

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jure GRUBAR

VPLIV ČASA MACERACIJE GROZDJIA SORTE
MODRA FRANKINJA NA EKSTRAKCIJO
POLIFENOLOV

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jure GRUBAR

**VPLIV ČASA MACERACIJE GROZDJA SORTE MODRA
FRANKINJA NA EKSTRAKCIJO POLIFENOLOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF THE MACERATION TIME OF GRAPES VARIETY
BLAUFRANKISCH ON EXTRACTION OF POLYPHENOLS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je potekalo v laboratoriju Katedre za tehnologije, prehrano in vino Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in enološkem laboratoriju Kmetijsko gozdarskega zavoda Novo mesto.

Za mentorja diplomskega dela je imenovan doc. dr. Mojmirja Wondro in za recenzentko prof. dr. Leo Pogačnik.

Mentor: doc. dr. Mojmir Wondra

Recenzentka: prof. dr. Lea Pogačnik

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Jure Grubar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 663.252.1/.3:543.2/.9(043)=163.6
KG	vino / rdeča vina / Modra frankinja / kakovost vina / maceracija / fenoli / fenolne spojine / antociani / flavonoidi / neflavonoidi / kemijska sestava
AV	GRUBAR, Jure
SA	WONDRA, Mojmir (mentor) / POGAČNIK, Lea (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	VPLIV ČASA MACERACIJE GROZDJIA MODRA FRANKINJA NA EKSTRAKCIJO POLIFENOLOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	VIII, 43 str., 4 pregl., 17 sl., 43 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Maceracija je proces, ki pri pridelavi rdečih vin sledi drozganju grozdja in omogoča podaljšan stik grozdnega soka s trdnimi delci grozdne jagode. V raziskavi smo uporabili ročno trgano grozdje sorte Modra frankinja, ki je bilo pridelano v vinorodni deželi Posavje. Maceracija drozge je potekala 9 dni v avtomatiziranem vinifikatorju vinske kleti Krško. Namen raziskave je bil ugotoviti, ali je pri sorti Modra frankinja 9 dni tisti čas maceracije drozge, ki optimalno vpliva na ekstrakcijo polifenolov. Med maceracijo drozge smo vsakih 24 h odvzemali vzorce mošta ter v njem določali osnovne kemijske parametre (sladkor, pH, titrabilne in hlapne kisline), barvne parametre (intenziteta, ton, delež rdeče barve in absorbanca pri valovnih dolžinah 420, 520, 620 nm) in koncentracijo različnih fenolnih spojin (skupni fenoli, flavonoidi, neflavonoidi, antociani, taninski in netaninski fenoli). Vsebnost sladkorja v moštu je s časom maceracije drozge padla z začetnih 84 °Oe na končnih 32 °Oe. Koncentracija skupnih fenolov in antocianov v moštu se je med maceracijo drozge povečevala in na koncu dosegla vrednost 1883 mg/L oziroma 610 mg/L. Povečevale so se tudi koncentracije taninskih fenolov in flavonoidov. Barvni parametri so se med maceracijo spreminjali.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 663.252.1/3:543.2/.9(043)=163.6
CX	wine / red wines / Blaufrankisch / wine quality / maceration / phenols / phenol compounds / anthocyanins / flavonoids / nonflavonoids / chemical structure
AU	GRUBAR, Jure
AA	WONDRA, Mojmir (supervisor) / POGAČNIK, Lea (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY	2016
TI	INFLUENCE OF THE MACERATION TIME OF GRAPES VARIETY BLAUFRANKISCH ON EXTRACTION OF POLYPHENOLS
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	VIII, 43 p., 4 tab., 17 fig., 43 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Maceration is a process of the red wine production, which allows prolonged contact of the grape juice with berry particles. In this research hand-harvested grapes Blue Franconian, which were produced in the Posavje region, were used. Maceration of the mash was performed in the wine cellar Krško in automated fermentation tank for 9 days. The purpose of the study was to determine, if 9 days of maceration is the optimal time for polyphenol extraction. During the maceration process must samples were taken every 24 h. Analyses consisted of determination of basic chemical parameters (sugar, pH, titratable and volatile acids), colour parameters (intensity, tone, proportion of red colour and absorbancy at 420, 520 and 620 nm) and concentrations of polyphenols (total phenols, flavonoids, non-flavonoids, anthocyanins, tannic and non-tannic phenols). The sugar content of the must dropped from the initial 84 °Oe to 32 °Oe at the end of maceration. Total phenols and anthocyanins were increasing and finally reached 1883 mg/L and 610 mg/L, respectively. The tannin phenols and flavonoids were also increasing. The colour parameters were changing during the maceration.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE.....	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK.....	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN RAZISKAVE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 VINORODNA DEŽELA POSAVJE IN MODRA FRANKINJA.....	3
2.2 PREDELAVA GROZDJIA.....	5
2.2.1 Pecljanje in drozganje.....	5
2.2.2 Maceracija.....	5
2.2.3 Stiskanje	6
2.2.4 Vinifikator	7
2.3 SESTAVA VINA.....	8
2.3.1 Voda.....	8
2.3.2 Alkoholi	8
2.3.3 Glicerol	9
2.3.4 Ogljikovi hidrati	9
2.3.5 Kisline	10
2.3.6 Aldehidi	10
2.3.7 Estri.....	11
2.3.8 Fenolne spojine	11
2.3.9 Neflavonoidi	14
2.3.10 Resveratrol.....	14
2.3.11 Aromatične spojine	15
3 MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIAL	17
3.1.1 Grozdje sorte Modra frankinja.....	17
3.1.2 Priprava in maceracija drozge	17
3.2 METODE DELA	17
3.2.1 Merjenje koncentracije sladkorja.....	18
3.2.2 Merjenje vrednosti pH.....	18
3.2.3 Merjenje titrabilnih kislin	19
3.2.4 Določanje koncentracije hlapnih kislin	19
3.2.5 Intenziteta in ton barve	20
3.2.6 Določanje koncentracije antocianov	22
3.2.7 Določanje skupnih fenolnih spojin po Singletonu in Rossiju.....	23
3.2.8 Določanje koncentracije neflavonoidov in flavonoidov.....	24

3.2.9	Določanje netaninskih fenolov.....	25
3.2.10	Statistična analiza	25
4	REZULTATI	27
4.1	DOLOČANJE OSNOVNIH KEMIJSKIH PARAMETROV	27
4.2	DOLOČANJE POLIFENOLOV	28
4.2.1	Vsebnosti skupnih fenolov v moštu med maceracijo.....	29
4.2.2	Vsebnosti taninskih in netaninskih fenolov v moštu med maceracijo	29
4.2.3	Vsebnosti flavonoidov in neflavonoidov v moštu med maceracijo.....	30
4.2.4	Vsebnosti antocianov v moštu med maceracijo	31
4.3	DOLOČANJE BARVNIH PARAMETROV	31
4.3.1	Intenziteta barve.....	32
4.3.2	Delež rdeče barve oziroma prostih in vezanih antocianov v obliki flavilijevega kationa.....	33
4.3.3	Delež rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah	33
4.3.4	Ton barve	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	35
5.1	RAZPRAVA	35
5.2	SKLEPI	36
6	VIRI.....	40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Porazdelitev fenolnih spojin (%) v grozdni jagodi (Košmerl in sod., 2004).....	11
Preglednica 2: Rezultati merjenja osnovnih kemijskih parametrov v moštu med maceracijo.....	27
Preglednica 3: Rezultati določanja vsebnosti polifenolov v moštu med maceracijo	28
Preglednica 4: Rezultati barvnih parametrov v moštu med maceracijo	32

KAZALO SLIK

Slika 1: Vinorodna dežela Posavje (Vinorodna dežela Posavje, 2011).....	3
Slika 2: Grozd sorte Modra frankinja.....	4
Slika 3: Predelava rdečega grozdja - klasični postopek (Vodopivec, 1993)	5
Slika 4: Primer fenolne spojine - hidroksibenzojska kislina (Abram in Simčič, 1997)	11
Slika 5: Glavni proantocianidini grozdja in vina (Vrhovšek, 2000)	12
Slika 6: Strukturna formula monomernih enot flavan-3-olov (Abram in Simčič, 1997)	13
Slika 7: Strukturna formula antociana (Vrhovšek, 2000).....	13
Slika 8: Strukturna formula resveratrola (Jackson, 2000).....	15
Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin (Singleton in Rossi, 1965).....	24
Slika 10: Koncentracija skupnih fenolov v moštu med maceracijo	29
Slika 11: Koncentracije taninskih in netaninskih fenolov v moštu med maceracijo.....	30
Slika 12: Koncentracije flavonoidov in neflavonoidov v moštu med maceracijo.....	30
Slika 13: Koncentracije antocianov v moštu med maceracijo.....	31
Slika 14: Intenziteta barve mošta med maceracijo	32
Slika 15: Delež rdeče barve mošta med maceracijo	33
Slika 16: Deleži rdeče barve pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm v moštu med maceracijo	33
Slika 17: Ton barve mošta med maceracijo	34

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CO ₂	ogljikov dioksid
NaOH	natrijev hidroksid
°Oe	Öechslejeva stopinja
PTP	priznано tradicionalno poimenovanje
SD	standardna deviacija
SO ₂	žveplov dioksid

1 UVOD

Pridelava grozdja sorte Modra frankinja je v Sloveniji večinoma razširjena v vinorodni deželi Posavje. Modra frankinja predstavlja v Podravskem in Posavskem vinskem rajonu eno najbolj kakovostnih rdečih sort. S svojo bogato fenolno sestavo je primerna za zorenje v leseni posodi, kjer pokaže vso svojo vrhunskost, hkrati pa je lahko tudi kakovostno enoletno vino. Sorta Modra frankinja je lahko primerna za pridelavo vrhunskih rdečih vin, če je grozdje doseglo sladkorno stopnjo vsaj 85 °Oe (Nemanič, 1996). Jagodna kožica, ki ima bogato fenolno sestavo, ima pomembno vlogo pri senzoričnih lastnostih vina (Silva in Queiroz, 2016). Z ustreznim časom maceracije grozdja lahko pridelamo odlično mlado vino za takojšnjo porabo ali krepko intenzivno obarvano vino za nadaljnje zorenje. Sorta Modra frankinja je med drugim osnova za vino Metliška črnina, zastopana pa je tudi v rdečem Bizeljčanu PTP (priznano tradicionalno poimenovanje) in Cvičku PTP. Njena kakovostna stopnja je odvisna predvsem od dozorelosti in načina ter časa maceracije drozge. Mnogokrat pa predelovalci grozdja ne izkoristijo celotnega potenciala, ki ga ima sorta Modra frankinja (Nemanič, 1996).

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki dajejo vinu barvo, vplivajo na vonj in okus, so osnova za staranje vina, delujejo kot antioksidanti in konzervansi ter izkazujejo antimikrobno aktivnost. Fenolne spojine imajo dokazan pozitiven učinek na zdravje ljudi. Splošno so fenoli ciklične benzenove spojine z eno ali več hidroksilnimi skupinami. Izhajajo predvsem iz grozdja, nekaj pa se jih med pridelavo vina ekstrahira iz lesene posode (Bavčar, 2006). Fenolne spojine določajo predvsem karakter grozdja in kasneje vina. Fenolne spojine vključujejo rdeče pigmente, trpke okuse ter grenke substance v grozdju in vinu. Nekatere od njih hitro oksidirajo in sodelujejo v nadaljnjih reakcijah zorenja vina. Na vsebnost posameznih fenolov vplivata predvsem genetska zasnova sorte in letnik pridelave (Lingua in sod., 2016; Alcalde-Eon in sod., 2006).

1.1 NAMEN RAZISKAVE

V zadnjem desetletju na slovenskem trgu močno narašča povpraševanje po vinu sorte Modra frankinja. Omenjena sorta je v Sloveniji najbolj zastopana v vinorodni deželi Posavje, vendar se njena pridelava širi tudi v ostala vinorodna območja. Kakovost vina je močno odvisna od tehnoloških postopkov pri predelavi, predvsem maceracije, zato bomo v diplomskem delu ovrednotili različne kemijske parametre mošta med maceracijo. Z analizo parametrov mošta sorte Modra frankinja želimo ugotoviti, ali je 9-dnevna maceracija optimalna za ustrezen razvoj barvnih parametrov in polifenolov.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

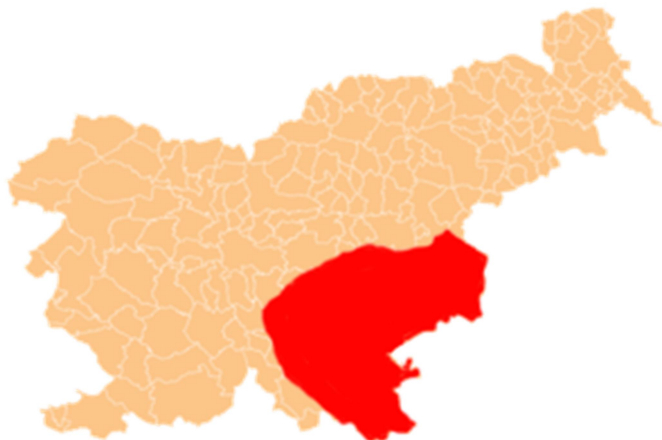
Predpostavljamo, da bomo z daljšim časom maceracije (devet dni) drozge sorte Modra frankinja dosegli ugodno polifenolno sestavo in barvo ter s tem vplivali na kakovost vina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 VINORODNA DEŽELA POSAVJE IN MODRA FRANKINJA

V zadnjem času se Modra frankinja uveljavlja na tržišču kot samostojno vino. V Sloveniji je prisotna v vinorodnih deželah Posavje in Podravje (Nemanič, 2014). Vinorodna dežela Posavje (slika 1) je razdeljena na tri okoliše, in sicer Dolenjska, Bela Krajina in Bizeljsko Sremič. Obsega področje zahodno od reke Sotle, Posavje, okolici reke Krke in Kolpe, kar predstavlja približno 4500 ha površine vseh vinogradov (Bunderl Rus in sod., 1994). V vinorodni deželi Posavje je skupna površina vinogradov z Modro frankinjo ocenjena na 520 ha, kar pomeni približno 2 100 000 trsov. Največ od tega, kar polovica, jo je prisotne v vinorodnem okolišu Dolenjska. V Štajerski Sloveniji jo je bistveno manj, slabih 170 ha, kar pomeni približno 660 000 trsov (Nemanič, 2014).

Vinorodna dežela Posavje je gričevnata, marsikje preprejena s strmimi brežinami, zato je obdelava vinogradov otežena. Tla so večinoma sestavljena iz laporja in peščenjakov z apnenčastim vezivom. Podnebje je celinsko z vplivi hladnejše podalpske klime. Letna količina padavin se giblje med 1000 in 1200 mm (Bunderl Rus in sod., 1994).



Slika 1: Vinorodna dežela Posavje (Vinorodna dežela Posavje, 2011)

Modra frankinja predstavlja 4,21 % skupne površine vinogradov v Sloveniji, medtem ko v svetovnem merilu slovenska pridelava vina Modra frankinja predstavlja 4,16 % med najpopularnejšimi svetovnimi rdečimi sortami grozdja (Anderson in Nanda, 2013). Pojavlja se v nižjem in višjem kakovostnem razredu. Kakovostni razred je odvisen od obremenitve trte, dozorelosti grozdja, časa trgatve, načina vinifikacije in izbrane dosledne tehnologije. Trenutno se sortni in krajevni značaj vina Modra frankinja ne odražata dovolj raznoliko med Podravskega in Posavskega okolišem. Razlike, ki bi temeljile na različnih naravnih dejavnikih (terroir), pa bi bile zaželeni. Zato je potrebno znanje širiti in nadgrajevati ter z leti doseči zastavljen cilj (Nemanič, 2014).

Modra frankinja je po razširjenosti in kakovosti glavna rdeča sorta v vinorodni deželi Posavje. Sorta spada v skupino trt črnomoškega bazena – *Proles pontica*. Pridelujejo jo tudi v drugih evropskih državah, predvsem na Madžarskem, v Avstriji, na Češkem, v Nemčiji, v Romuniji, na Hrvaškem, v manjšem obsegu pa tudi na Slovaškem, v Bolgariji, Italiji, Srbiji in Španiji. Poznana je pod številnimi imeni, med katerimi so najbolj pogosta: Blauer Limberger, Blaufränkisch, Frankovka, Frankovka modra, Franconia, Kekfrankos, Game (Robinson in sod., 2013).



Slika 2: Grozd sorte Modra frankinja

Sorta za pridelovanje ni zahtevna, saj dobro uspeva tako na težkih apnenčastih tleh kakor tudi na rodovitnih ilovnatih tleh, ki so lahko delno peščena. Modra frankinja, za katero je značilno, da odganja zgodaj, je ena izmed najbujnejših sort v našem prostoru. Zaradi bujne rasti, ki je predvsem v vlažnih letih pretirana, zahteva strokovno obdelavo, predvsem pri zimski rezi in gnojenju vinograda (Nemanič, 1996).

List je velik, okrogel s plitvimi zarezi, povprečno velik 240 cm². Listni pecelj je dolg in srednje debel. Grozd je v tehnološki zrelosti srednje velik do velik, nekoliko deljen in ne preveč zbit (slika 2). Težak je v povprečju od 120 do 200 g. Jagoda je v tehnološki zrelosti srednje debela, okroglasta, temno modra in malo naprašena. Jagodna kožica je debela in trda, meso pa sočno in sladko. Sok jagode je brezbarven ali rahlo rdečkaste barve. Posamezna jagoda ima eno ali dve pečki srednje velikosti (Hrček, 1982; Goethe, 1887). Mošt iz grozdja Modre frankinje ima 15–18 % sladkorja in 7–8 g/L skupnih kislin. Vina so polna, sveža, jedrnata, modro rdeče barve, bogata s tanini, ki se dobro prekrijejo z drugimi sestavinami (Šikovec, 1996).

2.2 PREDELAVA GROZDJA

2.2.1 Pecljanje in drozganje

Pecljanje je postopek, pri katerem ločimo jagode od pecljev. Postopek je pri predelavi rdečega grozdja nujen (slika 3), saj bi peclji v nasprotnem primeru povzročili grenkobo in trpkost v moštu ter kasneje v vinu. Peclji zdravega grozdja predstavljajo 2–8 % skupne mase. Drozganje je proces, pri katerem sprostimo sok oziroma jagodno meso iz jagode. Strojno pecljanje in drozganje potekata sočasno, pri čemer pazimo, da ne poškodujemo pecljev. Hkrati pazimo, da nam drozgalnik stisne jagode samo toliko, da iz njih izteče sok in minimalno poškoduje jagodne kožice ter pečke (Radovanović, 1970).



Slika 3: Predelava rdečega grozdja - klasični postopek (Vodopivec, 1993)

2.2.2 Maceracija

Maceracija je postopek predelave rdečega grozdja, pri katerem pustimo drozgo stati od 3 do 6 dni ali več. Zasnovan je na kontaktu jagodnega soka z jagodnimi kožicami. Za kakovost vina je to ena najpomembnejših faz tekom predelave grozdja v vino. Cilj maceracije je ekstrakcija fenolnih snovi iz jagodne kožice in pečk (barvnih in taninskih). Ta faza predelave je odgovorna za vse specifične karakteristike (videz, vonj, okus) in loči bela od rdečih vin. Med maceracijo se sproščajo aromatične snovi in njihovi prekursorji, dušične spojine, polisaharidi ter minerali, ki izvirajo iz jagodnih kožic, pecljevine in pečk. Vsaka sestavina vpliva na kemično in senzorično raznolikost fenolnih spojin. Pecljevina

daje vinu travnat vonj, medtem ko pečke prispevajo k rezkosti in grobosti. Jagodne kožice in pečke vplivajo na uravnoteženje vina. Fenolne spojine iz različnih komponent grozdja variirajo v odvisnosti od sorte, pogojev maceracije in drugih faktorjev. Koncentracija fenolnih spojin med maceracijo narašča. Vina, pridelana iz grozdja, ki je raslo na najboljših legah, so sposobna daljših in intenzivnejših maceracij. Taka vina potrebujejo tudi daljši čas zorenja v kleti. Rdeča vina nižje kakovosti, namenjena hitri konzumaciji, se macerirajo manj časa, saj bi se z dolgo maceracijo pokazalo več napak kot kakovostnih parametrov (Bavčar, 2006).

Ekstrakcijo fenolnih snovi iz jagodnih kožic razdelimo v štiri postopke:

- klasična maceracija, pri kateri je temperatura drozge do 30 °C;
- maceracija v atmosferi ogljikovega dioksida (CO₂) ali karbonska maceracija;
- topla maceracija ali termovinifikacija, kjer je temperatura drozge 45 °C (2 do 3 ure) ali 80 °C (nekaj minut), nato pa sledi hitra ohladitev;
- hladna maceracija ali kriomaceracija, kjer je temperatura nižja od 15 °C in se uporabi večje količine žveplovega dioksida (SO₂) – do 400 mg (Nemanič in sod., 1997).

Faktorji, ki vplivajo na ekstrakcijo polifenolov, so temperatura in čas maceracije, vsebnost alkohola, CO₂, kislin in potapljanje klobuka. Klobuk so trdni delci drozge, ki se zaradi nastajajočega CO₂ tekom alkoholne fermentacije dvigajo na površje vrelne posode. Med maceracijo je potrebno klobuk potapljati, saj v nasprotnem primeru pride do negativnih procesov v tej fazi predelave, kot so oksidacija, razvoj očetno-kislinskih bakterij ali kopičenje toplote v vinifikatorju. Temperatura močno vpliva na ekstrakcijo polifenolov, ki se hitreje ekstrahirajo pri višjih temperaturah, ter antocianov, na katere temperatura nima tako velikega vpliva (Boulton in sod., 1996). Daljši postopek maceracije pomeni višjo koncentracijo ekstrahiranih fenolnih snovi v vinu, zato je le-to bolj trpko. Barva pri daljšem postopku maceracije sicer ni intenzivnejša, je pa stabilnejša, saj se na antocianske komponente vežejo tanini, ki stabilizirajo barvo (Bajuk, 2000). Z višanjem koncentracije alkohola se pospešuje ekstrakcija fenolnih spojin, predvsem taninov iz pečk (Klenar, 1998).

2.2.3 Stiskanje

Stiskanje je postopek, s katerim ločimo tekoči del od trdnega, torej sok od grozdnih jagod. Bele sorte stiskamo takoj po pecljanju, rdeče pa po končani maceraciji. Ločimo več tipov stiskalnic, ki se med seboj razlikujejo po materialu, načinu prenosa sile in načinu spravljanja drozge. Poznamo mehanske, hidravlične, pnevmatske in kontinuirne stiskalnice. Glede na lego koša jih delimo na vertikalne in horizontalne (Nemanič in sod., 1997).

2.2.4 Vinifikator

Vinifikator je posoda, v kateri poteka maceracija rdečih vin skupaj s fermentacijo. Je nepogrešljiv del opreme pridelave rdečih vin, saj bistveno pripomore h končni kvaliteti vina. Vinifikatorji so lahko narejeni iz različnih materialov – lesa, betona ali jekla. Les je plemenit material in leseni vinifikatorji so bili dolgo del tradicije vinogradniških območij. Slaba stran lesa je njegovo vzdrževanje, saj ima omejeno življenjsko dobo, lahko pa je tudi vir kontaminacije in slabih okusov. Pomanjkljivost je tudi ta, da niso hermetično zaprti in da je les slab prevodnik toplote. Betonski vinifikatorji dovoljujejo rabo dejanskega volumna, saj so ti tanki narejeni na mestu. Slabost je v tem, da kisline razžirajo beton, zato morajo biti notranje stene ustrezno zaščitene z epoksi smolami. Kljub zaščiti je potrebno redno vzdrževanje le-teh. Beton je boljši prevodnik toplote kakor les, vendar so hladilni sistemi še vedno nepogrešljiv del sistema. Ti tanki so popolnoma hermetično zaprti in se lahko uporabljajo tudi za shranjevanje vina. Jeklo, še posebej nerjaveče jeklo, je najpogostejše uporabljen material v današnjih časih. Obstajata dve vrsti nerjavečega jekla: prvi vsebuje molibden, drugi ne. Krom-nikelj-molibden jeklo je bolj odporno na korozijo in je nujno za dolgoročno shranjevanje žveplanih vin. Še posebej je to pomembno v delno napolnjenih posodah, saj v vlažni atmosferi nad površino vina prihaja do koncentriranja plinastega SO₂, njegove pare pa na stene posode delujejo korozivno. Nerjaveči jekleni tanki imajo prednost, ker so hermetični in imajo vgrajene različne oblike opreme in merilnikov. Olajšano je tudi vzdrževanje, tako notranje kakor tudi zunanje. Nerjaveče jeklo je dober toplotni prevodnik. Hlajenje v teh tankih je dokaj poenostavljeno. Hladna tekočina kroži v dvojnem plašču tanka ali v vgrajenem toplotnem izmenjevalcu (Radovanović, 1970). V 60. in 70. letih prejšnjega stoletja so nerjaveči tanki dokazali svojo prednost pri kontroli parametrov v primerjavi z lesenimi in betonskimi tanki. Danes se z njihovo pomočjo drozge lahko tudi segrevajo, še posebej v tistih, ki so postavljeni zunaj kleti (Ribereau Gayon in sod., 2000).

Kmalu po zaključku fermentacije se temperatura hitro spusti na zunanjo, kar pomeni, da so nekateri post-fermentativni procesi upočasneni, kar pa ni zaželeno. Zato so v današnjem času vinifikatorji s sistemom regulacije temperature nujno potrebni. Zelo je pomembna tudi velikost vinifikatorja. Tanki velikih kapacitet so seveda bolj ekonomični, vendar velikost ne sme biti pretirana in prilagojena proizvodnji. Različne stopnje pri pridelavi vina je težko kontrolirati do potankosti v tankih, večjih od 50 000 litrov. Tank naj bi bil napolnjen pred začetkom fermentacije, čas zapolnjevanja pa naj ne bi presegal 12 ur. Tudi oblika vinifikatorja je pomembna. Izmenjevalna površina med jagodnimi kožicami in grozdnim sokom mora biti zadostna. Včasih so tanki previsoki za svoj premer. Obratno, tanki ne smejo biti preširoki. V tem primeru je ekstrakcija snovi zelo reducirana, vinifikator tako izgubi svojo učinkovitost, lahko pride do prekomernega stika s zrakom (Ribereau Gayon in sod., 2000).

Osnovni model vinifikatorja mora biti opremljen z vsaj dvema odprtinama, razporejenima na spodnjem in zgornjem delu. Ti odprtini služita za dovod in odvod drozge ter čiščenje po končani vinifikaciji. Nepogrešljivi so: merilnik, ki kaže volumen vsebujoče drozge v sistemu; odtok za jemanje vzorcev; merilnik temperature; ter pokrov na vrhu tanka, ki mora omogočati hermetično zaprtje vinifikatorja. Navadno se na tovrstnih tankih pojavljajo še sistemi, ki avtomatsko spremljajo in regulirajo temperaturo. Sprva so bili ti sistemi sestavljeni iz enostavnega pretoka hladne vode skozi tank. Danes hladilne tekočine krožijo skozi dvojni plašč tanka ali imajo vgrajene toplotne izmenjevalce. Slednji je sicer bolj učinkovit, vendar lahko povzroča težave pri čiščenju. Potreben je tudi sistem za prečrpavanje drozge, istočasno s segrevanjem ali hlajenjem drozge, da se skupaj z vsebino vinifikatorja homogenizira njena temperatura. Avtomatski kontrolni sistemi za temperaturo so narejeni tako, da jo regulirajo skozi celoten proces fermentacije. Avtomatski sistemi za prečrpavanje drozge so nujni in pomembni za olajšano ekstrakcijo snovi iz jagodne kožice in zračenje fermentirane drozge. Aeracija je najbolje kontrolirana, če v sistem vnašamo vnaprej določene količine kisika. Trajanje prečrpavanja drozge pogosto pripelje do prekomerne astringence v vinu, na kar moramo biti še posebej pozorni. Prečrpavanje drozge s zračenjem je lahko koristno le v določenih primerih, samo prečrpavanje pa ima veliko koristnih učinkov. Homogenizira se temperatura, koncentracija sladkorja in koncentracija kvasovk. To omogoča boljši učinek fermentacije, hkrati pa omogoča boljšo ekstrakcijo polifenolov iz jagodne kožice. Nepogrešljiv je tudi sistem za avtomatično odstranjevanje jagodnih kožic. Ta lastnost je pomembna predvsem pri horizontalnem tipu vinifikatorja. Ti sistemi se lahko nagnejo pod določenim kotom in s tem izboljšajo ter olajšajo izpraznitev vsebine vinifikatorja (Ribereau Gayon in sod., 2000).

2.3 SESTAVA VINA

2.3.1 Voda

Voda je najbolj zastopana spojina v vinu, saj jo vsebuje 75–85 %. Nižji je odstotek vode, višja je kakovost vina, ker so toliko bolj zastopane druge spojine. Voda v vinu deluje kot topilo in reagent v kemijskih reakcijah (Bavčar, 2006).

2.3.2 Alkoholi

Etanol je najpomembnejši in najbolj zastopan alkohol v vinu. Vinu daje stabilnost, deluje kot topilo in zagotavlja določene senzorične lastnosti. Nastane med potekom alkoholne fermentacije kot posledica delovanja kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Splošna reakcija alkoholnega vrenja: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$. Etanol nastane iz glukoze in fruktoze. Kvasovke lažje presnavljajo glukozo kot fruktozo, zato v nepovretem vinu običajno ostaja fruktoza. Vsebnost etanola v vinih je običajno med 9 in 14 volumskih %.

Izkoristek sladkorjev je v močni povezavi z uporabljenimi sevi kvasovk, temperaturo fermentacije in pH vrednostjo mošta.

Vloga etanola:

- deluje kot topilo pri ekstrakciji barvil in taninov med vinifikacijo rdečih sort;
- raztaplja hlapne snovi, ki se oblikujejo med fermentacijo;
- pri staranju vina reagira z organskimi kislinami in tvori estre, z aldehidi pa acetale;
- vinu doda specifičen vonj in okus, v večjih koncentracijah pa deluje pekoče ter stopnjuje zaznavo sladkobe in grenkobe (Rapp in Mandery, 1986).

Poleg etanola so v vinu še drugi alkoholi, in sicer višji alkoholi, ki dajejo vinu aromo, ter sladki alkoholi (dioli, polioli), ki dajejo vinu polnost. Višje alkohole so alkoholi z več kot dvema ogljikovima atomoma. Predstavljajo približno 50 % vseh aromatičnih snovi v vinu, če ne upoštevamo etanola. Pomembni so tudi pri staranju vina, saj se iz njih tvorijo estri. Največ jih nastane kot sekundarni produkt med alkoholno fermentacijo, nekaj pa jih je prisotnih v jagodah. Prekursorji za nastanek višjih alkoholov so nekatere aminokisline ali nekateri sladkorji. Pomembni višji alkoholi v vinu so izoamil alkohol (3-metil-1-butanol), amil alkohol (2-metil-1-butanol) in izobutil alkohol (2-metil-1-propanol) (Rapp in Mandery, 1986).

2.3.3 Glicerol

Glicerol je stranski produkt alkoholne fermentacije. Lahko je prisoten že v grozdju. V suhih vinih ga je poleg vode in etanola največ. Glicerol deluje rahlo sladko in daje vinu polnost ter zaokroženost. V vinu je stabilen, lahko pa služi kot vir ogljika za mikroorganizme, kot so oacetnokislinske ali mlečnokislinske bakterije (Berovič in sod., 2007).

2.3.4 Ogljikovi hidrati

Ogljikove hidrate delimo na monosaharide, disaharide in polisaharide. Ogljikovi hidrati so organske spojine, ki vsebujejo zgolj ogljikove, kisikove in vodikove atome. Nastajajo v procesu fotosinteze v listih rastlin. Njihova koncentracija v vinu je pomembna za mikrobiološko stabilnost vina, delitev vina v kategorije in senzorične lastnosti vina. Njihov slahek okus v pravilnem razmerju s kislino vzpostavi ravnotežje v vinu, večja koncentracija sladkorjev pa tudi prekrije zaznave grenkobe (Bavčar, 2006).

Monosaharide delimo na heksoze in pentoze. Heksoze so najpomembnejši in količinsko najbolj zastopani ogljikovi hidrati v moštu in vinu. So glavni substrat za kvasovke pri alkoholni fermentaciji. Služijo kot vir energije, za tvorbo etanola, višjih alkoholov, estrov maščobnih kislin in aldehydov. Pomembnejša monosaharida sta glukoza in fruktoza. Njuna

skupna koncentracija v zrelem grozdju je med 150 in 300 g/L. Razmerje med glukozo in fruktozo je tudi parameter zrelosti grozdja. V polni zrelosti je njuno razmerje 1:1, po polni zrelosti pa prevladuje fruktoza. Kvasovke najprej fermentirajo glukozo, šele nato fruktozo. Pentoze je v moštu in vinu bistveno manj. Kvasovke jih ne morejo uporabiti kot substrat. Glavne pentoze v vinu so arabinoza, ksiloza in ramnoza (Bavčar, 2006).

Najpomembnejši disaharid je saharoza. V večini rastlinskih celic predstavlja pomembno energetska zalogo. Sestavljena je iz glukoze in fruktoze. Kvasovke je ne uporabljajo direktno, presnavljajo pa produkte njene hidrolize (Bavčar, 2006).

Polisaharide predstavljajo pektini, glukani, dekstrani in škrob. V grozdju imajo dve pomembni funkciji, in sicer strukturno (celuloza, pektin) ter energetska (škrob). V vino preidejo skupaj z moštom med mletjem in stiskanjem, lahko pa tudi kot posledica mikrobiološke aktivnosti. Navadno je njihova koncentracija večja v rdečih vinih, kjer v tehnološkem postopku uporabimo višjo temperaturo. V vinu in moštu so pomembni zaradi velikosti molekul ter koloidnih lastnosti. Le-te lahko povzročajo težave pri filtraciji in preprečujejo bistrenje vina (Bavčar, 2006).

2.3.5 Kisline

V moštu in vinu se večinoma nahajajo organske kisline. V vinu so v glavnem prisotne vinska, jabolčna, citronska in mlečna kislina. Poleg naštetih so v vinu še očetna, jantarna, piruvična, propionska, glikolova, galakturonska, oksalna, fumarna kislina. Skupna koncentracija kislin v vinu je običajno od 5,5 do 8,5 g/L. Koncentracija kislin je pomembna za stabilnost, barvo, kislost oziroma primeren pH in obstojnost vina. Imajo velik vpliv na ravnotežje vina. Organske kisline v vinu delimo na hlapne in nehlapne. Nehlapne pridejo v vino iz grozdja, le manjši del jih nastane v samem vinu. Hlapne kisline v vinu so sekundarni produkt alkoholne fermentacije ali pa produkt kvarjenja vina (Bavčar, 2006).

2.3.6 Aldehidi

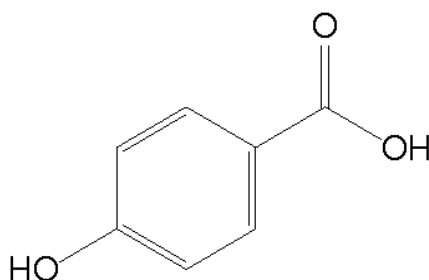
Najbolj zastopan med aldehidi v vinu je acetaldehid. Predstavlja več kot 90 % vseh aldehydov v vinu. Večje koncentracije v vinu so nezaželene, saj negativno vplivajo na senzorične lastnosti vina. Največ ga nastane med alkoholno fermentacijo. Po fermentaciji se zreducira v etanol in tako se njegova vsebnost zmanjša. Pomembni aldehidi so tudi fenolni aldehidi, ki nastajajo pri razgradnji lignina lesenih posod (vanilin) kot posledica delovanja kvasovk in plesni *Botrytis cinerea* (benzaldehyd) ali pa izhajajo iz grozdja (heksanali) (Bavčar, 2006).

2.3.7 Estri

Estri so zelo pomembni za aromo vina. Nastajajo z reakcijo med karboksilno skupino organskih kislin in hidroksilno skupino alkoholov (alifatski estri) ali fenolov (fenolni estri). Estri imajo v vinu dva izvora: encimska esterifikacija med fermentacijo in kemijska esterifikacija med dolgotrajnim zorenjem. Etilni estri maščobnih kislin in acetati višjih alkoholov so prevladujoči estri v vinu in se tvorijo med alkoholno fermentacijo (Košmerl, 2007). Pomembnejši so alifatski estri, katerih je bistveno več kakor fenolnih, poleg tega so bolj hlapni. Estre, ki so posledica reakcije med očetno kislino in etanolom ali višjimi alkoholi (etilacetat, izoamil acetat, izobutil acetat, 2-fenil etilacetat), povezujemo s sadno cvetlično aromo belih mladih vin in jih imenujemo sadni estri (Bavčar, 2006).

2.3.8 Fenolne spojine

Fenoli so ciklične benzenove spojine (slika 4), ki imajo enega ali več aromatskih obročev in najmanj eno -OH skupino vezano direktno na aromatski obroč (Jackson, 2000).



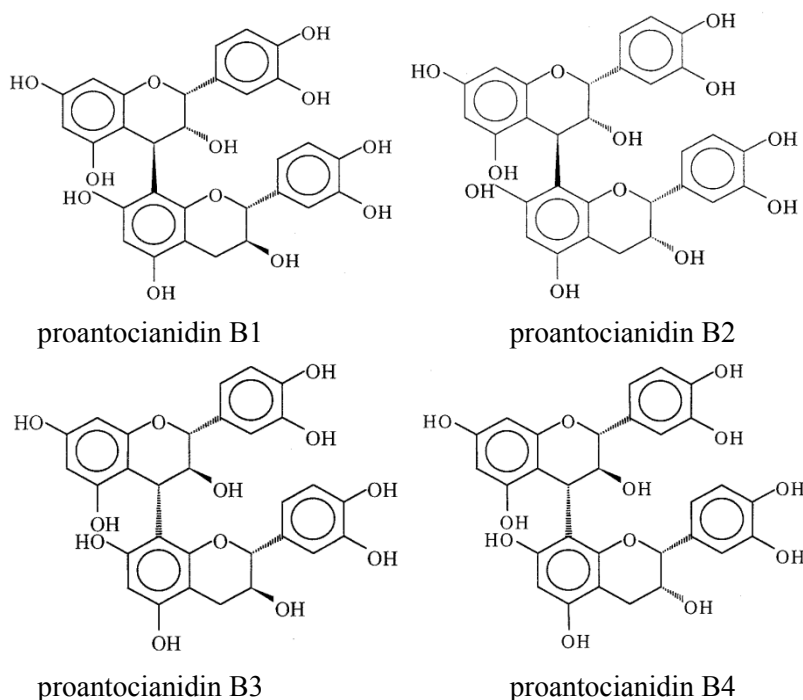
Slika 4: Primer fenolne spojine - hidroksibenzojska kislina (Abram in Simčič, 1997)

Fenolne spojine so pomembne, saj vinu dajejo barvo, vplivajo na vonj in okus, so osnova za staranje vina, delujejo kot antioksidanti in konzervansi ter imajo antimikrobno aktivnost. Dokazan je pozitiven učinek delovanja fenolnih spojin na zdravje ljudi (Bavčar, 2006). Povprečna koncentracija fenolnih spojin v belem vinu je 225 mg/L, v rdečem vinu 1800 mg/L, v desertnem vinu pa od 350 do 950 mg/L (Košmerl in sod., 2004). Porazdelitev fenolnih spojin v jagodi belega in rdečega grozdja je predstavljena v preglednici 1.

Preglednica 1: Porazdelitev fenolnih spojin (%) v grozdni jagodi (Košmerl in sod., 2004)

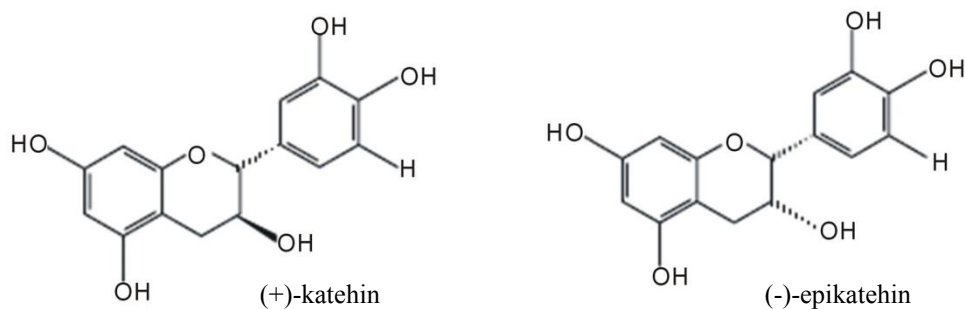
Del grozdne jagode	Rdeče grozdje	Belo grozdje
Jagodna kožica	33,3 %	23,2 %
Grozdni sok	3,4 %	4,5 %
Grozdne pečke	62,6 %	71,4 %

V skupino flavonoidov uvrščamo podskupine flavan-3-ole, proantocianidine, antociane in flavonole. Monomerne in oligomerne oblike flavan-3-olov so najvažnejši polifenoli v rdečih vinih. Flavan-3-oli in proantocianidini (slika 5) se nahajajo predvsem v trdih delih grozdne jagode (kožicah, pečkih), medtem ko so njihove koncentracije v grozdnem soku zelo majhne. Z daljšim časom maceracije se njihova koncentracija močno poveča. Zaradi tega je njihova vsebnost vedno večja v rdečih kakor v belih vinih (Vrhovšek, 2000). Najpomembnejša flavan-3-ola v grozdju sta monomera katehin in epikatehin.



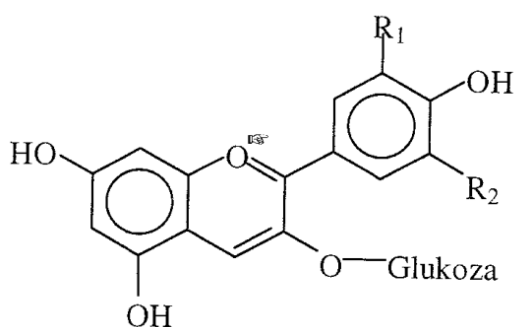
Slika 5: Glavni proantocianidini grozdja in vina (Vrhovšek, 2000)

Katehini spadajo v družino kondenziranih taninov. Na β -fenolnem obroču imajo dve hidroksilni skupini. Monomerne oblike katehina (slika 6) in delno kondenzirane oblike katehina so med segrevanjem v kislem mediju podvržene polimerizaciji. Produkti polimerizacije imajo večjo molekulsko maso, so oranžno-rjave barve in netopni v vodi. Koncentracije katehina v rdečih vinih dosegajo do 200 mg/L, medtem ko so vrednosti epikatehina približno polovico manjše (Soleas in sod., 1997; Goldberg in sod., 1996; Vrhovšek, 2000).



Slika 6: Strukturna formula monomernih enot flavan-3-olov (Abram in Simčič, 1997)

Antociani so druga najpomembnejša polifenolna skupina v rdečih vinih (slika 7). Antociani so pigmenti in so odgovorni za rdečo barvo vin. Na sladkor se vežejo kot monoglukozid (značilno za evropske rdeče sorte) ali diglukozid (značilno za rdeče hibride). Omenjeni podatek služi za ugotavljanje hibrida v rdečem vinu (Vine, 1997). Osnovno strukturo antocianov predstavlja hidroksiflavinijev ion. Antociani so kemijsko nestabilni in so podvrženi razbarvanju. Rdeča barvila ob prisotnosti kisika iz zraka oksidirajo in preidejo v koloidno obliko – usedlino rdečega vina. Koncentracija prostih oblik antocianov, ki so obarvani ali neobarvani, je odvisna od pH vrednosti, prisotnosti SO₂ in drugih dejavnikov. Pri nižji pH vrednosti je barva vina rubinasto rdeča, pri višji pa prehaja v modro. Ob prisotnosti večje koncentracije SO₂ vino posvetli, vendar je intenziteta barve reverzibilna (Zoecklein in sod., 1994). Antociani hitro reagirajo s polimeriziranimi tanini in tako dobimo stabilno rdečo barvo. Koncentracija skupnih antocianov je v veliki meri odvisna od sorte in je med 40 in 1300 mg/L (Vrhovšek, 2000). Barvila iz skupine antocianov delimo v pet skupin, ki se med seboj razlikujejo po mestu vezave hidroksilne ali metoksilne skupine na molekulo antocianidina – malvidin, cianidin, peonidin, delfinidin in petunidin (Zoecklein in sod. 1994).



Slika 7: Strukturna formula antociana (Vrhovšek, 2000)

Levkoantociani se nahajajo v jagodni kožici in pečkih. Njihova vsebnost v moštu in kasneje v vinu je odvisna od tehnologije predelave grozdja in vinifikacije. V vinu se levkoantociani pojavijo v bolj ali manj kondenzirani obliki. Osnovna monomerna enota je flavan-3,4-diol. Monomerne in polimerne enote levkoantocianov med segrevanjem v kislem mediju preidejo v rdeče obarvane antocianidine za razliko od katehinov. Večja kot

je stopnja kondenzacije, bolj izrazit je značaj taninskih snovi. V mladih vinih prevladuje večja kondenzacijska oblika, zato so mlada vina bolj trpka. Kondenzirana oblika levkoantocianov s staranjem preide v prosto obliko, ki je netopna in se z beljakovinami izloči. Vina postanejo bolj harmonična, manj trpka in manj grenka (Vrhovšek, 2000).

2.3.9 Neflavonoidi

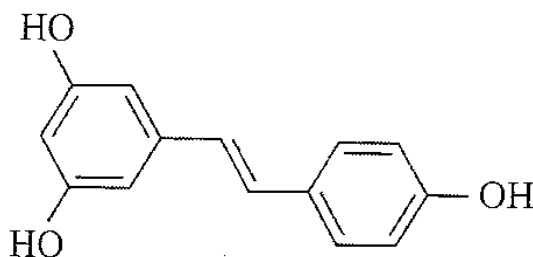
Neflavonoidi v grozdju so derivati hidroksicimetnih in hidroksibenzojskih kislin ter stilbenov, kamor spada tudi resveratrol. Nahajajo se predvsem v celičnih vakuolah kože grozdne jagode. Najbolj zastopani in poznani so derivati hidroksicimetnih kislin, ki so vezani oziroma esterificirani na sladkorje, alkohole ali kisline. Med njimi je največ estrov vinske kisline s kavno (kaftarna kislina), *p*-kumarno (kutarna kislina) in ferulno kislino (fertarna kislina). Drugi vir neflavonoidov je ekstrakcija iz lesa. Glavna sestavina je elagična kislina, ki izhaja iz hidrolizabilnih taninov lesa, to je polimerov elagične in galne kisline z glukozo. Z razgradnjo lignina se v vino izločajo tudi drugi neflavonoidi, kot so benzaldehidi in aldehidi cimetne kisline (Bavčar, 2006).

Hidroksicimetne kisline so glavna skupina neflavonoidov tako v rdečih kakor tudi v belih vinih (Marcheix in sod., 1990). So glavni polifenoli v grozdnem soku in posledično glavni polifenoli belega vina pridelanega brez maceracije. Študije kažejo, da imajo vina, pridelana iz različnih sort, specifičen profil hidroksicimetnih kislin. To velja predvsem za rdeča vina, za katere je profil tako specifičen, da lahko na njem temelji klasifikacija rdečih vinskih sort (Mattivi in sod., 1995; Mattivi in Nicolini, 1997). Koncentracije hidroksicimetnih kislin se v povprečju gibljejo med 20 in 120 mg/L za rdeča vina (Mattivi in Nicolini, 1997), medtem ko so koncentracije v belih vinih navadno polovico manjše (Vrhovšek, 1998).

Glavne proste hidroksibenzojske kisline v vinu so galna, vanilijeva in siringinska. Galna kislina in njeni estri vsebujejo tri proste hidroksi skupine, zaradi česar je galna kislina zelo močan antioksidant (Da Silva in sod., 1991; Roginsky in Lissi, 2005). Galna kislina je glavna hidroksibenzojska kislina v rdečih vinih in se ekstrahira iz grozdnih pečk. Ekstrakcija galne kisline je razmeroma počasna, zato lahko večje vsebnosti dosežemo z daljšim maceracijskim časom (Mattivi in Nicolini, 1997). Siringinska in vanilijeva kislina se ekstrahirata iz jagodne kože in celičnega soka (Di Stefano in Cravero, 1990).

2.3.10 Resveratrol

Resveratrol spada v skupino stilbenov (slika 8). V vinu je bil prvič odkrit leta 1992. Dokazano deluje preventivno pri boleznih srca in ožilja ter pri nekaterih vrstah rakavih obolenj. V vinu se nahaja v štirih različnih oblikah. To so *cis*- in *trans*- resveratrol ter *cis*- in *trans*- glukozid resveratrola (Vrhovšek, 2000).



Slika 8: Strukturna formula resveratrola (Jackson, 2000)

Največje skupne koncentracije vseh štirih oblik resveratrola v rdečih vinih dosegajo vrednosti do 30 mg/L. Na koncentracijo resveratrola v vinu vplivajo številni faktorji, in sicer stopnja dozorelosti grozdja, način vinifikacije grozdja in način donegovanja vina. Resveratrol se v grozdju nahaja predvsem v jagodni kožici, zato se njegova koncentracija med maceracijo hitro povečuje. Sinteza resveratrola je močno sortno pogojena. Sorti, ki sta še posebej znani po veliki vsebnosti omenjene spojine, sta Modri pinot in Modra frankinja. Velik vpliv na vsebnost resveratrola imajo tudi okoljski dejavniki, kot sta temperatura in vlažnost. Primarna vloga resveratrola je zaščita grozdnih jagod pred UV sevanjem in sivo grozdno plesnijo *Botrytis cinerea* (Vrhovšek, 2000).

2.3.11 Aromatične spojine

Vino vsebuje preko 800 spojin, ki vplivajo na njegov vonj, okus in aromo. Na naše čutilne receptorje delujejo hkrati, kar pomeni, da za določen vonj vina ni odgovorna ena sama spojina, ampak jih deluje več skupaj. Spojine morajo biti hlapne in v zadostnih koncentracijah, da lahko v vinu delujejo na naše receptorje kot zaznave (Bavčar, 2006). Za vonj so odgovorni predvsem alkoholi, kisline, aldehidi, ketoni, terpeni, norizoprenoidi, pirazini in merkaptani. V vinu se z izjemo etanola nahajajo v skupni koncentraciji od 0,2 do 1,2 g/L, od tega je približno 50 % višjih alkoholov.

Aromatične spojine razdelimo v tri skupine:

- aromatične spojine iz grozdja (terpeni, norizoprenoidi, pirazini);
- aromatične spojine, ki nastanejo med alkoholno fermentacijo (alkoholi, višji alkoholi, estri, kisline, aldehidi, ketoni, hlapni fenoli, merkaptani);
- aromatične spojine, ki nastanejo med zorenjem vina (estri maščobnih kislin, skupna koncentracija terpenov pada, sproščanje norizoprenoidov in žveplovih spojin, pri vinu v lesenih sodih → vanilin, siringaldehid, sinapaldehid, benzaldehid) (Bavčar, 2006).

Med zorenjem vina prihaja do kompleksnih sprememb vonja in arome, ki so posledica razpada nekaterih aromatičnih spojin iz grozdja, hidrolize vezanih aromatičnih spojin, transformacije v druge spojine in ekstrakcije novih spojin iz lesa. Vse te reakcije so

odvisne od časa zorenja, temperature, dostopnosti kisika, svetlobe in vrste posode v času zorenja (Bavčar, 2006).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Grozdje sorte Modra frankinja

V okviru eksperimentalnega dela smo uporabili grozdje sorte Modra frankinja. Grozdje je bilo pridelano v vinorodni deželi Posavje, natančneje vinorodnem okolišu Bizeljsko Sremič na legi Marof Pišce, kjer ima v svoji lasti vinograd Vinska klet Krško. Obremenitev je bila 2 kg grozdja na trto. Grozdje je bilo ročno trgano dne 15.10. 2008.

3.1.2 Priprava in maceracija drozge

Za prvo vzorčenje smo se odločili takoj po pecljanju in drozganju grozdja. Grozdje je bilo takoj po pecljanju posredovano v vinifikator, kjer je v naslednjih dneh potekala maceracija in fermentacija. Istočasno je sledil dodatek kvasne kulture skupaj s hrano in encimi za čimprejšnji začetek alkoholne fermentacije. Vinifikacija je potekala 9 dni. Maceracija je potekala v vinifikatorju znamke GIMAR TECHNO z volumnom 70 000 litrov. Vinifikator je deloval na principu polivanja drozge vsakih šest ur, polivanje je trajalo eno minuto v treh ciklikih. V vinifikator je bilo šesti dan dodanih 8 ton drozge, kar je predstavljalo približno 10 % volumna vinifikacijske posode.

Drozgi so bili takoj po predelavi v vinifikator dodane kvasovke in ostala enološka sredstva v naslednjih koncentracijah:

- kvasovke Fermol Premier Cru 20 g/100 L drozge,
- hrana za kvasovke Fermoplus Intergrateur 20 KD 30 g/100 L drozge,
- hrana za kvasovke Biostimol 40 g/100 L drozge,
- encimi Endozym Rouge ICS 10 Rouge,
- enološki tanini Aroma-Gal 20 g/100 L drozge (AEB SpA, Brescia, Italija).

3.2 METODE DELA

Vzorčenje je potekalo enkrat dnevno, vzorčili smo v treh paralelkah. Vzorce za takojšnjo analizo smo shranjevali v hladilniku, za kasnejše analize (50 mL) pa v zamrzovalni skrinji. Del analiz smo opravili v laboratoriju Kmetijsko gozdarskega zavoda Novo mesto (pH, sladkor, titrabilne kisline, hlapne kisline, ton barve, koncentracija antocianov), del pa v laboratoriju za Tehnologijo vina na Biotehniški fakulteti v Ljubljani (skupni fenoli, netaninski polifenoli, ne flavonoidni fenoli).

V dnevno odvzetih vzorcih smo določali naslednje parametre: sladkor, pH, titrabilne kisline, hlapne kisline, skupne fenole, netaninske fenole, taninske fenole, flavonoide,

neflavonoide, antociane in različne barvne parametre. Pri merjenju barve mošta med maceracijo smo določali intenziteto barve, ton barve, delež rdeče barve in deleže rdeče barve pri 420, 520 ter 620 nm. Pred laboratorijskimi analizami smo iz vzorca najprej izganjali CO₂ na ultrazvočni kopeli. Nato smo vzorec filtrirali skozi grob in fin filter papir.

3.2.1 Merjenje koncentracije sladkorja

Koncentracijo sladkorja v moštu smo merili z digitalnim ročnim refraktometrom in odčitali sladkorno stopnjo v °Oe. Refraktometer je fizikalna naprava, ki deluje na principu meritve lomnega količnika. Na svetlobno prizmo refraktometra smo nanесли kapljico mošta in neposredno odčitali vrednost v °Oe.

Laboratorijska oprema:

- plastična kapalka 3 mL
- refraktometer (Milwaukee MA885 Wine refractometer)

3.2.2 Merjenje vrednosti pH

Vrednost pH je definirana kot negativni desetiški logaritem koncentracije vodikovih ionov (Boyer, 2005). V bioloških sistemih je določanje koncentracije vodikovih ionov, ki je izražena kot pH, pomembnejša kakor podatek o skupnih kislinah. Vpliv pH je viden v selektivnem delovanju na mikroorganizme, v intenzivnosti in odtenku barve, okusu, razmerju med prostim in vezanim žveplom. pH je navadno odločilen za pojav napak in bolezni vina. pH mošta normalnih trgatev je med 3,1 in 3,6. Običajno je pH vrednost vina nižja od 3,6.

Vrednosti pH smo določili s pH metrom. Pred merjenjem pH medija je potrebno pH meter umeriti pri temperaturi 20 °C s pufrskima raztopinama s pH 4,00 in 7,02. V 100 mL čaši smo izmerili pH 25 mL vzorca.

Laboratorijska oprema:

- pH meter s kombinirano stekleno elektrodo
- magnetno mešalo
- pipeta in bireta (25 mL)
- visoka čaša (100 mL)
- puhalka z deionizirano vodo

Raztopine za določanje pH:

Pufirska raztopina s pH = 4,00: raztopina kalijevega hidrogen ftalata (C₈H₅KO₆)

Pufirska raztopina s pH = 7,02: raztopina kalijevega dihidrogenfosfata (KH₂PO₄)

Standardna raztopina: nasičena raztopina kalijevega hidrogen tartrata: 0,57 g $C_4H_5KO_6$, deionizirana voda

3.2.3 Merjenje titrabilnih kislin

Titribilne (skupne) kisline smo merili s potenciometrično metodo. Umerili smo pH meter in v 25 mL mošta izmerili vrednost pH. Na pH metru smo nastavili končno točko titracije na pH 7,00 in titrirali z 0,1000 M raztopino NaOH do nastavljen končne točke titracije ter odčitali porabo baze. Nadaljevali smo s titracijo do končne točke titracije pH 8,20 in ponovno odčitali porabo baze. Iz dobljenih podatkov smo izračunali koncentracijo titrabilnih kislin in jo izrazili kot g vinske kisline/L.

Račun:

$$TK_1 \text{ (g/L)} = \frac{a_1 \text{ (mL)} \times c \times M \text{ (g/mol)}}{v \text{ (mL)} \times n} \cong a_1 \text{ (mL)} \times 0,3 \quad \dots(1)$$

$$TK_2 \text{ (g/L)} = \frac{a_3 \text{ (mL)} \times c \times M \text{ (g/mol)}}{v \text{ (mL)} \times n} \cong a_3 \text{ (mL)} \times 0,3 \quad \dots(2)$$

TK₁...titrabilne kisline

TK₂...skupne kisline

a₁...volumen porabljene baze pri titraciji do pH 7,00 (mL)

a₃...volumen porabljene baze pri titraciji do pH 8,20 (mL)

c...koncentracija baze (0,1 M)

M...molska masa vinske kisline (150,09 g/mol)

v...volumen vzorca (25 mL)

n...molsko razmerje kemijske reakcije med NaOH in vinsko kislino (n = 2)

Laboratorijska oprema:

- pH meter s kombinirano stekleno elektrodo
- magnetno mešalo
- pipeta in bireta
- visoka čaša (100 mL)
- puhalka z deionizirano vodo

Raztopine za določanje skupnih kislin:

Pufrska raztopina s pH = 4,00: raztopina kalijevega hidrogen ftalata ($C_8H_5KO_6$)

Pufrska raztopina s pH = 7,02: raztopina kalijevega dihidrogenfosfata (KH_2PO_4)

Standardna raztopina: nasičena raztopina kalijevega hidrogen tartrata: 0,57 g $C_4H_5KO_6$

0,1000 M raztopina natrijevega hidroksida (NaOH): 4,005 g NaOH, deionizirana voda

3.2.4 Določanje koncentracije hlapnih kislin

Hlapne kisline v vinu so v največji meri zastopane kot očetna, mravljična in butanojska kislina. Določili smo jih titrimetrično. V destilacijsko bučko smo odpipetirali 20 mL vzorca, dodali 1 mL 50 % vinske kisline in dve do tri kapljice protipenilca. Stene destilacijske bučke smo sprali z deionizirano vodo in destilirali vzorec z vodno paro v 250 mL erlenmajerico do končnega volumna destilata 150 mL. Po destilaciji vzorca z vodno paro je sledila titracija destilata. Destilatu smo dodali dve do tri kapljice raztopine fenolftaleina in takoj titrirali s standardizirano 0,1000 M raztopino natrijevega hidroksida do prehoda brezbarvne raztopine v svetlo rožnato (barva mora biti obstojna vsaj 15 do 20 sekund). Odčitali smo porabo titranta in izračunali koncentracijo hlapnih kislin. Rezultat smo izrazili kot g očetne kisline/L.

Račun:

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

HK₁...koncentracija hlapnih kislin

a₁...poraba titranta (mL)

c...koncentracija NaOH (0,1000 mol/L)

M...molska masa očetne kisline (60,05 g/mol)

Laboratorijska oprema:

- destilacijska naprava Gibertini
- hidrostatska tehlnica
- merilna bučka (100 mL)
- pipete (1 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL)
- erlenmajerica (250 mL)
- bireta (50 mL)
- puhalka z deionizirano vodo

Raztopine za določanje hlapnih kislin:

0,1000 M raztopina NaOH: 4,005 g NaOH, deionizirana voda

20 % raztopina protipenilca

1 % alkoholna raztopina fenolftaleina: 1 g fenolftaleina, 100 mL 80 % etanola

50 % raztopina vinske kisline

3.2.5 Intenziteta in ton barve

Barvo opisujemo različno glede na spekter absorbirane in prepuščene svetlobe, pri čemer vse subjektivne zaznave ne pomenijo jasno definirane fizikalne količine (intenziteta barve, odtenek barve, spekter svetlobe). Človeško oko ni sposobno razlikovati posameznih komponent barve ločeno po valovnih dolžinah, ampak jih zaznava kot celoto (Košmerl in sod., 2004).

Določanje intenzitete barve v rdečih vinih:

Vzorec smo filtrirali in razredčili v razmerju 1:10 z raztopino za razredčevanje ter premešali. Razredčen vzorec smo odpipetirali v kvarčno kiveto in izmerili absorbanco pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm proti slepemu vzorcu (deionizirani vodi).

Račun:

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

I...intenziteta barve

A_{420} ...absorbanca svetlobe pri valovni dolžini 420 nm

A_{520} ...absorbanca svetlobe pri valovni dolžini 520 nm

A_{620} ...absorbanca svetlobe pri valovni dolžini 620 nm

Določanje tona barve:

Vzorec smo razredčili in mu izmerili absorbanco na spektrofotometru. Nianso barve določimo na podlagi kota (Φ). Rezultat je podan v stopinjah: 0° do $51^\circ \rightarrow$ rdeča barva; 52° do $80^\circ \rightarrow$ purpurno rdeča barva; negativni kot $\rightarrow$ opečnata barva (Zoecklein in sod., 1994).

Račun:

$$\text{ton barve} = A_{420} / A_{520} = \Phi \rightarrow \text{tg}(A_{420} / A_{520}) \quad \dots(5)$$

A_{420} ...absorbanca svetlobe pri valovni dolžini 420 nm

A_{520} ...absorbanca svetlobe pri valovni dolžini 520 nm

Laboratorijska oprema:

- epruvete
- polnilne pipete
- kvarčne kivete (10 mm)
- UV VIS spektrofotometer
- pH meter
- puhalka z deionizirno vodo

Raztopine za določanje intenzitete in tona barve:

Raztopina za razredčevanje kalijev hidrogen ftalat ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_6$): 10,21 g kalijevega hidrogen ftalata, 6,10 mL 2 M raztopine HCl, deionizirana voda

Določanje deleža rdeče barve:

Delež rdeče barve, ki pomeni proste in vezane antocianine v obliki flavilijevega iona, ter deleže rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah, smo izračunali s pomočjo spodnjih enačb.

Račun:

$$dA_F(\%) = \left(A_{520} - \frac{A_{420} + A_{620}}{2} \right) \times \frac{1}{A_{520}} \times 100 \quad \dots(6)$$

Delež rdeče barve pri posamezni valovni dolžini:

$$dA_{420}(\%) = \frac{A_{420}}{I} \times 100 \quad \dots(7)$$

$$dA_{520}(\%) = \frac{A_{520}}{I} \times 100 \quad \dots(8)$$

$$dA_{620}(\%) = \frac{A_{620}}{I} \times 100 \quad \dots(9)$$

3.2.6 Določanje koncentracije antocianov

Določanje koncentracije antocianov je potekalo po metodi Ribereau-Gayon in E. Stonesren, kjer smo spektrofotometrično merili absorbanco pri valovni dolžini 520 nm, in sicer A_1 v prvi raztopini (1 mL vina, 1 mL etanola, zakisanega z 0,1 % HCl, 10 mL 2 % HCl) in absorbanco A_2 v drugi raztopini (1 mL vina, 1 mL etanola, zakisanega z 0,1 % HCl, 10 mL pufrske raztopine pH = 3,5). Za slepi vzorec smo vzeli deionizirano vodo, meritve pa smo opravili najkasneje v eni uri.

Račun:

$$\text{Koncentracija antocianov (mg/L)} = (A_1 - A_2) \times 386,598 \quad \dots(10)$$

A_1 ...absorbanca v prvi raztopini pri dodatku HCl

A_2 ...absorbanca v drugi raztopini pri dodatku pufra

386,598...empirični faktor (Ough in Amerine, 1988)

Laboratorijska oprema:

- epruvete
- pipete (1 mL, 10 mL)
- kvarčne kivete (10 mm)
- puhalka z deionizirano vodo
- UV spektrofotometer

Raztopine za določanje koncentracije antocianov:

Pufrska raztopina s pH = 3,50: 71,6 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, deionizirana voda

Etanol, zakisan z 0,1 % HCl

2 % raztopina HCl

3.2.7 Določanje skupnih fenolnih spojin po Singletonu in Rossiju

Fenolne spojine v moštu smo določali spektrofotometrično po metodi Singleton in Rossi (1965). Za določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin smo v vzorec dodali Folin-Ciocalteujev reagent, ki v alkalni raztopini (dodatek Na_2CO_3) oksidira fenolne snovi. Absorbanco reakcijske mešanice smo izmerili pri valovni dolžini 765 nm. Kot standardno referenčno spojino za določanje skupnih fenolnih spojin smo uporabili galno kislino. Koncentracijo skupnih fenolnih spojin smo izračunali iz umeritvene krivulje in rezultat izrazili kot mg galne kisline/L (Košmerl in sod., 2004).

Laboratorijska oprema:

- UV spektrofotometer
- kvarčne kivete (10 mm)
- merilne bučke (100 mL)
- polnilne pipete (1 mL, 2 mL, 3 mL, 5 mL, 10 mL)
- puhalka z deionizirano vodo

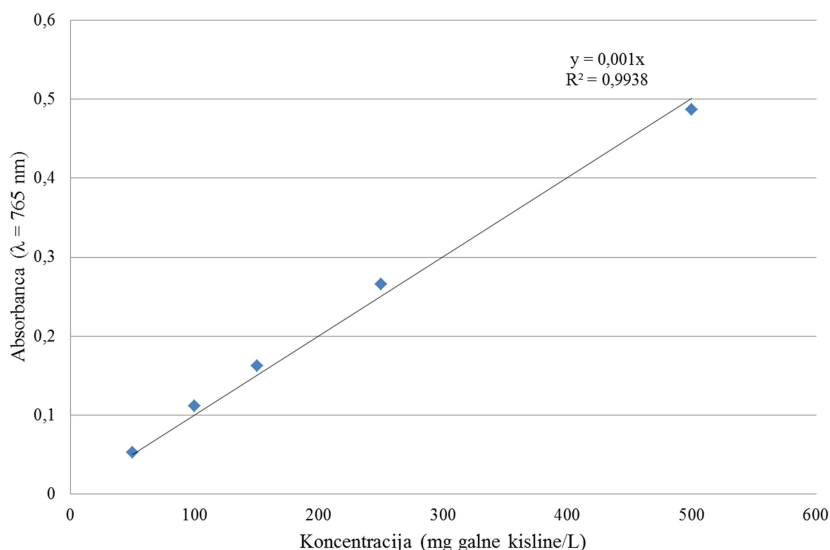
Raztopine za določanje skupnih fenolnih spojin:

Osnovna raztopina galne kisline (500 mg galne kisline, 10 mL absolutnega etanola, deionizirana voda)

Folin-Ciocalteujev reagent razredčen z deionizirano vodo (1:2)

20 % raztopina natrijevega karbonata (Na_2CO_3)

Za določitev koncentracije skupnih fenolov smo pripravili umeritveno krivuljo, kar pomeni, da smo najprej pripravili standardne raztopine galne kisline različnih koncentracij in jim izmerili absorbance. Na podlagi teh rezultatov smo narisali umeritveno krivuljo (slika 9).



Slika 9: Umeritvena krivulja za določanje skupnih fenolnih spojin (Singleton in Rossi, 1965)

Enačba umeritvene krivulje nam je služila za izračun skupnih fenolov v vzorcih mošta. Beer-Lambertov zakon za to metodo velja v območju koncentracije 50-500 mg galne kisline/L (Košmerl in sod., 2004).

3.2.8 Določanje koncentracije neflavonoidov in flavonoidov

Za določanje koncentracije neflavonoidov smo vzorcu dodali HCl in formaldehid, premešali ter inkubirali 24 ur, nato pa filtrirali. Filtratu smo dodali Folin-Ciocalteu reagent, počakali 2 uri, dodali natrijev karbonat in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 765 nm. Rezultat smo preračunali iz umeritvene krivulje za skupne fenole. Koncentracijo flavonoidov smo izračunali iz razlike med koncentracijo skupnih fenolov in koncentracijo neflavonoidov.

Laboratorijska oprema:

- merilna bučka (25 mL, 100 mL)
- pipete (5 mL, 10 mL)
- filter papir (0,45 μ m)
- epruvete
- kvarčne kivete (10 mm)
- UV spektrofotometer

Raztopine za določanje skupnih neflavonoidov:

HCl: HCl (35-37 %) smo razredčili v razmerju 1:4 z deionizirano vodo

Formaldehid

Folin-Ciocalteu reagent razredčen z deionizirano vodo (1:3)

20 % raztopina natrijevega karbonata (Na_2CO_3)

3.2.9 Določanje netaninskih fenolov

Vzorcu, ki smo ga predhodno centrifugirali, smo dodali metil celulozo in nasičen amonijev sulfat ter deionizirano vodo. Sledilo je ponovno centrifugiranje – 10 minut pri 4000 rpm. Supernatantu smo dodali vodo, Folin-Ciocalteujev reagent in pustili stati 2 uri, nato pa dodali še Na_2CO_3 . Raztopino smo ponovno premešali in pustili stati še 2 uri. Sledilo je merjenje absorbance pri valovni dolžini 765 nm. Koncentracijo taninskih fenolov smo izračunali iz razlike med koncentracijo skupnih fenolov in koncentracijo netaninskih fenolov, ki smo jih določili iz umeritvene krivulje.

Laboratorijska oprema:

- centrifuga
- epruvete
- merilne bučke (10 mL, 100 mL)
- pipete (1 mL, 2 mL, 5 mL, 15 mL)
- kvarčne kivete (10 mm)
- UV spektrofotometer

Raztopine za določanje netaninskih fenolov:

0,4 % metilceluloza

Nasičen amonijev sulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

Folin-Ciocalteujev reagent razredčen z deionizirano vodo (1:3)

20 % raztopina natrijevega karbonata (Na_2CO_3)

Deionizirana voda

Za določitev koncentracije netaninskih fenolov smo najprej pripravili standardne raztopine galne kisline različnih koncentracij in jim izmerili absorbance. Na podlagi teh rezultatov smo narisali umeritveno krivuljo, s pomočjo katere smo izračunali vsebnost netaninskih fenolov v vzorcih mošta.

3.2.10 Statistična analiza

Rezultate analiz smo pripravili in uredili s programom EXCEL XP. Podatke smo statistično obdelali z računalniškim programom SAS (SAS Software. Version 8.01, 1999) s proceduro GLM (General Linear Models). Izračunali smo povprečja in standardne deviacije.

Aritmetična sredina ali povprečje ($\bar{x}$) je vsota vseh vrednosti, deljena s številom enot v vzorcu in je postavljena tako, da je vsota vseh odklonov enaka nič. Standardna deviacija (SD) je kvadratni koren iz variance, ki je osnovna mera razpršenosti podatkov okoli

aritmetične sredine. Opredeljena je na osnovi vsote kvadriranih odklonov od aritmetične sredine. Srednje vrednosti za eksperimentalne skupine so bile izračunane z uporabo Duncanovega testa in so primerjane pri 5 % tveganju.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE OSNOVNIH KEMIJSKIH PARAMETROV

V preglednici 2 so zbrani rezultati osnovnih kemijskih parametrov mošta med maceracijo. Vrednosti posameznih parametrov so se statistično značilno ($P \leq 0,001$) spreminjale v odvisnosti od časa maceracije. Vsebnost sladkorja je iz začetne vrednosti 84 °Oe s časom padla na končno vrednost 32 °Oe. Padec je viden že po prvem dnevu, kar pomeni, da se je fermentacija začela takoj ob inokulaciji. Po 120 h maceracije se vsebnost sladkorja poveča, kar je posledica naknadno dodane drozge, ki je bila iz grozdja predelana tisti dan. Sladkor nato spet pada do povretja. Kvasni nastavek je bil očitno ustrezno pripravljen. Sev kvasovk je bil prav tako izbran pravilno, saj je fermentacija potekala konstantno, brez zastojev do šestega dne maceracije, ko ni bilo več zaznati padca sladkorja (fermentacije).

Preglednica 2: Rezultati merjenja osnovnih kemijskih parametrov v moštu med maceracijo

Čas maceracije (h)	Parameter			
	Sladkor (°Oe)	pH	Titribilne kisline (g/L)	Hlapne kisline (g/L)
0	84,00 ±0,00 a	3,37 ±0,01 de	7,63 ±0,34 b	0,13 ±0,03 d
24	76,87 ±0,51 b	3,31 ±0,02 e	8,98 ±0,08 a	0,16 ±0,01 c
48	51,00 ±0,00 c	3,40 ±0,01 d	7,67 ±0,15 b	0,26 ±0,01 b
72	38,67 ±0,58 d	3,43 ±0,00 bcd	7,04 ±0,12 cd	0,31 ±0,01 a
96	31,33 ±0,58 h	3,49 ±0,00 ab	7,05 ±0,13 cd	0,31 ±0,01 a
120	36,00 ±0,00 e	3,47 ±0,00 abc	6,93 ±0,14 cd	0,31 ±0,01 a
144	32,83 ±0,29 f	3,53 ±0,01 a	7,05 ±0,05 cd	0,32 ±0,01 a
168	32,00 ±0,00 g	3,53 ±0,01 a	7,25 ±0,39 c	0,33 ±0,00 a
192	32,00 ±0,00 g	3,41 ±0,11 cd	6,87 ±0,03 d	0,33 ±0,01 a
216	32,00 ±0,00 g	3,52 ±0,01 a	7,00 ±0,05 cd	0,31 ±0,00 a
P	***	***	***	***

Podatki prikazujejo $\bar{x} \pm SD$ ($n = 3$). Stopnja značilnosti: ***, $P \leq 0,001$. Srednje vrednosti z različnimi malimi črkami (a,b,c,d,e,f,g,h) v stolpcih so statistično značilne ($P < 0,05$).

Vrednosti pH in vsebnost hlapnih kislin s časom maceracije naraščajo. pH vrednost se viša zaradi izločanja Ca- in K-tartratov med fermentacijo, s čimer se posledično manjša tudi koncentracija titribilnih kislin. Večanje koncentracije hlapnih kislin pa je posledica delovanja kvasovk, ki pri alkoholni fermentaciji tvorijo te spojine kot stranski produkt metabolizma. Koncentracija titribilnih kislin je med maceracijo drozge padala, saj med fermentacijo potekajo procesi izločanja tartratov (soli vinske kisline).

4.2 DOLOČANJE POLIFENOLOV

V preglednici 3 so zbrani rezultati o vsebnosti različnih polifenolnih spojin v moštu med maceracijo. Vrednosti posameznih polifenolnih spojin so se v odvisnosti od časa maceracije statistično značilno ($P \leq 0,001$) razlikovale. Vsebnost skupnih fenolov v moštu je bila na začetku 777 mg/L in se je med maceracijo zviševala ter dosegla najvišjo vrednost na koncu maceracije po 216 h (1883 mg/L). Srednje vrednosti z različnimi malimi črkami kažejo značilne razlike med vzorci mošta v odvisnosti od časa maceracije. Vsebnost netaninskih fenolov v vzorcih mošta se je gibala med 628 mg/L in 1108 mg/L. Najnižja vsebnost je bila na začetku maceracije, nato je s časom naraščala in dosegla statistično značilno najvišjo vrednost po 192 h maceracije. Po 216 h maceracije je vsebnost netaninskih fenolov nekoliko padla in dosegla končno vrednost 889 mg/L. Vsebnost taninskih fenolov v vzorcih mošta je bila med 149 mg/L in 994 mg/L. Statistično značilno najnižja vsebnost je bila na začetku maceracije in najvišja na koncu maceracije po 216 h.

Preglednica 3: Rezultati določanja vsebnosti polifenolov v moštu med maceracijo

Čas maceracije (h)	Parameter (mg/L)					
	Skupni fenoli	Netaninski fenoli	Taninski fenoli	Flavonoidi	Neflavlavonoi di	Antociani
0	777 ±25 f	628 ±22 e	149 ±8 g	40 ±2 g	737 ±24 c	207 ±4 h
24	971 ±7 e	661 ±9 d	310 ±3 f	40 ±5 g	931 ±33 b	277 ±3 g
48	1348 ±19 d	881 ±46 c	467 ±36 e	198 ±7 f	1150 ±22 a	472 ±5 e
72	1549 ±35 c	1059 ±22 ab	489 ±34 de	394 ±22 e	1154 ±24 a	583 ±5 d
96	1827 ±18 ab	1094 ±61 ab	710 ±53 bc	888 ±7 c	939 ±11 b	647 ±12 a
120	1654 ±37 bc	1059 ±18 ab	595 ±52 cd	564 ±22 d	1090 ±12 a	446 ±6 f
144	1696 ±89 b	1092 ±31 ab	671 ±12 cd	830 ±65 c	866 ±75 b	587 ±9 d
168	1807 ±59 ab	973 ±55 bc	834 ±35 b	1036 ±98 b	737 ±33 c	591 ±6 cd
192	1861 ±64 a	1108 ±47 a	753 ±21 b	1124 ±41 ab	737 ±60 c	600 ±2 bc
216	1883 ±22 a	889 ±65 c	994 ±78 a	1226 ±52 a	657 ±52 c	610 ±10 b
P	***	***	***	***	***	***

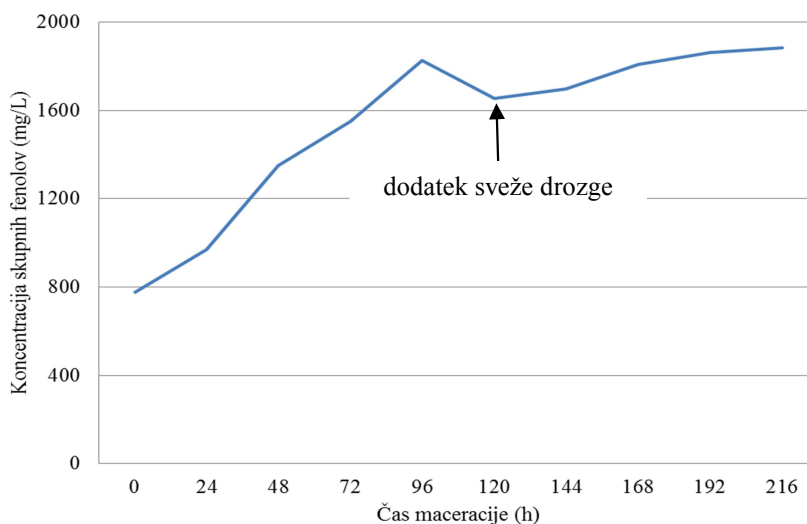
Podatki prikazujejo $\bar{x} \pm SD$ ($n = 3$). Stopnja značilnosti: ***, $P \leq 0,001$. Srednje vrednosti z različnimi malimi črkami (a,b,c,d,e,f,g,h) v stolpcih so statistično značilne ($P < 0,05$).

Vsebnosti flavonoidov v moštu med maceracijo so bile med 40 mg/L in 1226 mg/L. Na začetku maceracije in po 24 h so bile vsebnosti najnižje, statistično značilno največ flavonoidov pa je bilo na koncu maceracije po 216 h. Količina neflavonoidov v moštu med maceracijo se je gibala od 657 mg/L do 1154 mg/L. Značilno najvišja vsebnost neflavonoidov je bila v moštu po 72 h maceracije in najnižja na koncu maceracije po

216 h. Vsebnosti antocianov v moštu so se gibale med 207 mg/L in 647 mg/L. Značilno najmanjša vsebnost je bila na začetku maceracije, najvišja pa v moštu po 96 h maceracije.

4.2.1 Vsebnosti skupnih fenolov v moštu med maceracijo

Koncentracija skupnih fenolov v moštu je med maceracijo naraščala (slika 10). Najvišja vrednost je bila dosežena ob koncu maceracije, in sicer 1883 mg/L, kar je v skladu s pričakovanjem za rdeča vina.

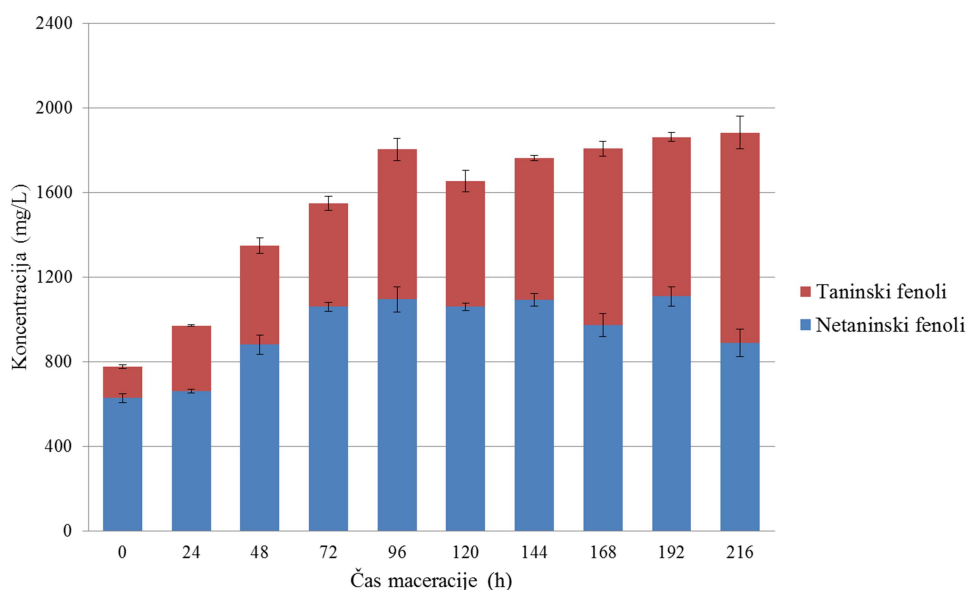


Slika 10: Koncentracija skupnih fenolov v moštu med maceracijo

Do znižanja koncentracije skupnih fenolov je prišlo po 120 h (označeno na sliki 10), ko se je v fermentirajočo drozgo dodala sveža nefermentirajoča drozga. Po tem je koncentracija skupnih fenolov zopet naraščala.

4.2.2 Vsebnosti taninskih in netaninskih fenolov v moštu med maceracijo

Vsebnosti taninskih fenolov so med maceracijo naraščale (slika 11). Do zmanjšanja je prišlo po 120 h, ko je bila fermentirajoči drozgi dodana sveža drozga. Najmanjša koncentracija taninskih fenolov je bila izmerjena na začetku maceracije, in sicer 149 mg/L, največja pa na koncu maceracije 994 mg/L.

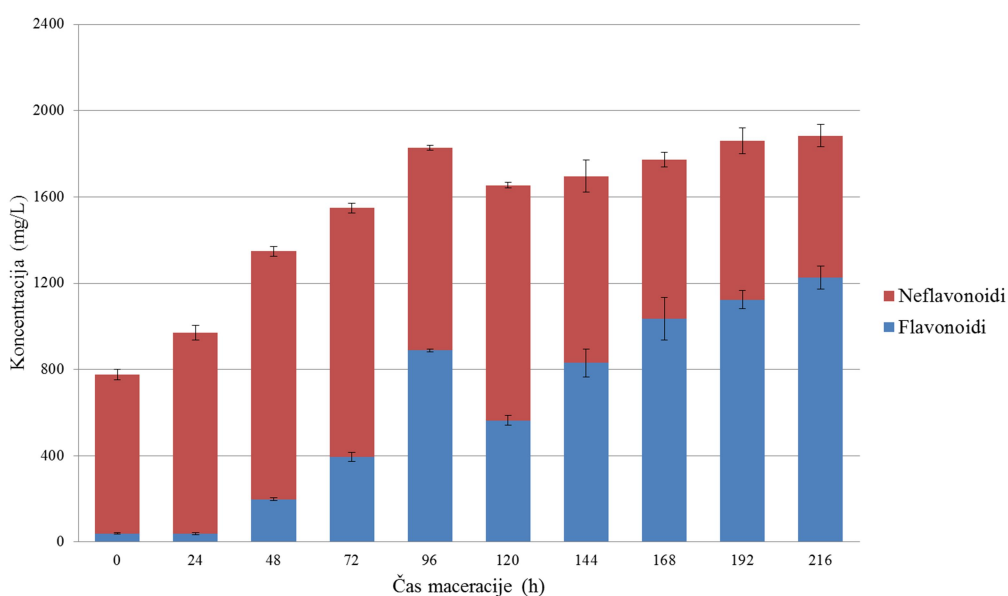


Slika 11: Koncentracije taninskih in netaninskih fenolov v moštu med maceracijo

Pri netaninskih fenolih je bila najmanjša koncentracija takoj na začetku maceracije, in sicer 628 mg/L, največja pa po 192 h in sicer 1108 mg/L. Na koncu maceracije je vrednost le-teh rahlo padla.

4.2.3 Vsebnosti flavonoidov in neflavonoidov v moštu med maceracijo

Koncentracija flavonoidov je bila najnižja na začetku maceracije, in sicer 40 mg/L (slika 12). S časom maceracije je koncentracija naraščala in je bila največja na koncu maceracije, ko je dosegla vrednost 1226 mg/L.

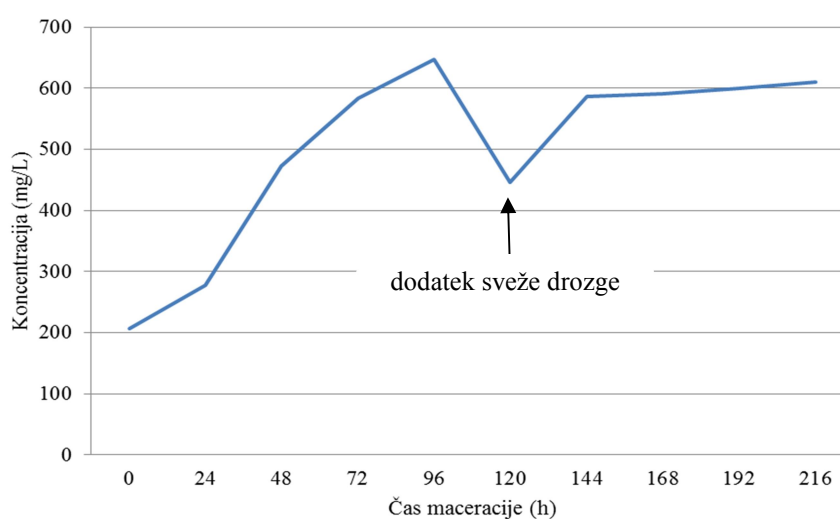


Slika 12: Koncentracije flavonoidov in neflavonoidov v moštu med maceracijo

Vrednost neflavonoidov je dosegla maksimum po 72 h, in sicer 1154 mg/L. Vrednost je do konca maceracije padla pod začetno vrednost in je bila zadnji dan maceracije najmanjša.

4.2.4 Vsebnosti antocianov v moštu med maceracijo

Vsebnost antocianov je med maceracijo naraščala (slika 13). Na začetku maceracije je koncentracija antocianov naraščala nekoliko hitreje (do 96 h), kjer je dosegla maksimalno vrednost 647 mg/L. Nato se je zgodila motnja, ko se je drozgi dodala sveža nefermentirajoča drozga (označeno na sliki 13). Pri tem času je vsebnost antocianov padla, vendar je začela zopet naraščati in ob koncu maceracije dosegla vrednost 610 mg/L.



Slika 13: Koncentracije antocianov v moštu med maceracijo

4.3 DOLOČANJE BARVNIH PARAMETROV

V preglednici 4 so predstavljeni rezultati barvnih parametrov v moštu med maceracijo. Vsakodnevno so se izvajale meritve naslednjih parametrov v moštu: intenziteta barve, ton barve, rdeča barva in deleži rdeče barve pri 420, 520 ter 620 nm.

Vrednosti posameznih barvnih parametrov so se v odvisnosti od časa statistično značilno ($P \leq 0,001$) razlikovale. Intenziteta barve je bila med 2,5 in 13,4. Značilno največja intenziteta barve v moštu je bila dosežena po 168 in 192 h. Ton barve se je gibal med 0,38 in 0,45 rad. Rdeča barva je z začetnih 77,3 % po 216 h maceracije padla na končnih 72,5 %. Deleža rdeče barve pri 420 in 620 nm sta bila značilno najvišja v moštu po končani maceraciji, medtem ko je bil delež rdeče barve pri 520 nm značilno najvišji na začetku maceracije.

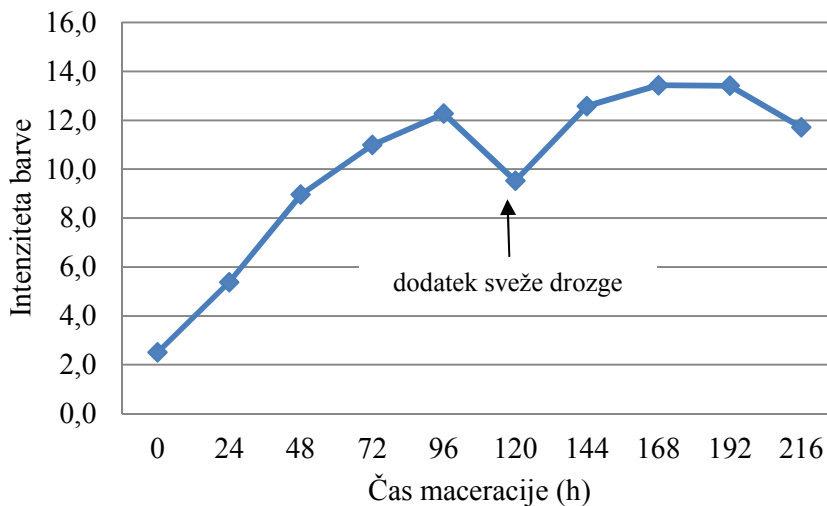
Preglednica 4: Rezultati barvnih parametrov v moštu med maceracijo

Čas maceracij e (h)	Parameter					
	Intenziteta barve	Ton barve (rad)	Rdeča barva (%)	Rdeča barva 420 nm (%)	Rdeča barva 520 nm (%)	Rdeča barva 620 nm (%)
0	2,51 ±0,02 i	0,381 ±0,002 f	77,33 ±0,16 a	26,22 ±0,19 e	68,81 ±0,16 a	4,97 ±0,35 f
24	5,38 ±0,08 h	0,391 ±0,004 e	75,91 ±0,24 c	26,42 ±0,20 e	67,48 ±0,21 c	6,10 ±0,11 e
48	8,96 ±0,19 g	0,388 ±0,004 e	75,93 ±0,43 c	26,20 ±0,16 e	67,51 ±0,39 c	6,29 ±0,30 de
72	10,99 ±0,06 e	0,377 ±0,002 fg	76,39 ±0,06 b	25,59 ±0,10 f	67,92 ±0,06 b	6,49 ±0,05 cd
96	12,27 ±0,10 c	0,373 ±0,003 g	76,47 ±0,09 b	25,40 ±0,14 f	68,00 ±0,08 b	6,60 ±0,07 bc
120	9,52 ±0,11 f	0,429 ±0,004 b	73,82 ±0,21 f	28,15 ±0,18 b	65,63 ±0,18 f	6,22 ±0,01 de
144	12,58 ±0,17 b	0,404 ±0,001 d	74,84 ±0,05 d	26,89 ±0,05 d	66,53 ±0,04 d	6,59 ±0,08 bc
168	13,43 ±0,08 a	0,412 ±0,005 c	74,21 ±0,23 e	27,17 ±0,22 c	65,97 ±0,20 e	6,85 ±0,03 ab
192	13,41 ±0,05 a	0,406 ±0,000 d	74,52 ±0,02 de	26,87 ±0,01 d	66,24 ±0,02 de	6,89 ±0,01 a
216	11,71 ±0,15 d	0,447 ±0,002 a	72,45 ±0,10 g	28,80 ±0,06 a	64,47 ±0,09 g	6,73 ±0,02 abc
P	***	***	***	***	***	***

Podatki prikazujejo $\bar{x} \pm SD$ (n = 3). Stopnja značilnosti: ***, $P \leq 0,001$. Srednje vrednosti z različnimi malimi črkami (a,b,c,d,e,f) v stolpcih so statistično značilne ($P < 0,05$).

4.3.1 Intenziteta barve

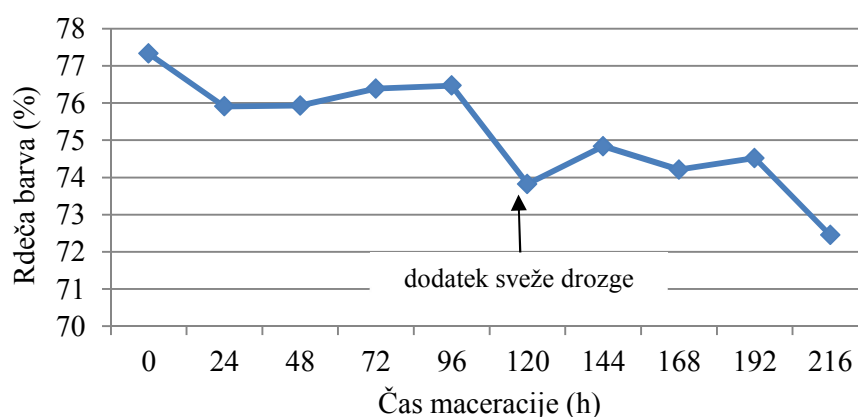
Intenziteta barve mošta med maceracijo je prikazana na sliki 15. Pričakovano je bila intenziteta barve najmanjša na začetku maceracije. Nato je med maceracijo naraščala do maksimalne vrednosti po 168 h in do konca maceracije rahlo padla.



Slika 14: Intenziteta barve mošta med maceracijo

4.3.2 Delež rdeče barve oziroma prostih in vezanih antocianov v obliki flavilijevega kationa

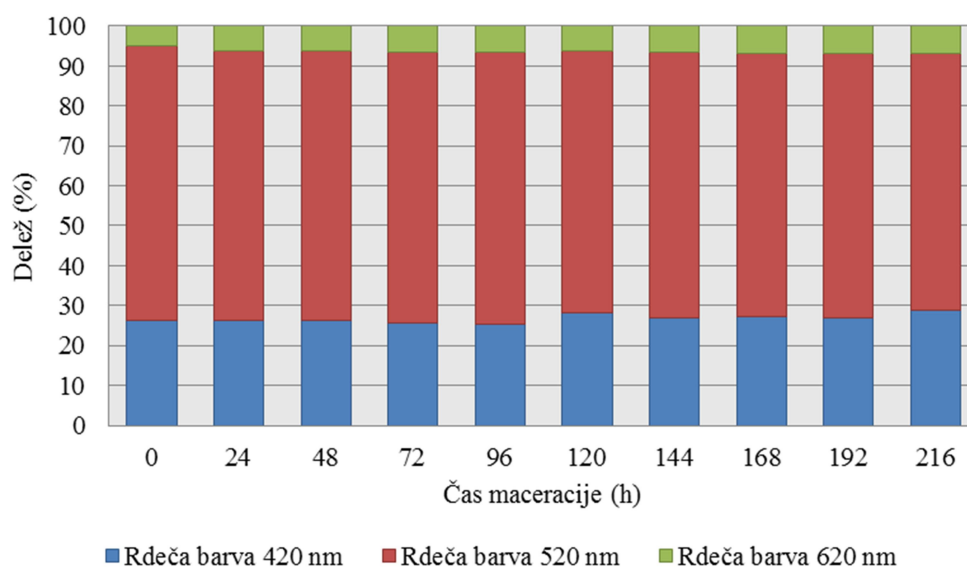
Slika 15 prikazuje spreminjanje deleža rdeče barve mošta. Delež rdeče barve se je med maceracijo zmanjševal, in sicer se je od začetka pa do konca znižal za 6 %.



Slika 15: Delež rdeče barve mošta med maceracijo

4.3.3 Delež rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah

Meritve barve pri valovni dolžini 420 nm predstavljajo spekter rumeno-rjave barve, pri valovni dolžini 520 nm odtenek rdeče barve in pri 620 nm modro-vijolični odtenek barve.



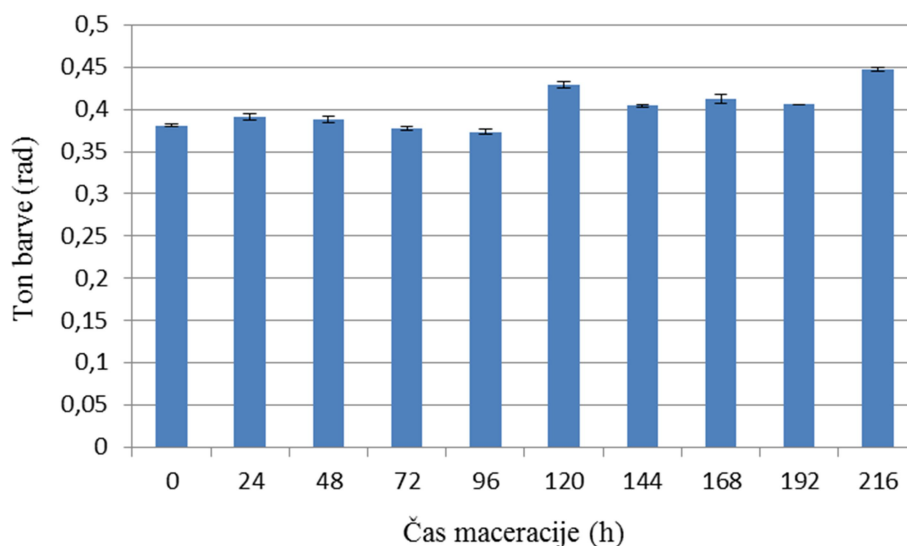
Slika 16: Deleži rdeče barve pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm v moštu med maceracijo

Delež rdeče barve (%) pri 420 nm, torej rumeno-rjavi odtenek, je med maceracijo počasi naraščal, še posebej pri 120 h, ko je v drozgo prišlo nekaj kisika, ki je povzročil oksidacijo

in s tem naraščanje rjavih odtenkov barve (slika 16). Največja izmerjena vrednost je bila na koncu maceracije, in sicer 2,6 % večja od začetne. Delež barve pri 520 nm je med maceracijo počasi padal. Največja vrednost je bila izmerjena takoj na začetku, nato pa je vrednost do konca maceracije padla za 4,3 %. Delež barve pri 620 nm, torej modro vijolični odtenek, se je med maceracijo povečeval in dosegel maksimalno vrednost po 192 h, ko se je od začetne vrednosti povečal za 1,8 %. V največjem deležu je bil zastopan odtenek rdeče barve, sledil je rumeno-rjavi odtenek, v najmanjšem deležu pa je bil modro vijolični odtenek.

4.3.4 Ton barve

Iz slike 17 je razvidno, da so bile vse vrednosti tangensa kota med 0,36 in 0,45 rad (20 ° do 24 °), kar pomeni, da je bila barva rdeča (Zoecklein in sod., 1994) za vse dni maceracije.



Slika 17: Ton barve mošta med maceracijo

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti vpliv časa maceracije drozge grozdja sorte Modra frankinja na ekstrakcijo polifenolov. Z meritvami osnovnih kemijskih parametrov, barvnih parametrov in vsebnosti polifenolov mošta smo pridobili rezultate, na podlagi katerih smo ocenili ekstrakcijo le-teh v odvisnosti od časa.

Spremljali smo vrednost sladkorja, pH, titrabilnih ter hlapnih kislin med maceracijo drozge. Prav tako smo izmerili intenziteto barve, ton barve, delež rdeče barve in delež rdeče barve pri valovnih dolžinah 420, 520 ter 620 nm. V sklopu analiz polifenolov smo določili koncentracije skupnih fenolov, taninskih in netaninskih fenolov, flavonoidov in neflavonoidov ter antocianov v moštu Modre frankinje med maceracijo.

Vrednost sladkorja se je med maceracijo zmanjševala, kar je bila posledica metabolizma kvasovk, saj iz sladkorja nastajajo alkoholi in CO₂. pH vrednost je naraščala zaradi izločanja kalijevih in kalcijevih tartratov. Posledično se je zaradi tega manjšala tudi vsebnost titrabilnih kislin. Koncentracija hlapnih kislin je med maceracijo nekoliko naraščala, vendar je bila največja izmerjena vrednost 0,31 g/L, kar je sprejemljivo in pod zakonsko določeno mejo. Hlapne kisline nastajajo kot stranski produkt kvasovk med fermentacijo mošta in so navadno odvisne od tehnologije predelave ter načina vinifikacije (Košmerl in sod., 2004).

Koncentracija skupnih fenolov je med maceracijo naraščala. Začetna vrednost je bila 777 mg/L, končna vrednost pa je bila 1883 mg/L, kar sovpada s podatki iz literature. Povprečna koncentracija skupnih fenolov v rdečih vinih je 1800 mg/L, lahko pa je v razponu med 700 in 4000 mg/L (Košmerl, 2013). Vsebnost flavonoidov se je med maceracijo povečevala. Koncentracija je narasla od začetnih 40 mg/L do končnih 1226 mg/L. Vrednost flavonoidov v rdečih vinih predstavlja do 85 % vrednosti skupnih fenolov, v našem primeru 67 % na koncu maceracije, ko sta bili ti dve koncentraciji največji. V rdečih vinih je koncentracija flavonoidov do 1000 mg/L (Košmerl, 2013), kar pomeni, da je bila v našem primeru izmerjena koncentracija večja od običajne.

Ekstrakcija antocianov na začetku maceracije hitro narašča, nato pa pada proti koncu fermentacije (Zoecklein in sod., 1994). V našem primeru je bila največja koncentracija antocianov izmerjena po 96 h, kar to navedbo tudi potrjuje. Do konca maceracije se koncentracija antocianov ni več bistveno spremenila, a vseeno nekoliko naraščala do zadnjega dne. To pomeni, da je do konca maceracije naraščala tudi koncentracija flavonoidov, kar potrjuje dejstvo, da čas trajanja maceracije ter povečanje koncentracije etanola vplivata na ekstrakcijo teh spojin (Bavčar, 2006).

Neflavonoidi so dosegli največjo koncentracijo po 72 h, in sicer 1154 mg/L. Do konca maceracije se je njihova koncentracija zmanjšala za 43 %. Neflavonoidi so zelo nestabilne spojine, ki se lahko ločijo v prvotne komponente zaradi nizke pH vrednosti vina. Ravno nasprotno so flavonoidi bolj stabilni zaradi močnejših kovalentnih vezi med vodikom in kisikom posameznih fenolov (Bavčar, 2006), kar je razvidno tudi iz naših meritev.

Tako kot je naraščala koncentracija skupnih fenolov, je naraščala tudi koncentracija taninskih fenolov med maceracijo mošta. Taninski fenoli se delijo na hidrolizabilne in kondenzirane. Med te spadajo tudi flavonoidi, pri katerih smo ugotovili, da je njihova koncentracija med maceracijo naraščala. Med netaninske fenole spadajo antociani. Koncentracija obeh je dosegla maksimalno vrednost po 96 h.

V največjem deležu je bil zastopan odtenek rdeče barve, sledil je rumeno-rjavi, v najmanjšem deležu pa je bil določen modro-vijolični odtenek. Največja vrednost deleža rdeče barve je bila izmerjena pri 520 nm, kar je pričakovano, saj je v začetku v drozgi še nekaj kisika. Ta povzroča vezavo antocianov in tanina, ki prispevajo k deležu rdeče barve pri valovni dolžini 520 nm (Nemanič, 2002). Z večanjem vsebnosti alkohola etanola se manjša delež barve pri 420 in 520 nm. V našem primeru smo ugotovili, da se je manjšal le delež barve pri 520 nm. Pri 420 nm se je vrednost nekoliko povečala. Ker je pri odtenku rumeno-rjave barve prišlo do povečanja, sklepamo, da se je po času 120 h skupaj z dodatkom nove nefermentirajoče drozge dovedel kisik, ki je na fenole vplival tako, da so se tvorili rjavo obarvani kinoni.

Intenziteta barve v moštu je med maceracijo naraščala, kar je razumljivo, saj sta naraščali tudi koncentraciji taninov in antocianov, ki tvorita kompleks ter tako stabilizirata barvo. Posledično sta se večali vrednosti tona in intenzitete barve. Antociani se povezujejo tudi z drugimi fenolnimi spojinami, organskimi kislinami in aminokislinami, s katerimi kopigmentirajo ter tvorijo obarvane komplekse.

5.2 SKLEPI

Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko povzamemo naslednje sklepe:

- Koncentracija skupnih fenolov je bila največja ob koncu maceracije, kar pomeni, da so se skozi celoten proces maceracije iz grozdnih pečk in kožic uspešno ekstrahirali.
- Koncentracija flavonoidov v moštu je naraščala do konca maceracije, kjer je dosegla maksimalno vrednost.
- Koncentracija antocianov v moštu je dosegla maksimalno vrednost po 96 h maceracije, nato je nekoliko padla.

- Intenziteta barve se je med procesom maceracije povečevala in dosegla vrh osmi dan, nato je začela padati.
- Ton barve se je vseskozi povečeval in dosegel maksimum ob koncu maceracije.
- Delež rdeče barve v obliki flavilijevega kationa se je med maceracijo zmanjševal, saj so se prosti antocianini povezali z ekstrahiranimi tanini v moštu in s tem tvorili stabilnejše komplekse.
- Delež rdeče barve pri 520 nm se je do konca maceracije zmanjševal, medtem ko se je delež rdeče barve pri 420 nm nekoliko povečal. Tudi delež barve pri 620 nm se je med procesom maceracije nekoliko povečal.
- Koncentracija sladkorja v moštu je med maceracijo padala do zaključene fermentacije (šesti dan), nato je bila konstantna.
- pH vrednost mošta med maceracijo je naraščala, koncentracija titrabilnih kislin pa padala.
- Med maceracijo mošta se je koncentracija hlapnih kislin povečevala.

POVZETEK

Modra frankinja je po razširjenosti in kakovosti glavna rdeča sorta v vinorodni deželi Posavje. Grozdje sorte Modra frankinja je primerno za pridelavo rdečih vin, saj lahko iz njega z optimalnim časom maceracije pridelamo odlična mlada vina za takojšnjo porabo ali krepko in intenzivno obarvana vina za nadaljnje zorenje. Modra frankinja je med drugim osnova vina Metliška črnina, zastopana je tudi v rdečem Bizeljčanu PTP in Cvičku PTP. Njena kakovostna stopnja je zelo odvisna od dozorelosti grozdja in načina ter časa maceracije drozge.

Namen diplomske naloge je bil ovrednotiti kemijske parametre v moštu med maceracijo drozge in ugotoviti, ali je pri sorti Modra frankinja devet dni tisti čas maceracije drozge, ki optimalno vpliva na ekstrakcijo polifenolov. Uporabili smo ročno trgano grozdje, ki je bilo pridelano v vinorodni deželi Posavje. V makro poskusu je maceracija in fermentacija drozge potekala devet dni v avtomatiziranem vinifikatorju vinske kleti Krško.

Med maceracijo drozge smo dnevno odvezemali vzorce mošta. Določali smo osnovne kemijske parametre (sladkor, pH, titrabilne in hlapne kisline), barvne parametre (intenziteta, ton, delež rdeče barve in barva pri valovnih dolžinah 420, 520, 620 nm) in koncentracije različnih fenolnih spojin (skupni fenoli, flavonoidi, neflavonoidi, antociani, taninski in netaninski fenoli).

Z dnevnim spremljanjem kemijskih parametrov smo ugotovili, da fermentacija pravilno poteka, sladkor enakomerno pada, kakor tudi koncentracija titrabilnih kislin. Zaradi bioloških procesov med maceracijo s fermentacijo se je višala vrednost pH in večala koncentracija hlapnih kislin. Povečevala se je koncentracija alkohola, kar je pripomoglo k večji ekstrakciji antocianov. Vrednost antocianov je med procesom naraščala, svojo maksimalno vrednost pa je dosegla po 96 h maceracije drozge.

Vsebnost sladkorja v moštu je s časom maceracije drozge padla z začetnih 84 °Oe na končnih 32 °Oe. Koncentracija skupnih fenolov in antocianov v moštu se je med maceracijo drozge povečevala in na koncu dosegla vrednost 1883 mg/L, oziroma 610 mg/L. Z dolgim časom maceracije se je povečeval tudi delež skupnih, taninskih in netaninskih fenolov, saj se je ekstrahiralo precej skupnih fenolov iz jagodnih kožic in grozdnih pečk.

Barvni parametri so se med maceracijo spreminjali. Intenziteta barve se je s časom maceracije večala, kakor tudi delež rjavo-rumenih odtenkov in modro vijoličnih odtenkov. Ob času, ko je bil ton barve največji je bil hkrati najmanjši delež rdeče barve, torej prostih in vezanih in antocianinov v obliki flavilijevega kationa.

Rezultati analiz so pokazali, da je devet dni maceracije drozge sorte Modra frankinja ob ustreznih pogojih tisti čas, ko se v mošt ekstrahira zadostna količina polifenolnih spojin. Glede na dobljene rezultate meritev v makroposkusu in s primerjavo podatkov iz literature lahko sklepamo, da se je v devetih dneh ekstrahirala ustrezna količina polifenolnih spojin. Enolog v kleti se je odločil končati maceracijo, ko je mošt dosegel ustrezne osnovne kemijske parametre.

6 VIRI

- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. *Farmacevtski vestnik*, 48: 573-589
- 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, 1: 238-254
- Anderson K., Nanda R. A. 2013. Which winegrape varieties are grown where? A global empirical picture. Adelaide, University of Adelaide Press: 700 str.
- Bajuk A. 2000. Ugotavljanje optimalnega časa maceracije kultivarja Frankinja. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 96 str.
- Bavčar D. 2006. Kletarjenje danes. Ljubljana, Kmečki glas: 286 str.
- Berovič M., Pivec A., Košmerl T., Wondra M., Celan S. 2007. Influence of heat shock on glycerol production in alcohol fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103, 2: 135-139
- Boulton R. B., Singleton V., Bisson L. F., Kunkee R. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, Chapman&Hall: 604 str.
- Boyer R. F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Bunderl Rus N., Prunk J., Nemanič J., Klemenc S., Prunk A. 1994. Vodnik po slovenskih vinorodnih okoliših. Ljubljana, Založba Grad: 229 str.
- Da Silva J. M. R., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S. 1991. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 9: 1549-1552
- Di Stefano R., Cravero M. C. 1990. Origine degli acidi vanillico e siringico dei vini. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 43, 2: 47-53
- Goethe H. 1887. Handbuch der Ampelographie. Berlin, P. Parey: 219 str.
- Goldberg D. M., Garovic-Kocic V., Diamandis E. P., Pace-Asciak C. R. 1996. Wine: does the colour count?. *Clinica Chimica Acta*, 246: 183-193

- Hrček L. 1982. Vinogradništvo II. del Ampelografija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 97 str.
- Jackson R. S. 2000. Wine science: principles, practice, perception. San Diego, Academic Press: 648 str.
- Klenar I. 1998. Različni postopki maceracije rdečih vinskih sort. Ptuj, Veritas: 7 str.
- Košmerl T., Kač M., Zupančič-Kralj L., Hribar J. 2004. Osnovne kemijske analize mošta in vina: laboratorijske vaje za predmet Tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 106 str.
- Košmerl T. 2007. Alkoholna fermentacija mošta: izbrana poglavja pri predmetu tehnologija vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 95 str.
- Košmerl T. 2013. Vinske kvasovke, hranila in tanini. Maribor, Jurana: 67 str.
- Lingua M. S., Fabani M. P., Wunderlin D. A., Baroni M. V. 2016. *In vivo* antioxidant activity of grape, pomace and wine from three red varieties grown in Argentina: Its relationship to phenolic profile. Journal of Functional Foods, 20: 332-345
- Marcheix J., Fleuriet A., Billot J. 1990. Fruit phenolics. Florida, CRC Press: 378 str.
- Mattivi F., Nicolini G. 1997. Analysis of polyphenols and resveratrol in Italian wines. BioFactors, 6, 4: 445-448
- Mattivi F., Reniero F., Korhammer S. 1995. Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 7: 1820-1823
- Nemanič J. 1996. Spoznajmo vino. Ljubljana, Kmečki glas: 165 str.
- Nemanič J., Kocjančič M., Resnik M., Žnidaršič-Pongrac V. 1997. Novi trendi v predelavi rdečega grozdja. V: Moderne tehnologije predelave in kakovost živil. 18. Bitenčevi živilski dnevi 1997, Ljubljana, 12-13 junij 1997. Žlender B., Gašperlin L., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 199-209
- Nemanič J. 2002. Mikrooksidacija vin v sodčkah in cisternah. Ljubljana, Kmečki glas, 59, 45: 8

- Nemanič J. 2014. Kako optimalno pridelati, ovrednotiti Modro frankinjo v Posavju?, Sevnica, Javni zavod za kulturo, šport, turizem in mladinske dejavnosti: 11 str.
<http://www.modra-frankinja.com/upload/urejevalnik/datoteke/KAKO%20OPTIMALNO%20PRIDELATI%20MF%20Strokovni%20clanek%20Julij%20Nemanic.pdf> (15. jun. 2015)
- Ough C. S., Amerine M. A. 1988. Methods for analysis of musts and wines. New York, John Wiley & Sons: 377 str.
- Radovanović V. 1970. Tehnologija vina. Beograd, Građevinska knjiga: 688 str.
- Rapp A., Mandery H. 1986. Wine aroma. *Experientia*, 42, 8: 873-884
- Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A., Glories Y., Maujean A. 2000. Handbook of enology. Vol. 2: The chemistry of wine. Chichester, J. Wiley & Sons: 404 str.
- Robinson J., Harding J., Vouillamoz J. F. 2013. Wine grapes: A complete guide to 1,368 vine varieties, including their origins and flavours. New York, Ecco/HarperCollins: 1242 str.
- Roginsky V., Lissi E. A. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92, 2: 235-254
- Šikovec S. 1996. Vino, pijača doživetja. Ljubljana, Kmečki glas: 321 str.
- Silva L. R., Queiroz M. 2016. Bioactive compounds of red grapes from Dão region (Portugal): Evaluation of phenolic and organic profile. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6, 4: 315-321
- Singleton V. L., Rossi J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 3: 144-158
- Soleas J. G., Diamandis E. P., Goldberg D. M. 1997. Wine a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11: 287-313
- Vine R. P. 1997. Winemaking : from grape growing to marketplace. New York, Chapman & Hall: 439 str.

Vinorodna dežela Posavje. 2011. V: Wikipedija: spletni portal
https://sl.wikipedia.org/wiki/Vinorodna_de%C5%BEela_Posavje (28. mar. 2016)

Vodopivec M. 1993. Kako pripravimo dobro vino. Ljubljana, Republiška uprava za pospeševanje kmetijstva: 144 str.

Vrhovšek U. 1998. Resveratrol v slovenskih vinih. Sodobno kmetijstvo, 31, 10: 435-440

Vrhovšek U. 2000. Bioaktivne polifenolne spojine grozdja in vina. V: Zbornik referatov. Strokovni posvet Vino – hrana, zdravje 2000, Ljubljana, 5. 4. 2000. Rajher Z. (ur.). Celje, Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 42-56

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

ZAHVALA

Iskrena zahvala gre profesorju dr. Mojmirju Wondri za strokovno pomoč in potrpežljivost ter pregled diplomskega dela.

Zahvala gre tudi recenzentki prof. dr. Lei Pogačnik za strokovni pregled diplomske naloge.

Za pomoč in sodelovanje v laboratoriju Kmetijsko gozdarskega zavoda Novo mesto gre zahvala gospe Katarini Merlin. Za pomoč pri meritvah v laboratoriju Biotehniške fakultete, oddelka za vinarstvo pa gospe Zdenki Zupančič.

Hvala tudi vinski kleti Krško za priložnost dela pri makroposkusu in vse potrebne informacije.

Nazadnje še iskrena hvala moji družini za možnost opravljanja in uspešen zaključek študija.