

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marko LESICA

**VPLIV VPIHOVANJA KISIKA NA ZORENJE  
RDEČIH VIN**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Marko LESICA

**VPLIV VPIHOVANJA KISIKA NA ZORENJE RDEČIH VIN**

MAGISTRSKO DELO

**INFLUENCE OF OXYGEN INTAKE ON MATURING OF RED  
WINES**

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2009

Magistrsko delo je zaključek podiplomskega magistrskega študija bioloških in biotehniških znanosti. Delo je potekalo v Vinski kleti "Goriška Brda" z.o.o. Dobrovo, v laboratorijih Katedre za tehnologijo prehrane in vina na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, v Centralnem laboratoriju Kmetijskega inštituta Slovenije v Ljubljani in Katedri za analizo kemijo, Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete z dne, 03.03.2008 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za magistrski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja živilstva. Za mentorico je bila imenovana doc. dr. Tatjana Košmerl in za somentorico doc. dr. Helena Prosen.

Mentorica: doc. dr. Tatjana Košmerl

Somentorica: doc. dr. Helena Prosen

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Rajko Vidrih  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Tatjana Košmerl  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: doc. dr. Helena Prosen  
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Član: doc. dr. Denis Rusjan  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Marko Lesica

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Md  
DK UDK 663.222:663.256/.257:546.21:547.56(043)=163.6  
KG vino/merlot/cabernet sauvignon/rdeča zvrst/mikrooksigenacija/kisik/fenoli/tanini/  
antocianini/barve/trpkost/senzorične lastnosti  
AV LESICA, Marko, univ. dipl. inž. živ. tehnol.  
SA KOŠMERL, Tatjana (mentorica) / PROSEN, Helena (somentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in  
biotehniških znanosti, področje živilstva  
LI 2009  
IN VPLIV VPIHOVANJA KISIKA NA ZORENJE RDEČIH VIN  
TD Magistrsko delo s področja živilstva  
OP XI, 96 str., 18 pregl., 43 sl., 56 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Preučevali smo vpliv mikrooksigenacije na zorenje različnih rdečih vin (merlot, cabernet sauvignon in rdeča zvrst). Mikrooksigenacija se običajno uporablja pri rdečih vinih kot cenejša alternativna metoda zorenja v lesenih sodih in temelji na dodajanju majhne količine čistega kisika vinu. V raziskavi smo preučili vpliv dovajanja kisika na razvoj barve in fenolnih spojin med dvoletnim poskusom mikrooksigenacije. V prvem letu so analize vključevale določanje skupnih, taninskih, netaninskih, flavonoidnih in neflavonoidnih fenolov, fenolnih indeksov, antocianinov, intenzitete barve, tona barve, deleža rdečega barvila, deleža rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah (420, 520 in 620 nm), oceno koncentracije barvila odpornega na vezavo žveplovega dioksida (SO<sub>2</sub>) ter kemijskih parametrov (pH, prosti in vezani SO<sub>2</sub>, vsebnost alkohola in skupnega ekstrakta, skupne titrabilne in hlapne kisline). Mikrooksigenacija je povzročila zmanjšanje vsebnosti skupnih fenolov in prostih antocianinov v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Pri vseh tretiranih vinih se intenziteta barve bistveno poveča. Razvoj posameznih skupin barvil je pokazal nepričakovane rezultate. V drugem letu poskusa smo analizirali še spremembe posameznih fenolnih spojin z metodo HPLC-MS in razvoj aromatskih spojin z metodo GC-MS. Raztapljanje kisika povzroči več kondenzacijskih in polimerizacijskih reakcij, ki vplivajo na vsebnost posameznih fenolnih spojin, kot so katehin, epikatehin, sinapična kislina, klorogenska kislina, ferulna kislina, *trans*-resveratrol, kvercetin, *p*-kumarna kislina in 3,4-dihidroksibenzojska kislina. Kisik ni vplival na vsebnost hlapnih spojin. Senzorična analiza je pokazala značilno manjšo zaznavo zelenih tonov vina merlot letnika 2006 ter manjšo zaznavo trpkosti vina cabernet sauvignon letnika 2006.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Md  
DC UDC 663.222:663.256/.257:546.21:547.56(043)=163.6  
CX wines/Merlot/Cabernet Sauvignon/red cuvée/microoxygenation/oxygen/phenols  
tannins/anthocyanins/colour/astringency/sensory characteristics  
AU LESICA, Marko  
AA KOŠMERL, Tatjana (supervisor) / PROSEN, Helena (co-advisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate study of Biological and  
Biotechnical sciences, field: Food Science and Technology  
PY 2009  
TI INFLUENCE OF OXYGEN INTAKE ON MATURING OF RED WINES  
TD M. Sc. Thesis  
OP XI, 96 p., 18 tab., 43 fig., 56 ref.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI The effect of microoxygenation on maturing of different red wines (Merlot, Cabernet Sauvignon and red *cuvée* wine) was determined. Microoxygenation is usually applied to red wines as a cheaper alternative to oak aging and it consists of the addition of very small amounts of pure oxygen to wine over time. In this study the effect of oxygen intake on colour and phenolic compounds changing during a two-year microoxygenation experiment was studied. In the first year the content of total phenols, tannins, non-tannins, flavonoids and non-flavonoids, phenol index, anthocyanins, colour density, colour hue, degree of red pigment colouration, degree of red pigment colouration at different wavelength (420, 520 and 620 nm), estimation of sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) resistant pigments concentration and chemical parameters (pH, free and bound SO<sub>2</sub>, ethanol, total dry extract, total titrable and volatile acids) were determined. Microoxygenation reduced the total phenolics and anthocyanins content compared to the control wine. In all treated wines colour intensity increased. The evolution of pigment groups gave also unexpected results. In the second year of experiment the changing of phenolic compounds with HPLC-MS method and the evolution of aroma profile with GC-MS analyses were determined. The oxygen dissolution enhanced the condensation and polymerization reactions, influenced the content of some phenolic compounds such as catechin, epicatechin, sinapic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, *trans*-resveratrol, *p*-cumaric acid, quercetin and 3,4-dihydroxybenzoic acid. Oxygen did not affect the concentration of volatile acids. Sensory analyses showed a significant diminution of herbaceous aromas in Merlot wine from vintage 2006 and lower astringency in Cabernet Sauvignon wine from vintage 2006.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA.....	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 KISIK IN VINO .....	3
2.2 RAZTAPLJANJE KISIKA.....	4
2.3 DOSTOPNOST KISIKA MED VINIFIKACIJO .....	5
2.3.1 PORABA KISIKA MED MACERACIJO IN FERMENTACIJO.....	6
2.3.2 KISIK V FAZI ZORENJA VINA.....	7
2.4 FAZE MIKROOKSIGENACIJE.....	8
2.4.1 FAZA STRUKTURIRANJA.....	8
2.4.2 FAZA HARMONIZACIJE.....	10
2.4.3 FAZA NASIČENJA .....	11
2.5 GLAVNI VPLIVI KISIKA PRI ZORENJU RDEČIH VIN .....	11
2.5.1 BARVA VINA .....	11
2.5.1.1 Vpliv vrednosti pH .....	13
2.5.1.2 Vpliv vsebnosti SO <sub>2</sub> .....	14
2.5.1.3 Temperatura vina.....	15
2.5.1.4 Polimerizacije in kondenzacije fenolov .....	15
2.5.1.5 Ostale reakcije taninov.....	19
2.5.1.5.1 Kopigmentacija .....	20
2.5.2 VPLIV KISIKA NA TRPKOST IN GREKOBHO VINA .....	22
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>24</b>
3.1 POTEK POSKUSA.....	24
3.2 MATERIALI .....	24
3.3 VPIHOVANJE KISIKA.....	26
3.4 METODE DELA .....	28

3.4.1	VZORČENJE .....	28
3.4.2	SPEKTROFOTOMETRIČNE METODE .....	28
3.4.2.1	Določanje intenzitete ali gostote barve po Ilandu in sod.....	28
3.4.2.2	Določanje tona ali nianse barve .....	29
3.4.2.3	Ocena vsebnosti barvil odpornih na SO <sub>2</sub> .....	30
3.4.2.4	Ocena vsebnosti rdečih barvil brez učinka SO <sub>2</sub> .....	31
3.4.2.5	Določanje deleža (%) rdeče barve po Ilandu in sod. (2000).....	31
3.4.2.5.1	Določanje deleža (%) rdeče barve.....	32
3.4.2.6	Določanje skupnih antocianinov .....	33
3.4.2.7	Določanje skupnih in netaninskih polifenolov ter skupnih neflavonoidov s formaldehidom.....	34
3.4.2.7.1	Priprava umeritvene krivulje galne kisline .....	34
3.4.2.7.2	Določanje masne koncentracije skupnih fenolov.....	36
3.4.2.7.3	Določanje masne koncentracije netaninskih fenolov .....	37
3.4.2.7.4	Določanje skupnih neflavonoidov s formaldehidom .....	38
3.4.3	ELEKTROKEMIJSKE ANALIZE .....	40
3.4.3.1	Določanje vrednosti pH.....	40
3.4.4	TITRIMETRIČNE ANALIZE .....	40
3.4.4.1	Določanje SO <sub>2</sub> v vinu po Ripperju.....	40
3.4.4.2	Določanje hlapnih kislin.....	42
3.4.4.3	Določanje koncentracije skupnih (titrabilnih) kislin .....	43
3.4.4.4	Določanje relativne gostote, skupnega ekstrakta in alkohola v vinu.....	44
3.4.5	KROMATOGRAFSKE METODE .....	45
3.4.5.1	Analiza fenolov s HPLC-MS .....	45
3.4.5.2	Analiza hlapnih aromatskih spojin z GC-MS kromatografijo .....	46
3.4.6	SENZORIČNA ANALIZA.....	47
3.4.7	STATISTIČNA ANALIZA .....	47
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>REZULTATI DOLOČANJA MASNIH KONCENTRACIJ SKUPNIH FENOLOV, ANTOCIANINOV, TANINSKIH IN NETANINSKIH FENOLOV TER FLAVONOIDNIH IN NEFLAVONOIDNIH FENOLOV V VINU .....</b>	<b>49</b>
4.1.1	MASNA KONCENTRACIJA SKUPNIH, NETANINSKIH IN TANINSKIH FENOLOV .....	49
4.1.2	MASNA KONCENTRACIJA ANTOCIANINOV, FLAVONOIDNIH IN NEFLAVONOIDNIH FENOLOV .....	52
<b>4.2</b>	<b>PRIMERJALNI REZULTATI OSTALIH FENOLNIH ANALIZ .....</b>	<b>56</b>
4.2.1	VPLIV MIKROOKSIGENCIJE NA RAZVOJ AROMATSKIH SPOJIN .....	60

<b>4.3 REZULTATI DOLOČANJA INTENZITETE IN TONA BARVE, DELEŽA RDEČEGA BARVILA IN DELEŽA RDEČE BARVE PRI POSAMEZNIH VALOVNIH DOLŽINAH V VINU .....</b>	<b>64</b>
4.3.1 INTENZITETA BARVE VINA.....	64
4.3.2 TON (NIANSA) BARVE VINA.....	66
4.3.3 DELEŽ (%) RDEČEGA BARVILA .....	68
4.3.4 DELEŽ (%) RDEČE BARVE PRI POSAMEZNIH VALOVNIH DOLŽINAH .....	70
4.3.5 DELEŽ (%) POSAMEZNE OBLIKE BARVILA .....	74
<b>4.4 REZULTATI DOLOČANJA pH, PROSTEGA IN VEZANEGA SO<sub>2</sub>, SKUPNIH IN HLAJNIH KISLIN, VSEBNOST ALKOHOLA IN SKUPNEGA EKSTRAKTA.....</b>	<b>78</b>
<b>4.5 SENZORIČNA ANALIZA VIN LETNIKA 2006.....</b>	<b>81</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>83</b>
5.1 RAZPRAVA .....	83
5.2 SKLEPI .....	86
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>88</b>
6.1 POVZETEK.....	88
6.2 SUMMARY .....	89
<b>7 VIRI.....</b>	<b>91</b>



## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Struktura antocianidinov in njihova prisotnost v vinu (Margalit, 2004).....	12
<b>Preglednica 2:</b> Kratice. ....	25
<b>Preglednica 3:</b> Potek poskusa mikrooksigenacije v vinih letnika 2005. ....	25
<b>Preglednica 4:</b> Potek poskusa mikrooksigenacije v vinih letnika 2006. ....	26
<b>Preglednica 5:</b> Potek vzorčenja vina pri poskusu mikrooksigenacije za vina letnika 2005. ....	28
<b>Preglednica 6:</b> Potek vzorčenja vina pri poskusu mikrooksigenacije za vina letnika 2006. ....	28
<b>Preglednica 7:</b> Primerjava fenolnih indeksov vina letnika 2005.....	56
<b>Preglednica 8:</b> Povprečna vsebnost nekaterih fenolnih spojin (mg/L) po mikrooksigenaciji vin letnika 2006. ....	58
<b>Preglednica 9:</b> Povprečna vsebnost nekaterih fenolnih spojin (mg/L; <sup>+</sup> ploščina vrhov) po mikrooksigenaciji vina merlot letnika 2006. ....	59
<b>Preglednica 10:</b> Povprečna vsebnost nekaterih fenolnih spojin (mg/L; <sup>+</sup> ploščina vrhov) po mikrooksigenaciji vina cabernet sauvignon letnika 2006.....	60
<b>Preglednica 11:</b> Povprečna površina vrhov aromatskih spojin po mikrooksigenaciji vina merlot letnika 2006. ....	62
<b>Preglednica 12:</b> Povprečna površina vrhov aromatskih spojin po mikrooksigenaciji vina cabernet sauvignon letnika 2006.....	63
<b>Preglednica 13:</b> Povprečna intenziteta barve vin po mikrooksigenaciji.....	65
<b>Preglednica 14:</b> Povprečen ton barve vin po mikrooksigenaciji.....	67
<b>Preglednica 15:</b> Povprečen delež (%) rdeče barve po mikrooksigenaciji vin.....	69
<b>Preglednica 16:</b> Povprečni delež (%) rdeče barve pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm ter ocena vsebnosti barvila odpornega na SO <sub>2</sub> po mikrooksigenaciji vin. ....	71
<b>Preglednica 17:</b> Povprečen delež (%) posamezne oblike barvila po mikrooksigeniranega vin.....	75
<b>Preglednica 18:</b> Primerjava vrednosti pH, prostega in vezanega SO <sub>2</sub> , vsebnosti alkohola, skupnega ekstrakta, skupnih in hlapnih kislin pred in po mikrooksigenaciji vin. ....	80

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Primer raztapljanja kisika v vinu pri mikrooksigenaciji in navadnem pretoku med zorenjem (Cagnasso in sod., 2003: 33).....	3
<b>Slika 2:</b> Priporočena količina dodanega kisika v vino pri različnih temperaturah (Nel, 2001: 2).....	4
<b>Slika 3:</b> Oksidacija fenolne spojine v ustrezni kinon. ....	6
<b>Slika 4:</b> Strukturni vpliv v odvisnosti od začetka mikrooksigenacije (Goals ..., 2001: 8).....	9
<b>Slika 5:</b> Flavilijev ion; R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , sta lahko H, OH ali OCH <sub>3</sub> (Margalit, 2004). ....	11
<b>Slika 6:</b> Kemijske reakcije fenolov v rdečem vinu med staranjem in vpliv na organoleptične karakteristike. (A – antocianin, T – tanin, P – procianidin, C – katehin, TtC – zelo kondenzirani tanini, TC – kondenzirani tanini, TP – taninski polisaharidi, ↓ - oborina, AD – razgrajeni antocianini) (Ribéreau-Gayon in sod., 2000: 363).....	12
<b>Slika 7:</b> Strukturne oblike antocianinov glede na vrednost pH (Cheynier, 2005). ....	13
<b>Slika 8:</b> Reakcija razbarvanja antocianinov zaradi vezave bisulfitnega iona (Margalit, 2004). ....	14
<b>Slika 9:</b> Kondenzacija antocianinov in taninov (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).....	16
<b>Slika 10:</b> Kondenzacija proantocianidinov in antocianinov (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). ....	17
<b>Slika 11:</b> Struktura barvila, nastalega pri kondenzaciji antocianina in flavanola z acetaldehidnim mostičkom; R = flavanol enote (Atanasova in sod., 2002). ....	18
<b>Slika 12:</b> Nekateri etilno vezani fenoli (Cheynier, 2005).....	19
<b>Slika 13:</b> Struktura piranoantocianinov: Pirano-malvidin 3-glukozid: R=H; Karboksil-pirano-malvidin-3-glukozid: R=COOH; (epi)katehin-pirano-malvidin-3-glukozid: R = flavanol enote; Flavanol dimer-pirano-malvidin-3-glukozid: R = flavanolov dimer (Atanasova in sod., 2002).....	21
<b>Slika 14:</b> Potek mikrooksigenacije za posamezno vrsto vina. ....	24
<b>Slika 15:</b> Mikrooksidator MICRODUE® (Microossigenazione – Microdue, 2005). ....	27
<b>Slika 16:</b> Shema volumetričnega dovajanja kisika (Microossigenazione – Microdue, 2005). ....	27
<b>Slika 17:</b> Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin. ....	36
<b>Slika 18:</b> Spreminjanje vsebnosti skupnih fenolov (mg/L) med mikrooksigenacijo vin letnika 2005. ....	49
<b>Slika 19:</b> Vsebnost skupnih fenolov pred in po končani mikrooksigenaciji vin letnika 2006. ....	50
<b>Slika 20:</b> Spreminjanje vsebnosti taninov in netaninov (mg/L) med mikrooksigenacijo vin letnika 2005. ....	51
<b>Slika 21:</b> Vsebnost taninskih in netaninskih fenolov (mg/L) pred in po končani mikrooksigenaciji vin letnika 2006. ....	52

<b>Slika 22:</b> Spreminjanje vsebnosti antocianinov (mg/L) med mikrooksigenacijo vin letnika 2005.....	53
<b>Slika 23:</b> Povprečna vsebnost antocianinov (mg/L) pred in po končani mikrooksigenaciji vin letnika 2006. ....	53
<b>Slika 24:</b> Spreminjanje povprečne vsebnosti flavonoidnih in neflavonoidnih fenolov (mg/L) med mikrooksigenacijo vin letnika 2005.....	54
<b>Slika 25:</b> Povprečna vsebnost flavonoidnih in neflavonoidnih fenolov (mg/L) pred in po končani mikrooksigenaciji vin letnika 2006. ....	55
<b>Slika 26:</b> Kinetika vanilin indeksa in procianidinov med mikrooksigenacijo vin letnika 2005.....	57
<b>Slika 27:</b> Indeks polimerizacije (vanilin/procianidin) med mikrooksigenacijo vin letnika 2005.....	57
<b>Slika 28:</b> Učinek mikrooksigenacije na spreminjanje intenzitete barve vin v odvisnosti od časa – letnik 2005. ....	64
<b>Slika 29:</b> Povprečna intenziteta barve pred in po mikrooksigenaciji vin letnika 2006. ....	65
<b>Slika 30:</b> Učinek mikrooksigenacije na spreminjanje tona barve vin letnika 2005 v odvisnosti od časa.....	66
<b>Slika 31:</b> Povprečen ton barve pred in po mikrooksigenaciji vin letnika 2006. ....	68
<b>Slika 32:</b> Učinek mikrooksigenacije na spreminjanja deleža (%) rdeče barve vin letnika 2005 v odvisnosti od časa.....	68
<b>Slika 33:</b> Povprečni delež (%) rdeče barve pred in po mikrooksigenaciji vin letnika 2006. ....	70
<b>Slika 34:</b> Povprečni delež (%) rdeče barve mikrooksigeniranega vina rdeče zvrsti letnika 2005 pri valovnih dolžinah 420 in 520 nm v odvisnosti od časa.....	71
<b>Slika 35:</b> Povprečni delež (%) rdeče barve mikrooksigeniranega vina rdeče zvrsti letnika 2005 pri valovni dolžini 620 nm in ocena vsebnosti barvila odpornega na SO <sub>2</sub> v odvisnosti od časa. ....	72
<b>Slika 36:</b> Povprečni delež (%) rdeče barve mikrooksigeniranega vina merlot letnika 2005 pri valovnih dolžinah 420 in 520 nm v odvisnosti od časa. ....	72
<b>Slika 37:</b> Povprečni delež (%) rdeče barve mikrooksigeniranega vina merlot letnika 2005 pri valovni dolžini 620 nm in ocena vsebnosti barvila odpornega na SO <sub>2</sub> v odvisnosti od časa.....	73
<b>Slika 38:</b> Povprečni delež (%) rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah pred in po mikrooksigenaciji vin letnika 2006. ....	74
<b>Slika 39:</b> Povprečen delež (%) posamezne oblike barvila mikrooksigeniranega vina rdeče zvrsti letnika 2005 v odvisnosti od časa. ....	75
<b>Slika 40:</b> Povprečen delež (%) posamezne oblike barvila mikrooksigeniranega vina merlot letnika 2005 v odvisnosti od časa.....	76
<b>Slika 41:</b> Povprečen delež (%) posamezne oblike barvila po mikrooksigenaciji vin letnika 2006.....	77

<b>Slika 42:</b> Povprečna senzorična ocena vina merlot letnik 2006 po 20 in 60 dneh mikrooksigenacije. ....	81
<b>Slika 43:</b> Povprečna senzorična ocena vina cabernet sauvignon letnik 2006 po 20 in 60 dneh mikrooksigenacije. ....	82

## 1 UVOD

Mlada rdeča vina izpostavljena kisiku lahko pod določenimi pogoji pridobijo na kakovosti. Mikrooksigenacija je tehnika, s katero lahko vplivamo na fenolno strukturo vina, pri čemer skušamo prilagoditi količino dodanega kisika vinu tako, da povečamo stabilnost barve ter zmanjšamo trpkost taninov in prisotnost neprijetnih arom.

Mikrooksigenacija je tehnika počasnega dovajanja kisika v vino v količinah, ki morajo biti tolikšne, da takoj vstopijo v reakcije in na ta način ne pride do akumulacije prevelikih količin raztopljenega plina. Kisik igra pomembno vlogo pri različnih fizikalno-kemijskih in mikrobioloških procesih, ki potekajo med fermentacijo in zorenjem vina. Rdeča vina vsebujejo številne fenolne spojine z močnim antioksidacijskim potencialom, ki so zelo podvržene kemijskim spremembam ob prisotnosti kisika. Te lahko privedejo do izboljšanja ali poslabšanja senzorične kakovosti vina.

Najpomembnejše prednosti počasnega dovajanja kisika v mikro količinah v primerjavi s tradicionalnimi tehnikami pridelave rdečih vin naj bi bile: stabilizacija barve, zmanjšanje reduktivnih, travnatih in zelenih arom ter pospeševanje polimerizacije taninov, s tem pa tudi zmanjšanje grenkobe in trpkosti rdečih vin. Namen mikrooksigenacije je predvsem vplivati na preoblikovanje polimerizacijske stopnje polifenolov, kar posledično doprinese k manjši grenkobi in trpkosti, večji stabilnosti barve, izboljšanju arome, zmanjšanju sulfidnih in reduktivnih arom ter povečanju potenciala staranja vina.

Začetek razvoja mikrooksigenacije sega v leto 1990 v JZ Francijo. Patrick DuCournau, tako imenovani oče vodene mikrooksigenacije, začne proučevati delovanje kisika na razvoj vina v posameznih fazah zorenja. Sistem mikrooksigenacije temelji na uvajanju točno določene količine kisika v vino s pomočjo porozne membrane oziroma sonde v obliki majhnih mehurčkov, ki se raztopijo v vinu, medtem ko se dvigajo proti površini. S postopkom mikrooksigenacije lahko posnemamo naravno zorenje vina v lesenih sodih. Dovajanje kisika je le del naravnega procesa, ki ga lahko izvajamo v inertnih posodah. Ekstrakcijo lesnih komponent zagotovimo z dodatkom lesa v obliki oblancev ali dog, ki so dostopni na trgu, s tem pa lahko pridelamo vina zelo podobna tistim, ki zorijo v pravih lesenih sodih. Tovrstnemu postopku lahko pripišemo najvišjo stopnjo higiene, saj ga lahko enačimo z uporabo novih lesenih sodov. Korak dlje pri tovrstnih poskusih je upoštevanje količinsko optimalnih razmerij vina, kisika in lesa. Enoten recept mikrooksigenacije žal ne obstaja. Izkušnje in poznavanje vina so osnovne smernice za pravilno vodenje postopka, pri čemer lahko vedno naletimo na težave, kajti vina se med seboj zelo razlikujejo, ne samo po sorti grozdja, iz katerega so pridelana, ampak tudi po letnikih. Način vodenja postopka je odvisen od številnih dejavnikov, predvsem pa od izkušenj.

## **1.1 NAMEN DELA**

Namen magistrskega dela je ugotoviti osnovne značilnosti procesa mikrooksigenacije v fazi normalnega ali pospešenega zorenja, vlogo tehnike mikrooksigenacije pri pridelavi rdečih vin iz vinorodnega okoliša Goriška brda, proučiti vpliv letnika in sorte ter določiti smiselnost procesa znotraj klasične pridelave vina, kot alternativno ali dopolnilno tehniko.

## **1.2 DELOVNA HIPOTEZA**

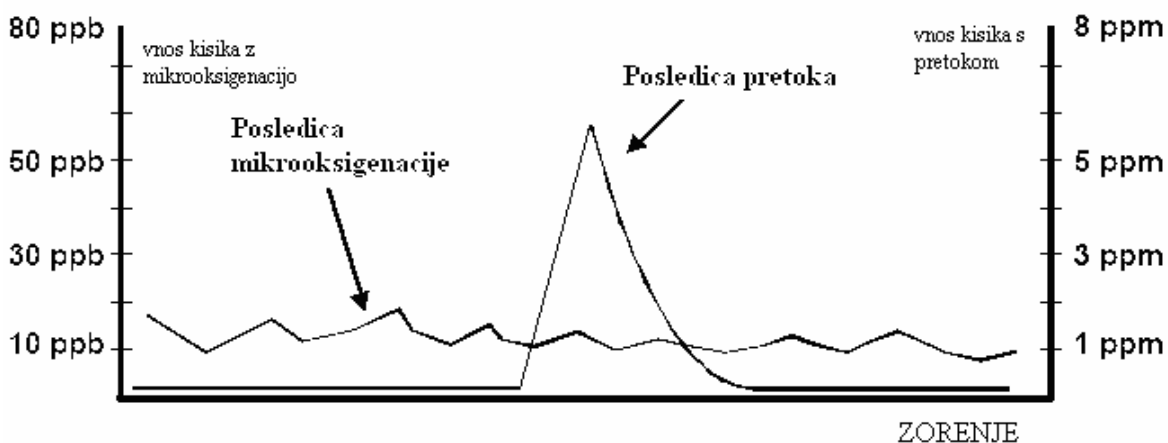
S tehniko mikrooksigenacije bi želeli potrditi ali zavreči trditev, da vpihovanje majhnih količin kisika vpliva na boljšo stabilnost in intenziteto barve vina, na spremembo fenolne sestave oziroma strukture, kot tudi na senzorične lastnosti vina. Potek procesa in izbira delovnih parametrov sta pogojena s sorto in letnikom, trajanje in hitrost procesa pa z razvojno fazo zorenja.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KISIK IN VINO

Uporaba kisika v vinarstvu je zelo pomembna in prinaša določene koristi v posameznih stopnjah pridelave vina (McCord, 2003; Otto, 2003; Blanchard in sod., 2004):

- med maceracijo in vinifikacijo: kisik je pomemben za dobro delovanje in rast kvasovk, predvsem pospešuje tvorbo sterolov in maščobnih kislin, ki se vgrajujejo v celično steno;
- med zorenjem:
  - bela vina: kisik lahko vpliva na povečanje ekstrakta vina;
  - rdeča vina: kisik igra pomembno vlogo pri polimerizaciji fenolnih spojin, predvsem v zgodnjem stadiju zorenja. Polimerizacija povzroči nastanek stabilnih oblik antocianinov, ki so odporni na razbarvanje zaradi vezave SO<sub>2</sub> in bolj odporni na spremembe pH vina. Med zorenjem pričakujemo tudi izboljšanje arome – zmanjšanje reduktivnih, zelenih in travnatih arom, trpkosti in grenkobe.



**Slika 1:** Primer raztapljanja kisika v vinu pri mikrooksigenaciji in navadnem pretoku med zorenjem (Cagnasso in sod., 2003: 33).

Kisik pride v stik z grozdnim sokom že pri drozganju grozdnih jagod, kar aktivira oksidacijske encime. Ti encimi oksidirajo fenolne spojine v kinone – kar vodi v porjavitev mošta. Mošt oziroma vino vsebujejo pri nasičenju s kisikom nekje med 7 in 8 mg O<sub>2</sub>/L. Največja količina raztopljenega kisika je odvisna od :

- temperature vina
- vsebnosti skupnega ekstrakta
- vsebnosti reducirajočih sladkorjev in
- vsebnosti ogljikovega dioksida.

## 2.2 RAZTAPLJANJE KISIKA

Topnost plina v tekočinah sledi Henryjevemu zakonu in je odvisna od narave plina in parcialnega tlaka ( $PO_2$ ):

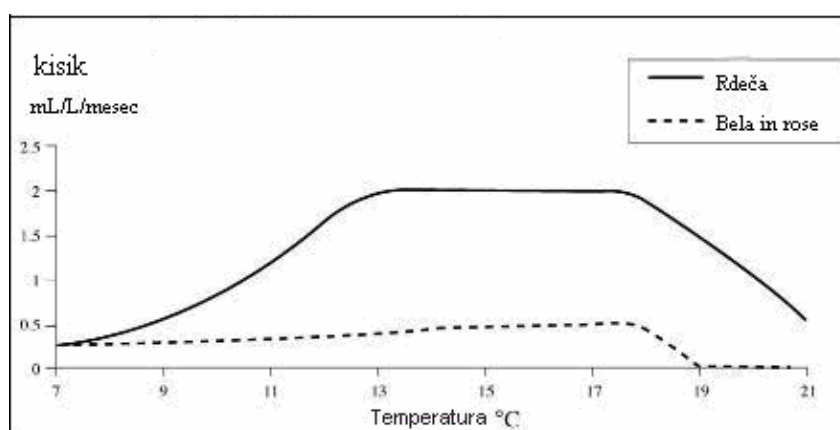
$$PO_2 = H \times C \quad \dots(1)$$

kjer je  $H$  = Henryjeva konstanta in  $C$  = koncentracija kisika v ravnotežnem stanju.

Parcialni tlak kisika v zraku pri 20 °C in 101,3 kPa znaša 21,1 kPa. V vinu, nasičenem z zrakom pri sobni temperaturi (20 °C) in atmosferskem tlaku, znaša topnost kisika nekje med 6 in 8 mg/L. Velja, da se topnost kisika pri zmanjšanju temperature vina za 5 °C poveča za približno 10 %. Topnost kisika je odvisna tudi od vsebnosti alkohola, ekstrakta in sladkorja v vinu (Singleton, 1987).

Z vidika praktične uporabe naj bi postopek mikrooksigenacije potekal optimalno pri temperaturi vina med 15 in 18 °C. Temperatura naj ne bi bila nižja od 10 °C in višja od 22-25 °C. Temperatura ima na mikrooksigenacijo dvojni vpliv. Prvi je hitrost reakcij, ki potekajo s kisikom v vinu – višja je temperatura, hitrejšje so reakcije; drugi pa samo raztapljanje kisika, ki se povečuje z zmanjšanjem temperature. To lahko predstavlja velik problem, kajti če je temperatura procesa nizka, lahko pride do kopičenja kisika. V takih primerih moramo proces mikrooksigenacije ustaviti. Ker postopek mikrooksigenacije poteka v zimskem času, je takih primerov veliko.

Količina dovedenega kisika se ponavadi označuje kot mL/L oziroma mg/L. Pri 15 °C 1 mg kisika predstavlja 1,47 mL, pri 20 °C pa 1 mg kisika predstavlja 1,5 mL (Goals ..., 2001).



Slika 2: Priporočena količina dodanega kisika v vino pri različnih temperaturah (Nel, 2001: 2).



### 2.3 DOSTOPNOST KISIKA MED VINIFIKACIJO

Poznamo številne načine preprečevanja nezaželenih oksidacij. Prvi je ta, da odstranimo spojine, ki so podvržene oksidacijam – fenole. Pri tem se lahko poslužujemo hiperoksidacije. Lahko uporabimo tudi različna čistila, kot sta želatina in PVPP (polivinilpolipirrolidon), vendar moramo biti pri tem pozorni, da ne osiromašimo vina na aromatikah s predoziranje le-teh. Vsebnost fenolnih spojin lahko zmanjšamo že, če zmanjšamo čas maceracije in z nežnim stiskanjem drozge (tlak stiskanja do 0,7 bar) (du Toit, 2005).

Vino ali mošt pride v stik s kisikom praktično pri vsakem procesu, ki ga izvajamo. Da bi zmanjšali oziroma preprečili dostop kisika, se vinarji poslužujejo hiperredukcijskega načina pridelave vina. Ta temelji na različnih ukrepih preprečevanja dostopa kisika. V fazi drozganja in stiskanja drozge se uporablja suhi led (sublimacija CO<sub>2</sub> ter izpodrivanje kisika). Pri pretokih se tanke in cevovode napolni z inertnim plinom, večinoma CO<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>, lahko tudi argonom, ki pa je cenovno dražji. Izbira plina je odvisna od postopka. CO<sub>2</sub> je težji od zraka in ga zato izpodriva, vendar se tudi raztaplja v vinu, medtem ko se N<sub>2</sub> ne raztaplja, vendar je lažji od zraka. V mošt se dodaja tudi vitamin C kot antioksidant. Pravilna uporaba SO<sub>2</sub> tekom pridelave je ključnega pomena pri preprečevanju oksidacij. Nekatera vina izgubijo sadnost že pri nekajkratnem kratkotrajnem stiku s kisikom. Če upoštevamo, da pri določenih postopkih neizogibno vnesemo kisik v vino (centrifugiranje 7 mg/L, filtracija 3-7 mg/L, pretok 2-6 mg/L) (du Toit, 2005) so lahko že ti postopki vzrok za slabšo kakovost. Uporaba dobre opreme ter natančen in vesten vinar oziroma kletar lahko dosti pripomore h kakovosti končnega produkta.

Uporaba mikrooksidacije je najbolj učinkovita pri vinih, ki imajo razmerje skupnih flavonoidov in antocianinov med pet in sedem (Cagnasso in sod., 2003). Pri vinih z manjšo vsebnostjo taninskih snovi se lahko poslužujemo dodatka eksogenih taninov. Količina dovedenega kisika je zmeraj kritična točka. Splošno pravilo velja, da so količine kisika lahko bistveno večje v zgodnji fazi zorenja vina (20 mL/L/mesec), ker imamo droži kot velikega porabnika kisika, s tem pa preprečimo primarni pojav reduktivnih vonjav (H<sub>2</sub>S). Kasneje se količina kisika prilagaja zmoglosti porabe le-tega. Osnovno načelo je preprečiti oksidacije in pojav polimerizacije samih taninov, ki vodi v suhost vina. V praksi se proces spremlja s sistematičnimi senzoričnimi analizami in z vsebnostjo hlapnih kislin, predvsem ob pojavu večjega delovanja mikroorganizmov.

Sekundarni vpliv dovajanja kisika je popolna fermentacija reducirajočih sladkorjev, ki včasih zaradi narave procesa ne poteče do konca oziroma je otežena (Cagnasso in sod., 2003).

### 2.3.1 PORABA KISIKA MED MACERACIJO IN FERMENTACIJO

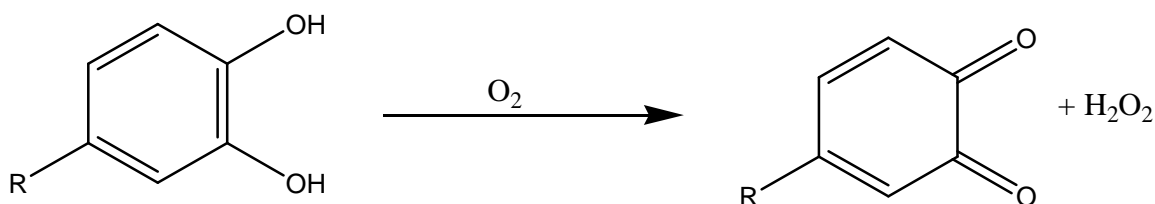
Med maceracijo je poraba kisika povezana z vsebnostjo suspendiranih delcev (kvasovke in jagodne kožice) ter topnih snovi, ki se nahajajo v moštu (Silva in Lambri, 2006; Atanasova in sod., 2002). Med maceracijo in alkoholno fermentacijo potekajo različni kemijski in mikrobiološki procesi, ki prispevajo k porabi kisika, pri tem naj izpostavimo aktivnost kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* in vsebnost fenolnih spojin.

Različni avtorji navajajo, da kisik pospešuje in preprečuje morebitne zastoje fermentacije. To dejstvo izhaja iz ključne funkcije kisika v metabolizmu kvasovk *S. cerevisiae*, kot vpliv na večjo tvorbo membranskih lipidnih komponent, kot so steroli in nenasičene maščobne kisline, ki pripomorejo k večji alkoholni toleranci kvasovk (Silva in Lambri, 2006).

Raziskave kažejo, da je primerna količina kisika za nemoten potek fermentacije v moštu 10-20 mg/L (Silva in Lambri, 2006). Izbira časa dovajanja kisika je ravno tako pomembna saj velja, da je dodatek tega najbolj primeren v zaključni fazi kvasovk oziroma v prvi četrtini fermentacije. Vsekakor pa je vnos kisika učinkovit do polovice fermentacije. Kisik v tej fazi služi predvsem potrebam kvasovk in ne predstavlja velike nevarnosti za oksidacijo mošta oziroma vina z vidika kakovosti. Kisik ima lahko pozitivne ali negativne učinke na fenolno strukturo v odvisnosti od količine in časa dodatka. Pri tem ločimo obdobja maceracije, alkoholne fermentacije in maceracije po končani fermentaciji (Silva in Lambri, 2006).

Količina absorbiranega kisika je odvisna od oksidacijskih mehanizmov: encimskih in avtokatalitskih reakcij. Pri tem nastajajo različni kondenzacijski kompleksi antocianin-tanin in polimerizacijski produkti taninov.

Kisik oksidira fenolne spojine v vinu in moštu. Pri tem fenolna skupina odda en elektron in proton, kot je prikazano na spodnji sliki. Nastali kinon lahko tvori rjavo obarvan pigment v moštu ali vinu.



**Slika 3:** Oksidacija fenolne spojine v ustrezni kinon.

Pri tovrstnih reakcijah dobimo še en stranski produkt – vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ki je še močnejši oksidant kot O<sub>2</sub>. Z dodatkom SO<sub>2</sub> preprečimo nadaljnjo oksidacijo, saj se ta veže z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in prepreči nadaljnjo oksidacijo fenolnih spojin. V moštu te reakcije katalizirajo oksidacijski encimi, in sicer dve vrsti – tirozinaza in lakaza (du Toit in sod., 2006b). Ta sta prisotna že v grozdju, oziroma lakaze je več pri okužbi s plesnijo *Botrytis cinerea*. Encimi oksidirajo predvsem kaftarno kislino. Nastali kinoni se lahko z dodatkom glutaciona v vino

oziroma, če je ta že naravno prisoten, nazaj reducirajo in s tem preprečijo nadaljnjo oksidacijo v odsotnosti kisika. Lakaza lahko ponovno oksidira to molekulo v ustrezen kinon, ki se lahko spet reducira z novo molekulo glutationa. V primeru nastanka velikih molekul se te oborijo in posedejo na dno posode kot rjava usedlina. S poznavanjem razmerja vsebnosti glutationa in kaftarne kisline lahko napovemo, če je kakšna sorta bolj podvržena oksidaciji. V grozdnem soku so te reakcije avtokatalitične in potekajo hitro ob večji koncentraciji kisika. Med fermentacijo mošt postane bolj reduktiven, nastali rjavi pigmenti pa se skupaj z odmrliimi kvasovkami posedejo na dno. Od mladega vina jih ločimo ob prvem pretoku (du Toit, 2005).

To dejstvo se lahko upošteva pri pridelavi vina z večjo oksidacijsko toleranco. Tehnologija je poznana pod imenom hiperoksidacija. V grozdni sok uvajamo velike količine kisika, ki povzročijo oksidacijo fenolov in posedanje le-teh. Slednje lahko storimo na primer s 30 minutnim vpihovanjem kisika v tank, s pretakanjem grozdnega soka iz tanka v tank ali z uporabo kisika namesto dušika pri flotaciji za doseganje bistrosti grozdnega soka. Pred fermentacijo nastalo usedlino ločimo od grozdnega soka. Pred tem postopkom moštu ne dodajamo SO<sub>2</sub>. Tovrstna vina so pogosto manj grenka in niso primerna za staranje. Omenjena tehnologija naj ne bi imela večjega vpliva na okus vina v primerjavi s klasično tehnologijo (du Toit, 2005; du Toit in sod., 2006b).

### 2.3.2 KISIK V FAZI ZORENJA VINA

Prisotnost kisika v vinu povzroča nekatere spremembe, kot je na primer kemijska oksidacija, ki je bistveno počasnejša od encimske oksidacije v moštu. Spojine, ki so najbolj dovzetne za oksidacijo, so katehin, epikatehin, antocianini in ostale fenolne snovi. Tudi lesni tanini in njihovi hidrolizni produkti kot so galna in elagova kislina lahko oksidirajo in predstavljajo do neke mere zaščito pred oksidacijo grozdnih fenolov (du Toit, 2005; du Toit in sod., 2006b).

Pri belih vinih je kemijska oksidacija načeloma nezaželena, čeprav manjše količine kisika v tej fazi lahko izboljšajo kakovost vina. To velja predvsem med zorenjem belih vin v hrastovih sodih. Pri pretirani oksidaciji pride do izgube arome in sadnosti vse do acetaldehidnih not. Oksidacija vodi tudi v spremembo maščobnokislinske sestave vina s povečanjem vsebnosti furfurala in evgenola, ki bistveno vplivata na aromatiko vina.

Pri rdečih vinih je prisotnost kisika bistveno bolj zaželena. Ta ima velik vpliv predvsem na barvo in okus rdečih vin. Kisik lahko oksidira nezaželeni H<sub>2</sub>S, ki ima vonj po gnilih jajcih, ter zmanjša reduktivne in zelene arome vina (du Toit, 2005; du Toit in sod., 2006b).

V obdobju pred jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo se pri rdečih vinih lahko uporablja bistveno večje količine kisika (1-4 mg/L/dan) brez strahu, da bi vino postalo oksidirano (du Toit, 2005). Omenjeni tehniki pravimo makrooksidacija, ki je primerna predvsem pri vinih z večjo vsebnostjo fenolov, kot so prešanci. V tej fazi se lahko najbolj stabilizira barva rdečih vin, še preden se ta izloči kot oborina. Postopek makrooksidacije lahko uporabljamo tudi po jabolčno-mlečnokislinski fermentaciji, vendar moramo biti pozorni na

rast oacetnokislinskih bakterij in kvasovk rodu *Brettanomyces* (du Toit, 2005; du Toit in sod., 2006b).

V fazi zorenja se postopek dovajanja kisika imenuje mikrooksigenacija ali mikrooksidacija. Količina dovedenega kisika in trajanje postopka varira od vina do vina. Količina dovedenega kisika naj bi bila med 1 in 4 mg/L/mesec za dobo od enega do šestih mesecev (du Toit, 2005). Vino z večjo vsebnostjo taninov in antocianinov, lahko sprejema bistveno večje količine kisika, na primer 3-4 mg/L, nekaj mesecev. Količina dovedenega kisika je v okvirih, ki bi ga vino sprejelo, če bi zorelo v hrastovih sodih, zato se lahko pri mikrooksigenaciji poslužujemo še uporabe hrastovih dog ali oblancev. Med zorenjem v sodih vino sprejme nekje 30-40 mg O<sub>2</sub>/L/leto (du Toit, 2005; du Toit in sod., 2006b). Tu so vključeni tudi pretoki, čiščenja, dolivanje itd.

Z mikrobiološkega vidika je prisotnost kisika lahko problematična. Oacetnokislinske bakterije so aerobne bakterije, ki se ob zadostni količini kisika lahko relativno hitro namnožijo. Dokazano je, da se koncentracija oacetnokislinskih bakterij med zorenjem vina v sodih bistveno poveča pri vsakem pretoku, ki povzroči večji vnos kisika v vino ter da se koncentracija teh zmanjša sorazmerno z zmanjšanjem koncentracije raztopljenega kisika (du Toit, 2005). Oacetnokislinske bakterije pretvarjajo alkohol v oacetno kislino oziroma v acetaldehid pri bolj anaerobnih razmerah.

Druga vrsta mikroorganizmov, ki so pomembni pri mikrooksigenaciji, so kvasovke rodu *Brettanomyces*. Delovanje teh lahko privede do tvorbe hlapnih fenolov, katerih vonj spominja na konjski znoj in zdravila (du Toit, 2005).

## **2.4 FAZE MIKROOKSIGENACIJE**

Sam potek mikrooksigenacije lahko razdelimo na tri dele:

- faza strukturiranja,
- faza harmonizacije in
- faza nasičenja.

### **2.4.1 FAZA STRUKTURIRANJA**

Tako imenujemo prvo fazo mikrooksigenacije, med katero mlado vino izgubi prvotne značilnosti in postane bolj taninasto. V tej fazi na preprost način odpravimo ali preprečimo reduktivne note, ki so v veliki meri prisotne pri mladih vinih.

Stopnja izgradnje oziroma strukturiranja se začne takoj po alkoholni fermentaciji in traja nekje do šest mesecev. Zelo pomemben je čas začetka, saj v zgodnji fazi omogoča bistveno intenzivnejšo končno strukturo vina, kar vodi v boljši končni produkt. To stopnjo delimo še na dva dela – pred in po jabolčno-mlečnokislinski fermentaciji. Različni viri navajajo trajanje strukturne faze različno dolgo, kar je pogojeno s samim postopkom in vodenjem mikrooksigenacije ter narave vina. Dolžina te faze je odvisna od vsebnosti taninov in

antocianinov. (Parish in sod., 2000; Goals ..., 2001; Nel, 2001; Bissel in sod., 2003; Otto, 2003).

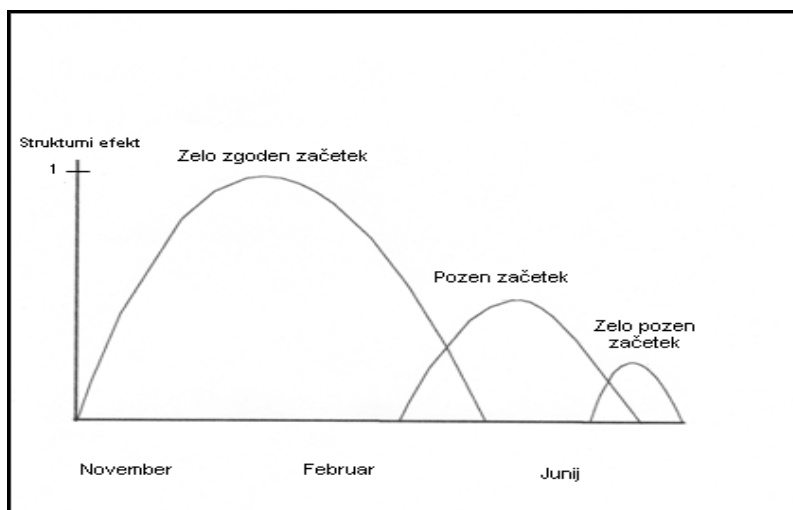
Vsakršnakoli obdelava vina, ki povzroči zmanjšanje količine fenolov, se pozna tudi na uspešnosti strukturne faze mikrooksigenacije, kot na primer:

- čiščenje vina, predvsem z beljakovinskimi čistilnimi sredstvi,
- lakazna aktivnost (plesen *Botrytis cinerea*),
- razredčevanje vina (tipizacija vina z drugim strukturno šibkejšim vinom).

Po drugi strani pa vsak postopek, ki okrepi strukturo, poveča efekt mikrooksigenacije:

- uporaba enoloških taninov,
- tipizacija ali mešanje vin različnih sort.

Prva stopnja izgradnje se začne takoj po alkoholnem vrenju. Ta faza mikrooksigenacije je ključnega pomena za strukturo in stabilnost rdečih vin. V tej fazi je moč mikrooksigenacije največja in moramo začeti z njo zelo hitro, ker je prisotnost SO<sub>2</sub> majhna in prisotnost fenolnih snovi največja, kasneje se del teh posede na dno fermentacijske posode. Postopek spremljamo z večkratnim degustiranjem, kar je ključno v tej fazi zorenja (Goals ..., 2001; Bissel in sod., 2003). Druga stopnja strukturne faze sledi po končani jabolčno-mlečnokislinski fermentaciji in dodatku SO<sub>2</sub>. Količina vpihanega kisika se zmanjša desetkratno, pri tem pa se nadaljuje strukturiranje taninov (Goals ..., 2001; Bissel in sod., 2003).



**Slika 4:** Strukturni vpliv v odvisnosti od začetka mikrooksigenacije (Goals ..., 2001: 8).

Količina dovedenega kisika je odvisna od posameznega vina in se določa na podlagi degustacije in težnje k nastanku acetaldehida, kateri je bistvenega pomena v nadaljnjih reakcijah polimerizacije. Količino kisika prilagajamo vsebnosti acetaldehida, ki naj bo

komaj rahlo zaznaven. Meritve koncentracije acetaldehida so priporočljive, vendar naj opozorimo, da je spremljanje le-tega težavno, ker ni stabilen in mora meritev potekati zelo hitro. Kisik v tej fazi povzroči delno polimerizacijo in mehčanje taninov ter zmanjšanje reduktivnih in travnatih vonjav in okusov. Kisik najprej reagira s fenoli in pride do nastanka kinonov in  $H_2O_2$ , ki katalizira reakcijo oksidacije etanola v acetaldehid. Ta tvori »acetaldehidne mostičke« med tanini in antocianini ter olajša fazo polimerizacije (Goals ..., 2001; Parish in sod., 2000).

#### 2.4.2 FAZA HARMONIZACIJE

V tej fazi preide v ospredje taninska mehkoča, ki podaljša okus in izniči vegetativni karakter vin, ki postanejo bolj sadna z značilnim vonjem po jagodičevju. Zanimivo je, da mora vino najprej skozi fazo, ki mu poslabša senzorično kakovost – postane zaprto, trpko in delno oksidativno, da se v naslednji fazi lahko razvije prava aroma in mehkoča.

V tej fazi se išče končno točko mikrooksidacije, ki nastopi, ko dosežemo najbolj kompleksno aromatiko in primerno taninsko mehkočo. To fazo bi lahko poimenovali evolucijska faza, saj so morebitne napake lahko usodne za končno kakovost vina. Dolžina postopka harmonizacije je odvisna od dolžine strukturne faze. Daljša kot je strukturna faza, daljša je tudi faza harmonizacije. Praviloma traja postopek harmonizacije dvakrat dlje od stopnje strukturiranja, čeprav se temu lahko izognemo z dovajanjem večjih količin kisika v primeru, da mora vino hitro na trg. Dovajanje večjih količin kisika za hitrejšo stabilizacijo si lahko privoščimo le pri mikrooksidiranih vinih. Pri tradicionalnih metodah lahko tak poseg povzroči nezaželeno oksidacijo vina. Določitev končne točke mikrooksidacije je zelo težavna, vendar ključnega pomena, saj nadaljevanje procesa predstavlja slabšanje kakovosti vina s pojavom suhih taninov zaradi prekomerne polimerizacije taninov. Razlikovanje med trpkimi in suhimi tanini zna včasih zмести vinarja. Če so tanini trpki, potrebujejo kisik, da jih »zmehča«, v tem primeru nadaljujemo mikrooksidacijo. Če pa postanejo tanini suhi, moramo zmanjšati oziroma prekiniti dotok kisika.

Veliko pozornost moramo posvetiti temperaturi vina, ki naj bo čim bolj konstantna. To je predvsem pomembno pri strukturno siromašnih vinih. V tej fazi količina dovedenega kisika praviloma ne presega 1 mL/L/mesec. Morebitne spremembe doziranja (že razlika 0,5 mL/L/mesec) lahko doprinesejo velike spremembe končnega produkta. Zaradi majhnih količin kisika ne more priti do kopičenja le-tega, zato je vloga temperature zanemarljiva, dokler ostaja ta konstantna in ne preveč visoka, da bi prišlo do pospešitev reakcij in morebitnih oksidacij (Goals ..., 2001; Bissel in sod. 2003).

### 2.4.3 FAZA NASIČENJA

To je faza, kjer pride do medsebojne polimerizacije taninov zaradi pomanjkanja antocianinov. Posledica tega je prevlada taninskega značaja, ki daje vinu ekstremno robotost in občutek suhosti. V nadaljevanju lahko pride do oksidacije aromatičnih spojin in splošne oksidacije vina (Goals ..., 2001; Bissel in sod. 2003).

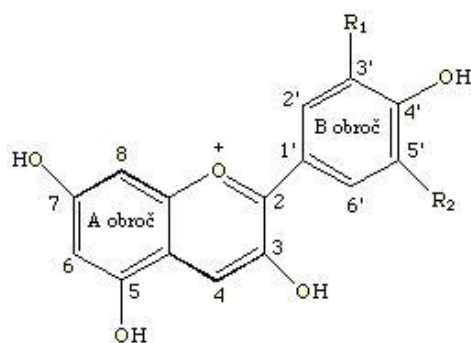
## 2.5 GLAVNI VPLIVI KISIKA PRI ZORENJU RDEČIH VIN

### 2.5.1 BARVA VINA

Prosti antocianini so v mladih vinih osnovna barvila, ki dajejo rdeče, vijolične in modre odtenke. V prvem letu zorenja se več kot 50 % (v 10 letih lahko tudi 80-90 %) teh pretvori oziroma kondenzira ali polimerizira v bolj obstojna barvila (Margalit, 2004; Boulton, 2001). Tako nastala polimerna barvila postanejo glavna barvila starih vin. Raziskave kažejo, da so osnovne interakcije, ki potekajo med fenoli anaerobnega značaja, ter da je pri teh reakcijah bolj pomembna temperatura vina kot prisotnost kisika (Gómez-Plaza in sod., 1999). Polimeri so bistveno bolj stabilni na nadaljnje oksidacije, zato se tudi staranje vina in nadaljnja sprememba barve v rjavo-rdeč odtenek upočasnijo. Spojine, ki dajejo barvo vinu, so fenoli. Fenoli dajejo tudi za trpkost in okus vinu. Tekom zorenja oziroma staranja vina potekajo neprestane spremembe v njegovi fenolni sestavi (Brouillard in sod., 2003; García-Puente in sod., 2006).

Tipičen prehod barve rdečih vin je iz vijolično-rdeče (monomerna barvila) v temno rdečo (kondenzacije, polimerizacije) do rdeče-rjave (visoka stopnja polimerizacije) in na koncu v rjavo barvo (Margalit, 2004; Perez-Lamela in sod., 2006).

Antocianini so pomembni sekundarni metaboliti, ki dajejo barvo rastlinskim delom, prevsem plodom in cvetom. Njihove reakcije, predvsem kopigmentacija, so ključne za barvno raznolikost cvetic in sadja. Antocianini se pri nižji vrednosti pH nahajajo v obliki flavilijevega kationa (slika 5).

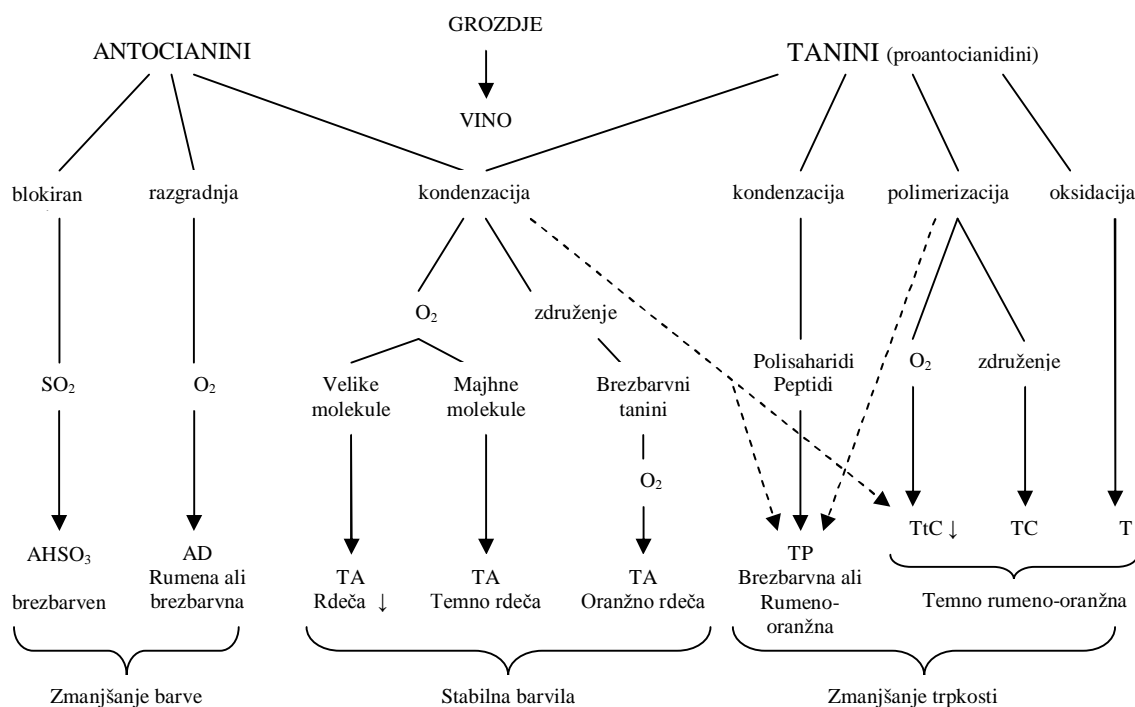


**Slika 5:** Flavilijev ion; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, sta lahko H, OH ali OCH<sub>3</sub> (Margalit, 2004).

Antocianidine vedno najdemo v glikozidni obliki – antocianini. Sladkorna komponenta je ponavadi vezana na mestu 3, v primeru diglikozida pa še na mestu 5. Diglikozidi so načeloma prisotni le v hibridih, toda te so z današnjimi analitskimi metodami zasledili tudi v vinih žlahtne vinske trte *Vitis vinifera* L. Natančen izvor še ni potrjen, zanimivo pa je, da se v določenem obdobju zorenja vina koncentracija diglukozidov povečuje (Alcalde-Eon in sod., 2006). V naravi poznamo šest vrst antocianinov, od tega jih je pet prisotnih v grozdju rdečih sort vinske trte in v njihovih vinih.

**Preglednica 1:** Struktura antocianidinov in njihova prisotnost v vinu (Margalit, 2004).

ANTOCIANIDIN	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Prisotnost v vinu
Pelargonidin	H	H	ni prisoten v vinu
Cianidin	OH	H	prisotni v vinu
Delfinidin	OH	OH	
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H	
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH	
Malvidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	



**Slika 6:** Kemijske reakcije fenolov v rdečem vinu med staranjem in vpliv na organoleptične karakteristike. (A – antocianin, T – tanin, P – procianidin, C – katehin, TtC – zelo kondenzirani tanini, TC – kondenzirani tanini, TP – taninski polisaharidi, ↓ - oborina, AD – razgrajeni antocianini) (Ribéreau-Gayon in sod., 2000: 363).

V vinu sort žlahtne vinske trte *Vitis vinifera* L. je D-glukoza sladkorna komponenta, ki je vezana pri antocianinih (glukozid). Flavonoidi imajo tudi druge sladkorje, vendar je teh relativno malo (L-ramnoza, L-arabinoza, D-galaktoza (Margalit, 2004). Sladkorna



komponenta omogoča fenolom boljšo topnost v vodi in zaščito pred encimskimi reakcijami. Glukozna komponenta je lahko tudi zaestrena na mestu 4 s kislinami (*p*-kumarna, ferulna, kavna) (Margalit, 2004).

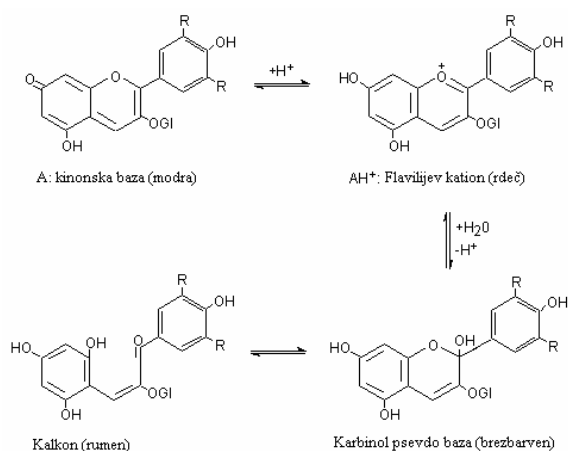
Razmerje antocianinov v grozdju je sortna lastnost in posledično tudi barva vina. Malvidina je v grozdju žlahtne vinske trte *V. vinifera* L. največ in daje rdeč odtenek barve, pelargonidin se ne nahaja v grozdju, peonidin in cianidin imajo bolj oranžen, petunidin in delphinidin pa modrikast odtenek. Značilnost antocianinov je, da so v kislem mediju prisotni kot kationi (vendar je pri pH vina samo manjši del antocianinov prisotnih kot kationi), s tem pa je povezana njihova barva, stabilnost ter oblikovanje nestabilnih kompleksov. Barva antocianinov je tako pogojena s številnimi dejavniki preko redukcije in oksidacije (Margalit, 2004). Njihova stabilnost je odvisna od (Ribéreau-Gayon in sod., 2000, Margalit, 2004):

- vrednost pH,
- kovinskih kationov,
- vsebnosti SO<sub>2</sub>,
- T vina,
- Koncentracije kisika in intenzitete svetlobe
- polimerizacije, kondenzacije, kopigmentacije in
- ostalih reakcij.

### 2.5.1.1 Vpliv vrednosti pH

Za antocianine so značilne štiri oblike stanja, ki so odvisne od vrednosti pH medija (Ribéreau-Gayon in sod., 2000, Margalit, 2004):

- Flavilijev ion (rdeč), kationska oblika,
- Kinonska baza (moder),
- Karbinol (brezbarven), psevdobaza in
- Kalkon (rumen) ima *cis*- in *trans*- izomero (C obroč odprt)



**Slika 7:** Strukturne oblike antocianinov glede na vrednost pH (Cheynier, 2005).

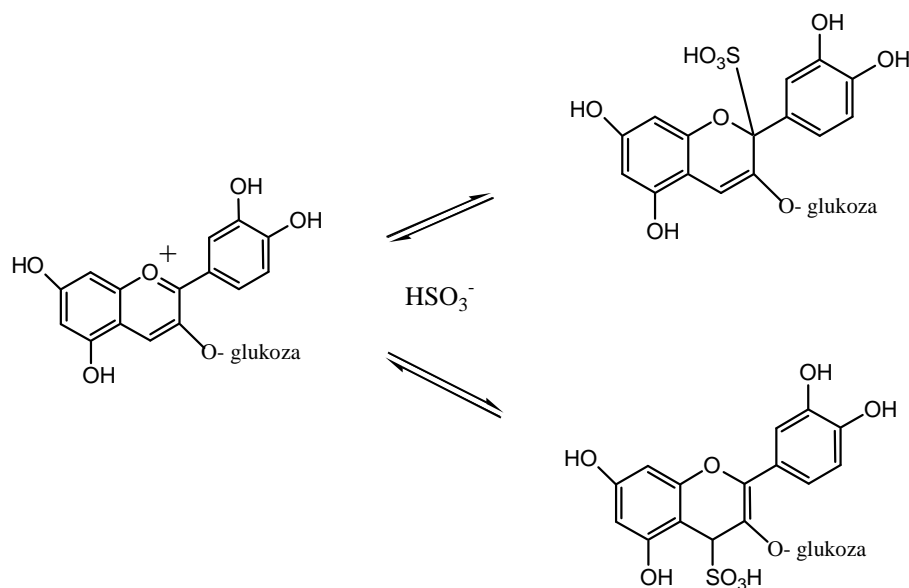
Barva antocianinov je v največji meri odvisna od vrednosti pH. V vinu, kjer je vrednost pH višja od 3,0, je viden le del potencialne rdeče barve. Delež posamezne oblike antocianina se da izračunati ob poznavanju  $pK_a$  antocianina po sledeči enačbi (Margalit, 2004):

$$\log [F^+]/[F] = pK_a - pH, \quad \dots (2)$$

kjer je  $[F^+]$  koncentracija flavilijevega iona (mol/L),  $[F]$  koncentracija flavonoida (mol/L).

### 2.5.1.2 Vpliv vsebnosti $SO_2$

Ena od specifičnih reakcij antocianinov je reakcija z  $SO_2$  (Margalit, 2004). Zaradi pozitivnega naboja centralnega obroča, ki je prisoten na kisikovem atomu, oziroma na C2 in C4 ogljiku, lahko pride pri presežku  $SO_2$  do nukleofilne adicije  $HSO_3^-$  in dobimo brezbarvni bisulfitni derivat (slika 8). Stopnja razbarvanja je seveda odvisna od vsebnosti antocianinov v vinu, prisotnost taninov pa tudi vpliva na manjše razbarvanje (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Margalit, 2004).



**Slika 8:** Reakcija razbarvanja antocianinov zaradi vezave bisulfitnega iona (Margalit, 2004).

Vpliv vsebnosti  $SO_2$  pri mikrooksidaciji se kaže v reakcijah s  $H_2O_2$ , acetaldehidom ali aldehidi in antocianini, kjer pride do upočasnevanja reakcij oksidacije in kondenzacije med tanini in antocianini. Velika vsebnost prostega  $SO_2$  v vinu limitira strukturne vplive mikrooksidacije. To pojasnjuje, zakaj je začetek mikrooksidacije pred jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo tako pomemben, ko še nismo opravili korekcije  $SO_2$  v vinu (Parish in sod., 2000; Goals ..., 2001).

### 2.5.1.3 Temperatura vina

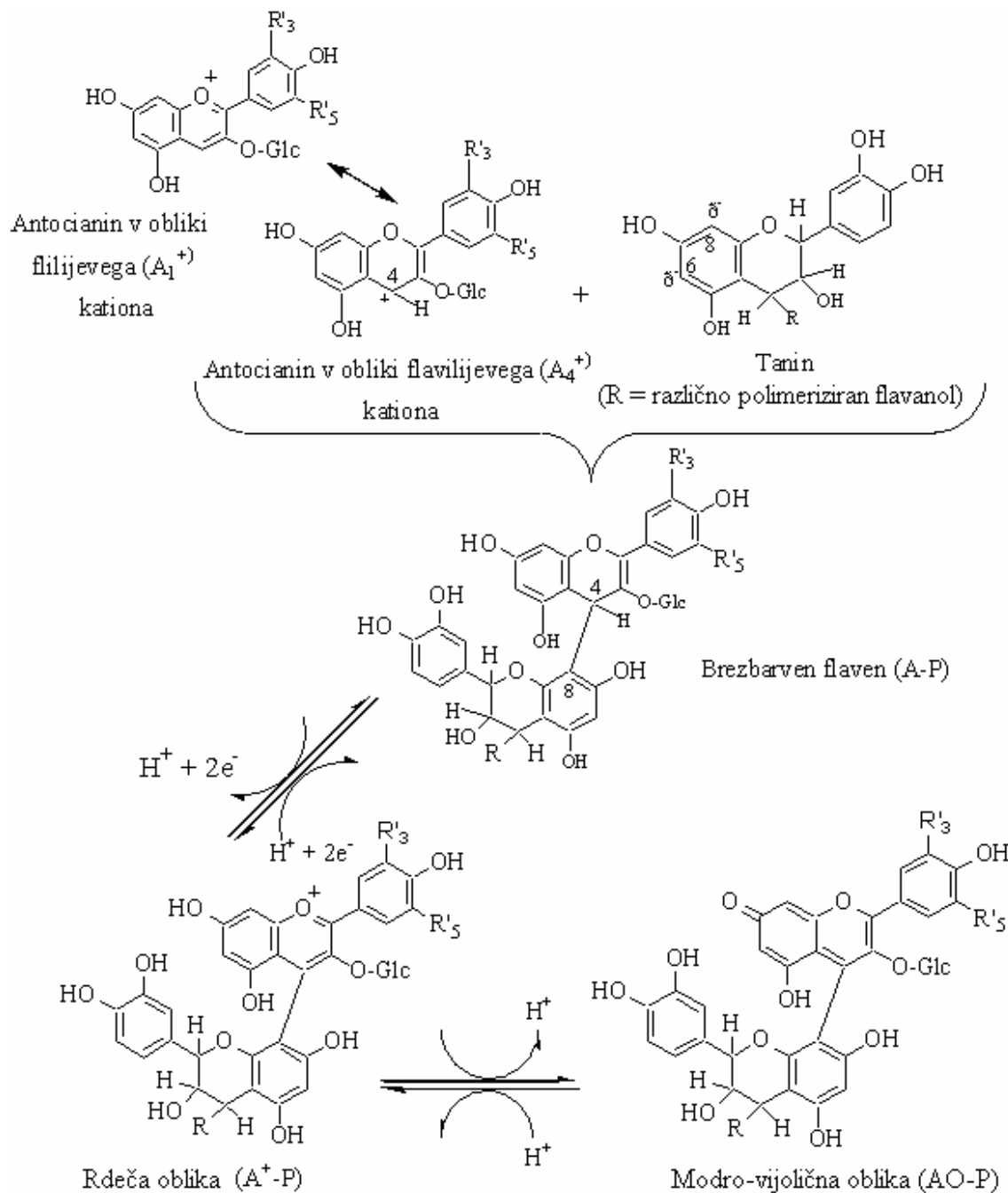
Na splošno višja temperatura vina pospeši kemijske reakcije polimerizacije in s tem tvorbo dolgih fenolnih polimerov, ki dajo vinu rjavkast odtenek barve (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). Višja temperatura pospeši tudi razgradnjo antocianinov in nastanek benzoata, cinamata, dihidroflavonolov, katehina in preostalih nedefiniranih spojin (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). Malvidin je bistveno slabše odporen na temperaturo kot na primer cianidin (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). Zato je za kakovostno staranje vin pomembna primerna in konstantna temperatura. Poleg temperature ima velik vpliv tudi svetloba, ki v prisotnosti kisika pospeši oksidacijo oziroma razgradnjo antocianinov (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Margalit, 2004).

### 2.5.1.4 Polimerizacije in kondenzacije fenolov

Flavilijev ion lahko neposredno reagira z različnimi spojinami kot so aminokisljine, floroglucinol in katehin, pri tem pa nastanejo brezbarvni flaveni (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Margalit, 2004). Kljub vezavi antocianinov rdeča barva vina ostane, poleg tega se intenziteta barve še poveča. Nastali barvni kompleksi so manj občutljivi na spremembe vrednosti pH in posledice razbarvanja zaradi dodatka SO<sub>2</sub>. V reakcijah so vključeni različni mehanizmi kondenzacije antocianinov in taninov, ki tvorijo komplekse z barvnim odtenkom oranžne do modro-vijolične barve. Med temi so najbolj poznani naslednji trije mehanizmi (Ribéreau-Gayon in sod., 2000):

#### 1 Kondenzacija antocianinov → tanin (A-T)

V tej reakciji se antocianin obnaša kot kation (A<sup>+</sup>) in tvori vez s proantocianidinom (P) na mestu C6 ali C8 (slika 9). Pri tem nastane brezbarvni flaven, ki ob prisotnosti kisika oziroma oksidirajočega medija preide v barven kompleks – rdeč (A<sup>+</sup>-P) ali modro-vijoličen (AO-P).

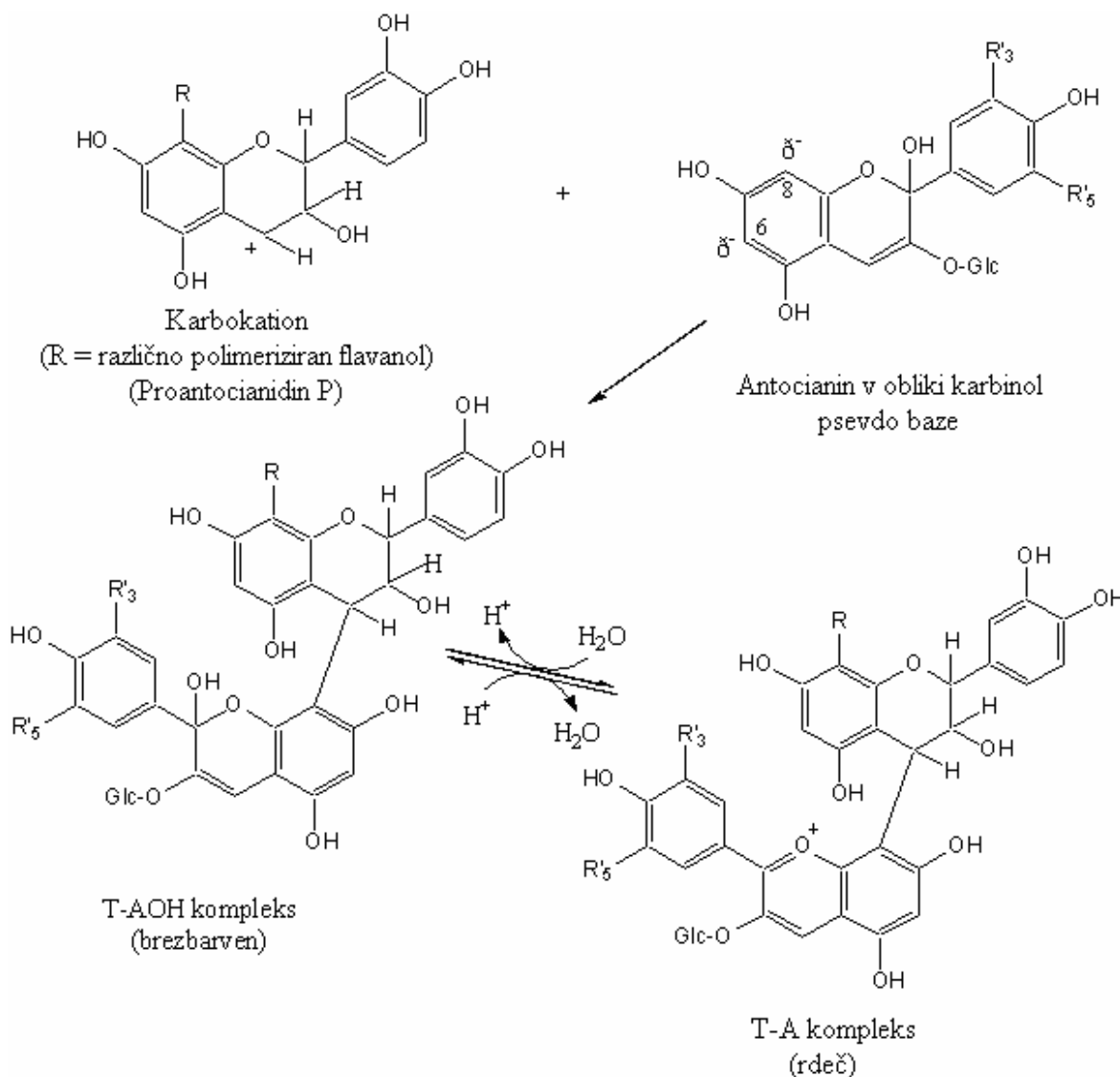


**Slika 9:** Kondenzacija antocianinov in taninov (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

## 2 Kondenzacija taninov → antocianin (T-A)

V tem primeru deluje proantocianidin kot karbokation po protonaciji molekule ter reagira z nukleofilnim mestom antocianina v obliki karbinola na mestu C6 ali C8 (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

Nastali kompleks je brezbarven in šele po dehidraciji preide v rdeče-oranžno barvo (slika 10). Reakcija poteka v odsotnosti kisika, na hitrost vpliva temperatura in koncentracija antocianinov v vinu. Barva nastalega kompleksa je odvisna od vrste karbokationa in stopnje polimerizacije (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

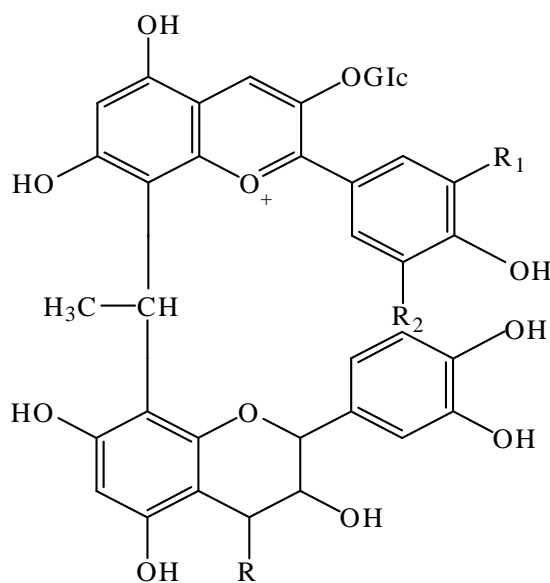


**Slika 10:** Kondenzacija proantocianidinov in antocianinov (Ribéreau-Gayon in sod., 2000).

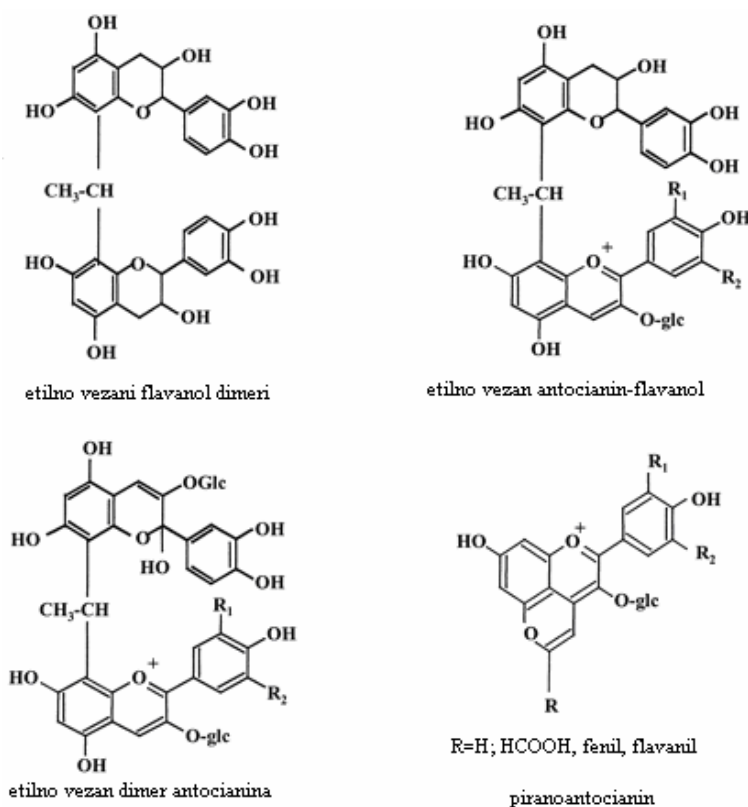
### 3 Kondenzacija ob nastanku etilnega mostička

Reakcija antocianinov in flavanolov pri posredovanju acetaldehida je značilna reakcija mikrooksidacije. Bistvo te reakcije je blago, kontrolirano dodajanje kisika (zorenje v sodih, oziroma umetno vpihovanje kisika – mikrooksidacija/mikrooksidacija), ki vodi v nastanek etanala iz etanola in tvorbo različnih fenolnih spojin. Acetaldehid igra pomembno vlogo v začetnih reakcijah polimerizacije med antocianini in ostalimi fenolnimi spojinami (García-Puente, 2006). Deluje kot mostiček med antocianinom in flavanoli med zorenjem in ima velik vpliv na barvo rdečih vin.

Mehanizem reakcije se začne s kondenzacijo acetaldehida s flavanolom in z nastankom vmesnega karbokationa, ki lahko reagira z novo molekulo flavanola ali hidrirano obliko antocianina. Detekcija morebitnih produktov kot so (+)-katehin-etil-dimernih mostičkov v vinu ali dimernih- oziroma trimernih-etilnih mostičkov med katehinom in epikatehinom ter (epi)katehin-etil-malvidin-3-glukozidom v modelnih raztopinah, je dokaz reakcij kondenzacije v rdečem vinu (Atanasova in sod., 2002). Nastali kompleksi dajejo vinu škrlatno oranžen odtenek – večjo absorbanco pri 420 in 620 nm. Tovrstna reakcija je relativno hitra in ob preveliki stopnji polimerizacije lahko pride do obarjanja nastalih pigmentov (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Margalit, 2004).



**Slika 11:** Struktura barvila, nastalega pri kondenzaciji antocianina in flavanola z acetalhidnim mostičkom;  
R = flavanol enote (Atanasova in sod., 2002).



Slika 12: Nekateri etilno vezani fenoli (Cheynier, 2005).

### 2.5.1.5 Ostale reakcije taninov

Tanini reagirajo tudi s proteini in polisaharidi (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). Pri reakciji s proteini gre predvsem za tvorbo nekovalentnih vezi, tako da se tanini vežejo na površino proteina, s tem zmanjšajo hidrofilni značaj tega in povzročijo nastajanje večjih kompleksov – »kepe«, ki se oborijo. Tvorba teh kompleksov je predvsem pomembna pri stabilizaciji vin, ne pa kot barvni kompleks. Enako velja za kompleks med tanini in polisaharidi, ki je bolj pomemben na primer pri iskrenju penečih vin.

Tanini oziroma proantocianidini se hitro oksidirajo, kar je tudi njihova funkcija v zaščiti vina. Oksidacija je lahko tako kemijska, kot encimska (lakaze, polifenol oksidaze – PFO) (Margalit, 2004). Fenoli so v bistvu lovilci radikalov, s tem pa se sami oksidirajo in tvorijo različne polimere in netopne rjave pigmente. Hitrost teh reakcij je pogojena s parametri (vrednost pH, temperatura vina, prisotnost drugih spojin, itd.).

Tanini so zelo nestabilni in kljub vsem zaščitam (inertna atmosfera, SO<sub>2</sub>, tema) polimerizirajo ter tvorijo najprej rumena barvila, ki lahko preidejo v rjava barvila, katera se na koncu posedejo na dno posode. Proantocianidini tvorijo v kislem mediju karbokatione, ki lahko reagirajo z drugimi proantocianidini in s tem povečajo stopnjo polimerizacije. Te reakcije neprestano potekajo, kljub morebitni odstranitvi katehinov (osnovna enota

kondenziranih taninov), ki se v vinu zaradi neprestanih reakcij ponovno pojavijo (Vivar-Quintana in sod., 2001). Ob močni oksidaciji pride do tvorbe neurejenih polimerov in hitrejšega izločanja le-teh iz vina (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Vivar-Quintana in sod., 2001; Margalit, 2004).

#### 2.5.1.5.1 Kopigmentacija

Ločimo dve vrsti kopigmentacije, in sicer (Boulton, 2001):

- intramolekularno: nastane med različnimi antocianini in je najbolj stabilna,
- intermolekularna: nastane med fenoli, ki niso antocianini, po večini hidroksicimetne kisline.

Proces kopigmentacije je pomemben predvsem za mlada rdeča vina, kjer pride do združitve med antocianini in ostalimi, običajno brezbarvnimi organskimi molekulami v vinu oziroma med antocianini samimi. Ta povezava povzroči, da koncentracija antocianinov ni linearno sorazmerna z intenziteto barve. Barva vina je bolj intenzivna kot bi pričakovali glede na koncentracijo antocianinov, prisotnih v vinu. Poznano je veliko število kofaktorjev, ki sodelujejo v procesu kopigmentacije z barvili, so med seboj v simbiozi oziroma tekmujejo med seboj za vezavo na določeno barvilo (Boulton, 2001).

Proces kopigmentacije med barvili in kofaktorji (kopigmenti) vključuje antocianine in določene fenolne kisline, flavonoide, predvsem derivate flavonolov in flavonov, kovinske ione ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Mg}^{2+}$ ), ki tvorijo komplekse predvsem s cianidinom, delphinidinom in petunidinom, kateri imajo vsaj dve OH skupini na B obroču (Ribéreau-Gayon in sod., 2000). Na proces kopigmentacije vpliva tudi vrednost pH, temperatura vina in vsebnost etanola, ki je prisoten v vinu in cepi tovrstne vezi, ter s tem zmanjšuje pomembnost reakcije kopigmentacije v vinu. Te reakcije so značilne za praktično polovico antocianinov mladih vin (Boulton, 2001). Pri določenih kofaktorjih je poleg povečanja intenzitete barve, zaznaven tudi premik absorpcijskega maksimuma za 5 do 20 nm višje v modro-vijolične odtenke barve (Boulton, 2001; Atanasova in sod., 2002). Barva kopigmentiranih antocianinov je lahko nekajkrat intenzivnejša v primerjavi s prostimi antocianini (Boulton, 2001). Pri tem igra veliko vlogo pri povečanju intenzitete vrsta antocianina, kofaktor, razmerje med kofaktorjem in barvilom ter vrednost pH (Boulton, 2001). Ravnotežje nastalega kompleksa se spreminja s stopnjo razredčitve in pri Beer-Lambertovega zakonu dobimo pri različnih razredčitvah različne rezultate (Boulton, 2001; Atanasova in sod., 2002). Pri razredčevanju pride do razpada kompleksa in vzpostavitve novega ravnotežja (Atanasova in sod., 2002). S tem lahko ločimo barvo, ki je posledica kopigmentacije oziroma polimerizacije.

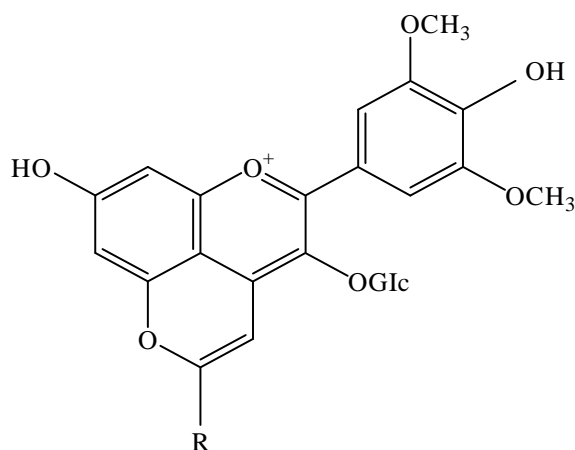
Pojav kopigmentacije je pomemben predvsem za barvo mladih rdečih vin. Povečanje obarvanosti je med dva- in desetkratno vrednostjo, v večini primerov med štiri- in



šestkratnim povečanjem obarvanosti barvil (Boulton, 2001). Pri nekaterih sortah je stopnja kopigmentacije manjša zaradi majhne vsebnosti kofaktorjev (npr. modri pinot), ki pa jih lahko povečamo (npr. z povečanjem vsebnosti antocianinov, kofaktorjev ali obeh). To je tudi eden izmed razlogov, zakaj so nekatera rdeča vina slabše obarvana kljub močni obarvanosti jagodne kožice (Boulton, 2001). Vsebnost kofaktorjev je omejena z začetno vsebnostjo teh v grozdju ali s kasnejšo topnostjo v vinu. V postopku staranja pride do preoblikovanja barvil iz monomernih oblik v polimerne, pri tem pa se spreminja tudi ravnotežno razmerje kofaktorjev, kateri se predvsem v prvem letu staranja oksidirajo ali hidrolizirajo (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Boulton, 2001).

Značilna reakcija tvorbe barvil, ki so stabilna in odporna na vezavo  $\text{SO}_2$ , je ciklo-adicija med antocianini in nekaterimi kvasnimi metaboliti, s polarizabilnimi dvojnimi vezmi, predvsem vinilfenolom, piruvično kislino in acetaldehidom. Slednji sodelujejo v mehanizmu nastajanja strukturno podobnih spojin piranoantocianinom (Atanasova in sod., 2002; Morata in sod., 2006). Vinilfenol nastaja z dekarboksilacijo *p*-kumarne kisline s kvasno dekarboksilazo, nato pa reagira z malvidinom (v glikolizirani ali acilirani monoglikolizirani obliki – *p*-kumaroilglukozid). Vitisin A in *p*-kumaroilvitisin A sta produkta reakcij piruvične kisline z malvidin-3-glukozidom oziroma malvidin-3-(6-*p*-kumaroil) glukozidom. Acetaldehid tvori z malvidin-3-glukozidom vitisin B in *p*-kumaroilvitisin B (Vivar-Quintana in sod. 2001; Morata in sod., 2006). Predvsem vinil-derivati predstavljajo bolj stabilna barvila (rdeče-rjava) zaradi vsebnosti še dodatnega aromatskega obroča v molekuli (Morata in sod., 2006).

Študije so pokazale, da nekateri piranoantocianini lahko reagirajo z nekaterimi spojinami v vinu, ki so posledica razgradnje etilno vezanih flavanol oligomerov in antocianin-etil-flavanol oligomerov (Alcalde-Eon in sod., 2006). Pri tem nastanejo »portisini«, ki imajo absorpcijski maksimum pri 575 nm in pripomorejo k modri barvi vina.



**Slika 13:** Struktura piranoantocianinov: Pirano-malvidin 3-glukozid: R=H; Karboksil-pirano-malvidin-3-glukozid: R=COOH; (epi)katehin-pirano-malvidin-3-glukozid: R = flavanol enote; Flavanol dimer-pirano-malvidin-3-glukozid: R = flavanolov dimer (Atanasova in sod., 2002).

Vsi ti reakcijski mehanizmi vplivajo na tvorbo novih barvil v vinu, ki nadomestijo antocianine, povečajo barvno stabilnost v povezavi z vrednostjo pH in z vsebnostjo SO<sub>2</sub> in izboljšajo kakovost okusa v povezavi s strukturo taninov (Castellari in sod., 2000, Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Atanasova in sod., 2002).

Kisik sodeluje pri reakcijah oksidacije, kondenzacije in polimerizacije, kjer so vključene različne spojine v vinu. Najbolj opazna sprememba je zmanjšanje vsebnosti fenolov, predvsem skupnih antocianinov, ki reagirajo s cinamati in acilnimi skupinami v reakciji polimerizacije (Pérez-Mangariño in sod., 2006). Kisik pospeši tvorbo polimernih kompleksov antocianin-tanin ter poveča modri ton barve, kot posledico nastajanja kompleksov z etilnimi mostički, ki pa so kemijsko nestabilni (Llaudy in sod., 2006). Ti naj bi po določenem času razpadli, pri čemer dobimo proste antocianine, poleg tega pa nastopijo strukturne preureditve (Pérez-Mangariño in sod., 2006; Llaudy in sod., 2006). Ugotovili so, da etanal, ki nastane pri mikrooksidaciji in sodeluje pri tvorbi etilnih mostičkov med antocianini in flavanoli, lahko sodeluje tudi pri nastajanju piranoantocianinov, zelo pomembnih barvnih spojin zorenih vin (Llaudy in sod., 2006). Kisik je dobrodošel predvsem pred jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo, ker zmanjša posedanje barvil, kar je tipično med tem procesom (Goals ..., 2001).

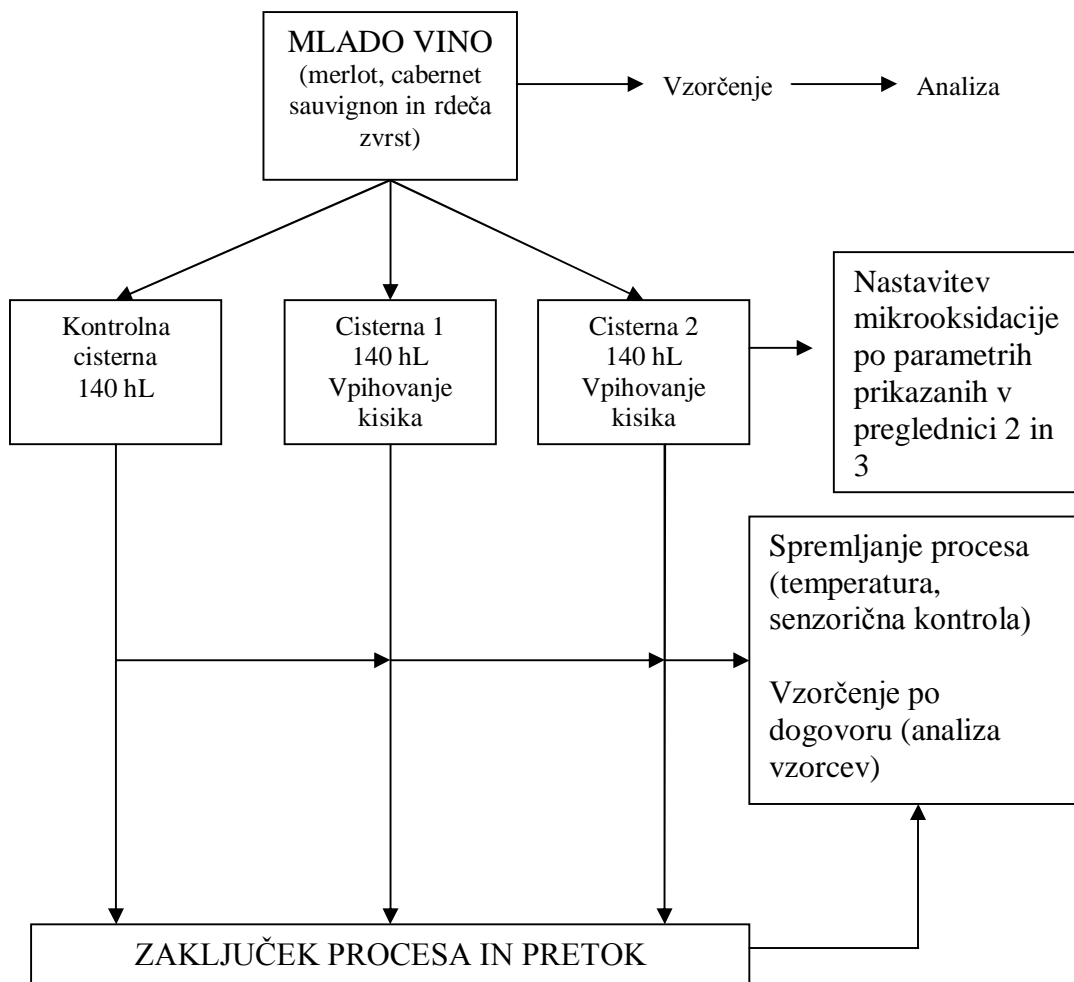
## 2.5.2 VPLIV KISIKA NA TRPKOST IN GREKBO VINA

Fenoli so osnovne molekule, ki dajejo vinu grenak okus in občutek trpkosti. Monomerne enote prispevajo bolj h grenkobi vina (tudi k trpkosti s tvorbo kompleksov katehin-protein), medtem ko z naraščanjem polimerizacije le-teh se občutek trpkosti hitreje povečuje kot grenkoba (Lea in Arnold, 1978; Arnold in sod., 1980; Robichaud in Noble, 1990). Dodatek monomernih molekul flavan-3-olov v vino poveča občutek grenkobe in trpkosti v primerjavi s kontrolnimi vzorci, vendar ne sorazmerno enako. Okus grenkobe je izrazitejši od občutka trpkosti (Fischer, 1990; Fischer in sod., 1994). Povečanje občutka trpkosti vina je bistveno manjše. Obratno se zgodi pri dodatku neflavonoidnih polimerov taninskih kislin, ki bistveno povečajo občutek trpkosti v primerjavi z grenkobo (Fischer, 1990; Fischer in sod., 1994). Pri tem ne gre le za velikost polimera, temveč tudi za tip kovalentne vezi, ki se tvori med monomeri in prispeva k intenzivnosti zaznave trpkosti (Gacon in sod., 1996). Na primer, dimeri katehina z vezjo 4-6 so bolj grenki od teh z vezjo 4-8. Velja pa tudi, da so monomeri in večji polimeri bolj grenki kot dimeri, trimeri ter tetrameri (Gawel, 1998). Stopnja polimerizacije ni edini parameter, ki vpliva na povečanje zaznave grenkobe in trpkosti, pri tem sodeluje tudi konformacija molekul. Na primer (-)-epikatehin je bolj trpek in grenek kot njegov kiralni izomer (+) katehin. Epikatehin ima bolj planarno strukturo in s tem lažje tvori intermolekularne vodikove vezi hidroksilnih molekul – povečanje občutka trpkosti (Thorngate in Noble, 1995; Gacon in sod., 1996).

Mikrooksigenacija je učinkovit postopek zmanjšanja trpkosti vin (Llaudy in sod., 2006). Velikost molekule proantocianidina naj bi bila sorazmerno povezana s intenziteto trpkosti (Vidal in sod., 2004). Zaradi delovanja kisika pride do obarjanja proantocianidinov zaradi visoke stopnje polimerizacije oziroma kondenzacije teh s antocianini, kar zmanjša občutek trpkosti.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 POTEK POSKUSA



Slika 14: Potek mikrooksidacije za posamezno vrsto vina.

Figure 14: The process of microoxygenation according to individual type of wine.

#### 3.2 MATERIALI

Poskus je bil izveden v Vinski kleti Goriška Brda z.o.o dve leti zaporedoma in sicer v vinih letnika 2005 in 2006. Prvo leto smo uporabili vino merlot in zvrst rdečega vina (merlot, cabernet sauvignon, cabernet franc, modri pinot v različnih deležih), v drugem letu pa smo rdečo zvrst zamenjali z vinom cabernet sauvignon. Po predhodni tipizaciji smo vsako vino pretočili v tri betonske cisterne prostornine 140 hL, kjer je ena cisterna predstavljala kontrolni vzorec, v ostali dve pa smo vpihovali različne količine kisika. Betonske cisterne so bile opremljene s hladilnimi napravami. Zaradi ostre zime smo v prvem letu naleteli na problem hitrega padca temperature vina pod dopustno mejo vodenja mikrooksidacije,

kar nas je prisililo, da smo po dobrem mesecu mikrooksigenacijo prekinili za določen čas in nadaljevali, ko so okoljske razmere v kleti to dovoljevale. Sam potek poskusa in količina vpihovanega kisika sta navedeni v preglednici 3.

V slikah in preglednicah so podatki oziroma rezultati označeni s sledečimi kraticami:

**Preglednica 2:** Kratice.

**Table 2:** Abbreviations.

OZNAKA	POMEN
MK 05	Merlot kontrola letnik 2005
M1 05	Merlot 1 letnik 2005
M2 05	Merlot 2 letnik 2005
PK 05	Rdeča zvrst (prešanec) kontrola letnik 2005
P1 05	Rdeča zvrst (prešanec) 1 letnik 2005
P2 05	Rdeča zvrst (prešanec) 2 letnik 2005
MK 06	Merlot kontrola letnik 2006
M1 06	Merlot 1 letnik 2006
M2 06	Merlot 2 letnik 2006
CSK 06	Cabernet sauvignon kontrola letnik 2006
CS1 06	Cabernet sauvignon 1 letnik 2006

**Preglednica 3:** Potek poskusa mikrooksigenacije v vinih letnika 2005.

**Table 3:** Application of the microoxygenation in wines of vintage 2005.

Temperatura (°C)	Količina vpihovanega kisika (mL/L/mesec)						
	14,2	12,2	11,0	10,3	9,3	8,2	10,2
Datum	15.11.2005	28.11.2005	05.12.2005	12.12.2008	19.12.2005	23.03.2006	24.04.2006
MK 05	/	/	/	/	/	/	Zaključek poskusa
M1 05	5	3	2	2	/	2	
M2 05	15	6	4	2	/	2	
PK 05	/	/	/	/	/	/	
P1 05	15	10	6	3	/	3	
P2 05	20	15	8	3	/	3	
Število dni od začetka poskusa	0	13	20	27	34	128 (94 dni mirovanja)	

V drugem letu poskusa smo imeli na razpolago vina merlot in cabernet sauvignon letnika 2006. Poskus je bil zasnovan na enak način, le da smo v tem primeru imeli le dve cisterni vina cabernet sauvignon, kjer je ena služila za kontrolo, v drugo pa smo vpihovali kisik. Potek poskusa in količine vpihovanega kisika so navedene v preglednici 4.

**Preglednica 4:** Potek poskusa mikrooksigenacije v vinih letnika 2006.

**Table 4:** Application of the microoxygenation in wines of vintage 2006.

	Količina vpihovanega kisika (mL/L/mesec)						
Temperatura (°C)	16,0	15,5	14,7	12,5	11,7	10,5	9,3
Datum	13.11.2006	20.11.2006	04.12.2006	11.12.2006	15.01.2007	22.01.2007	05.03.2007
MK 06	/	/	/	/	/	/	Zaključek poskusa
M1 06	5	5	5	3	3	1,5	
M2 06	10	10	10	7	7	3,5	
CSK 06	10	/	/	/	Zaključek poskusa	/	/
CS1 06	15	15	15	10		/	/
Število dni od začetka poskusa	0	7	21	28	63	70	112

Kemijske in spektrofotometrične analize smo opravili na Katedri za vinarstvo Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani v treh ponovitvah. Kromatografske analize smo opravili na Katedri za tehnologijo rastlinskih živil, Biotehnične fakultete ter na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Ljubljani. Vzorci so bili do analiz in med analizami hranjeni v hladilnici oziroma hladilniku pri temperaturi 5-8 °C in zaščiteni pred kisikom.

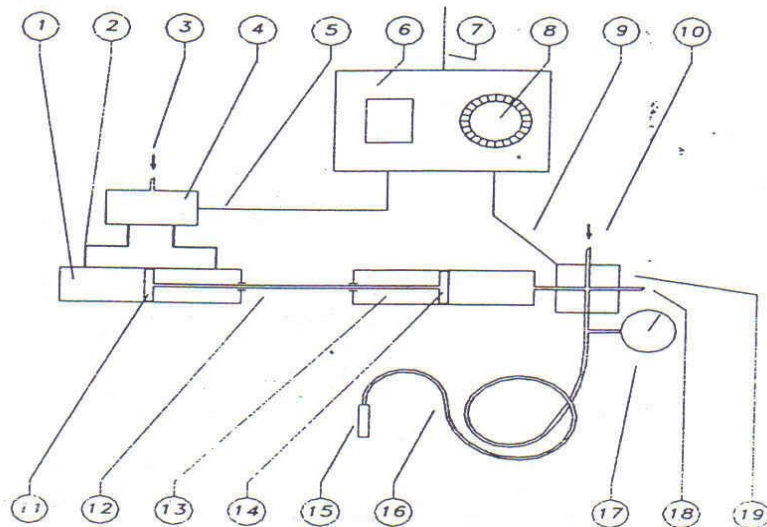
### 3.3 VPIHOVANJE KISIKA

Pri poskusu smo uporabili aparaturo MICRODUE® italijanskega proizvajalca JU.CLA.S. s točnim volumetričnim doziranjem kisika preko bata. Količino dovedenega kisika je možno spreminjati z uravnavanjem tlaka kisika na batu in s frekvenco delovanja samega bata.

Na mikrooksidator lahko priključimo do štiri dozirne sonde, ki dovajajo kisik vsaka v svoj procesirani vzorec. Z uravno frekvence delovanja bata lahko dovajamo različne količine kisika z vsako sondo posebej oziroma iste količine v različne vzorce vina.



**Slika 15:** Mikrooksidator MICRODUE® (Microossigenazione – Microdue, 2005).



**Slika 16:** Shema volumetričnega dovajanja kisika (Microossigenazione – Microdue, 2005).

Legenda: 1. pnevmatski bat, 2. povezava zraka, 3. dovod zraka pod tlakom, 4. elektronski ventil bata, 5. električna povezava, 6. komandna plošča, 7. električni kabel, 8. časomer, 9. električna povezava, 10. dovod kisika, 11. pnevmatsko vodilo bata, 12. povezovalna gred, 13. dozirna sonda, 14. vodilo dozirne sonde, 15. difuzor, 16. cev za dovajanje kisika, 17. manometer, 18. atmosferska izravnava, 19. distribucijski ventil.

### 3.4 METODE DELA

#### 3.4.1 VZORČENJE

Vzorčenje v prvem in drugem letu je potekalo po naslednjem razporedu.

**Preglednica 5:** Potek vzorčenja vina pri poskusu mikrooksigenacije za vina letnika 2005.

**Table 5:** Sampling of wine during the process of microoxygenation of vintage 2005.

Datum vzorčenja	15.11.2005	28.11.2005	19.12.2005	03.02.2006	23.03.2006	24.04.2006
Št. dni od začetka poskusa	0	13	34	80	128	159
Oznaka vzorcev	1	2	3	4	5	6

Vzorke vina smo natočili v čiste suhe steklenice prostornine 1 liter, zaprli s kronske pokrovčkom in postavili v hladilnico do analize. V prvem letu smo spremljali potek poskusa s klasičnimi analizami – titrimetrične, potenciometrične, spektrofotometrične metode.

**Preglednica 6:** Potek vzorčenja vina pri poskusu mikrooksigenacije za vina letnika 2006.

**Table 6:** Sampling of wine during the process of microoxygenation of vintage 2006.

Datum vzorčenja	13.11.2006	23.11.2006	06.12.2006	08.01.2007	05.03.2007	28.05.2006
Št. dni od začetka poskusa	0	10	23	56	112	196
Oznaka vzorcev	1	2	3	4	5	6

V drugem letu poskusa smo dali večji poudarek na senzorične in predvsem kromatografske analize. Zadnje vzorce smo uporabili za kromatografske analize s HPLC-MS in GC-MS, medtem ko smo klasične analize (titrimetrične, potenciometrične, spektrofotometrične metode) izvedli le pred začetkom in po zaključku poskusa. Vzorce vina vmesnih vzorčenj smo tudi senzorično analizirali.

#### 3.4.2 SPEKTROFOTOMETRIČNE METODE

##### 3.4.2.1 Določanje intenzitete ali gostote barve po Ilandu in sod.

###### Princip metode:

Intenziteto barve smo določili s spektrofotometrično metodo, pri kateri vzorec vina razredčimo s pufrno raztopino s  $\text{pH} = 3,5$  v določenem razmerju glede na zvrst vina in izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 420 nm in 520 nm proti slepemu vzorcu (deionizirana voda). Intenziteta barve je vsota absorbance svetlobe pri valovni dolžini 420 nm, ki predstavlja vsebnost rdeče obarvanih barvil in absorbance svetlobe pri valovni



dolžini 520 nm, ki predstavlja vsebnost rumenih-rjavih barvil. Dobljene vrednosti ustrezajo vizualnim opisom vina. Vrednosti med 0 in 6 ustrezajo svetlejšemu obarvanemu vzorcem, med 6 in 10 srednje rdečim, nad 10 temno rdečemu obarvanemu vzorcem (Iland in sod., 2000).

$$\text{Intenziteta barve} = A_{420} + A_{520} \quad \dots(3)$$

#### **Instrumenti in reagenti:**

- spektrofotometer: UV – 160 A SHIMADZU
- pH meter: Mettler Toledo DL 50, Švica
- 10 mm kvarčna kiveta
- epruvete
- avtomatska pipeta
- kapalke
- pufer s pH = 3,5

#### **Opis dela:**

Vzorci vina smo predhodno razredčili v razmerju, da smo prišli v verilno območje spektrofotometra. Razredčitve smo opravili s fosfatno pufrno raztopino, ki smo jo predhodno pripravili, tako da smo se približali vrednosti pH vina (cca pH = 3,5). Razredčen vzorec smo dobro premešali in prenesli v 10 mm kvarčno kiveto ter jim na spektrofotometru izmerili absorbanco pri valovnih dolžinah 420 in 520 nm. Dobljene vrednosti smo sešteli, pomnožili z razredčitvenim faktorjem in podali kot rezultat.

#### **3.4.2.2 Določanje tona ali nianse barve**

##### **Princip metode:**

Metoda je enaka kot pri določanju intenzitete barve. Za izračun smo uporabili naslednjo enačbo (Košmerl in Kač, 2004):

$$\text{ton barve} = \frac{A_{420}}{A_{520}} \quad \dots(4)$$

Izračunani koeficient predstavlja odtenek ali nianso barve vina.

#### **Instrumenti in reagenti:**

- spektrofotometer: UV – 160 A SHIMADZU
- pH meter: Mettler Toledo DL 50, Švica
- 10 mm kvarčna kiveta

- epruvete
- avtomatska pipeta
- kapalke
- pufer s pH = 3,5

#### **Opis dela:**

Princip dela je enak kot pri določanju intenzitete barve. Pri izračunu določimo kvocient dobljenih absorbcanc.

#### **3.4.2.3 Ocena vsebnosti barvil odpornih na SO<sub>2</sub>**

##### **Princip metode:**

Vzorcu vina dodamo prebitek SO<sub>2</sub> in izmerimo absorbanco pri 520 nm ( $A_{520}^{SO_2}$ ), ki nam da oceno koncentracije rdečih barvil, ki so odporna na vezavo z SO<sub>2</sub>. To so v glavnem polimerne in tudi manjše molekule – dimeri, trimeri (Iland in sod., 2000).

$$\text{vsebnost barvil odpornih na SO}_2 \text{ (a.u.)} = A_{520}^{SO_2} \quad \dots(5)$$

##### **Instrumenti in reagenti:**

- spektrofotometer: UV – 160 A SHIMADZU
- 10 mm kvarčna kiveta
- epruvete
- avtomatska pipeta
- kapalke
- 25 % (w/v) raztopina K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

##### **Priprava raztopin:**

###### 25 % (w/v) raztopina K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

V 100 mL bučko smo zatehtali 25 g kalijevega metabisulfita (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Merck, kataloška št. 1.05057.0500) in ga raztopili v deionizirani vodi, ki smo jo dolili do oznake na bučki.

##### **Opis dela:**

V epruveto smo odpipetirali 10 mL vina in dodali 150 µL 25 % (w/v) raztopine K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, dobro premešali, prelili v 10 mm kvarčno kiveto in izmerili absorbanco pri 420 in 520 nm.

### 3.4.2.4 Ocena vsebnosti rdečih barvil brez učinka SO<sub>2</sub>

#### Princip metode:

Dodatek prebitka CH<sub>3</sub>CHO v vzorec povzroči izničenje delovanja vezave barvil z SO<sub>2</sub> (Iland in sod., 2000) in omogoča lažjo primerjavo vzorcev med seboj:

$$\text{Modificirana intenziteta barve} = A_{520}^{CH_3CHO} + A_{420}^{CH_3CHO} \quad \dots(6)$$

$$\text{Modificiran ton barve} = \frac{A_{420}^{CH_3CHO}}{A_{520}^{CH_3CHO}} \quad \dots(7)$$

$$\text{Modificiran delež rdečih barvil (\%)} = \left( \frac{A_{520}^{CH_3CHO}}{A_{520}^{HCl}} \right) \times 100 \quad \dots(8)$$

#### Instrumenti in reagenti:

- spektrofotometer: UV – 160 A SHIMADZU
- 10 mm kvarčna kiveta
- epruvete
- avtomatska pipeta
- kapalke
- 10 % (w/v) raztopina CH<sub>3</sub>CHO

#### Priprava raztopin:

##### 10 % (w/v) raztopina CH<sub>3</sub>CHO

V 100 mL bučko smo odpipetirali 10 mL acetaldehida (CH<sub>3</sub>CHO, Merck, kataloška št. 8.00004.0500) in dopolnili z deionizirano vodo do oznake.

#### Opis dela:

V epruveto smo odpipetirali 10 mL vina in dodali 100 µL 10 % (w/v) raztopine CH<sub>3</sub>CHO, dobro premešali in po 45 min izmerili absorbanco v 10 mm kvarčni kiveti pri 420 in 520 nm.

### 3.4.2.5 Določanje deleža (%) rdeče barve po Ilandu in sod. (2000)

#### Princip metode:

Delež rdeče barve smo določili spektrofotometrično. Vzorec vina razredčimo z 1 M raztopino HCl in izmerimo absorbanco pri 520 nm ( $A_{520}^{HCl}$ ). Pri tako nizki vrednosti pH so vsi antocianini in druga barvila v rdeče obarvani obliki (Iland in sod., 2000).

$$\text{delež (\%)} \text{ rdečega barvila} = \frac{A_{520}}{A_{520}^{HCl}} \times 100 \times \frac{R_1}{R_2} \quad \dots(9)$$

### Instrumenti in reagenti:

- spektrofotometer: UV – 160 A SHIMADZU
- 10 mm kvarčna kiveta
- epruvete
- avtomatska pipeta
- kapalke
- 1 M raztopina HCl

### Priprava raztopin:

#### 1 M raztopina HCl:

82,9 mL 37 % klorovodikove kisline (HCl, Merck, kataloška št. 1.00317.1000;  $\rho = 1,190 \text{ g/mL}$ ) smo odpipetirali v 1000 mL bučko in dopolnili z deionizirano vodo do oznake.

### Opis dela:

V epruveto smo odpipetirali 10 mL 1 M raztopino HCl in nato dodali 100  $\mu\text{L}$  vzorca vina. Vsebinsko epruvete smo dobro premešali in po treh urah izmerili absorbanco pri 520 nm. Dobljene vrednosti smo vstavili v enačbo 9 ob upoštevanju razredčitev ( $R_1 = 5$ ,  $R_2 = 101$ ) in dobili delež (%) rdečega barvila v vzorcu.

#### 3.4.2.5.1 Določanje deleža (%) rdeče barve

### Princip metode:

Metoda je enaka kot pri določanju intenzitete barve. Pri tem pa izmerimo še absorbanco pri 620 nm in izračunamo delež rdeče barve – prostih in vezanih antocianinov v obliki flavilijevega kationa z naslednjo enačbo (Košmerl in Kač, 2004):

$$\text{dAF (\%)} = \left( A_{520} - \frac{(A_{420} + A_{620})}{2} \right) \times \frac{1}{A_{520}} \times 100 \quad \dots(10)$$

Delež (%) rdečebarnih snovi pri posamezni valovni dolžini:

$$\text{pri 420 nm:} \quad \text{dA420 (\%)} = \left( \frac{A_{420}}{I} \right) \times 100 \quad \dots(11)$$

$$\text{pri 520 nm:} \quad dA_{520} (\%) = \left( \frac{A_{520}}{I} \right) \times 100 \quad \dots(12)$$

$$\text{pri 620 nm:} \quad dA_{620} (\%) = \left( \frac{A_{620}}{I} \right) \times 100 \quad \dots(13)$$

$$\text{Intenziteta barve} \quad I = \sum (A_{420} + A_{520} + A_{620}) \quad \dots(14)$$

#### **Instrumenti in reagenti:**

- spektrofotometer: UV – 160 A SHIMADZU
- pH meter: Mettler Toledo DL 50, Švica
- 10 mm kvarčna kiveta
- epruvete
- avtomatska pipeta
- kapalke
- pufer s pH = 3,5

#### **Opis dela:**

Princip dela je enak kot pri določanju intenzitete barve. Pri izračunu dobimo delež (%) rdeče barve v obliki flavilijevega kationa in delež (%) barvnih snovi pri posamezni valovni dolžini.

#### **3.4.2.6 Določanje skupnih antocianinov**

##### **Princip metode:**

Barva rdečega vina je posledica ekstrakcije antocianinov iz jagodnih kožic med maceracijo in nadaljnjih sprememb med vinifikacijo zaradi številnih vplivov (pH, vsebnost SO<sub>2</sub>, polimerizacije, temperature vina). Pri vrednosti pH vina med 3,3-4,3 obstaja v ravnotežju več molekularnih oblik vsakega antocianina. Z znižanjem vrednosti pH vina na 0,5-0,8 preidejo vsi antocianini v obarvano obliko (flavilijev ion), zato lahko določimo njihovo masno koncentracijo tako, da izmerimo absorbanco vzorcev pri 520 nm in izračunamo masno koncentracijo antocianinov s pomočjo koeficienta, ki upošteva molarno absorptivnost in molsko maso prevladujočega barvila (Ough in Amerine, 1988).

##### **Instrumenti in materiali:**

- spektrofotometer: UV – 160 SHIMADZU
- analitska tehnica: AEA – 220 A
- avtomatska pipeta

- epruvete
- 10 mm kvarčna kiveta
- 100 mL bučka
- filter papir
- C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 95 % (Merck, kataloška št. 1.59010.0500)
- 35-37 % HCl (Merck, kataloška št. 1.00317.1000;  $\rho = 1,190$  g/mL)

### **Priprava raztopin:**

#### 0,1 % etanolna raztopina HCl (v/v):

V 500 mL bučko odpipetiramo 1,38 mL koncentrirane HCl in do oznake dopolnimo z 95 % etanolom.

#### 2 % raztopina klorovodikove kisline (v/v):

V 1000 mL bučko odpipetiramo 45,23 mL koncentrirane HCl (35-37 % HCl,  $\rho = 1,190$  g/mL) in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo.

### **Opis dela:**

V dve epruveti smo odpipetirali po 1 mL bistrega predhodno filtriranega vzorca in dodali po 1 mL 0,1 % raztopine HCl v 95 % etanolu. V prvo epruveto smo odpipetirali 10 mL 2 % raztopine HCl, v drugo pa 10 mL deionizirane vode in dobro premešali. V 10 mm kvarčni kiveti smo izmerili absorbanco obeh vzorcev proti slepemu vzorcu (pripravimo ga po enakem postopku, le da namesto vzorca vina uporabimo deionizirano vodo). Iz dobljenih podatkov smo izračunali razliko med prvo ( $A_1$ ) in drugo ( $A_2$ ) epruveto in dobljeno vrednost pomnožili s faktorjem, ki vključuje molsko maso barvila, molarno absorptivnost in faktor razredčitve. Iz dobljenih vrednosti smo izračunali masno koncentracijo antocianinov po naslednji enačbi:

$$\text{Antocianini (mg/L)} = (A_1 - A_2) \times f \quad \dots(15)$$

f – empirični faktor = 386,598 mg/L

### **3.4.2.7 Določanje skupnih in netaninskih polifenolov ter skupnih neflavonoidov s formaldehidom**

#### 3.4.2.7.1 Priprava umeritvene krivulje galne kisline

#### **Princip metode:**

Galna kislina deluje kot oksidant, ki omogoča redukcijo volframove in molibdenove kisline oziroma njenih soli v Folin-Ciocalteau reagentu. Uporabljamo jo kot standardno referenčno spojino za določanje skupnih in netaninskih fenolov. Pri reakciji Folin-

Ciocalteau reagenta in različnih koncentracij galne kisline nastanejo modro obarvani produkti, katerim izmerimo absorbanco (pri valovni dolžini 765 nm). Iz rezultatov pripravimo umeritveno krivuljo, ki nam služi za izračun masne koncentracije skupnih in netaninskih fenolov ter skupnih ne flavonoidov. Zaradi širokega spektra fenolnih spojin se za ovrednotenje uporablja določena standardna enota, ki predstavlja količino galne kisline, potrebne za doseg enake absorbance kot vse fenolne spojine skupaj. Tako podajamo skupne fenole kot ekvivalent galne kisline (Določanje polifenolov, 1995).

### **Instrumenti in reagenti:**

- spektrofotometer: UV – 160 SHIMADZU
- analitska tehtnica: AEA – 220A
- avtomatska pipeta
- 100 mL merilne bučke
- kapalke
- 10 mm kvarčna kiveteta
- galna kislina (3,4,5 – trihidroksibenzojeva kislina), Sigma, kataloška št. 044K0183
- Folin-Ciocalteujev reagent (F.C.), Merck, kataloška št. 1.09001.0500
- 20 % raztopina natrijevega karbonata (w/v), Merck, kataloška št. 1.063920500
- absolutni etanol
- deionizirana voda

### **Priprava raztopin:**

#### Osnovna raztopina galne kisline:

V 100 mL bučko zatehtamo 500 mg galne kisline, dodamo 10 mL absolutnega etanola, raztopimo in razredčimo do oznake z deionizirano vodo.

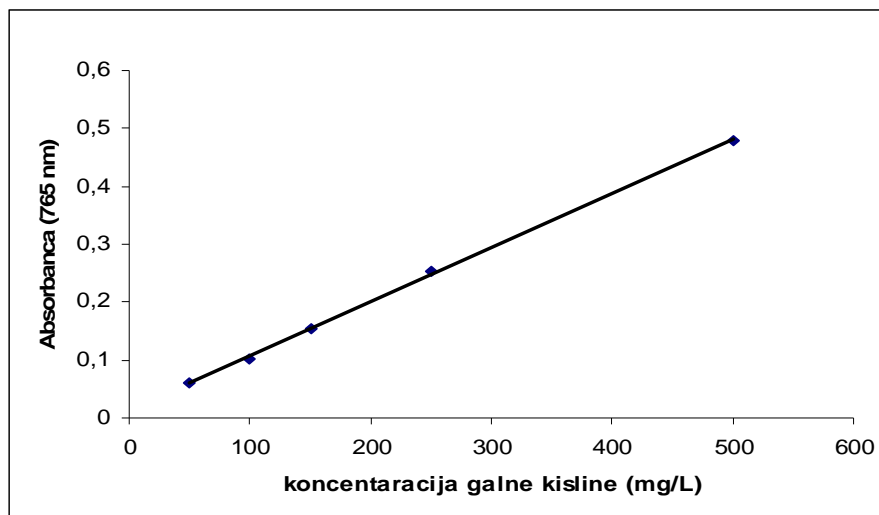
#### Folin-Ciocalteau reagent (F.C.)

Tik pred uporabo razredčimo komercialni reagent z deionizirano vodo po navodilih proizvajalca, v našem primeru v razmerju 1:2.

### **Opis dela:**

Po pripravi osnovne raztopine galne kisline odpipetiramo v šest bučk naslednje volumne osnovne raztopine: 0, 1, 2, 3, 5, 10 mL, dopolnimo s približno 60 mL deionizirane vode, raztopino dobro premešamo in dodamo v vsako po 5 mL F.C. reagenta. Raztopino spet dobro premešamo in po 30 s (najkasneje po 8 min) dodamo 15 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata. Raztopino spet premešamo in dopolnimo do oznake. Po dveh urah pri 20 °C izmerimo absorbanco proti slepemu vzorcu (brez dodatka osnovne raztopine galne kisline) v 10 mm kivetah pri valovni dolžini 765 nm.

Umeritvena krivulja:  $y = 0,0009x + 0,0139$  ... (16)  
 $R^2 = 0,9996$



Slika 17: Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin.

#### 3.4.2.7.2 Določanje masne koncentracije skupnih fenolov

##### Princip metode:

Za določanje koncentracije skupnih fenolnih snovi dodamo v primerno razredčena vina (rezultati meritev absorbanca naj bi bil v območju 0,05 do 0,6 a.u.) F.C. reagent, ki v alkalni raztopini (dodatek natrijevega karbonata) oksidira fenolne snovi. Oksidacija fenolnih snovi s F.C. reagentom temelji na reakciji z mešanico fosfovolframove ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) in fosfomolibdenove ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) kisline oziroma njunih soli v vodni raztopini ter litijevega sulfata (slednji prepreči obarvanje F.C. reagenta) v alkalnem mediju. Redukcija volframove(VI) in molibdenove(VI) kisline poteče le v prisotnosti fenolatnega iona. Pri tem pa nastane mešanica modrih oksidov ( $W_8O_{23}$  in  $Mo_8O_{23}$ ). Modro obarvan reakcijski produkt določimo z merjenjem absorbanca pri 765 nm. Rezultat podamo kot mg galne kisline/L (Določanje polifenolov, 1995).

##### Instrumenti in reagenti:

- spektrofotometer: UV – 160 SHIMADZU
- analitska tehnica: AEA – 220A
- avtomatska pipeta
- 100 mL merilne bučke
- kapalke
- 10 mm kvarčna kiveta
- galna kislina (3,4,5 – trihidroksibenzojska kislina), Sigma, kataloška št. 044K0183



- raztopina F.C. reagent, Merck, kataloška št. 1.09001.0500
- 20 % raztopina natrijevega karbonata (w/v), Merck, kataloška št. 1.063920500
- deionizirana voda
- absolutni etanol

### **Priprava raztopin:**

#### Osnovna raztopina galne kisline:

V 100 mL bučko zatehtamo 500 mg galne kisline, dodamo 10 mL absolutnega etanola, raztopimo in razredčimo do oznake z deionizirano vodo.

#### F.C. reagent:

Tik pred uporabo razredčimo komercialni reagent z deionizirano vodo po navodilih proizvajalca, v našem primeru v razmerju 1:2.

#### 20 % raztopina Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:

V 1000 mL bučko zatehtamo 200 g natrijevega karbonata, dopolnimo z deionizirano vodo skoraj do oznake in segrevamo, dokler se natrijev karbonat popolnoma raztopi. Raztopino ohladimo na sobno temperaturo (20 °C) in dopolnimo do oznake.

### **Opis dela:**

Vzorci smo pred analizo razredčili v razmerju 1:5 in nato odpipetirali po 1 mL tako razredčenega vzorca v 100 mL merilno bučko, naprej pa postopali isto kot pri umeritveni krivulji. Na podlagi umeritvene krivulje smo iz dobljenih absorbanca vzorcev in ob upoštevanju razredčitvenega faktorja ( $R = 5$ ) izračunali koncentracijo skupnih fenolov v vzorcu.

#### 3.4.2.7.3 Določanje masne koncentracije netaninskih fenolov

### **Princip metode:**

Netaninske fenole določimo s spektrofotometrično metodo z uporabo F.C. reagenta. Postopek obarvanja temelji najprej na reakciji metilceluloze ter diamonijevega sulfata z vzorcem in nato s F.C. reagentom (Določanje polifenolov, 1995).

### **Instrumenti in reagenti:**

- spektrofotometer: UV – 160 SHIMADZU
- analitska tehtnica: AEA – 220A
- centrifuga: EPPENDORF Centrifuge 5810, Nemčija
- centrifugirke
- avtomatska pipeta

- 100 mL merilne bučke
- kapalke
- 10 mm kvarčna kiveta
- 0,4 % raztopina metilceluloze (BioChemika, kataloška št. 64605)
- nasičena raztopina amonijevega sulfata  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck, kataloška št. 1.01217.1000)
- F.C. reagent (Merck, kataloška št. 1.09001.0500)
- 20 % raztopina natrijevega karbonata  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (w/v), (Merck, kataloška št. 1.063920500)
- deionizirana voda

### **Priprava raztopin:**

#### 0,4 % raztopina metilceluloze:

V 100 mL bučko zatehtamo 0,4 g metilceluloze, raztopimo in dopolnimo z deionizirano vodo.

#### Nasičena raztopina amonijevega sulfata $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ :

V deionizirani vodi raztapljamo amonijev sulfat do točke nasičenja. To dosežemo, ko se na dnu čaše ali bučke začnejo nabirati kristali amonijevega sulfata.

### **Opis dela:**

V 10 mL centrifugirko odpipetiramo 2 mL vzorca vina, dodamo 1 mL 0,4 % raztopine metilceluloze, 2 mL nasičene raztopine  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in dopolnimo z deionizirano vodo do 10 mL. Dobljeno mešanico, ki se je izkosmičila, centrifugiramo 10 min pri 4000 obratih/minuto.

1 mL supernatanta odpipetiramo v 100 mL merilno bučko, dodamo 60 mL deionizirane vode, raztopino dobro premešamo in dodamo v vsako po 5 mL F.C. reagenta. Raztopino spet dobro premešamo in po 30 s (najkasneje po 8 min) dodamo 15 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata. Raztopino spet premešamo in dopolnimo do oznake. Po dveh urah pri 20 °C izmerimo absorbanco proti slepemu vzorcu v 10 mm kivetah pri valovni dolžini 765 nm. Masno koncentracijo netaninskih fenolov izračunamo iz podatkov umeritvene krivulje za galno kislino.

#### 3.4.2.7.4 Določanje skupnih neflavonoidov s formaldehidom

### **Princip metode:**

Skupne neflavonoide določimo s spektrofotometrično metodo z uporabo F.C. reagenta. Predhodno mora vzorec reagirati z raztopino HCl in formaldehidom, nato sledi barvna reakcija z F.C. reagentom.

### **Instrumenti in reagenti:**

- spektrofotometer: UV – 160 SHIMADZU
- analitska tehtnica: AEA – 220A
- filter papir – 0,45 µm
- avtomatska pipeta
- 25 mL merilne bučke
- 100 mL merilne bučke
- kapalke
- 10 mm kvarčna kiveta
- raztopina HCl (1:4), (Merck, kataloška št. 1.00317.1000)
- formaldehid, (Merck, kataloška št. 1.04003)
- F.C. reagent, (Merck, kataloška št. 1.09001.0500)
- 20 % raztopina natrijevega karbonata Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (w/v), (Merck, kataloška št. 1.063920500)
- deionizirana voda

### **Priprava raztopin:**

#### Raztopina formaldehida:

V 100 mL bučko smo odpipetirali 2,16 mL formaldehida in dopolnili z deionizirano vodo do oznake.

#### Raztopina HCl (1:4):

37 % koncentrirano HCl smo razredčili v razmerju 1:4 z deionizirano vodo.

### **Opis dela:**

V 25 mL bučke smo odpipetirali po 10 mL vzorca, 10 mL raztopine HCl (1:4) in 5 mL raztopine formaldehida, zaprli, dobro premešali in pustili stati 24 h. Vzorce smo prefiltrirali skozi filter papir premera por 0,45 µm. Nekaj filtrata smo najprej spustili ven, ker se nekaj barve veže na filter papir in šele nato ulovili filtrat v epruveto. En mililiter filtrata smo odpipetirali v 100 mL merilno bučko in naprej postopali kot pri določanju skupnih fenolov z dodatkom F.C. reagenta, natrijevega karbonata in merjenjem absorbance pri 765 nm. Masno koncentracijo skupnih ne flavonoidov smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje za galno kislino.

### 3.4.3 ELEKTROKEMIJSKE ANALIZE

#### 3.4.3.1 Določanje vrednosti pH

##### **Princip metode:**

Merimo razliko potencialov med dvema elektrodama. Potencial ene od elektrod je odvisen od vrednosti pH tekočine, medtem, ko ima druga elektroda konstanten potencial in jo imenujemo referenčna elektroda. Za meritev vzamemo 50 mL mošta ali vina. Napaka pH-metra znaša 0,1 %.

##### **Instrumenti in reagenti:**

- pH meter: Mettler Toledo DL50, Version 2.4, Švica
- magnetno mešalo
- čaše
- kapalke
- pufrna raztopina s pH 3 = raztopina citronske kisline (Merck, kataloška št. 1.09434.1000)
- pufrna raztopina s pH 4 = Mettler-Toledo,  $4,01 \pm 0,02$  (kataloška št. 51340057)
- pufrna raztopina s pH 7 = Mettler-Toledo,  $7,00 \pm 0,02$  (kataloška št. 51340059)
- elektrolit, KCl 3 mol/L nasičen z AgCl, Mettler-Toledo (kataloška št. 51340045)

##### **Opis dela:**

Po umeritvi pH-metra s standardnimi pufrnimi raztopinami izmerimo vrednost pH vina. V približno 50 mL vzorca vina smo potopili elektrodo skupaj z mešalom in na zaslonu odčitali vrednost pH vzorca.

### 3.4.4 TITRIMETRIČNE ANALIZE

#### 3.4.4.1 Določanje SO<sub>2</sub> v vinu po Ripperju

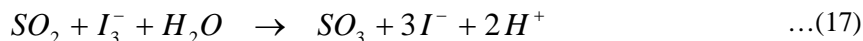
##### **Princip metode:**

Določanje skupnega in prostega SO<sub>2</sub> temelji na oksidacijsko-redukcijski reakciji z raztopino joda (I<sub>2</sub>). Za določitev prostega SO<sub>2</sub> vzorec vina najprej nakisamo z dodatkom žveplove (VI) kisline; s tem zmanjšamo oksidativni vpliv vina (predvsem polifenolnih spojin) pri titraciji z raztopino joda, dodamo indikator (škrobovico) in titriramo s standardizirano raztopino joda. Jod oksidira žveplovo (IV) kislino v žveplovo (VI) kislino in v končni točki titracije prebitna količina joda obarva raztopino modro.

Za določitev koncentracije skupnega SO<sub>2</sub> vzorcu vina najprej dodamo 1 M raztopino NaOH. S tem dosežemo hidrolizo vezanega SO<sub>2</sub> – acetaldehid- $\alpha$ -hidroksisulfonata in

drugih bisulfitnih kompleksov. Nato sledi dodatek ostalih reagentov in jodometrična titracija, kot pri določanju prostega SO<sub>2</sub> (Košmerl in Kač, 2004).

Reakcija pri določanju SO<sub>2</sub> v vinu:



#### Instrumenti:

- bireta
- pipete (merilne 5 in 10 mL; polnilna 25 mL)
- erlenmajerica s širokim vratom (250 mL)

#### Reagenti:

- izhodna raztopina joda: 12,9 g joda in 25 g kalijevega jodida raztopimo v približno 100 mL deionizirane vode, prenesemo v 1000 mL merilno bučko in pri temperaturi 20 °C dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;
- 0,01 M raztopina joda: 200 mL izhodne raztopine joda razredčimo z deionizirano vodo do končnega volumna 1000 mL;
- 1 M raztopina natrijevega hidroksida; v 1000 mL merilno bučko zatehtamo 40,05 g NaOH in dopolnimo do oznake z deionizirano vodo;
- Raztopina žveplove (VI) kisline (1+3): previdno dodamo 1 volumski del koncentrirane kisline k 3 volumskim delom deionizirane vode;
- 1 % raztopina škrobovice (indikator): 10 g škroba popolnoma raztopimo (s segrevanjem do vrenja) v 500 mL deionizirane vode, s katero tudi dopolnimo do oznake (do 1000 mL).

#### Opis dela:

Za določitev prostega SO<sub>2</sub>: v 250 mL erlenmajerico odpipetiramo 25 mL vzorca vina, dodamo 5 mL škrobovice, premešamo, nato dodamo 5 mL raztopine žveplove(VI) kisline (1+3) in titriramo s standardizirano raztopino joda do modre barve, ki naj bo obstojna približno 20 s.

Za določitev skupnega SO<sub>2</sub>: v 250 mL erlenmajerico odpipetiramo 25 mL vzorca vina in dodamo 25 mL 1 M raztopine NaOH, premešamo in pustimo stati točno 10 min, da poteče hidroliza vezanega SO<sub>2</sub>; dodamo 5 mL škrobovice in 10 mL raztopine žveplove(VI) kisline (1+3) in takoj titriramo s standardizirano raztopino joda.

Koncentracijo prostega in skupnega SO<sub>2</sub> (mg/L) izračunamo po naslednji formuli:

$$c_{SO_2} (mg / L) = \frac{a \cdot c_{I_2} \cdot M \cdot 1000}{n \cdot v} \cong a \cdot 25,6 \quad \dots(18)$$

v kateri pomeni **a** volumen standardizirane raztopine joda (mL), **c** (**I<sub>2</sub>**) koncentracijo joda (0,01 M), **M** molsko maso SO<sub>2</sub> (64 g/mol), **n** molsko razmerje iz kemijske enačbe (n=1) in

$v$  volumen vzorca vina (25 mL). Točno koncentracijo joda določimo s standardizacijo. Rezultat podamo v mg SO<sub>2</sub>/L vina, brez decimalnih mest (Košmerl in Kač, 2004).

### 3.4.4.2 Določanje hlapnih kislin

#### Princip metode:

Po destilaciji vzorca z vodno paro sledi titracija destilata s standardizirano vodno raztopino natrijevega hidroksida. Rezultat izrazimo kot očetno kislino (g/L).

#### Instrumenti:

- generator pare (VADE, Gibertini, Italija)
- destilacijska naprava (D.E.E. Gibertini, Italija)
- pipete (merilne 1, 5 in 10 mL; polnilna 20 mL)
- erlenmajerica (250 mL)
- bireta
- kapalka
- puhalka z deionizirano vodo

#### Reagenti:

- 0,1 M raztopina natrijevega hidroksida: 4,005 g NaOH zatehtamo v 1000 mL merilno bučko in dopolnimo z deionizirano vodo do oznake;
- 1 % alkoholna raztopina fenolftaleina (indikator): 1 g fenolftaleina raztopimo v 100 mL 80 % (v/v) etanola;
- 50 % raztopina vinske kisline: v 100 mL merilno bučko zatehtamo 50 g vinske kisline in dopolnimo z deionizirano vodo do oznake;
- 20 % raztopina protipenilca, ki je bil priložen destilacijski napravi.

#### Opis dela:

V destilacijsko bučko odpipetiramo 20 mL vzorca vina, dodamo 1 mL 50 % vinske kisline za nevtralizacijo in 2-3 kapljice protipenilca. Stene destilacijske bučke speremo z deionizirano vodo in destiliramo vzorec z vodno paro v 250 mL erlenmajerico do končnega volumna destilata 150 mL. Destilatu dodamo 2-3 kapljice raztopine fenolftaleina in takoj titriramo s standardizirano 0,1 M raztopino natrijevega hidroksida do prehoda brezbarvne raztopine v svetlo rožnato (barva mora biti obstojna 15 – 20 s).

Koncentracijo hlapnih kislin izračunamo po naslednji formuli:

$$HK_1 = a_1 \cdot c \cdot M(g/mol) \cdot \left( \frac{50}{1000} \right) \cong a \cdot 0,3 \quad \dots(19)$$

v kateri pomeni  $HK_I$  koncentracijo hlapnih kislin, izraženih kot očetna kislina (g/L),  $a_I$  poraba titranta (mL),  $c$  koncentracijo NaOH (0,1 mol/L),  $50$  razredčitveni faktor in  $M$  molsko maso očetne kisline (60,05 g/mol) (Košmerl in Kač, 2004).

### 3.4.4.3 Določanje koncentracije skupnih (titrabilnih) kislin

#### Princip metode:

Merimo razliko v potencialu med dvema elektrodama, ki sta potopljeni direktno v vzorec mošta ali vina. Ena elektroda (referenčna) ima stalen potencial, druga steklena elektroda (merilna) pa ima potencial, ki je funkcija aktivnosti  $H_3O^+$  ionov v raztopini. Uporabljamo pH meter s skalo v pH enotah. Titracija z 0,1 M raztopino NaOH poteka v avtomatskem titratorju do (končne) točke titracije pH = 7,0 oziroma pH = 8,2. Dve različni končni točki uporabljamo zaradi primerljivosti dveh različnih metod: metode po *Organization International de la Vigne et du Vin* (OIV), ki ima za končno točko pH = 7,0 in metode po *American Society of Enologists ter Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), ki imata končno točko pri pH = 8,2. Ough in Amerine (1988) predlagata, da se uporablja metoda titracije do končne točke pH = 8,2, ker je pri titraciji šibkih kislin v vinu z močno bazo končna točka titracije običajno med 7,8 in 8,3. Ogljikov dioksid v skupno kislost ni vštet. Koncentracijo skupnih kislin izražamo kot g/L vinske kisline (Ough in Amerine, 1988).

#### Instrumenti in reagenti:

- pH meter: Mettler Toledo DL50, Version 2.4, Švica
- polnilne pipete
- čaše
- kapalke
- pufrna raztopina s pH 3 = raztopina citronske kisline (Merck, kataloška št. 1.09434.1000)
- pufrna raztopina s pH 4 = Mettler-Toledo,  $4,01 \pm 0,02$  (kataloška št. 51340057)
- pufrna raztopina s pH 7 = Mettler-Toledo,  $7,00 \pm 0,02$  (kataloška št. 51340059)
- elektrolit, KCl 3 mol/L nasičen z AgCl, Mettler-Toledo (kataloška št. 51340045)
- 0,1 M raztopina NaOH (Merck, kataloška št. 1.06498)

#### Opis dela:

Najprej smo s pufrskimi raztopinami umerili pH meter, nato pa v 100 mL čašo odpipetirali 25 mL vzorca vina, nastavili končno točko titracije na pH = 7,00, titrirali z 0,1 M raztopino NaOH do nastavljene (končne) točke titracije ter odčitali porabo baze. Nadaljevali smo

titracijo do končne točke  $\text{pH} = 8,20$  in ponovno odčitati porabo baze. Iz dobljenih podatkov smo izračunali koncentracijo skupnih titrabilnih kislin po naslednji formuli:

$$TK_{1(2)}(g/L) = \frac{a_{1(2)}(mL) \cdot c \cdot M(g/mol)}{v(mL) \cdot n} \cong a_{1(2)}(mL) \cdot 0,3 \quad \dots(20)$$

kjer pomeni  $a_{1(2)}$  volumen porabljene baze pri titraciji do  $\text{pH} = 7,00$  ( $8,20$ ) (mL),  $c$  koncentracijo baze (0,1 M),  $M$  molsko maso vinske kisline (150,09 g/mol),  $v$  volumen vzorca (25 mL) in  $n$  molsko razmerje iz kemijske reakcije ( $n=2$ ). Rezultat izražamo na dve decimalni mesti.

#### 3.4.4.4 Določanje relativne gostote, skupnega ekstrakta in alkohola v vinu

##### Princip metode:

Termostatiranemu vzorcu vina ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) izmerimo relativno gostoto z denzimetrom. Nato točno določen volumen (100 mL) ponovno termostatiranega vzorca predestiliramo z destilacijsko napravo v 100 mL merilno bučko. Po destilaciji vzorca termostatiramo alkoholni destilat in izmerimo njegovo relativno gostoto z denzimetrom. Poleg relativne gostote odčitamo tudi koncentracijo (volumski delež) alkohola.

##### Instrumenti in reagenti:

- destilacijska naprava (D.E.E. Gibertini, Italija)
- denzimeter: Mettler Toledo DE 45, Švica
- merilne bučke (100 mL)
- kapalke
- puhalka z deionizirano vodo
- 12 % raztopina kalcijevega oksida: v 100 mL merilno bučko zatehtamo 12 g kalcijevega oksida (CaO, Merck, kataloška št. 1.14815), raztopimo v manjši količini deionizirane vode, s katero tudi dopolnimo do oznake.
- 20 % raztopina protipenilca: v 100 mL merilno bučko nalijemo 20 mL koncentriranega protipenilca (priložen pri destilacijski napravi) in dopolnimo z deionizirano vodo do oznake.

##### Opis dela:

Vzorec vina najprej termostatiramo na  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in ga previdno vbrizgamo v merilno celico denzimetra brez mehurčkov zraka s predhodnim spiranjem s samim vzorcem. Izmerimo relativno gostoto vzorca vina.

100 mL vzorca vina, termostatiranega na  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , prenesemo v destilacijsko bučko, dobro speremo z deionizirano vodo, dodamo 5 mL 12 % raztopine kalcijevega oksida za boljšo



elektrolitsko prevodnost, 2-3 kapljici protipenilca in speremo destilacijsko posodo z deionizirano vodo. Vzorec predestiliramo v 100 mL bučko do končnega volumna destilata 75-80 mL, dopolnimo z deionizirano vodo in alkoholni destilat ponovno termostatiramo na 20 °C, merilno bučko dopolnimo točno do oznake in izmerimo relativno gostoto alkoholnega destilata in koncentracijo alkohola (vol. %).

Izračun relativne gostote ( $d_{SE}$ ) in vsebnost skupnega ekstrakta:

$$d_{SE} = d_V - d_A + 1,0000 \quad \dots(21)$$

kjer pomeni  $d_V$  relativno gostoto vzorca vina in  $d_A$  relativno gostoto alkoholnega destilata. Na podlagi znane relativne gostote  $d_{SE}$  iz tabele odčitamo masno koncentracijo skupnega ekstrakta v vinu (g skupnega ekstrakta/L vina). Rezultat izrazimo na eno decimalno mesto.

### 3.4.5 KROMATOGRAFSKE METODE

#### 3.4.5.1 Analiza fenolov s HPLC-MS

Instrumentacija:

- Perkin Elmer PE200 binarna črpalka
- Perkin Elmer PE200 autosampler
- Perkin Elmer PE200 UV/VIS detektor
- Applied Biosystems 3200 Q TRAP masni spektrometer, ionizacija z razprševanjem v električnem polju (ESI), negativni način

HPLC pogoji:

- kolona Gemini C18 3  $\mu$ m delci 150 x 4,6 mm s predkolono
- pretok mobilne faze 0,7 mL/min
- mobilna faza A: 0,5% CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>CN (50/50); mobilna faza B: 2% CH<sub>3</sub>COOH

Gradient

Čas (min)	% A	% B
0	30	70
10	30	70
30	100	0
35	100	0

Stabilizacija kolone z začetno sestavo mobilne faze 5 min pred injiciranjem.

- volumen injiciranja 10  $\mu$ L.

MS pogoji:

- temperatura ionizacije 300 °C
- napetost -4500 V
- »curtain gas« (N<sub>2</sub>) 40 psi
- plin za razprševanje (zrak) 40 psi
- plin za odparevanje mobilne faze (zrak) 60 psi
- način detekcije MRM (opazovanje izbranih reakcij prehoda)
- »dwell time« 50 ms

Vrednosti potencialov (vstopni potencial, izstopni potencial, kolizijska energija) so bili optimizirani za vsak analit posebej.

### 3.4.5.2 Analiza hlapnih aromatskih spojin z GC-MS kromatografijo

Instrumentacija:

- plinski kromatograf HP 5890
- masni detektor 5972 Hewlett-Packard

GC-MS pogoji:

- Kolona
  - VOCOL – dimenzije 60 m x 0,25 mm (notranji premer)
  - debelina filma 1,5 µm – Supelco
  - temperaturni program: 50 °C (2 min) – 10 °C min<sup>-1</sup> – 210 °C (40 min)
- temperatura injektora 250 °C
- temperatura detektorja 280 °C
- masni spektrometer z ionizacijo molekul z elektroni in zapisom kromatogramov v TIC (skupni ionski tok) načinu

Priprava vzorcev:

Mikroekstrakcija na trdno fazo (SPME – solid phase micro extraction) je potekala z uporabo vlaken (DVB/CAR/PDMS) debeline 50/30 µm (Supelco). Vzorci vina (5 ml) so bili temperirani v 20 mL vialah 15 min pri 50 °C. Vlakna, s katerimi smo vzorčili 35 min v »headspace« prostoru vial, so bila nato postavljena v injektor plinskega kromatografa, kjer je potekala desorpcija 10 min.

Spojine so bile identificirane na podlagi retencijskih časov (v primerjavi s standardom) in spektra z uporabo baze podatkov masnih spektrov (NIST02). Ploščina vrhov za kvantifikacijo je bila izmerjena v TIC kromatogramu oziroma v ločenem ionskem kromatogramu v primeru koelucije različnih spojin.

### 3.4.6 SENZORIČNA ANALIZA

S senzorično analizo smo določali spremembe na štirih lastnostih vina (sadnost, zeleni toni, grenkoba in trpkost), na katere ima mikrooksigenacija največji vpliv. Spremljali smo spremembe po 20 in 60 dneh od začetka mikrooksigenacije. Senzorično oceno smo izvedli s pomočjo točkovnih lestvic, rezultate pa statistično ovrednotili.

Posamezno lastnost vina smo ocenili na podlagi naprej določene lestvice točkovanja:

Sadnost: 1 (najmanj saden) – 10 (najbolj saden)

Zeleni toni: 1 (najmanj zelenih tonov) – 10 (največ zelenih tonov)

Trpkost: 1 (najmanj trpek) – 15 (najbolj trpek)

Grenkoba: 1 (najmanj grenek) – 15 (najbolj grenek)

Všečnost: 1 (najmanj) – 3 (najbolj)

Kriterij za posamezno lastnost smo določili na podlagi predhodnih vzorcev vin, kjer so bile posamezne lastnosti različno izražene. Po usklajevanju so potekala ocenjevanja vzorcev po skupinah. Za pomoč in lažje razumevanje posamezne lastnosti vina smo podali nekaj deskriptorjev oziroma opisov:

Sadnost: jagodičevje (črni ribez, malina, robida, borovnica, ...), fermentacijska aroma (banane, vrtnice, med ...)

Zeleni toni: vegetativni, rastlinski ali zeleni toni – po pecljevini, pečkah

Trpkost: rezek, surov, trpek, kosmat občutek v ustih, ki ga zaznamo po celotni površini jezika in ustne sluznice.

### 3.4.7 STATISTIČNA ANALIZA

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programski paket SAS/STAT (SAS Software. Version 8.01, 1999). V poskusu zbrane podatke smo pripravili in uredili s programom Microsoft EXCEL. Osnovne statistične parametre smo izračunali s proceduro MEANS, s proceduro UNIVARIATE pa smo podatke testirali na normalnost porazdelitve. Pri obdelavi podatkov s statističnim modelom smo uporabili proceduro GLM (General Linear Model). Statistično značilne razlike smo preverjali z Duncanovim testom pri 5 % tveganju.

Pri modelu obdelave smo upoštevali vpliv sorte, zorenja, vzorčenja in paralelke.

$$y_{ijkl} = \mu + S_i + ZOR_j + VZ_k + PAR_l + e_{ijkl} \quad (\text{model})$$

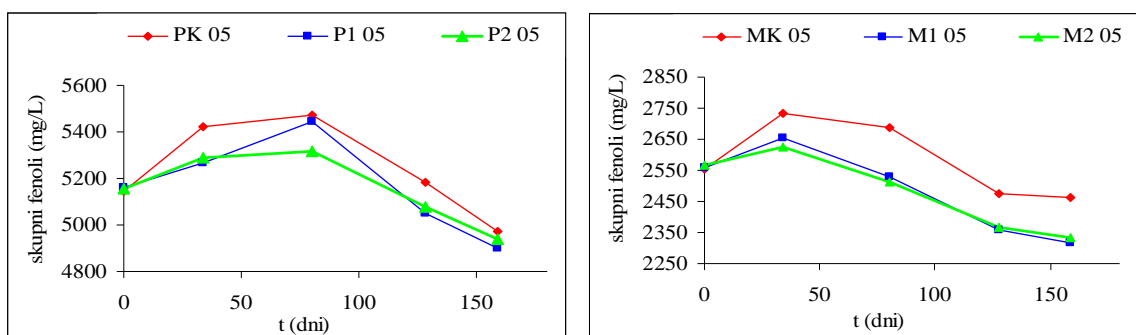
$y_{ijkl}$  = opazovana vrednost,  $\mu$  = povprečna vrednost,  $S_i$  = vpliv sorte ( $i$  = merlot 2005, rdeča zvrst 2005, merlot 2006 in cabernet sauvignon 2006),  $ZOR_j$  = vpliv zorenja ( $j$  = normalno zorenje – kontrola, "manj" vpihovanega kisika, "več" vpihovanega kisika);  $VZ_k$  = vpliv

vzorčenja ( $k = 1-6$  vina letnika 2005; 1-2 vina letnika 2006),  $\mathbf{PAR}_l$  = vpliv paralelke oziroma ocenjevalva ( $l = 1-3$  za kemijske analize, 1-10 oziroma 1-13 za senzorične analize),  $e_{ijkl}$  = rezidualni ostanek.

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI DOLOČANJA MASNIH KONCENTRACIJ SKUPNIH FENOLOV, ANTOCIANINOV, TANINSKIH IN NETANINSKIH FENOLOV TER FLAVONOIDNIH IN NEFLAVONOIDNIH FENOLOV V VINU

#### 4.1.1 MASNA KONCENTRACIJA SKUPNIH, NETANINSKIH IN TANINSKIH FENOLOV



**Slika 18:** Spreminjanje vsebnosti skupnih fenolov (mg/L) med mikrooksigenacijo vin letnika 2005.

**Figure 18:** Evaluation of total phenols (mg/L) during microoxygenation of wines from vintage 2005.

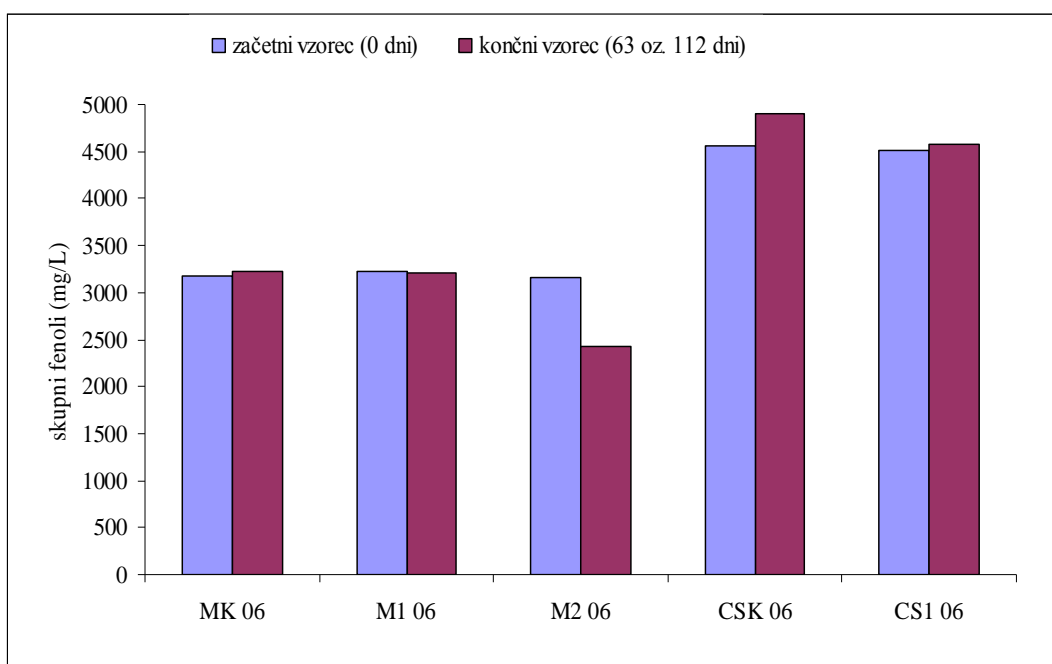
Masno koncentracijo skupnih fenolov prikazujeta sliki 18 in 19. Masno koncentracijo smo izrazili v mg/L galne kisline, ki se običajno uporablja kot standardna referenčna spojina. Pomanjkljivost metode je v tem, da je nespecifična, saj z njo določimo množino vseh hidroksilnih (-OH) skupin, ki so prisotne v vzorcu (Ribéreau-Gayon, 1972).

Masna koncentracija skupnih fenolov v obeh primerih na začetku narašča in nato se do konca poskusa enakomerno zmanjšuje. Pri rdeči zvrsti (P 05) se vsebnost skupnih fenolov povečuje prvih 80 dni, nato se ta enakomerno zmanjšuje do konca poskusa. V vsebnosti skupnih fenolov se med vzorci vina kontrole in mikrooksigeniranega vina na koncu niso pokazale statistično značilne razlike. Končna vsebnost skupnih fenolov v rdeči zvrsti je bila manjša za 1,5 % (4901 mg/L) pri P1 05 in 0,7 % (4941 mg/L) pri P2 05 v primerjavi s kontrolnim vzorcem (4975 mg/L).

Vsebnost skupnih fenolov v vinu merlot (M 05) se povečuje prvih 34 dni, nato pa zmanjšuje vse do konca poskusa. Končne razlike niso statistično značilne, kljub temu, da mikrooksigenirana vzorca vsebujeta 6 % (2317 mg/L) manj pri M1 05 in 5 % (2334 mg/L) manj pri M2 05 skupnih fenolov v primerjavi s kontrolnim vzorcem (2464 mg/L) MK 05.

Začetno povečanje vsebnosti skupnih fenolov kaže prvo fazo v procesu mikrooksigenacije, kjer pride do povečanja vsebnosti taninov in intenzivnosti barve kot navajajo Goals ... (2001) in Atanasova in sod. (2002). Faza strukturiranja traja različno dolgo predvsem odvisno od lastnosti vina. Castellari in sod. (2000), Goals ... (2001) in Atanasova in sod.

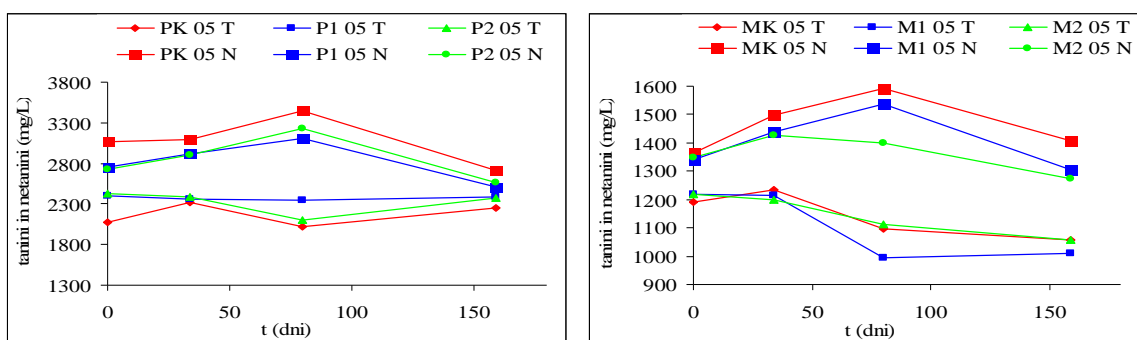
(2002) navajajo, da faza strukturiranja lahko traja od 10-30 dni, v ekstremnih primerih lahko tudi do 6 mesecev. V tem primeru je bila v vinu rdeča zvrst, ki je strukturno bolj bogato vino z večjo vsebnostjo fenolnih spojin, ta faza dolga dobra dva meseca, v vinu merlot, ki pa je ravno tako fenolno zelo bogato vino, pa le dober mesec. Castellari in sod. (2000) navajajo, da kisik v drugem delu strukturne faze povzroči povečanje kondenziranih in polimernih reakcij, ki lahko vplivajo na zmanjšanje antioksidacijske sposobnosti fenolnih spojin in s tem na zmanjšanje skupnih fenolov, kar je lepo razvidno tudi pri naših rezultatih.



**Slika 19:** Vsebnost skupnih fenolov pred in po končani mikrooksigenaciji vin letnika 2006.

**Figure 19:** Total phenol contents before and after microoxygenation of wines from vintage 2006.

V vsebnosti skupnih fenolov v drugem letu so se med vini v poskusu pokazale statistično značilne razlike. V vinu merlot (M 06) je bila končna vsebnost skupnih fenolov manjša v primerjavi s kontrolo (3222 mg/L) za 0,5 % (3209 mg/L) pri M1 06 in za kar 25 % (2429 mg/L) pri M2 06. V vinu cabernet sauvignon (CS 06) je bila vsebnost skupnih fenolov v primerjavi z začetnimi vrednostmi (4560 mg/L) na koncu nekoliko večja. Končna razlika med kontrolnim (4897 mg/L, CSK 06) in mikrooksigeniranim vzorcem (CS1 06) je znašala dobrih 6 % (4584 mg/L) manj skupnih fenolov v mikrooksigeniranemu vzorcu.



(Legenda/legend: T – tanini, N – netanini)

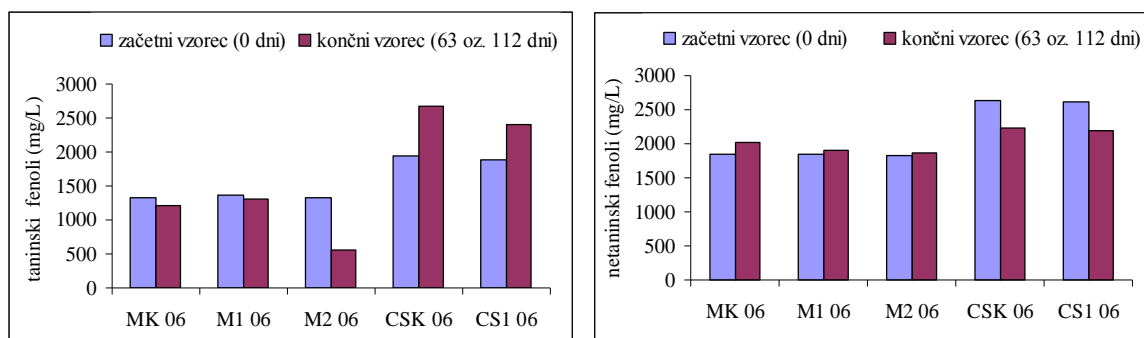
**Slika 20:** Spreminjanje vsebnosti taninov in netaninov (mg/L) med mikrooksigenacijo vin letnika 2005.

**Figure 20:** Evaluation of tannin and non-tannin phenols (mg/L) during microoxygenation of wines from vintage 2005.

V rdeči zvrsti vina (P 05) se vsebnost taninov ni bistveno spremenila. Na koncu poskusa je bila vsebnost le-teh večja za 6 % (2389 mg/L) pri P1 05 oziroma 5 % (2373 mg/L) pri P2 05 v primerjavi s kontrolo (2258 mg/L). Statistično značilne razlike so se pokazale le v vsebnosti netaninov, kjer je vsebnost le-teh v vinu pri zadnjem vzorčenju v primerjavi s kontrolo (2717 mg/L) manjša za 7 % (2512 mg/L) pri vinu P1 05 in za 6 % (2569 mg/L) pri vinu P2 05.

V vinu merlot M1 05 se je vsebnost taninov v primerjavi s kontrolo (1057 mg/L) zmanjšala za 5 % (1010 mg/L), medtem ko je pri vinu M2 05 ostala bolj ali manj na enaki ravni (1059 mg/L). Statistično značilne razlike so se pokazale samo v vsebnosti netaninov med vini zadnjega vzorčenja, in sicer med kontrolo (1407 mg/L) in tretiranimi vini, kjer se je vsebnost pri vinu M1 05 zmanjšala na 1307 mg/L (7 %) in pri vinu M2 05 na 1275 mg/L (9 %).

Fenolne reakcije v vinu lahko privedejo do spremembe, razgradnje in tvorbe novih taninov (Zoecklein, 2007). Pri tem potekajo različne kemijske reakcije polimerizacije in depolimerizacije taninov ter taninov in antocijaninov. Du Toit in sod. (2006a) navajajo, da se je pri poskusu mikrooksigenacije vsebnost taninov rahlo zmanjšala. Cacho s sod. (1995) navajajo, da je zmanjšanje koncentracije taninov med mikrooksigenacijo tesno povezano z vsebnostjo železa, bakra in mangana v vinu. Večja je vsebnost le-teh, večja je izguba taninov. Železo katalizira kemijsko reakcijo vezave acetaldehida s fenolnimi snovmi. Večja kot je vsebnost železa, manjše je povečanje koncentracije acetaldehida. Ta reagira z različnimi fenoli in pride do obarjanja nastalih spojin. To lahko pojasni zmanjšanje koncentracij taninov in skupnih fenolov.



**Slika 21:** Vsebnost taninskih in netaninskih fenolov (mg/L) pred in po končani mikrooksigenaciji vin letnika 2006.

**Figure 21:** Tannin and non-tannin phenols content (mg/L) before and after microoxygenation of wines vintage 2006.

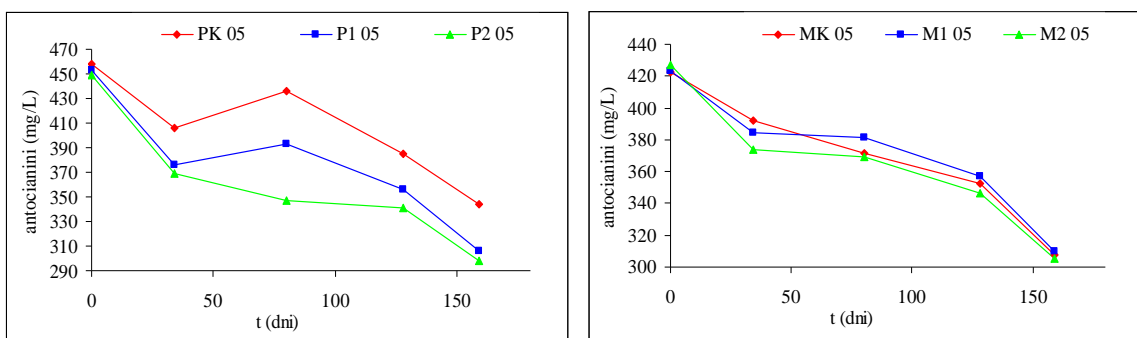
V vsebnosti taninov so se v drugem letu poskusa med vini merlot pokazale statistično značilne razlike. Povprečna vsebnost taninov se je glede na kontrolni vzorec (1211 mg/L) vina pri zadnjem vzorčenju pri vinu M1 06 povečala za 8 % (1308 mg/L), medtem ko se pri vinu M2 06 zmanjša za 54 % (556 mg/L). Razliko pripisujemo napaki meritve. Vsebnost netaninov se na koncu v primerjavi s kontrolo (2011 mg/L) zmanjša pri vinu M1 06 za 6 % (1901 mg/L), pri vinu M2 06 pa za 7 % (1873 mg/L).

Povprečna vsebnost taninov v vinu cabernet sauvignon se je med zorenjem bistveno povečala, vendar se je na koncu vsebnost le-teh v mikrooksigeniranem vzorcu v primerjavi s kontrolo (2669 mg/L) zmanjšala za 10 % na 2189 mg/L. V povprečju se je vsebnost netaninov med prvim in zadnjim vzorčenjem vina istega obravnavanja zmanjšala za približno 16 % (2229 mg/L). V mikrooksigeniranih vinih pa smo določili povprečno manjšo vsebnost netaninov še za 1 % (2189 mg/L) kot pri kontroli, kar pa se ni pokazalo za statistično značilno.

#### 4.1.2 MASNA KONCENTRACIJA ANTOCIANINOV, FLAVONOIDNIH IN NEFLAVONOIDNIH FENOLOV

Na začetku zorenja je stopnja polimerizacije taninov majhna in v prisotnosti kisika pride do kondenzacije teh z antocianini (netanini), kar vodi v nastanek stabilnih barvil (Zoecklein, 2007). Uporaba mikrooksigenacije v kasnejši fazi zorenja bi povzročila nasproten učinek. Pri tem bi potekala kondenzacija antocianinov s polimeriziranimi tanini, kar v večini primerov vodi do izločanja oziroma obarjanja barvila in posledično zmanjšanje intenzitete barve. Bistveno zmanjšanje vsebnosti antocianinov je značilno za vina, ki zorijo v *barrique* sodih. To gre pripisati hrastovim taninom, ki se lažje oksidirajo v primerjavi z grozdnimi tanini, kar vodi do povečanja polimerizacije (du Toit in sod., 2006a).



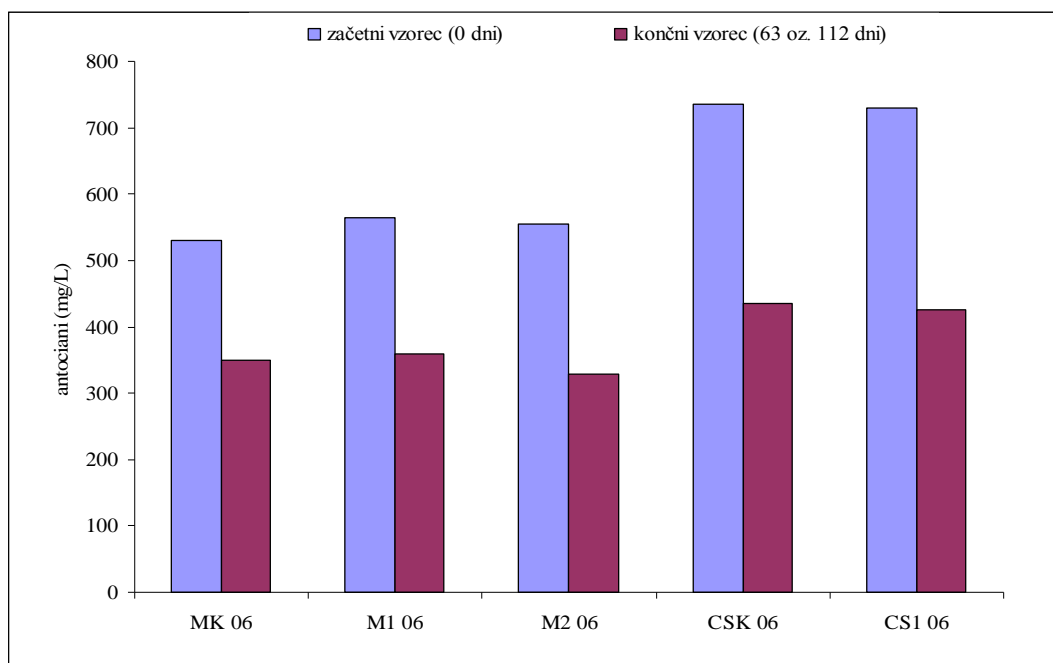


**Slika 22:** Spreminjanje vsebnosti antocianinov (mg/L) med mikrooksigenacijo vin letnika 2005.

**Figure 22:** Evaluation of anthocianins content (mg/L) during microoxygenation of wines from vintage 2005.

Rezultati vin letnika 2005 kažejo postopno zmanjšanje vsebnosti antocianinov, kar je bilo tudi pričakovati. V rdeči zvrsti vina iz zadnjega vzorčenja se povprečna vsebnost antocianinov statistično značilno razlikuje med kontrolo (344 mg/L) in mikrooksigeniranimi vini. Pri vinu P1 05 smo določili za 11 % (306 mg/L), medtem ko pri vinu P2 05 pa kar za 13 % (298 mg/L) statistično manjšo povprečno vsebnost antocianinov glede na kontrolo.

Pri sorti merlot se statistično značilne razlike v povprečni vsebnosti antocianov niso pokazale, saj je bila vsebnost antocianov na koncu poskusa v kontrolnem vzorcu 307 mg/L, v mikrooksigeniranih vzorcih pa 310 mg/L (M1 06) in 305 mg/L (M2 05).



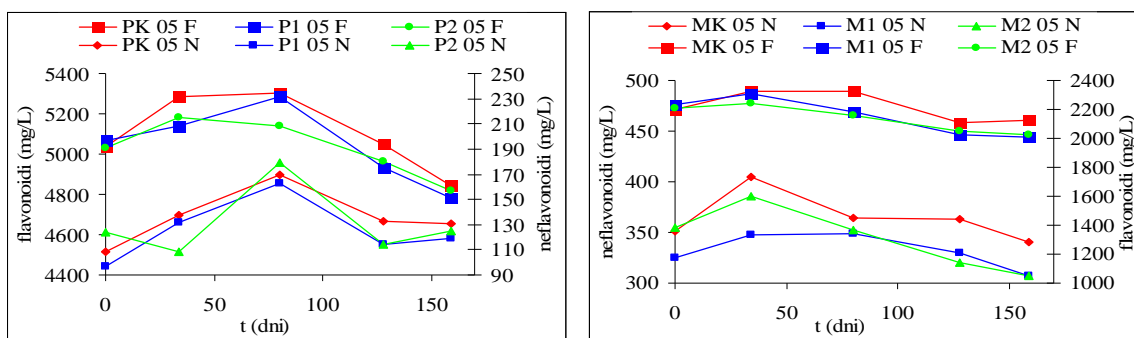
**Slika 23:** Povprečna vsebnost antocianinov (mg/L) pred in po končani mikrooksigenaciji vin letnika 2006.

**Figure 23:** Average anthocianins content (mg/L) before and after microoxygenation of wines from vintage 2006.

Tudi v drugem letu poskusa povprečna vsebnost antocianinov ni pokazala statistično značilne razlike med kontrolo in mikrooksigeniranimi vzorci vina. Povprečna vsebnost antocianinov se je v vseh vzorcih vina do konca poskusa v povprečju zmanjšala za dobro tretjino. Po zaključku mikrooksigenacije je bila povprečna vsebnost antocianinov v vzorcu M1 06 za 2 % (359 mg/L) večja, v vzorcu M2 06 pa za 6 % (328 mg/L) manjša v primerjavi s kontrolnim vzorcem (350 mg/L). Vzorec M2 06 se je tudi edini statistično značilno razlikoval od kontrole. V vinu cabernet sauvignon je končna vsebnost antocianinov v mikrooksigeniranemu vzorcu (CS1 06) za dobra 2 % manjša (425 mg/L) v primerjavi s kontrolo (435 mg/L), vendar brez statistično značilne razlike.

Med skladiščenjem in staranjem rdečih vin se vsebnost prostih antocianinov, ki dajejo barvo vinu, zmanjšuje zaradi njihovih številnih reakcij z drugimi fenolnimi spojinami, predvsem flavonoli oziroma v kombinaciji z acetaldehidom. To je razlog pretvorbe barve iz rdeče-modrega odtenka, ki je značilen za mlada vina, v rdeče-rjavo barvo zorenega vina. Pri tem pride tudi do zmanjšanja trpkosti (Cacho in sod., 1995; Castellari in sod., 2000; Atanasova in sod., 2002).

Fenolne spojine sestavljajo številne različne kemijske strukture, ki jih lahko razdelimo v dve večji skupini – neflavonoidi in flavonoidi. Neflavonoide sestavljajo preprosti fenoli z osnovno strukturo benzojske in hidroksicimetne kisline. Flavonoidi vsebujejo osnovno C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> strukturo. Med te spadajo antocianini in gradniki taninov – polimerni flavan-3-oli (proantocianidini oziroma kondenzirani tanini) (Zoecklein, 2007).



(Legenda: F – flavonoidi, N – neflavonoidi)

**Slika 24:** Spreminjanje povprečne vsebnosti flavonoidnih in neflavonoidnih fenolov (mg/L) med mikrooksigenacijo vin letnika 2005.

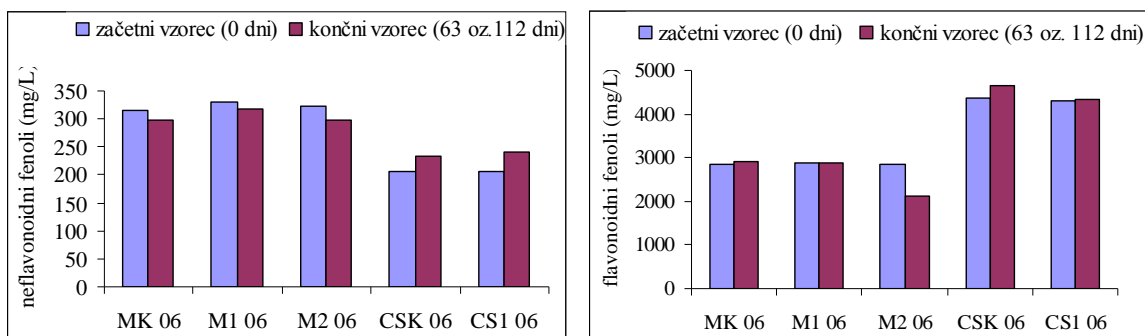
**Figure 24:** Evaluation of flavonoid and non-flavonoid phenols content (mg/L) during microoxygenation of wines from vintage 2005.

Povprečno manjšo vsebnost neflavonoidov kot tudi flavonoidov smo ovrednotili v mikrooksigeniranih vzorcih vina v primerjavi s kontrolo. V rdeči zvrsti vina smo ob zadnjem vzorčenju v kontrolnem vzorcu vina določili 131 mg/L neflavonoidov, v vzorcu P1 05 9 % (119 mg/L) in v vzorcu P2 05 pa 5 % manjšo vsebnost (125 mg/L). Povprečna

vsebnost flavonoidov v kontrolnem vzorcu je bila 4844 mg/L, v vzorcih pa dober odstotek manj in sicer pri vzorcu P1 05 4782 mg/L in pri vzorcu P2 05 4816 mg/L.

V vzorcih vina merlot so se v dinamiki vsebnosti flavonoidnih in neflavonoidnih fenolih pokazali podobni trendi vendar z večjimi razlikami. Povprečna vsebnost neflavonoidov je bila v primerjavi s kontrolo (341 mg/L) v obeh vzorcih vina manjša za 10 % (307 mg/L). Vsebnost flavonoidov v mikrooksigeniranih vzorcih je bila 2011 mg/L pri vinu M1 05 in 2027 mg/L pri vinu M2 05, kar predstavlja 5 % manj v primerjavi s kontrolo (2123 mg/L). V obeh primerih so se statistično značilne razlike pokazale samo v povprečni vsebnosti neflavonoidov.

V prisotnosti kisika pride do zmanjšanja vsebnosti številnih fenolnih komponent. Castellari in sod. (2000), du Toit in sod. (2006a) ter Zoecklein (2007) navajajo, da je v njihovih poskusih mikrooksigenacije prišlo do bistvenega zmanjšanja vsebnosti neflavonoidov (galne, kavne in ferulne kisline) in flavonoidov ((+)-katehina, (-)-epikatehina in različnih drugih snovi).



**Slika 25:** Povprečna vsebnost flavonoidnih in neflavonoidnih fenolov (mg/L) pred in po končani mikrooksigenaciji vin letnika 2006.

**Figure 25:** Average flavonoid and non-flavonoid phenols content (mg/L) before and after microoxygenation of wines from vintage 2006.

V povprečni vsebnosti neflavonoidnih fenolov v vinu merlot letnika 2006 se pred in po tretiranju niso pokazale večje razlike. Vzorec vina kontrole (MK 06) je pri zadnjem vzorčenju vseboval 299 mg/L neflavonoidov, vzorec M1 06 317 mg/L (statistično značilna razlika) in vzorec M2 06 298 mg/L. Pri povprečni vsebnosti flavonoidnih fenolov je bila vsebnost le-teh pri vzorcu vina M2 06 statistično značilno manjša za 27 % (2131 mg/L), v vzorcu M1 06 pa le za 1 % manjša (2892 mg/L) v primerjavi s kontrolo (2923 mg/L).

Pri vzorcih vina cabernet sauvignonu se je pokazalo splošno povečanje vsebnosti neflavonoidov, čeprav v primerjavi s kontrolo (233 mg/L) le za dobre 3 % (241 mg/L). Povprečna vsebnost flavonoidov je bila pri zadnjem vzorčenju za 7 % statistično značilno manjša v mikrooksigeniranemu vinu (4344 mg/L) v primerjavi s kontrolo (4664 mg/L).

## 4.2 PRIMERJALNI REZULTATI OSTALIH FENOLNIH ANALIZ

Rezultati v preglednici 7 so pridobljeni iz analiz, ki so bile izvedene na Kmetijskem inštitutu Slovenije na vzorcih vina letnika 2005 iz zadnjega vzorčenja z namenom primerjave lastnih rezultatov.

**Preglednica 7:** Primerjava fenolnih indeksov vina letnika 2005.

**Table 7:** Comparison of phenol indices of wines from vintage 2005.

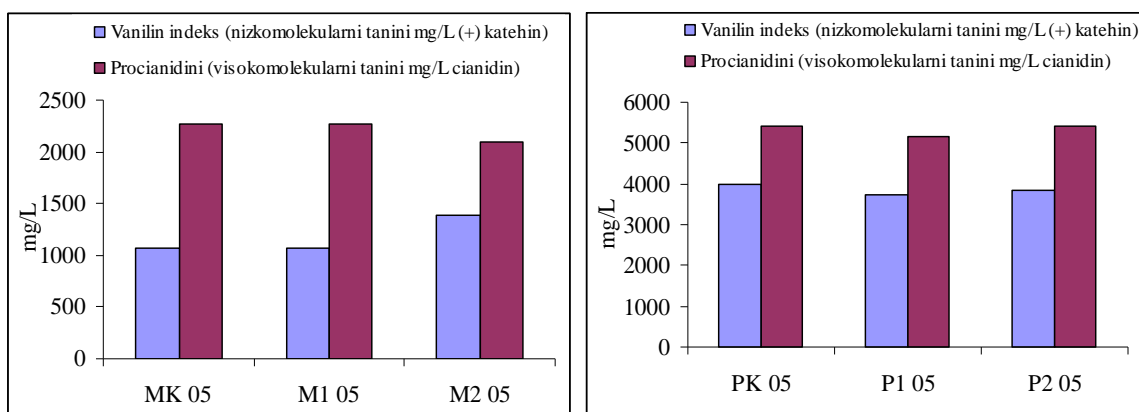
	Indeks 280	Vanilin indeks (nizkomolekularni tanini) mg/L (+)catehin	Procianidini (visokomolekularni tanini) mg/L cianidina	IP = vanilin/procianidini	Albumin Indeks Abs 280	Indeks želatine
MK 05	51,9	1075	2273	0,472	0,326	37,12
M1 05	53,2	1064	2267	0,469	0,321	36,22
M2 05	52,0	1384	2100	0,659	0,306	31,81
PK 05	101,6	4002	5403	0,740	0,558	82,38
P1 05	99,8	3715	5150	0,721	0,535	74,73
P2 05	100,8	3844	5423	0,709	0,525	81,18

Indeks 280 nam poda oceno vsebnosti skupnih fenolov. Prednost te metode je v hitrosti in ponovljivosti v primerjavi s F.C. metodo. Če dobljene rezultate primerjamo z lastnimi podatki za vsebnost skupnih fenolov, opazimo, da se kinetika spreminjanja skupnih fenolov ujema v rdeči zvrsti, medtem ko v vinu merlot kažeta metodi nasprotnoče si rezultate.

Katehini in proantocianidini reagirajo z vanilinom, kar nam da podatek o vsebnosti nizkomolekularnih taninov. Vsebnost procianidinov kaže na vsebnost visokomolekularnih taninov, vendar nam oba podatka ne podata bistvenih odgovorov. Šele indeks polimerizacije, ki predstavlja razmerje med nizkomolekularnimi in visokomolekularnimi tanini, nam da konkretnije primerjave. V vinu merlot se ta vrednost v mikrooksigeniranem vzorcu M1 05 bistveno ne spremeni, medtem ko je v vzorcu M2 05 indeks večji za 40 % (0,659) v primerjavi s kontrolo (0,472). Rezultat kaže bistveno manjšo polimerizacijo v mikrooksigeniranih vzorcih. V rdeči zvrsti je indeks polimerizacije v mikrooksigeniranih vzorcih manjši za 3 % (0,721) pri P1 05 in za 4 % (0,709) pri P2 05 v primerjavi s kontrolo (0,740), kar kaže na relativno večjo stopnjo polimerizacije. Podobne rezultate navajajo tudi Castellari in sod. (2000), ki so v povprečju

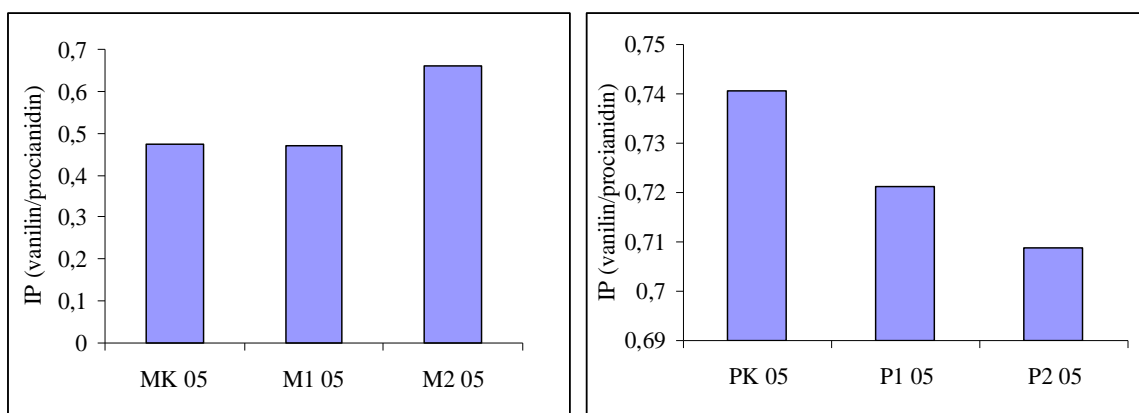
določili zmanjšanje nizkomolekularnih fenolnih spojin za 11 %, medtem ko je vsebnost visokomolekularnih fenolnih spojin naraščala. Manjše vsebnosti procianidinov v mikrooksigeniranih vzorcih pripisujejo večjemu obarvanju polimernih fenolnih produktov, ki nastajajo med zorenjem, posredno naj bi to vplivalo tudi na zmanjšanje trpkosti vina (Llady in sod., 2006).

Indeks želatine (ŽI) in albumin indeks (AI) nam podata oceni koncentracije procianidinov in s tem oceno trpkosti. Večja je vrednost, bolj naj bi bilo vino trpko. Oba indeksa (ŽI in AI) sta v mikrooksigeniranih vzorcih nižja v primerjavi s kontrolo (preglednica 7). Albumin indeks je za določanje trpkosti bolj natančen od indeksa želatine zaradi različne kakovosti želatine na trgu. Na splošno velja, da se trpkost povečuje s povečevanjem stopnje polimerizacije, vendar to vedno ne drži (Zoecklein, 2007). Polimerizacija taninov, ki poteka pri mikrooksigenaciji, naj bi se razlikovala pri tvorbi večjih polimernih produktov. Ta naj bi spodbujala predvsem vezavo procianidinov z drugimi molekulami in preprečevala tvorbo večjih molekul (Zoecklein, 2007).



**Slika 26:** Kinetika vanilin indeksa in procianidinov med mikrooksigenacijo vin letnika 2005.

**Figure 26:** Vanillin index and procyanidin kinetics during the microoxygenation of wines from vintage 2005.



**Slika 27:** Indeks polimerizacije (vanilin/procianidin) med mikrooksigenacijo vin letnika 2005.

**Figure 27:** Polymerization index (vanillin/procyanidin) development during the microoxygenation of wines from vintage 2005.

Na vsebnost skupnih in posameznih fenolnih spojin pri rdečih vinih imajo velik vpliv kakovost grozdja, enološka sredstva in vinifikacija. Vpliv mikrooksidacije na vsebnost določenih fenolnih spojin je podan v preglednicah 8, 9 in 10.

V preglednici 8 so predstavljeni rezultati vsebnosti fenolov, dobljenih s HPLC analizo, ki je bila opravljena na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, medtem ko so rezultati vsebnosti fenolov v preglednicah 9 in 10 bili določeni s HPLC analizo na Oddelku za živilstvo. V slednjih smo zaradi pomanjkanja standardov kvantitativno ovrednotili le štiri spojine, medtem ko so za ostale spojine podane povprečne ploščine vrhov kromatogramov.

**Preglednica 8:** Povprečna vsebnost nekaterih fenolnih spojin (mg/L) po mikrooksidaciji vin letnika 2006.  
**Table 8:** Average content of selected phenol compounds (mg/L) after microoxygenation of wines from vintage 2006.

SPOJINA/VZOREC	MK 06	M1 06	M2 06	vpliv	CSK 06	CS1 06	vpliv
<b>Galna kislina</b>	8,15 ± 0,15 a	7,93 ± 0,15 a	8,08 ± 0,15 a	nz	7,28 ± 0,14 a	7,25 ± 0,14 a	nz
<b>3,4-DHBA</b>	0,96 ± 0,02 c	1,04 ± 0,02 b	1,57 ± 0,03 a	***	0,85 ± 0,02 b	1,33 ± 0,02 a	***
<b>Sinapična k.</b>	0,087 ± 0,001 a	0,066 ± 0,001 c	0,069 ± 0,001 b	***	0,092 ± 0,002 a	0,077 ± 0,001 b	***
<b>Katehin</b>	15,30 ± 0,31 a	14,15 ± 0,28 b	14,69 ± 0,29 b	**	18,07 ± 0,36 a	15,76 ± 0,32 b	**
<b>Epikatehin</b>	7,96 ± 0,17 a	7,48 ± 0,16 b	6,96 ± 0,15 c	***	6,25 ± 0,13 a	5,22 ± 0,11 b	***
<b>Vanilinska k.</b>	0,47 ± 0,01 c	0,50 ± 0,01 b	0,71 ± 0,01 a	***	0,44 ± 0,01 b	0,73 ± 0,01 a	***
<b>Kavna kislina</b>	0,41 ± 0,01 c	0,47 ± 0,01 a	0,44 ± 0,01 b	***	0,47 ± 0,01 b	0,60 ± 0,01 a	***
<b>Kvercetin</b>	13,49 ± 0,38 a	13,81 ± 0,39 a	13,31 ± 0,37 a	nz	9,78 ± 0,27 a	7,87 ± 0,22 b	***
<b>Klorogenska k.</b>	0,049 ± 0,001 a	0,049 ± 0,001 a	0,050 ± 0,001 a	nz	0,022 ± 0 b	0,024 ± 0 a	**
<b>Ferulna kislina</b>	0,23 ± 0 a	0,21 ± 0 c	0,22 ± 0 b	***	0,22 ± 0 b	0,23 ± 0 a	*
<b>Resveratrol</b>	2,46 ± 0,04 b	2,65 ± 0,04 a	2,27 ± 0,03 c	***	0,73 ± 0,01 a	0,68 ± 0,01 b	**
<b>p-kumarna k.</b>	0,68 ± 0,01 a	0,58 ± 0,01 b	0,55 ± 0,01 c	***	0,63 ± 0,01 b	0,76 ± 0,01 a	***

\*\*\* $P \leq 0,001$  statistično zelo visok značilen vpliv; \*\* $P \leq 0,01$  statistično visok značilen vpliv; \* $P \leq 0,05$  statistično značilen vpliv; nz –  $P > 0,05$  statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

Primerjava podatkov HPLC analiz pokaže zelo različne rezultate predvsem v kvantitativnem vrednotenju. Smiselno je opazovati le trende spreminjanja posameznih fenolnih spojin med mikrooksidacijo.

V našem primeru mikrooksidacija ni imela statistično značilnega vpliva na vsebnost galne kisline. Značilni vplivi so se pokazali v vsebnosti katehina, epikatehina in sinapične kisline, kjer se je vsebnost le-teh v mikrooksidiranih vinih zmanjšala. Povprečna vsebnost klorogenske kisline v mikrooksidiranem vinu merlot ni kazala statističnih razlik, medtem ko je bila vsebnost v vinu cabernet sauvignonu značilno večja. Značilne razlike smo ovrednotili tudi za ferulno kislino, kjer se je povprečna vsebnost med mikrooksidacijo zmanjšala v vinu merlot oziroma povečala v cabernet sauvignonu v primerjavi s kontrolo.

Rezultati namigujejo, da mikrooksigenacija povzroči zmanjšanje vsebnosti resveratrola, predvsem *trans*-resveratrola, kar navajajo tudi Castellari in sod. (2000), *p*-kumarne kisline in kvercetin ter povečanje vsebnosti 3,4-dihidroksibenzojske kisline. Iz preglednic 9 in 10 je razvidno tudi povečanje vsebnosti fenolnih dimerov v mikrooksigeniranih vinih, kar smo pričakovali glede na številne polimerizacijske reakcije, ki so toliko bolj značilne pri mikrooksigenaciji. Ostali rezultati ne kažejo značilnih razlik oziroma so si celo nasprotujoči.

Castellari in sod. (2000) navajajo, da je v njihovem primeru dovajanje kisika imelo največji vpliv na zmanjšanje vsebnosti fenolov, kot so (+)-katehin, (-)-epikatehin, kvercetin, kavna kislina in antocianini.

**Preglednica 9:** Povprečna vsebnost nekaterih fenolnih spojin (mg/L; <sup>+</sup>ploščina vrhov) po mikrooksigenaciji vina merlot letnika 2006.

**Table 9:** Average content of selected phenol compounds (mg/L, <sup>+</sup>peak area) after microoxygenation of wine Merlot from vintage 2006.

SPOJINA/VZOREC	MK 06	M1 06	M2 06	vpliv
<b>Galna kislina</b>	47,3 ± 2,5 a	46,9 ± 1,4 a	47,0 ± 1,1 a	nz
<b>Kavna kislina</b>	2,38 ± 0,01 a	2,30 ± 0,06 a	2,37 ± 0,01 a	nz
<b>Ferulna kislina</b>	2,61 ± 0,01a	1,77 ± 0,07 b	1,96 ± 0,18 b	***
<b>Kvercetin</b>	16,78 ± 0,95 a	14,54 ± 0,77 b	12,84 ± 0,34 c	***
<b><sup>+</sup>Klorogenska kislina</b>	12200 ± 200 a	11650 ± 140 a	12000 ± 330 a	nz
<b><sup>+</sup><i>p</i>-kumarinska kislina</b>	4060 ± 170a	3986 ± 50 a	4380 ± 210 a	nz
<b><sup>+</sup>Elagova kislina</b>	52560 ± 490 b	54000 ± 1300 ab	57200 ± 2600 a	*
<b><sup>+</sup>Miricetin</b>	114500 ± 3000 a	116900 ± 2500 a	75000 ± 56000 a	nz
<b><sup>+</sup>Luteolin</b>	2250 ± 170 a	2500 ± 110 a	2458 ± 37 a	nz
<b><sup>+</sup><i>Trans</i>-resveratrol</b>	3446 ± 59 a	3083 ± 66 b	2841 ± 20 c	***
<b><sup>+</sup><i>Cis</i>-resveratrol</b>	3107 ± 79 a	2997 ± 73 a	3009 ± 75 a	nz
<b><sup>+</sup><i>Cis</i>-piceid</b>	462800 ± 6100 a	456000 ± 8000 a	462600 ± 1300 a	nz
<b><sup>+</sup><i>Trans</i>-piceid</b>	113860 ± 690 c	116470 ± 140 a	115120 ± 660 b	**
<b><sup>+</sup>Kvercetin-3-glukuronid A</b>	431000 ± 14000 a	395000 ± 15000 b	369200 ± 7300 c	**
<b><sup>+</sup>Kvercetin-3-glukuronid B</b>	430000 ± 14000 a	395000 ± 15000 b	369300 ± 7300 c	**
<b><sup>+</sup>Dimer 1</b>	428400 ± 9000 a	420140 ± 680 a	401400 ± 2800 b	**
<b><sup>+</sup>Dimer 2</b>	4567000 ± 12000 a	435600 ± 6100 b	419560 ± 180 c	**
<b><sup>+</sup>Dimer 3</b>	74307 ± 19 a	70800 ± 1500 b	65100 ± 2700 c	**
<b><sup>+</sup>Dimer 4</b>	22950 ± 740 a	23740 ± 860 a	21358 ± 80 b	*
<b><sup>+</sup>Epikatehin</b>	10760 ± 290 a	10380 ± 130 ab	10240 ± 110 b	*
<b><sup>+</sup>Katehin</b>	668500 ± 6500 a	613000 ± 32000 ab	586000 ± 36000 b	*
<b><sup>+</sup>3,4-DHBA</b>	8280 ± 350 ab	7790 ± 140 b	8760 ± 230 a	*

\*\*\* $P \leq 0,001$  statistično zelo visok značilen vpliv; \*\* $P \leq 0,01$  statistično visok značilen vpliv; \* $P \leq 0,05$  statistično značilen vpliv; nz –  $P > 0,05$  statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

**Preglednica 10:** Povprečna vsebnost nekaterih fenolnih spojin (mg/L; <sup>+</sup>ploščina vrhov) po mikrooksigenaciji vina cabernet sauvignon letnika 2006.

**Table 10:** Average content of selected phenol compounds (mg/L, <sup>+</sup>peak area) after microoxygenation of wine Cabernet Sauvignon from vintage 2006.

SPOJINA/VZOREC	CSK 06	CS1 06	vpliv
<b>Galna kislina</b>	41,6 ± 5,7 a	40,20 ± 0,33 a	nz
<b>Kavna kislina</b>	2,19 ± 0,01 a	2,27 ± 0,22 a	nz
<b>Ferulna kislina</b>	1,43 ± 0,17 a	1,51 ± 0,16 a	nz
<b>Kvercetin</b>	8,70 ± 0,24 a	8,40 ± 0,25 a	nz
<b><sup>+</sup>Klorogenska kislina</b>	11861 ± 39 b	12940 ± 120a	***
<b><sup>+</sup>p-kumarinska kislina</b>	3954 ± 15 b	4650 ± 20 a	***
<b><sup>+</sup>Elaginska kislina</b>	59621 ± 69 b	61821 ± 66 a	***
<b><sup>+</sup>Miricetin</b>	15400 ± 1100 a	14040 ± 860 a	nz
<b><sup>+</sup>Luteolin</b>	2060 ± 29 a	1952 ± 17 b	**
<b><sup>+</sup>Trans-resveratrol</b>	1400 ± 100 a	1231 ± 8 a	nz
<b><sup>+</sup>Cis-resveratrol</b>	540 ± 53 a	520 ± 23 a	nz
<b><sup>+</sup>Cis-piceid</b>	10100 ± 2200 a	104300 ± 4300 a	nz
<b><sup>+</sup>Trans-piceid</b>	34740 ± 710 b	42250 ± 380 a	***
<b><sup>+</sup>Kvercetin-3-glukuronid A</b>	357200 ± 8800 a	339500 ± 3800 b	*
<b><sup>+</sup>Kvercetin-3-glukuronid B</b>	358800 ± 8600 a	339400 ± 3800 b	*
<b><sup>+</sup>Dimer 1</b>	467810 ± 360 a	473700 ± 9400 a	nz
<b><sup>+</sup>Dimer 2</b>	392000 ± 6000 a	353500 ± 4200 b	***
<b><sup>+</sup>Dimer 3</b>	69424 ± 71 a	71000 ± 1300 a	nz
<b><sup>+</sup>Dimer 4</b>	17010 ± 510 a	14750 ± 110 b	**
<b><sup>+</sup>Epikatehin</b>	8070 ± 320 a	8577 ± 56 a	nz
<b><sup>+</sup>Katehin</b>	487000 ± 44000 a	449000 ± 26000 a	nz
<b><sup>+</sup>3,4-DHBA</b>	6800 ± 200 a	4574 ± 12 b	***

\*\*\* $P \leq 0,001$  statistično zelo visok značilen vpliv; \*\* $P \leq 0,01$  statistično visok značilen vpliv; \* $P \leq 0,05$  statistično značilen vpliv; nz –  $P > 0,05$  statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

#### 4.2.1 VPLIV MIKROOKSIGENACIJE NA RAZVOJ AROMATSKIH SPOJIN

Analize identifikacije in kvantifikacije aromatskih spojin smo opravili na vinih letnika 2006, vendar so rezultati zaradi pomanjkanja standardov podani le kot ploščine posameznih vrhov, kjer smo spojine določili s pomočjo retencijskih časov in masnih spektrov. Rezultati nam dajo le okvirni vpogled o vplivu mikrooksigenacije na aromato vina.

Za lažjo predstavitev smo določene spojine grupirali po skupinah glede na njihove kemijske lastnosti. Skupine so: etilni estri (etil butirat, etil heksanoat, etil oktanoat in druge); estri očetne kisline (izoamilni acetat, heksil acetat, feniletil acetat in druge) in maščobne kisline (heksanojska, oktanojska, dekanoska in dodekanojska kislina). Ostale spojine smo primerjali posamično.



Glede na vsebnost etilnih estrov, estrov očetne kisline in ostalih estrov, ki so odgovorni za sadno aromo mladih vin (Ortega-Heras in sod., 2008), so se pokazale določene značilne razlike med mikrooksigeniranimi vzorci vina in kontrolami. Te razlike pa so med različnimi vini večinoma nasprotujoče si oziroma prisotne le pri eni sorti. V nasprotju s splošno znanim dejstvom, da naj bi mikrooksigenacija povečala nastanek hlapnih spojin, odgovornih za sadne in cvetlične vonjave (Castellari in sod., 200; Goals ..., 2001; Atanasova in sod., 2002; Cagnasso on sod., 2003; Blanchard in sod., 2004), tega v tem primeru ne moremo trditi. V vinu cabernet sauvignon se te razlike kažejo večinoma v zmanjšanju vsebnosti posameznih spojin. Povečanje sadnosti mikrooksigeniranih vin je s tega vidika rezultat kompleksnejših reakcij, ki vključujejo tudi ostale aromatične spojine.

Pri mikrooksigenaciji naj bi nastalo več višjih alkoholov, ki imajo značilnost alkoholnega, zbadajočega občutka, z izjemo 2-feniletanola z aromo vrtnice (Ortega-Heras in sod., 2008). V našem primeru med obravnavanji niso vidne razlike v vsebnosti višjih alkoholov. Vsebnost višjih alkoholov je večja v mikrooksigeniranem vzorcu pred malolaktično fermentacijo (MLF), kasneje so razlike zaznavne le v vsebnosti 3-metiltio-propanola in benzil alkohola (Hernández-Orte in sod., 2009).

Med alkoholno fermentacijo nastajajo tudi maščobne kisline (heksanojska, oktanojska kislina in druge), ki dajejo vinu mlečno in sladkobno noto. Te v manjših količinah pripomorejo k boljši aromatici vina. Vsebnosti heksanojske in oktanojske kisline so se v mikrooksigeniranih vinih merlot glede na kontrolo statistično značilno povečale, medtem ko se je vsebnost le-teh v vinu cabernet sauvignon značilno zmanjšala. Na splošno naj bi se pri mikrooksigenaciji vsebnost maščobnih kislin povečala na račun hidrolize pripadajočih estrov oziroma na račun manjše stopnje esterifikacije le-teh (Ortega-Heras in sod. 2008).

Vsebnost terpenskih spojin je sortno značilna. Te igrajo pomembno vlogo predvsem pri aromatičnih vinih, medtem ko so v ostalih vinih prisotne v manjših količinah. Vsebnosti linaloola, limonena in terpinola so se v vseh mikrooksigeniranih vinih zmanjšale, razen vsebnosti linaloola v vinu merlot. Pri zorenju vina so razlike v aromatici mikrooksigeniranih vin najbolj občutne pred jabolčno-mlečnokislinsko oziroma malolaktično fermentacijo, nato se razlike med zorenjem bistveno zmanjšajo (Hernández-Orte in sod., 2009). Isti avtorji navajajo, da so ovrednotili trikrat večjo vsebnost geraniola (terpen) pri poskusu mikrooksigenacije vina cabernet sauvignon.

C-6 alkoholi (heksanol in *cis*-3-heksanol) so odgovorni za zelene note vina. Kljub značilnosti mikrooksigenacije, ki naj bi povzročila zmanjšanje zaznave teh arom, ni še potrjenih znanstvenih rezultatov, da bi lahko to trditev v celoti sprejeli. V našem primeru se je vsebnost heksanola v mikrooksigeniranih vzorcih vina merlot značilno zmanjšala, medtem ko v vinu cabernet sauvignon ni bilo značilnih razlik.

**Preglednica 11:** Povprečna površina vrhov aromatskih spojin po mikrooksigenaciji vina merlot letnika 2006.  
**Table 11:** Average peak areas of determined aromatic compounds after microoxygenation of Merlot wine from vintage 2006.

$t_R$ / min	Verjetna spojina	MK 06	M1 06	M2 06	vpliv
8,20	očetna kislina	0,68 ± 0,14 a	0,80 ± 0,16 a	/ b	***
9,22	etil acetat	3,78 ± 0,76 a	3,47 ± 0,69 a	3,19 ± 0,64 a	nz
12,17	Izopentanol	54 ± 11 b	52 ± 10 b	112 ± 22 a	**
13,82	etil butanoat	0,63 ± 0,13 a	0,72 ± 0,15 a	0,67 ± 0,13 a	nz
14,99	etil izopentanoat	0,86 ± 0,17 a	0,92 ± 0,18 a	0,90 ± 0,18 a	nz
15,24	metoksifeniloksim	4,84 ± 0,97 b	7,1 ± 1,4 a	3,52 ± 0,70 b	*
15,48	1-heksanol	2,77 ± 0,55 a	1,70 ± 0,34 b	1,65 ± 0,33 b	*
15,59	izopentil acetat	4,80 ± 0,96 b	5,3 ± 1,1 b	44,4 ± 8,9 a	***
15,97	furfural	0,39 ± 0,08 a	0,49 ± 0,10 a	0,54 ± 0,11 a	nz
16,66	imidazol-4-očetna kisl. (?)	/ b	/ b	0,06 ± 0,01 a	***
16,76	metil heksanoat	0,06 ± 0,01 a	/ b	/ b	***
16,91	stiren	0,43 ± 0,09 a	0,22 ± 0,04 b	0,47 ± 0,09 a	*
17,53	heksanojska kisl.	0,06 ± 0,01 b	/ c	0,17 ± 0,03 a	***
17,78	3-metil-1-penten	0,32 ± 0,06 a	0,30 ± 0,06 a	0,36 ± 0,07 a	nz
17,97	3-metil-2-penten (?)	0,26 ± 0,05 a	/ b	0,19 ± 0,04 a	***
18,27	etil heksanoat	7,1 ± 1,4 a	8,5 ± 1,7 a	7,3 ± 1,5 a	nz
18,42	etil-2-heksenoat (cis/trans?)	0,40 ± 0,08 a	0,44 ± 0,09 a	0,41 ± 0,08 a	nz
18,55	heksil acetat	1,73 ± 0,35 a	1,30 ± 0,26 ab	0,85 ± 0,17 b	*
18,73	butirolakton	0,22 ± 0,04 a	0,20 ± 0,04 a	0,20 ± 0,04 a	nz
18,87	1,3,5-benzotriol (?)	/ c	0,29 ± 0,06 a	0,18 ± 0,04 b	***
19,00	5-metil-2-furankarboksialdehid	/	/	/	nz
19,10	1-propen-1-tiol	2,99 ± 0,60 a	3,37 ± 0,67 a	2,35 ± 0,47 a	nz
19,25	benzaldehyd	1,82 ± 0,36 a	1,70 ± 0,34 a	1,36 ± 0,27 a	nz
19,37	limonen	2,03 ± 0,41 a	/ b	0,12 ± 0,02 b	***
19,54	etil-2-heksenoat (cis/trans?)	1,10 ± 0,22 a	/ b	0,11 ± 0,02 b	***
19,93	1-oktanol	1,28 ± 0,26 a	/ b	1,25 ± 0,25 a	***
20,35	etil heptanoat	0,48 ± 0,10 a	/ b	0,07 ± 0,01 b	***
20,73	nezn. Terpenska spojina	0,32 ± 0,06 a	0,42 ± 0,08 a	0,33 ± 0,07 a	nz
20,91	nonanal	0,19 ± 0,04 a	0,24 ± 0,05 a	0,17 ± 0,03 a	nz
21,04	metil oktanoat	0,17 ± 0,03 b	0,41 ± 0,08 a	0,27 ± 0,06 b	**
21,20	fenilacetalddehyd	0,34 ± 0,07 a	0,36 ± 0,07 a	0,33 ± 0,07 a	nz
21,75	linalool	/ b	/ b	0,07 ± 0,01 a	***
21,93	oktanojska kisl.	/ b	0,41 ± 0,08 a	0,40 ± 0,08 a	***
22,61	etil oktanoat	48,4 ± 9,7 a	68 ± 14 a	49,3 ± 9,9 a	nz
22,89	feniletanol	59 ± 11 a	65 ± 13 a	72 ± 14 a	nz
22,98	dietilester butandiojske kisl.	20,6 ± 4,1 a	12,4 ± 2,5 a	20,1 ± 4,0 a	nz
23,98	izopentil heksanoat	0,28 ± 0,06 a	0,27 ± 0,05 a	0,22 ± 0,04 a	nz
24,86	1-dekanol	0,54 ± 0,11 a	0,64 ± 0,13 a	0,52 ± 0,10 a	nz
25,08	terpineol	0,33 ± 0,07 a	0,38 ± 0,08 a	0,20 ± 0,04 b	*
25,22	etil nonanoat	0,28 ± 0,06 b	0,63 ± 0,13 a	0,28 ± 0,06 b	**
26,09	etilester fenilocetne kisl.	0,48 ± 0,10 a	0,69 ± 0,14 a	0,44 ± 0,09 a	nz
26,23	metil nonanoat	0,13 ± 0,03 c	0,54 ± 0,11 b	1,03 ± 0,21 a	***
26,54	feniletil acetat	2,68 ± 0,54 a	3,34 ± 0,67 a	2,46 ± 0,49 a	nz
26,77	izobutil kaprilat	/	/	/	nz
28,19	5-metil izotiazol	/ b	0,20 ± 0,04 a	/ b	***
28,57	etil dekanat	22,0 ± 4,4 b	33,9 ± 6,8 a	18,7 ± 3,7 b	*
30,04	5-butyl-4-metil-2-dihidrofuranon	0,24 ± 0,05 a	0,27 ± 0,05 a	0,21 ± 0,04 a	nz
30,72	izopentil oktanoat	0,20 ± 0,04 a	0,27 ± 0,05 a	0,26 ± 0,05 a	nz
31,47	5-etoksi tiazol	1,14 ± 0,23 a	1,44 ± 0,29 a	1,24 ± 0,25 a	nz
31,70	damaskon (?)	0,39 ± 0,08 a	0,48 ± 0,10 a	0,59 ± 0,12 a	nz
32,47	1-dodekanol	0,23 ± 0,05 b	0,92 ± 0,18 a	/ c	***
38,95	etil dodekanoat	1,19 ± 0,24 a	1,62 ± 0,32 a	1,02 ± 0,20 a	nz
42,82	izopentil laurat	/	/	/	nz

\*\*\* $P \leq 0,001$  statistično zelo visok značilen vpliv; \*\* $P \leq 0,01$  statistično visok značilen vpliv; \* $P \leq 0,05$  statistično značilen vpliv; nz –  $P > 0,05$  statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

**Preglednica 12:** Povprečna površina vrhov aromatskih spojin po mikrooksigenciji vina cabernet sauvignon letnika 2006.

**Table 12:** Average peak areas of determined aromatic compounds after microoxygenation of Cabernet Sauvignon wine from vintage 2006.

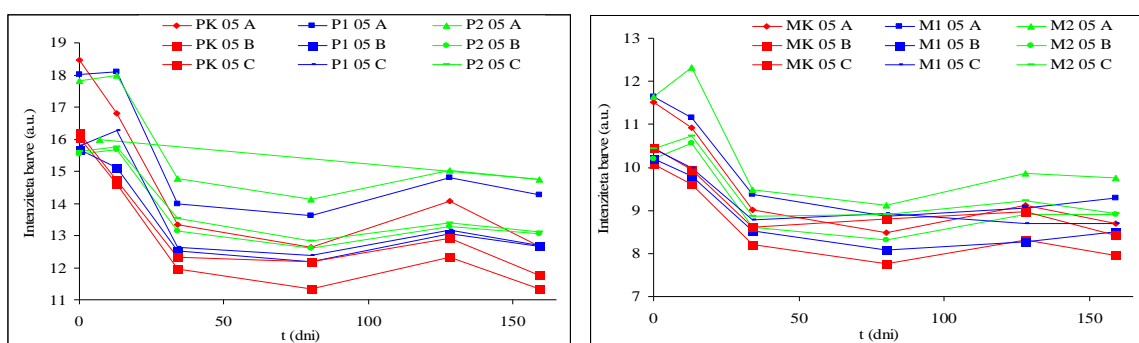
$t_R$ / min	Verjetna spojina	CSK 06	CS1 06	vpliv
8,20	očetna kislina	0,86 ± 0,17 a	0,58 ± 0,12 a	nz
9,22	etil acetat	5,1 ± 1,0 a	3,89 ± 0,78 a	nz
12,17	Izopentanol	105 ± 21 a	52 ± 10 b	*
13,82	etil butanoat	1,04 ± 0,21 a	0,76 ± 0,15 a	nz
14,99	etil izopentanoat	0,76 ± 0,15 a	0,55 ± 0,11 a	nz
15,24	metoksifeniloksim	5,8 ± 1,2 a	7,3 ± 1,5 a	nz
15,48	1-heksanol	2,75 ± 0,55 a	3,45 ± 0,69 a	nz
15,59	izopentil acetat	11,7 ± 2,3 a	7,1 ± 1,4 b	*
15,97	furfural	0,17 ± 0,03 a	/ b	***
16,66	imidazol-4-očetna kisl. (?)	0,09 ± 0,02 a	/ b	***
16,76	metil heksanoat	/	/	nz
16,91	stiren	0,21 ± 0,04 a	0,33 ± 0,07 a	nz
17,53	heksanojska kisl.	0,34 ± 0,07 a	0,13 ± 0,03 b	**
17,78	3-metil-1-penten	0,29 ± 0,06 a	0,27 ± 0,05 a	nz
17,97	3-metil-2-penten (?)	0,21 ± 0,04 a	0,20 ± 0,04 a	nz
18,27	etil heksanoat	19,9 ± 4,0 a	13,7 ± 2,7 a	nz
18,42	etil-2-heksenoat ( <i>cis/trans</i> ?)	0,18 ± 0,04 a	0,12 ± 0,02 a	nz
18,55	heksil acetat	1,69 ± 0,34 a	1,74 ± 0,35 a	nz
18,73	butirolakton	0,11 ± 0,02 a	0,17 ± 0,03 a	nz
18,87	1,3,5-benzentriol (?)	0,20 ± 0,04 a	0,28 ± 0,06 a	nz
19,00	5-metil-2-furankarboksialdehid	0,51 ± 0,10 a	/ b	***
19,10	1-propen-1-tiol	2,38 ± 0,48 a	2,80 ± 0,56 a	nz
19,25	benzaldehyd	0,57 ± 0,11 a	0,50 ± 0,10 a	nz
19,37	limonen	/	/	nz
19,54	etil-2-heksenoat ( <i>cis/trans</i> ?)	0,21 ± 0,04 a	0,18 ± 0,04 a	nz
19,93	1-oktanol	1,08 ± 0,22 a	1,00 ± 0,20 a	nz
20,35	etil heptanoat	0,19 ± 0,04 a	0,12 ± 0,02 a	nz
20,73	nezn. Terpenska spojina	0,33 ± 0,07 a	0,32 ± 0,06 a	nz
20,91	nonanal	0,16 ± 0,03 a	0,13 ± 0,03 a	nz
21,04	metil oktanoat	0,39 ± 0,08 a	0,28 ± 0,06 a	nz
21,20	fenilacetaldehyd	0,21 ± 0,04 a	0,21 ± 0,04 a	nz
21,75	linalool	0,23 ± 0,05 a	/ b	***
21,93	oktanojska kisl.	1,00 ± 0,20 a	0,44 ± 0,09 b	*
22,61	etil oktanoat	119 ± 24 a	89 ± 17 a	nz
22,89	feniletanol	40,5 ± 8,1 a	49,1 ± 9,8 a	nz
22,98	dietilester butandiojske kisl.	3,98 ± 0,80 a	4,69 ± 0,94 a	nz
23,98	izopentil heksanoat	0,26 ± 0,05 a	0,22 ± 0,04 a	nz
24,86	1-dekanol	0,55 ± 0,11 a	0,42 ± 0,08 a	nz
25,08	terpineol	0,27 ± 0,05 a	0,33 ± 0,07 a	nz
25,22	etil nonanoat	0,37 ± 0,07 a	0,34 ± 0,07 a	nz
26,09	etilester fenilocetne kisl.	0,26 ± 0,05 a	0,23 ± 0,05 a	nz
26,23	metil nonanoat	0,22 ± 0,04 a	0,21 ± 0,04 a	nz
26,54	feniletil acetat	2,72 ± 0,54 a	2,21 ± 0,44 a	nz
26,77	izobutil kaprilat	0,11 ± 0,02 a	0,10 ± 0,02 a	nz
28,19	5-metil izotiazol	/	/	nz
28,57	etil dekanat	55 ± 11 a	42,4 ± 8,5 a	nz
30,04	5-butil-4-metil-2-dihidrofuranon	/ b	0,15 ± 0,03 a	***
30,72	izopentil oktanoat	0,48 ± 0,10 a	0,35 ± 0,07 a	nz
31,47	5-etoksi tiazol	0,53 ± 0,11 a	0,26 ± 0,05 b	*
31,70	damaskon (?)	/	/	nz
32,47	1-dodekanol	5,3 ± 1,1 a	0,34 ± 0,07 b	**
38,95	etil dodekanoat	2,61 ± 0,52 a	1,87 ± 0,37 a	nz
42,82	izopentil laurat	0,40 ± 0,08 a	/ b	***

\*\*\* $P \leq 0,001$  statistično zelo visok značilen vpliv; \*\* $P \leq 0,01$  statistično visok značilen vpliv; \* $P \leq 0,05$  statistično značilen vpliv; nz –  $P > 0,05$  statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

### 4.3 REZULTATI DOLOČANJA INTENZITETE IN TONA BARVE, DELEŽA RDEČEGA BARVILA IN DELEŽA RDEČE BARVE PRI POSAMEZNIH VALOVNIH DOLŽINAH V VINU

#### 4.3.1 INTENZITETA BARVE VINA

Intenziteta in ton barve ter delež (%) rdečega barvila imajo, posebno v rdečih vinih, pomembno vlogo pri organoleptičnem ocenjevanju kakovosti. Na barvo vina vpliva veliko dejavnikov (zrelost grozdja, način in čas ter temperatura maceracije, fermentacija, vrednost pH vina, zorenje vina), s katerimi lahko bistveno izboljšamo ali poslabšamo intenzivnost in stabilnost le-te. V prisotnosti kisika nastajajo številne strukturne povezave, ki privedejo do polimerizacije taninov. Polimerizacijske reakcije, ki potekajo med tanini in antocianini privedejo do nastanka spojin, ki so bolj odporne na razgradnjo in pripomorejo k večji barvni intenziteti. Barvne analize smo opravili spektrofotometrično po dveh različnih metodah oziroma izračunih, ki jih navajajo Iland in sod. (2000) in Košmerl in Kač (2004).



Legenda/legend: **A** ( $A_{420} + A_{520} + A_{620}$ ), **B** ( $A_{420} + A_{520}$ ), **C** ( $A_{520}^{CH_3CHO} + A_{420}^{CH_3CHO}$ )

**Slika 28:** Učinek mikrooksigenacije na spreminjanje intenzitete barve vin v odvisnosti od časa – letnik 2005.

**Figure 28:** Effect of microoxygenation on colour intensity of wines over time from vintage 2005.

Intenziteta barve je fizikalna lastnost obarvanih spojin, ki jo določamo spektrofotometrično. Pri svojem delu smo določali intenziteto barve na tri načine. Krivulji A in B sta rezultat meritve osnovnega vina. Pri krivulji A je v izračun upoštevana še vrednost absorbance pri valovni dolžini 620 nm, kar bistveno ne spremeni oblike krivulje. Krivulja C je rezultat meritve ob dodatku acetaldehida, ki izniči delovanje  $SO_2$  tako, da se ta veže na acetaldehid.

V vseh primerih opazimo splošno zmanjšanje intenzitete barve vina, vendar je to manjše v mikrooksigeniranih vinih. Vse razlike so tudi statistično značilne. V povprečju je bila intenziteta (A, B, C) vina rdeče zvrsti po mikrooksigenaciji večja za 10 % v vzorcu P1 05 in za 14 % v vzorcu P2 05 v primerjavi s kontrolo.

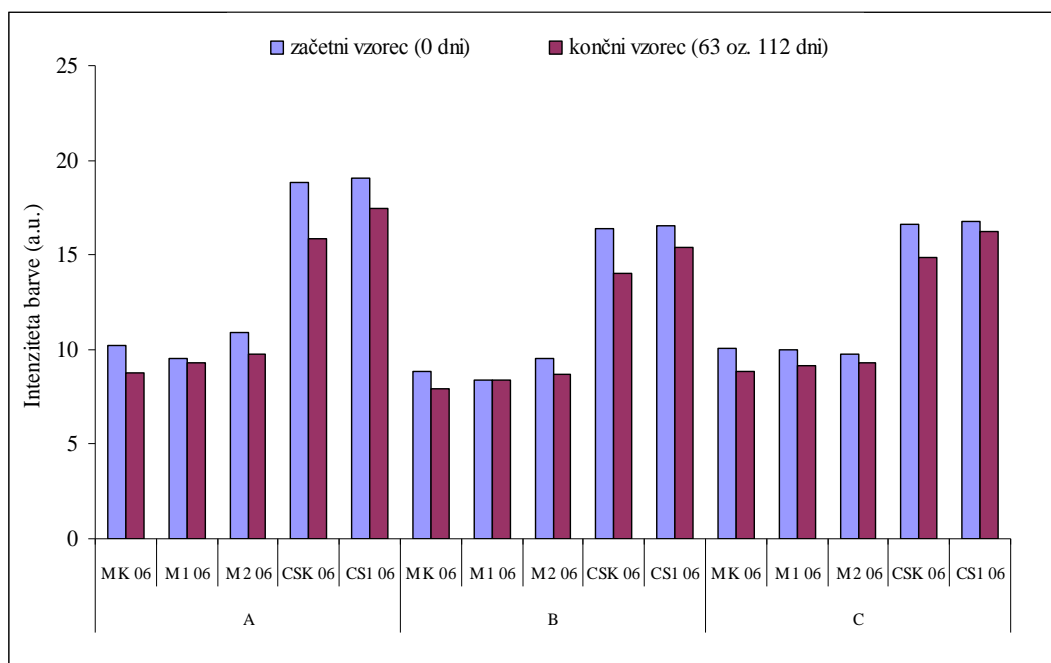
V vinu merlot smo dobili precej podobne rezultate kot v vzorcih rdeče zvrsti vina. Končni vzorec M1 05 ima v povprečju večjo intenziteto za 6 %, vzorec M2 05 pa za 10 % v primerjavi s kontrolo.

**Preglednica 13:** Povprečna intenziteta barve vin po mikrooksigenaciji.

**Table 13:** Average colour intensity after microoxygenation of wines.

oznaka	Intenziteta A	vpliv	Intenziteta B	vpliv	Intenziteta C	vpliv
<b>MK 05</b>	8,73 ± 0,03 c	***	7,99 ± 0,02 c	***	8,42 ± 0,11 b	*
<b>M1 05</b>	9,25 ± 0,04 b		8,48 ± 0,02 b		8,70 ± 0,04 b	
<b>M2 05</b>	9,79 ± 0,05 a		8,93 ± 0,03 a		8,94 ± 0,03 a	
<b>PK 05</b>	12,68 ± 0,01 c	***	11,36 ± 0,01 c	***	11,77 ± 0,02 c	***
<b>P1 05</b>	14,25 ± 0,03 b		12,64 ± 0,02 b		12,70 ± 0,04 b	
<b>P2 05</b>	14,76 ± 0,03 a		13,04 ± 0,02 a		13,12 ± 0,01 a	
<b>MK 06</b>	8,67 ± 0,07 c	***	7,84 ± 0,05 c	***	8,83 ± 0,16 b	**
<b>M1 06</b>	9,24 ± 0,04 b		8,33 ± 0,04 b		9,13 ± 0,05 b	
<b>M2 06</b>	9,70 ± 0,02 a		8,68 ± 0,02 a		9,31 ± 0,14 a	
<b>CSK 06</b>	15,86 ± 0,05 b	***	14,03 ± 0,03 b	***	14,85 ± 0,06 b	***
<b>CS1 06</b>	17,44 ± 0,02 a		15,43 ± 0,01 a		16,22 ± 0,08 a	

\*\*\* $P \leq 0,001$  statistično zelo visok značilen vpliv; \*\* $P \leq 0,01$  statistično visok značilen vpliv; \* $P \leq 0,05$  statistično značilen vpliv; nz –  $P > 0,05$  statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.



**Slika 29:** Povprečna intenziteta barve pred in po mikrooksigenaciji vin letnika 2006.

**Figure 29:** Average colour intensity before and after microoxygenation of wines from vintage 2006.

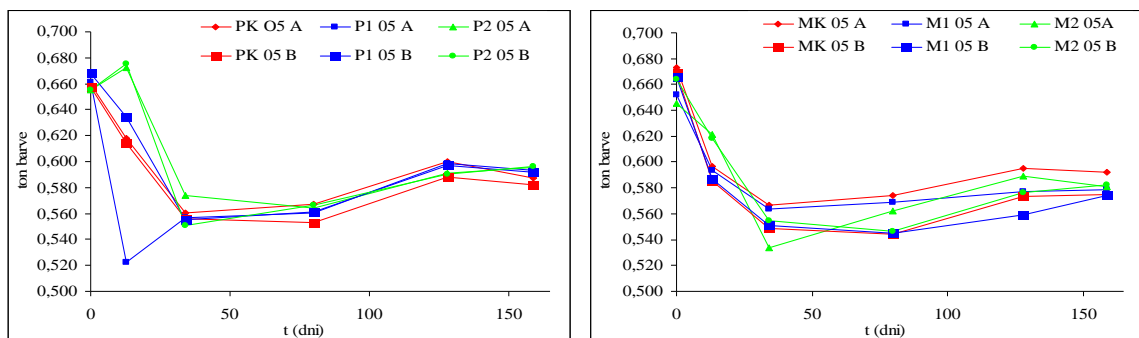
Tudi v letu 2006 so se pokazali precej podobni rezultati glede na leto 2005. Mikrooksigenirani vzorci vina merlot kažejo večjo končno povprečno intenziteto barve v primerjavi s kontrolo (A, B, C) za 5 % v vzorcu M1 06 ter 9 % v vzorcu M2 06.

V vinu cabernet sauvignon je bila povprečna končna intenziteta vina v primerjavi s kontrolo za 10 % večja.

Zmanjšanje intenzitete barve je sorazmerno s časom, vendar je manjše pri mikrooksigeniranem vinu. Mikrooksigenacija povzroča zmanjšanje vsebnosti monoglukozidnih antocijaninov. Pri mikrooksigenaciji antocijanini lažje reagirajo z drugimi spojinami in tvorijo nova barvila s tanini in ostalimi spojinami (nastanek različnih piranoantocijaninov), ki so bistveno bolj stabilni in pripomorejo k večji barvni intenziteti (Atanasova in sod., 2002; Cano-Lopez in sod., 2006; Zoecklein, 2007).

#### 4.3.2 TON (NIANSA) BARVE VINA

Barva rdečih vin je odvisna od vrste in vsebnosti prisotnih antocijaninov. Antocijanini so amfoterni, torej je njihova barva prvenstveno odvisna od vrednosti pH (Revilla in sod., 1999).



Legenda/legend: **A**  $\frac{A_{420}}{A_{520}}$ ; **B**  $\frac{A_{420}^{CH_3CHO}}{A_{520}^{CH_3CHO}}$

**Slika 30:** Učinek mikrooksigenacije na spreminjanje tona barve vin letnika 2005 v odvisnosti od časa.

**Figure 30:** Effect of microoxygenation on colour hue of wines from vintage 2005 over time.

V prvi fazi mikrooksigenacije – strukturna faza, se pokaže splošno zmanjšanje tona barve vseh vin, ta se nato do konca poskusa postopoma povečuje. V rdeči zvrsti je bil ton barve (A, B) mikrooksigeniranih vin po zadnjem vzorčenju v povprečju značilno večji za 1 % v vzorcu P1 05 in 2 % v vzorcu P2 05 v primerjavi s kontrolo.

V vinu merlot je bil ton barve mikrooksigeniranih vin v prvem primeru značilno manjši v primerjavi s kontrolo. Pri drugi meritvi, kjer smo dodali prebitek acetaldehida, ki izniči učinek razbarvanja zaradi vezave SO<sub>2</sub>, pa je bil ton barve mikrooksigeniranega vzorca M2 05 značilno večji v primerjavi s kontrolo.

**Preglednica 14:** Povprečen ton barve vin po mikrooksigenaciji.  
**Table 14:** Average colour hue after microoxygenation of wines.

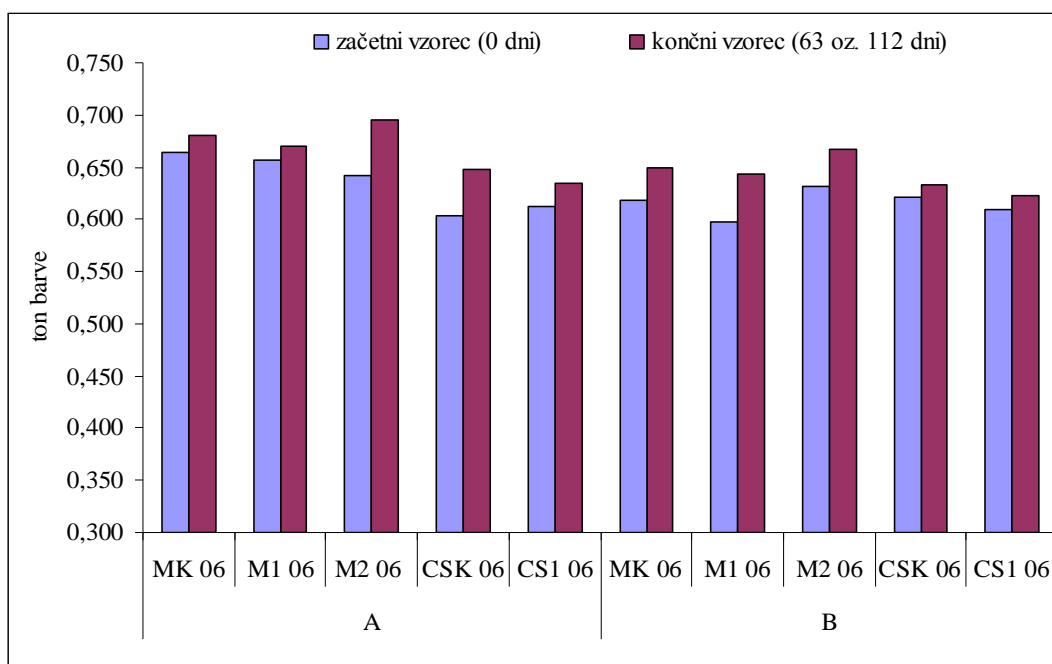
oznaka	Ton barve A	vpliv	Ton barve B	vpliv
<b>MK 05</b>	0,595 ± 0,004 a	***	0,575 ± 0,003 b	*
<b>M1 05</b>	0,579 ± 0,001 b		0,574 ± 0,001 b	
<b>M2 05</b>	0,581 ± 0,001 b		0,581 ± 0,003 a	
<b>PK 05</b>	0,588 ± 0,001 b	***	0,582 ± 0,001 c	***
<b>P1 05</b>	0,594 ± 0,001 a		0,591 ± 0,001 b	
<b>P2 05</b>	0,595 ± 0,001 a		0,596 ± 0,002 a	
<b>MK 06</b>	0,676 ± 0,005 b	***	0,649 ± 0,003 b	**
<b>M1 06</b>	0,668 ± 0,003 c		0,643 ± 0,001 b	
<b>M2 06</b>	0,697 ± 0,001 a		0,667 ± 0,007 a	
<b>CSK 06</b>	0,647 ± 0,001 a	***	0,633 ± 0,001 a	***
<b>CS1 06</b>	0,636 ± 0,001 b		0,622 ± 0,001 b	

\*\*\*  $P \leq 0,001$  statistično zelo visok značilen vpliv; \*\*  $P \leq 0,01$  statistično visok značilen vpliv; \*  $P \leq 0,05$  statistično značilen vpliv; nz –  $P > 0,05$  statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

V vinu merlot letnika 2006 se je ton barve mikrooksigeniranih vin značilno povečal le pri vzorcu M2 06 za slabe 3 %. Vzorec M1 06 se bistveno ni razlikoval od kontrole.

Nasprotno smo v vinu cabernet sauvignon določili 2 % manjši ton barve mikrooksigeniranega vzorca.

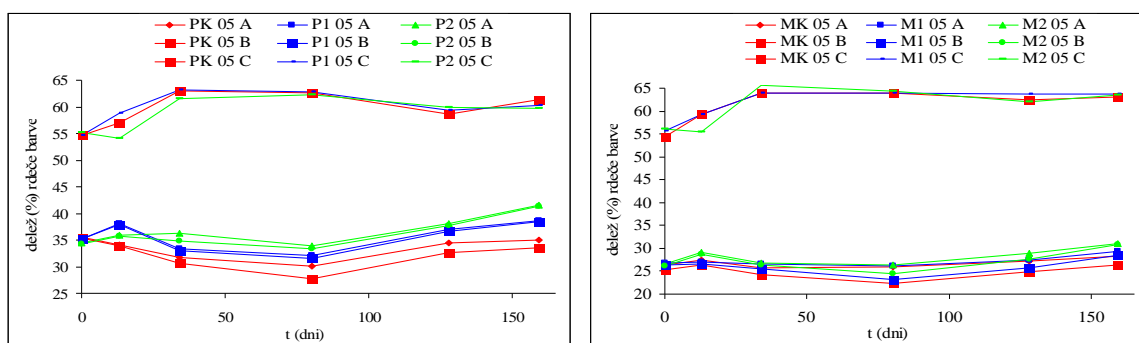
Du Toit in sod. (2006a) navajajo, da se je pri poskusu mikrooksigenacije ton barve mikrooksigeniranih vin rahlo povečal. V procesu mikrooksigenacije potekajo polimerizacije, pri čemer nastajajo številne nove spojine kot na primer piranoantocianini, ki prispevajo k večji absorbanci pri 420 nm, kot prosti antocianini (Atanasova in sod., 2002). Istočasno nastajajo tudi barvila z večjo absorbanco pri 520 nm. Krivulja B je rezultat izračuna tona barve brez učinka vezave SO<sub>2</sub>, kar naj bi se odražalo na manjšem tonu barve, saj se poveča absorbanca pri 520 nm. Po pričakovanju so rezultati zelo različni med vzorci in z majhnimi razlikami. Tudi Castellari in sod. (2000) navajajo, da v poskusu mikrooksigenacije niso zaznali bistvenih sprememb v tonu barve med kontrolnim in mikrooksigeniranim vzorcem.



Slika 31: Povprečen ton barve pred in po mikrooksigenaciji vin letnika 2006.

Figure 31: Average colour hue before and after microoxygenation of wines from vintage 2006.

#### 4.3.3 DELEŽ (%) RDEČEGA BARVILA



Legenda/legend: A – delež (%) rdeče barve brez vpliva vezave SO<sub>2</sub> na barvila; B – delež (%) rdeče barve; C – delež (%) rdeče barve v obliki flavilijevega kationa.

Slika 32: Učinek mikrooksigenacije na spreminjanja deleža (%) rdeče barve vin letnika 2005 v odvisnosti od časa.

Figure 32: Effect of microoxygenation on the degree (%) of red pigment colouration of wines from vintage 2005 over time.

Dobljeni rezultati kažejo povprečen porast deleža rdečega barvila (A, B, C) v mikrooksigeniranih vzorcih glede na kontrolo.



**Preglednica 15:** Povprečen delež (%) rdeče barve po mikrooksigenaciji vin.

**Table 15:** Average degree (%) of red pigment colouration after microoxygenation of wines.

oznaka	A	vpliv	B	vpliv	C	vpliv
<b>MK 05</b>	28,27 ± 0,75 b	*	26,47 ± 0,51 c	***	62,85 ± 0,25 c	**
<b>M1 05</b>	29,34 ± 0,76 b		28,51 ± 0,60 b		63,96 ± 0,17 a	
<b>M2 05</b>	31,05 ± 0,84 a		31,02 ± 0,87 a		63,28 ± 0,18 b	
<b>PK 05</b>	34,93 ± 0,58 c	***	33,57 ± 0,56 c	***	61,47 ± 0,04 a	***
<b>P1 05</b>	38,68 ± 0,98 b		38,45 ± 0,82 b		60,19 ± 0,05 b	
<b>P2 05</b>	41,53 ± 0,32 a		41,32 ± 0,41 a		59,80 ± 0,05 c	
<b>MK 06</b>	25,21 ± 0,72 b	**	22,03 ± 0,36 c	***	57,37 ± 0,21 a	***
<b>M1 06</b>	25,76 ± 0,22 b		23,19 ± 0,25 b		57,57 ± 0,17 a	
<b>M2 06</b>	28,02 ± 0,82 a		25,68 ± 0,36 a		55,18 ± 0,16 b	
<b>CSK 06</b>	31,05 ± 0,34 b	***	29,09 ± 0,48 b	***	56,91 ± 0,10 b	***
<b>CS1 06</b>	35,20 ± 0,55 a		33,20 ± 0,36 a		57,58 ± 0,05 a	

\*\*\* $P \leq 0,001$  statistično zelo visok značilen vpliv; \*\* $P \leq 0,01$  statistično visok značilen vpliv; \* $P \leq 0,05$  statistično značilen vpliv; nz –  $P > 0,05$  statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

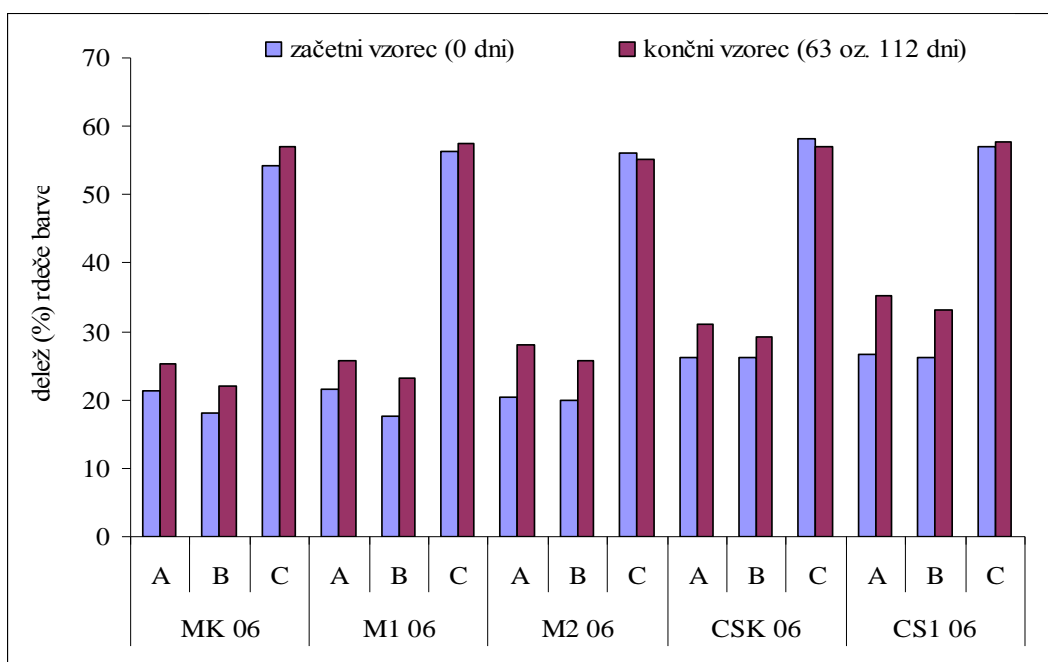
Delež rdeče barve v rdeči zvrsti je bil pri mikrooksigeniranih vinih v povprečju statistično značilno večji za 8 % v vzorcu P1 05 in za 13 % v vzorcu P2 05.

V vinu merlot je bil v povprečju značilen porast deleža rdeče barve za 4 % v vzorcu M1 05 in za 9 % v vzorcu M2 05 v primerjavi s kontrolo.

Polimerni produkti nadomestijo monomerne antocianine in s tem izboljšajo obstojnost in povečajo delež rdeče barve. V enem letu staranja lahko pride tudi do 50 % zamenjave barvnih spojin – prostih monomernih antocianinov s polimernimi produkti (Tsanova-Savova in sod., 2002). Nastala barvila so v mikrooksigeniranih vzorcih bistveno bolj obstojna. V konkretnem primeru gre verjetno večinoma za kondenzacije antocianinov v piranoantocianine, ki imajo še bolj intenzivne barve z več rdečimi in modro vijoličnimi odtenki (Mateus in sod., 2006). Omenjene reakcije so značilne za mikrooksigenacijo in naši rezultati to potrjujejo.

V vinih letnika 2006 smo v povprečju določili značilno večji delež rdečih barvil (A, B, C) v merlotu za 2,5 % pri vzorcu M1 06 in 8 % pri vzorcu M2 06 v primerjavi s kontrolo.

V vinu cabernet sauvignon se je povprečni delež rdeče barve v mikrooksigeniranem vzorcu v primerjavi s kontrolo povečal za 7 %.



**Slika 33:** Povprečni delež (%) rdeče barve pred in po mikrooksigenaciji vin letnika 2006.

**Figure 33:** Average degree (%) of red pigment colouration before and after microoxygenation of wines from vintage 2006.

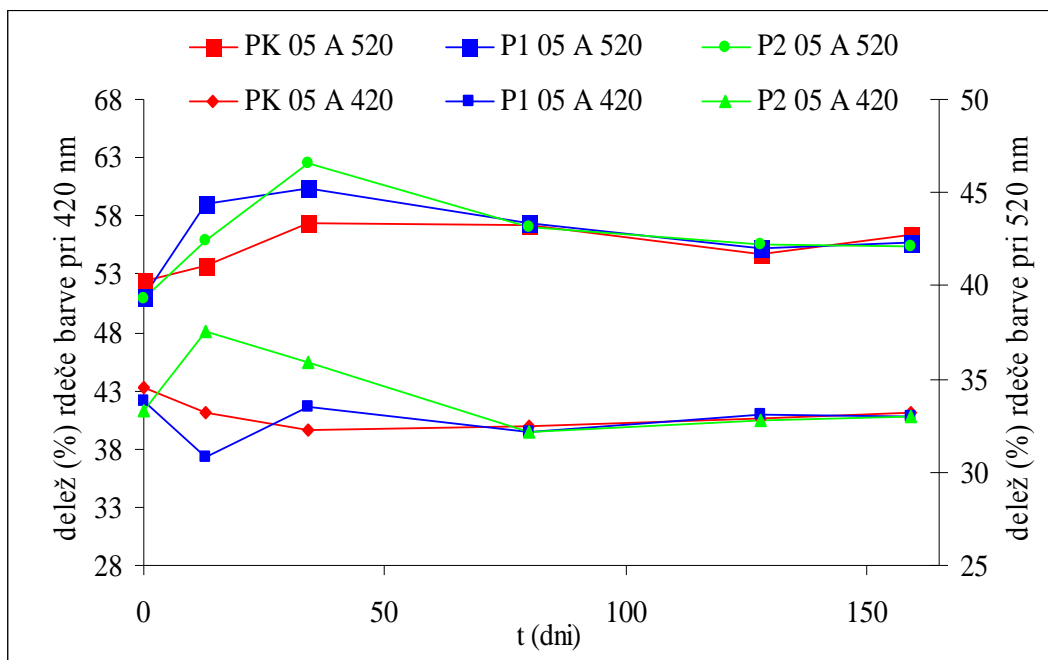
#### 4.3.4 DELEŽ (%) RDEČE BARVE PRI POSAMEZNIH VALOVNIH DOLŽINAH

Delež rdeče barve pri posamezni valovni dolžini oziroma spreminjanje odtenkov barve ni pokazalo bistvenih sprememb. Barva pri valovni dolžini 420 nm predstavlja rumeno-rjave odtenke, pri 520 nm rdeče odtenke in modro-vijolične odtenke pri 620 nm. Analize so pokazale na splošno zmanjšanje deleža rumeno-rjavih in modro-vijoličnih odtenkov barve in povečanje deleža rdečih odtenkov. Povečanje absorbanca pri 420 nm bi lahko bila tudi posledica prekomerne oksidacije fenolnih spojin, vendar je bila v našem primeru mikrooksigenacija korektno izpeljana.

Analize barve rdeče zvrsti letnika 2005 so pokazale na koncu značilno zmanjšanje rumeno-rjave barve v obeh mikrooksigeniranih vzorcih (P1 05; P2 05) za 0,4 oziroma 0,5 % in zmanjšanje rdeče barve za 1,4 oziroma 1,8 % glede na kontrolni vzorec vina. Nasprotno pa smo pri istih vzorcih vina določili značilno večji delež modro-vijolične barve za 8 in 11 %.

Tudi končna ocena vsebnosti barvila, ki je odporno na vezavo SO<sub>2</sub>, je pokazala podobne rezultate kot delež rdečega barvila pri 620 nm. Barvila, odpornega na vezavo SO<sub>2</sub>, je bilo na koncu v primerjavi s kontrolnim vzorcem za 9 % več v vzorcu P1 05 in 13 % pri P2 05.

Iz tega lahko sklepamo, da so nastala barvila odporna na vezavo SO<sub>2</sub>. To nam kaže odnos med monomernimi in polimernimi produkti v vinu, ki so posledica polimerizacije, in pripomorejo k stabilnejši barvi zaradi svoje odpornosti na razbarvanje vina z SO<sub>2</sub>. To so predvsem polimerna barvila in tudi manjše molekule kot navajajo Iland in sod. (2000).



**Slika 34:** Povprečni delež (%) rdeče barve mikrooksigeniranega vina rdeče zvrsti letnika 2005 pri valovnih dolžinah 420 in 520 nm v odvisnosti od časa.

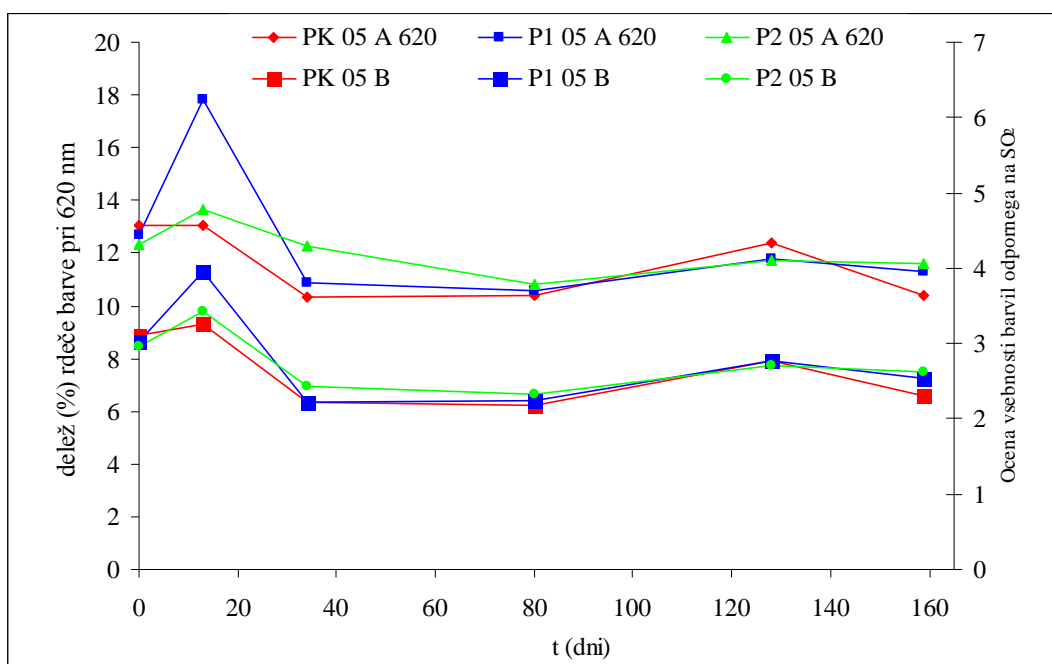
**Figure 34:** Average degree (%) of red pigment colouration of microoxygenated wine red *cuvée* from vintage 2005 at 420 and 520 nm wavelength over time.

**Preglednica 16:** Povprečni delež (%) rdeče barve pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm ter ocena vsebnosti barvila odpornega na SO<sub>2</sub> po mikrooksigenaciji vin.

**Table 16:** Average degree (%) of red pigment colouration at 420, 520 and 620 nm wavelength and estimation of content of SO<sub>2</sub> resistant pigment after microoxygenation of wines.

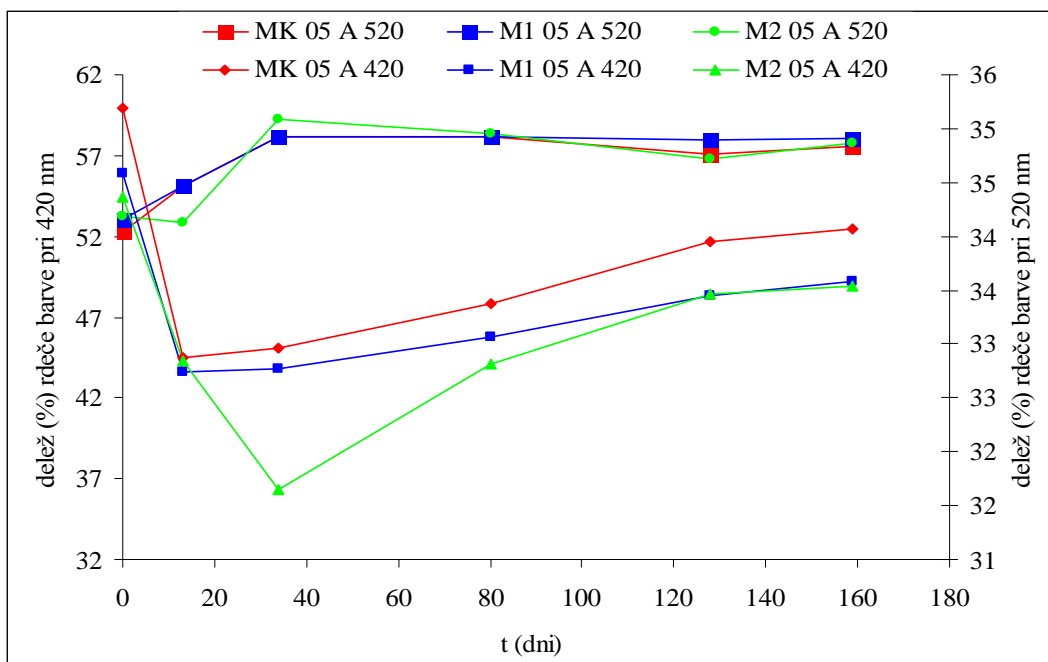
oznaka	dA420	vpliv	dA520	vpliv	dA620	vpliv	barvila odporna na vezavo SO <sub>2</sub>	vpliv
<b>MK 05</b>	34,15 ± 0,15 a	***	57,37 ± 0,16 c	**	8,50 ± 0,09 b	**	1,64 ± 0,01 c	***
<b>M1 05</b>	33,63 ± 0,06 b		58,11 ± 0,12 a		8,25 ± 0,13 b		1,67 ± 0,01 b	
<b>M2 05</b>	33,53 ± 0,02 b		57,66 ± 0,12 b		8,82 ± 0,12 a		1,75 ± 0,01 a	
<b>PK 05</b>	33,15 ± 0,05 a	**	56,41 ± 0,02 a	***	10,44 ± 0,04 c	***	2,31 ± 0,01 c	***
<b>P1 05</b>	33,05 ± 0,02 b		55,67 ± 0,03 b		11,27 ± 0,02 b		2,53 ± 0,02 b	
<b>P2 05</b>	32,96 ± 0,03 c		55,43 ± 0,03 c		11,61 ± 0,03 a		2,62 ± 0,02 a	
<b>MK 06</b>	36,49 ± 0,27 a	**	53,98 ± 0,13 a	***	9,53 ± 0,25 b	***	2,00 ± 0,02 c	***
<b>M1 06</b>	36,12 ± 0,07 b		54,10 ± 0,10 a		9,78 ± 0,03 b		2,05 ± 0,01 b	
<b>M2 06</b>	36,76 ± 0,03 a		52,73 ± 0,09 b		10,51 ± 0,09 a		2,28 ± 0,02 a	
<b>CSK 06</b>	34,76 ± 0,04 a	***	53,71 ± 0,06 b	***	11,54 ± 0,09 a	nz	3,44 ± 0,01 b	***
<b>CS1 06</b>	34,39 ± 0,01 b		54,01 ± 0,03 a		11,51 ± 0,02 a		3,74 ± 0,01 a	

\*\*\*P≤0,001 statistično zelo visok značilen vpliv; \*\*P≤0,01 statistično visok značilen vpliv; \*P≤0,05 statistično značilen vpliv; nz – P>0,05 statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.



**Slika 35:** Povprečni delež (%) rdeče barve mikrooksigeniranega vina rdeče zvrsti letnika 2005 pri valovni dolžini 620 nm in ocena vsebnosti barvila odpornega na SO<sub>2</sub> v odvisnosti od časa.

**Figure 35:** Average degree (%) of red pigment colouration of microoxygenated wine red *cuvée* from vintage 2005 at 620 nm wavelength and estimation of content of SO<sub>2</sub> resistant pigment over time.

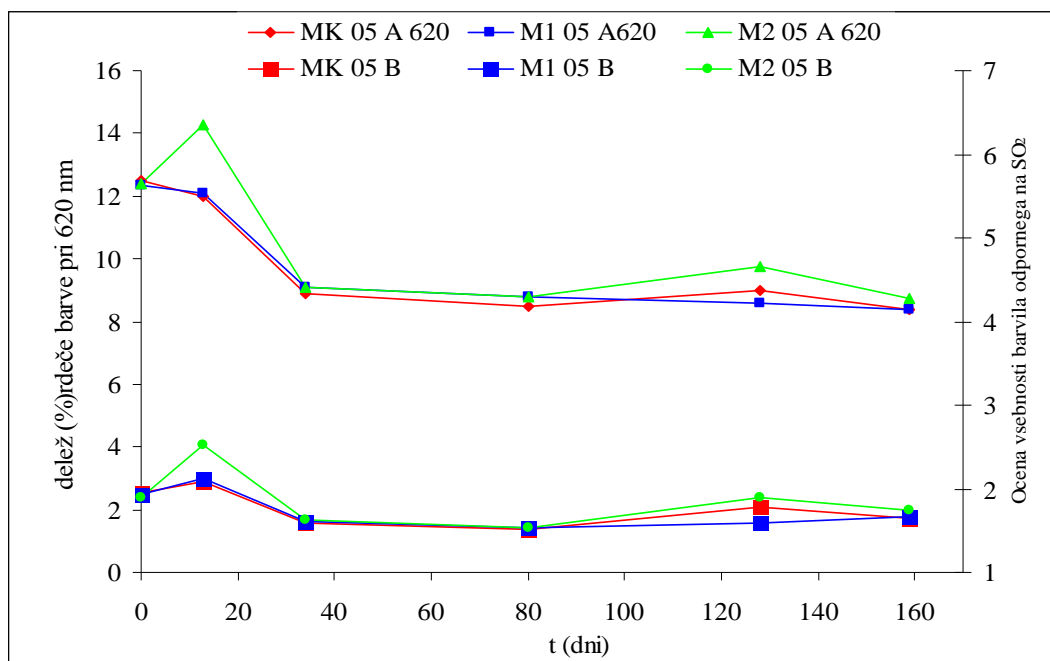


**Slika 36:** Povprečni delež (%) rdeče barve mikrooksigeniranega vina merlot letnika 2005 pri valovnih dolžinah 420 in 520 nm v odvisnosti od časa.

**Figure 36:** Average degree (%) of red pigment colouration of microoxygenated wine Merlot from vintage 2005 at 420 and 520 nm wavelength over time.

V vinu merlot letnika 2005 smo v mikrooksisgeniranih vzorcih vina zabeležili za 2 % značilno manjši odtенок rumeno-rjave barve v primerjavi s kontrolo. V vzorcu M1 05 se je značilno povečal delež rdeče barve, in sicer za 1 %, medtem ko delež modro-vijolične barve je ostal nespremenjen. V vzorcu M2 05 je bil tako delež rdeče barve kot delež modro-vijolične barve značilno večji za 0,5 % oziroma 4 %.

Ocena vsebnosti barvila odpornega na vezavo SO<sub>2</sub> v vinu merlot letnika 2005 (slika 37) je ponovno pokazala podobne rezultate kot delež rdečega barvila pri 620 nm. Tega je v primerjavi s kontrolnim vzorcem značilno več za 2 % v vzorcu M1 05 in za 7 % v vzorcu M2 05.



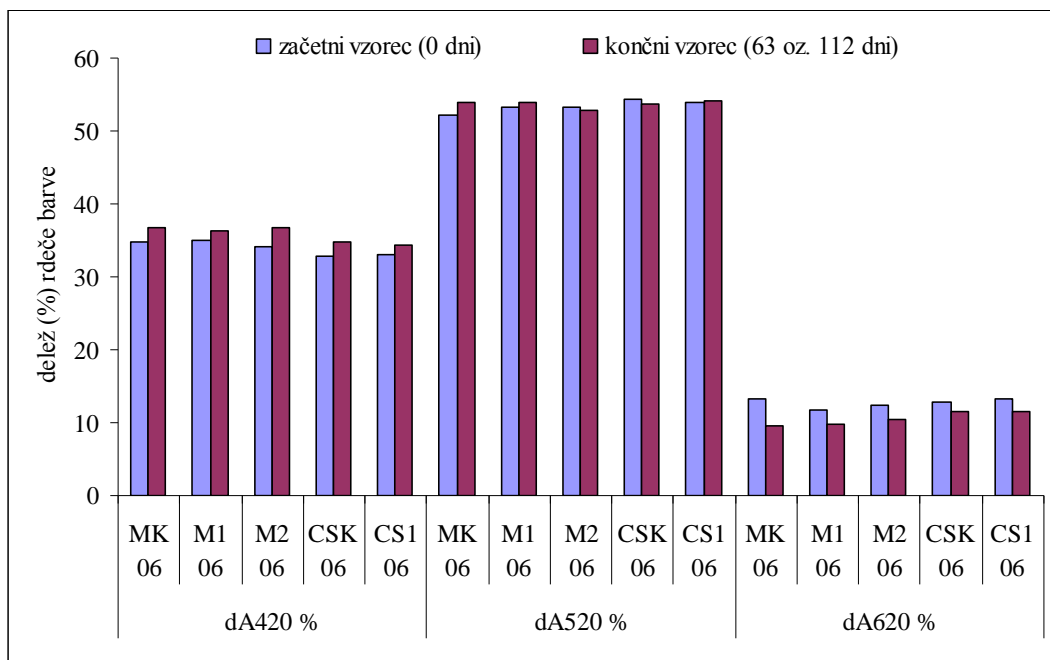
**Slika 37:** Povprečni delež (%) rdeče barve mikrooksisgeniranega vina merlot letnika 2005 pri valovni dolžini 620 nm in ocena vsebnosti barvila odpornega na SO<sub>2</sub> v odvisnosti od časa.

**Figure 37:** Average degree (%) of red pigment colouration of microoxygenated wine Merlot from vintage 2005 at 620 nm wavelength and estimation of content of SO<sub>2</sub> resistant pigment over time.

V vinu merlot letnika 2006 (slika 38) je v vzorcu M1 06 končni delež rumeno-rjave barve značilno manjši za 1,3 % v primerjavi s kontrolo, medtem ko je bil delež rdečih in modro-vijoličnih odtenkov brez statistično značilnih razlik. Vzorec M2 06 je vseboval za 2 % značilno manj rdečih barvil in kar 10 % več modro-vijoličnih barvil v primerjavi s kontrolo. Odtенок rumeno-rjavih barvil je ostal nespremenjen.

V vinu cabernet sauvignon je bil povprečni delež rumeno-rjavih barvil ob zadnjem vzorčenju mikrooksisgeniranega vina v primerjavi s kontrolo značilno manjši za 1,1 %. Značilno večji je bil le delež rdečih barvil, in sicer za 0,7 % v primerjavi s kontrolnim vzorcem, medtem ko v deležu modro-vijoličnih barvil ni bilo značilni razlik.

Ocena vsebnosti barvila odpornega na SO<sub>2</sub> v vinih letnika 2006 je pokazala značilno povečanje le-tega v mikrooksigeniranih vinih za 3 % pri vzorcu M1 06, 14 % pri vzorcu M2 06 ter 9 % pri vzorcu CS1 06 v primerjavi s kontrolama.



**Slika 38:** Povprečni delež (%) rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah pred in po mikrooksigenaciji vin letnika 2006.

**Figure 38:** Average degree (%) of red pigment colouration at different wavelengths before and after microoxygenation of wines from vintage 2006.

#### 4.3.5 DELEŽ (%) POSAMEZNE OBLIKE BARVILA

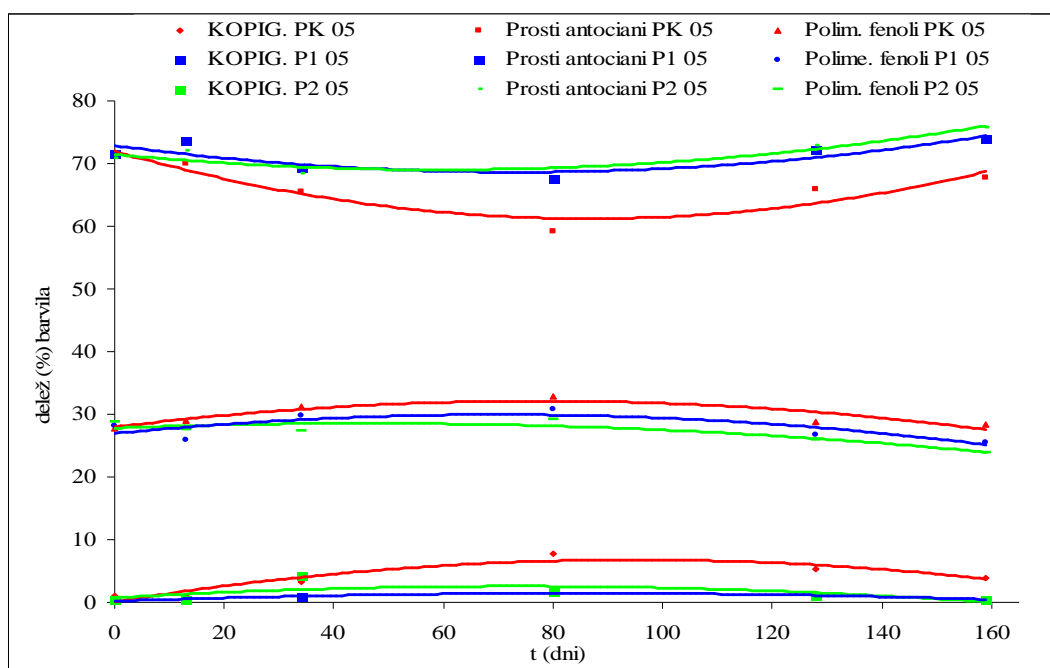
Na sliki 39 je podana dinamika odziva posameznega barvila na mikrooksigenacijo vina rdeča zvrst. Mikrooksigenacija je značilno zmanjšala delež kopigmentiranih barvil v primerjavi s kontrolo. Pri vinu P1 05 je bil končni delež le-teh 0,50 %, pri vinu P2 05 pa 0,49 % v primerjavi s kontrolnim vzorcem, kjer je bil delež teh 3,90 %. Določili smo značilno manjši delež barvil v obliki polimernih fenolov v mikrooksigeniranih vzorcih. Ob zadnjem vzorčenju je ta delež znašal 25,61 % pri vzorcu P1 05 in 23,84 % pri vzorcu P2 05, medtem ko je kontrolni vzorec vseboval 28,35 % le-teh. Delež barvil v obliki prostih antocianinov se je značilno povečal, in sicer na 73,81 % pri vinu P1 05 in 75,67 % pri vinu P2 05 v primerjavi s kontrolo, kjer je ta delež znašal 67,76 %.

**Preglednica 17:** Povprečen delež (%) posamezne oblike barvila po mikrooksigeniranega vin.

**Table 17:** Average degree (%) of single pigments after microoxygenation of wines.

oznaka	kopigmentirana barvila	vpliv	prosti antocianini	vpliv	polimerni fenoli	vpliv
<b>MK 05</b>	6,4 ± 1,2 a	***	58,61 ± 0,81 c	***	35,04 ± 0,93 a	*
<b>M1 05</b>	2,83 ± 0,51 b		63,41 ± 0,41 b		33,76 ± 0,87 a	
<b>M2 05</b>	0,12 ± 0,10 c		67,98 ± 0,95 a		31,90 ± 0,85 b	
<b>PK 05</b>	3,90 ± 0,13 a	**	67,76 ± 0,49 c	***	28,35 ± 0,48 a	***
<b>P1 05</b>	0,58 ± 0,44 b		73,81 ± 0,33 b		25,61 ± 0,64 b	
<b>P2 05</b>	0,49 ± 0,24 b		75,67 ± 0,41 a		23,84 ± 0,19 c	
<b>MK 06</b>	12,6 ± 2,1 a	nz	48,1 ± 1,3 c	***	39,3 ± 1,2 a	**
<b>M1 06</b>	10,02 ± 0,23 a		51,56 ± 0,54 b		38,41 ± 0,32 a	
<b>M2 06</b>	8,3 ± 1,9 a		56,3 ± 1,1 a		35,4 ± 1,1 b	
<b>CSK 06</b>	6,30 ± 0,58 a	nz	61,81 ± 0,89 b	***	31,89 ± 0,36 a	***
<b>CS1 06</b>	5,67 ± 0,44 a		66,20 ± 0,07 a		28,13 ± 0,44 b	

\*\*\* $P \leq 0,001$  statistično zelo visok značilen vpliv; \*\* $P \leq 0,01$  statistično visok značilen vpliv; \* $P \leq 0,05$  statistično značilen vpliv; nz –  $P > 0,05$  statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.



**Slika 39:** Povprečen delež (%) posamezne oblike barvila mikrooksigeniranega vina rdeče zvrsti letnika 2005 v odvisnosti od časa.

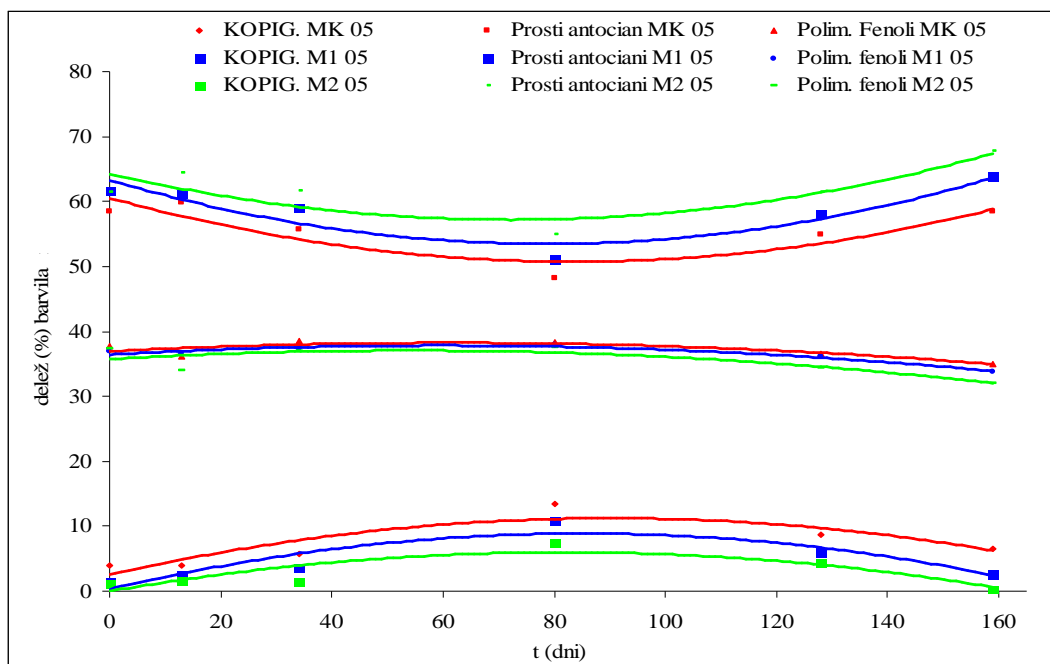
**Figure 39:** Average degree (%) of single pigments of microoxygenated wine red *cuvée* from vintage 2005 over time.

Pričakovali smo povečanje deleža barvil v obliki polimernih fenolov in kopigmentiranih barvil ter zmanjšanje deleža barvil v obliki prostih antocianinov. Du Toit in sod. (2006a) navajajo podobne rezultate pri mikrooksigenaciji, kjer se je delež barvila v obliki prostih

antocianinov v prvih 6 tednih povečal, deleža polimernih fenolov in kopigmentiranih barvil pa zmanjšala v primerjavi s kontrolo. Nato se je do konca poskusa (10 tednov) delež polimernih fenolov zelo povečal, medtem ko se je delež prostih antocianinov zelo zmanjšal.

Povečanje vsebnosti antocianinov lahko pripišemo kopigmentaciji. Kopigmentacija barvil je definirana kot povečanje barve zaradi tvorbe kompleksov med barvili (antocianini) in kofaktorji (nebarvne spojine). Boulton (2001) navaja, da se v mladih vinih prosti antocianini vežejo v kopigmentirane oblike, ki omogočajo večjo stabilnost barve, kar se kaže kot večja vsebnost skupnih antocianinov v vinu. Tako vezani antocianini povzročijo večjo obarvanost kot prosti antocianini. Ta pojav je tudi razlog za modro-vijolični barvni odtenek vina in večjo intenziteto barve mladih rdečih vin ter kratkoročno pripomore k stabilnosti barve (Boulton, 2001; Levensgood in Boulton, 2004).

Gonzales Cartagena (1994), Boulton (2001), Gómez-Plaza (2001) in Llaudy in sod. (2006) navajajo podobne rezultate – povečanje skupnih antocianinov oziroma zmanjšanje skupnih antocianinov in povečanje skupnih obarvanih antocianinov. Slednje pripisujejo tvorbi polimernih barvil oziroma možnosti cepljenja šibke vezi antocianin-etil-flavanol spojini, kjer lahko pride do sproščanja prostih antocianinov ali strukturnih preureditev.

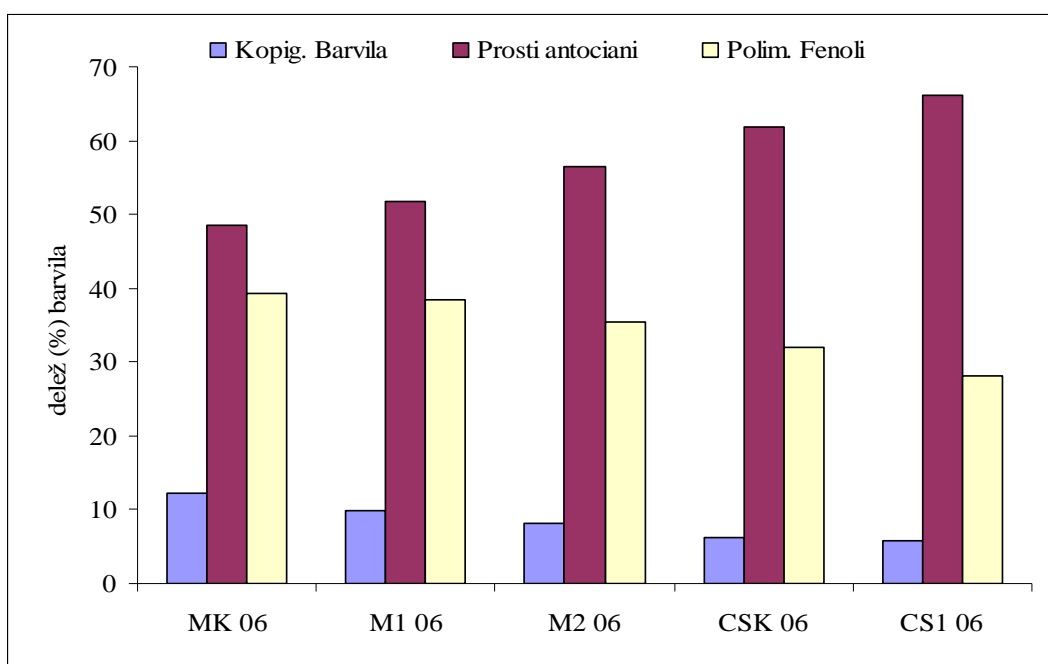


**Slika 40:** Povprečen delež (%) posamezne oblike barvila mikrooksigeniranega vina merlot letnika 2005 v odvisnosti od časa.

**Figure 40:** Average degree (%) of single pigments of microoxygenated wine Merlot from vintage 2005 over time.



Na sliki 40 so prikazani učinki mikrooksigenacije na vino merlot letnika 2005. Pri zadnjem vzorčenju vina smo določili značilno manjši povprečni delež kopigmentiranih barvil v mikrooksigeniranih vzorcih. Pri vinu M1 05 je bil ta delež 2,83 %, pri vinu M2 05 0,12 %, medtem ko je v kontrolnem vzorcu ta delež znašal 6,40 %. Delež polimernih fenolov se je v primerjavi s kontrolnim vzorcem vina (35,04 %) značilno zmanjšal le pri vzorcu M2 05 in sicer na 31,90 %. Delež prostih antocianinov se je značilno povečal in je znašal 63,41 % pri vinu M1 05 ter 67,98 % pri vinu M2 05, medtem ko je bil v kontrolnem vzorcu le 58,48 %.



**Slika 41:** Povprečen delež (%) posamezne oblike barvila po mikrooksigenaciji vin letnika 2006.

**Figure 41:** Average degree (%) of single pigments after microoxygenation of wines from vintage 2006.

Tudi v vinih letnika 2006 smo ob zadnjem vzorčenju vina glede na kontrolo določili povprečno manjši delež polimernih fenolov v mikrooksigeniranih vzorcih vina ter večji delež barvil v obliki prostih antocianinov. Delež kopigmentirana barvil je bil pri mikrooksigeniranih vzorcih manjši, vendar brez statistično značilnih razlik.

V vinu merlot je bil končni delež kopigmentiranih barvil kontrole 12,60 %, medtem ko je bil ta delež v mikrooksigeniranih vzorcih manjši, in sicer 10,02 % v vinu M1 06 in 8,30 % v vinu M2 06. Povprečni delež polimernih fenolov je bil v mikrooksigeniranih vinih glede na kontrolo (39,30 %) značilno manjši, saj smo pri vinu M1 06 določili 38,41 % le-teh, pri vinu M2 06 pa 35,40 %. Določili pa smo v povprečju večji delež prostih antocianinov v vzorcih mikrooksigeniranega vina, in sicer 51,56 % v vinu M1 06 ter 56,30 % v vinu M2 06, medtem ko v kontroli 48,10 %.

V vinu cabernet sauvignon se je pokazal podoben trend. V mikrooksigeniranem vzorcu vina smo določili 5,67 %, medtem ko v kontroli 6,30 % delež kopigmentiranih barvil. Povprečni delež polimernih fenolov je bil v kontrolnem vzorcu vina 31,89 %, medtem ko se je pri tretiranem vinu s kisikom le-ta zmanjšal na 28,13 %. Tudi v tem primeru smo zabeležili povečan delež prostih antocianov, in sicer na 66,20 % v primerjavi s kontrolnim vzorcem, kjer je bil povprečni delež le 61,81 %.

Med zorenjem rdečih vin se barva vina spreminja iz rdeče-vijoličnih v rumeno-rjave odtenke. Pri tem se vsebnost antocianinov zmanjšuje in nastajajo druga barvila preko različnih reakcij, kot so oksido-redukcijske reakcije in vezave z drugimi spojinami, na primer ogljikovodiki, beljakovinami, flavanoli in nekaterimi kovinami (Mateus in sod., 2006). Prva tovrstna barvila so pripisali predvsem reakciji antocianinov in flavanolov preko acetaldehida. Kasneje so prišli do spoznanja, da antocianini reagirajo tudi z drugimi spojinami, kot so piruvična kislina, vinil fenol, vinil katehol,  $\alpha$ -ketoglutarina kislina, aceton in 4-vinil gvajakol, pri čemer se tvorijo nove skupine barvil po imenu piranoantocianini s spektrofotometričnimi značilnostimi, ki pripomorejo k bolj oranžno-rdeči barvi vina (Alcade-Eon in sod., 2006; Mateus in sod., 2006). Med temi so tudi takšne spojine, ki imajo značilnosti modro-vijoličnih barvil. Antocianin piruvati, ki nastanejo med reakcijo antocianinov in piruvične kisline, so najbolj zastopana barvila po enem oziroma dveh letih zorenja vina, medtem ko se vsebnost prostih antocianinov znatno zmanjša (Mateus in De Freitas, 2001). Cano-Lopez in sod. (2006) navajajo, da je v vinu ena najbolj pomembnih spojin piranoantocianinov, vitisin. Vsebnost tega se pri mikrooksigenaciji poveča sorazmerno s količino dovedenega kisika.

#### **4.4 REZULTATI DOLOČANJA pH, PROSTEGA IN VEZANEGA SO<sub>2</sub>, SKUPNIH IN HlapNIH KISLIN, VSEBNOST ALKOHOLA IN SKUPNEGA EKSTRAKTA**

Rezultati nekaterih kemijskih lastnosti vina pred in po mikrooksigenaciji vin so podani v preglednici 18. Med kontrolnimi in mikrooksigeniranimi vzorci vina nismo določili večjih razlik.

V mikrooksigeniranih vzorcih smo zasledili statistično značilno nižjo vrednost pH. V vzorcu mikrooksigeniranega vina cabernet sauvignon smo določili statistično večjo vsebnost skupnih kislin, medtem ko pri vinu rdeča zvrst 2005 pa večjo vsebnost hlapnih kislin. V vinu merlot letnik 2005 je bila vsebnost hlapnih kislin statistično značilno manjša v mikrooksigeniranih vzorcih glede na kontrolo. Cano-Lopez in sod. (2006) navajajo, da je prišlo v njihovem poskusu mikrooksigenacije do precejšnjega dviga vrednosti pH in precejšnjega zmanjšanja vsebnosti skupnih kislin pri kontrolah v primerjavi z

mikrooksigeniranimi vzorci. Sklepajo, da mikrooksigenacija zaščiti zmanjšanje vsebnosti kislin v vinu, ne povzroča pa dviga hlapnih kislin in akumulacije acetaldehida.

Mikrooksigenacija je v našem primeru vplivala ne zmanjšanje skupnega ekstrakta vin, kar se je statistično potrdilo v vinih letnika 2005. Vsebnost ekstrakta se je najbolj zmanjšala v vzorcu M2 05, in sicer za slaba dva odstotka.

Cano-Lopez in sod. (2006) navajajo, da kljub vpihovanju kisika so v mikrooksigeniranih vzorcih vina določili povprečno značilno manjšo vsebnost vezanega SO<sub>2</sub> kot v kontrolnih vzorcih. V našem primeru se ta trditev skoraj v celoti potrди, saj je količina vezanega SO<sub>2</sub> v mikrooksigeniranih vzorcih skoraj v vseh primerih manjša v primerjavi s kontrolo. Le vzorca P2 05 (22 mg/L – kontrola 17 mg/L) in M1 06 (35 mg/L – kontrola 31 mg/L) vsebujeta večjo količino vezanega SO<sub>2</sub>.

Pri ostalih kemijskih parametrih nismo zasledili omembe vrednih razlik med kontrolnimi in mikrooksigeniranimi vini.

**Preglednica 18:** Primerjava vrednosti pH, prostega in vezanega SO<sub>2</sub>, vsebnosti alkohola, skupnega ekstrakta, skupnih in hlapnih kislin pred in po mikrooksigenaciji vin.

**Table 18:** Comparison of pH value, free and bound SO<sub>2</sub>, ethanol, total dry extract, total titrable and volatile acids before and after microoxygenation of wines.

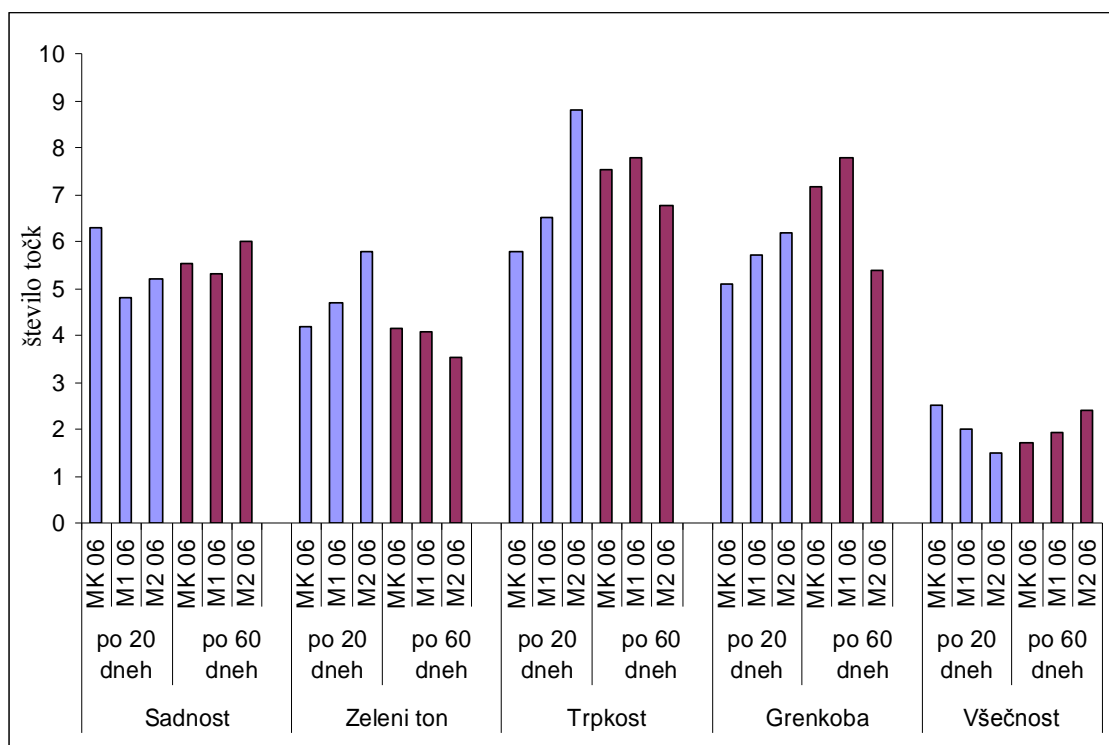
	pH		Prosti SO <sub>2</sub> (mg/L)		Skupni SO <sub>2</sub> (mg/L)		Vezani SO <sub>2</sub> (mg/L)		Skupne kisline (g/L) pH = 7,00		Skupne kisline (g/L) pH = 8,20		Hlapne kisline (g/L)		Vsebnost alkohola (vol. %)		Skupni ekstrakt (g/L)	
	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K	Z	K
<b>LETNIK 2005</b>																		
vpliv	*	***	-	-	-	-	nz	***	nz	nz	nz	nz	*	***	nz	nz	nz	*
MK 05	3,44 <sup>b</sup>	3,50 <sup>a</sup>	13	19	25	37	12	18 <sup>a</sup>	6,4	6,4	6,9	6,9	0,34 <sup>b</sup>	0,43 <sup>b</sup>	12,76	12,73	27,2	26,8 <sup>a</sup>
M1 05	3,44 <sup>b</sup>	3,49 <sup>a</sup>	14	16	26	30	12	14 <sup>b</sup>	6,5	6,4	6,9	6,9	0,37 <sup>a</sup>	0,41 <sup>c</sup>	12,74	12,75	27,0	26,6 <sup>ab</sup>
M2 05	3,45 <sup>a</sup>	3,48 <sup>b</sup>	13	14	25	27	12	13 <sup>c</sup>	6,5	6,3	7,0	6,8	0,37 <sup>a</sup>	0,46 <sup>a</sup>	12,74	12,75	27,5	26,3 <sup>b</sup>
vpliv	nz	***	-	-	-	-	**	**	nz	nz	nz	nz	**	***	nz	**	nz	*
PK 05	3,45	3,46 <sup>a</sup>	18	17	28	34	10 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	6,7	6,4	7,3	7,1	0,29 <sup>b</sup>	0,34 <sup>a</sup>	11,95	12,02 <sup>a</sup>	32,6	32,2 <sup>a</sup>
P1 05	3,45	3,44 <sup>b</sup>	12	15	28	30	16 <sup>a</sup>	15 <sup>c</sup>	6,7	6,4	7,3	7,1	0,30 <sup>b</sup>	0,31 <sup>b</sup>	11,94	11,99 <sup>b</sup>	32,4	31,9 <sup>b</sup>
P2 05	3,45	3,44 <sup>b</sup>	12	13	28	35	16 <sup>a</sup>	22 <sup>a</sup>	6,7	6,4	7,3	7,1	0,32 <sup>a</sup>	0,30 <sup>c</sup>	11,96	12,00 <sup>b</sup>	32,6	31,7 <sup>b</sup>
<b>LETNIK 2006</b>																		
vpliv	***	***	-	-	-	-	***	***	nz	nz	nz	nz	nz	nz	nz	**	nz	nz
MK 06	3,61 <sup>c</sup>	3,65 <sup>a</sup>	34	25	53	56	19 <sup>a</sup>	31 <sup>b</sup>	5,6	5,0	6,3	5,8	0,41	0,33	13,91	13,99 <sup>a</sup>	29,0	27,5
M1 06	3,62 <sup>b</sup>	3,62 <sup>b</sup>	36	23	55	57	19 <sup>a</sup>	35 <sup>a</sup>	5,5	5,0	6,2	5,7	0,44	0,32	13,97	13,96 <sup>b</sup>	29,2	27,4
M2 06	3,64 <sup>a</sup>	3,61 <sup>c</sup>	21	21	34	46	13 <sup>b</sup>	25 <sup>c</sup>	5,5	5,1	6,2	5,8	0,43	0,33	13,95	14,00 <sup>a</sup>	29,2	27,4
vpliv	***	***	-	-	-	-	***	***	nz	**	nz	*	nz	nz	**	*	nz	nz
CSK 06	3,61 <sup>a</sup>	3,62 <sup>a</sup>	16	23	32	40	16 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>	6,1	5,4 <sup>b</sup>	6,8	6,2 <sup>b</sup>	0,44	0,37	14,26 <sup>a</sup>	14,32 <sup>a</sup>	33,2	30,9
CS1 06	3,60 <sup>b</sup>	3,56 <sup>b</sup>	18	24	32	38	14 <sup>b</sup>	14 <sup>b</sup>	6,1	5,6 <sup>a</sup>	6,8	6,5 <sup>a</sup>	0,44	0,38	14,20 <sup>b</sup>	14,30 <sup>b</sup>	33,0	30,7

Z – začetni vzorec; K – končni vzorec

\*\*\* $P \leq 0,001$  statistično zelo visok značilen vpliv; \*\* $P \leq 0,01$  statistično visok značilen vpliv; \* $P \leq 0,05$  statistično značilen vpliv; nz –  $P > 0,05$  statistično neznačilen vpliv; skupine z enako črko v indeksu se med seboj statistično značilno ne razlikujejo.

#### 4.5 SENZORIČNA ANALIZA VIN LETNIKA 2006

Učinek mikrooksigenacije na kakovost vina letnika 2006 smo poskušali ovrednotiti tudi senzorično. Spremljali smo štiri senzorične lastnosti vina, za katere je vpliv mikrooksigenacije značilen ter še splošno všečnost posameznega vzorca. Cilji mikrooksigenacije so polnejši, bolj zaokrožen in svež okus ter povečanje sadnosti in aromatičnosti vina z veliko »mehkih« taninov. Postopek izboljša stabilnost in intenzivnost barve, oksidativno stabilnost, zmežča trpke tanine in povzroča zmanjšanje reduktivnih in rastlinskih arom (Goals ..., 2001; Atanasova in sod., 2002; du Toit in sod., 2006a). Rezultati senzorične analize so podani kot povprečja. Statistična analiza je zaznala značilne razlike le v nekaj primerih.



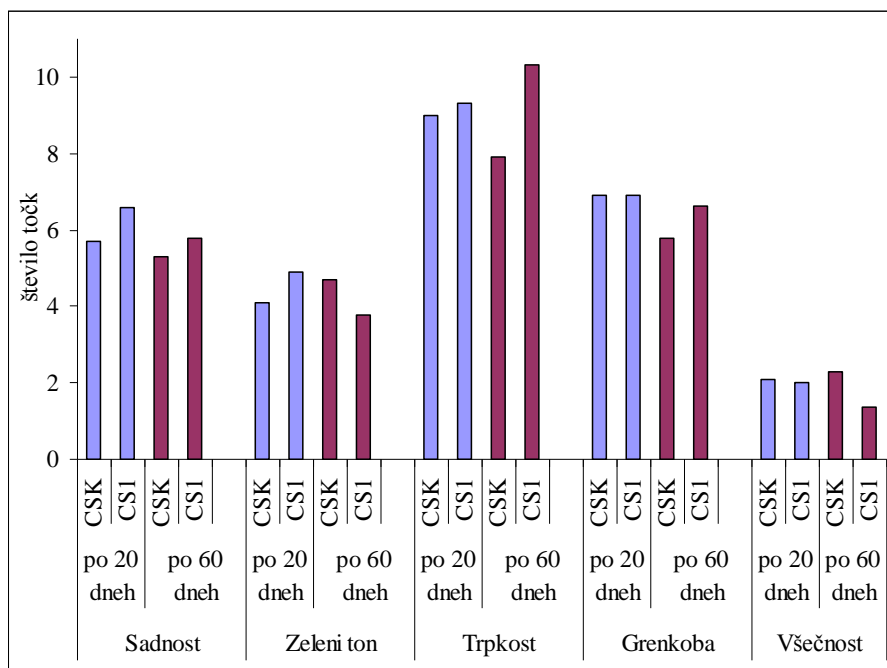
**Slika 42:** Povprečna senzorična ocena vina merlot letnik 2006 po 20 in 60 dneh mikrooksigenacije.

**Figure 42:** Average sensory evaluation of Merlot wine from vintage 2006 after 20 and 60 days of microoxygenation.

Rezultati senzorične analize vina merlot (2006) so prikazani na sliki 42. Prikazana so povprečja senzoričnih ocen, iz katerih je razvidno, da smo v mikrooksigeniranih vinih glede na kontrolo ocenili povprečno večjo sadnost, medtem ko smo v vinih, ki so bila izpostavljena večjemu vnosu kisika, zaznali manj zelenih tonov, manj grenkobe in manj trpkosti. Všečnost mikrooksigeniranih vin se je povečala v primerjavi s kontrolo.

Pri statistični obdelavi rezultatov so se pokazale značilne razlike le v sledečih primerih:

- všečnost vina po 20-ih dneh mikrooksigenacije, kjer je bilo vino kontrole ocenjeno kot najbolj priljubljeno, sledijo mikrooksigenirana vina;
- značilno manjša je bila zaznava zelenih tonov v vzorcu vina, ki je bil izpostavljen večjemu vnosu kisika, pri tem pa se je tudi všečnost bistveno povečala.



**Slika 43:** Povprečna senzorična ocena vina cabernet sauvignon letnik 2006 po 20 in 60 dneh mikrooksigenacije.

**Figure 43:** Average sensory evaluation of Cabernet Sauvignon wine from vintage 2006 after 20 and 60 days of microoxygenation.

V vinu cabernet sauvignon so se v povprečju povečala sadnost, grenkoba in trpkost mikrooksigeniranega vina. Zaznava zelenih tonov je bila manjša v mikrooksigeniranemu vinu, pri tem pa je bila tudi všečnost tega vina manjša.

Statistična obdelava rezultatov je zaznala sledečo značilno razliko:

- po 60-ih dneh mikrooksigenacije sta se trpkost in všečnost mikrooksigeniranega in kontrolnega vina značilno razlikovali.

Analiza rezultatov je tudi pokazala, da je obstajala značilna razlika v trpkosti kontrolnih vzorcev posameznih vin. Vino cabernet sauvignon je bilo v našem primeru značilno bolj trpko od merlota.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Namen naloge je bil ugotoviti, kako vpihovanje kisika s t.i. postopkom mikrooksigenacije vpliva na zorenje različnih rdečih vin. Poskus je potekal v dvoletnem obdobju (trgatev 2005 in 2006) na treh različnih vinih (merlot, cabernet sauvignon in rdeča zvrst). Rezultati so pokazali bistvene razlike med tretiranimi vini, kar je potrdilo mnenje o težavnosti pravilnega vodenja postopka mikrooksigenacije, ki se je odražalo v različni kakovosti vina, zato bo postopek potrebno prilagoditi posamezni vrsti vina.

Kemijske reakcije fenolnih spojin v vinu lahko privedejo do spremembe, degradacije in tvorbe novih taninov. Končna vsebnost skupnih fenolov v mikrooksigeniranih vzorcih vina je bila v primerjavi s kontrolo v vseh primerih manjša, vendar samo v prvem letu poskusa statistično neznačilna. V mikrooksigeniranih vzorcih rdeče zvrsti je bila na koncu vsebnost skupnih fenolov manjša za povprečno 1 % v primerjavi s kontrolnim vzorcem (4975 mg/L). V vinu merlot letnika 2005 je bila vsebnost skupnih fenolov manjša za povprečno 5 %, medtem ko je bila v vinu M2 06 vsebnost le-teh značilno manjša, za kar 25 % (2429 mg/L) v primerjavi s kontrolnim vzorcem (3222 mg/L). Mikrooksigeniran vzorec vina cabernet sauvignon letnika 2006 se je značilno razlikoval od kontrolnega vzorca, saj je na koncu vseboval povprečno 6 % (4897 mg/L) manj skupnih fenolov.

Vsebnosti taninov in netaninov ter flavonoidov in neflavonoidov v vzorcih vina so se na koncu poskusa v primerjavi s kontrolo bistveno razlikovale od vzorca do vzorca. V rdeči zvrsti letnika 2005 je bilo taninov v povprečju za 5 % več v primerjavi s kontrolnim vzorcem (2258 mg/L), netaninov pa za povprečno 6 % manj v primerjavi s kontrolnim vzorcem (2717 mg/L). V zadnjem vzorčenju smo določili 131 mg/L neflavonoidov v kontrolnem vzorcu vina, v mikrooksigeniranih vzorcih pa 9 % (P1 05) in 5 % (P2 05) značilno manjšo vsebnost le-teh.

V vinu merlot se je končna vsebnost taninov zelo razlikovala med vzorci, kar kaže na razlike pri isti sorti v različnih letnikih. V vinu merlot letnika 2005 je bila vsebnost taninov v primerjavi s kontrolo manjša le pri vzorcu M1 05. Statistično značilne razlike so se pokazale samo v vsebnosti netaninov. Vsebnost netaninov je bila manjša za 7 % v vzorcu M1 05 in 9 % v vzorcu M2 05 v primerjavi s kontrolnim vzorcem (1407 mg/L). Značilne razlike so se pokazale tudi v povprečni vsebnosti neflavonoidov, kjer smo določili 10 % manj le-teh v mikrooksigeniranih vinih.

Značilne razlike smo določili tudi pri vinu merlot letnika 2006, kjer je bila vsebnost taninov v vzorcu M1 06 manjša za 8 %, medtem ko v vzorcu M2 06 za 54 % v primerjavi s

kontrolno (1211 mg/L). Vsebnost netaninov se je na koncu v primerjavi s kontrolo zmanjšala pri vinu M1 06 za 6 %, pri vinu M2 06 pa za 7 %. V vzorcu M1 06 smo določili še za povprečno 6 % značilno večjo vsebnost neflavonoidov, v vzorcu M2 06 pa povprečno 27 % značilno manjšo vsebnost flavonoidov glede na kontrolno.

V vinu cabernet sauvignon smo v zadnjem vzorčenju določili za 10 % značilno manjšo vsebnost taninov v mikrooksigeniranem vzorcu, medtem ko se je vsebnost netaninov razlikovala le za 1 %. Značilna razlika se je pokazala še pri 7 % manjši končni vsebnosti flavonoidov v mikrooksigeniranemu vzorcu vina glede na kontrolno.

Rezultati so pokazali postopno zmanjšanje vsebnosti koncentracije antocianinov med zorenjem, kar je bilo tudi pričakovati. Vsebnost antocianinov je bila v mikrooksigeniranih vzorcih manjša zaradi povečanja reakcij antocianinov z ostalimi fenolnimi spojinami. Značilne razlike v vsebnosti prostih antocianinov smo določili v vinu rdeča zvrst, kjer je bilo antocianinov za povprečno 11 % manj v vzorcu P1 05 in za 13 % manj v vzorcu P2 05 v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Značilne razlike v vsebnosti antocianinov med mikrooksigeniranim in kontrolnim vzorcem smo določili tudi pri vzorcu M2 06 (6 % manj), medtem ko pri ostalih vinih ni bilo statistično značilnih razlik.

V vinih letnika 2005 smo izvedli še dodatne analize in izračune fenolnih indeksov za boljše razumevanje sprememb, ki potekajo v vinu ob dovajanju kisika. Indeks polimerizacije v rdeči zvrsti je pokazal sorazmerno naraščanje polimerizacije s količino vpihovanega kisika za 3 oziroma 4 %. V vinu merlot, vzorec M1 05 se ni razlikoval od kontrole, medtem ko je bil indeks polimerizacije v vzorcu M2 05 večji za 40 % in kaže na manjšo stopnjo polimerizacije. Indeksa želatine in albumina sta bila v mikrooksigeniranih vzorcih manjša, kar kaže na manjšo trpkost vin. Pravilo, da se z večjo stopnjo polimerizacije povečuje tudi trpkost, v tem primeru ne drži.

Mikrooksigenacija ima vpliv predvsem na določene fenolne spojine, ki smo jih analizirali s HPLC metodo. Značilne vplive smo določili za vsebnost katehina, epikatehina in sinapične kisline, kjer se je vsebnost teh zmanjšala v mikrooksigeniranih vinih. Razlike so se pokazale tudi v vsebnosti klorogenske in ferulne kisline. Mikrooksigenacija je povzročila zmanjšanje vsebnosti *trans*-resveratrola, *p*-kumarne kisline in kvercetina ter povečanje vsebnosti 3,4-dihidroksibenzojske kisline in fenolnih dimerov v mikrooksigeniranih vinih.

Učinek mikrooksigenacije se je pokazal tudi na aromatici vina. Povečanje sadnosti, polnosti in telesa vina z zmanjšanjem zelenih in reduktivnih arom je značilnost, ki jo pripisujejo mikrooksigenaciji. Senzorična analiza je pokazala, da se sadnost mikrooksigeniranih vin poveča, medtem ko se zaznava zelenih tonov, okus grenkobe in občutek trpkosti zmanjša v vinih, ki so bila izpostavljena večjemu vnosu kisika. Všečnost mikrooksigeniranih vin se je po mikrooksigenaciji povečala v primerjavi s kontrolno.



Statistična obdelava je potrdila značilne razlike zmanjšanja zelenih tonov mikrooksigeniranega vina merlot in povečanje vsečnosti tega vzorca. V vinu cabernet sauvignon sta se značilno razlikovali le trpkost in vsečnost mikrooksigeniranega vzorca, vendar smo v nasprotju s pričakovanjem določili večji občutek trpkosti vina in na splošno slabšo priljubljenost le-tega.

Pri analizi aromatičnih spojin smo določili nekaj značilnih razlik in potrdili, da mikrooksigenacija vpliva na določene aromatične profile. V vinu merlot se je v mikrooksigeniranih vzorcih zmanjšala vsebnost heksanola, ki mu pripisujejo značilnost zelenih tonov. Povečala se je vsebnost maščobnih kislin, ki dajejo bolj sladkobno noto in zaokrožen okus vinu, medtem ko je bila vsebnost estrov, ki so odgovorni za sadno noto vina, v večini primerov manjša. V vinu cabernet sauvignon so rezultati podobni, vendar z manjšimi razlikami.

Intenziteta barve mikrooksigeniranih vin je pokazala pričakovane rezultate, saj so vrednosti značilno večje na koncu poskusa: V mikrooksigeniranih vzorcih smo določili od 5 do 14 % večjo intenziteto barve v primerjavi s kontrolami. Intenziteta barve je bila sorazmerno večja s količino vpihovanega kisika.

Bistvenih sprememb v tonu barve vin nismo zaznali. V vzorcih rdeče zvrsti se je pokazal značilno večji ton barve v mikrooksigeniranih vzorcih za 1 in 2 %, kar lahko pripisujemo relativno manjšemu deležu antocijaninov v vinu glede na fenolno sestavo in povečanju intenzitete barve predvsem na račun rumenorjavih barvnih odtenkov vina. Pri vinih merlot in cabernet sauvignon se je ton barve v mikrooksigeniranih vzorcih rahlo zmanjšal in kaže ključne reakcije antocijaninov s fenolnimi spojinami in povečanje intenzitete barve na račun rdečih barvil.

Na koncu poskusa se je v vseh vzorcih pokazal sorazmerno od 2 do 13 % večji delež rdečega barvila glede na količino vpihovanega kisika v primerjavi s kontrolnimi vzorci. Največji porast rdečega barvila je bil pri mikrooksigeniranih vzorcih rdeče zvrsti (med 8 in 13 %), medtem ko je bil ta delež v vinih merlot in cabernet sauvignon večji med 2 in 9 %.

Delež rdeče barve pri posamezni valovni dolžini oziroma spreminjanje odtenkov barve ni pokazal bistvenih sprememb. Kljub večji intenziteti barve v mikrooksigeniranih vzorcih se delež barve pri posameznih valovnih dolžinah v rdeči zvrsti ni bistveno spremenil. Iz rezultatov je najbolj razviden sorazmerno značilno večji delež barve pri 620 nm (8 % in 11 %) in barve, odporne na vezavo SO<sub>2</sub> (9 in 13 %).

V vinu merlot smo dobili podobne rezultate, vendar manj značilne razlike. Delež modro vijolične barve (620 nm) in barvil, odpornih na vezavo SO<sub>2</sub>, se je sorazmerno povečal do 10 % oziroma 7 %, medtem ko deleža barve pri 420 in 520 nm nista pokazala večjih razlik

v primerjavi s kontrolo. V vinu cabernet sauvignonu so bile razlike manjše. Delež rumeno-rjavih barvil je bil ob zadnjem vzorčenju mikrooksigeniranega vina v primerjavi s kontrolo značilno manjši za 1,1 %. Značilno večji je bil le delež rdečih barvil, in sicer za 0,7 % v primerjavi s kontrolnim vzorcem, medtem ko v deležu modro-vijoličnih barvil ni bilo značilnih razlik. Ocena vsebnosti barvila odpornega na SO<sub>2</sub> je pokazala značilno povečanje tega v mikrooksigeniranih vinih od 2 do 14 %.

Zanimive rezultate smo dobili pri deležu posameznih barvil po mikrooksigenaciji. Pričakovali smo povečanje deleža barvil v obliki polimernih fenolov in kopigmentiranih barvil ter zmanjšanje deleža barvil v obliki prostih antocianinov. Zgodilo se je ravno nasprotno. V vseh primerih je prišlo do sorazmernega povečanja oziroma zmanjšanja deleža barvil glede na količino vpihovanega kisika. Delež barvil v obliki prostih antocianinov se je povečal od 3 do 8 % v posameznih vzorcih. Delež barvil v obliki polimernih fenolov se je zmanjšal sorazmerno od 1 do 5 %, medtem ko je bil delež kopigmentiranih barvil manjši od 1 do 6 % v posameznih vzorcih.

Rezultati nekaterih kemijskih lastnosti vina pred in po mikrooksigenaciji niso pokazali velikih razlik med kontrolnimi in mikrooksigeniranimi vzorci. V mikrooksigeniranih vzorcih smo zasledili značilno nižje vrednosti pH, kar se pri nekaterih vzorcih značilno izraža na večji vsebnosti skupnih oziroma hlapnih kislin. Mikrooksigenacija je v vinih letnika 2005 značilno vplivala na zmanjšanje vsebnosti skupnega ekstrakta do dveh odstotkov. Kljub vpihovanju kisika smo skoraj v vseh mikrooksigeniranih vinih določili manjšo vsebnost vezanega SO<sub>2</sub>.

## 5.2 SKLEPI

- Rezultati fenolnih analiz potrjujejo značilne vplive mikrooksigenacije na fenolno sestavo vina in reakcije posameznih fenolov, ki potekajo med mikrooksigenacijo.
- Spreminjanje vsebnosti posameznih fenolov spojin je sorazmerno količini vpihovanega kisika.
- Mikrooksigenacija poveča intenziteto barve in delež rdečega barvila. Barva mikrooksigeniranih vin je bolj stabilna in odpornejša na razbarvanje zaradi vezave SO<sub>2</sub>.
- Mikrooksigenacija bistveno ne vpliva na ton barve.
- Zmanjšanje vsebnosti antocianinov je večje pri tretiranju z večjo koncentracijo kisika.
- Mikrooksigenacija ima značilen vpliv na izboljšanje aromatičnosti vin, ki se kaže tako pri kromatografskih analizah kot pri senzorični analizi.
- Mikrooksigenacija značilno vpliva na zmanjšanje zaznave astringence oziroma trpkosti.

- Vsa vina oziroma vina različnih letnikov iste sorte se obnašajo drugače pri postopku mikrooksigenacije. Nemogoče je vnaprej določiti parametre procesa poteka mikrooksigenacije. Vodenje tovrstnih procesov ostaja deloma neznanka in temelji predvsem na izkušnjah ter kemijskih in senzoričnih kontrolah.
- Mikrooksigenacija je primerna tehnologija za rdeča vina vinorodne dežele Primorska, ki so načeloma fenolno zelo bogata.
- Mikrooksigenacija je smiselna predvsem kot dopolnilna in ne vodilna tehnologija v procesu zorenja vin. Pomembna je v fazi fermentacije oziroma takoj po zaključku le-te, za preprečevanje pojava H<sub>2</sub>S, stabilizacijo barve itd.
- Z ekonomskega vidika je tehnologija glede na možnost praktične uporabe relativno poceni.
- Mikrooksigenacija je povsem varna tehnologija pridelave vina ob upoštevanju osnovnih načel.

## 6 POVZETEK

### 6.1 POVZETEK

Namen mikrooksigenacije je ustvariti določene spremembe v teksturi in aromi vina, katerih ne moremo doseči s tradicionalnim zorenjem vin. Cilj tega procesa vključuje izboljšanje okusa (telesa in teksture), povečanje stabilnosti barve, povečanje oksidativne stabilnosti in zmanjšanje vegetativnih arom. Med potekom postopka opazimo razvoj in povečanje aromatike. Tanini postanejo mehkejši, vina zaokrožena in z večjim telesom. Vegetativne in reduktivne arome izginejo, pri tem pa dobimo vino z daljšim pookusom. Spremljali smo učinek mikrooksigenacije na različna rdeča vina (merlot, cabernet sauvignon in rdeča zvrst).

Mikrooksigenacija je povzročila zmanjšanje vsebnosti skupnih fenolov v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Pri posameznih fenolnih skupinah (flavonoidi, ne flavonoidi, tanini in netanini) so bili rezultati zelo različni, kar kaže na številne reakcije fenolov, ki potekajo s kisikom. Vsebnost prostih antocianinov v mikrooksigeniranih vinih je bila manjša v primerjavi s kontrolo. Mikrooksigenacija spodbuja reakcije antocianinov z ostalimi fenoli, pri čemer se koncentracija prostih antocianinov zmanjša z naraščanjem koncentracije vpihovanega kisika, kar je posledica povečanja reakcij antocianinov s proantocianidini. Analiza indeksa polimerizacije ni pokazala bistvenih sprememb, medtem ko manjše vrednosti indeksa želatine in albumina kažeta na zmanjšanje trpkosti vin.

Raztapljanje kisika je povzročilo več kondenzacijskih in polimerizacijskih reakcij, ki vplivajo na vsebnost posameznih fenolnih spojin, kot so katehin, epikatehin, sinapična kislina, klorogenska kislina, ferulna kislina, *p*-kumarna kislina, *trans*-resveratrol in 3,4-dihidroksibenzojska kislina. Kisik lahko vpliva tudi na vsebnost hlapnih spojin, čeprav naši rezultati niso pokazali bistvenih sprememb. Vpihovanje kisika se je odražalo na vsebnosti nekaterih estrov, kratkoverižnih maščobnih kislin (heksanojska in oktanojska kislina), terpenskih spojin (linalool, limonen, terpinol) in heksanola. Senzorična analiza je potrdila rezultate kemijske analize.

V vseh tretiranih vinih se je intenziteta barve bistveno povečala v mikrooksigeniranih vzorcih v primerjavi s kontrolo. Povečanje intenzitete barve je bilo sorazmerno količini kisika. Ton barve pokaže le manjše razlike med mikrooksigeniranimi in kontrolnimi vini. Nasprotno smo zabeležili sorazmerno povečanje deleža rdečega barvila in modro-vijolične barve v mikrooksigeniranih vinih, kar kaže na nastanek stabilnih barvnih kompleksov, ki so odporni na razbarvanje zaradi vezave SO<sub>2</sub>.

Razvoj posameznih skupin barvil je pokazal nepričakovane rezultate. Delež polimernih in kopigmentiranih barvil se je zmanjšal, namesto da bi se povečal, nasprotno pa smo določili

večji delež barve na račun prostih antocianinov. Vse to kaže na kompleksne reakcije, ki potekajo v vinu ob prisotnosti kisika.

Rezultati kemijskih analiz niso pokazali posebnih anomalij.

## 6.2 SUMMARY

The purpose of micro-oxygenation is to bring about desirable changes in wine texture and aroma which cannot be obtained by traditional ageing techniques. The objectives of the process include improved mouthfeel (body and texture), enhanced colour stability, increased oxidative stability, and decreased vegetative aroma. As treatment proceeds, one eventually observes an augmentation of the aromatic intensity, a development of the complexity. The tannins are less hard and softer, the body of the wine is increased, and the wine's mouthfeel is rounder. The herbaceous aromas and the reduction character vanish and the length may increase. The effect of microoxygenation treatments of different red wines (Merlot, Cabernet Sauvignon and a red *cuvée* wine) was evaluated.

Microoxygenation reduced the total phenolics content as compared to the control wine. Phenol groups (flavonoids, non-flavonoid, tannins and non-tannins) showed different results in content as a consequence of different phenol reactions with oxygen. Total anthocyanins were lower in the microoxygenated wines compared to the control wines. Microoxygenation favours reaction of anthocyanins with other phenols where concentrations of free anthocyanins decreased with increased oxygen concentration, which could be due to augmented combination of anthocyanins with proanthocyanidins. The polymerization index was also analyzed, but it shows only minor difference. The gelatin and albumin indices showed lower value, which suggested the decrease of astringency.

The oxygen dissolution, by enhancing the condensation and polymerization reactions, influenced on the content of some phenolic compounds such as catechin, epicatechin, sinapic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, *p*-cumaric acid, quercetin, *trans*-resveratrol and 3,4-dihydroxybenzoic acid. Oxygen has also an effect on the volatile composition of wine although our obtained results showed that the microoxygenation treatment did not cause significant changes. The addition of oxygen showed changes in the content of some esters, short chain fatty acids (hexanoic and octanoic acid), terpenic compounds (linalool, limonen, terpineol), hexanol. Sensory analysis confirmed the results of the chemical analysis.

In all treated wines colour intensity increased in microoxygenated wines in comparison with control. The increase was proportional to the oxygen addition, therefore the higher oxygen dose was added, higher colour intensity of wine was obtained. Colour hue showed only small differences between microoxygenated and control wine. On the other hand there

was a proportional augmentation of the degree of red pigment colouration and blue-purple colour in microoxygenated wines. This shows the formation of more stable colour which is resistant to bleaching by SO<sub>2</sub>.

The evolution of colour matters showed also unexpected results. The degree of polymeric pigment and copigment complex decreased instead of increased, on the other hand the degree of colour matter due to the free anthocyanins augmented. This shows complex reaction that take place during wine exposure to oxygen.

The results of chemical analyses did not show any anomalies.

## 7 VIRI

- Alcalde-Eon C., Escribano-Bailón M. T., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. C. 2006. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: a comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, 563: 238-254.
- Arnold R. A., Noble A. C., Singleton V. L. 1980. Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28: 675-678.
- Atanasova V., Fulcrand H., Cheynier V., Moutounet M. 2002. Effect of oxygenation on polyphenol changes in the course of wine-making. *Analytica Chimica Acta*, 458: 15-27.
- Bissel P., Steans G., Ewart A. 2003. Study of colour development in pinot noir wines. *Australian & New Zealand Wine Industry Journal*, 4, 1: 58-61.
- Blanchard L., Darriet P., Dubourdieu D. 2004. Reactivity of 3-mercaptohexanol in red wine: impact of oxygen, phenolic fractions, and sulfur dioxide. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55: 115-120.
- Boulton R. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 2: 67-87.
- Brouillard R., Chassaing S., Fougerousse A. 2003. Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? *Phytochemistry*, 64: 1179-1186.
- Cacho J., Enrique Castells J., Esteban A., Laguna B., Sagristá N. 1995. Iron, copper, and manganese influence on wine oxidation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 3: 380-384.
- Cagnasso E., Gerbi V., Caudana A. 2003. Miglioramento della qualità dei vini rossi: valutazione della maturità fenolica e applicazione della microossigenazione. *Agricoltura e Qualità*, 36: 32-36.
- Cano-López M., Pardo-Minguez F., López-Roca J. M., Gómez-Plaza E. 2006. Effect of microoxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 3: 325-331.

- Castellari M., Matricardi L., Arfelli G., Galassi S., Amati A. 2000. Level of single bioactive phenolics in red wine as a function of the oxygen supplied during storage. *Food Chemistry*, 69: 61-67.
- Cheyrier V. 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81,1: 223-229.
- Določanje polifenolov: celokupni, taninski, netaninski. Spektrofotometrična metoda. M 06-5206. 1995. Ljubljana, Kemijski inštitut: 3-3.
- Du Toit W. J. 2005. Oxygen in winemaking: part 1 and 2. Suider Paarl, WineLand. Wynboer: A Technical Guide for Wine Producers (avgust, september 2005).  
<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/200706micro.php3> (6. apr. 2008): 8 str.  
<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/200707micro.php3> (6. apr. 2008): 9 str.
- Du Toit W. J., Lisjak K., Marais J., du Toit M. 2006a. The effect of micro-oxygenation on the phenolic composition, quality and aerobic wine-spoilage microorganisms of different South African red wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 1: 57-67.
- Du Toit W. J., Marais J., Pretorius I. S., du Toit M. 2006b. Oxygen in must and wine: a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27, 1: 76-94.
- Fischer U. 1990. The influence of ethanol, pH, and phenolic composition on the temporal perception of bitterness and astringency, and parotid salivation. M. Sc. Thesis. Davis, University of California: 252 str.
- Fischer U., Boulton R. B., Noble A. C. 1994. Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationship between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli. *Food Quality and Preference*, 5: 55-64.
- Gacon K., Peleg H., Noble A. C. 1996. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Food Quality and Preference*, 7: 343-344.
- García-Puente R. E., Alcalde-Eon C., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J. C., Escribano-Bailón M. T. 2006. Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation. *Analytica Chimica Acta*, 563: 215-222.
- Gawel R., 1998. Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4: 74-95.



Goals of micro-oxygenation. 2001. Sebastopol, Vinovation Inc. (August 2001)  
<http://www.vinovation.com/MOotheory.htm> (16. apr. 2005): 18 str.

Gómez E., Martínez A., Laencina J. 1995. Prevention of oxidative browning during wine storage. *Food Research International*, 28, 3: 213-217.

Gómez-Plaza E., Gil-Muñoz R., López-Roca J. M., Martínez A. 1999. Color and phenolic compounds of a young red wine as discriminating variables of its ageing status. *Food Research International*, 32: 503-507.

Gómez-Plaza E., Gil-Muñoz R., López-Roca J.M., Martínez-Cutillas A., Fernández J. I. 2001. Phenolic compounds and color stability of red wines: effect of skin maceration time. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 3: 266-270.

Gonzales Cartagena L., Perez-Zuñiga F. J., Bravo Abad F. 1994. Interactions of some environmental and chemical parameters affecting the color attributes of wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45: 43-48.

Hernández-Orte P., Lapena A. C., Escudero A., Astrain J., Baron C., Pardo I., Polo L., Ferrer S., Cacho J., Ferreira V. 2009. Effect of micro-oxygenation on the evolution of aromatic compounds in wines: malolactic fermentation and ageing in wood. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie – Food Science and technology*, 42, 1: 391-401.

Iland P., Ewart A., Sitters J., Markides A., Bruer N. 2000. Techniques for chemical analysis and quality monitoring during winemaking. Campbelltown, Patrick Iland Wine Promotions: 98-99.

Košmerl T., Kač M. 2004. Osnovne kemijske analize mošta in vina: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 106 str.

Lea A. G. H., Arnold G. M. 1978. The phenolics of ciders: bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29: 478-483.

Levengood J., Boulton R. 2004. The variation in the color due to copigmentation in young cabernet sauvignon wines. V: *Red wine color: Revealing the mysteries*. Waterhouse A., Kennedy J.A. (eds). (ACSSymposium Series; 886). Washington, American Chemical Society: 35-52.

- Llaudy M. C., Canals R., González-Manzano S., Canals J. M., Santos-Buelga C., Zamora F. 2006. Influence of micro-oxygenation treatment before oak aging on phenolic compounds composition, astringency, and color of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4246 -4252.
- Margalit Y. 2004. Concepts in wine chemistry. 2<sup>nd</sup> ed. San Francisco, The Wine Appreciation Guild: 389 str.
- Mateus, N., De Freitas, V. A. P. 2001. Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments in Port wine during ageing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 5217-5222.
- McCord J. 2003. Application of toasted oak and micro-oxygenation to aging of Cabernet Sauvignon wines. *Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker*, 474: 43-53.
- Microsigenazione – Microdue. 2005. Verona, JU.CLA.S. (marec 2005)  
[http://www.vason.com/contenuto/comune/prodottijuclas/microsigenazione\\_eng.htm](http://www.vason.com/contenuto/comune/prodottijuclas/microsigenazione_eng.htm)  
(25. apr. 2005): 5 str.
- Morata A., Calderón F., González M. C., Gómez-Cordovés M. C., Suárez J. A. 2006. Formation of the highly stable pyranoanthocyanins (vitisin A and B) in red wines by the addition of pyruvic acid and acetaldehyde. *Food Chemistry*, 100: 1144-1152.
- Nel L. 2001. The use of micro-oxygenation technique. Suider Paarl, WineLand. Wynboer: A Technical Guide for Wine Producers. (oktober 2001)  
<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/0101technique.php3> (22. apr. 2005): 4 str.
- Ortega-Heras M., Rivero-Pérez M. D., Pérez-Mangariño S., González-Huerta C., González-Sanjosé M. L. 2008. Changes in the volatile composition of red wines during aging in oak barrels due to microoxygenation treatment applied before malolactic fermentation. *European Food Research and Technology*, 226: 1485-1493.
- Otto C. 2003. The Vasse Felix approach to micro-oxygenation. *Australian & New Zealand Wine Industry Journal*, 18, 3: 40-46.
- Ough C. S., Amerine M. A. 1988. Methods for analysis of musts and wines. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley & Sons: 377 str.

- Parish M., Wolan D., Paul R. 2000. Micro-oxygenation – a review. Australian Grapegrower & Winemaker Annual Technical Issue. Oakleigh, Wine Network Group .(januar 2000)  
[http://www.winenet.com.au/articles/WineNetwork\\_Mox-review\\_MP-RP-DW00.pdf](http://www.winenet.com.au/articles/WineNetwork_Mox-review_MP-RP-DW00.pdf)  
(18. feb. 2009): 8 str.
- Pérez-Lamela C., García-Falcón M. S., Simal-Gándara J., Orriols-Fernández I. 2007. Influence of grape variety, wine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chemistry*, 101: 601-606.
- Pérez-Mangariño S., Sánchez-Iglesias M., Ortega-Heras M., González-Huerta C., González-Sanjosé M. L. 2007. Colour stabilization of red wines by microoxygenation treatment before malolactic fermentation. *Food Chemistry*, 101: 881-893.
- Ribéreau-Gayon J. 1972. *Sciences et techniques du vin*. Paris, Dunod: 496 str.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Duburdieu D. 2000. *Handbook of enology. Volume 2. The chemistry of wine stabilization and treatments*. Chichester, John Wiley & Sons: 353-393.
- Revilla I., Pérez-Magarino S., González-Sanjosé M. L., Beltrán S. 1999. Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 847: 83-90.
- Robichaud J. L., Noble A. C. 1990. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53: 343-353.
- Silva A., Lambri M. 2006. Oxygen measures and consumption in must and wine. *Analytica Chimica Acta*. 563: 391-395.
- Singleton V. L. 1987. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 1: 69-77.
- Thorngate J. H., Noble A. C. 1995. Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3 R (-)-epicatechin and 3 S (+)-catechin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67: 531-535.

- Tsanova-Savova S., Dimov S., Ribarova F. 2002. Anthocyanins and color variables of Bulgarian aged red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15: 647-654.
- Vidal S., Francis L., Noble A., Kwiatkowski M., Cheynier V., Waters E. 2004. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513: 57-65.
- Vivar-Quintana A. M., Santos-Buelga C., Rivas-Gonzalo J.C. 2001. Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta*, 458: 147-155.
- Zoecklein B. W. 2007. Micro-oxygenation, current theory and applications. *Practical Winery & Vineyard*, november/december 2007: 24-32.
- Žorž M. 1991. HPLC. Ljubljana, samozaložba: 5-118.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Tatjani Košmerl in ostalim strokovnim delavcem fakultete za znanje in pomoč pri izdelavi magistrskega dela.

Celotni ekipi vinske kleti "Goriška Brda" se zahvaljujem za omogočeno izvedbo poskusa, še posebej Istoku Mikulinu, Darinku Ribolici in Zdenki Blaškovič za strokovno pomoč. Zahvala gre tudi Eriki, Damijani, Igorju, Miranu in ostalim sodelavcem za pomoč in podporo.

Hvala celotni družini.