litijev sulfat je v reagentu F.C. zato, da prepreči obarjanje. Modri pigment določimo z merjenjem absorbance pri 765 nm. Rezultat podajamo v mg GAE /l. Za poskus smo morali najprej pripraviti umeritveno krivuljo. Kot standardno referenčno raztopino smo uporabili galno kislino.

V 1,5 ml centrifugirne epruvete smo odpipetirali naslednje volumne standardne raztopine s koncentracijo 13,6 mg/l: 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 300, 400, 500 μl in z mili Q vodo dopolnili do 750 μl . Raztopinam smo dodali 125 μl razredčenega reagenta F.C. in z mešalčkom dobro premešali. Po petih minutah smo dodali še 125 μl raztopine natrijevega karbonata in še enkrat dobro premešali. Po 90 minutah smo pripravljenim standardom (pri temperaturi 20 °C, valovni dolžini 765 nm in v 1 cm kivetah) izmerili absorbance.



Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje masne koncentracije fenolov

Za analizo vzorcev smo najprej pripravili etanolne, 10 vol. % etanolne in vodne raztopine liofilizatov izbranih vin (metoda 3.2.2). Vsako ekstrakcijo smo delali v treh ponovitvah. Vzorce smo odvisno od pričakovane koncentracije skupnih fenolov pred analizo primerno razredčili. Končne razredčitve so prikazane v preglednici 9.

Preglednica 9: Končni razredčitveni faktorji posameznih vzorcev pri določanju masne koncentracije skupnih fenolov

Vzorci	Faktor R (končna razredčitev)
modri pinot: vino	667
modri pinot: etanolna frakcija	64
modri pinot: 10 vol. % etanolna frakcija	320
modri pinot: vodna frakcija	320
modra frankinja: vino	667
modra frankinja: etanolna frakcija	267
modra frankinja: 10 vol. % etanolna frakcija	601
modra frankinja: vodna frakcija	601
cabernet sauvignon: vino	500
cabernet sauvignon: etanolna frakcija	200
cabernet sauvignon: 10 vol. % etanolna frakcija	400
cabernet sauvignon: vodna frakcija	400
rdeča zvrst: vino	286
rdeča zvrst: vodna frakcija	286
rumeni muškat	133
rumeni muškat: vodna frakcija	133

V 1,5 ml mikrocentrifugirke smo odpipetirali primerno količino razredčenih vzorcev in jim dodali vodo do 750 μ l. Nato smo jim dodali 125 μ l reagenta F.C. in dobro premešali. Po 5 minutah smo dodali 125 μ l natrijevega karbonata in ponovno premešali. Pripravljenim vzorcem smo po 90 minutah (pri sobni temperaturi, valovni dolžini 765 nm in v 1cm kivetah) izmerili absorbanco. Meritve smo delali v treh paralelkah. Na podlagi umeritvene krivulje (slika 9) smo ob upoštevanju razredčitvenega faktorja (preglednica 9) izračunali koncentracijo skupnih fenolov v vzorcu.

3.2.4.2 Določanje masne koncentracije netaninskih fenolov

Masno koncentracijo netaninskih fenolov določimo, tako da taninske komponente v vzorcih najprej oborimo z metilcelulozo in amonijevim sulfatom, nato pa z reagentom F.C. določimo preostale netaninske fenole (Določanje polifenolov ..., 1995).

V 1,5 ml centrifugirko smo odpipetirali 200 μ l vzorca (vin in pripravljenih frakcij po metodi 3.2.2), 100 μ l raztopine metilceluloze, 200 μ l raztopine amonijevega sulfata in 500 μ l mili Q vode, dobro premešali in počakali 5 minut, da so se taninske komponente oborile. Nato smo 5 minut centrifugirali pri 10 000 obr/min. Supernatant smo glede na pričakovane dobljene vrednosti primerno razredčili (preglednica 10). Nato smo po enakem postopku kot pri določanju koncentracije skupnih fenolov z reagentom F.C. določili preostale netaninske fenole v vzorcih.

Preglednica 10: Končni razredčitveni faktorji posameznih vzorcev pri določanju netaninskih fenolnih spojin

Vzorci	Faktor R (končna razredčitev)
modri pinot: vino	667
modri pinot: etanolna frakcija	63
modri pinot: 10 vol. % etanolna frakcija	250
modri pinot: vodna frakcija	250
modra frankinja: vino	667
modra frankinja: etanolna frakcija	100
modra frankinja: 10 vol. % etanolna frakcija	250
modra frankinja: vodna frakcija	250
cabernet sauvignon: vino	500
cabernet sauvignon: etanolna frakcija	83
cabernet sauvignon: 10 vol. % etanolna frakcija	167
cabernet sauvignon: vodna frakcija	167

3.2.4.3 Določanje masne koncentracije neflavonoidov

Masno koncentracijo neflavonoidnih komponent v vinu določimo, tako da flavonoidne komponente oborimo s HCl in formaldehidom. Koncentracijo neflavonoidnih fenolov pa določimo z reagentom F.C..

V 15 ml plastične epruvete smo odpipetirali 2 ml vzorca (vin in pripravljenih frakcij po metodi 3.2.2), 2 ml HCl in 1 ml formaldehida, dobro premešali ter pustili stati 24 ur. Tako tretiran vzorec smo nato pri 10 000 obratih na minuto centrifugirali 5 minut.

Supernatant posameznega vzorca smo primerno razredčili (preglednica 11) in po enakem postopku kot pri določanju masne koncentracije skupnih fenolov določili masno koncentracijo neflavonoidnih fenolov.

Preglednica 11: Končni razredčitveni faktorji posameznih vzorcev pri določanju neflavonoidnih fenolnih spojin

Vzorci	Faktor R (končna razredčitev)
modri pinot: vino	83
modri pinot: etanolna frakcija	50
modri pinot: 10 vol. % etanolna frakcija	100
modri pinot: vodna frakcija	100
modra frankinja: vino	83
modra frankinja: etanolna frakcija	125
modra frankinja: 10 vol. % etanolna frakcija	125
modra frankinja: vodna frakcija	125
cabernet sauvignon: vino	63
cabernet sauvignon: etanolna frakcija	63
cabernet sauvignon: 10 vol. % etanolna frakcija	71
cabernet sauvignon: vodna frakcija	71

3.2.4.4 Določanje antioksidacijskega potenciala (AOP)

Za določitev antioksidacijskega potenciala vzorcev smo uporabili stabilni vijolično obarvan prosti radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH[•]), ki ima absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 517 nm. V prisotnosti donorjev vodika, kot so na primer fenoli, se DPPH[•] reducira v svetlo rumeno obarvan DPPH₂ (Brand-Williams in sod., 1995). Iz tega sledi, da manjši kot je antioksidacijski potencial vzorca, večja je absorbanca pri valovni dolžini 517 nm.

3.2.4.4.1 OPTIMIZACIJA METODE

3.2.4.4.1.1 Določanje absorbance DPPH[•] pri 517 nm v odvisnosti od vrste medija

Želeli smo preveriti, če medij vpliva na absorbanco DPPH[•] oziroma absorbanco slepih vzorcev.

V 1,5 ml centrifugirne epruvete smo odpipetirali 250 µl medija (etanol, mili Q vodo, citratni pufer: pH 3,5, acetatni pufer: pH 5,5), 1 ml etanolne raztopine DPPH[•] ter dobro premešali. Pripravili smo tudi slepe vzorce z 250 µl medija (etanol, mili Q voda, citratni pufer: pH 3,5, acetatni pufer: pH 5,5) in 1 ml etanola. Tako pripravljenim slepim raztopinam smo po petih minutah izmerili absorbanco pri 517 nm.

3.2.4.4.1.2 Določanje absorbance reduciranega DPPH[•] pri 517 nm v odvisnosti od medija in koncentracije reducenta

Da bi preverili absorbanco popolnoma reduciranega DPPH[•] (DPPH₂) pri valovni dolžini 517 nm, smo naredili poskus, pri katerem smo s prebitno koncentracijo askorbinske kisline (0,016 mM, 0,04 mM, 0,4 mM), DPPH[•] koncentracije 0,0736 mM, reducirali, tako da je reakcija potekla do konca.

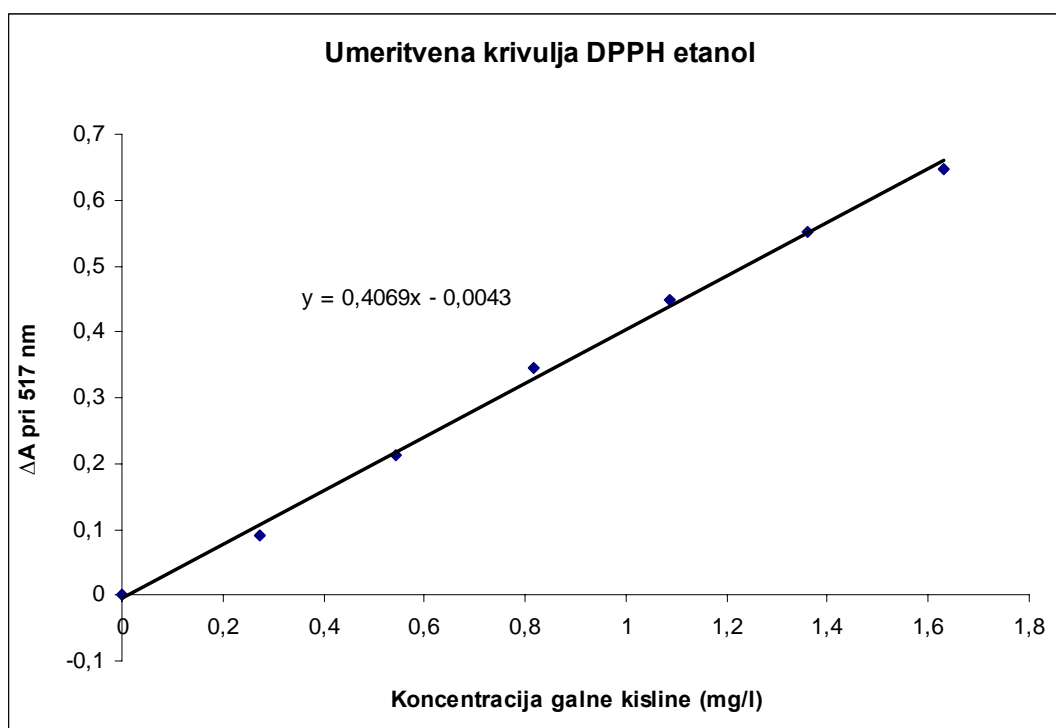
Iz literature zasledimo, da DPPH[•] in askorbinska kislina reagirata v razmerju 2 : 1. Ena molekula askorbinske kisline torej reducira dve molekuli DPPH[•] (Molyneux, 2004). Preveriti smo tudi hoteli, če pH medija vpliva na potek reakcije.

V 1,5 ml centrifugirne epruvete smo dali 50 µl askorbinske kisline (molarnih koncentracij: 10 mM, 1 mM ali 0,4 mM), 200 µl medija (mili Q vodo, citratni pufer: pH 3,5 ali acetatni pufer: pH 5,5) in 1 ml etanolne raztopine DPPH[•] (0,092 mM) ter dobro premešali. Reakcija je v hipu stekla. Dobili smo popolnoma rumeno raztopino, ki smo ji po petih minutah (pri 517 nm) izmerili absorbanco, umerjeno na ustreznemu slepi vzorec (raztopina z 250 µl medija: etanol, mili Q voda, citratni pufer: pH 3,5 ali acetatni pufer: pH 5,5 in 1 ml etanola).

3.2.4.4.2 PRIPRAVA UMERITVENE KRIVULJE

Za določitev AOP smo morali pripraviti umeritveno krivuljo. Kot standard smo uporabili raztopino galne kisline.

V centrifugirne 1,5 ml epruvete smo odpipetirali: 0, 25, 50, 75, 100, 125 in 150 μ l raztopine galne kisline s koncentracijo 13,6 mg/l ter z mili Q vodo dopolnili do 250 μ l. Nato smo dodali 1 ml etanolne DPPH^{*} raztopine in dobro premešali. Po 350 minutah smo tako pripravljenim standardom izmerili absorbance. Umeritveno krivuljo (slika 10) smo dobili, tako da smo od absorbance referenčne raztopine (0 μ l galne kisline) odšteli absorbanco pri ustreznem dodatku galne kisline.



Slika 10: Umeritvena krivulja za določanje antioksidacijskega potenciala z DPPH^{*}

3.2.4.5 Določanje antioksidacijskega potenciala vin in fenolnih frakcij

Sprva smo po metodi ekstrakcije polifenolov (glej 3.2.2) pripravili etanolne, 10 vol. % etanolne in vodne raztopine liofilizatov izbranih vin. Vsako ekstrakcijo smo delali v treh ponovitvah.

Antioksidacijski potencial vzorcev smo določili, tako da smo v 1,5 ml epruvete odpipetirali primeren volumen posameznega vzorca vin in posameznih frakcij, glede na določeni končni razredčitveni faktor (preglednica 12), in ga dopolnili do 250 μ l z mili Q vodo. Nato smo dodali 1 ml etanolne raztopine DPPH^{*} in dobro premešali.

Absorbanco pri valovni dolžini 517 nm smo izmerili po 1360 minutah. Meritve smo delali v treh paralelkah, nato pa jih s pomočjo umeritvene krivulje (slika 10) in z upoštevanjem razredčitvenega faktorja preračunali v rezultat, ki smo ga podali kot mg galne kislina na liter vzorca. Končnim rezultatom smo izračunali aritmetično sredino.

Preglednica 12: Končni razredčitveni faktorji vzorcev pri določanju antioksidacijskega potenciala fenolnih spojin

Vzorci	Faktor R (končna razredčitev)
modri pinot: vino	833
modri pinot: etanolna frakcija	80
modri pinot: 10 vol. % etanolna frakcija	400
modri pinot: vodna frakcija	400
modra frankinja: vino	833
modra frankinja: etanolna frakcija	500
modra frankinja: 10 vol. % etanolna frakcija	750
modra frankinja: vodna frakcija	750
cabernet sauvignon: vino	625
cabernet sauvignon: etanolna frakcija	250
cabernet sauvignon: 10 vol. % etanolna frakcija	500
cabernet sauvignon: vodna frakcija	500

3.2.4.6 Določanje antioksidacijskega potenciala netaninov

Antioksidacijski potencial netaninov smo določili po enakem principu metode kot masno koncentracijo netaninskih fenolov. Potem ko smo z metilcelulozo in amonijevim sulfatom tanine oborili, smo antioksidacijski potencial netaninov določili z DPPH[•].

V 1,5 ml centrifugirko smo odpipetirali 200 µl vzorca (vin in pripravljenih frakcij po metodi 3.2.2), 100 µl metilceluloze, 200 µl amonijevega sulfata in 500 µl mili Q vode, dobro premešali in počakali 5 minut, da so se taninske komponente oborile. Nato smo pet minut centrifugirali pri 10 000 obratih na minuto. Dobljeni supernatant smo glede na pričakovane dobljene vrednosti primerno razredčili (preglednica 13). Antioksidacijski potencial preostalih netaninskih fenolov v vzorcih smo določili po enakem postopku kot pri določanju antioksidacijskega potenciala skupnih fenolov z DPPH[•].

Preglednica 13: Končni razredčitveni faktorji pri določanju antioksidacijskega potenciala netaninskih fenolov

Vzorci	Faktor R (končna razredčitev)
modri pinot: vino	833
modri pinot: etanolna frakcija	208
modri pinot: 10 vol. % etanolna frakcija	833
modri pinot: vodna frakcija	833
modra frankinja: vino	833
modra frankinja: etanolna frakcija	313
modra frankinja: 10 vol. % etanolna frakcija	833
modra frankinja: vodna frakcija	833
cabernet sauvignon: vino	625
cabernet sauvignon: etanolna frakcija	313
cabernet sauvignon: 10 vol. % etanolna frakcija	625
cabernet sauvignon: vodna frakcija	625

3.2.4.7 Določanje antioksidacijskega potenciala neflavonoidov

Antioksidacijski potencial neflavonoidnih fenolov smo določili, tako da smo najprej flavonoidne fenole v vzorcih vin in posameznih frakcijah oborili, in sicer po enakem postopku, kot smo jih oborili pri določanju masne koncentracije neflavonoidnih fenolov. Antioksidacijski potencial preostalih neflavonoidnih fenolov pa smo določili s pomočjo DPPH^{*}.

V 15 ml plastične epruvete smo odpipetirali 2 ml posameznega vzorca (vin in pripravljenih raztopin po metodi 3.2.2), 2 ml HCl in 1 ml formaldehida, dobro premešali ter pustili stati 24 ur. Tako pripravljene raztopine smo nato pri 10 000 obratih na minuto centrifugirali. Supernatant posameznega vzorca smo primerno razredčili (Preglednica 14) in po enakem postopku kot pri določanju antioksidacijskega potenciala skupnih fenolov z DPPH^{*} določili neflavonoidne fenole v vzorcih.

Preglednica 14: Končni razredčitveni faktorji pri določanju antioksidacijskega potenciala neflavonoidnih fenolov

Vzorci	Faktor R (končna razredčitev)
modri pinot: vino	39
modri pinot: etanolna frakcija	39
modri pinot: 10 vol. % etanolna frakcija	39
modri pinot: vodna frakcija	63
modra frankinja: vino	45
modra frankinja: etanolna frakcija	45
modra frankinja: 10 vol. % etanolna frakcija	45
modra frankinja: vodna frakcija	63
cabernet sauvignon: vino	31
cabernet sauvignon: etanolna frakcija	31
cabernet sauvignon: 10 vol. % etanolna frakcija	31
cabernet sauvignon: vodna frakcija	78

3.2.4.8 Določanje kinetike reakcije z radikalom DPPH[•]

Standardom (galni kislina, cianidin kloridu, rutin, kvercetin, katehin, epikatehin, resveratrol in oein kloridu), skupnim fenolom v vzorcih, netaninskim fenolom v vzorcih in neflavonoidnim fenolom v vzorcih smo določili hitrost reagiranja z DPPH[•]. Z merjenjem absorbance ($\lambda=517$ nm) smo reakcijo spremljali v določenih časovnih razmikih. Najprej smo pripravili raztopine standardov koncentracije 1 mg/l. Nato smo jim glede na pričakovane rezultate meritev določili končni razredčitveni faktor (preglednica 15) in jih z mili Q vodo primerno razredčili. Glede na končno razredčitev smo v 1,5 ml centrifugirne epruvete odpipetirali primerno količino določenega standarda in ga z mili Q vodo dopolnili do 250 μ l. Dodali smo 1 ml etanolne raztopine DPPH[•] in dobro premešali. Pripravili smo tudi slepe vzorce (250 μ l in 1 ml etanolne raztopine DPPH[•]). Pri valovni dolžini 517 nm smo po 20, 30, 65, 125, 240, 360, 480, 1440 in 1740 minutah izmerili absorbance. Merjenim absorbancam referenčnih raztopin (brez antioksidantov) smo odšteli absorbance standardov in jih v odvisnosti od časa prikazali z grafom.

Preglednica 15: Končni razredčitveni faktorji pri določanju kinetike reakcije standardov z radikalom DPPH[•]

Standardi	Faktor R (končna razredčitev)
galna kislina	500
cianidin klorid	500
rutin	250
kvercetin	500
katehin	714
epikatehin	714
resveratrol	400
oein klorid	300

Postopek priprave za določanje kinetike reakcije skupnim fenolom, netaninskim fenolom in neflavonoidnim fenolom v vinu in v pripravljenih raztopinah je bil enak kot pri določanju antioksidacijskega potenciala vina in pripravljenih frakcij, določanju antioksidacijskega potenciala netaninov in določanju antioksidacijskega potenciala neflavonoidov. Merjenje je potekalo tako kot pri zgoraj omenjenem postopku določanja kinetike standardov. Ravno tako smo rezultate predstavili grafično.

3.2.4.9 Določanje masne koncentracije antocianov

Metoda temelji na dejstvu, da z zmanjšanjem vrednosti pH vina na 0,5–0,8 preidejo vsi antociani v obarvano obliko, zato lahko določimo njihovo masno koncentracijo, tako da izmerimo absorbanco vzorcev pri valovni dolžini 520 nm in izračunamo masno koncentracijo antocianov s pomočjo koeficienta, ki upošteva molarno absorbtivnost in molsko maso prevladujočega barvila (Ough in Amerine, 1988).

V dve 1,5 ml centrifugirni epruveti smo odpipetirali po 50 μ l posameznega vzorca vin in pripravljenih frakcij (po metodi 3.2.2). V prvo mikrocentrifugirko smo dodali 50 μ l

zakisane raztopine etanola in 500 µl 2 % raztopine klorovodikove kisline, dobro premešali ter pri valovni dolžini 520 nm izmerili absorbanco (A_1) proti slepemu vzorcu. Drugi centrifugirni epruveti smo dodali 50 µl zakisane raztopine etanola in 500 µl citratnega pufru (pH 3,5), dobro premešali pri valovni dolžini 520 nm in izmerili absorbanco (A_2) proti slepemu vzorcu. Koncentracijo antocianov (C), izraženo v mg malvidin-3-monoglukoze na liter, smo izračunali po matematični zvezi 3 (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

$$C = (A_1 - A_2) \cdot 386,596 \quad \dots (3)$$

3.2.4.10 Določanje barvnih parametrov

Barva je zaznava odbite vidne svetlobe od določene snovi ali telesa in je pomembna lastnost pri oceni kakovosti vina (Plahuta, 2005). Na barvo vina vpliva pH, vsebnost žveplovega dioksida in alkohol. Pomembno je tudi razmerje med antociani in tanini, ki vplivajo na stabilnost barve. Stabilne barve vin so rdeča, temno rdeča in oranžno rdeča barva. Do spremembe barve pride predvsem med zorenjem zaradi oksidativnih in neoksidativnih reakcij polimerizacije procianidinov. Tvorijo se tudi kondenzirani tanini, za katere je značilna temno rumenorjava barva. Barvo rdečih vin se spektrofotometrično določi z merjenjem absorbanc pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm. Z večanjem vrednosti pH, vsebnosti žveplovega dioksida in večanjem koncentracije alkohola se zmanjšata absorbanca pri 420 nm in 520 nm (Košmerl in Kač, 2004).

Glede na različne koncentracije barvnih snovi v vzorcih vin in rekonstituiranih liofilizatov smo jih različno razredčili s puferno raztopino (preglednica 16). Tako razredčenim vzorcem smo izmerili absorbanco pri valovnih dolžinah 420 nm, 520 nm in 620 nm.

Preglednica 16: Končni razredčitveni faktorji pri določanju barvnih parametrov

Vzorci	R (420 nm)	R (520 nm)	R (620 nm)
modri pinot: vino	5	28,5	5
modri pinot: etanolna frakcija	1	1	1
modri pinot: 10 vol. % etanolna frakcija	5	5	5
modri pinot: vodna frakcija	5	5	5
modra frankinja: vino	5	28,5	5
modra frankinja: etanolna frakcija	5	5	5
modra frankinja: 10 vol. % etanolna frakcija	5	31,25	5
modra frankinja: vodna frakcija	5	31,25	5
cabernet sauvignon: vino	5	28,5	5
cabernet sauvignon: etanolna frakcija	5	5	5
cabernet sauvignon: 10 vol. % etanolna frakcija	5	5	5
cabernet sauvignon: vodna frakcija	5	5	5

Intenziteto barve (I) rdečega vina smo izračunali s pomočjo matematične zveze 4, medtem ko smo delež rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah (420 nm, 520 nm in 620 nm) izračunali preko matematičnih zvez 5, 6 in 7. Delež rdeče barve oziroma prostih in vezanih antocianov v obliki flavilijevega kationa smo izračunali z matematično zvezo 8, ton barve pa po matematični zvezi 9.

$$I = \sum(A_{420} + A_{520} + A_{620}) \cdot R \quad \dots (4)$$

$$dA_{420}(\%) = A_{420} \cdot R \cdot 100 / I \quad \dots (5)$$

$$dA_{520}(\%) = A_{520} \cdot R \cdot 100 / I \quad \dots (6)$$

$$dA_{620}(\%) = A_{620} \cdot R \cdot 100 / I \quad \dots (7)$$

$$A_F(\%) = (A_{520} - (A_{420} + A_{620}) / 2) A_{520}^{-1} \cdot 100 \quad \dots (8)$$

$$\text{ton barve: } A_{420} / A_{520} \quad \dots (9)$$

3.2.5 Določanje fenolov s tekočinsko kromatografijo

Za tekočinsko kromatografijo smo najprej pripravili 1 ml etanolne, 10 vol. % etanolne in vodne raztopine liofilizatov izbranih vin (metoda 3.2.2). Tako pripravljene raztopine in vina smo prefiltrirali v viale.

20 µl posameznega vzorca smo nanесли na RP C₁₈ kromatografsko kolono. Polifenole smo ločevali z gradientno elucijo. Eluirane spojine smo zaznali z detektorjem z diodno matriko. Rezultate analiz smo predstavili kot integralno vrednost absorbance v območju od 280 do 550 nm pri določenem času.

3.2.6 Določanje hlapnih komponent vin in rekonstituiranih liofilizatov s plinsko kromatografijo

Pri plinski kromatografiji smo se osredotočili izključno samo na sorti modra frankinja in sorte cabernet sauvignon. Analize so bile opravljene na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo.

V posamezno vialo smo odpipetirali 800 µl vina, 800 µl 10 vol. % etanolne frakcije ter v 800 µl vodne frakcije vin. Vodne frakcije in etanolne frakcije smo pripravili po metodi 3.2.2. Analizirali smo tudi sam liofilizat. V eno vialo smo zatehtali 50 mg liofilizata modre frankinje, v drugo pa 50 mg liofilizata cabernet sauvignona. Hlapne komponente smo vezali na SPME iglo (divinil benzen/karboksen/polidimetil ksiloksan) 30 minut pri sobni temperaturi.

Hlapne komponente smo analizirali s plinsko kromatografijo na VOCOL kapilarni koloni in jih detektirali z masnim detektorjem. Temperaturni program smo nastavili na 50 °C. Po dveh minutah smo pričeli dvigovati temperaturo s hitrostjo 10 °C/min do 210 °C. Hlapne komponente smo identificirali s pomočjo NIST knjižnice masnih spektrov.

3.2.7 Senzorična analiza

Senzorično analizo smo jo opravili po 100 točkovni metodi. Po tej metodi se oceni 10 senzoričnih parametrov, kot so bistrost, barva, intenzivnost vonja, odkritost vonja, kakovost vonja, intenzivnost okusa, odkritost okusa, kakovost okusa, obstojnost arome ter splošni vtis. Maksimalno število točk, ki jih vzorec lahko doseže, je 100, minimalno število točk pa 40. Razpon vseh ocen tako ni 100 točk, ampak samo 60 (preglednica 17).

Vina so ocenjevali štirje izkušeni pokuševalci vin. Kot rezultat smo podali povprečje dobljenih ocen.

Preglednica 17: Ocenjevanje lastnosti vin po 100-točkovni metodi (O.I.V., 1998)

SENZORIČNA OCENA (točke)		odlično	prav dobro	dobro	zadovoljivo	nezadovoljivo
VIDEZ (3–15)	bistrost	5	4	3	2	1
	barva	10	8	6	4	2
VONJ (12–30)	intenzivnost	8	7	6	4	2
	odkritost	6	5	4	3	2
	kakovost	16	14	12	10	8
OKUS (18–44)	intenzivnost	8	7	6	4	2
	odkritost	6	5	4	3	2
	kakovost	22	19	16	13	10
	obstojnost arome	8	7	6	5	4
SPLOŠNI VTIS (7–11)		11	10	9	8	7

Pri senzorični analizi smo ocenjevali vina, 10 vol. % etanolne frakcije ter vodne frakcije sort modri pinot, modra frankinja in cabernet sauvignon. Poleg vrhunskih vin smo senzorično analizirali tudi namizno vino rdeče zvrsti ter vodno in 10% vol. etanolno raztopino liofilizata rdeče zvrsti.

Liofilizacijo (po metodi 3.2.1) smo ponovili trikrat, da smo dobili dovolj liofilizata za pripravo vzorcev. Po metodi 3.2.2 smo za senzorično analizo pripravili 3 do 4 dl posameznih frakcij. Rekonstituirane vzorce vin in vina smo pred analizo shranili pri primerni temperaturi.

4 REZULTATI

4.1 PREOSTANEK PO LIOFILIZACIJI

Po liofilizaciji smo s tehtanjem ugotovili, da vina vsebujejo od 21,4 g do 123 g suhega preostanka na liter vina. Rdeča suha vrhunska vina liofilizatov, kot so modra frankinja, modri pinot in cabernet sauvignon, so vsebovala od 31,09 g do 34,96 g suhega preostanka na liter vina. Rdeča zvrst je v primerjavi z vrhunskimi vini razumljivo imela manjšo maso ekstrakta. Največjo vrednost suhega preostanka na liter vina je imelo belo sladko vrhunsko vino rumeni muškat, verjetno zaradi visoke količine prisotnih sladkorjev.

Preglednica 18: Vsebnost suhega preostanka po liofilizaciji vin

	Vsebnost suhe snovi (g/l)
modra frankinja	34,3
modri pinot	36,0
cabernet sauvignon	31,1
rdeča zvrst	21,4
rumeni muškat	123

4.2 VSEBNOST ETANOLA IN GLICEROLA

Koncentracija glicerola v vinu pomembno vpliva na kakovost, saj mu daje polnost in povečuje sladko zaznavo v vinu (Plahuta, 2004). S tekočinsko kromatografijo smo ugotovili, da se z liofilizacijo izgubi večina etanola, medtem ko se glicerol ne zmanjša (preglednici 19, 20).

Preglednica 19: Koncentracija etanola v vodnih frakcijah vzorcev glede na vina

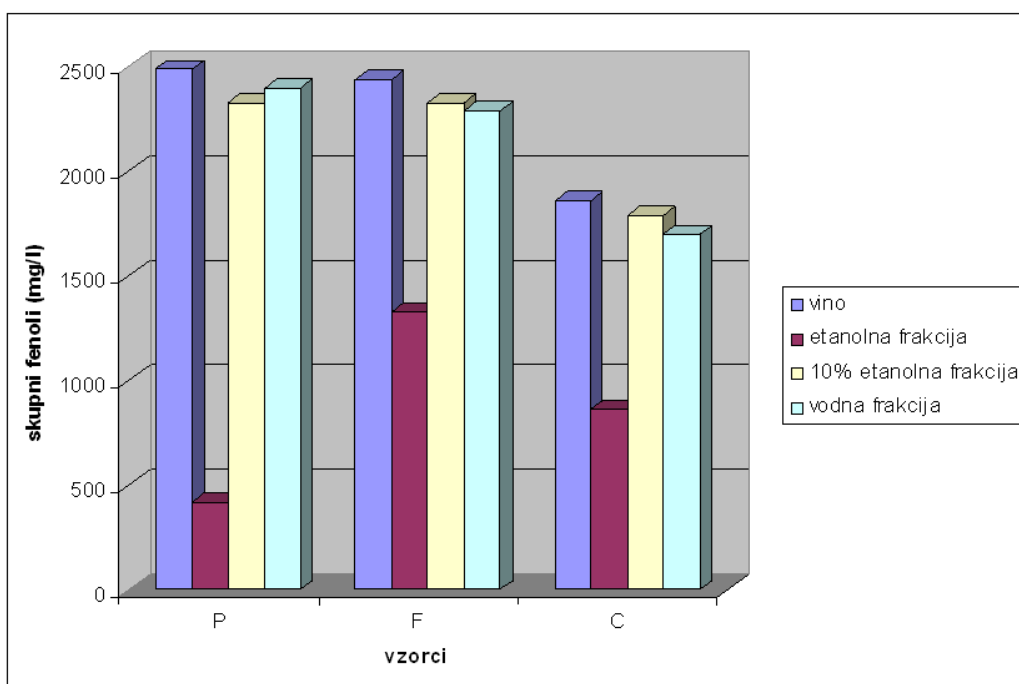
	koncentracija etanola v vodnih frakcijah(g/l)	koncentracija etanola v vinu (g/l)	procent izhlapelega etanola (%)
modri pinot	0,14	95,85	99,9
modra frankinja	0,63	104,58	99,4
cabernet sauvignon	0,60	97,24	99,4

Preglednica 20: Koncentracija glicerola v vodnih frakcijah glede na vino

	koncentracija glicerola v vodnih frakcijah(g/l)	koncentracija glicerola v vinu (g/l)	procent izgubljenega glicerola (%)
modri pinot	8,43	9,14	8
modra frankinja	8,43	9,30	9
cabernet sauvignon	7,85	9,45	17

4.3 REZULTATI DOLOČANJA MASNIH KONCENTRACIJ FENOLOV

4.3.1 Masne koncentracije skupnih fenolov

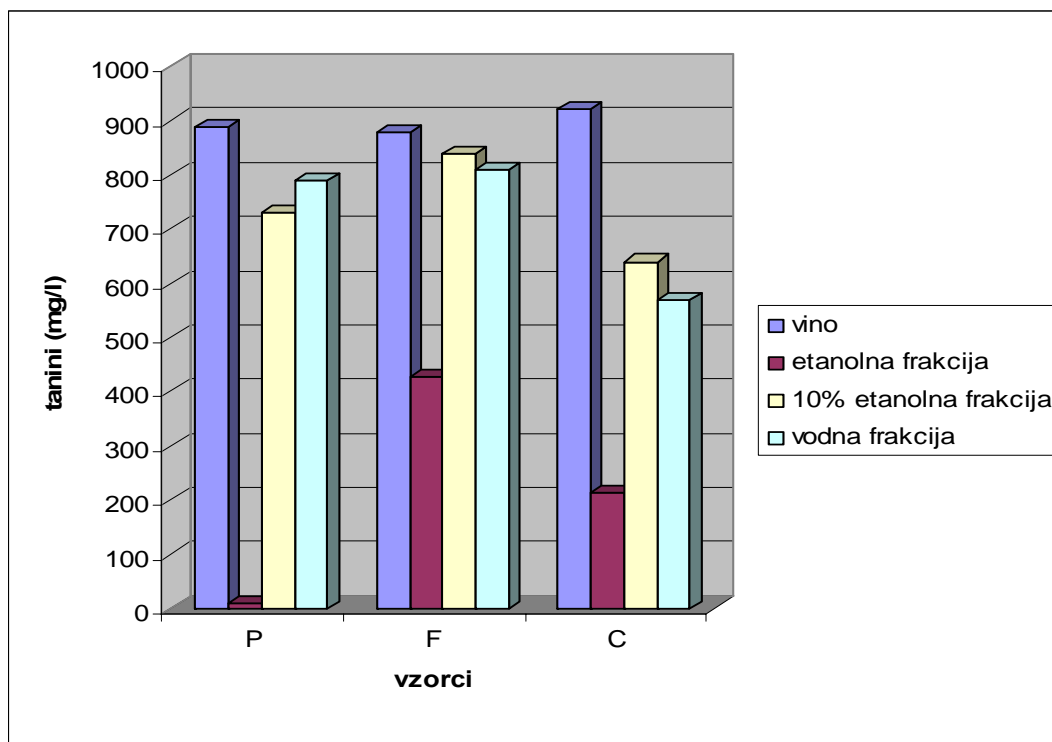


Slika 11: Grafični prikaz masne koncentracije skupnih fenolov v vinu in rekonstituiranih liofilizatih

Masno koncentracijo skupnih fenolov vzorcev prikazujeta slika 11 in priloga A₁ (metoda 3.2.4.1). S slike je razvidno, da imata vino sorte modra frankinja in vino sorte modri pinot največjo masno koncentracijo polifenolov, in sicer 2490 mg GAE/l in 2440 mg GAE/l, medtem ko ima vino sorte cabernet sauvignon manjšo vsebnost skupnih polifenolov (1860 mg GAE/l). Pri vseh treh sortah vin se najmanj skupnih polifenolov ekstrahira z etanolom. V etanolu se raztopi le 17 % do 55 % vseh skupnih fenolov. Najslabše so topni pri sorti modri pinot. Z vodo in 10 vol. % etanolom se izgubi le od 3,6 % do 8,6 % vseh skupnih fenolov izvornega vina.

Za primerjavo smo poleg rdečih vrhunskih vin analizirali tudi rdečo zvrst, ki je imela vsebnost skupnih fenolov 1130 mg GAE/l. Nekoliko manjšo vsebnost je imela njegova vodna frakcija, in sicer 1110 mg GAE/l. Analizirano belo vrhunsko rumeni muškat vino je imelo le 507 mg GAE/l skupnih fenolov, medtem ko je vodna frakcija vsebovala 417 mg GAE/l skupnih fenolov. Z liofilizacijo rdeče zvrsti vina se je torej izgubilo le 2,7 % fenolov, z liofilizacijo belega vina pa 18 %.

4.3.2 Masne koncentracije taninskih fenolov



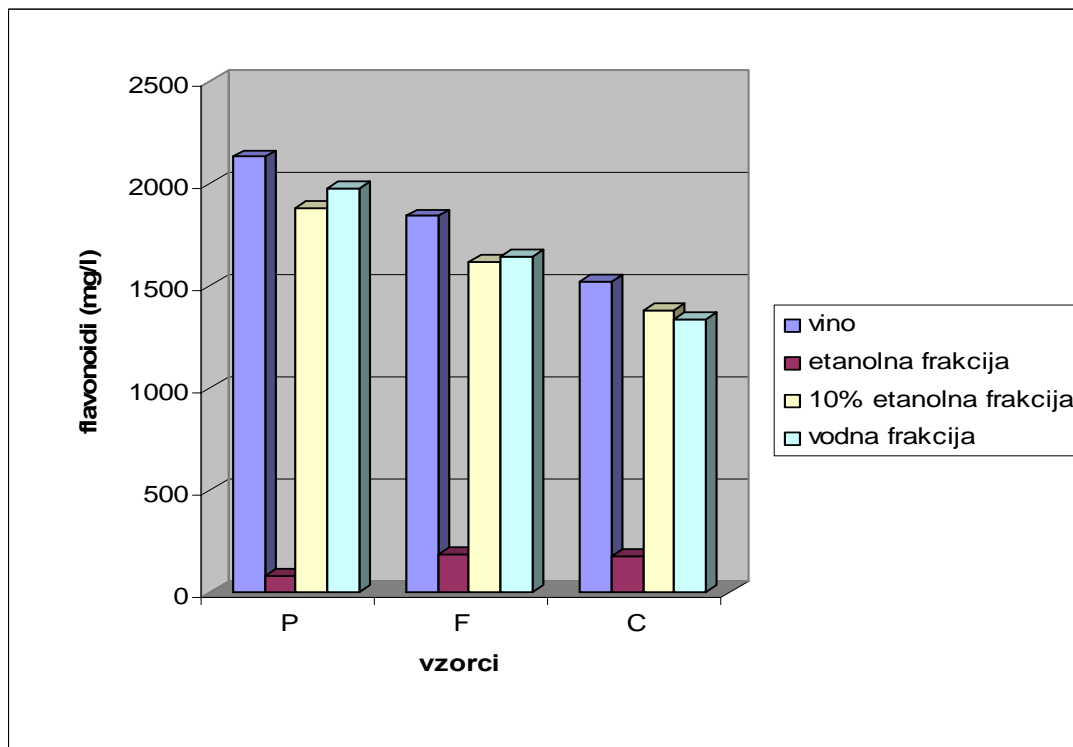
Slika 12: Grafični prikaz masne koncentracije taninskih fenolov v vinu in rekonstituiranih liofilizatih

Masno koncentracijo netaninov (metoda 3.2.4.2) prikazuje priloga A₂, medtem ko slika 12 prikazuje masno koncentracijo taninskih fenolov, ki smo jih dobili, tako da smo od masne koncentracije skupnih fenolov odšteli masno koncentracijo netaninskih fenolov.

Vsebnost taninskih fenolov v vzorcih vin se glede na vsebnost skupnih fenolov giblje med 36 % do 50 %. Vini sorte modri pinot in modra frankinja imata enako vsebnost taninskih fenolnih spojin, in sicer 36 %. Najbogatejše glede taninskih spojin je vino sorte cabernet sauvignon, ki vsebuje 50 % taninskih fenolov.

Glede na vsebnost taninskih snovi v vzorcih vin se z etanolom ekstrahira najmanj taninov. V vinu sorte modri pinot se z etanolom ekstrahira le 0,90 %, v vinu sorte cabernet sauvignon 23 %, v vinu sorte modra frankinja pa nekoliko več, in sicer 49 %. Kljub temu da ima vino sorte cabernet sauvignon največjo masno koncentracijo taninov, se jih z vodo in 10 vol. % etanolom, glede na drugi dve sorti vin, ekstrahira najmanj. 10 % etanolna frakcija jih glede na vino vsebuje 69 %, vodna frakcija pa 62 %. Z vodo in 10 vol. % etanolom se jih največ ekstrahira pri sorti modra frankinja (96 % in 92 %). Le nekoliko manj jih je v vodni in 10 vol. % etanolni frakciji modrega pinota (82 % in 89 %).

4.3.3 Masne koncentracije flavonoidov



Slika 13: Grafični prikaz masne koncentracije flavonoidnih fenolov v vinu in rekonstituiranih liofilizatih

Masno koncentracijo neflavonoidov po metodi 3.2.4.3 prikazuje priloga A₃, medtem ko slika 13 prikazuje masno koncentracijo flavonoidov, ki smo jih dobili, tako da smo od masne koncentracije skupnih fenolov odšteli masno koncentracijo neflavonoidnih fenolov. Največ flavonoidnih snovi ima vino sorte modri pinot, in sicer 86 % glede na skupno masno koncentracijo. Vino sorte modra frankinja jih glede na skupno masno koncentracijo vsebuje 76 %, vino sorte cabernet sauvignon pa 82 %.

Tudi pri flavonoidih se etanol kaže kot najslabše topilo. V etanolni frakciji modri pinot je le 3,9 % flavonoidov glede na vino, etanolna frakcija sorte modra frankinja vsebuje 10 vol. %, etanolna frakcija sorte cabernet sauvignon pa 12 %. Glede na skupno masno koncentracijo fenolov topili 10 vol. % etanol in voda ekstrahirata približno enako količino flavonoidov, in sicer pri sorti modri pinot 88 % in 93 %, pri sorti modra frankinja 88 % in 90 %, pri sorti cabernet sauvignon pa 91 % in 88 %.

4.3.4 Fenolna sestava posameznih frakcij

Preglednica 21: Delež taninov in flavonoidov v vinu in posameznih frakcijah, kjer masna koncentracija skupnih fenolov v posamezni raztopini predstavlja 100 %

izbrane sorte vin		vsebnost posameznih vrst fenolov v etanolni frakciji (%)	vsebnost posameznih vrst fenolov v 10 vol. % etanolni frakciji (%)	vsebnost posameznih vrst fenolov v vodni frakciji (%)	vsebnost posameznih vrst fenolov v vinih (%)
modri pinot	TANINI	1,9	31	33	36
	FLAVONOIDI	20	81	83	86
modra frankinja	TANINI	32	36	35	36
	FLAVONOIDI	14	70	72	76
cabernet sauvignon	TANINI	25	36	34	50
	FLAVONOIDI	21	77	79	82

Iz preglednice 21, kjer masna koncentracija skupnih fenolov posamezne frakcije predstavlja 100 %, je razvidno, da so po fenolni sestavi vodne in 10 vol. % etanolne frakcije podobne vinu, saj prevladujejo flavonoidi (od 77 % do 86 % vseh fenolov). Tanini so prisotni v manjši meri (od 31 % do 50 % vseh fenolov). Etanolne frakcije se odvisno od sorte razlikujejo. V etanolni frakciji sorte modri pinot prevladujejo flavonoidi, v etanolni frakciji modre frankinje prevladujejo tanini, v etanolni frakciji cabernet sauvignon pa so tanini in flavonoidi približno enako zastopani.

4.3.5 Ponovljivost rezultatov

Ker so imele naše meritve tudi do 10 vol. % relativno napako, smo želeli ugotoviti, kaj najbolj vpliva na velikost napake. Tako smo primerjali koeficiente variabilnosti znotraj ene ekstrakcije s koeficienti variabilnosti, kjer so na končni rezultat meritev vplivale ponovitve ekstrakcije (preglednica 22, metoda 3.2.4.1.).

Preglednica 22: Primerjava med koeficientom variabilnosti meritev masne koncentracije skupnih fenolov, ki zajema tri ponovitve ekstrakcije in koeficientom variabilnosti znotraj ene ekstrakcije

VZORCI	KV (vpliv ekstrakcije) (%)	KV (znotraj ene ekstrakcije) (%)
modri pinot: etanolna frakcija	10	2,6
modri pinot: 10 vol. % etanolna frakcija	5,2	1,8
modri pinot: vodna frakcija	1,8	0,6
modra frankinja: etanolna frakcija	3,3	0,2
modra frankinja: 10 vol. % etanolna frakcija	3,7	1,0
modra frankinja: vodna frakcija	4,9	0,6
cabernet sauvignon: etanolna frakcija	3,3	1,1
cabernet sauvignon: 10 vol. % etanolna frakcija	2,8	1,9
cabernet sauvignon: vodna frakcija	5,6	1,4

Iz preglednice 22 je razvidno, da ponovljivost ekstrakcije bistveno vpliva na velikost relativne napake. Medtem ko smo znotraj ene ekstrakcije dosegli največ 2,6 % relativno napako, smo s ponovitvami ekstrakcije dosegli tudi do 10 vol. % relativno napako. Najvišja relativna napaka je bila pri etanolni frakciji sorte modri pinot, kar je verjetno posledica slabe topnosti fenolov v etanolu, saj smo pri raztapljanju liofilizata tega vina v etanolu določili najmanjše vrednosti fenolov.

Ravno tako smo ugotavljali vpliv priprave vzorca iz meritve relativne napake pri določitvi netaninov in neflavonoidov. Eksperiment smo delali v treh paralelkah. Rezultati za vino sorte modra frankinja so prikazani v preglednici 23.

Preglednica 23: Primerjava med koeficientom variabilnosti meritev masne koncentracije netaninskih in neflavonoidnih fenolov, ki zajema štiri ponovitve priprave vzorca, in koeficientom variabilnosti znotraj enega vzorca in tremi meritvami

	KV vpliv priprave vzorca (%)	KV znotraj ene priprave vzorca (%)
NETANINI modra frankinja (vino)	1,2	0,27
NEFLAVONOIDI modra frankinja (vino)	2,6	1,1

Iz preglednice 23 je razvidna dobra ponovljivost tako pri pripravi vzorca kot pri sami določitvi.

4.4 REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDACIJSKA POTENCIALA

4.4.1 Optimizacija metode

4.4.1.1 Absorbanca DPPH^{*} v odvisnosti od vrste medija

Preglednica 24: Absorpcija DPPH^{*} v odvisnosti od medija in pri valovni dolžini 517 nm.

	A (slepa)	A (slepa) - A (ničla)
v etanolu	1,1665	1,137
v mili Q vodi	1,158	1,156
v citratnem pufru 3,5	1,131	1,123
v acetatnem pufru 5,5	1,179	1,170

Pokazali smo (preglednica 24), da je absorpcija svetlobe DPPH^{*} le malo odvisna od vrste medija. Zaradi enostavnosti dela smo se odločili, da bomo vzorce pred analizo razredčili z mili Q vodo.

4.4.1.2 Absorbanca popolne redukcije DPPH^{*} z askorbinsko kislino v odvisnosti od vrste medija

Pokazali smo, da pri valovni dolžini 517 nm tudi DPPH₂, ki smo ga pripravili z redukcijo DPPH^{*} z askorbinsko kislino, absorbira svetlobo, kar potem vpliva na sistematično napako meritev.

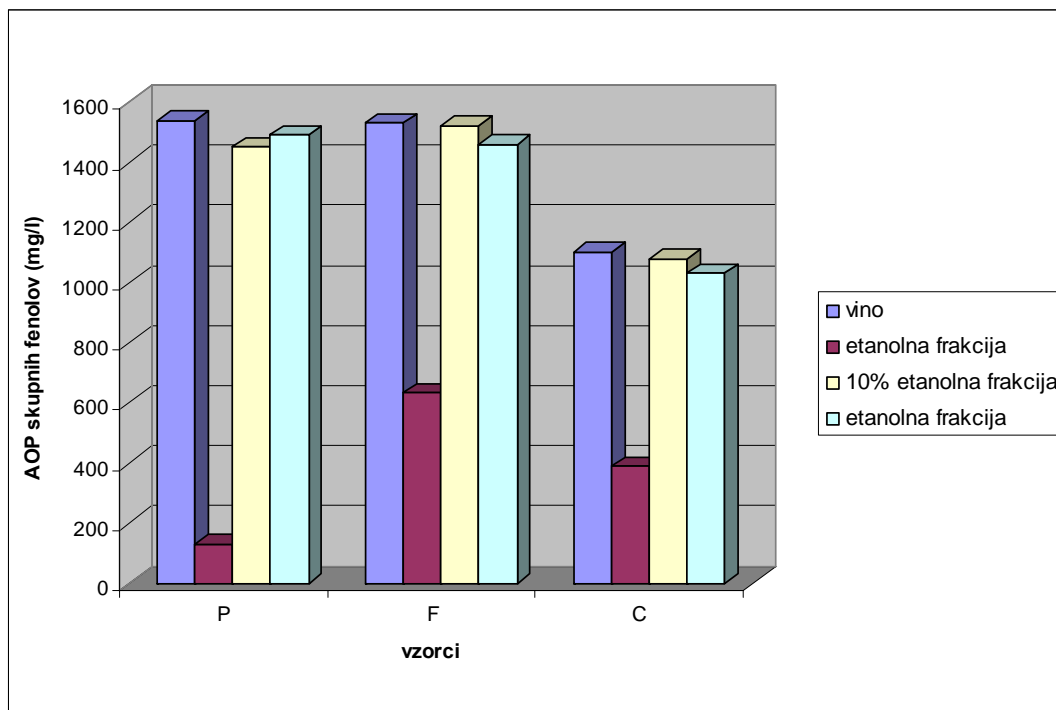
Preglednica 25: Absorbanca popolne redukcija DPPH^{*} z askorbinsko kislino v različnih medijih

razredčitveni medij	Absorbanca ($\lambda=517$ nm)		
	askorbinska kislina (0,016 mM)	askorbinska kislina (0,04 mM)	askorbinska kislina (0,4 mM)
mili Q voda	0,0874	0,0555	0,0478
pH 5,5 (acetatni pufer)	0,172	0,169	0,111
pH 3,5 (citratni pufer)	0,04296	0,0493	0,0462

Iz preglednice 25 je razvidno, da je absorbirana svetloba DPPH₂ odvisna od pH medija. Največje vrednosti smo dobili v mediju acetatnega pufra s pH 5,5. V vodnem ali v mediju s pH 3,5 (citratni pufer) smo dobili bistveno nižje rezultate. Potemtakem smo kot razredčitveni medij vzorcev izbrali mili Q vodo, ki tako kot citratni pufer s pH 3,5 bistveno ne vpliva na absorbcijo svetlobe DPPH^{*} in s tem posredno na končne rezultate meritev in sistematično napako.

4.4.2 Antioksidacijski potencial skupnih fenolov

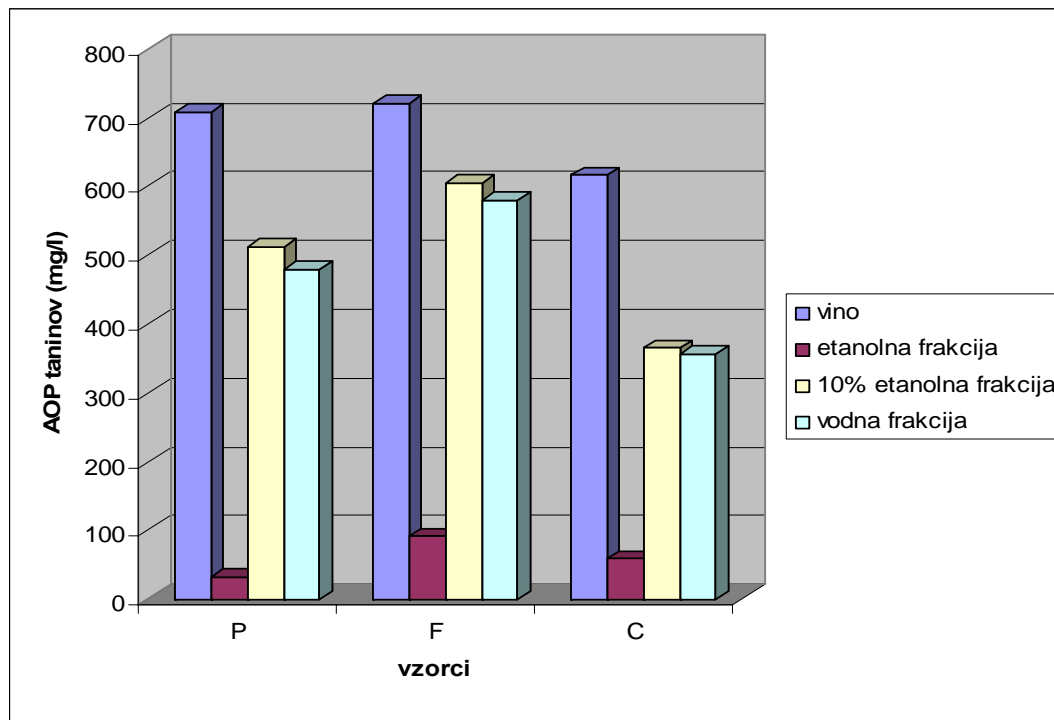
Za ovrednotenje vsebnosti antioksidantov in posredno polifenolov v vzorcih smo poleg metode za določanje masne koncentracije fenolov s F.C. reagentom uporabili tudi metodo 3.2.4.5 določanja antioksidacijskega potenciala (AOP).



Slika 14: Grafični prikaz antioksidacijskega potenciala skupnih fenolov v vinu in rekonstituiranih liofilizatih

AOP skupnih fenolov vzorcev vina in posameznih frakcij, izražen kot mg galne kisline na liter, prikazujeta slika 14 in priloga B₁. S slike je razvidno, da imata vini sorte modri pinot in modra frankinja največji AOP, in sicer 1540 mg GAE/l in 1530 mg GAE/l. Nekoliko nižji AOP ima vino sorte cabernet sauvignon (1100 mg GAE/l). Pri vseh treh sortah je AOP etanolne frakcije najmanjši, in sicer znaša le 8,5 % (pri sorti modri pinot) do 41 % (pri sorti modra frankinja) celotnega AOP posameznih sort vin. AOP vodnih in 10 vol. % etanolnih frakcij je bistveno večji, saj znaša pri sorti modri pinot 94 % in 97 % celotnega AOP vina, pri sorti modra frankinja 99 % in 95 % celotnega AOP vina ter pri sorti cabernet sauvignon 98 % in 94 % celotnega AOP vina.

4.4.3 Antioksidacijski potencial taninov

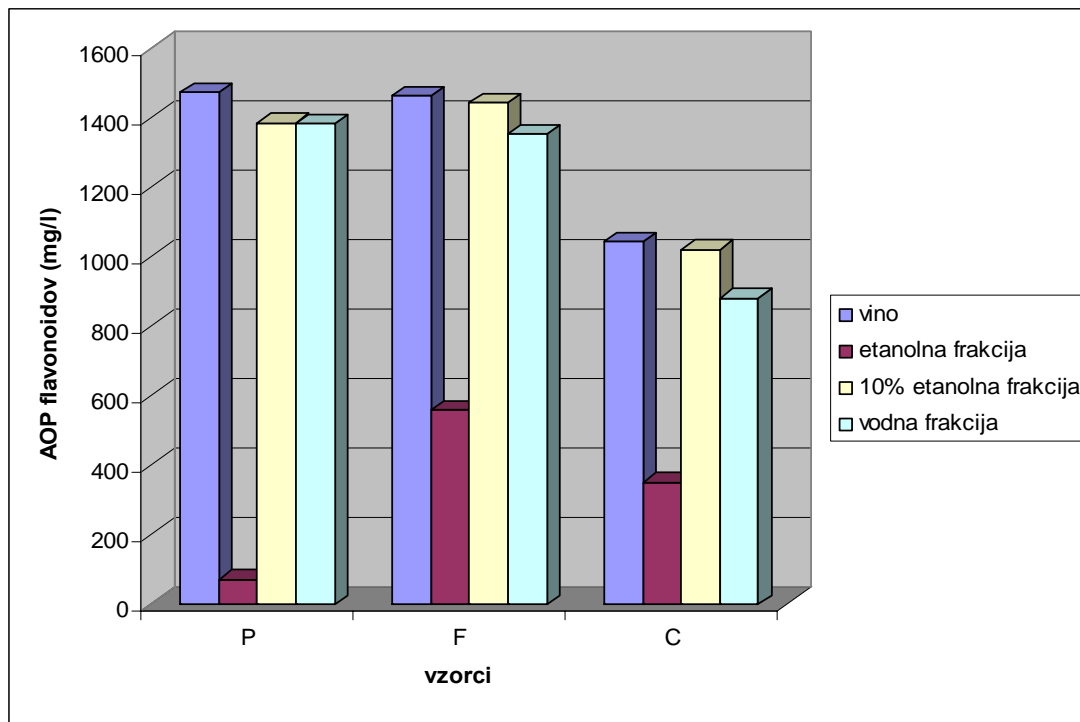


Slika 15: Grafični prikaz antioksidacijskega potenciala taninov v vinu in rekonstituiranih liofilizatih

Antioksidacijski potenciali (AOP) netaninov po metodi 3.2.4.6 prikazuje priloga B₂, medtem ko slika 15 prikazuje AOP taninov, ki smo ga dobili iz razlike celotnega AOP skupnih fenolov posameznih vzorcev in AOP netaninov.

AOP taninskih fenolov v vzorcih vin se glede na AOP skupnih fenolov vzorcev vin giblje med 46 % in 56 %. Vina sorte modri pinot in modra frankinja imata približno enak AOP taninskih fenolnih spojin (46 % in 47 %). Čeprav je absolutna vrednost AOP (izražena na mg galne kisline na liter) taninov vina cabernet sauvignon glede na drugi dve sorti vin najmanjša, je v relativnem smislu (glede na delež AOP skupnih fenolov v vinu) najvišja, in sicer znaša 56 %. Ne glede na to pa se v vodni in 10 vol. % etanolni frakciji AOP taninov sorte cabernet sauvignon ohrani v najmanjši meri (60 % in 58 % glede na AOP taninskih fenolov v vinu). AOP taninov v vodnih in 10 vol. % etanolnih frakcij vina sorte modri pinot glede na tanine v vinu znaša 72 % in 68 %, pri sorti modra frankinja pa AOP glede na tanine v vinu znaša 84 % in 80 %. Etanolna frakcija vin ima najnižji AOP taninskih fenolnih spojin, in sicer od 4,4 % (vina sorte modri pinot) do 13 % (vina sorte modra frankinja) glede AOP taninov v vinih.

4.4.4 Antioksidacijski potencial flavonoidov



Slika 16: Grafični prikaz antioksidacijskega potenciala flavonoidov v vinu in rekonstituiranih liofilizatih

Antioksidacijski potenciali (AOP) neflavonoidov po metodi 3.2.4.7 prikazuje priloga B₃, medtem ko slika 16 prikazuje AOP flavonoidov, ki smo ga dobili iz razlike celotnega AOP skupnih fenolov posameznih vzorcev in AOP neflavonoidov.

Flavonoidni fenoli pripomorejo k večini AOP skupnih fenolov v vinu. Pri analiziranih vinih različnih sort AOP flavonoidov glede na AOP skupnih fenolov znaša 95 % do 96 %. AOP flavonoidov v etanolnih frakcijah je v vinih najnižji, in sicer od 4,9 % (pri sorti modri pinot) do 38 % (sorta modra frankinja) in 34 % (sorta cabernet sauvignon). AOP flavonoidnih fenolov vodnih in 10 vol. % etanolnih frakcij glede na AOP flavonoidnih fenolov vin je približno enak, in sicer znaša 94 % pri vodni in etanolni frakciji vina sorte modri pinot, 98 % in 92 % pri sorti modra frankinja ter 98 % pri 10 vol. % etanolni frakciji sorte cabernet sauvignon. Nekoliko nižje razmerje je le pri vodni frakciji sorte cabernet sauvignon, in sicer 84 %.

4.4.5 Fenolna sestava posameznih frakcij glede na AOP fenolnih snovi

Preglednica 26: Delež antioksidacijskega potenciala taninov in flavonoidov v vinu in posameznih frakcijah

izbrane sorte vin		vsebnost posameznih vrst fenolov v etanolni frakciji (%)	vsebnost posameznih vrst fenolov v 10 vol. % etanolni frakciji (%)	vsebnost posameznih vrst fenolov v vodni frakciji (%)	vsebnost posameznih vrst fenolov v vinih (%)
modri pinot	TANINI	24	35	32	46
	FLAVONOIDI	55	95	93	95
modra frankinja	TANINI	14	40	40	47
	FLAVONOIDI	88	95	81	95
cabernet sauvignon	TANINI	15	34	33	56
	FLAVONOIDI	90	94	85	95

Iz preglednice 26 je razvidno, da so po antioksidacijskem potencialu (AOP) vodne in 10 vol. % etanolne frakcije podobne vinu, saj prevladuje AOP flavonoidov (od 81 % pa do 95 % vseh fenolov posameznih frakcij vin), tanini pripomorejo k AOP v manjši meri (32 % pa do 56 % vseh fenolov posameznih frakcij vin). Tudi v etanolnih frakcijah k AOP največ pripomorejo flavonoidi, vendar pa imajo tanini v primerjavi z drugimi frakcijami bistveno manjši AOP.

4.4.6 Ponovljivost rezultatov

Ravno tako kot pri metodi določanja masne koncentracije fenolov z reagentom F.C. smo tudi v tem primeru ugotavljali, kaj vpliva na velikost napake. Tako smo primerjali koeficient variabilnosti znotraj ene ekstrakcije s koeficientom variabilnosti več ekstrakcij (preglednica 27).

Preglednica 27: Primerjava med koeficientom variabilnosti meritev antioksidacijskega potenciala skupnih fenolov, ki zajema tri ponovitve ekstrakcije, in koeficientom variabilnosti znotraj ene ekstrakcije

VZORCI	KV vpliv ekstrakcije (%)	KV vpliv postopka določanja AOP (%)
modri pinot: etanolna frakcija	7,2	1,1
modri pinot: 10 vol. % etanolna frakcija	4,6	4,4
modri pinot: vodna frakcija	9,8	4,0
modra frankinja: etanolna frakcija	2,1	2,0
modra frankinja: 10 vol. % etanolna frakcija	1,7	1,7
modra frankinja: vodna frakcija	5,8	2,2
cabernet sauvignon: etanolna frakcija	5,9	1,3
cabernet sauvignon: 10 vol. % etanolna frakcija	5,7	1,2
cabernet sauvignon: vodna frakcija	10	2,0

Iz preglednice 27 je razvidno, da ponovljivost ekstrakcije vpliva na velikost relativne napake, saj smo znotraj ene ekstrakcije dosegli največ 4,4 % relativno napako, medtem ko smo s ponovitvami ekstrakcije dosegli tudi 10 vol. % relativno napako.

Iz meritve relativne napake smo preverili tudi vpliv priprave vzorca pri določitvi netaninov in neflavonoidov (preglednica 28, metodi 3.2.4.6 in 3.2.4.7) ter prišli do zaključka, da le v manjši meri priprava vzorca vpliva na velikost napake.

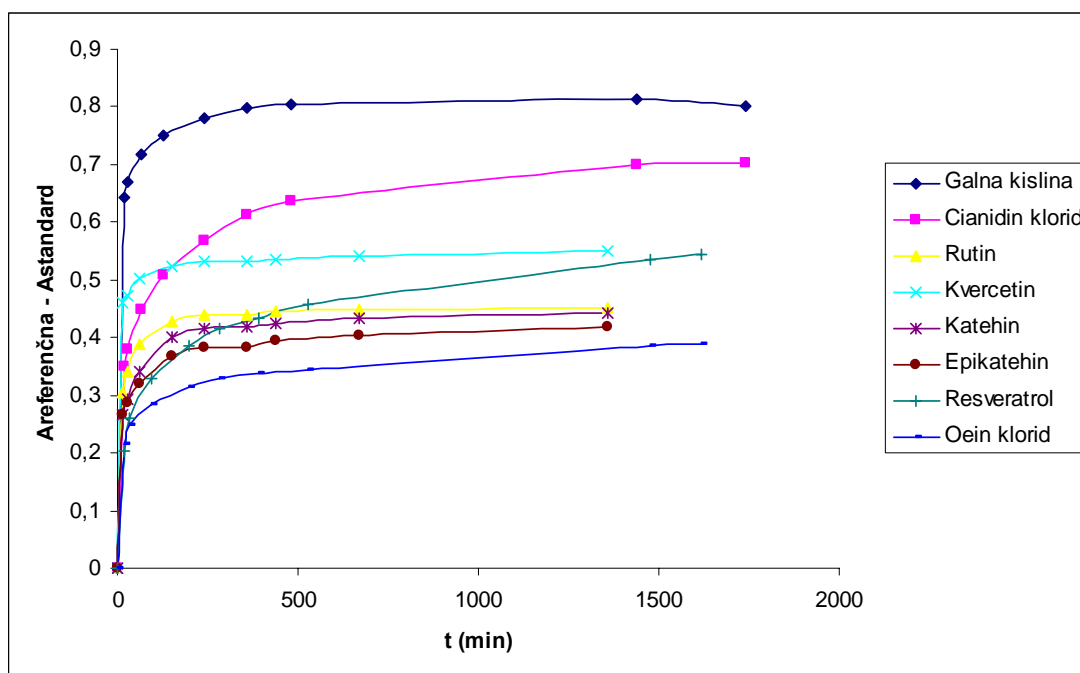
Preglednica 28: Primerjava med koeficientom variabilnosti meritev antioksidacijskega potenciala netaninskih in neflavonoidnih fenolov (zajema štiri ponovitve obarjanja) in koeficientom variabilnosti znotraj enega obarjanja

	KV vpliv obarjanja (%)	KV znotraj enega obarjanja (%)
NETANINI modra frankinja (vino)	5,2	3,8
NEFLAVONOIDI modra frankinja (vino)	0,59	0,21

4.4.7 Spremljanje hitrosti reakcije antioksidantov v vinu s prostim radikalom DPPH•

4.4.7.1 Spremljanje hitrosti reakcije standardov s prostim radikalom DPPH•

Z namenom, da bi preverili, kakšen čas je potreben, da reakcija med radikalom DPPH• in antioksidanti v vinu poteče do konca, smo spremljali, kako se absorbanca pri 517 nm spreminja skozi daljše časovno obdobje. Za eksperimente smo se odločili na osnovi študij (Podlogar, 2007), kjer so ugotovili, da polifenoli v vinu reagirajo relativno počasi, kar lahko privede do sistematične napake pri določitvi AOP.

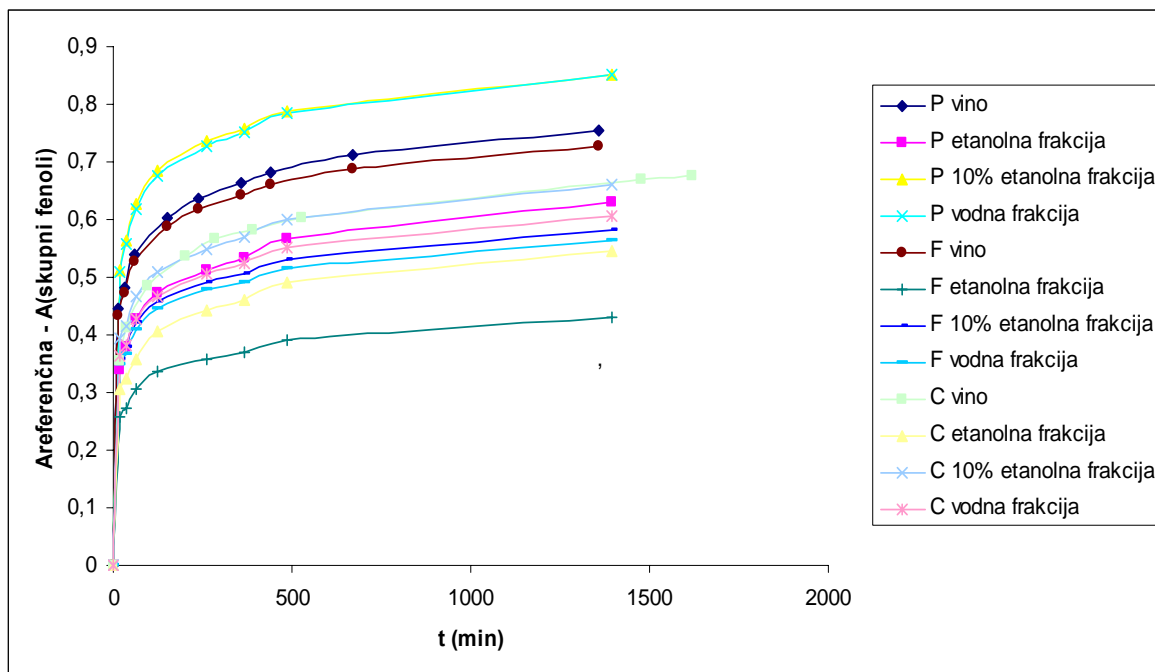


Slika 17: Grafični prikaz časovno odvisne redukcije DPPH* s standardi

Na sliki 17 niso pomembne absolutne vrednosti razlik absorbanc ($A_{slepa} - A_{standard}$), saj so te posledica različnih razredčitev posameznih vzorcev, ampak je predvsem pomembna oblika grafa oziroma čas pri katerem se reakcija zaključi. S slike je razvidno, da izmed analiziranih standardov najpočasneje reagira resveratrol, kjer po 23 urah redukcija še vedno poteka. Ravno tako počasi reagirata oein klorid in cianidin klorid. Hitreje reagirajo standardi, kot so galna kislina, rutin in kvercetin.

4.4.7.2 Spremljanje hitrosti reakcije skupnih fenolov s prostim radikalom DPPH[•]

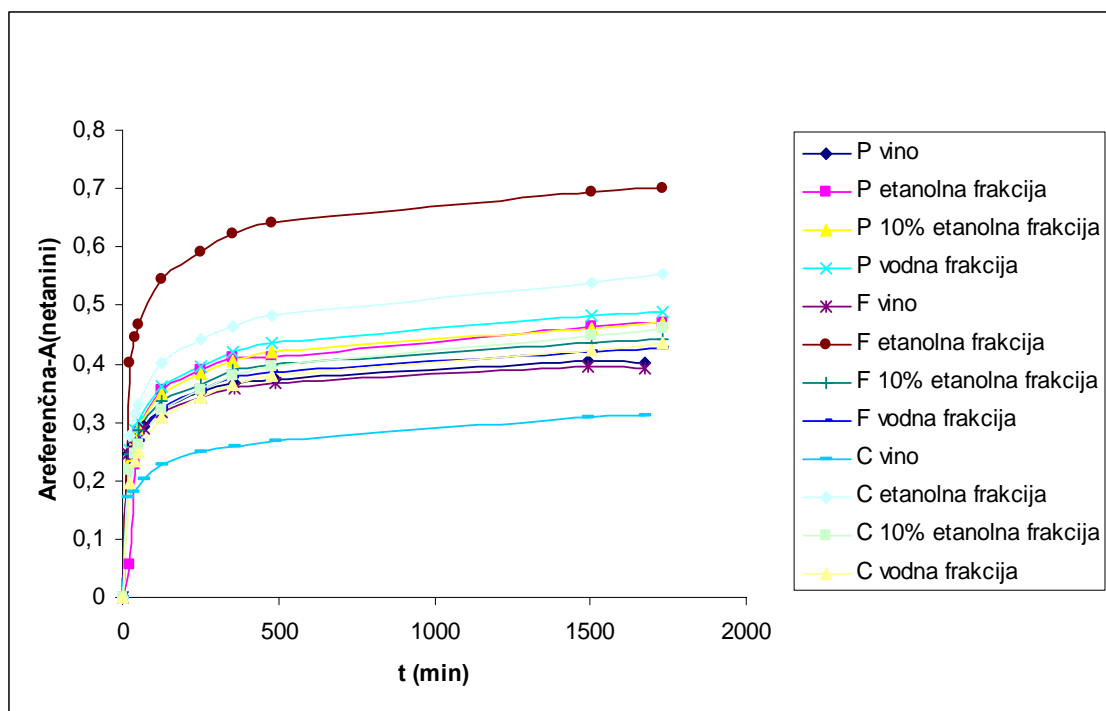
Merili smo tudi hitrost reakcije med DPPH[•] in fenoli v vinih ter pripravljenih frakcijah in ugotovili, da se reakcija merjenih vzorcev in DPPH[•] počasi zaključuje šele pri 1360 minutah (slika 18).



Slika 18: Grafični prikaz časovno odvisne redukcije DPPH[•] s fenoli vina in rekonstituiranih liofilizatov

Iz grafa 18 je razvidno tudi, da med določenim vinom in med posameznimi frakcijami ni bistvenih razlik glede na hitrost oksidacije polifenolov. Tudi med različnimi sortami vin ni bistvene razlike v kinetiki reakcije.

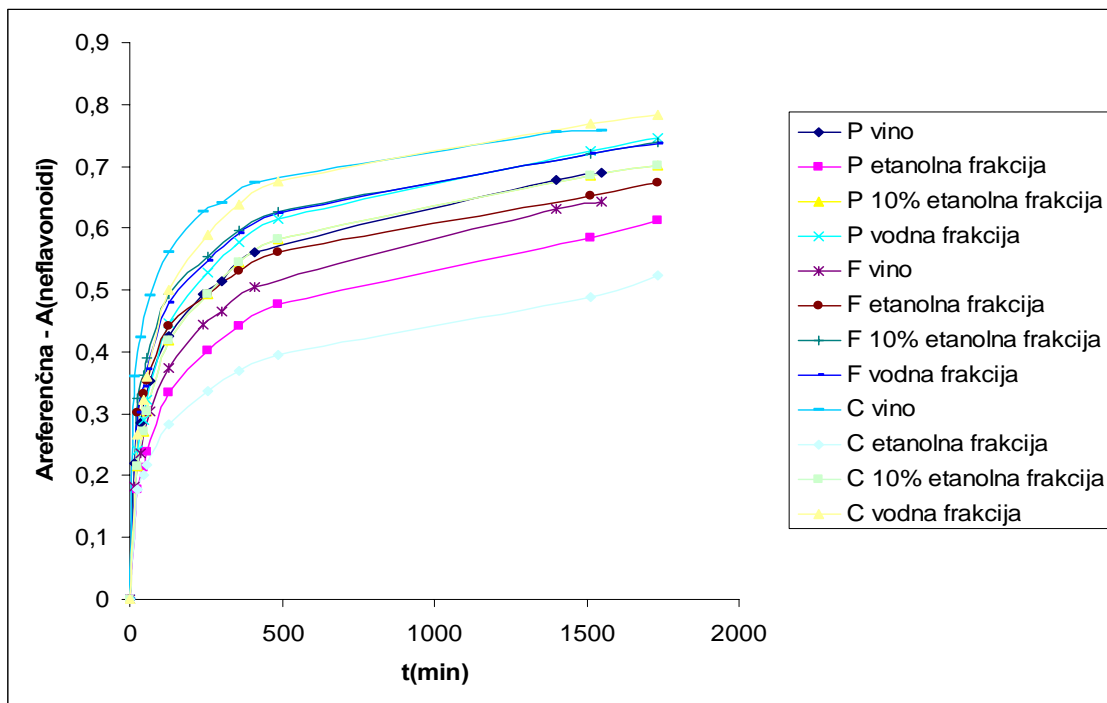
4.4.7.3 Spremljanje hitrosti reakcije netaninov s prostim radikalom DPPH[•]



Slika 19: Grafični prikaz časovno odvisne redukcije DPPH[•] z netaninskimi fenoli vina in rekonstituiranih liofilizatov

Pri merjenju kinetike reakcije netaninskih fenolov z DPPH[•] smo ugotovili, da se hitrost reakcije bistveno ne razlikuje od hitrosti reakcije med skupnimi polifenoli in DPPH[•] (slika 19).

4.4.7.4 Spremljanje hitrosti reakcije neflavonoidov s prostim radikalom DPPH•



Slika 20: Grafični prikaz časovno odvisne redukcije DPPH• z neflavonoidnimi fenoli vina in rekonstituiranih liofilizatov

S slike 20 je razvidno, da neflavonoidni fenoli reagirajo počasneje od netaninskih fenolov, saj je hitrost reakcije (naklon krivulje) pri zadnjih merjenih točkah večja.

4.4.7.5 Primerjava rezultatov spremljanja hitrosti reakcije fenolnih spojin s prostim radikalom DPPH[•]

Da bi boljše prikazali ugotovitve, ki smo jih nakazali pod rezultati 4.4.7.1, 4.4.7.2, 4.4.7.3 in 4.4.7.4, smo glede na končni merjeni čas preračunali, kolikšen delež DPPH[•] reagira po 4 urah (preglednica 29).

Preglednica 29: Delež DPPH[•], ki je reagiral po štirih urah v primerjavi s 23 urami za vina in rekonstituirane liofilizate modri pinot (P), modra frankinja (F) in cabernet sauvignon (C)

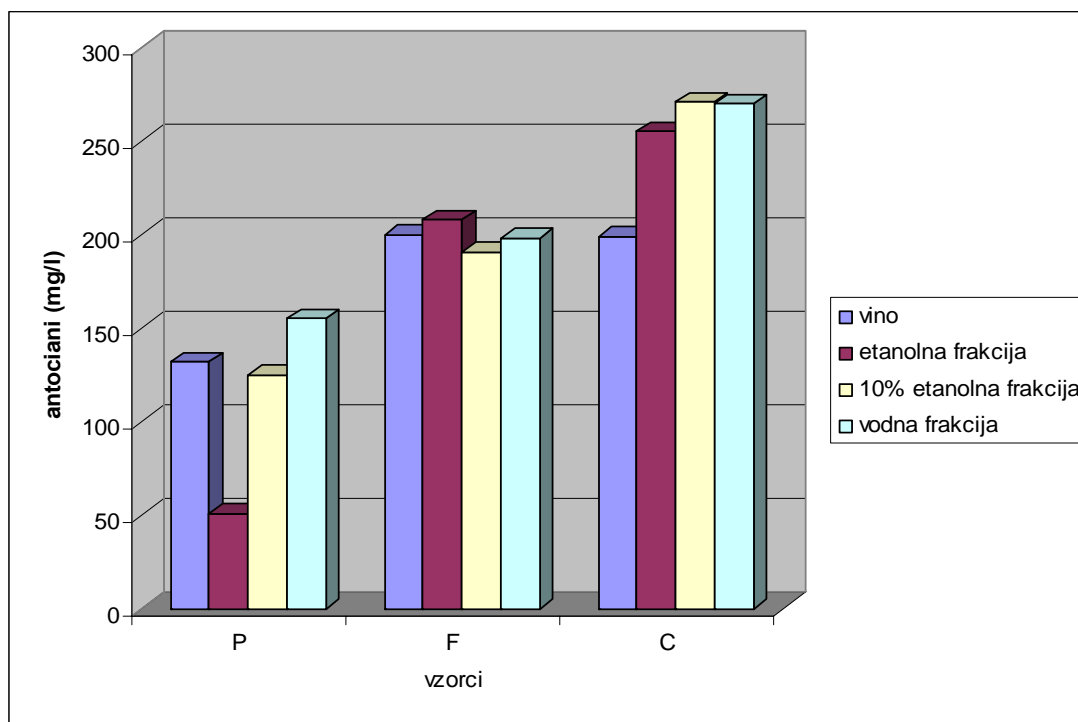
standardi		skupni fenoli		netanini		neflavonoidi	
galna kislina	97 %	P: vino	85 %	P: vino	88 %	P: vino	71 %
		P: etanol	82 %	P: etanol	82 %	P: etanol	66 %
cianidin klorid	81 %	P: 10 vol. % et.	86 %	P: 10 vol. % et.	81 %	P: 10 vol. % et.	70 %
		P: voda	86 %	P: voda	82 %	P: voda	71 %
		F: vino	85 %	F: vino	88 %	F: vino	69 %
rutin	97 %	F: etanol	83 %	F: etanol	85 %	F: etanol	73 %
		F: 10 vol. % et.	84 %	F: 10 vol. % et.	82 %	F: 10 vol. % et.	75 %
kvercetin	97 %	F: voda	85 %	F: voda	83 %	F: voda	74 %
katehin	94 %	C: vino	84 %	C: vino	80 %	C: vino	83 %
epikatehin	91 %	C: etanol	81 %	C: etanol	80 %	C: etanol	64 %
		C: 10 vol. % et.	83 %	C: 10 vol. % et.	77 %	C: 10 vol. % et.	76 %
resveratrol	77 %	C: voda	84 %	C: voda	78 %	C: voda	75 %
oein klorid	85 %						

Iz preglednice 29 je razvidno, da netanini in skupni fenoli reagirajo z DPPH[•] enako hitro, medtem ko neflavonoidi reagirajo občutno počasneje. Vidno je tudi, da z DPPH[•] določeni neflavonoidi predstavljajo manjši del celote kot pa pri določitvi s F. C. reagentom.

4.5 DOLOČEVANJE MASNE KONCENTRACIJE ANTOCIANOV

Antociani ali z drugo besedo antocianini so flavonoidi, ki dajo barvo rdečim vinom (Plahuta, 2004). To pa ne pomeni, da je vsebnost antocianov sorazmerna z deležem rdeče barve. Nevezani antociani se odvisno od pH nahajajo v različnih oblikah, ki dajejo različne barvne odtenke (rdeč flavilijev kation, moder kalkon, modra kinonska baza ter brezbarvna karbinol psevdobaza) (Vrščaj in Košmerl, 2005). Pri nižjem pH je torej barva vina rubinasto rdeča, pri višjem pa prehaja v modro.

Masno koncentracijo, izraženo kot malvidin-3-monoglukozid po metodi 3.2.4.9, prikazuje slika 21 in priloga C₁.



Slika 21: Grafični prikaz masne koncentracije antocianov v vinih in rekonstituiranih liofilizatih

S slike 21 je razvidno, da izmed izbranih sort vin vino modra frankinja in vino sorte cabernet sauvignon vsebujeta največ antocianov (200 mg/l in 199 mg/l). V manjši meri jih vsebuje vino sorte modri pinot (132 mg/l).

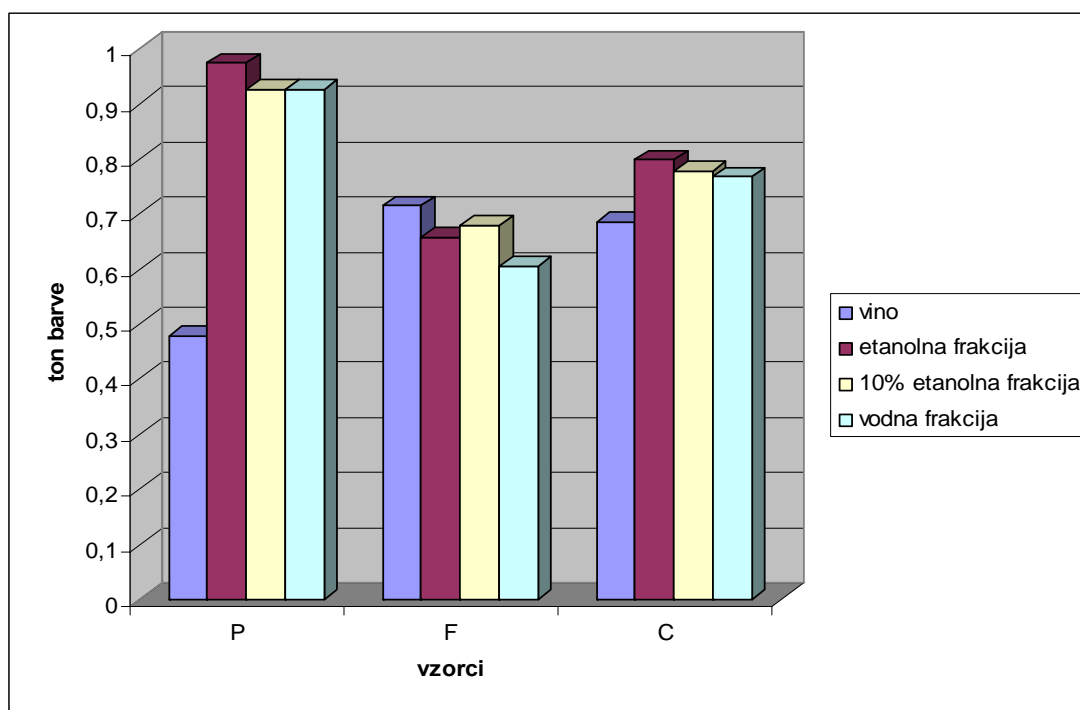
Zanimivo je, da se z liofilizacijo v nekaterih primerih vsebnost antocianov poveča. Najbolj je to očitno v frakcijah sorte cabernet sauvignon, saj je masna koncentracija antocianov za 28 % (pri etanolni frakciji) do 36 % (pri vodni in 10 vol. % etanolni frakciji) višja.

4.6 REZULTATI DOLOČANJA BARVNIH PARAMETROV

Pri ocenjevanju kakovosti rdečih vin so še posebej pomembni barvni parametri, kot so intenziteta, ton barve in delež rdečega barvila, ki temeljijo na merjenju absorbanc pri 420, 520 in 620 nm. Po metodi 3.2.4.10 smo v vinih in posameznih frakcijah spektrofotometrično določili ton barve (slika 22), intenziteto barve (slika 23), delež rdeče barve (slika 24) ter delež barve pri valovnih dolžinah 420 nm, 520 nm in 620 nm (slike 25, 26 in 27).

4.6.1 Ton barve

Ton barve smo določili z razmerjem med absorbancama pri valovni dolžini 420 nm in valovni dolžini 520 nm (metoda 3.2.4.10). Rezultati so grafično prikazani na sliki 22 in v prilogi C₂. Večja vsebnost rumeno-rjavih barvil vpliva na večjo vrednost absorbance pri valovni dolžini 420 nm in s tem na povečanje tona barve.



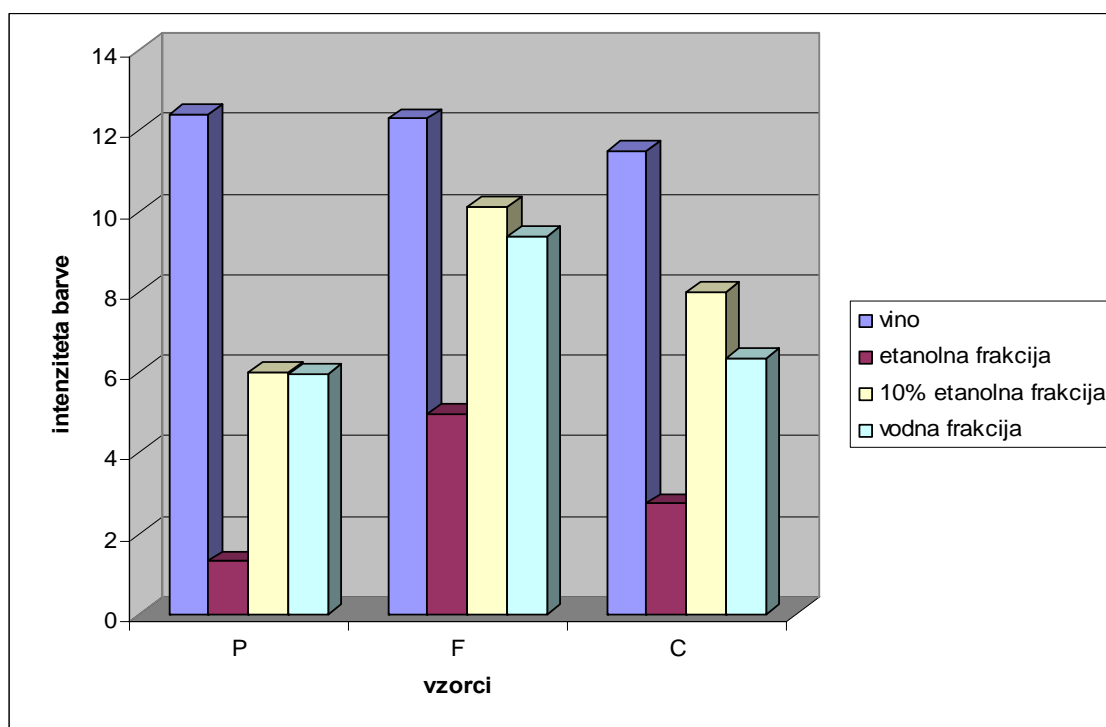
Slika 22: Grafični prikaz tona barve v vinih in rekonstituiranih liofilizatih

Iz grafa je razvidno, da ima vino sorte modri pinot najnižjo vrednost tona barve (0,479), njegove frakcije pa najvišjo (0,974, 0,926 in 0,926). To pomeni, da s postopkom liofilizacije prevladujoč rdeč ton preide v nestabilne rumeno-rjave odtenke barve. Vrednosti tona barve vin in posameznih frakcij sorte modra frankinja se gibljejo v intervalu med 0,715 in 0,604. V tem primeru ima vino najvišjo vrednost oziroma se

odtenki rdeče barve s postopkom liofilizacije celo nekoliko povečajo. Tudi v vinu sorte cabernet sauvignon se s postopkom liofilizacije zmanjša odtenek rdeče barve, vendar pa v manjši meri kot v vinu sorte modri pinot.

4.6.2 Intenziteta barve

Intenziteto barve vzorcev smo določili po metodi 3.2.4.10 (enačba 4). Rezultati so razvidni s slike 23 in priloge C₃.



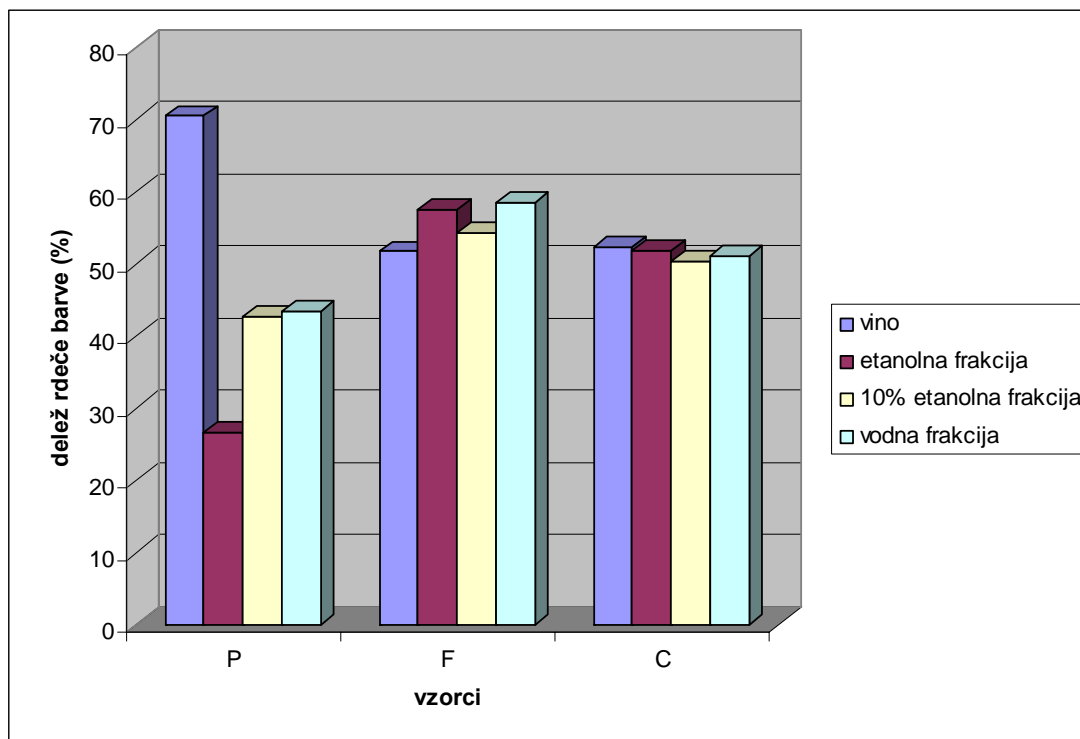
Slika 23: Grafični prikaz intenzitete barve v vinih in rekonstituiranih liofilizatih

S slike lahko vidimo, da so vina bolj intenzivno obarvana kot posamezne frakcije. Vrednosti 10 vol. % etanolnih frakcij in vodnih frakcij so za 18 % do 48 % nižje. Vodne frakcije so v primerjavi z 10 vol. % etanolnimi frakcijami vedno nekoliko manj obarvane. Etanolne frakcije so najmanj intenzivno obarvane (11 % do 40 % glede na intenziteto barv vin).

Najbolj obarvana so vina sort modri pinot in modra frankinja (12, 4 in 12,3). Intenziteta barve vina sorte cabernet sauvignon je nekoliko nižja (11,5). Intenzivnost barve se najbolj ohrani pri vodni in 10 vol. % etanolni frakciji sorte modra frankinja, saj je le 18 % nižja pri 10 vol. % etanolni frakciji ter 23 % nižja pri vodni frakciji. Liofilizacija najbolj vpliva na intenziteto barve vina sorte modri pinot. Tako se pri etanolni frakciji te sorte vrednost zniža za 89 %, pri 10 vol. % etanolni in vodni frakciji pa za 48 %.

4.6.3 Delež rdeče barve

Po metodi 3.2.4.10 smo z enačbo 8 določili delež odtenka rdeče barve (prostih in vezanih antocianov v obliki flavilijevega kationa) vin in posameznih frakcij. Rezultate prikazuje slika 24 in priloga C₄.



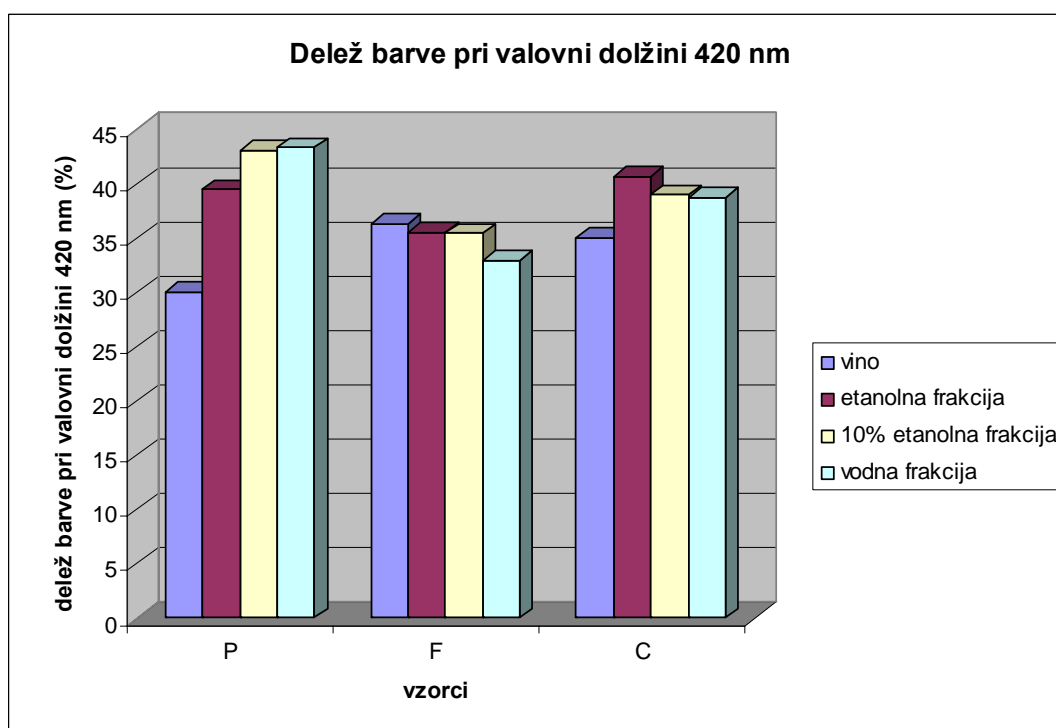
Slika 24: Grafični prikaz deleža rdeče barve v vinih in rekonstituiranih liofilizatih

S slike 24 je razviden velik delež rdeče barve vina sorte modri pinot, ki znaša 71 %. Bistveno nižja sta deleža rdeče barve v vinih sort modra frankinja in cabernet sauvignon, ki znašata 52 %. Kljub temu pa postopek liofilizacije najbolj osiromaši vino modri pinot, saj se delež rdeče barve v etanolni frakciji zniža za 62 %, deleža v 10 vol. % etanolni frakciji in vodni frakciji pa za 61 % in 62 %. Deleži rdeče barve vin in posameznih frakcij sort modra frankinja in cabernet sauvignon se gibljejo v ozkem intervalu od 50 % do 59 %. V frakcijah vina sorte modra frankinja so deleži rdeče barve nekoliko višji kot v vinu.

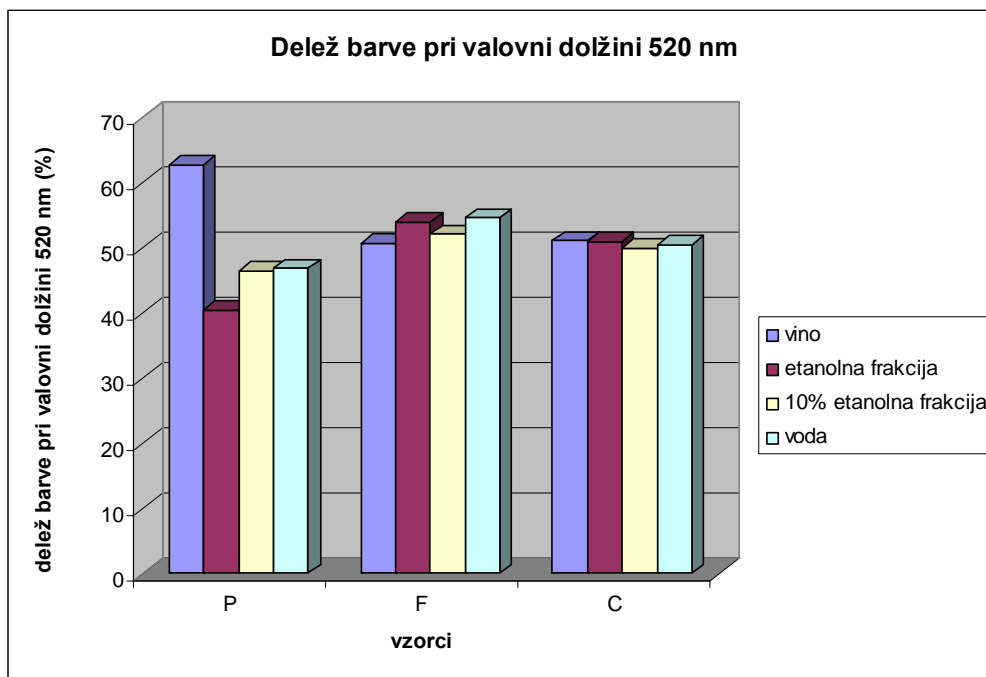
4.6.4 Delež barve pri posameznih valovnih dolžinah

Vzorcem smo po metodi 3.2.4.10 izmerili absorbance pri valovnih dolžinah 420 nm, 520 nm in 620 nm ter s pomočjo matematičnih zvez 5,6 in 7 dobili rezultate, ki so prikazani na slikah 25, 26 in 27 ter v prilogah C₅, C₆ in C₇.

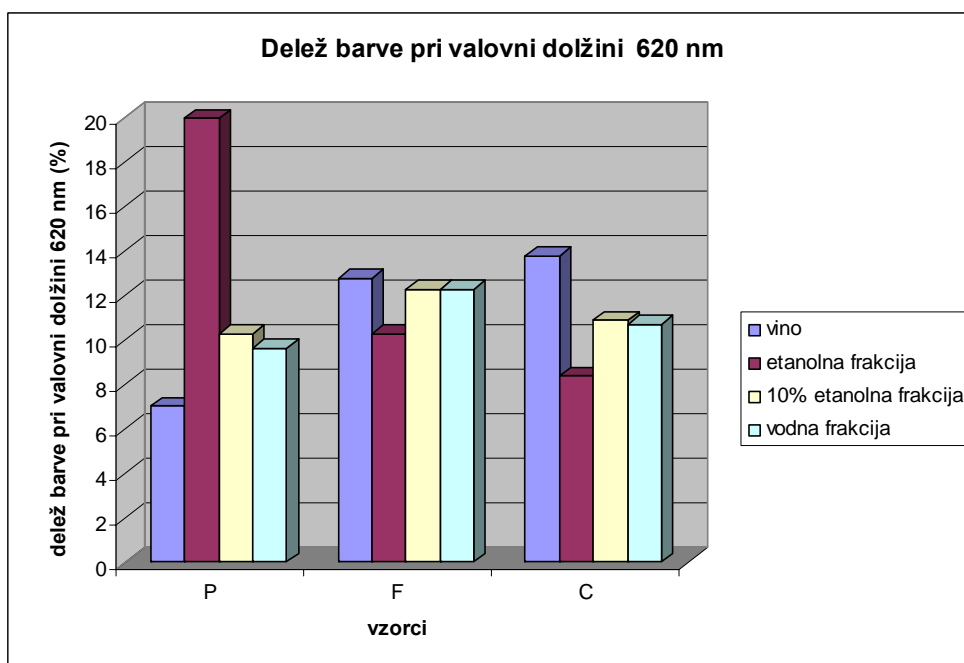
Na vrednost absorbance pri valovni dolžini 420 nm vplivajo predvsem odtenki rjave barve, na vrednost absorbance pri 520 nm odtenki rdeče barve, na vrednost absorbance pri 620 nm pa odtenki modro-vijolične barve.



Slika 25: Grafični prikaz deleža barve v vinih in rekonstituiranih liofilizatih pri valovni dolžini 420 nm



Slika 26: Grafični prikaz deleža barve v vinih in rekonstituiranih liofilizatih pri valovni dolžini 520 nm



Slika 27: Grafični prikaz deleža barve v vinih in rekonstituiranih liofilizatih pri valovni dolžini 620 nm

S slik 25, 26 in 27 lahko sklepamo, da so vrednosti deleža barve vseh vzorcev največje pri valovni dolžini 520 nm oziroma da prevladuje rdeča barva. Deleži barve pri 520 nm se gibljejo od 41 % (v etanolni frakciji modri pinot) do 63 % (v vinu sorte modri pinot). Z izjemo vina sorte modra frankinja imajo frakcije v primerjavi z vini nekoliko nižji delež barve pri valovni dolžini 520 nm. Najbolj se to opazi v vinu sorte modri pinot, saj se deleži barve frakcij v primerjavi z vinom zmanjšajo kar za 25 % (pri vodni frakciji) do 36 % (pri etanolni frakciji).

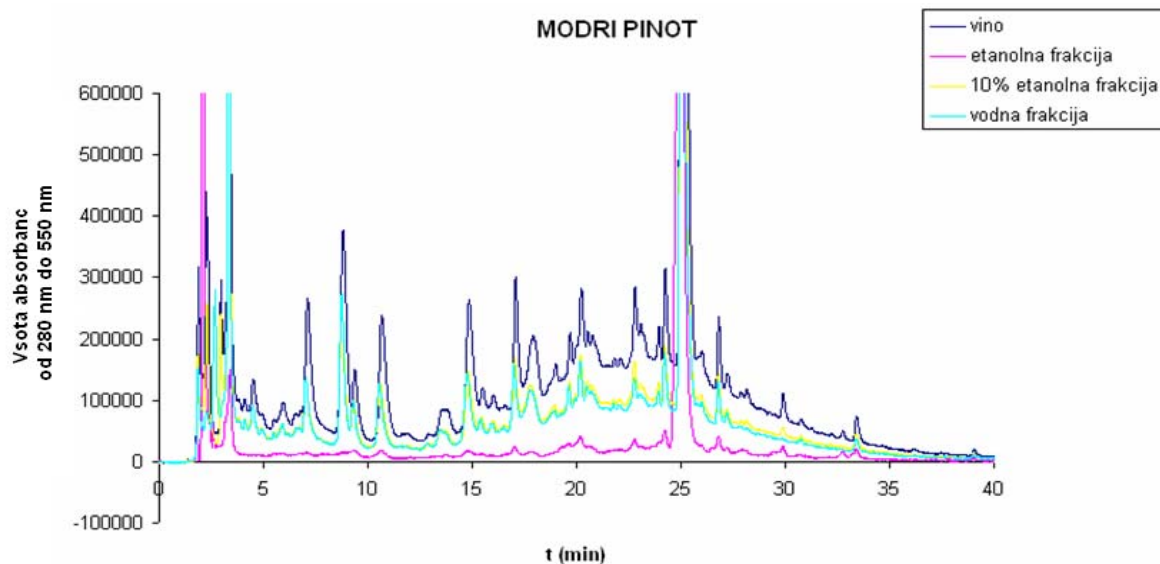
Tudi pri valovni dolžini 420 nm so deleži barv relativno visoki, saj se gibljejo v intervalu med 30 % (v vinu sorte modri pinot) in 44 % (v vodni frakciji sorte modri pilot). Z izjemo vina sorte modra frankinja so vrednosti deležev posameznih frakcij vedno večje v primerjavi z vini. Na račun zmanjšanja deleža barve pri absorbanca 520 nm se torej povečajo deleži barve pri 420 nm.

Pri valovni dolžini 620 nm so vrednosti vzorcev najnižje (od 7 % do 20 %). Odtenci modro-vijolične barve so torej najmanj zastopani. Posebej izstopa delež barve etanolne frakcije sorte modri pinot, saj je kar za 65 % višji od deleža barve v vinu.

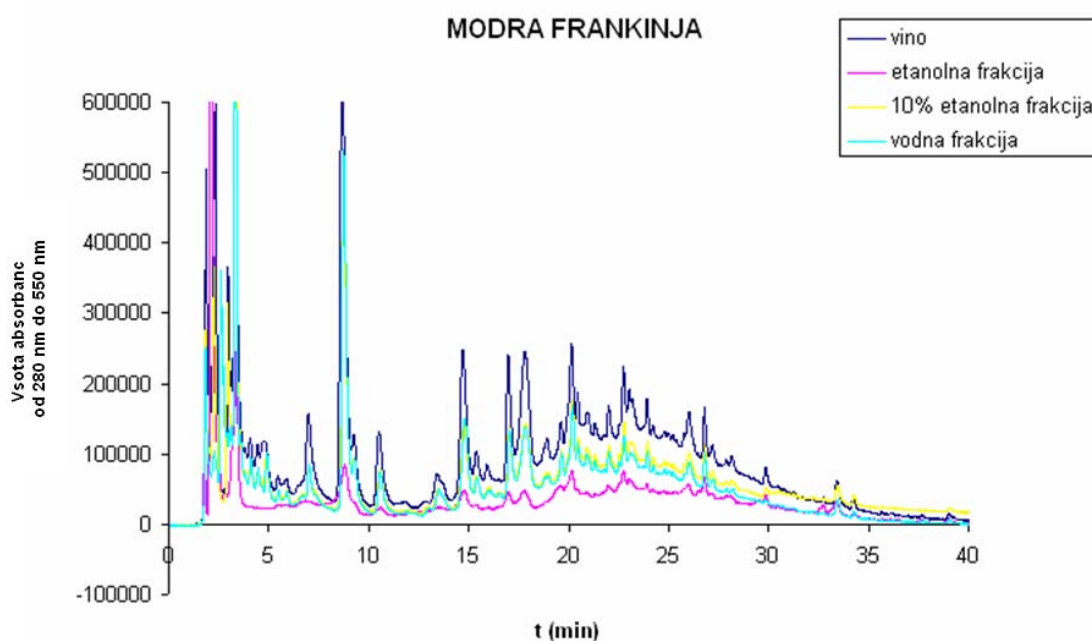
4.7 REZULTATI PRIMERJAVE VSEBNOSTI POLIFENOLOV S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO

Da bi ugotovili, ali liofilizacija in raztapljanje v različnih topilih vplivata na profil polifenolov, smo vina in posamezne frakcije nanesli na hidrofobno kolono. Vezane komponente smo eluirali z naraščajočo koncentracijo organskega topila in detektirali z diodno matriko v območju od 280 nm do 550 nm, kjer ima absorpcijske maksimume večina polifenolov.

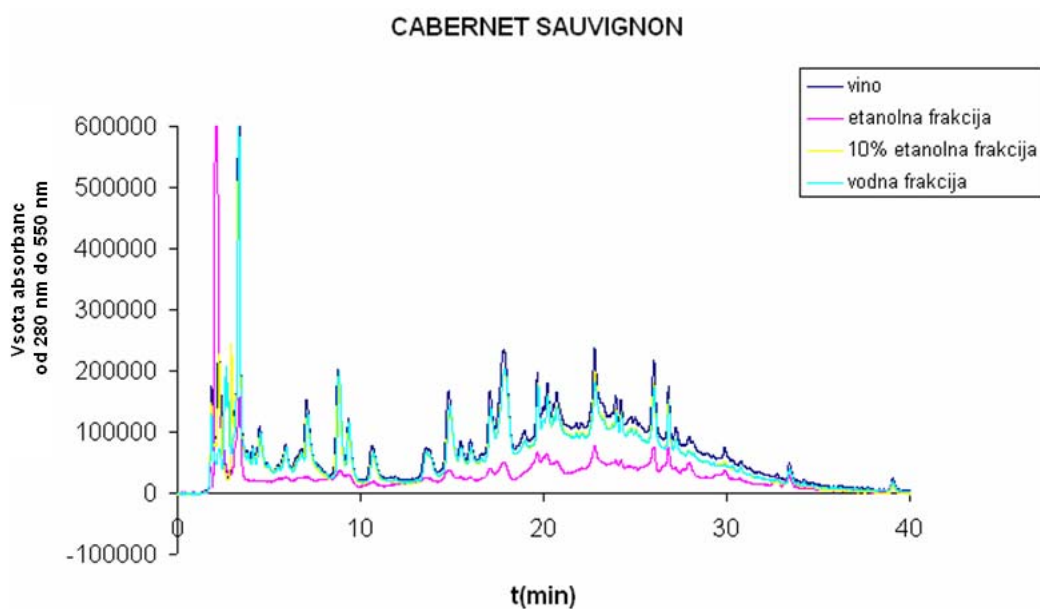
Rezultate primerjave vsebnosti fenolov vin in posameznih frakcij s tekočinsko kromatografijo prikazujejo slike 28, 29 in 30.



Slika 28: Elucijski diagram spojin v vinu sorte modri pinot in rekonstituiranih liofilizatih, ki absorbirajo v območju od 280 do 550 nm, analiziranih s HPLC



Slika 29: Elucijski diagram spojin v vinu sorte modra frankinja in rekonstituiranih liofilizatih, ki absorbirajo v območju od 280 do 550 nm, analiziranih s HPLC

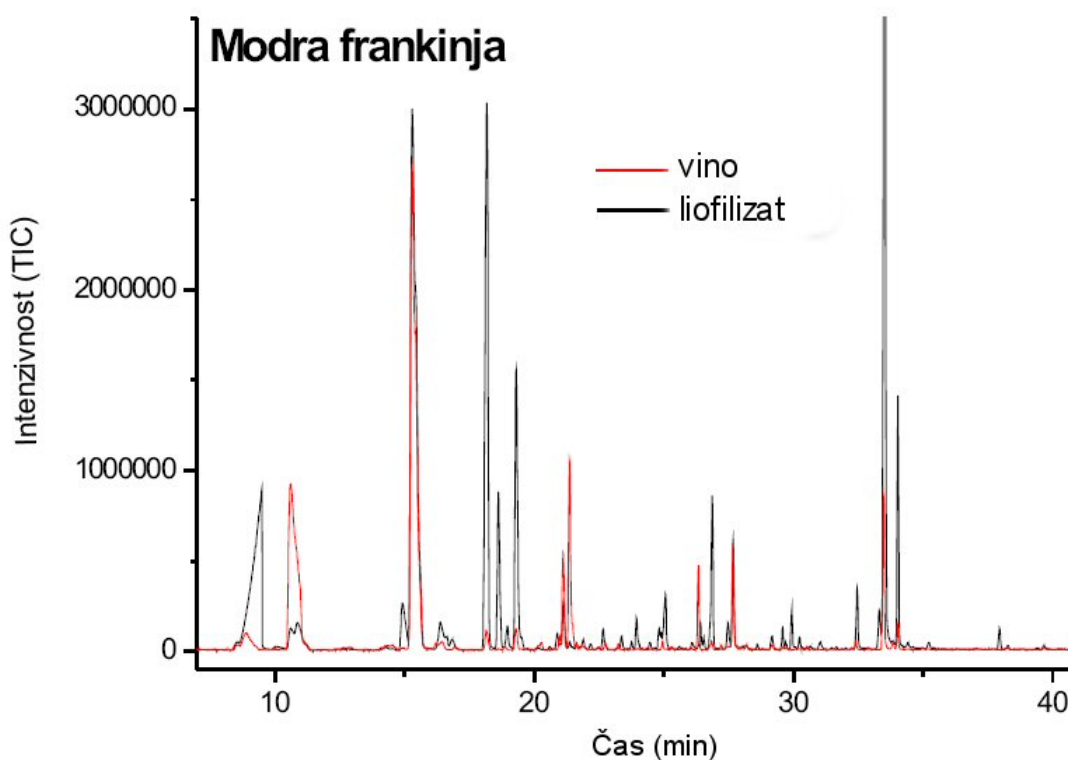


Slika 30: Elucijski diagram spojin v vinu sorte cabernet sauvignon in rekonstituiranih liofilizatih, ki absorbirajo v območju od 280 do 550 nm, analiziranih s HPLC

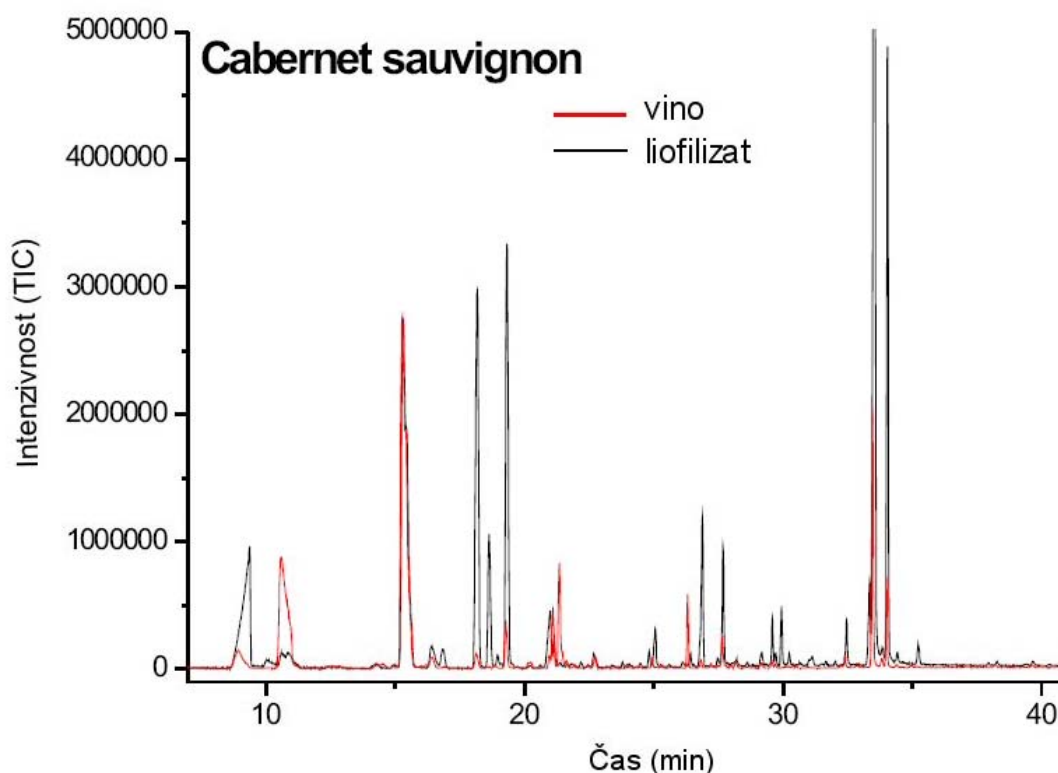
Na slikah 28, 29 in 30 vidimo, da so oblike grafov posameznih frakcij podobne oblikam grafov izvornih vin. To pomeni, da se liofilizati glede na vrsto polifenolnih snovi od izvornih vin bistveno ne razlikujejo. Nekoliko večje razlike v oblikah krivulj so razvidne le pri etanolnih frakcijah. Ploščine krivulj 10 vol. % etanolnih in vodnih frakcij so nekoliko manjše od ploščin izvornih vin. Še posebej je to razvidno pri sorti modri pinot, medtem ko pri sorti cabernet sauvignon med ploščinami ni večjih razlik. Analize s tekočinsko kromatografijo so torej pokazale, da se z liofilizacijo koncentracija polifenolnih snovi nekoliko zmanjša.

4.8 REZULTATI DOLOČANJA HlapNIH KOMPONENT VIN IN REKONSTITUIRANIH LIOFILIZATOV S PLINSKO KROMATOGRFIJO

Vzorce smo pripravili po metodi 3.2.1, po metodi 3.2.6 pa so s plinsko kromatografijo določili hlapne komponente vin. Rezultate analize prikazujeta sliki 31 in 32, preglednica 30 ter prilogi E₁ in E₂.



Slika 31: Kromatogram določanja hlapnih komponent vina in rekonstituiranih liofilizatov sorte modra frankinja s plinsko kromatografijo



Slika 32: Kromatogram določanja hlapnih komponent vina in rekonstituiranih liofilizatov sorte cabernet sauvignon s plinsko kromatografijo

S plinsko kromatografijo smo v vzorcih vin določili večino sestavin, ki vplivajo na aromo. Obe sorti vin cabernet sauvignon in modra frankinja imata v večini enako sestavo hlapnih komponent, opazne so bile le manjše razlike (priloga E₁).

V liofilizatih vin smo identificirali okoli 50 hlapnih komponent, kar je več kot v prvotnih vinih. Za večino identificiranih hlapnih komponent v liofilizatih je bilo značilno, da so v primerjavi z vini imele daljši retencijski čas in da so se eluirale na koncu temperaturnega gradienta (preglednica 30, prilogi E₁, E₂).

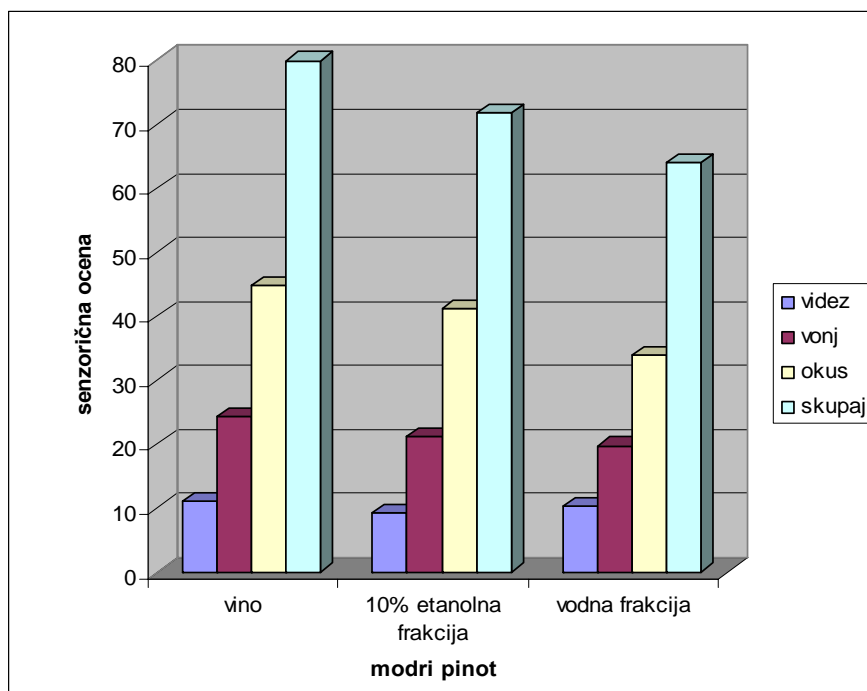
10 vol. % etanolne in vodne frakcije so vsebovale večino sestavin arom, vendar pa v manjših koncentracijah kot v izvornem vinu. Ko smo liofilizat rekonstituirali z vodo, smo določili večjo koncentracijo hlapnih komponent kot pa rekonstrukciji z 10 vol. % etanolom. Nekatere komponente arom so bile prisotne celo v večji koncentraciji kot v izvornem vinu (sliki 31 in 32, preglednica 30). Višje vrednosti komponent arom v vodni fazi so lahko posledica manjše topnosti teh komponent v vodi v primerjavi s topnostjo v 10 vol. % etanolu.

Preglednica 30: Relativne vrednosti hlapnih komponent 10 vol. % etanolnih frakcij in vodnih frakcij vin sort modra frankinja in cabernet sauvignon glede na vino

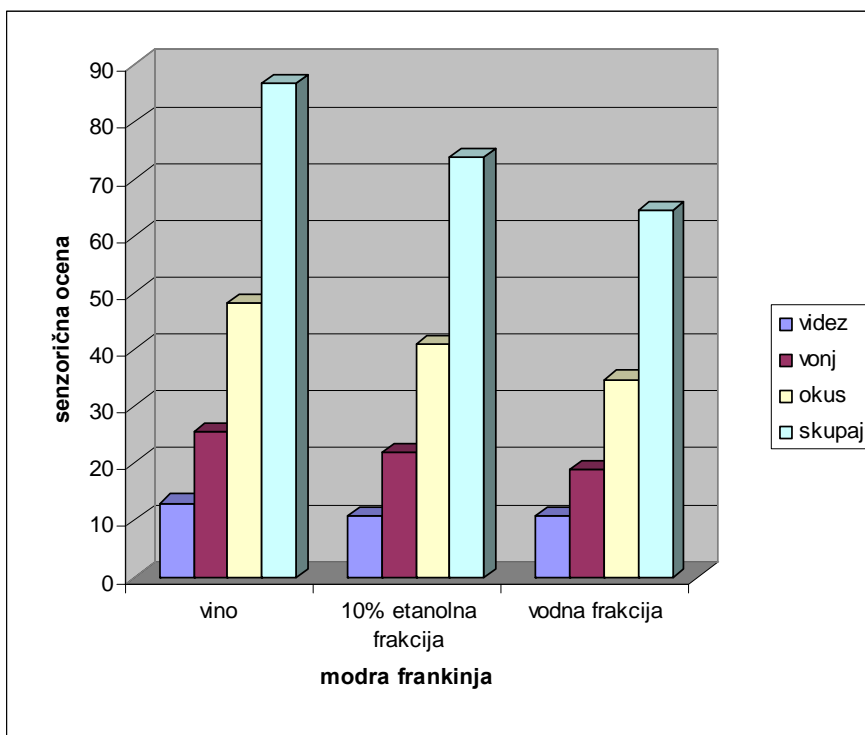
t_R	glavne komponente	F voda	F 10 vol. % etanol	C voda	C 10 vol. % etanol
6,086	etanol	7,7	102	9,3	140
8,546	ogljikov disulfid	/	/	5,9	11
8,911	neidentificirane komponente z m/z 43, 45, 60 in 76	51	15	54	12
10,608	etil acetat	25	5,6	29	2,0
15,291	3-metil 1-butanol	60	9	68	10
18,157	etilni ester butanojske kisline ali 2,3-butandiol	100	38	370	100
19,293	2-hidroksi etilni ester propanojske kisline	110	28	125	19
21,118	1-heksanol	19	11	26	8,7
21,364	3-metil acetat 1-butanol	3,5	2,7	3,2	0,9
24,955	heksanojska kislina	40	31	58	23
26,330	etilni ester heksanojske kisline ali diacetat 1,3-propandiola	2,5	2,6	1,8	1,4
26,848	butirolakton	57	52	130	130
27,672	benzaldehyd	5,7	5,9	14	13
32,403	oktanojska kislina	83	50	84	43
33,474	feniletil alkohol	71	64	73	43
34,020	diethylni ester butandiojske kisline	40	31	36	14

4.9 REZULTATI SENZORIČNE ANALIZE

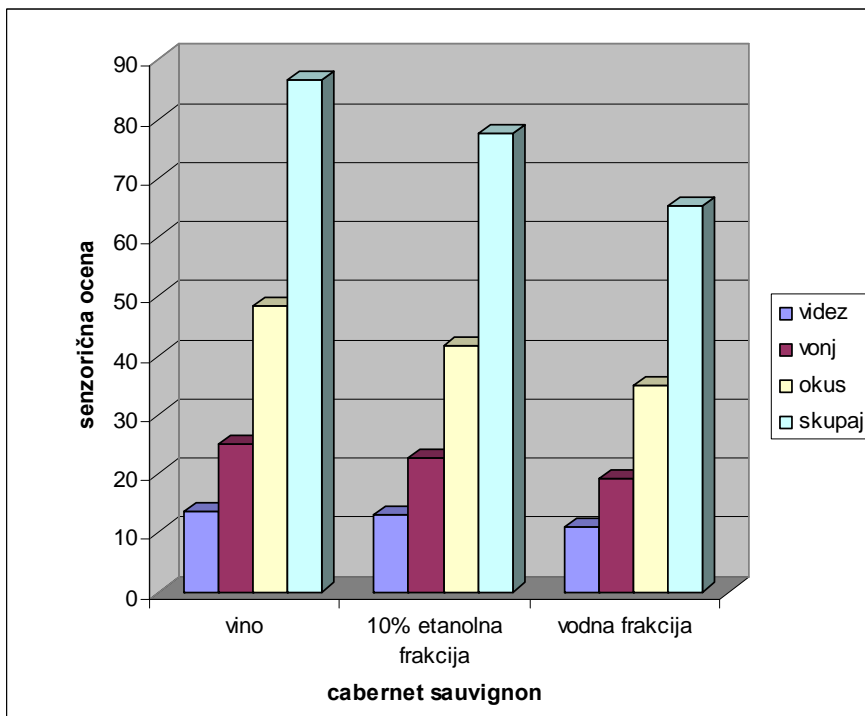
Senzorično analizo smo izvedli po metodi 3.2.7. Poleg vrhunskih vin ter njihovih rekonstituiranih liofilizatov z 10 vol. % etanolom in vodo smo senzorično ocenili tudi rdečo zvrst in njene vodne in 10 vol. % etanolne rekonstituirane liofilizate. Rezultati posameznih ocen okusa, vonja in videza ter skupna ocena so razvidni s slik 33, 34, 35, 36 in iz prilog D₁, D₂, D₃, D₄.



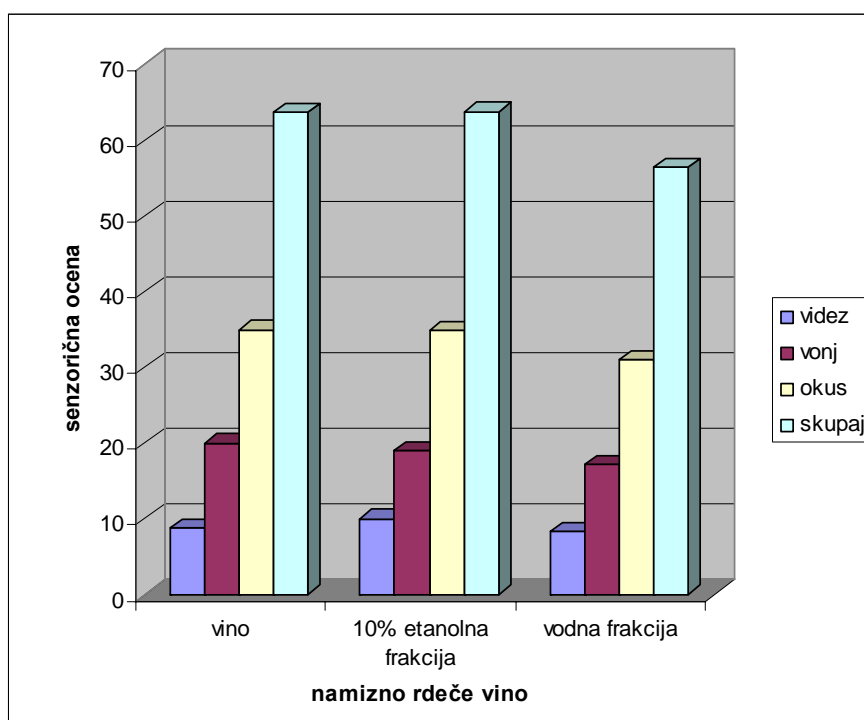
Slika 33: Grafični prikaz senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizatov sorte modri pinot



Slika 34: Grafični prikaz senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizatov sorte modra frankinja



Slika 35: Grafični prikaz senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizatov sorte cabernet sauvignon



Slika 36: Grafični prikaz senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizatov rdeče zvrsti

S slik 33, 34, 35 in 31 vidimo, da so najvišjo oceno določili vrhunskim vinom sort modra frankinja in cabernet sauvignon (86,75). Nekoliko manj točk je dobilo vrhunsko vino modri pinot (80). Senzorično najslabše ocenjena je bila rdeča zvrst (63,75). Z izjemo 10 vol. % etanolne frakcije rdeče zvrsti, ki si je prislužila za 1 % višjo oceno, so bile vse posamezne frakcije v primerjavi s prvotnimi vini slabše ocenjene. Postopek liofilizacije je, z izjemo 10 vol. % etanolne frakcije sorte modri pinot in z izjemo 10 vol. % etanolne frakcije rdeče zvrsti, najbolj vplival na okus, saj so v primerjavi z vinom frakcije pri okusu izgubile tudi do 28 % vseh točk (pri vodni frakciji sorte modra frankinja). Izgube so bile najbolj očitne pri vodnih frakcijah najboljše ocenjenih vin.

Največ točk je 10 vol. % etanolna frakcija sorte modri pinot izgubila pri videzu, in sicer 16 %, medtem ko je 10 vol. % etanolna frakcija rdeče zvrsti na videzu celo pridobila. Ocena se ji je zvišala kar za 14 %. Največ točk je 10 vol. % etanolna frakcija rdeče zvrsti izgubila pri vonju (5 %).

Pri vseh vodnih in 10 vol. % etanolnih frakcijah smo zaradi kisline zaznali neskladnost v okusu.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo ugotavljali razlike med rdečim vinom in posameznimi frakcijami, ki smo jih dobili tako, da smo vino liofilizirali in ga z etanolom, 10 vol. % etanolom in vodo rekonstruirali. Ugotavljali smo tudi razlike med sortami vin modri pinot, modra frankinja in cabernet sauvignon. Poleg tega smo izbrana vrhunska vina primerjali z namiznim vinom rdeče zvrsti in ugotavljali, kako liofilizacija vpliva na kakovost. Za primerjavo smo liofilizirali tudi vrhunsko belo vino rumeni muškat.

Pri ugotavljanju razlik smo se posluževali različnih kemijskih metod. Predvsem smo se osredotočili na direktne spektrofotometrične metode, kot so določanje masne koncentracije fenolnih spojin in AOP. Na vinih, 10 vol. % etanolnih in vodnih frakcijah smo na koncu izvedli še senzorično analizo.

Z liofilizacijo vrhunskih rdečih vin smo dobili lepljiv liofilizat z maso 31,1 g do 35,0 g na liter vina, odvisno od sorte. Kot pričakovano, je po liofilizaciji rdeče zvrsti ostalo manj suhe snovi, in sicer 21,4 g na liter vina. Največ liofilizata smo dobili pri belem vinu sorte rumeni muškat (123 g/l). Tako visoko vsebnost suhe snovi po liofilizaciji pripisujemo visoki vsebnosti sladkorja v vinu sorte rumeni muškat, ki poleg tega pripomore k hidroskopičnosti ekstrakta.

Namen liofilizacije je bil predvsem odstranitev etanola, ki omejuje varno vsakodnevno priporočljivo uživanje vina. Zato smo ugotavljali, koliko etanola ostane v liofilizatu vin. Rezultati, ki smo jih dobili s pomočjo tekočinske kromatografije, so pokazali, da se z liofilizacijo izgubi večina etanola (od 99,1 % do 99,8 %,) medtem ko glicerol v večini ostane. Izgubi se ga le od 8 % do 17 % (preglednici 18, 19). Glicerol namreč vpliva na kakovost vin, saj je pomembna sestavina vina, ki mu daje polnost in povečuje sladko zaznavo v vinu (Plahuta, 2004).

Naša dognanja o vplivu liofilizacije na vino in vpliv različnih topil na ekstrakcijo polifenolov liofilizata temeljijo predvsem na spektrofotometričnih metodah določanja masne koncentracije fenolnih spojin z reagentom F.C. in antioksidacijskega potenciala fenolnih spojin, izraženih kot mg galne kisline na liter.

Masno koncentracijo skupnih fenolov vzorcev prikazujeta slika 11 in priloga A₁. Vino sorte modra frankinja in vino sorte modri pinot imata največjo masno koncentracijo polifenolov, in sicer 2490 mg GAE/l in 2440 mg GAE/l. Vino sorte cabernet sauvignon ima manjšo vsebnost skupnih polifenolov (1860 mg GAE/l). Kot je bilo pričakovano, je rdeča zvrst vsebovala le 1130 mg GAE/l skupnih fenolov, belo vino rumeni muškat pa 507 mg GAE/l. Rezultati se skladajo z literaturo. Po López-Vélez in sod. (2003) se je vsebnost skupnih polifenolov rdečih španskih vin, ki so jo ravno tako določili z reagentom F.C. in izrazili kot mg galne kisline na liter, gibala med 1800 mg GAE/l in 2300 mg GAE/l. Fernández-Pachón in sod. (2004) pa so z enako metodo analizirali 16 različnih rdečih španskih vin in dobili vrednosti v intervalu med 1313 mg GAE/l in 2389 mg GAE/l. Pri belih vinih so dobili nižje vrednosti, in sicer od 89 mg GAE/l do 331 mg GAE/l. Toda po

Woraratphoka in sod. (2006) bela tajska vina vsebujejo med 306 in 846 mg GAE/l skupnih fenolov.

Po liofilizaciji se z etanolno ekstrakcijo ohrani le 17 % do 55 % vseh skupnih fenolov izbranih rdečih vin. Najmanj se jih ohrani pri sorti modri pinot. Tako z vodo kot z 10 vol. % etanolom se polifenoli liofilizata enako dobro ekstrahirajo. Izgubi se le 3,6 % do 8,6 % vseh skupnih fenolov. Ravno tako se je z liofilizacijo rdeče zvrsti izgubilo le 2,7 % fenolov. Kakovostni razred vin torej ni vplival na ohranitev fenolnih snovi v liofilizatu. Bistveno več skupnih fenolov se je izgubilo z liofilizacijo belega vina rumeni muškat, in sicer kar 18 %.

Določali smo tudi masno koncentracijo taninov in neflavonoidov v izbranih vzorcih vin in posameznih frakcijah. Masno koncentracijo taninov in flavonoidov prikazujeta sliki 12 in 13, medtem ko so masne koncentracije netaninov in neflavonoidov podane v prilogah A₂ in A₃. Vina so vsebovala od 36 % do 50 % taninov ter 76 % do 86 % flavonoidov. S tanini je najbogatejše vino sorte cabernet sauvignon, ki vsebuje 50 % taninskih fenolov. Vini sort modri pinot in modra frankinja vsebujeta bistveno manj taninov (36 %). Rezultati se skladajo z literaturo (Nemanič, 1999; Plahuta, 2004), saj naj bi bilo grozdje sorte modri pinot siromašno s tanini, sorta cabernet sauvignon pa naj bi dajala taninsko močno zastopana vina. Ravno nasprotno je vino sorte modri pinot najbogatejše s flavonoidi, saj jih vsebuje 86 %. Nekoliko manj jih vsebuje vino sorte cabernet sauvignon (82 %), najmanj pa vino sorte modra frankinja (76 %). Treba je poudariti, da se flavonoidi in tanini med seboj ne izključujejo, saj so spojine, kot so na primer hidrolizabilni tanini, sestavljene iz flavonoidov (katehinov in levkoantocianinov) (Plahuta 2004, Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

Najmanj flavonoidov in taninov se ohrani v etanolnih frakcijah (od 0,90 % pa do 49 % se ohrani taninov, od 3,9 % pa do 12 % se ohrani flavonoidov). Pri sorti modri pinot je opazna še posebej nizka zastopanost teh spojin. Voda in 10 vol. % etanol enako dobro ekstrahirata tako tanine kot flavonoide. V vodni in 10 vol. % etanolni frakciji se ohrani od 88 % do 93 % flavonoidov ter z izjemo vina sorte cabernet sauvignon 82 % do 96 % taninov. Na vino sorte cabernet sauvignon postopka liofilizacije in (ali) ponovne ekstrakcije z 10 vol. % etanolom in vodo specifično vplivata. V 10 vol. % etanolni frakciji vina sorte cabernet sauvignon se namreč ohrani le 69 % taninov, v vodni frakciji pa še nekoliko manj (62 %).

Poleg tega da smo ugotavljali, koliko taninov in flavonoidov se v posameznih frakcijah ohrani (glede na flavonoide in tanine v vinu), smo ugotavljali tudi sestavo fenolnih spojin posameznih frakcij. Preglednica 21 prikazuje delež taninov in flavonoidov glede na masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin v posameznih frakcijah. Iz podanih rezultatov je razvidno, da so po fenolni sestavi vodne in 10 vol. % etanolne frakcije podobne vinu, saj prevladujejo flavonoidi (od 77 % do 86 % vseh fenolov), tanini so prisotni v manjši meri (31 % pa do 50 % vseh fenolov). Etanolne frakcije se odvisno od sorte razlikujejo.

Polifenole v vzorcih smo ovrednotili tudi tako, da smo jim z DPPH^{*} določili antioksidacijski potencial (AOP). Ugotovili smo, da reduciran DPPH^{*} absorbira svetlobo pri valovni dolžini 517 nm. Absorpcija je odvisna od medija (preglednica 25). Vendar pa je v vodi in citratnem pufru s pH 3,5 absorpcija minimalna, kar potem bistveno ne vpliva na rezultate meritev. Tudi DPPH^{*} odvisno od razredčitvenega medija absorbira svetlobo (preglednica 24).

Poleg tega smo pri optimizaciji metode ugotovili, da je reakcija med DPPH[•] in fenoli v vinu počasna (slika 18). Po 4 urah v vinu reagira približno 80 % DPPH[•], najpočasnejše reagira z neflavonoidnimi spojinami (preglednica 29). Merili smo tudi kinetiko standardov (slika 17, preglednica 29) in ugotovili, da najpočasneje reagira resveratrol, ki po 23 urah še vedno reducira DPPH[•]. Ravno tako počasi reagirata oenin klorid in cianidin klorid. Najhitreje reagirajo standardi, kot so galna kislina, rutin in kvercetin.

Iz literature je znano, da je v povezavi z večjo vsebnostjo skupnih fenolov značilno večji tudi antioksidacijski potencial vina (Fernández-Pachón in sod. 2004, Kovačič A., 2006). Ta korelacija je razvidna tudi iz naših rezultatov. S slike 14 in priloge B₁ je razvidno, da je antioksidacijski potencial vin sort modra frankinja in modri pinot največji in znaša 1540 in 1530 mg GAE/l. Nekoliko manjši je v vinu sorte cabernet sauvignon (1100 mg GAE/l). Delež AOP taninov v vinih znaša med 46 % do 56 %, delež AOP flavonoidov pa od 95 % do 96 %. Tako pri določanju AOP skupnih fenolov kot pri določanju AOP taninov in flavonoidov smo v etanolnih frakcijah v primerjavi z vini dobili najmanjše vrednosti (slike 14, 15, 16), medtem ko se AOP 10 vol. % etanolnih in vodnih frakcij ni dosti razlikoval od AOP vin. V teh frakcijah se AOP skupnih fenolov ohrani od 94 % do 99 %, flavonoidov od 84 % do 98 %, medtem ko se taninov ohrani nekoliko manj (58 % do 84 %). Najmanj taninov se ohrani pri sorti cabernet sauvignon (od 58 % do 60 %). Rezultate določanja AOP smo v preglednici 26 podali tudi glede na delež AOP taninov in flavonoidov v posameznih frakcijah. V vodnih in 10 vol. % etanolnih frakcijah prevladujejo flavonoidi (od 81 % pa do 95 %), tanini pripomorejo k AOP v manjši meri (32 % do 56 %). Tudi v etanolnih frakcijah je flavonoidov največ, taninov pa v primerjavi z drugimi frakcijami bistveno manj.

Navedena dejstva potrjujejo dobro povezavo med vrednotenjem fenolnih spojin v vinu z reagentom F.C. in določanjem AOP z DPPH[•]. Poudariti je treba, da je ta povezanost mišljena v relativnem smislu in ne v absolutnem smislu, saj po metodi določanja AOP z DPPH[•] dobimo v absolutnem smislu za približno 40 % manjše vrednosti.

Kljub splošni dobri korelaciji metod pa so se predvsem pri določanju taninskih in flavonoidnih fenolov pojavile razlike, saj smo z metodo AOP v vinih določili večji delež flavonoidov, v vodnih in 10 vol. % etanolnih frakcijah pa v primerjavi s prvotnim vinom manjši delež taninov. Tudi sestava etanolnih frakcij se nekoliko razlikuje. Po metodi določanja masne koncentracije z reagentom F.C. smo v etanolni frakciji sorte modra frankinja določili prevladujoč delež taninov (32 %) in približno enako zastopanost taninov (25 %) ter flavonoidov (21 %) pri sorti cabernet sauvignon (preglednica 21), medtem ko smo pri metodi določanja AOP z DPPH[•] v vseh treh frakcijah določili prevladujoč delež flavonoidov (preglednica 26).

Pri obeh metodah smo primerjali relativno napako znotraj ene ekstrakcije in relativno napako več ekstraktov ter vpliv obarjanja taninov in flavonoidov na velikost relativne napake. Tako pri eni kot pri drugi metodi smo prišli do zaključka, da ponovljivost ekstrakcije bistveno vpliva na napako, ponovljivost priprave vzorcev za določitev neflavonoidov in netaninov pa vpliva na relativno napako v manjši meri (preglednice 22, 23 in 27, 28). Kljub temu je bila opazna razlika med koeficienti variabilnosti znotraj ene ekstrakcije, saj je bila pri metodi določanja masne koncentracije fenolnih spojin z reagentom F.C. nekoliko boljša ponovljivost. Relativna napaka v nobenem primeru ni preseгла 10 %.

Glede na to, da je določanje AOP z DPPH^{*} relativno dolgotrajna analiza, da so bili pri tej metodi opaženi nekoliko večji koeficienti variabilnosti znotraj paralelk in da se lahko pojavi sistematična napaka zaradi absorpcije svetlobe (pri 517 nm) reduciranega DPPH^{*}, lahko trdimo, da je za vrednotenje fenolnih spojin v vinu metoda določanja masne koncentracije z reagentom F.C. primernejša.

Izbrane vzorce vin in njihove frakcije smo primerjali med sabo tudi z določanjem masne koncentracije antocianov, ki smo jo izrazili kot mg malvidin-3-monoglukozi na liter (slika 21, priloga C₁). Iz podanih rezultatov je razvidno, da vino sorte modra frankinja vsebuje 200 mg/l antocianov, vino sorte cabernet sauvignon 199 mg/l, vino sorte modri pinot pa jih vsebuje v najmanjši meri, in sicer 132 mg/l. Nekoliko presenetljiva so dejstva, da se s postopkom liofilizacije in ekstrakcije v nekaterih primerih vsebnost antocianov poveča. Najbolj izstopajo frakcije vina sorte cabernet sauvignon, saj vsebujejo kar za 28 % do 36 % večje masne koncentracije v primerjavi z izvornim vinom. Vino sorte cabernet sauvignon ima tudi veliko vsebnost taninov, ki se s postopkom liofilizacije in ekstrakcije bistveno zmanjša. Antociani se namreč vežejo s tanini v komplekse, ki pozitivno vplivajo na stabilnost barve vina. Opazili smo tudi, da je v frakcijah sorte cabernet sauvignon barva nekoliko manj stabilna. Čeprav je vsebnost stabilnih rdečih pigmentov enaka kot v vinu, se vsebnost rumeno-rjavih pigmentov poveča. Med postopkom liofilizacije in ekstrakcije morda prišlo do prehoda antocianov v prosto obliko. V literaturi (Margalit, 2004) smo našli dve možni razlagi. Kondenzirani tanini so polimeri flavonoidov, ki so vezani s C-C vezjo, in pod normalnimi pogoji ne hidrolizirajo zlahka. Prva možna razlaga je, da je zaradi znižanega pH-ja v liofilizatu prišlo do disociacije kondenziranih taninov, ki se lahko zaradi oksidacije pretvorijo v obarvane cianidine. Druga možna razlaga je lahko prisotnost proste oblike žveplovega dioksida v vinu, ki z antociani tvori brezbarvne produkte. Reakcija je reverzibilna. Možno je, da je z liofilizacijo prišlo do odcepa nukleofilne skupine SO₃⁻ in antociani so prešli v prosto obarvano obliko.

Masna koncentracija antocianov v posameznih frakcijah glede na prvotno vino je v veliki meri odvisna od sorte. Pri sorti vina modri pinot je glede na vino v etanolni frakciji 61 % manj antocianov, v 10 vol. % etanolni frakciji 5 % manj antocianov, v vodni frakciji pa 17 % več antocianov. V frakcijah sorte modra frankinja pa so antociani v primerjavi z vinom prisotni približno v enaki meri.

Izbranim vzorcem smo določili barvne parametre, kot so ton barve, intenziteta barve, delež rdeče barve ter delež barve pri valovnih dolžinah 420 nm, 520 nm in 620 nm, s katerimi lahko predvsem sklepamo na stabilnost barve oziroma na stabilnost fenolnih spojin, ki vinu dajejo barvo. Pri rdečih vinih so to predvsem antociani. Stabilne barve vin so rdeča, temno rdeča in oranžno rdeča barva (Košmerl in Kač, 2004).

V vinu sorte modri pinot je bila v primerjavi z drugimi vini opazna najmanjša vrednost tona barve (slika 22, priloga C₂). To pomeni, da ima vino sorte modri pinot večjo vsebnost stabilnih rdečih barvil v primerjavi z drugimi vini. Ravno nasprotno pa so imele njegove frakcije največjo vrednost tona barve. Iz tega lahko sklepamo, da postopek liofilizacije na barvo te sorte vina najbolj vpliva. To lahko potrdimo tudi z rezultati merjenja intenzitete barve (slika 23, priloga C₃), z rezultati merjenja deleža rdeče barve (slika 24, priloga C₄) in z določenim bistveno nižjim deležem barve pri 520 nm ter bistveno višjim deležem barve pri 420 nm frakcij v primerjavi s prvotnim vinom (sliki 25 in 26, prilogi C₅ in C₆). Pri etanolni frakciji modri pinot še posebej izstopa rezultat deleža barve pri valovni dolžini

620 nm, ki je bistveno višji v primerjavi z drugimi vzorci, kar nakazuje na prevladujoče odtenke modro-vijolične barve (slika 27, priloga C₇).

Vino sorte modra frankinja je ravno tako intenzivno obarvano kot vino sorte modri pinot (slika 23, priloga C₃). Vendar pa se pri tej sorti vina s postopkom liofilizacije intenzivnost barve najmanj zmanjša. Ton barve frakcij je celo nekoliko nižji v primerjavi s prvotnim vinom, kar pomeni, da se v frakcijah rdeči pigmenti malo bolj izrazijo v primerjavi z izvornim vinom (slika 22, priloga C₂). To potrjujejo tudi rezultati določanja deleža rdeče barve (slika 24, priloga C₄) in rezultati določanja deleža barve pri valovni dolžini 520 nm (slika 26, priloga C₆). Glede na vse določene barvne parametre, lahko zaključimo, da na barvo vina sorte modra frankinja liofilizacija nima bistvenega vpliva.

Pri sorti cabernet sauvignon je delež rdeče barve vina in posameznih frakcij približno enak. V primerjavi z vinom se delež rdeče barve posameznih frakcij zmanjša le za 0,8 % do 3,8 % (slika 24, priloga C₄). Ravno tako je zmanjšanje deleža barve pri valovni dolžini 520 nm minimalno (od 1,4 % do 0,4 %). Toda ton barve frakcij je v primerjavi z vinom večji za 12 % do 16 %, kar pomeni, da s postopkom liofilizacije nekoliko pridejo do izraza rumeno-rjavi pigmenti (slika 22, priloga C₂). To potrjuje tudi izmerjen delež barve frakcij pri valovni dolžini 420 nm, ki je od prvotnega vina večji za 11 % do 16 % (slika 25, priloga C₅). Na sliki 23 (priloga C₃) je očitno zmanjšanje intenzitete barve frakcij v primerjavi z vinom. Ker po liofilizaciji ostane delež rdeče barve enak, odtenki rumeno-rjavih barv pa se nekoliko zvečajo, je manjša intenzivnost barve posledica zmanjšanja intenzivnosti odtenka modro-vijolične barve, kar je razvidno s slike 27 in priloge C₇.

Iz vseh navedenih dejstev lahko zaključimo, da je vpliv postopka liofilizacije na barvo vina sortno pogojen. Splošno lahko trdimo samo, da se z liofilizacijo intenzivnost barve zmanjša, in sicer odvisno od posamezne frakcije. Intenzivnost barve je najmanjša pri etanolnih frakcijah, največja pa pri 10 vol. % etanolnih frakcijah. Vrednosti intenzitete barve vodnih frakcij so od 10 vol. % etanolnih frakcij manjše za 0,7 % do 21 %.

Vina in posamezne frakcije smo primerjali med sabo tudi s pomočjo tekočinske kromatografije. Ugotovili smo, da se 10 vol. % etanolne frakcije in vodne frakcije glede na vrsto polifenolnih snovi od izvornih vin bistveno ne razlikujejo, vendar pa so količinsko zastopane v nekoliko manjši meri (slike 28, 29, 30). V etanolnih frakcijah se glede na prvotno vino profil polifenolov nekoliko bolj spremeni. Tudi fenolne snovi so zastopane v bistveno manjši meri. S slik 28, 29 in 30 je tudi razvidno, da je zastopanost posameznih fenolov sortno pogojena.

S plinsko kromatografijo smo analizirali hlapne komponente v izbranih vzorcih (slike 31, 32, preglednica 30 in priloge E₁, E₂). Z liofilizacijo se je ohranila večina hlapnih komponent, vendar so bile z izjemo nekaterih prisotne v manjših koncentracijah kot v izvornem vinu. Opazne so bile bistvene razlike med 10 vol. % etanolno in vodno frakcijo, saj smo v vodni frakciji določili večjo koncentracijo komponent. To lahko razložimo z dejstvom, da so te komponente v vodi manj topne v primerjavi z manj polarnim 10 vol. % etanolom (Kralj Cigić in sod., 2007).

Po opravljenih kemijskih analizah smo na koncu izbrane vzorce še senzorično ocenili (slike 28, 29, 30 in 31, priloge D₁, D₂, D₃, D₄). Najboljše sta bili ocenjeni vini sort cabernet sauvignon in modra frankinja, in sicer s 86,75 točke. Vino modri pinot je dobilo nekoliko slabšo oceno (80). Po pričakovanjih je bila senzorično najslabše ocenjena rdeča zvrst

(63,75). Z liofilizacijo se je vrhunskim vinom kakovost bistveno poslabšala, medtem ko se je kakovost 10 vol. % etanolne frakcije rdeče zvrsti celo za malenkost povečala. Pri vseh sortah vin so bile vodne frakcije slabše ocenjene. Proces liofilizacije in ponovne ekstrakcije vrhunskih vin je najbolj vplival na okus. Izjemoma je 10 vol. % etanolna frakcija sorte modri pinot izgubila relativno več točk na videzu (16 % glede na videz vina) v primerjavi z okusom (7,8 % glede na okus vina). 10 vol. % etanolna frakcija rdeče zvrsti je več točk pridobila na videzu v primerjavi z izvornim vinom ter izgubila največ točk pri vonju (5 %). Okus je ostal enak. Senzorično smo zaznali izstopanje kisline. Okus bi lahko izboljšali z dodatkom sladkorja.

Iz tega lahko povzamemo, da vsebnost etanola bistveno vpliva na okus in da bolje kot je bilo ocenjeno izvorno vino, večje so bile izgube z liofilizacijo. Iz tega sledi, da bi bilo smiselno liofilizirati poceni rdeča zvrstna vina in pripraviti pijačo z nizko vsebnostjo alkohola ter z dodatkom sladkorja.

5.2 SKLEPI

- Po liofilizaciji enega litra rdečih vrhunskih vin sort modri pinot, modra frankinja in cabernet sauvignon smo dobili liofilizat z maso med 31,1 g do 35,0 g. Rdeča zvrst je po liofilizaciji vsebovala le 21,4 g, belo vino sorte rumeni muškata pa je zaradi velike vsebnosti sladkorja vsebovalo 123 g suhega preostanka.
- Z liofilizacijo izbranih vzorcev smo odstranili od 99,1 % do 99,8 % etanola ter 8 % do 17 % glicerola.
- Vina sorte modra frankinja in vino sorte modri pinot vsebujeta 2490 mg GAE/l in 2440 mg GAE/l skupnih polifenolov, vino sorte cabernet sauvignon 1860 mg GAE/l, rdeča zvrst 1130 mg GAE/l, belo vino rumeni muškata pa 507 mg GAE/l. Najmanj polifenolov se ekstrahira z etanolom (od 17 % do 55 %). Pri ekstrakciji z 10 vol. % etanolom in vodo se večina skupnih polifenolov ohrani (od 96,4 % do 91,4 %).
- Ugotovili smo, da glede na masno koncentracijo skupnih fenolov izbrana vina vsebujejo od 36 % do 50 % taninov ter 76 % do 86 % flavonoidov. Največ taninov vsebuje vino sorte cabernet sauvignon (50 %). V vodnih in 10 vol. % etanolnih frakcijah se večina taninskih in flavonoidnih polifenolov ohrani (82 %–96 %). Izjemoma je v vinu sorte cabernet sauvignon zastopanost taninov bistveno manjša (69 % in 62 %). Najmanj flavonoidov (3,9 %–12 %) in taninov (0,90 %–49 %) se ohrani v etanolnih frakcijah. Po fenolni sestavi so vodne in 10 vol. % etanolne frakcije podobne vinu, saj prevladujejo flavonoidi (od 77 % do 86 % vseh fenolov), tanini so prisotni v manjši meri (31 % do 50 % vseh fenolov).
- Reakcija med DPPH^{*} in fenoli v vinu in posameznih frakcijah je počasna. V primerjavi z vrednostmi, izmerjenimi po 23 urah, po 4 urah v vinu reagira približno 80 % fenolov. Najpočasnejše so neflavonoidne spojine. Med standardi počasi reagirajo resveratrol, oenin klorid in cianidin klorid. Hitreje reagirajo standardi, kot so galna kislina, rutin in kvercetin.
- Antioksidacijski potencial, izražen kot mg galne kisline na liter, vin sort modra frankinja in modri pinot znaša 1540 in 1530 mg GAE/l, vina sorte cabernet sauvignon pa 1100 mg GAE/l. Delež AOP taninov v vinih se giblje med 46 % in 56 %, delež AOP flavonoidov pa med 95 % in 96 %. V etanolnih frakcijah je AOP skupnih fenolov najmanjši (4,4 %–41 %). V vodnih in 10 vol. % etanolnih frakcijah se AOP skupnih fenolov in flavonoidov v večji meri ohrani (84 % do 99 %), medtem ko je AOP taninov nekoliko manjši (58 % do 84 %). To je bilo še posebej očitno pri sorti cabernet sauvignon (od 58 % do 60 %). V vodnih in 10 vol. % etanolnih frakcijah prevladujejo flavonoidi (od 81 % pa do 95 %), tanini pripomorejo k AOP v manjši meri (32 % do 56 %). V etanolnih frakcijah je zastopanost flavonoidov največja. Taninov je bistveno manj.

- Metoda določanja AOP je sorazmerno dobro korelirala z metodo določanja masne koncentracije skupnih fenolov. Kljub temu so se pri določanju taninskih in flavonoidnih fenolov pojavile razlike.
- Razlike med rezultati določanja AOP fenolov z DPPH[•] in masne koncentracije skupnih fenolov s F. C. so bile sledeče. Z metodo AOP smo v vinih določili večji delež flavonoidov, v vodnih in 10 vol. % etanolnih frakcijah pa v primerjavi s prvotnim vinom manjši delež taninov. Tudi pri določanju polifenolne sestave etanolnih frakcij smo dobili drugačne rezultate. Po metodi določanja masne koncentracije polifenolov z reagentom F.C. smo v etanolni frakciji sorte modra frankinja določili prevladujoč delež taninov, pri sorti cabernet sauvignon pa približno enako zastopanost taninov ter flavonoidov, medtem ko smo pri metodi določanja AOP z DPPH[•] v vseh treh frakcijah določili prevladujoč delež flavonoidov.
- Metoda ovrednotenja polifenolov vin s F.C. je primernejša od metode določanja AOP, saj je določanje AOP polifenolov z DPPH[•] relativno dolgotrajna analiza, pri kateri so bili opaženi nekoliko večji koeficienti variabilnosti znotraj paralelk in pri kateri se lahko zaradi absorpcije svetlobe reduciranega DPPH[•] pojavi sistematična napaka.
- Masna koncentracija antocianov, izraženih kot mg malvidin-3-monoglukoze na liter, vina sorte modra frankinja znaša 200 mg/l, vina sorte cabernet sauvignon 199 mg/l, vina sorte modri pinot pa 132 mg/l. Vsebnost antocianov je v veliki meri odvisna od sorte. Pri sorti vina cabernet se je s postopkom liofilizacije vsebnost antocianov povečala za 28 % do 36 %. To bi lahko bila posledica prehoda antocianov v prosto obliko zaradi zmanjšanja pH-ja v liofilizatu. Poleg tega pa je možno, da je prišlo do odcepa SO₃⁻ skupine, vezane na antociane, in s tem do ponovnega obarvanja antocianov.
- Vpliv liofilizacije na barvo rdečih vin je sortno pogojen. Vino sorte modri pinot ima večjo vsebnost stabilnih rdečih barvil v primerjavi z drugimi vini. Ravno nasprotno pa imajo posamezne frakcije te sorte najnižjo vsebnost stabilnih rdečih barvil. V etanolni frakciji prevladujejo odtenki modro-vijolične barve. Liofilizacija na barvo vina sorte modra frankinja ni imela bistvenega vpliva. Po liofilizaciji sorte cabernet sauvignon ostane delež rdeče barve enak, odtenki rumeno-rjavih barv pa se nekoliko zvečajo glede na zmanjšanje intenzivnosti odtenka modro-vijolične barve. Z liofilizacijo se intenzivnost barve zmanjša glede na sorto. Intenzivnost barve je najmanjša pri etanolnih frakcijah, največja pa pri 10 vol. % etanolnih frakcijah.
- Zastopanost posameznih fenolov je odvisna od sorte vina. 10 vol. % etanolne frakcije in vodne frakcije se glede na vrsto polifenolnih snovi od izvornih vin bistveno ne razlikujejo. V etanolnih frakcijah se glede na prvotno vino profil polifenolov nekoliko bolj spremeni. V 10 vol. % etanolnih frakcijah in vodnih

frakcijah se vsebnost polifenolov glede na prvotno vino nekoliko zmanjša. Najmanj polifenolov se ohrani v etanolnih frakcijah.

- Z liofilizacijo vin sort cabernet sauvignon in vin sorte modra frankinja se je ohranila večina hlapnih komponent. Z izjemo nekaterih so bile prisotne v manjših koncentracijah kot v izvornem vinu. Vodne frakcije so v primerjavi z 10 vol. % etanolnimi frakcijami vsebovale večjo koncentracijo hlapnih komponent, kar bi lahko bilo posledica manjše topnosti teh komponent v vodi.
- Bolje kot je bilo senzorično ocenjeno vino, večje so bile izgube z liofilizacijo. Po liofilizaciji in ponovni ekstrakciji se je vrhunskim vinom kakovost bistveno poslabšala, medtem ko se je kakovost 10 vol. % etanolne frakcije rdeče zvrsti celo za malenkost povečala. Proces liofilizacije in ponovne ekstrakcije vrhunskih vin najbolj vpliva na okus. Pri okušanju smo zaznali izrazito izstopanje kisline. Vsebnost etanola bistveno vpliva na kakovost vzorcev, saj so bile vodne frakcije najslabše ocenjene.

6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil pripraviti liofilizate rdečih vin sort modra frankinja, modri pinot in cabernet sauvignon. Poleg osnovnih vzorcev smo liofilizirali tudi rdečo zvrst in vrhunsko belo vino rumeni muškat. Z etanolom, 10 vol. % etanolom in vodo smo pripravili ekstrakte z enako koncentracijo suhe snovi, kot jo je imelo prvotno vino. Ugotoviti smo morali, ali se pripravljene frakcije razlikujejo med sabo in od prvotnega vina.

Po liofilizaciji vin smo dobili liofilizate z maso med 21,4 g/l do 35 g/l. Izjemoma je belo vino sorte rumeni muškat vsebovalo 123 g/l suhe snovi. Najmanj ekstrakta smo po liofilizaciji dobili pri rdeči zvrsti. Z liofilizacijo smo odstranili etanol, tako da ga je ostalo le od 0,9 % do 0,2 %. Vsebnost glicerola smo z liofilizacijo v večini ohranili.

Spektrofotometrično smo določili masno koncentracijo skupnih fenolnih snovi v vinih in posameznih frakcijah. Vsebnosti masnih koncentracij v izbranih vrhunskih vinih so se gibale med 1860 mg GAE/l do 2490 mg GAE/l. Rdeča zvrst je vsebovala bistveno manjše koncentracije polifenolov (1130 mg GAE/l). Belo vino je skupnih fenolov vsebovalo 507 mg GAE/l. Najmanj polifenolov se je ekstrahiralo z etanolom, v 10 vol. % etanolu in vodi pa je bila masna koncentracija polifenolov skoraj enaka izvornim vinom. V vinih so prevladovali flavonoidi (76 %–96 %), tanini so bili prisotni v manjši meri (36 %–50 %). V 10 vol. % etanolu in vodi je v večini masna koncentracija taninskih in flavonoidnih fenolov ostala enaka koncentraciji izvornega vina. Izjema so bile 10 vol. % etanolne in vodne frakcije sorte cabernet sauvignon, kjer so bili tanini glede na izvorno vino prisotni v bistveno manjši meri. Najmanj polifenolov se je ekstrahiralo z etanolom. Glede na vrsto polifenolnih snovi so bile 10 vol. % etanolne in vodne frakcije podobne vinu, medtem ko so bile odvisno od sorte etanolne frakcije različne.

Vinom in frakcijam smo s pomočjo DPPH^{*} določili tudi AOP. Ugotovili smo, da DPPH^{*} absorbira svetlobo v odvisnosti od medija. Tudi reduciran DPPH^{*} absorbira svetlobo, kar lahko potem vpliva na sistematično napako meritev. V vodi in citratnem pufri s pH 3,5 je bila absorpcija minimalna. Presenetljiva je bila tudi ugotovitev, da po 4 urah z DPPH^{*} reagira le približno 80 % fenolov v vinih in posameznih frakcijah. Najpočasneje so reagirale neflavoidne spojine. Antioksidacijski potencial, izražen kot mg galne kisline na liter, vin sort modra frankinja in modri pinot je znašal 1540 mg GAE/l in 1530 mg GAE/l, vina sorte cabernet sauvignon pa 1100 mg GAE/l. Čeprav je metoda določanja AOP sorazmerno dobro korelirala z metodo določanja masne koncentracije skupnih fenolov, so se pri določanju taninskih in flavonoidnih fenolov pojavile razlike.

Glede na to, da je določanje AOP polifenolov z DPPH^{*} relativno dolgotrajna analiza, pri kateri so bili opaženi nekoliko večji koeficienti variabilnosti znotraj paralelk in pri kateri se lahko zaradi absorpcije svetlobe reduciranega DPPH^{*} pojavi sistematična napaka, smo prišli do sklepa, da je metoda določanja masne koncentracije fenolnih snovi z reagentom F.C. za določanje polifenolov v vinu primernejša.

Razlike med vsebnostjo polifenolov v vinih in posameznih frakcijah smo ugotavljali tudi z visokotlačno tekočinsko kromatografijo. Ugotovili smo, da se glede na vrsto polifenolnih snovi 10 vol. % etanolne frakcije in vodne frakcije od prvotnih vin bistveno ne razlikujejo, le vsebnost polifenolov glede na vino se nekoliko zmanjša. Večje razlike glede na vsebnost in profil polifenolnih snovi so bile opažene pri etanolnih frakcijah.

Spektrofotometrično smo določili tudi vsebnost antocianov in barvne parametre, ki so v veliki meri odvisni od sorte. Pri sorti vina cabernet se je s postopkom liofilizacije vsebnost antocianov povečala, kar je lahko posledica prehoda antocianov v prosto obliko. Največjo vsebnost stabilnih rdečih barvil je vsebovalo vino sorte modri pinot, medtem ko so imele posamezne frakcije te sorte najnižjo vsebnost stabilnih rdečih barvil. Na sorto modra frankinja liofilizacija ni bistveno vplivala. Pri sorti cabernet sauvignon je ostal delež rdeče barve enak, odtenki rumeno-rjavih barvil pa so se povečali.

Ne glede na sorto se je z liofilizacijo intenzivnost barve zmanjšala.

S plinsko kromatografijo smo določili hlapne komponente vin in posameznih frakcij sort cabernet sauvignon in sort modra frankinja. Z liofilizacijo se je ohranila večina hlapnih komponent, vendar v manjših koncentracijah kot v izvornem vinu. V vodnih frakcijah smo določili večjo koncentracijo hlapnih komponent kot z 10 vol. % etanolom.

Na koncu smo opravili še senzorično oceno vin in ugotovili, da vsebnost etanola bistveno vpliva na senzorično oceno. Vodne frakcije so bile namreč najslabše ocenjene. Kakovostni razred liofilizatov je bil bistveno slabši od izvornih vrhunskih vin. Pri rdeči zvrsti se je kakovost z liofilizacijo in ponovno ekstrakcijo v 10 vol. % etanolu celo povečala. Pri vseh 10 vol. % etanolnih in vodnih rekonstituiranih liofilizatih smo zaznali izstopanje kisline, kar bi lahko izboljšali z dodatkom sladkorja. Glede na dobljene rezultate senzorične analize bi bilo smiselno liofilizirati cenejša namizna rdeča vina in pripraviti pijačo z nizko vsebnostjo alkohola ter z dodatkom sladkorja.

Raziskave bi bilo torej potrebno nadaljevati v tej smeri, saj je evropski trg prenasičen z vini nižje kakovosti. Ta vina bi lahko uporabili za pripravo nizkoalkoholne pijače s povečano vsebnostjo fenolnih snovi.

7 VIRI

Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi dnevi 2000, Portorož, 26-27 okt. 2000. Žlendar B., Gašparin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23–27

Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmaceutski vestnik, 48: 573–589

Barra S., Franceschi S., Negri E., Talamini R., La Vecchia C. 1990. Type of alcoholic beverage and cancer of the oral cavity, pharynx and oesophagus in an Italian area with high wine consumption. *International Journal of Cancer*, 46, 1017–1020

Beral V, Hamajima N, Hirose K, Rohan T, Calle E.E., Heath C.W., Coates R.J., Liff J.M., Talamini R., Chantarakul N., Koetsawang S., Rachawat D., Morabia A., Schuman L., Stewart W., Szklo M., Bain C., Schofield F., Siskind V., Band P., Coldman A.J., Gallagher R.P., Hislop T.G., Yang P., Kolonel L.M., Nomura A.M.Y., Hu J., Johnson K.C., Mao Y., De Sanjose S., Lee N., Marchbanks P., Ory H.W., Peterson H.B., Wilson H.G., Wingo P.A., Ebeling K., Kunde D., Nishan P., Hopper J.L., Colditz G., Gajalakshmi V., Martin N., Pardthaisong T., Solpisornkosol S., Theetranont C., Boosiri B., Chutivongse S., Jimakorn P., Virutamasen P., Wongsrichanalai C., Ewertz M., Adami H.O., Bergkvist L., Magnusson C., Persson I., Chang-Claude J., Paul C., Skegg D.C.G., Spears G.F.S., Boyle P., Evstifeeva T., Daling J.R., Hutchinson W.B., Malone K., Noonan E.A., Stanford J.L., Thomas D.B., Weiss N.S., White E., Andrieu N., Bremond A., Clavel F., Gairard B., Lansac J., Piana L., Renaud R., Izquierdo A., Viladiu P., Cuevas H.R., Ontiveros P., Palet A., Salazar S.B., Arsitizabal N., Cuadros A., Tryggvadottir L., Tulinius H., Bachelot A., Le M.G., Peto J., Franceschi S., Lubin F., Modan B., Ron E., Wax Y., Friedman G.D., Hiatt R.A., Levi F., Bishop T., Kosmelj K., Primic-Zakelj M., Ravnihar B., Stare J., Beeson W.L., Fraser G., Bulbrook R.D., Cuzick J., Duffy S.W., Fentiman I.S., Hayward J.L., Wang DY, McMichael AJ, McPherson K, Hanson RL, Leske MC, Mahoney MC, Nasca P.C., Varma A.O., Weinstein A.L., Moller T.R., Olsson H., Ranstam J., Goldbohm R.A., van den Brandt P.A., Apelo R.A., Baens J., de la Cruz J.R., Javier B., Lacaya L.B., Ngelangel C.A., La Vecchia C., Negri E., Marubini E., Ferraroni M., Gerber M., Richardson S., Segala C., Gatei D., Kenya P., Kungu A., Mati J.G., Brinton L.A., Hoover R., Schairer C., Spirtas R., Lee H.P., Rookus M.A., van Leeuwen F.E., Schoenberg J.A., McCredie M., Gammon M.D., Clarke E.A., Jones L., Neil A., Vessey M., Yeates D., Appleby P., Banks E., Bull D., Crossley B., Goodill A., Green J., Hermon C., Key T., Langston N., Lewis C., Reeves G., Collins R., Doll R., Peto R., Mabuchi K., Preston D., Hannaford P., Kay C., Rosero-Bixby L., Gao Y.T., Jin F., Yuan J.M., Wei H.Y., Yun T., Zhiheng C., Berry G., Cooper Booth J., Jelichovsky T., MacLennan R., Shearman R., Wang Q.S., Baines C.J., Miller A.B., Wall C., Lund E., Stalsberg H., Shu X.O., Zheng W.,

Katsouyanni K., Trichopoulou A., Trichopoulos D., Dabancens A., Martinez L., Molina R., Salas O., Alexander X.E., Anderson K., Folsom A.R., Hulka B.S., Bernstein L., Enger S., Haile R.W., Paganini-Hill A., Pike M.C., Ross R.K., Ursin G., Yu M.C., Longnecker M.P., Newcomb P., Bergkvist L., Kalache A., Farley T.M.M., Holck S. 2002. Alcohol, tobacco and breast cancer-collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58515 women with breast cancer and 95067 women without the disease. *British Journal of Cancer*, 87: 1234–1245

Borman S. 2005. Anticancer agents found in aged wine: Compounds from oak casks react with wine components to form topoisomerase II. Inhibitors. *Science & Technology*, 31: 36–36

Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 28: 25–30

Brivida K., Sies H. 1994. Nonenzymatic antioxidant defence system. V: *Natural antioxidants in human health and disease*. Feri B. (ed.). San Diego, Academic Press: 107–128

Burton G.W., Ingold K.U. 1989. Mechanism of antioxidant action: Preventive and chain-breaking antioxidants. V: *Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine*. Miquel J. (ed.). Boca Raton, CRC: 29–43

Caen J., Brun S. 1994. Vino in zdravje: Biologija in patologija ožilja. Francoski nacionalni program. V: *Vino in zdravje*, Celje, 9–10 nov. 1994. Ljubljana, Inštitut za higieno, Medicinske fakultete Ljubljana, Celje, Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 19–19

Chan M.M. 2002. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. *Biochemical Pharmacology*, 63: 99–104

Cushnie T.P.T., Lamb A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. 2005. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26: 343–356

Damianaki A., Bakogeorgou E., Kampa M., Notas G., Hatzoglou A., Panagiotou S., Gemetzi C., Kouroumalis E., Martin P.M., Castanas E. 2000. Potent inhibitory action of red wine polyphenols on human breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 78: 429–441

Določanje polifenolov: celokupni, taninski, netaninski. Spektrofotometrična metoda. M 06-5206. 1995. Ljubljana, Kemijski inštitut: 3–3

Falcao J.M., Dias J.A., Miranda A.C., Leitao C.N., Lecerda M.M., da Motta L.C. 1994. Red wine consumption and gastric cancer in Portugal: a Case-control study. *European Journal of Cancer Prevention*, 3, 269–276

- Fantinelli J.C., Schinella G., Cingolani H.E., Mosca S.M. 2005. Effects of different fractions of a red wine non-alcoholic extract on ischemia-reperfusion injury. *Life Science*, 76: 2721–2733
- Fernández-Pachón M.S., Villaño D., García-Parrilla M.C., Troncoso A.M. 2004. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta*, 513: 113–118
- Frémont L. 2000. Biological effects of resveratrol. *Life Science*, 66, 8: 663–673
- Frémont L., Belguendouz L., Delpal S. 1999. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. *Life Science*, 64, 26: 2511–2521
- German J.B., Walzem R.L. 2000. The health benefits of wine. *Annual Review of Nutrition*, 20: 561–593
- Goldberg D.M., Garovic-Kocic V., Diamandis E.P., Pace-Asciak C.R. 1996. Wine: does the colour count? *Clinica Chimica Acta*, 246: 183–193
- Halliwell B. 2007. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research*, 73: 341–347
- Halliwell B. 2006. Polyphenols: antioxidants treats for healthy living or covert toxins? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86: 1992–1995
- Huang M.T., Wood A.W., Newmark H.L. 1983. Inhibition of mutagenicity of bay'region diol'epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids. *Carcinogenesis*, 4: 1631–1637
- Jensen O.M., Paine S.L.; McMichael A.J., Ewertz M. 1996. Alcohol. V: Cancer epidemiology and prevention. 2nd ed. Schottenfeld D., Fraumeni Jr. J. F. (eds.). New York, Oxford University Press: 290–318
- Jovanic S.V., Steenken S., Simic, M.G. Hara, Y. 1997. Antioxidant properties of flavonoids: Reduction potentials and electron transfer reactions of flavonoid radicals, V: Flavonoids in health and disease. Rice-Evens C.A., Packer. L. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc., s.: 137–161
- Kanner J., Frankel E.N., Granit R., German J.B., Kinsella J.E. 1994. Natural antioxidants in grapes and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 64–69
- Kapš P. 1997. *Vino in zdravje*. Novo mesto, Erro: 165 str.

Kemija: [leksikon]. 2004. Tržič, Učila international: 441 str.

Kennedy J., Ferrier J., Harbertson J., Peyrot des Gachons C. 2006. Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 481–485

Kerry L. N., Abbey M. 1997. Red wine and fractionated phenolic compounds prepared from red wine inhibit low density lipoprotein oxidation in vitro. *Atherosclerosis*, 135: 93–102

Klatsky A.L., Armstrong M.A., Friedman G.D. 1997. Red wine, white wine, liquor, beer and risk for coronary artery disease hospitalization. *American Journal of Cardiology*, 80: 416–420

Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi 2000, Portorož, 26. in 27. okt., 2000. Žlender B., Gašperlin L.(ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11–21

Košmerl T. 2004. Postopki čiščenja, nege in stekleničenja vina: laboratorijske vaje za predmet Enologija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 43 str.

Košmerl T. 2005. Senzorične lastnosti mošta in vina: študijsko gradivo za pokaševalce vina, mošta in drugih proizvodov iz grozdja in vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 str.

Košmerl T., Vrhovšek U., Wondra M. Alkohol in rakava obolenja: Se vino razlikuje od ostalih alkoholnih pijač? V: *Karcinogene in antikarcinogene komponente v živilih*. 24. Bitenčevi živilski dnevi 2006, Ljubljana, 9-10 nov. 2006. Gašperlin L., Žlender B.(ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 149–156

Košmrel T., Kač M. 2004. Osnove kemijske analize mošta in vina. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97–106

Kovačič A. 2006. Vpliv dodatka enoloških sredstev na antioksidativno stabilnost vina sorte modri pinot. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 53 str.

Kralj Cigić I., Miklavčič A., Košmerl T., Cigić B. 2007. Influence of freeze drying on the wine aroma. V: *15th International Symposium "Spectroscopy in Theory and Practice"*, Nova Gorica, Slovenija, 18-21 April 2007, Book of abstracts. Nova Gorica, Univerza: 90–90

- Lattanzio V., De Cicco V., Di Venere D., Lima G., Salerno M. 1994. Antifungal activity of phenolics against fungi commonly encountered during storage. *Italian Journal of Food Science*, 1: 23–30
- Longnecker M.P. 1994. Alcoholic beverage consumption in relation to risk of breast-cancer-metaanalysis and review. *Cancer Causes and Control*, 5, 1: 73–82
- López-Vélez M., Martínez-Martínez F., Del Valle-Ribes C. 2003. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 3: 233–244
- Macheix J., Fleuriet A., Billot J. 1990. Fruit phenolics. Florida, CRC Press: 378 str.
- Margalit Y. 2004. Concepts in wine chemistry. San Francisco, Wine Appreciation Guild: 476 str.
- Marić V. 1996. Priprava in ohranjanje biotehnoloških proizvodov. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 397–409
- Milner J.A., McDonald S.S., Anderson D.E., Greenwald P. 2001. Molecular targets nutrients involved with cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 41: 1–16
- Molyneux P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211–219
- Morris Brown L. 2005. Epidemiology of alcohol-associated cancers. *Alcohol*, 25: 161–168
- Naravoslovje. 1996. Ljubljana, Cankarjeva založba: 700 str.
- Nemanič J. 1999. Spoznajmo vino. Ljubljana, Kmečki glas: 199 str.
- Nemanič J., Kocijančič M., Resnik M., Žnidaršič-Pogranc V. 1997. Novi trendi v predelavi rdečega grozdja. V: *Moderne tehnologije predelave in kakovosti živil*. 18. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana 12. in 13. julij 1997. Žlender B., Gašperlin L., Hočvar I. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 199–209
- Neuhouser M.L. 2004. Dietary flavonoids and cancer risk: Evidence from human population studies. *Nutrition and Cancer*, 50: 1–7
- O.I.V. 1998. Code international des pratiques oenologiques. Paris, O.I.V.: 98 str.
- Ough C.S., Amerine M.A. 1988. Method for analysis of musts and wines. 2nd ed. New York, John Wiley & Sons: 377 str.

Pace-Asciak C.R., Hahn S., Diamandis E.D., Soleas G., Goldberg D.M. 1995a. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. *Clinica Chimica Acta*, 235: 207–219

Pace-Asciak C.R., Rounova O., Hahn S.E., Diamandis E.P., Goldberg D.M. 1995b. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clinica Chimica Acta*, 246: 163–182

Pattichis K., Louca L.L., Jarman J., Sandler M., Glover V. 1995. 5-hydroksitryptamine release from platelets by different red wines: implication for migraine. *European Journal of Pharmacology*, 292: 173–177

Plahuta P. 2004. Veliki vinski leksikon. Ljubljana, Mladinska knjiga: 515 str.

Podlogar A. 2007. Ohranjanje antioksidativnih lastnosti rdečih vin. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 55 str.

Radovič T. 2002. Študija antioksidativnih in prooksidativnih lastnosti galne kisline. Diplomsko delo. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 50 str.

Renaud S.C., Ruf J.C. 1996. Effects of alcohol on platelet function. *Clinica Chimica Acta*, 246: 77–89

Referenčne vrednosti za vnos hranil. 2004. 1. izdaja. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje, Littera picta d.o.o: 215 str.

Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2000. Handbook of enology Vol. 2: The chemistry of wine stabilization and treatments. Paris, Dunod: 404 str.

Shahidi F., Naczki M. 1995. Antioxidant properties of food phenolics. V: Food phenolics: sources, effects, applications. Shahidi F., Naczki M. (eds.). Lancaster, Pennsylvania, USA, Technomic Publishing Company: 235–237

Soleas J.G., Diamandis E.P., Golberg D.M. 1997. Wine a biological fluid: History, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11: 287–313

Soleas J.G., Grass L., Josephy D.P., Goldberg D.M., Diamandis P. E. 2002. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clinical Biochemistry*, 35: 119–124

Šikovec S. 1996. Vino, pijača doživetja. Ljubljana, Kmečki glas: 321 str.

Thun M.J., Peto R., Lopez A.D., Monaco J.H., Henley S.J., Heath C.W., Doll R. 1997. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly US adults. *New England Journal of Medicine*, 337, 24: 1705–1714

Tomera J.F. 1999. Current knowledge of the health benefits and disadvantage of wine consumption. *Food Science & Technology*, 10: 129–138

Van Golde P.H., Lisette M.S., Vermeulen W.P., Wienders P.M.J., Hart H.C., Bouma B.N., Van der Wiel A. 1999. The role of alcohol in the anti low density lipoprotein oxidation activity of red wine. *Atherosclerosis*, 147, 2: 365–370

Van Golde P.H., Van der Westelaken M., Bouma B.M., Van de Wiel A. 2004. Characteristics of piraltin, a polyphenol concentrate, produced by freeze-drying of red wine. *Life Science*, 74: 1159–1166

Vertuani S., Angusti A., Manfredini S. 2004. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 1677–1694

Vrhovšek U. 1996. Fenoli kot antioksidanti v vinu. V: Zbornik referatov 1. slovenskega vinogradniško-vinarskega kongresa, Portorož od 4. do 6. decembra 1996. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas: 24–134

Vrhovšek U., Eder R., Wendelin S. 1997. Resveratrol – antioksidant v vinu. V: Tehnologija – hrana – zdravje. 1. slovenski kongres o hrani in prehrani z mednarodno udeležbo, Bled, 21-25 april, 1996. Knjiga del: Vol 2. Raspor P., Pitako D., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih delavcev Slovenije: 635–643

Vrščaj Vodošek T., Košmerl T. 2005. Določanje barvnih parametrov fenolnih spojin med maceracijo rdeče drozge. V: Slovenski kemijski dnevi 2005, Maribor, 22. in 23. september 2005. Glavič P., Brodnjak-Vončina D. (ur.). Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru: 10 str.

Wantke F., Gotz M., Jarusch R. 1996. Histamine in wine. Bronchoconstriction after a double-blind placebo-controlled red wine provocation test. *International Archives of Allergy and Immunology*, 110: 397–400

Woraratphoka J., Intarapichet K., Indrapichate K. 2006. Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from the northeast of Thailand. *Food Chemistry*, 104: 1485–1490

Yamamoto H., Ogawa T. 2002. Antimicrobial activity of perilla seed polyphenols against oral pathogenic bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66, 4: 921–924

Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump B. H., Nury F. S. 1994. Wine analysis and production. New York, Chapman & Hall: 89–151

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Blažu Cigiću za strokovno pomoč in usmerjanje pri nastajanju diplomske naloge. Pri raziskovalnem delu je spodbujal kritično razmišljanje in me navdušil za raziskovalno delo. Skratka, zahvaljujem se mu za ves vložen trud, saj brez njega tako zastavljene in tako napisane diplomske naloge ne bi bilo.

Najlepša hvala somentorci doc. dr. Tatjani Košmerl in recenzentu doc. dr. Mojmirju Wondri za strokovni pregled diplomske naloge.

Za pomoč pri delu v laboratoriju se zahvaljujem osebju Katedre za kemijo, še posebno Mateji Vidmar.

Dr. Tomažu Polaku se zahvaljujem za pomoč pri določanju fenolov vin in rekonstituiranih liofilizatov s tekočinsko kromatografijo, dr. Emilu Zlatiču pa za pomoč pri liofilizaciji.

Najlepša hvala dr. Ireni Kralj Cigić za pomoč pri določanju hlapnih komponent vin in rekonstituiranih liofilizatov s plinsko kromatografijo. Posebej se ji zahvaljujem, ker mi je omogočila sodelovanje pri objavi posterja na mednarodnem simpoziju v Novi Gorici.

Za senzorično analizo se zahvaljujem doc. dr. Tatjani Košmerl, doc. dr. Mojmirju Wondri, prof. dr. Marjanu Simčiču in doc. dr. Rajku Vidrihu.

Andreju Kocjančiču se zahvaljujem za pomoč pri oblikovanju diplomske naloge in moralno podporo.

Posebna zahvala je namenjena mojim staršem. Hvala za vso podporo tekom študija.

PRILOGE

Priloga A₁: Rezultati določanja skupnih fenolnih spojin v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

Vzorci	povprečna koncentracija (mg GAE/l)	standardna.deviacija (mg GAE/l)	KV (%)
modri pinot: vino	2490	65	2,6
modri pinot: etanolna frakcija	420	44	10
modri pinot: 10 vol. % etanolna frakcija	2330	120	5,2
modri pinot: vodna frakcija	2400	44	1,8
modra frankinja: vino	2440	73	3
modra frankinja: etanolna frakcija	1330	44	3,3
modra frankinja: 10 vol. % etanolna frakcija	2330	87	3,7
modra frankinja: vodna frakcija	2290	110	4,9
cabernet sauvignon: vino	1860	41	2,2
cabernet sauvignon: etanolna frakcija	862	13	3,3
cabernet sauvignon: 10 vol. % etanolna frakcija	1790	50	2,8
cabernet sauvignon: vodna frakcija	1700	96	5,6

Priloga A₂: Rezultati določanja netaninskih fenolov v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

	vino (mg GAE/l)	etanolna frakcija (mg GAE/l)	10 vol. % etanolna frakcija (mg GAE/l)	vodna frakcija (mg GAE/l)
modri pinot	1600	412	1600	1610
modra frankinja	1560	902	1490	1480
cabernet sauvignon	938	650	1150	1130

Priloga A₃: Rezultati določanja neflavonoidnih fenolov v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

	vino (mg GAE/l)	etanolna frakcija (mg GAE/l)	10 vol. % etanolna frakcija (mg GAE/l)	vodna frakcija (mg GAE/l)
modri pinot	357	337	450	421
modra frankinja	598	1140	709	646
cabernet sauvignon	338	683	411	364

Priloga B₁: Rezultati določanja antioksidacijskega potenciala skupnih fenolnih spojin v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

Vzorci	povprečna koncentracija (mg GAE/l)	standardna.deviacija (mg GAE/l)	KV (%)
modri pinot: vino	1540	15	0,94
modri pinot: etanolna frakcija	131	9,3	7,2
modri pinot: 10 vol. % etanolna frakcija	1450	67	4,6
modri pinot: vodna frakcija	1490	150	9,8
modra frankinja: vino	1530	65	4,2
modra frankinja: etanolna frakcija	632	13	2,1
modra frankinja: 10 vol. % etanolna frakcija	1520	26	1,7
modra frankinja: vodna frakcija	1460	84	5,8
cabernet sauvignon: vino	1100	49	4,4
cabernet sauvignon: etanolna frakcija	388	23	5,9
cabernet sauvignon: 10 vol. % etanolna frakcija	1080	61	5,7
cabernet sauvignon: vodna frakcija	1030	108	10

Priloga B₂: Rezultati določanja antioksidacijskega potenciala netaninskih fenolov v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

	vino (mg GAE/l)	etanolna frakcija (mg GAE/l)	10 vol. % etanolna frakcija (mg GAE/l)	vodna frakcija (mg GAE/l)
modri pinot	832	100	939	1010
modra frankinja	809	541	916	881
cabernet sauvignon	484	330	715	675

Priloga B₃: Rezultati določanja antioksidacijskega potenciala neflavonoidnih fenolov v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

	vino (mg GAE/l)	etanolna frakcija (mg GAE/l)	10 vol. % etanolna frakcija (mg GAE/l)	vodna frakcija (mg GAE/l)
modri pinot	66,6	59,3	67,8	115
modra frankinja	71,1	74,3	81,5	114
cabernet sauvignon	59,0	40,0	60,0	151

Priloga C₁: Rezultati določanja masne koncentracije antocianov v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

	vino (mg GAE/l)	etanolna frakcija (mg GAE/l)	10 vol. % etanolna frakcija (mg GAE/l)	vodna frakcija (mg GAE/l)
modri pinot	132	51	125	155
modra frankinja	200	208	191	198
cabernet sauvignon	199	255	271	270

Priloga C₂: Rezultati določanja tona barve v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

	vino	etanolna frakcija	10 vol. % etanolna frakcija	vodna frakcija
modri pinot	0,479	0,974	0,926	0,926
modra frankinja	0,715	0,658	0,680	0,604
cabernet sauvignon	0,685	0,798	0,777	0,767

Priloga C₃: Rezultati določanja intenzitete barve v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

	vino	etanolna frakcija	10 vol. % etanolna frakcija	vodna frakcija
modri pinot	12,4	1,31	6,00	5,96
modra frankinja	12,3	4,97	10,1	9,38
cabernet sauvignon	11,5	2,75	8,00	6,34

Priloga C₄: Rezultati določanja deleža rdeče barve v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih

	vino	etanolna frakcija	10 vol. % etanolna frakcija	vodna frakcija
modri pinot	70,5	26,6	42,7	43,4
modra frankinja	51,7	57,6	54,3	58,5
cabernet sauvignon	52,3	51,9	50,3	51,1

Priloga C₅: Rezultati določanja deleža barve v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih pri valovni dolžini 420 nm

	vino	etanolna frakcija	10 vol. % etanolna frakcija	vodna frakcija
modri pinot	30,1	39,5	43,1	43,4
modra frankinja	36,4	35,6	35,5	33,0
cabernet sauvignon	35,1	40,7	39,0	38,8

Priloga C₆: Rezultati določanja deleža barve v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih pri valovni dolžini 520 nm

	vino	etanolna frakcija	10 vol. % etanolna frakcija	vodna frakcija
modri pinot	62,9	40,5	46,6	46,9
modra frankinja	50,8	54,1	52,2	54,7
cabernet sauvignon	51,2	51,0	50,1	50,5

Priloga C₇: Rezultati določanja deleža barve v vinu in v rekonstituiranih liofilizatih pri valovni dolžini 620 nm

	vino	etanolna frakcija	10 vol. % etanolna frakcija	vodna frakcija
modri pinot	7,04	20,0	10,3	9,64
modra frankinja	12,8	10,3	12,3	12,3
cabernet sauvignon	13,8	8,4	10,9	10,7

Priloga D₁: Rezultati senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizatov sorte modri pinot

	videz	vonj	okus	skupaj
modri pinot: vino	11	24,25	44,75	80
modri pinot: 10 vol. % etanolna frakcija	9,25	21,25	41,25	71,75
modri pinot: vodna frakcija	10,25	19,75	34	64

Priloga D₂: Rezultati senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizatov sorte modra frankinja

	videz	vonj	okus	skupaj
modra frankinja: vino	13	25,5	48,25	86,75
modra frankinja: 10 vol. % etanolna frakcija	10,75	22	41	73,75
modra frankinja: vodna frakcija	10,75	19	34,75	64,5

Priloga D₃: Rezultati senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizatov sorte cabernet sauvignon

	videz	vonj	okus	skupaj
cabernet sauvignon: vino	13,5	25	48,25	86,75
cabernet sauvignon: 10 vol. % etanolna frakcija	13	22,75	41,75	77,5
cabernet sauvignon: vodna frakcija	11	19,25	35	65,25

Priloga D₄ : Rezultati senzorične analize vina in rekonstituiranih liofilizatov rdeče zvrsti

	videz	vonj	okus	skupaj
rdeča zvrst: vino	8,75	20	35	63,75
rdeča zvrst: 10 vol. % etanolna frakcija	10	19	34,875	63,875
rdeča zvrst: vodna frakcija	8,25	17,25	31	56,5

Priloga E₁: Relativne vrednosti hlapnih komponent vin sort modra frankinja in cabernet sauvignon

t_R	glavne komponente	modra frankinja	cabernet sauvignon
8,546	ogljikov disulfid	1,0	3,6
8,911	neidentificirane komponente z m/z 43, 45, 60 in 76	5,2	10
10,608	etil acetat	51	38
14,534	1,1-dietoksi etan	0,9	1,9
15,291	3-metil 1-butanol	100	100
16,207	2-metil etil ester propanojske kisline	0,8	0,4
18,157	etilni ester butanojske kisline ali 2,3-butandiol	2,2	0,8
19,293	2-hidroksi etilni ester propanojske kisline	2,2	6,6
20,272	3-metil etilni ester butanojske kisline	0,7	0,5
20,978	metoksi-fenil oksim ali 3-etil 2-pentanol	0,8	0,7
21,118	1-heksanol	7,7	6,0
21,364	3-metil acetat 1-butanol	14	11,4
21,471	2-metil acetat 1-butanol	1,0	0,2
21,638	2-metil acetat 1-butanol	0,4	0,6
24,955	heksanojska kislina	0,5	0,5
26,330	etilni ester heksanojske kisline ali diacetat 1,3-propandiol	4,8	5,7
26,848	butirolakton	0,8	0,6
27,672	benzaldehyd	7,0	2,7
32,403	oktanojska kislina	0,5	0,5
33,474	feniletil alkohol	10	22
34,020	dietilni ester butandiojske kisline	1,4	5,0

Priloga E₂: Prisotnost hlapnih komponent v vinih in liofilizatih vin sort cabernet sauvignon (C) in modra frankinja (F).

t_r	komponente	C vino	C liofilizat	F vino	F liofilizat
6,086	etanol	+	+	+	+
8,546	ogljikov disulfid	+	+	+	+
8,911	neidentificirane komponente z m/z 43,45,60 in 76	+		+	
9,494	očetna kislina		+		+
10,111	2,3-butandion ali 2-pentanon		+		+
10,608	etil acetat	+	+	+	+
10,884	2-metil 1-propanol ali 2-metil propanojska kislina		+		+
14,534	1,1-dietoksi etan	+	+	+	+
14,924	2,4,5-trimetil 1,3-dioksolan	+	+	+	+
15,291	3-metil 1-butanol	+	+	+	+
16,207	2-metil etil ester propanojske kisline	+		+	
16,381	2-heksanol		+		+
16,629	butanojska kislina		+		
16,952	2-metilpropil ester očetne kisline	+	+	+	+
18,157	etil ester butanojske kisline ali 2,3 butandiol	+	+	+	+
18,607	heksanal	+	+	+	+
19,023	3-metil butanojska kislina	+	+	+	+
19,293	2-hidroksi etil ester propanojske kisline	+	+	+	+

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga E2: Prisotnost hlapnih komponent v vinih in liofilizatih vin sort cabernet sauvignon (C) in modra frankinja (F).

tr	komponente	C vino	C liofilizat	F vino	F liofilizat
20,164	2-metil etil ester butanojske kisline	+			
20,272	3-metil etil ester butanojske kisline	+		+	+
20,603	3 etoksi 1-propanol		+		+
20,978	metoksi-fenil oksim ali 3-etil 2-pentanol	+	+	+	+
21,118	1-heksanol	+	+	+	+
21,364	3-metil acetat 1-butanol	+	+	+	
21,471	2-metil acetat 1-butanol	+	+	+	
21,638	2-metil acetat 1-butanol	+	+	+	
21,832	2-furanmetanol	+	+		+
22,176	2-etoksi 1-metoksietoksi etan		+		+
22,660	2-etoksi 1-metoksietoksi etan		+		+
23,249	furfuril metanoat ali etil metil ester amino metanojske kisline	+	+		+
23,760	N,N-dimetil acetamid		+		+
23,948	2-(2-etoksietoksi) acetat etanol		+		+
24,466	metoksi acetat propanol		+		+
24,817	3-hidroksi etil ester butanojske kisline		+		+
24,955	heksanojska kislina	+	+	+	+
25,302	heptanol	+		+	
26,330	etil ester heksanojske kisline ali diacetat 1,3-propandiol	+	+	+	+
26,848	butirolakton	+	+	+	+
27,019	oktanal				+
27,478	glicerin		+		+
27,672	benzaldehyd	+	+	+	+
28,613	2,7-dimetil 4,5-oktandiol		+		+
29,180	2,6-dimetil 4-heptanol		+		+
29,586	3-etil-2-pentanol		+		+
29,708	1-metoksi pentan		+		+
29,935	3-hidroksi etil ester butanojske kisline		+		+
30,240	benzil alkohol		+		+
32,403	oktanojska kislina	+	+	+	+
33,311	etil hidrogen sukcinat		+		+
33,474	feniletil alkohol	+	+	+	+
34,020	dietil ester butandiojske kisline	+	+	+	+
34,420	2-etil fenol		+		+
37,948	hidroksi dietil ester butandiojske kisline		+		+
38,280	2-feniletil ester oetne kisline		+		+
40,857	etil ester dekanajske kisline ali etil ester pentanojske kisline	+	+		+

+ prisotnost posamezne komponente, + signal je bil bistveno večj

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Ana MIKLAVČIČ

**PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA EKSTRAKTOV
LIOFILIZIRANIH VIN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008