

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jasna LUŽAR

ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL DROŽI

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Jasna LUŽAR

ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL DROŽI

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Živilstvo

ANTIOXIDANT POTENTIAL OF WINE LEES

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Food Science and Technology

Ljubljana, 2017

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Živilstvo. Delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti, Oddelku za živilstvo, Katedri za tehnologije, prehrano in vino ter Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Tatjano Košmerl, za somentorico izr. prof. dr. Polono Jamnik in za recenzentko prof. dr. Leo Demšar.

Mentorica: prof. dr. Tatjana KOŠMERL
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Somentorica: izr. prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Recenzentka: prof. dr. Lea DEMŠAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisana 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.

Jasna Lužar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 663.221:663.252/.253:547.56:577.1(043)=163.6
KG	vino/ bela vina/ laški rizling/ sauvignon/ vinske droži/ zorenje vina na drožeh/ fenolne spojine/ antioksidanti/ antioksidativni potencial
AV	LUŽAR, Jasna, dipl. inž. živ. in preh. (UN)
SA	KOŠMERL, Tatjana (mentorica)/JAMNIK, Polona (somentorica)/ DEMŠAR, Lea (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2017
IN	ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL DROŽI
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Živilstvo)
OP	XIII, 65 str., 18 pregl., 26 sl., 13 pril., 37 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Zorenje vina na drožeh je čedalje bolj razširjeno po vseh vinogradniških območjih in se tradicionalno uporablja za pridelavo penečih vin in belih vin. Zorenje vina ima številne učinke na končni produkt, in sicer zmanjšuje grenkobo in trpkost vin, daje poln in zaokrožen okus ter vpliva na tartratno in beljakovinsko stabilnost vin. Namen magistrskega dela je bil ugotoviti, ali zorenje vina na drožeh vpliva na ohranitev oziroma povečanje vsebnosti antioksidantov v vinu, in če lahko zorenje predstavlja alternativo dodatku SO₂ v vino. V fermentacijskih poskusih smo uporabili mošta sorte laški rizling in sauvignon, letnik 2015, in različne dodatke: komercialne starterske kulture, hranila zanje in trske iz hrastovega lesa (različnega izvora in stopnje ožganosti). Po končani alkoholni fermentaciji je približno šest mesecev potekalo zorenje vina na drožeh. Med zorenjem vina na drožeh smo izvajali fizikalno-kemijske analize, kot so spremljanje vsebnosti fenolnih spojin v vinu in antioksidativni potencial vina, ter mikrobiološke analize, kot sta bili metoda znotrajcelične oksidacije in mikrobiološki pregled droži. Rezultati so pokazali, da se s časom zorenja vsebnost fenolnih spojin zmanjšuje (izjema so vzorci z dodatkom trsk iz hrastovega lesa) in s tem se zmanjšuje tudi antioksidativni potencial vina. Večja vrednost antioksidativnega potenciala je bila v primeru vzorcev z dodanimi trskami iz hrastovega lesa, kar je posledica antioksidativnega delovanja fenolnih spojin, ki so se iz trsk ekstrahirale v vino. Pri določanju antioksidativnega potenciala droži rezultati kažejo na konstanten nivo oksidacije v celicah prva tri vzorčenja, tekom zadnjih treh vzorčenj zorenja pa so bila prisotna nihanja, ki so v povprečju nakazovala trend rahlega znižanja oksidacije v celicah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDK 663.221:663.252/.253:547.56:577.1(043)=163.6

CX wine/ white wines/ welsch riesling/ sauvignon/ wine lees/ wine ageing on lees/
phenolic compounds/ antioxidants/ antioxidant potential

AU LUŽAR, Jasna

AA KOŠMERL, Tatjana (supervisor)/JAMNIK, Polona (co-advisor)/DEMŠAR, Lea
(reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology

PY 2017

TY ANTIOXIDANT POTENTIAL OF WINE LEES

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Food Science and Technology)

NO XIII, 65 p., 18 tab., 26 fig., 13 ann., 37 ref.

LA sl

Al sl/en

AB In all the viticulture areas, the significance of wine ageing on lees is getting more
attention nowadays. It is traditionally used for sparkling wines and white wines.
Wine ageing on lees has several effects on final product – it reduces bitterness and
astringency, enhances the roundness and body of wines and has influence on tartrate
and protein stabilization. This Master's thesis's purpose was to determine whether
wine ageing on lees affects preservation of antioxidants and on the other hand
increases content of antioxidants. It can also represent alternative to addition of
sulfur dioxide (SO₂) in wine. In the experiment we have used Welsch Riesling and
Sauvignon grape musts, vintage 2015, and starter cultures, yeast nutrients and oak
chips with different botanical origin and toasted. After completion of alcoholic
fermentation, we have left wines in contact with lees for about six months. While
wine ageing we were monitoring the total polyphenols content, antioxidant
potential of wine, intracellular oxidation and microscopic examination of wine lees.
The obtained results have confirmed that total phenolic content decreased while
wine ageing on lees (except for samples with added oak chips) and therefore
antioxidant potential of wine has also decreased. Higher values of antioxidant
potential were measured in samples with added oak chips, which is the
consequence of antioxidant activity of phenolic compounds extracted from oak
chips. Results obtained by determination of intracellular oxidation show us constant
level of intracellular oxidation at first three sampling times, while oscillations were
present in intracellular oxidation at last three sampling times. The trend of
oxidation has slightly decreased in yeasts' cells during wine ageing on lees.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	X
KAZALO PRILOG.....	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN NALOGE.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 ZORENJE VINA NA DROŽEH ALI »SUR LIES« TEHNOLOGIJA.....	3
2.1.1 Definicija in sestava droži.....	3
2.2 AVTOLIZA KVASOVK.....	4
2.2.1 Mehanizmi avtolize kvasovk.....	5
2.2.1.1 Proteoliza.....	5
2.2.1.2 Razgradnja celične stene.....	6
2.2.2 Dejavniki, ki vplivajo na potek avtolize kvasovk	8
2.2.2.1 Temperatura.....	8
2.2.2.2 Ostali dejavniki.....	9
2.2.3 Kvasni avtolizati	9
2.2.3.1 Nastanek dušikovih spojin med avtolizo.....	9
2.2.3.2 Manoproteini.....	9
2.2.3.3 Lipidi.....	13
2.2.3.4 Nukleinske kisline.....	13
2.2.3.5 Hlapne spojine.....	14
2.3 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI DROŽI.....	14

2.3.1	Ustvarjanje redukativnega okolja.....	14
2.3.2	Interakcije med drožmi in fenolnimi spojinami	16
2.3.3	Odstranitev nezaželenih komponent v vinu	16
2.3.4	Oksidativno rožnato obarvanje (ang. oxidative pinking)	17
2.3.5	Adsorpcija tiolov na celične stene droži	17
2.3.6	Vloga droži pri tartratni in beljakovinski stabilnosti	17
2.4	OKSIDATIVNI STRES KVASOVK VRSTE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	18
2.4.1	Vloga glutationa pri zorenju vin na drožeh	20
3	MATERIAL IN METODE.....	21
3.1	ZASNOVA POSKUSA.....	21
3.2	MATERIAL.....	22
3.2.1	Mošt	22
3.2.2	Enološka sredstva	22
3.2.2.1	Suhe aktivne kvasovke.....	22
3.2.2.2	Hranila za kvasovke.....	23
3.2.2.3	Trske iz hrastovega lesa.....	24
3.2.3	Kemikalije in reagenti.....	24
3.2.3.1	Priprava osnovne raztopine galne kisline.....	24
3.2.3.2	Priprava FC reagenta.....	25
3.2.3.3	Priprava DPPH [·] v raztopini metanola.....	25
3.2.3.4	Priprava H ₂ DCFDA.....	25
3.2.3.5	Priprava 50 mM kalijevega fosfatnega pufra (pH = 7,8)	25
3.2.4	Laboratorijska oprema in aparature.....	26
3.2.5	Fermentacijski poskus.....	26
3.3	METODE.....	27
3.3.1	Fizikalno-kemijske metode	27
3.3.1.1	"WineScan" analiza za določanje osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov	27
3.3.1.2	Določanje skupnih fenolnih spojin po Singletonu in Rossiju.....	27
3.3.1.3	Določanje antioksidativnega potenciala vina s spektrofotometrično metodo s prostim radikalom DPPH [·]	27

3.3.2	Analize droži	28
3.3.2.1	Določanje antioksidativnega potenciala droži z metodo za določanje znotrajcelične oksidacije celic.....	28
3.3.2.2	Mikroskopski pregled droži.....	29
4	REZULTATI Z RAZPRAVO.....	30
4.1	FERMENTACIJSKE KRIVULJE	30
4.2	VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN.....	33
4.3	ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL VINA	38
4.3.1	Primerjava spreminjanja antioksidativnega potenciala vina glede na izbran sev kvasovk.....	43
4.3.2	Primerjava spreminjanja antioksidativnega potenciala vina glede na dodatek trsk iz hrastovega lesa	46
4.4	ZVEZA MED SKUPNIMI FENOLNIMI SPOJINAMI IN AOP VINA.....	48
4.5	ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL DROŽI.....	51
4.6	ZVEZA MED AOP VINA IN ZNOTRAJCELIČNO OKSIDACIJO.....	55
4.7	MIKROBIOLOŠKI PREGLED DROŽI.....	56
5	SKLEPI	59
6	POVZETEK.....	60
7	VIRI.....	62

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava vinskih droži (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).....	4
Preglednica 2: Tartratna stabilnost belih vin z dodatkom preparata Mannostab™ (g/hL), določena z vizualnim pregledom kalijeve hidrogentartratne kristalizacije in s spremembo koncentracije kalijevega K ⁺ iona (ΔK^+) znotraj šestih dni pri temperaturi 4 °C (Moine-Ledoux in sod., 1997).....	11
Preglednica 3: Uporabljene komercialne suhe aktivne kvasovke.....	23
Preglednica 4: Uporabljena komercialna hranila za kvasovke	23
Preglednica 5: Uporabljene trske iz hrastovega lesa.....	24
Preglednica 6: Vsebnost reducirajočih sladkorjev (RS), vsebnost skupnih fenolnih spojin (PFT) in antioksidativni potencial (AOP) po 74. dneh zorenja vina na drožeh (Lužar in sod., 2016)	34
Preglednica 7: Celokupno zmanjšanje skupnih fenolnih spojin (%) od časa vzorčenja t ₁ do t ₆	35
Preglednica 8: Povprečne vrednosti in standardni odklon koncentracije skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L) med zorenjem vina laški rizling (LR) in sauvignon (SAU) in sicer pri kontrolnih vzorcih, vzorcih z dodatkom hrastovih trsk in brez dodatka hrastovih trsk	36
Preglednica 9: Rezultati Duncanovega testa za vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih vina obeh sort ob različnih časih vzorčenja.....	38
Preglednica 10: Povprečne vrednosti in standardni odklon AOP vina (mmol/L) med zorenjem vina laški rizling (LR) in sauvignon (SAU) in sicer pri kontrolnih vzorcih, vzorcih z dodatkom hrastovih trsk in brez dodatka hrastovih trsk	40
Preglednica 11: Rezultati Duncanovega testa za vrednost antioksidativnega potenciala vzorcev vina obeh sort ob različnih časih vzorčenja	41
Preglednica 12: Celokupno zmanjšanje antioksidativnega potenciala vina (%) od časa vzorčenja.....	42
Preglednica 13: Koeficient korelacije (R ²) za vina sorte laški rizling in sauvignon ob različnih časih vzorčenja	48
Preglednica 14: Koeficient korelacije (R ²) za vina sorte laški rizling ob različnih časih vzorčenja.....	49

Preglednica 15: Koeficient korelacije (R^2) za vina sorte sauvignon ob različnih časih vzorčenja.....	49
Preglednica 16: Povprečne vrednosti in standardni odklon znotrajcelične oksidacije (PF/OD) med zorenjem vina laški rizling (LR) in sauvignon (SAU) in sicer pri kontrolnih vzorcih, vzorcih z dodatkom hrastovih trsk in brez dodatka hrastovih trsk	52
Preglednica 17: Rezultati Duncanovega testa za vrednost znotrajcelične oksidacije pri obeh sortah vina ob različnih časih vzorčenja	53
Preglednica 18: Test medsebojnih interakcij časa zorenja, sorte vina in dodatka trsk na znotrajcelično oksidacijo	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura celične stene kvasovk vrste <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (McClanahan, 2009).....	6
Slika 2: Shematična predstavitev morfoloških in biokemijskih sprememb v kvasni celici med avtolizo (Alexandre, 2011)	7
Slika 3: Vpliv mešanja na oksidacijsko-redukcijski potencial v zorenih belih vinih (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).....	16
Slika 4: Shematski prikaz poteka poskusa	21
Slika 5: Nastanek fluorescentne komponente DCF s pomočjo reaktivnih kisikovih zvrsti (RKZ) (Held, 2015)	28
Slika 6: Fermentacijske krivulje vzorcev vina sorte laški rizling	30
Slika 7: Fermentacijske krivulje vzorcev mošta sorte sauvignon	31
Slika 8: Kinetika oddanega CO ₂ (g/Lh) v odvisnosti od trajanja alkoholne fermentacije mošta sorte laški rizling	32
Slika 9: Kinetika oddanega CO ₂ (g/Lh) v odvisnosti od trajanja alkoholne fermentacije mošta sorte sauvignon	32
Slika 10: Spreminjanje povprečne vrednosti skupnih fenolnih spojin v vzorcih s časom zorenja za vsako sorto vina posebej z ali brez dodatka trsk iz hrastovega lesa.....	37
Slika 11: Spreminjanje povprečne vrednosti AOP vina s časom zorenja posebej za vino sorte laški rizling (LR) in sauvignon (SAU) ter z ali brez dodatka trsk iz hrastovega lesa	41
Slika 12: Spreminjanje antioksidativnega potenciala (AOP) kontrolnih vzorcev z oznakama 1 in 19 v odvisnosti od časa zorenja.....	43
Slika 13: Spreminjanje AOP vzorcev vina s komercialnim sevom CM v odvisnosti od časa zorenja	44
Slika 14: Spreminjanje AOP vzorcev vina s komercialnim sevom LVL1+LVL2 v odvisnosti od časa zorenja	44
Slika 15: Spreminjanje AOP vzorcev vina z dodanim komercialnim sevom D254 v odvisnosti od časa zorenja	45
Slika 16: Spreminjanje antioksidativnega potenciala vina glede na dodatek trsk iz hrastovega lesa.....	47

Slika 17: Zveza med skupnimi fenolnimi spojinami in AOP vin sorte laški rizling in sauvignon ob različnih časih vzorčenja med zorenjem vina na drožeh.....	48
Slika 18: Zveza med skupnimi fenolnimi spojinami in AOP vin sorte laški rizling ob različnih časih vzorčenja med zorenjem vina na drožeh	49
Slika 19: Zveza med skupnimi fenolnimi spojinami in AOP vin sorte sauvignon ob različnih časih vzorčenja med zorenjem vina na drožeh	50
Slika 20: Spreminjanje povprečne vrednosti znotrajcelične oksidacije s časom zorenja posebej za vino sorte laški rizling (LR) in sauvignon (SAU) ter z ali brez dodatka trsk iz hrastovega lesa.....	53
Slika 21: Zveza med AOP vina in znotrajcelično oksidacijo vinskih droži	55
Slika 22: Mikroskopski pregled droži vzorca 2 pri 1000x povečavi	56
Slika 23: Mikroskopski pregled droži vzorca 19 pri 1000x povečavi	56
Slika 24: Mikroskopski pregled droži vzorca 13 pri 1000x povečavi	57
Slika 25: Mikroskopski pregled droži vzorca 30 pri 1000x povečavi	57
Slika 26: Mikroskopski pregled droži vzorca 35 pri 1000x povečavi	58

KAZALO PRILOG

Priloga A: Osnovni fizikalno-kemijski parametri mošta sorte sauvignon in mošta sorte laški rizling, letnika 2015, dobljeni z WineScan (WSC) analizo na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica

Priloga B1: Dodana enološka sredstva (suhe aktivne kvasovke, komercialna hranila in trske iz hrastovega lesa) moštu sorte laški rizling

Priloga B2: Dodana enološka sredstva (suhe aktivne kvasovke, komercialna hranila in trske iz hrastovega lesa) moštu sorte sauvignon

Priloga C1: Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L) ob različnih časih vzorčenja (od t_1 do t_6) med zorenjem vina na drožeh

Priloga C2: Antioksidativni potencial vina (mmol/L) ob različnih časih vzorčenja (od t_1 do t_6) med zorenjem vina na drožeh

Priloga C3: Antioksidativni potencial droži (PF/OD) ob različnih časih vzorčenja (od t_1 do t_6) med zorenjem vina na drožeh

Priloga D1: Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L) ob različnih časih vzorčenja med zorenjem vina laški rizling na drožeh

Priloga D2: Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L) ob različnih časih vzorčenja med zorenjem vina sauvignon na drožeh

Priloga E1: AOP vina (mmol/L) sorte laški rizling ob različnih časih vzorčenja tekom zorenja na drožeh

Priloga E2: AOP vina (mmol/L) sorte sauvignon ob različnih časih vzorčenja tekom zorenja na drožeh

Priloga F: Test medsebojne primerjave neodvisnih spremenljivk (časa zorenja, sorte vina in dodatka trsk) na neodvisno spremenljivko – AOP vina

Priloga G1: Znotrajcelična oksidacija vinskih droži (PF/OD) tekom zorenja vina laški rizling na drožeh

Priloga G2: Znotrajcelična oksidacija vinskih droži (PF/OD) tekom zorenja vina sauvignon na drožeh

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

°Brix	stopinja Brix (enota sladkorne stopnje mošta)
AF	alkoholna fermentacija
AK	aminokislina
AOP	antioksidativni potencial
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. Deoxyribonucleic Acid)
FAN	prosti aminokislinski dušik (ang. Free Amino Nitrogen)
FC	reagent Folin-Ciocalteu
FRU	fruktoza
GAE	ekvivalent galne kisline (ang. Gallic Acid Equivalent)
GLU	glukoza
GSH	glutation
HT	visoka stopnja ožganosti (ang. Heavy Toasted)
KHT	kalijev hidrogentartrat
LR	laški rizling
MT	srednja stopnja ožganosti (ang. Medium Toasted)
OD	optična gostota (ang. Optical Density)
PF	prirast fluorescence
RNA	ribonukleinska kislina (ang. Ribonucleic Acid)
SAU	sauvignon
WSC	ang. WineScan

1 UVOD

Fenolne spojine so ključne sestavine vina, ki prispevajo k značilnostim vina, kot so barva, trpkost in grenkoba. Delujejo kot antioksidanti z mehanizmi, ki vključujejo lovljenje prostih radikalov, kar lahko prepreči srčno-žilne bolezni in raka. Po zaužitju vina (predvsem rdečega) pride do povečanega antioksidativnega delovanja v človeškem telesu (Serafini in sod., 1998). Bela vina vsebujejo manjše koncentracije skupnih fenolnih spojin (med 200 in 500 mg/L) kot rdeča vina zaradi pomanjkanja rdeče obarvanih antocianinov. V belih vinih se v največjem deležu nahajajo hidroksicimetne kisline (Kilmartin, 2010).

Drug tradicionalen način zaščite vina pred oksidanti predstavlja zorenje vina na drožeh. Zorenje vina na drožeh je tradicionalna enološka praksa, pri kateri se vino po zaključeni alkoholni fermentaciji pretoči v sode ali v nerjaveče cisterne skupaj z drožmi, kjer zori več mesecev. Med zorenjem vina je potrebno redno mešanje in dvigovanje droži («batonnage»). V Burgundiji poteka zorenje belih vin že tradicionalno na drožeh, v zadnjih letih pa je prišlo do razmaha popularnosti tega postopka tudi po drugih regijah in prav tako se uveljavlja zorenje rdečih vin na drožeh. Primarni razlogi za zorenje vin na drožeh se ponavadi navezujejo na povečano zaokroženost in polnost okusa tako pridelanih vin, na poudarek telesa vina in na povečanje kompleksnosti arome. Med zorenjem vina na drožeh se sproščajo polisaharidi, dušikove spojine ter maščobne in nukleinske kisline. Manoproteini imajo vlogo tudi pri stabilizaciji vina proti beljakovinski motnosti, zavirajo tartratno kristalizacijo in zmanjšujejo grenkost in trpkost vin (Charpentier, 2010).

1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je bil spremljanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin in antioksidativnega potenciala vina med zorenjem vina na drožeh. Iskali smo korelacijo med antioksidativnim potencialom vina in vsebnostjo fenolnih spojin. Želeli smo tudi poiskati zvezo med antioksidativnim potencialom vina in antioksidativnim potencialom droži neposredno po zaključeni alkoholni fermentaciji belega vina in po določenih časih zorenja vina na finih drožeh. Vinske droži naj bi imele zaščitno vlogo pri oksidaciji fenolnih spojin med zorenjem vina, ker prav tako predstavljajo vezavna mesta za kisik in tako tekmujejo s fenolnimi spojinami kot substrat.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- predpostavljamo, da bo večja vsebnost fenolnih spojin prispevala k večji vrednosti antioksidativnega potenciala (AOP) vina;
- pričakujemo, da bo dodatek trsk iz hrastovega lesa vzorcem mošta v predfermentativni fazi prispeval k večji vrednosti AOP vina;
- predvidevamo, da bosta AOP vina in vinskih droži ob zaključku alkoholne fermentacije največja in da se bosta s časom zorenja postopoma zmanjševala;
- pričakujemo pozitivno korelacijo med antioksidativnim potencialom droži in AOP vina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZORENJE VINA NA DROŽEH ALI »SUR LIES« TEHNOLOGIJA

O zorenju vina na drožeh govorimo, ko je po zaključeni alkoholni fermentaciji izpuščeno čiščenje vina. Tradicionalno so samo izbrana bela vina – večinoma so prihajala iz Burgundije – in peneča vina (pridelana po tradicionalni metodi) zorela na drožeh. Dandanes pa je zorenje vina na drožeh razširjeno že po vseh vinogradniških območjih in se vedno več vinogradnikov odloča za to metodo (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002).

Polisaharidi, dušikove spojine ter maščobne in nukleinske kisline se sproščajo med zorenjem vina na drožeh zaradi avtolize kvasnih celic. Manoproteini lahko stabilizirajo vino proti beljakovinski motnosti, zavirajo tartratno kristalizacijo in zmanjšujejo grenkobo in trpkost (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002).

Problemi, ki nastanejo pri zorenju belih vin na drožeh v sodih, so povezani s pojavom reduktivnega vonja. Reduktivno delovanje droži ni izenačeno z difuzijo kisika skozi vino, zato pride do nastanka reduktivne arome. Da bi se izognili reduktivnemu delovanju droži, vinarji ločijo vino od droži in ga pretočijo v sode, kjer ga premešavajo 1-2 meseca, nato pa mu dodajo droži nazaj (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002).

2.1.1 Definicija in sestava droži

Po definiciji EEC regulative št. 337/79 so vinske droži ostanek, ki ga najdemo na dnu posode z vinom po zaključeni alkoholni fermentaciji med skladiščenjem ali po odobrenih postopkih, ali so definirane kot ostanek, ki je bil pridobljen s filtracijo ali centrifugiranjem vina (Council ..., 1979).

Vinske droži predstavljajo v glavnem kvasne celice, ki so nastale med alkoholno fermentacijo, ki so pomešane še s kristali vinskega kamna, bakterijami in nekaterimi rastlinskimi materiali. Sestava droži je variabilna in je odvisna od trajanja posedanja droži. Težke ali grobe droži so delci, ki se v vinu brez pektina (sicer je onemogočeno bistrenje in usedanje) usedejo na dno posode v 24-ih urah. Njihova velikost je od 100 μm do 2 mm. Lahke ali fine droži so delci, ki ostanejo suspendirani 24 ur po tem, ko je bilo vino premešano ali pretočeno. Velikost finih droži je od 1 μm do manj kot 50 μm (Charpentier, 2010).

Preglednica 1: Sestava vinskih droži (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a)

Sestava	Delež (%)
Skupni nevtralni polisaharidi	71,9
Skupni dušik	2,6
Pepel	5,5
Kisli polisaharidi	5,2
Lipidi	7,8

Preglednica 1 prikazuje splošno sestavo vinskih droži, ki je še ne poznamo dovolj podrobno. V glavnem jih sestavljajo esencialni netopni polisaharidi (celuloza, hemiceluloza, pektin) in relativno majhen delež dušikovih spojin, esencialnih netopnih proteinov, ki jih droži ne morejo izkoristiti. Vsebujejo tudi mineralne soli in značilno količino lipidov – večinoma se ti nahajajo v celičnih membranah. Lipidna frakcija je sestavljena iz nekoliko večjega deleža nenasičenih kot nasičenih maščobnih kislin. Glavne maščobne kisline, ki sestavljajo droži, so linolenska kislina (C18:2), palmitinska kislina (C16:0) in oleinska kislina (C18:1) (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

2.2 AVTOLIZA KVASOVK

Izraz »avtoliza« je prvič uporabil Salkowski leta 1875, prve biokemijske osnove avtolize pekovskih kvasovk pa so bile objavljene leta 1950 (Charpentier, 2010).

Avtoliza je izraz, ki opisuje vrsto reakcij, ki se pojavijo v odmrlih kvasnih celicah (celice, ki so izgubile sposobnost rasti). Avtoliza kvasovk je definirana kot hidroliza intracelularnih biopolimerov z endohidrolazami, kar vodi v celično smrt in nastanek nizkomolekularnih produktov. Najprej pride do sproščanja hidrolitičnih encimov in njihovih substratov zaradi motenj delovanja celične membrane in lizosoma. Ti aktivirani encimi reagirajo z intraceličnimi polimeri, zaradi česar pride do akumulacije hidroliziranih produktov v periplazemskem prostoru. V zaključni fazi se molekularna masa hidrolitskih produktov zmanjša, tako da so ti produkti dovolj majhni, da lahko difundirajo iz celice v ekstracelularno okolje. Tudi komponente celične stene (glukani in manoproteini) se razgradijo in tako se poveča velikost por, kar še dodatno olajša prehod produktov avtolize iz celice v zunanje okolje (Charpentier, 2010).

Razumevanje avtolize in njenih učinkov je še posebej pomembno pri vinih, ki zorijo na kvasovkah dlje časa. Predvsem velja to za peneča vina, kot so šampanjci, ki morajo ostati v kontaktu z drožmi vsaj eno leto, da jih lahko tako poimenujemo (Charpentier, 2010).

2.2.1 Mehanizmi avtolize kvasovk

Avtolizo kvasovk razumemo kot litičen dogodek v kvasnih celicah. Avtoliza je ireverzibilen proces, do katerega pride zaradi delovanja znotrajceličnih encimov. Do procesa avtolize pride ob koncu stacionarne faze rasti in ga lahko enačimo s celično smrtjo.

Proces avtolize kvasovk se odvije v naslednjih korakih (Alexandre, 2011).:

- razgradnja notranjih celičnih struktur (lizosomov, citoplazemske membrane, ostalih organelov), ki vodi v sproščanje vakuolarnih proteaz v citoplazmo,
- hidroliza znotrajceličnih polimernih komponent in akumulacija produktov hidrolize v prostor, ki je omejen s celično steno,
- sproščanje produktov hidrolize, ki imajo dovolj majhno molekulsko maso, da prehajajo skozi pore celične stene
- nadaljnja avtolitična razgradnja komponent v zunajceličnem okolju s kvasnimi encimi.

Mehanizem avtolize kvasovk velja splošno za večino avtolitičnih procesov, vendar še vedno obstaja razlika med t.i. »naravno« in inducirano (umetno sproženo) avtolizo. Slednja je v široki uporabi za razne industrijske aplikacije, npr. kvasni ekstrakti kot ojačevalci arome, in v izolaciji znotrajceličnih encimov. Kvasni avtolizati se dodajajo tudi v gojišča za rast mikroorganizmov, ker so bogati z vitamini in aminokislinami. Inducirana avtoliza se uporablja v industrijskih procesih in je umetno povzročena s pomočjo fizikalnih (dvig temperature, izmenično zamrzovanje in taljenje, osmotski tlak), kemijskih (pH, detergenti, antibiotiki) in bioloških dejavnikov (aeracija in stradanje) (Alexandre, 2011).

Proces avtolize lahko poteče zelo hitro, od 48 do 72 ur, odvisno od izbranega povzročitelja avtolize. Nasprotno pa poteka »naravna« avtoliza znatno počasneje, ker so razmere med zorenjem vina na drožeh daleč od optimalnih. Optimalna temperatura za potek avtolize je 45 °C, optimalna vrednost pH pa 5. Med zorenjem vina na drožeh se giblje vrednost pH med 3 in 4, temperatura je 15 °C in vsebnost etanola približno 12 vol. %. Razlike v razmerah se odražajo v različnih kvasnih avtolizatih (Alexandre, 2011).

2.2.1.1 Proteoliza

Kvasna celica vsebuje širok nabor hidrolitičnih encimov, od katerih so najbolj proučevane proteaze, ki imajo ključno vlogo pri avtolizi kvasovk. Glavni encim, ki povzroča proteolizo med avtolizo kvasovk, je proteaza A. Deluje pri pH vina in sprošča kar 85 % skupnega dušika – pride do povečane vsebnosti dušikovih spojin v vinu. Proteaza A je endopeptidaza, ki odceplja visok delež peptidov (Alexandre in sod., 2001).

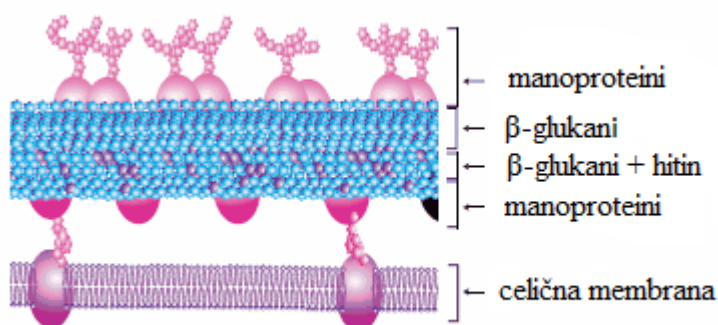
Kvasne celice v stacionarni fazi rasti in celo po celični smrti ohranijo β -glukanazno aktivnost v celičnih stenah in to tudi do nekaj mesecev po zaključeni alkoholni fermentaciji (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

Proteoliza ima direkten učinek na spremembo rigidne strukture celične stene med avtolizo kvasovk. Transformacija celične stene se dogaja prvih šest mesecev zorenja na drožeh in se odraža v izginjanju notranje plasti celične stene. Polisaharidi v zunanji plasti celične stene se začnejo spreminjati znatno kasneje, med osmimi in enajstimi leti (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002).

Med avtolizo kvasovk se medij – vino – bogati s komponentami, ki se sicer nahajajo v celični steni in se zaradi hidrolitične aktivnosti sproščajo iz kvasovk. Avtoliza kvasnih celic vodi do sproščanja celičnih proteinov, nukleinskih kislin, lipidov in polisaharidov, kar vodi do zmanjšanja celotne biomase (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002).

2.2.1.2 Razgradnja celične stene

Celična stena kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* predstavlja 20-30 % suhe celične mase. Večinoma je sestavljena iz manoproteinov, β -glukanov (β -1,3- in β -1,6-glikozidne vezi) in hitina, ki predstavljajo 85-90 % suhe mase celične stene in so med seboj povezani s kovalentnimi in nekovalentnimi vezmi. Glukani se nahajajo na zunanji plasti celične stene, medtem ko so manoproteini vstavljeni v to plast in prekrivajo sloj glukanov (Alexandre, 2011).



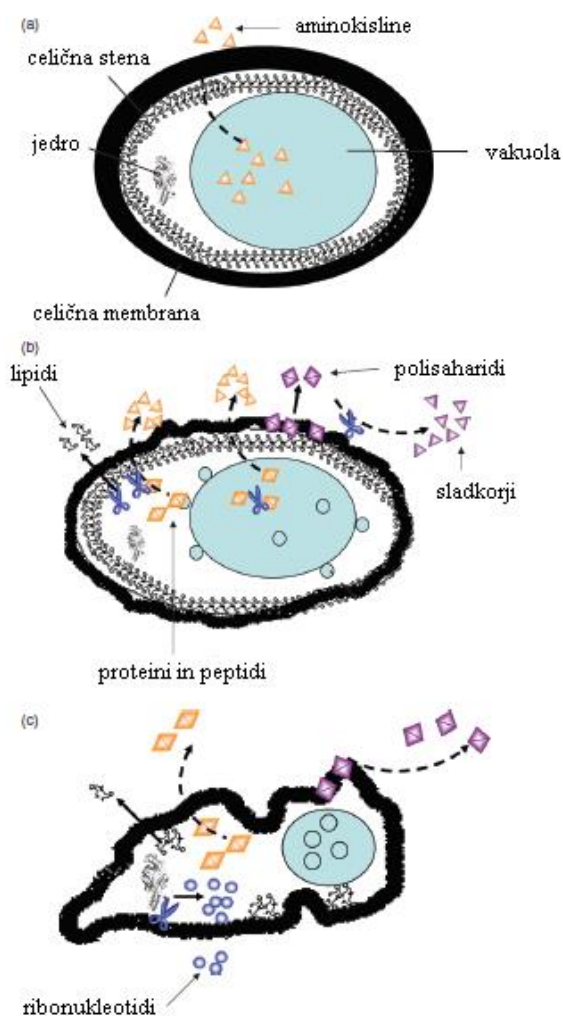
Slika 1: Struktura celične stene kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* (McClanahan, 2009)

Sestava celične stene je odvisna od dostopnosti hranil in od starosti celice. Razmerje glukanov v celični steni se poveča glede na količino sladkorja v mediju. Celične stene starejših celic imajo več glukanov in hitina ter manj manoproteinov. Zaradi tega so tudi bolj odporne na fizikalne in encimske dejavnike, ki bi jih lahko razgradili (Alexandre, 2011).

β -glukanaze, pri katerih ločimo endo- in eksoglukanaze, hidrolizirajo β -O-glikozidne vezi verige β -glukanov, pri čemer se sproščajo glukoza, oligosaharidi in manoproteini, ki so vpeti v celično steno ali kovalentno vezani na β -glukane. Iz celične stene kvasovk se med avtolizo zaradi proteolitske aktivnosti sproščajo aminokisline. Poleg aminokislin se z razgradnjo celične stene sproščajo še druge molekule. Proteaze in glukanaze sicer razgradijo celično steno, a vseeno ne pride do propada celične stene (Alexandre, 2011).

Razgradnjo celične stene lahko na kratko povzamemo v treh fazah (Alexandre, 2011):

- v prvi fazi glukanaze hidrolizirajo glukane in pri tem pride do sproščanja manoproteinov, vpetih ali kovalentno vezanih na glukane,
- v drugi fazi pride do sprostitve glukanov zaradi še vedno aktivnih glukanaz ali glukanaz, ki se nahajajo v mediju,
- v tretji fazi se s proteolitično aktivnostjo razgradi proteinska frakcija manoproteinov.



Slika 2: Shematična predstavitev morfoloških in biokemijskih sprememb v kvasni celici med avtolizo (Alexandre, 2011)

Slika 2 prikazuje shematično predstavitev morfoloških in biokemijskih sprememb v kvasni celici med avtolizo (v penečih vinih). Na začetku (a) so po končani sekundarni fermentaciji kvasne celice podaljšane in ovalne oblike. Celična stena je debela in gladka. Večji del prostora znotraj celice zavzema vakuola, ki je obdana s sferičnimi telesci. Po 3-6 mesecih (b) se celica in vakuola vidno zmanjšata. Sferična telesa se razporejajo ob vakuoli in prehajajo vanjo. Celična stena je hrapava in pojavljajo se majhne razpoke v celični steni. Po 9-12 mesecih (c) se celica pogrezne vase, kar se odraža še v manjši velikosti celice. Celična stena ostaja cela, vendar ima številne brazde in gube. Kvasne celice v tej fazi izgubijo velik del vsebine citoplazme (Alexandre, 2011).

Celična stena kvasovk, ki so bile gojene v sintetičnem mediju v 24-ih urah, je debela in brez gub ter jo zlahka razlikujemo od celične membrane. Po poteku avtolize se kvasne celice pomanjšajo in njihova površina je bolj nagubana in brazdasta. Gubasta zunanja plast nastane zaradi plazmolize, ki poteče zaradi povečanja velikosti vakuole zaradi raztapljanja vsebine citoplazme (Alexandre, 2011). Martinez-Rodriguez in sod. (2001) so primerjali strukturne in ultrastrukturne spremembe v kvasnih celicah med avtolizo v modelnem vinu in v penečih vinih. Po 24-urni inkubaciji v modelnem vinu so kvasne celice izgubile večino vsebine citoplazme in imele povečano vakuolo, medtem ko so kvasovke, na katerih je zorelo peneče vino, še vedno obdržale večji del citoplazemske vsebine in vakuola se je skrčila. Iz tega so sklepali, da razmere avtolize med zorenjem penečih vin na drožeh niso optimalne.

2.2.2 Dejavniki, ki vplivajo na potek avtolize kvasovk

2.2.2.1 Temperatura

Avtoliza kvasnih celic, ki poteče spontano, se zgodi zaradi katabolizma in odmrtnosti kvasnih celic. Takšna avtoliza je drugačna od inducirane avtolize, ki jo lahko sprožimo z zvišanjem temperature, z dodajanjem snovi, ki pospešijo plazmolizo oziroma porušijo integriteto celične membrane, ali pa z aktivacijo litičnih encimov (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002).

Avtolizo lahko sprožimo s povečanjem temperature, zaradi česar se poveča tudi aktivnost encimov, ki so vključeni v proces avtolize. Če dosežemo kritično točko, pride do denaturacije encimov. Razgradnja notranjih celičnih struktur in aktivacija litičnih encimov je odvisna od temperature. Optimalna temperatura za delovanje proteaz je 60 °C, medtem ko je za delovanje nukleaz 70 °C. Ti optimalni vrednosti temperature pa sta zaradi snovi, ki pospešujejo plazmolizo (prisotnost etanola, lecitina...), znižani. Optimalni temperaturi za potek avtolize bi torej bili med 45 in 60 °C pri pH vrednosti 5, kar pa je v vinarstvu nemogoče doseči (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002).

Da bi ugotovili vpliv temperature na avtolizo, so Feuillat in sod. (1982) spremljali količino dušika, ki so ga sprostile kvasovke. Več sproščenega dušika je nastalo pri povišani temperaturi. Dušik se po izpostavitvi vina temperaturi 55 °C za 4 ure ni več sproščal, medtem ko se je pri nižjih temperaturah sproščal dlje časa. To je zaradi inhibicije encimskega delovanja pri višjih temperaturah (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002).

2.2.2.2 Ostali dejavniki

Tudi nekateri kemijski dejavniki lahko pospešijo proces avtolize. To so (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002):

- vrednost pH: pri nižji vrednosti pH se znotrajcelične komponente sproščajo intenzivneje kot pri višji vrednosti pH,
- ionska sestava medija: kalcij in magnezij pospešita proces avtolize pri 30 °C,
- vsebnost etanola: proteoliza poteka v večji meri v vinu z 10 vol. % etanola kot v vinu z 12 vol. % etanola.

Tudi preveč intenzivna aeracija in pomanjkanje dušika ali energije v mediju lahko ovirajo strukturne in funkcionalne celične procese in tako pospešijo proces avtolize (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002).

2.2.3 Kvasni avtolizati

2.2.3.1 Nastanek dušikovih spojin med avtolizo

Dušikove spojine so eden glavnih produktov, ki nastanejo med avtolizo vinskih droži. Okoli 50 % dušika, prisotnega v kvasovkah, lahko z difuzijo prehaja v ekstracelularno okolje pri optimalni vrednosti pH 5-6. Proteini in peptidi, ki se sproščajo med avtolizo, so hidrolizirani in produkt hidrolize so proste aminokisline. Sproščanje dušikovih spojin je odvisno od znotrajcelične proteolitske aktivnosti, ki zavisi od seva kvasovke in od rastnega medija (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002).

2.2.3.2 Manoproteini

Manoproteini predstavljajo 25-50 % celične stene kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Vsebnost in količina sproščenih manoproteinov v vino je odvisna od seva kvasovke (Butzke, 2010).

Vidal in sod. (2003) ocenjujejo, da je od celotnih polisaharidov v rdečih vinih približno 35 % manoproteinov. Koncentracija manoproteinov v vinih je približno od 100 do 150

mg/L. Njihova velikost je spremenljiva in se razteza od 5000 do več kot 800000 daltonov; hidrolizirajo jih lahko encimi α -manozidaze in proteaze, pri čemer se sproščajo majhni peptidomanani v vino.

Zaželenne komponente, ki se sproščajo med zorenjem na drožeh, dajejo vinu aromo po praženih lešnikih, toastu in pečenemu mesu, prav tako pa manoproteini (makromolekularne kombinacije sladkorjev in proteinov v celičnih stenah kvasovk) prispevajo k bolj zaokroženi celokupni senzorični kakovosti, polnosti vina. Manoproteini lahko vežejo tanine iz novih hrastovih sodov ter tako zmanjšujejo trpkost in oksidativno rožnato obarvanje belih vin. Njihova koloidna narava lahko poveča tartratno stabilnost. Vina, pri katerih je alkoholna fermentacija potekala v lesenih sodih, in so bila zorena na skupnih drožeh s tedenskim premešavanjem, so imela večjo koncentracijo manoproteinov. Razlika v koncentraciji se giblje med 150 in 200 mg/L (Butzke, 2010).

Naravno prisotne makromolekule, ki se obnašajo kot zaščitni koloidi, vsebujejo predvsem rdeča vina. Prisotne so v koncentracijah, pri katerih ovirajo potek tartratne kristalizacije, vendar je ne docela inhibirajo. Več let se je trud vlagal v čiščenje in filtracijo vin z namenom, da bi se te koloide odstranilo, ker naj bi zmanjševali učinkovitost doseganja fizikalne stabilnosti npr. hladne stabilizacije. Večina suhih belih vin v Bordeaux-u, zorena na drožeh, je bila nestabilnih v mesecu marcu po prvi zimi, so pa postala stabilna junija ali julija brez kakršnih koli nadaljnjih tretiranj. V kolikor ta ista vina niso zorela na drožeh, je morala poteči hladna stabilizacija zaradi zaščite pred tartratno kristalizacijo. Ker se je že takrat vedelo, da se bela vina med zorenjem na drožeh obogatijo z manoproteini, so sklepali, da te makromolekule prispevajo k tartratni stabilizaciji vina (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b).

Manoproteinski preparati, *in vitro* pridobljeni iz celičnih sten kvasovk s pomočjo β -(1-3)- in β -(1-6)-glukanaz (GlucanexTM preparat), se lahko v vinarstvu uporabljajo za lažje izvajanje filtracije pri vinih, okuženih s plesnijo vrste *Botrytis cinerea*. Ti preparati inhibirajo tartratno kristalizacijo v belih, rdečih in rosé vinih, medtem ko enak dodatek (25 g/hL) manoproteinov, ekstrahiranih s pomočjo toplote, nima stabilizacijskega učinka (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b). Podobno lahko tartratno kristalizacijo belih, rdečih in rosé vin zavirajo tudi drugi visoko glikozilirani manoproteini z molekulsko maso približno 40 kDa (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002).

Preglednica 2: Tartratna stabilnost belih vin z dodatkom preparata Mannostab™ (g/hL), določena z vizualnim pregledom kalijeve hidrogentartratne kristalizacije in s spremembo koncentracije kalijevega K⁺ iona (ΔK^+) znotraj šestih dni pri temperaturi 4 °C (Moine-Ledoux in sod., 1997)

Vina	Test	Dodatek Mannostab™ (g/hL)				
		0	15	20	25	30
1996 Blanc de Blancs	Vizualni test	+	0	0	0	0
	ΔK^+ (mg/L)	52	72	17	0	0
Belo namizno vino	Vizualni test	+	0	0	0	0
	ΔK^+ (mg/L)	104	53	33	0	0
1996 beli Bordeaux	Vizualni test	+	0	0	0	0
	ΔK^+ (mg/L)	62	21	0	0	21
1996 beli Graves	Vizualni test	+	+	0	0	0
	ΔK^+ (mg/L)	155	52	0	0	62

Moine-Ledoux in sod. (1997) so pri uporabi manoproteinskega preparata Mannostab™ opazili zaviralno delovanje na precipitacijo kalijevega hidrogentartrata (KHT). Količina dodanega preparata se je gibala od 15 g/hL do 25 g/hL, medtem ko dodatek 30 g/hL ni imel zaviralnega učinka na kristalizacijo KHT (preglednica 2). Za tartratno stabilizacijo vin so odgovorne komponente, ki se nahajajo v preparatu – to so visoko glikolizirani manoproteini, ki imajo molekulske mase 30-40 kDa (Marchal in Jeandet, 2010).

Doco in sod. (2003) so proučevali sprostitvev polisaharidov v vinu med zorenjem na drožeh, in opazili, da je zorenje na drožeh rezultiralo v encimski razgradnji polisaharidov, prisotnih v grozdju. Določili so tudi, da je sprostitvev manoproteinov med zorenjem vina progresiven in linearen pojav. Vendar samo kontakt vina z drožmi ni dovolj, da pride do sprostitve manoproteinov, potrebno je premešavanje oziroma dvigovanje droži (»batonnage«), pri čemer se značilno poveča količina makromolekul, ki se izločijo v vino.

Optimalni pogoji za ekstrakcijo manoproteinov iz celičnih sten kvasovk so pri vrednosti pH 7 in 38 °C; to pomeni, da toplejše temperature v kleti in višje vrednosti pH pripomorejo k večji ekstrakciji manoproteinov. Žal pa so ti parametri daleč od tistih, ki spremljajo zorenje belih vin na drožeh (Butzke, 2010).

Še bolj pomembno kot sam režim mešanja je dejanska količina droži v fermentorju. Povečanje kvasne biomase pred začetkom alkoholne fermentacije je direktno povezano z vsebnostjo dušika v grozdnem soku. Večja vsebnost dušika pomeni tudi več nastale kvasne biomase in s tem več manoproteinov, ki se lahko sprostijo v vino. Dodatki hranil za kvasovke lahko sicer povečajo tvorbo kvasne biomase, vendar lahko v primeru, da niso popolnoma porabljena, predstavljajo hrano nezaželenim mikroorganizmom kasneje med zorenjem vina (Butzke, 2010).

Usedanje droži v vinu ali v grozdnem soku je neodvisno od oblike in velikosti fermentorja. Kvasne celice s premerom 10 μm potrebujejo približno 24 ur, da padejo 1 m proti dnu v grozdnem soku, v primeru manj viskoznega vina pa potrebujejo 17 ur. V standardnem sodu, ki meri 66 cm v obe smeri, se bodo droži posedle v 16-ih urah v grozdnem soku ali v 11-ih urah v vinu. V 100000 L tanku, visokem 10 m, bo potekalo posedanje droži 10 dni ali najmanj en teden (Butzke, 2010).

Posedanje droži ima ogromen vpliv na privzem hranil pred alkoholno fermentacijo. Kvasne celice, ki sedimentirajo druga vrh druge, tekmujejo med sabo za hranila in lahko se zgodi, da ne dobijo dovolj hrane za rast ali za končanje fermentacije. Zelo hladni mošti ($< 15\text{ }^{\circ}\text{C}$) ali mošti z dodatkom več kot 100 mg/L SO_2 imajo podaljšano lag fazo, pri čemer se lahko kvasovke celo v večjem tanku povsem posedejo na dno (Butzke, 2010).

Skupki droži so pa pogosto tudi vir reduktivnih žveplovih vonjav, zato jih je potrebno redno dvigovati z mešanjem. Na ta način se izognemo encimski redukciji žveplovsebujočih spojin, kot so SO_2 , ki ga proizvajajo kvasovke, ali elementarno žveplo, ki se lahko tvori med pretokom in aeracijo vin, pri katerih je bil odstranjen vodikov sulfid (H_2S) (Butzke, 2010).

Zaradi ohranjene encimske aktivnosti kvasovk v stacionarni fazi ni priporočen dodatek SO_2 v prvih nekaj tednih zorenja belih vin na drožeh, ker bi ga encimi reducirali v H_2S . Po končani jabolčno-mlečnokislinski fermentaciji se vinu lahko doda SO_2 in se ga pusti na drožeh, ker nimajo več reduktazne aktivnosti (Butzke, 2010).

Poiskati je potrebno ravnotežje med reduktivnimi notami in oksidacijo, saj je večina arom po praženih lešnikih ali pečenemu mesu odvisna od sledov reduciranih žveplovih spojin, predvsem od estrov določenih merkaptanov. Med mešanjem droži in vmešavanjem majhnih količin kisika lahko manoproteini absorbirajo presežek merkaptanov (s tvorbo močnih disulfidnih vezi) ter jih tako odstranijo iz vina (Butzke, 2010).

Proces avtolize kvasovk in sproščanje njihovih aminokislin ter ostalih komponent se ne zgodi znotraj šestih mesecev do enega leta zorenja belih vin. Samo v penečih vinih, ki so starana več kot dve leti, ima avtoliza kvasovk precejšen prispevek k aromi vina; zanje so bolj značilne sadne note kot aroma po lešnikih ali toastu. Avtoliza kvasovk lahko vodi tudi do sproščanja presežka uree iz kvasnih celic v vino, kar povzroča nastanek nezaželenega etil karbamata (Butzke, 2010).

2.2.3.3 Lipidi

Bistrenje in čiščenje vina sta odgovorna za majhno vsebnost lipidov v vinih. Lipidi se sicer med zorenjem vina na drožeh sproščajo v vino, vendar je njihov prispevek minimalen v primerjavi z ostalimi komponentami. Vsebnost lipidov je odvisna od uporabljenega seva kvasovke (Pérez-Serradilla in sod., 2008).

Lipidi lahko vplivajo na aromo vina, saj se med zorenjem sproščajo maščobne kisline, ki povečajo vsebnost hlapnih kislin z nizkim senzoričnim pragom, kot so estri, ketoni in aldehidi (Pérez-Serradilla in sod., 2008). Pueyo in sod. (2000) so poročali o sprostitvi različnih lipidov v modelnem vinu med avtolizo treh komercialnih kvasovk vrste *S. cerevisiae*, in sicer je sprostitvev potekala v treh fazah: v prvi fazi so se lipidi sprostili v medij, v drugi se je zmanjšala koncentracija lipidov v avtolizatih in v tretji se je povečalo število živih celic. Povečanje števila živih celic lahko interpretiramo kot rast najbolj odpornih kvasnih celic, ki uporabljajo sproščeno biomaso avtoliziranih celic kot hranila. Lipidna sestava avtolizatov ni zajemala niti 1-monoacilglicerolov niti fosfolipidov. Odsotnost fosfolipidov v avtolizatih pripisujemo njihovi razgradnji; sterol estri in triacilgliceroli so se nahajali v avtolizatih v večji koncentraciji (1-5 mg/L), medtem ko je bilo prostih maščobnih kislin, sterolov, diacilglicerolov in monoacilglicerolov manj (100-600 µg/L).

2.2.3.4 Nukleinske kisline

Medtem ko je o razgradnji proteinov med avtolizo opravljenih veliko študij, so raziskave o hidrolizi RNA in DNA manj znane. RNA in DNA predstavljata 5-15 % in 0,1-1,5 % suhe celične mase (Pérez-Serradilla in sod., 2008).

V kakšnem obsegu bo potekla razgradnja DNA, je odvisno od vrste kvasovke. V avtolizatu je bila zaznana zelo majhna koncentracija DNA, kar kaže na aktivnost encima DNA-aze. Razgradnja DNA poteče ob prisotnosti več različnih encimov, produkt katerih so oligonukleotidi, nukleotidi in nukleozidi. V avtolizatu je največ deoksiribonukleotidov, kar nam pove, da so v proces razgradnje v glavnem vključene endo- in eksonukleaze. Med avtolizo pride do 55 % razgradnje skupne DNA s posledično sprostitvijo 3'- in 5'-deoksiribonukleotida. Nekateri deli DNA pa se kljub optimalnim pogojem za potek avtolize ne razgradijo (Pérez-Serradilla in sod., 2008).

RNA predstavlja več kot 95 % skupne vsebnosti nukleinskih kislin znotraj kvasnih celic, zato je tudi razgradnja RNA ključna pri avtolizi kvasovk. Zhao in Fleet (2005) sta poročala o več kot 95 % razgradnji celične RNA pod različnimi pogoji. Glavne komponente, ki so se sprostile, so bili 3'-, 5'- in 2'-ribonukleotidi (Pérez-Serradilla in sod., 2008).

2.2.3.5 Hlapne spojine

Po zaključeni alkoholni fermentaciji vodi avtoliza kvasovk do sprostitve številnih komponent v vino. Te komponente skupaj s hlapnimi spojinami, ki so nastale med vinifikacijo, tvorijo kompleksno aromo vina. Kontakt vina z drožmi lahko zmanjša vsebnost hlapnih spojin in posledično sadno aromo vin. Pomembna je količina droži in čas kontakta droži z vinom – večja količina droži pospešuje tvorbo estrov, kar celokupno izboljšuje kakovost vin, vendar lahko pride tudi do nastanka dolgoverižnih alkoholov in hlapnih maščobnih kislin. Njihov nastanek ima škodljiv vpliv na kakovost vina. Prisotnost droži tudi pomembno vpliva na kakovost vin pri staranju v lesenih sodih, kjer vpliva na razdelitev aromatskih komponent med vinom in lesom ter vpliva na celotno aromo vina. Največje tveganje zorenja vina na drožeh je pojav žveplovih spojin (Pérez-Serradilla in sod., 2008).

Vloga dolgoverižnih alkoholov v aromi vina je odvisna predvsem od njihove koncentracije. Pri majhni vsebnosti prispevajo h kompleksnosti aromatike vina, medtem ko pri velikih koncentracijah prekrijejo aromo vina zaradi poudarjenih vonjav. Bautista in sod. (2007) poročajo, da se koncentracija vseh alkoholov (razen 1-butanola, ki se med zorenjem vina zmanjša) povečuje s časom skladiščenja (najsi bo to zorenje v prisotnosti ali odsotnosti droži).

Estri dolgoverižnih alkoholov in etilni estri so hlapne komponente, ki imajo ključno vlogo pri sadnih notah vin. Koncentracija estrov v vinu se zmanjšuje z daljšim časom zorenja vina v prisotnosti drožeh (Pérez-Serradilla in sod., 2008).

Prisotnost srednjeverižnih maščobnih kislin je v vinu nezaželena. Prisotnost droži poveča koncentracijo maščobnih kislin v vinu, kar so Bueno in sod. (2006) pojasnili z desorpcijskim fenomenom, do katerega pride po zaključeni AF in nastane zaradi avtolize kvasovk (Pérez-Serradilla in sod., 2008).

2.3 FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI DROŽI

2.3.1 Ustvarjanje reduktivnega okolja

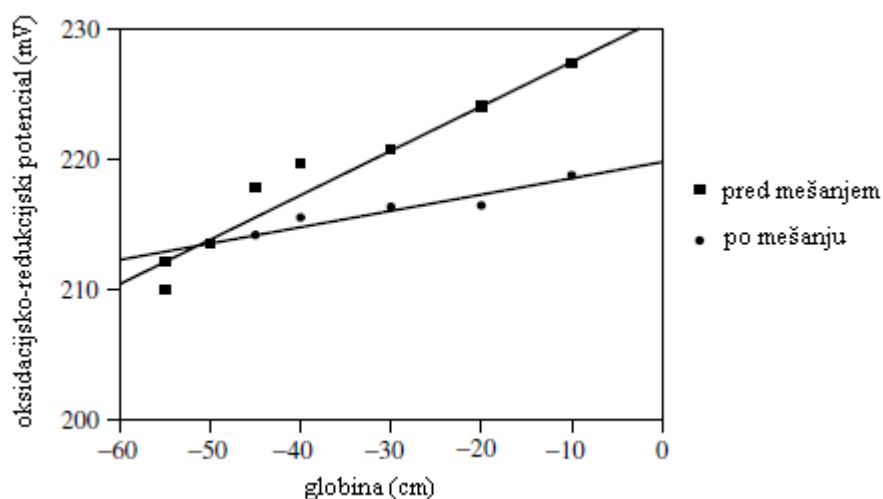
Ena izmed glavnih lastnosti droži je njihovo močno reduktivno delovanje, zato je potreben temeljit premislek o tem, ali izvesti zorenje vina na drožeh ali ne. V kolikor se vino pusti na celotni biomasi droži, se bodo prej ali slej pojavili nezaželeni reduktivni vonji. Le pri zorenju v lesenih sodih je možen podaljšan čas zorenja vina na drožeh, ker prihaja do minimalnega kontakta s kisikom. Vino pa mora biti kljub vsemu predhodno očiščeno s čistilnimi sredstvi in žveplano v primernih koncentracijah (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

Vinske droži lahko po zaključeni fermentaciji še vedno porabljajo znatne količine kisika in to vse do treh let in pol zorenja vina na drožeh pri temperaturi 14 °C. Sposobnost kvasovk, da porabljajo kisik, se zmanjša tekom zorenja vin na drožeh. Po odmrtnju kvasnih celic se kisik še vedno porablja, a za potek kemijskih reakcij, ki se odvijajo v vinu. Maksimalna količina porabljenega kisika je ocenjena na 4 mg/L pod specifičnimi pogoji (specifičen sev, medij in temperatura) med zorenjem vina na drožeh. Rezultati so pokazali, da je poraba kisika najbrž zaradi prednostnega napada kisika na lipide v celični membrani (Salmon in sod., 2000), kar spreminja strukturo celičnih membran.

Zorenje belih vin na drožeh lahko predstavlja probleme brez upoštevanja določenih ukrepov. Hitro lahko namreč pride do nezaželene tvorbe reduktivnih arom, zaradi česar je nujno potrebno mešanje droži. Z ustreznim čiščenjem in žveplanjem mošta lahko poteka zorenje vina v lesenih sodih brez težav dlje časa in ne pride do razvoja reduktivnih arom. Nasprotno pa se zgodi, če ločimo belo vino od droži in ga pretočimo v nove sode. V tem primeru pride do izgube sadnega karakterja vina in do razvoja oksidativne arome. Arome po vosku, kafri in smoli se še intenzivirajo med zorenjem vina v sodih. Iz tega je razvidno, da so droži nujno potrebne za pravilno zorenje suhih belih vin, saj delujejo kot reducenti (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

Bela vina imajo večji oksidacijsko-redukcijski potencial v lesenih sodih kot v cisternah iz nerjavnega jekla. Redoks potencial je znotraj soda največji na površini vina in se zmanjšuje od površine proti drožem na dnu soda. Zato vina, ki so zorena v cisternah velikega volumna, niso primerna za zorenje vina na drožeh, saj bi povzročila nastanek reduktivnih žveplovih spojin (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).

S starostjo sodov se izgubljajo njegove oksidativne lastnosti. Elagotanini se iz lesa starejših sodov sproščajo v manjših količinah, kar prispeva k stopnji oksidacije. Reduktivno okolje se posledično pogosteje ustvarja v uporabljenih sodih kot v novih. Mešanje oziroma dvigovanje droži homogenizira oksidacijsko-redukcijski potencial, kar lahko vidimo na sliki 3 (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a).



Slika 3: Vpliv mešanja na oksidacijsko-redukcijski potencial v zorenih belih vinih (Ribéreau-Gayon in sod., 2006a)

2.3.2 Interakcije med drožmi in fenolnimi spojinami

Fenolne spojine so ključne sestavine vina, ki prispevajo k značilnostim vina, kot so barva, trpkost in grenkoba. Povezava med fenolnimi spojinami in vinskimi drožmi izhaja iz dejstva, da lahko droži adsorbirajo fenolne spojine in jih skupaj z encimi (po avtolizi) sproščajo nazaj v vino. Manoproteini, ki se sprostijo med avtolizo kvasnih celic, lahko reagirajo s fenolnimi spojinami in s tem izboljšajo stabilnost barve vina in zmanjšujejo njegovo trpkost (Pérez-Serradilla in sod., 2008). Droži lahko modificirajo fenolni profil vin. Fenolne spojine se lahko podobno kot aromatične spojine adsorbirajo na droži. Celične stene kvasovk izkazujejo sposobnost vezanja flavan-3-ol derivatov in obarvanih spojin, ki nastanejo zaradi kondenzacije in oksidacije fenolnih spojin v belih vinih. Sposobnost kvasovk, da adsorbirajo fenolne spojine in predvsem neobarvane intermediate reakcij porjavenja, pripisujejo sterolom v membrani kvasovk. Zorenje vin na drožeh se zato lahko uporablja za preprečevanje reakcij porjavenja belih vin, pri čemer ne pride do spremembe senzoričnih lastnosti (Tao in sod., 2014).

2.3.3 Odstranitev nezaželenih komponent v vinu

Ohratoksin A (OTA) je kancerogeni mikotoksin in je produkt plesni rodov *Aspergillus* in *Penicillium*, ki se lahko pojavi tudi v moštih in vinih. Odstranimo ga lahko z dodatkom čistilnih sredstev, med katerimi sta bentonit in aktivno oglje najbolj učinkovita. Do značilne redukcije OTA je prišlo samo 90 minut po kontaktu vina z zelo majhno koncentracijo droži (20 g/L); po 7-dnevnem kontaktu je bila redukcija OTA že večja kot 70 % pri zorenju belega vina na drožeh in okoli 50 % pri zorenju rdečega vina. Pri še

daljšem kontaktu z drožmi ni več prišlo do izboljšanja rezultatov. Pri zorenju rdečih vin na drožeh prihaja do kompeticije med polifenoli in OTA zaradi istih vezavnih mest na površini kvasnih celic, zato je prišlo do slabše redukcije OTA (Pérez-Serradilla in sod., 2008).

Prisotnost 4-etilfenola in 4-etilgvajakola je posledica kontaminacije vina s kvasovkami rodu *Brettanomyces* in daje vonj po konjskem znoju, zdravilih in začimbah. Vsebnost 4-etilfenola in 4-etilgvajakola je bila manjša v vinih, ki so bila zorena na drožeh, kot v tistih, kjer so bile droži odstranjene (Pérez-Serradilla in sod., 2008).

2.3.4 Oksidativno rožnato obarvanje (ang. oxidative pinking)

Zorenje belih vin na drožeh pripomore tudi k preprečevanju rožnatega obarvanja. To se odraža v spremembi barve vina v sivo-rožnat odtenek kot posledica rahle oksidacije vina. Droži namreč lahko absorbirajo prekursorje molekul, ki so odgovorni za spremembo barve in na ta način zmanjšujejo verjetnost pojava rožnatega obarvanja (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002).

2.3.5 Adsorpcija tiolov na celične stene droži

Vinske droži imajo to sposobnost, da lahko povsem odstranijo določene hlapne tiole iz vina (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002). Fornairon-Bonnefond in sod. (2002) omenjajo v svojem delu eksperiment iz leta 1996, kjer sta Lavigne in Dubourdieu v modelne raztopine dodala droži ali njihove celične stene. Izkazalo se je, da so vinske droži popolnoma odstranile tiole (metan tiol in etan tiol). Med cisteini manoproteinov (nahajajo se v zunanjem delu celične stene kvasovk) in –SH skupinami hlapnih tiolov so se vzpostavili disulfidni mostički.

2.3.6 Vloga droži pri tartratni in beljakovinski stabilnosti

Z zorenjem vina na drožeh dosežemo tudi večjo stabilnost vin zaradi tartratne precipitacije in beljakovinske motnosti. Seveda se stabilnost proteinov v belih vinih izboljša, če so zoreni na drožeh v lesenih sodih. Mlada vina, ki jih pustimo na drožeh, imajo manjšo verjetnost, da postanejo ob izpostavitvi toplote motna. Poleg tega potrebujemo za doseg beljakovinske stabilnosti takih vin manjše količine bentonita (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b).

Proteini, ki so odgovorni za motnost v belih vinih, postanejo termostabilni v prisotnosti določenih koloidov, ki izvirajo iz celične stene kvasovk. Beljakovinska stabilnost takih vin

gre predvsem na račun prisotnosti proteinske frakcije, ki se pojavi zgolj med zorenjem vina na drožeh. Ta frakcija vsebuje 31,8 kDa manoprotein, MP32, ki je sestavljen iz 27 % proteina in 62 % manoze, in je del invertaze v celični steni kvasovke vrste *S. cerevisiae*. MP32 je termostabilen in stabilizira proteine v vinih, ki zorijo na drožeh. Med avtolizo kvasovk se MP32 sprošča iz celične stene zaradi delovanja glukanaz in proteaz iz vakuole celic (Fornairon-Bonnefond in sod., 2002). Molekulska masa MP32 je nižja kot molekulska masa invertaze (270 kDa). MP32 je fragment invertaze, ki se sprostí med avtolizo kvasovk med zorenjem vina na drožeh. Do sprostitve pride zaradi delovanja dveh encimov: glukanaze cepijo vezi, ki povezujejo invertazo na glukane celične stene, in proteaze, ki cepijo peptidne vezi invertaze (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b).

Izboljšanje beljakovinske stabilnosti pri zorenju belih vin na drožeh je odvisno od številnih parametrov, kot so dolžina zorenja vina v sodu, koncentracija droži, starost sodov in pogostost mešanja. Pri zorenju suhega belega vina sauvignon blanc na drožeh je bilo potrebno dodati manj kot 40 g/hL bentonita za stabilizacijo vina. Ob delni odstranitvi droži pred zorenjem je bil za dosego istega rezultata v istem vinu potreben dodatek 90 g/hL bentonita. Koncentracija MP32 v vinih, pri katerih so bile delno odstranjene droži, je znašala 10 mg/L, medtem ko je bila v vinih brez odstranitve droži 18 mg/L. Boljšo beljakovinsko stabilnost lahko dosežemo s pogostim mešanjem in z uporabo rabljenih sodov (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b).

Zaviralni učinek manoproteinov iz celičnih sten kvasovk na tartratno kristalizacijo ni zaradi komponente MP32, ki je odgovorna za beljakovinsko stabilizacijo, temveč zaradi visoko glikoziranih manoproteinov s povprečno molekulkso maso 40 kDa (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b).

2.4 OKSIDATIVNI STRES KVASOVK VRSTE *Saccharomyces cerevisiae*

Posamezne celice kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae* imajo omejeno sposobnost podvojevanja in zato predstavljajo stacionarne kulture kvasovk zanimiv model za študije procesa staranja. Ko celica kvasovke vstopi v stacionarno fazo, se razmnoževanje ustavi in celični metabolizem se upočasni. Celice lahko v takšnem stanju preživijo več tednov ali mesecev brez hranil (Jakubowski in sod., 2000).

Poraba kisika v moštu se v prvih nekaj minutah eksponentno večja zaradi metabolne aktivnosti kvasovk. Na koncu alkoholne fermentacije prevzamejo glavno vlogo pri porabi kisika fenolne spojine. Poraba kisika se izkazuje kot blaga oksidacija membranskih lipidov vinskih droži, ki vodi do nastanka lipidnih peroksidov in nadaljnjih produktov, ki vplivajo na senzorične lastnosti vina (Salmon in sod., 2000).

Pri primerjavi 5-dnevne kulture kvasovk vrste *S. cerevisiae* po zaključeni alkoholni fermentaciji in kulture kvasovk, na kateri so vina zorela 3 mesece, je bila pri slednji zaznana večja tvorba reaktivnih kisikovih zvrsti, zmanjšana aktivnost superoksid dismutaze, manjša vsebnost antioksidanta glutaciona in povečana vsebnost karbonilov. Ti rezultati nakazujejo na pojav oksidativnega stresa, ki nastane med zorenjem vina na stacionarnih kulturah kvasovk (Jakubowski in sod., 2000).

Oksidativni stres stacionarnih kultur kvasovk je posledica povečane akumulacije kisika v celicah zaradi upočasnjene metabolizma. Metabolno aktivne celice intenzivno porabljajo kisik, kar se odraža v majhni koncentraciji kisika znotraj celic. Pri stacionarnih kulturah pa je metabolizem znatno oslavljen in zato je koncentracija kisika znotraj celic večja. Mitohondrijska respiracija je največji vir reaktivnih kisikovih zvrsti (RKZ) v teh pogojih. Alternativen vir RKZ je tudi citoplazma, ki še dodatno prispeva k oksidativnim poškodbam celice. Kvasovke, ki vstopajo v stacionarno fazo rasti, imajo povečano vsebnost endogenih antioksidantov (superoksid dismutaza, glutation reduktaza) kot odgovor na povečano možnost za oksidativni stres (Jakubowski in sod., 2000).

Salmon in sod. (2000) so preučevali interakcijo med kisikom in drožmi med simulacijo zorenja vina na drožeh. Izkazalo se je, da nekateri membranski lipidi podležejo blagi oksidaciji med periodičnim mešanju droži in ponavljajočim dodatkom majhnih količin kisika. Te oksidacijske reakcije vodijo do nastanka lipidnih peroksidov in do tvorbe neznanih končnih produktov. Ti v glavnem nastanejo zaradi tvorbe RKZ, kar nakazuje na zmožnost droži, da porabljajo kisik med zorenjem vina. Lipidne oksidacije znotraj celične membrane so odgovorne za poškodovano in nefunkcionalno membrano.

Peroksidi so v glavnem lokalizirani v celični membrani. Nenasičene maščobne kisline membranskih lipidov in predvsem njihovi peroksidacijski produkti imajo osrednjo vlogo pri iniciaciji in propagaciji radikalnih reakcij v jedru membran kvasovk. Oksidacija lipidov in lipoproteinov se lahko v vsakem živem organizmu poveča z delovanjem prostih radikalov ali z lipooksigenazno aktivnostjo. Bakrovi ioni Cu^{2+} so znani kot katalizatorji pri reakcijah nastajanja prostih radikalov. Dodatek redoks-aktivnih kovin, kot je Cu^{2+} , je opazno povečal koncentracijo peroksidov v membranah droži (Salmon in sod., 2000).

V prisotnosti raztopljenega kisika (celo v zelo majhnih koncentracijah) je v vinu prišlo do nastanka prostih radikalov. Lovljenje prostih radikalov je v živih celicah kvasovk vrste *S. cerevisiae* povzročeno z encimskimi reakcijami, kot so delovanje Cu-, Zn- in Mn-superoksid dismutaze, celo v anaerobnem okolju. To encimsko delovanje vodi v nastanek peroksidov, ki so normalno odstranjeni z aktivnostjo katalaze in glutation peroksidaze. (Salmon in sod., 2000)

Nastanek RKZ bi lahko bil povezan tudi z aktivnostjo lipooksigenaz, vendar je specifično lipooksigenazno delovanje v anaerobnih celicah kvasovke vrste *S. cerevisiae* vprašljivo (Salmon in sod., 2000).

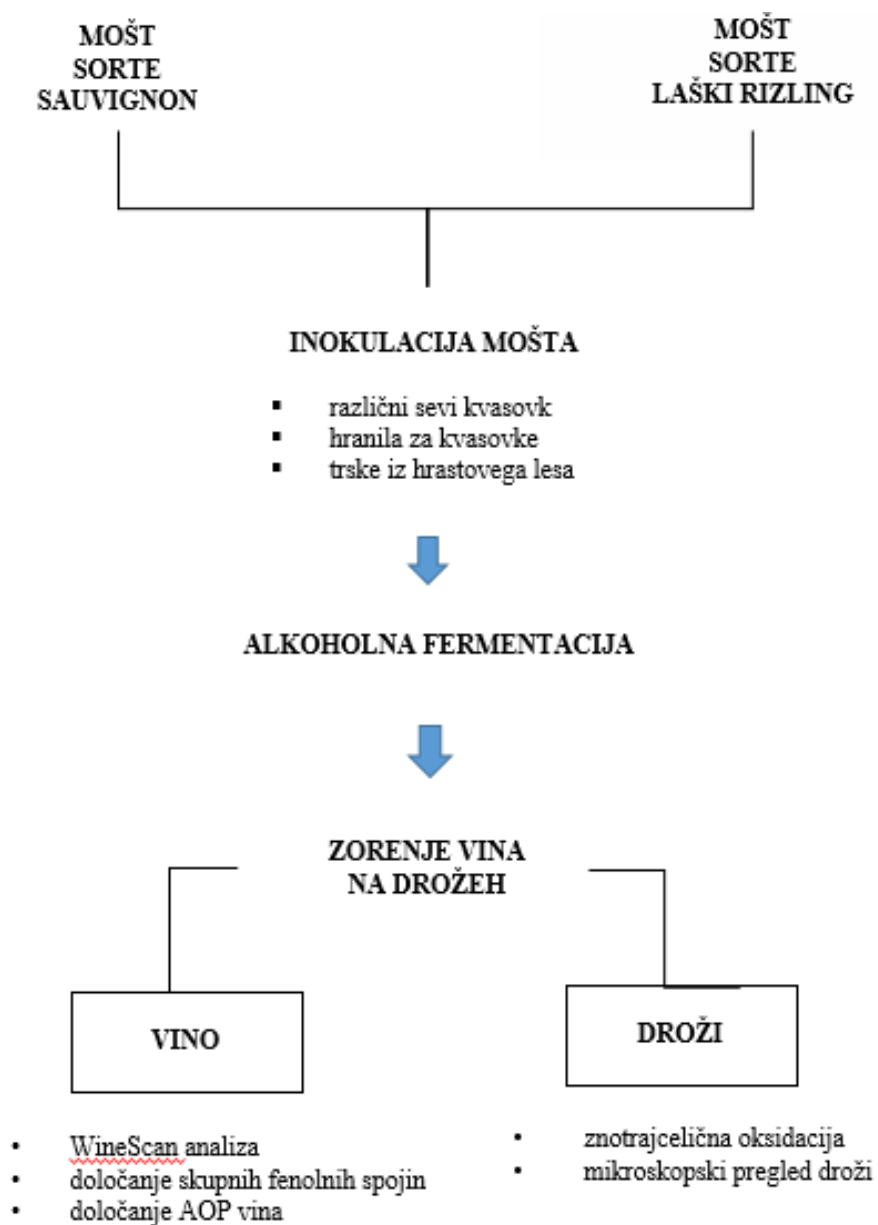
2.4.1 Vloga glutationa pri zorenju vin na drožeh

Glutation (GSH) je peptid z antioksidativnimi lastnostmi in je prisoten v grozdju in v moštu. Sestavljen je iz treh aminokislin: glutaminske kisline, cisteina in glicina. Kvasovke ga po zaključeni alkoholni fermentaciji sprostijo v vino. Vsebnost glutationa v vinu je odvisna od njegove začetne koncentracije v moštu in od uspešno izpeljane alkoholne fermentacije. V primeru zastoja AF se ne sprosti nič glutationa ali pa zelo majhna koncentracija (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b).

Med zorenjem vina na drožeh prihaja do neizogibnega zmanjševanja vsebnosti glutationa zaradi reagiranja s kisikom in z oksidiranimi fenolnimi spojinami (kinoni). V reduktivnih razmerah zorenja na drožeh (v uporabljenih sodih in pri zorenju na skupnih drožeh) se glutation bolje ohranja kot v oksidativnih (Ribéreau-Gayon in sod., 2006b).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ZASNOVA POSKUSA



Slika 4: Shematski prikaz poteka poskusa

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mošt

Za fermentacijski poskus smo uporabili mošta dveh belih vinskih sort, sauvignon in laški rizling, letnika 2015. Pred uporabo sta bila zamrznjena in nato segreta na sobno temperaturo. Vzorca moštov smo poslali na Kmetijsko gozdarski zavod Nova Gorica (KGZ NG), kjer so opravili fizikalno-kemijsko analizo. Podatki so zbrani v prilogi A.

Po končani alkoholni fermentaciji smo mlado vino skupaj z drožmi prelili v 0,5 L plastenke, kjer je nadalje 205 dni potekalo zorenje vina na drožeh v hladilnici na Biotehniški fakulteti pri 4 °C. Dodatek trsk iz hrastovega lesa v nekatere vzorce vina je predstavljal alternativo zorenju vina v lesenih sodih. Vzorčenje in analize so bile tekom zorenja vina na finih drožeh opravljene 6x, in sicer prvič 1 teden po zaključeni alkoholni fermentaciji (označeno s časom $t_1 = 0$), drugič ob času $t_2 = 14$ dni, $t_3 = 28$ dni, $t_4 = 48$ dni, $t_5 = 76$ dni in $t_6 = 205$ dni. Moštu in kasneje mlademu vinu ni bilo dodanega žveplovega dioksida (SO_2).

3.2.2 Enološka sredstva

V nadaljevanju je prikazano, katere suhe aktivne kvasovke, hranila za kvasovke in trske iz hrastovega lesa smo dodali posameznemu vzorcu. Ker iz preglednic ni razvidno, kateri vsi dodatki pripadajo določenemu vzorcu, so v prilogi B prikazana vsa uporabljena enološka sredstva za vsak posamezen vzorec.

3.2.2.1 Suhe aktivne kvasovke

Suhe aktivne kvasovke, uporabljene pri poskusu, so prikazane v preglednici 3. V večino vzorcev smo dodali suhe aktivne kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* za proizvodnjo belih vin, izjemoma smo še dodali v vzorec z oznako 16 kvasovko vrste *S. cerevisiae bayanus*, ki se uporablja za pridelavo penečih vin. V vzorce z oznakami 26, 27 in 30 smo dodali kombinacijo kvasovk vrste *Torulaspora delbrueckii* in *S. cerevisiae*, s katerima lahko posnemamo spontano alkoholno fermentacijo v kontroliranem okolju. Najprej smo inokulirali ne-*Saccharomyces* kvasovko vrste *Torulaspora delbrueckii*, po padcu sladkorne stopnje vzorca za 1,5-3 °Brix smo inokulirali še kvasovko vrste *S. cerevisiae*. Pri vzorcema z oznako 1 in 19 ni bilo dodatka suhih aktivnih kvasovk, zato je potekla spontana alkoholna fermentacija z endogeno kvasno mikrobioto.

Preglednica 3: Uporabljene komercialne suhe aktivne kvasovke

Oznaka vrelne steklenice	Komercialno ime za kvasovko	Vrsta kvasovk	Doziranje (g/hL)
2, 3, 4, 20, 21, 22	ICV Okay	<i>Saccharomyces cerevisiae cerevisiae</i>	25
5, 23, 35	71B	<i>S. cerevisiae cerevisiae</i>	30-35
6, 11, 24, 25	228	<i>S. cerevisiae cerevisiae</i>	30-40
7, 8	Cross Evolution	<i>S. cerevisiae cerevisiae</i>	25
9	Rhone 2056	<i>S. cerevisiae cerevisiae</i>	32
10	Anchor Alchemy I	<i>S. cerevisiae cerevisiae</i>	30
12, 28, 29	D254	<i>S. cerevisiae cerevisiae</i>	30
13	CEG	<i>S. cerevisiae cerevisiae</i>	30
14	299	<i>S. cerevisiae cerevisiae</i>	30
15, 17, 18, 31, 32, 33, 34	CM	<i>S. cerevisiae cerevisiae</i>	30-35
16	EC-1118	<i>S. cerevisiae bayanus</i>	40
26, 27, 30	LVL1 + LVL2	<i>Torulaspora delbrueckii</i> in <i>S. cerevisiae cerevisiae</i>	25+25

3.2.2.2 Hranila za kvasovke

Pri poskusu smo pri večini vzorcev uporabili komercialna hranila za kvasovke, ki so prikazana v preglednici 4.

Preglednica 4: Uporabljena komercialna hranila za kvasovke

Oznaka vrelne steklenice	Komercialno ime hranila za kvasovke	Doziranje (g/hL)
3, 4, 21, 22	Reskue	40
5, 12	Noblesse	30
6	Go-Ferm	30
7, 11	Supervit	20-30
8	Reduless	23
9, 15, 18, 23, 26, 33, 34	Optimum White	25-30
10, 13, 17, 24, 25, 30, 31, 35	Fermaid E	25-40
14	Inoferm	20
16, 32	Natuferm	30-40
27	Cx Activ	25
28, 29	Maxaferm	55

3.2.2.3 Trske iz hrastovega lesa

Pri poskusu smo uporabili naslednje trske iz hrastovega lesa, ki smo jih na začetku fermentacijskega poskusa dodali v mošt:

- Tanin Quercia AM HT,
- Tanin Quercia AM MT,
- Incanto American MT,
- Incanto French MT.

Preglednica 5: Uporabljene trske iz hrastovega lesa

Oznaka vrelne steklenice	Komercialno ime trsk iz hrastovega lesa	Doziranje (g/L)
6, 7, 8	Tanin Quercia AM HT	2
25, 28, 30	Tanin Quercia AM MT	4-5
31, 32	Incanto French MT	3
33, 34	Incanto American MT	2

3.2.3 Kemikalije in reagenti

Pri analizah mladega vina in vinskih droži smo uporabili naslednje reagente:

- galno kislino (Sigma),
- Folin-Ciocalteujev (FC) reagent (Merck),
- natrijev karbonat (Merck) za pripravo 20 % raztopine natrijevega karbonata,
- deionizirano vodo,
- DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) (Sigma),
- 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H₂DCFDA) (Sigma) za pripravo 1 mM raztopine v 96 % etanolu,
- kalijev dihidrogenfosfat (Merck) in kalijev hidrogenfosfat (Merck) za pripravo 50 mM kalijevega fosfatnega pufra (pH = 7,8).

3.2.3.1 Priprava osnovne raztopine galne kisline

Galno kislino uporabljamo kot standardno referenčno spojino za določanje skupnih fenolnih spojin po Singletonu in Rossiju. Pripravili smo jo tako, da smo v 100-mL merilno bučko natehtali 500 mg galne kisline, dodali 10 mL absolutnega etanola, raztopili in razredčili do oznake z deionizirano vodo (Košmerl in Kač, 2010).

S pomočjo osnovne raztopine galne kisline smo kasneje pripravili umeritveno krivuljo in sicer tako, da smo z ustreznim razredčevanjem pripravili različne koncentracije raztopin

galne kisline. V 100-mL merilne bučke smo odpipetirali od 0 do 10 mL osnovne raztopine galne kisline, dopolnili do oznake z deionizirano vodo ter premešali. Sledil je postopek, opisan pri poglavju 3.3.2.

3.2.3.2 Priprava FC reagenta

FC reagent smo tik pred uporabo razredčili po navodilih proizvajalca. V našem primeru smo uporabljali Merckov reagent, ki smo ga redčili z deionizirano vodo v razmerju 1:2.

3.2.3.3 Priprava DPPH[·] v raztopini metanola

Tik pred določanjem antioksidativnega potenciala vina smo v 100-mL bučko zatehtali 4 mg DPPH[·] in dopolnili s približno 20 mL metanola. Bučko smo dali na ultrazvočno kopel, da se je DPPH[·] popolnoma raztopil. Nato smo še dodajali metanol toliko časa, da je bila absorbanca okrog 1,0 (idealno 1,05).

3.2.3.4 Priprava H₂DCFDA

Pol ure pred določanjem znotrajcelične oksidacije smo v 15-mL falkon epruveto zatehtali 0,0049 g H₂DCFDA (shranjen na -20 °C), in v temi dodali 10 mL 96 % etanola. Eppendorf centrifugirko smo še dodatno zaščitili z alu-folijo, da ne bi prišlo do razgradnje barvila, in jo dobro premešali.

3.2.3.5 Priprava 50 mM kalijevega fosfatnega pufra (pH = 7,8)

Kalijev fosfatni pufer (50 mM) smo pripravili tako, da smo v eno čašo zatehtali 4,36 g K₂HPO₄, v drugo pa 3,40 g KH₂PO₄. S pomočjo magnetnega mešala smo ju raztopili z bidestilirano vodo do oznake 500 mL. Nato smo posamezni komponenti pufra združili tako, da je bil končni pH enak 7,8 (kislo komponento smo dodajali bazični). Sledilo je filtriranje pufra preko filtra z velikostjo por 0,2 µm. Shranili smo ga v hladilniku pri temperaturi 4 °C, pred uporabo pa smo ga segreli na 28 °C.

3.2.4 Laboratorijska oprema in aparature

Poleg standardne laboratorijske opreme smo uporabljali še naslednje aparature:

- UV-VIS spektrofotometer (Shimadzu UV-160 A),
- centrifuga (Tehtnica Centric 2000),
- magnetno mešalo (Magnetic stirrer mod microvar),
- analitska tehtnica (AEA-220 A),
- računalniški program Magellan,
- čitalec mikrotitrskih plošč Safire II (Tecan),
- ultrazvočna kopel (Iska, Sonis 2),
- pH-meter (Mettler Toledo DL50 Graphix),
- zamrzovalna omara (LTH),
- mikroskop (Leica ATC 2000).

3.2.5 Fermentacijski poskus

Mošt sorte 'Laški rizling' smo razdelili v osemnajst vrelnih steklenic po 550 mL, v sedemnajst steklenic pa smo razdelili mošt sorte 'Sauvignon'. V različne fermentacijske steklenice smo dodali različne starterske kulture vinskih kvasovk ali mlečnokislinskih bakterij (samo v dva vzorca), hranila za kvasovke in trske iz hrastovega lesa (Priloga A). Oblikovali smo torej različne skupine vzorcev; pri dveh vzorcih je potekla spontana fermentacija, pri večini pa smo dodajali različne kombinacije kvasovk in hranil. Od različnih kombinacij kvasovk in hranil smo desetim dodali še trske iz hrastovega lesa. Vrelne steklenice smo zaprli z vrelni veho, dobro premešali njihovo vsebino in jih stekali. Prvih 24 ur smo jih pustili na temperaturi 24 °C zaradi faze aklimatizacije, nato smo jih prenesli v klet s temperaturo 17 °C. Alkoholna fermentacija je potekala 14 dni. Prvi teden smo jo spremljali s tehtanjem vrelnih steklenic po 3x na dan v enakem razmiku, drugi teden smo tehtanje skrajšali na 2x na dan. S tehtanjem smo spremljali izgubo mase, ki je enaka sproščenemu CO₂. Na podlagi teh podatkov smo lahko narisali fermentacijske krivulje in krivulje fermentacijske kinetike naših vzorcev vina.

3.3 METODE

3.3.1 Fizikalno-kemijske metode

3.3.1.1 "WineScan" analiza za določanje osnovnih fizikalno-kemijskih parametrov

WineScan analizo mošta in vina smo opravili v agroživilskem laboratoriju na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica. WineScan je sodobna naprava proizvajalca FOSS, ki omogoča hitre analize (približno 60 sekund) grozdja, mošta ter vina.

S pomočjo infrardečega spektrofotometra s Fourierjevo transformacijo smo določili številne parametre pri vzorcih mošta in vina, in sicer gostoto, reducirajoče sladkorje, hlapne kisline, glicerol, alkohol idr. (Priloga A).

3.3.1.2 Določanje skupnih fenolnih spojin po Singletonu in Rossiju

Skupne fenolne spojine določamo s spektrofotometrično metodo, saj fenolne spojine absorbirajo svetlobo UV spektra in vidnega spektra. 1-mL nerazredčenim vzorcem vina in raztopini galne kisline (uporabljena kot standardna referenčna spojina) smo dodali 15 mL 20 % raztopino natrijevega karbonata in 5 mL razredčenega Folin-Ciocalteujevega reagenta ter pustili dve uri na sobni temperaturi. Po pretečenem času smo izmerili absorbanco reakcijske mešanice pri valovni dolžini 765 nm. Izmerjena absorbanca je proporcionalna masni koncentraciji skupnih fenolnih spojin, ki jo odčitamo iz umeritvene krivulje. Rezultat izrazimo kot mg galne kisline/L (Košmerl in Kač, 2010).

3.3.1.3 Določanje antioksidativnega potenciala vina s spektrofotometrično metodo s prostim radikalom DPPH[•]

Antioksidativni potencial vina smo določali s stabilnim prostim radikalom DPPH[•]. Metoda z radikalom DPPH[•] spada med spektroskopske metode, pri katerih določamo redukcijsko sposobnost antioksidantov v sistemih s kovinskimi ioni ali sintetičnimi radikali. Poleg radikala DPPH[•] izzovejo oksidacijo še superoksidni radikal, hidroksilni radikal, dušikov oksid, idr. Radikal DPPH[•] reagira z donorjem vodika, kamor sodijo fenolne spojine. Po redukciji DPPH[•] z antioksidantom (fenolne spojine) nastane DPPH₂, ki povzroči prehod barve iz vijolične v rumeno, to je pa vzrok za padec absorbance pri valovni dolžini 517 nm, saj ta ne absorbira pri tej valovni dolžini (Brand-Williams in sod., 1995).

50 µL razredčenega vzorca (R = 2) smo dodali 1,5 mL standardne raztopine DPPH[•] v 99 % metanolu. Po točno 30 minutah smo merili absorbanco pri valovni dolžini 517 nm. Ob vsakem vzorcu posebej smo pripravili tudi slepi in referenčni vzorec. Referenčne vzorce

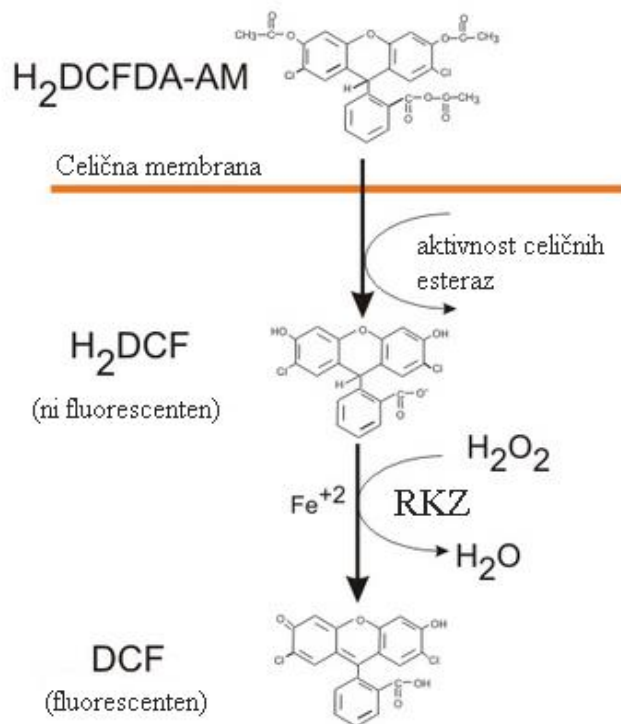
smo pripravili tako, da smo dodali k 1,5 mL raztopine DPPH[•] 50 µL metanola, dobro premešali in po točno 30 minutah izmerili absorbanco pri 517 nm. Pri pripravi slepih vzorcev pa smo 1,5 mL metanola dodali 50 µL vzorca vina in ponovili postopek.

3.3.2 Analize droži

V okviru analiz droži smo določali antioksidativni potencial droži z metodo za določanje znotrajcelične oksidacije celic, ki temelji na merjenju fluorescence barvila H₂DCF in opravili mikroskopski pregled droži.

3.3.2.1 Določanje antioksidativnega potenciala droži z metodo za določanje znotrajcelične oksidacije celic

Metoda določanja znotrajcelične oksidacije temelji na merjenju fluorescence oksidirane barvila H₂DCF. Celicam (drožem) ga dodamo v obliki diacetat estra (H₂DCFDA), ki zaradi svoje nepolarnosti enostavno prehaja preko membran celic. V notranjosti celic ga nespecifične esterase hidrolizirajo do H₂DCF. Nastali produkt je polaren, zaradi česar ostane ujet znotraj celic in ne prehaja preko membran. V notranjosti celic ga reaktivne kisikove zvrsti oksidirajo do diklorofluoresceina (DCF). DCF fluorescira pri valovni dolžini 520 nm, valovna dolžina vzbujanja (ekscitacije) pa je 488 nm (Jakubowski in Bartosz, 1997).



Slika 5: Nastanek fluorescentne komponente DCF s pomočjo reaktivnih kisikovih zvrsti (RKZ) (Held, 2015)

Sedimentu, ki smo ga dobili po centrifugiranju 10-mL kvasne suspenzije (vino z drožmi), smo dodali 10 mL 50 mM kalijevega fosfatnega pufra (pH 7,8), ki smo ga predhodno ogreli na 28 °C, da ne bi predstavljal za kvasovke temperaturni šok. Sediment z dodanim pufrom smo inkubirali 10 minut pri 28 °C.

Po končani inkubaciji smo v temi dodali 100 µL 1 mM sveže raztopine H₂DCFDA. Pripravili smo jo pol ure pred začetkom merjenja znotrajcelične oksidacije.

Centrifugirke smo prenesli na stresalnik in jih inkubirali v temi 20 minut pri 28 °C in 220 obr./min. Po končani inkubaciji je sledil nanos vzorcev po 200 µL na mikrotitrsko ploščico v dveh paralelkah. S pomočjo čitalca mikrotitrskih plošč Safire II (Tecan) in programske opreme Magellan je sledilo spremljanje 1-urne kinetike fluoresciranja barvila pri valovni dolžini vzbujanja 488 nm ter valovni dolžini emisije 520 nm. Rezultati so izraženi kot prirast fluorescence glede na optično gostoto suspenzije droži (PF/OD). Prirast fluorescence smo izračunali po naslednji formuli:

$$PF = \frac{F(1h) - F(0)}{F(0)} \quad \dots (1)$$

kjer PF pomeni prirast fluorescence, F(1h) vrednost fluorescence ob času t = 1 h (konec 1-h kinetike merjenja), F(0) pa vrednost fluorescence ob času t = 0 (začetek 1-urne kinetike merjenja).

3.3.2.2 Mikroskopski pregled droži

Z mikroskopskim pregledom droži smo ugotavljali, v kakšnem stanju so celice in ali je vidna avtoliza kvasovk.

Vzorci v plastenkah smo najprej dobro premešali, da smo lahko zajeli tudi droži, ki so bile sicer posedene na dno, in nato odvzeli po 5 mL vzorca. Pripravili smo nativni preparat, kamor smo kanili 6 µL vzorca, ga prekrili z objektnim stekelcem in pregledali pod 1000x povečavo. Da smo lahko ločili žive celice od mrtvih, smo dodali tudi metilensko modrilo, ki prehaja skozi celično steno in membrano mrtvih celic.

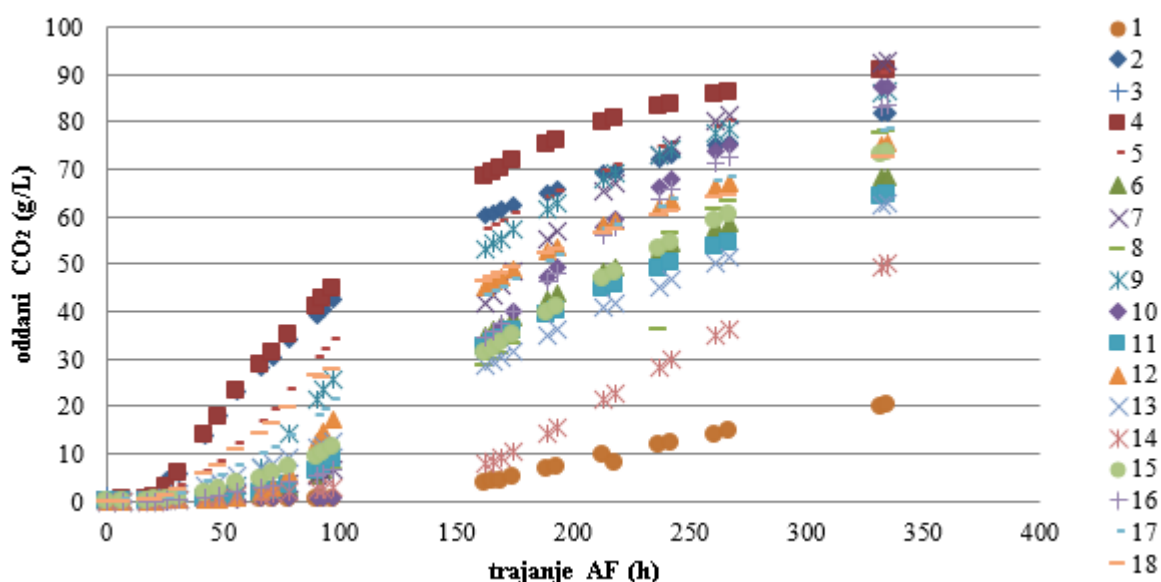
4 REZULTATI Z RAZPRAVO

V nadaljevanju magistrskega dela so prikazani rezultati fizikalno-kemijskih in mikrobioloških analiz. Vzorci vina sorte laški rizling imajo oznake 1-18, medtem ko imajo vzorci vina sorte sauvignon oznake 19-35. Vzorca 1 in 19 sta kontrolna vzorca, pri katerih je potekla spontana alkoholna fermentacija.

4.1 FERMENTACIJSKE KRIVULJE

Fermentacijski poskus je potekal 335 ur, kar znaša približno 14 dni. Tekom alkoholne fermentacije smo spremljali maso vrelnih steklenic, ki se je s časom fermentacije konstantno zmanjševala. To je zaradi oddanega CO₂, ki je poleg etanola glavni produkt AF. S temi podatki smo lahko izrisali fermentacijske krivulje posameznih vzorcev, ki prikazujejo odvisnost oddanega CO₂ od trajanja AF. Narisali smo tudi krivulje fermentacijske kinetike vzorcev kot spremembo oddanega CO₂ na časovno enoto.

Zanimalo nas je predvsem to, kako se razlikuje potek spontane fermentacije od inokulirane fermentacije, ali ima dodatek selekcioniranih kvasovk, hranil in trsk iz hrastovega lesa vpliv na potek alkoholne fermentacije in če da, v kolikšni meri.

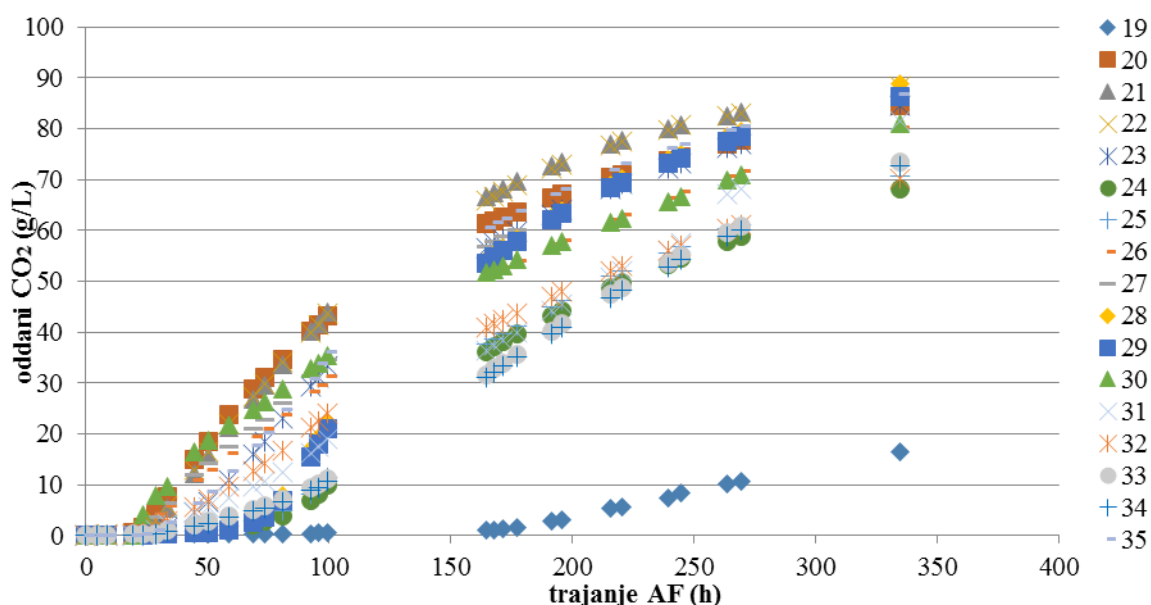


Slika 6: Fermentacijske krivulje vzorcev vina sorte laški rizling

Slika 6 prikazuje oddani CO₂ (g/L) med alkoholno fermentacijo za vzorce vina sorte laški rizling. Jasno je razvidna ločnica med kontrolnim vzorcem 1, kjer je potekala spontana fermentacija, in med preostalimi vzorci, katerim so bili pred samo AF dodana razna

enološka sredstva. Količina oddanega CO₂ v odvisnosti od trajanja AF je bila največja pri vzorcu 7, ki je vseboval komercialni sev kvasovk Cross Evolution, hranilo Supervit in trske iz hrastovega lesa Tanin Quercia, in najmanjša pri vzorcu 1, ki je vseboval naravno mikrofloro in mu niso bila dodana nobena enološka sredstva. Vzorec 1 je imel tudi najdaljšo fazo prilagajanja (lag faza), in sicer nekaj več kot 100 ur. Ponavadi traja lag faza 24-48 ur, da preidejo kvasovke v eksponentno fazo rasti. Želimo si, da je faza prilagajanja čim krajša, kar pomeni hitro prilagoditev na novo okolje.

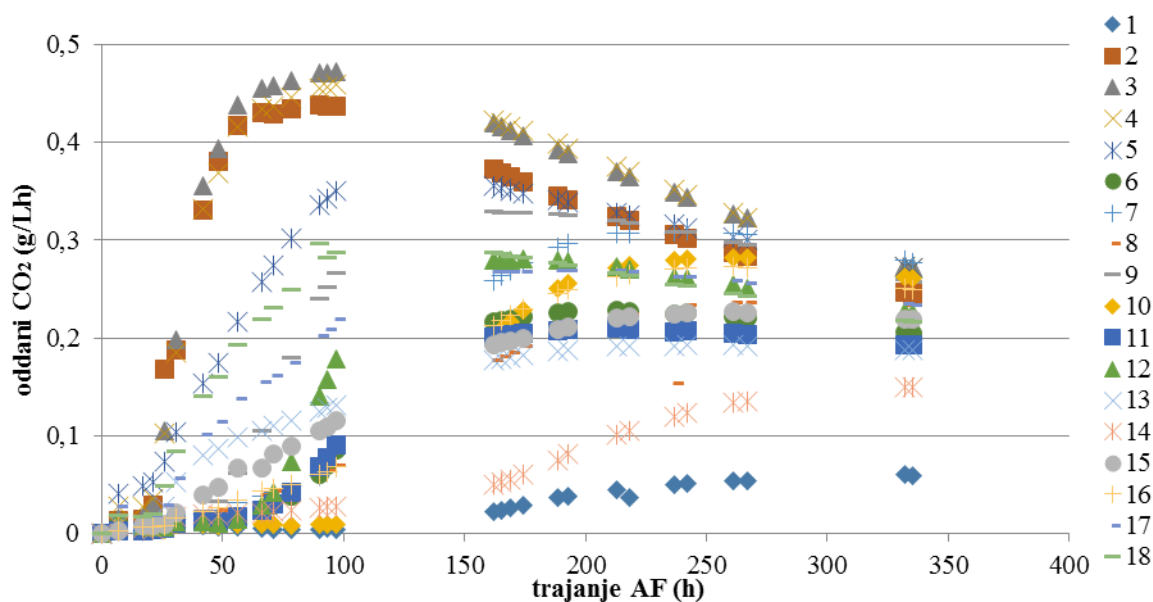
Eksponentno fazo rasti so najprej dosegle kvasovke v vzorcih 2 (ICV Okay) in 4 (ICV Okay + Reskue + LAB Omega) po približno 20-ih urah. Vzorec 1 je dosegel eksponentno fazo pri približno 150. urah, vendar je neizrazita in ni podobna logaritemski rasti.



Slika 7: Fermentacijske krivulje vzorcev mošta sorte sauvignon

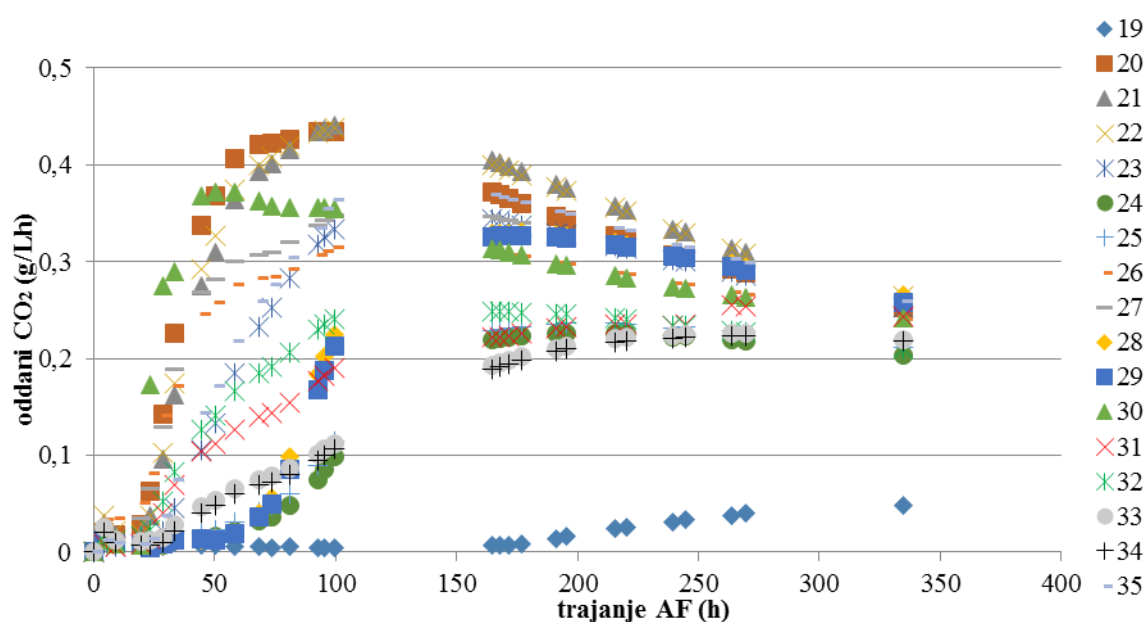
Podoben potek fermentacijskih krivulj kot pri vzorcih vina laški rizling je bil razviden tudi pri vzorcih vina sauvignon (slika 7). Količina oddanega CO₂ (g/L) je bila zopet najmanjša pri kontrolnem vzorcu z oznako 19, kjer je potekala spontana fermentacija. Vzorec 19 je imel tudi najdaljšo fazo prilagajanja, nekoliko več kot 150 ur. Največjo količino oddanega CO₂ med AF je imel vzorec 28, ki je vseboval komercialni sev kvasovk D254, hranilo Maxaferm in trske iz hrastovega lesu Tanin Quercia.

Eksponentno fazo rasti so najprej dosegle kvasovke v vzorcu 30 (LVL1+LVL2 + Fermaid E blanc + Incanto American MT) in 20 (ICV Okay). Zanimivo je, da so tako v vzorcu vina laški rizling kot v vinu sauvignon imeli vzorci samo z dodatkom kvasovke najkrajšo fazo prilagajanja. Stacionarna faza rasti v obeh primerih še ni bila zaključena pred zaključkom spremljanja AF, zato faza odmiranja ni razvidna.



Slika 8: Kinetika oddanega CO₂ (g/Lh) v odvisnosti od trajanja alkoholne fermentacije mošta sorte laški rizling

Kinetiko oddanega CO₂ (g/Lh) v odvisnosti od trajanja AF mošta sorte laški rizling nam predstavlja slika 8. Sproščanje CO₂ je doseglo svoj maksimum v sredini eksponentne faze rasti kvasovk, in sicer pri vzorcu z oznako 3 (ICV Okay + Reskue) nekje pri 100. uri trajanja AF. Pri vzorcu 1 težko rečemo, če je že prišlo do maksimalnega sproščanja CO₂, saj je nejasno, ali bi ta še naraščal ali bi začel padati.



Slika 9: Kinetika oddanega CO₂ (g/Lh) v odvisnosti od trajanja alkoholne fermentacije mošta sorte sauvignon

S slike 9 je razvidno, da je pri vzorcih mošta sorte sauvignon prišlo do največjega sproščanja CO₂ v odvisnosti od trajanja AF pri vzorcih 20 (ICV Okay), 21 (ICV Okay + Reskue) in 22 (ICV Okay + Reskue + LAB Omega), kar sovpada tudi s fermentacijsko krivuljo. Pri vzorcu 19 pa zopet težko trdimo, ali je že prišlo do maksimalnega sproščanja CO₂ pri približno 340 urah, saj z grafa ni razvidno.

4.2 VSEBNOST SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN

Po končani alkoholni fermentaciji in ob različnih časih zorenja vina na drožeh smo določali vsebnost skupnih fenolnih spojin po Folin-Ciocalteujevi metodi. Zanimalo nas je, kaj se dogaja s fenolnimi spojinami med zorenjem vina na drožeh.

V Prilogi D1 in D2 je ločeno za vina sorte laški rizling in sauvignon prikazano, kako se je spreminjala vsebnost skupnih fenolnih spojin med zorenjem vina na drožeh.

Največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin skozi celotno trajanje zorenja obeh sort vina sta imela kontrolna vzorca z oznako 1 in 19, kjer je potekla spontana alkoholna fermentacija.

Tudi iz preglednice 6 vidimo, da sta imela kontrolna vzorca največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin, kar nas ne preseneča. Slabost Folin-Ciocalteujeve metode pri določanju skupnih fenolnih spojin je namreč v tem, da reagira nespecifično z vsemi fenolnimi –OH skupinami vključno z aromatskimi AK ter z askorbinsko kislino, reducirajočimi sladkorji in organskimi kislinami (Abramovič, 2011). Vzorcem bi lahko odstranili reducirajoče komponente z ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) in dobili bolj natančne rezultate. Vzorca 1 in 19 sta imela 76. dan zorenja vina na drožeh največji ostanek reducirajočih sladkorjev in sicer vzorec 1 je imel 117,2 g RS/L, vzorec 19 pa 121,7 g RS/L. Povprečna vrednost reducirajočih sladkorjev vseh ostalih vzorcev vina sorte laški rizling je bila 34,4 g/L, vina sorte sauvignon pa 9,5 g/L (Lužar in sod., 2016).

Preglednica 6: Vsebnost reducirajočih sladkorjev (RS), vsebnost skupnih fenolnih spojin (PFT) in antioksidativni potencial (AOP) po 74. dneh zorenja vina na drožeh (Lužar in sod., 2016)

Vzorec	RS (g/L)	PFT (mg GAE/L)	AOP (mmol/L)
vina sorte laški rizling			
1	117,2	444,6	2,70
2	3,1	327,6	2,17
3	1,1	322,1	2,08
4	1,5	331,1	2,28
5	3,6	299,5	1,96
6	1,9	353,1	2,28
7	1,4	331,1	2,01
8	1,4	325,8	2,22
9	1,7	324,1	2,07
10	1,2	305,4	1,95
11	7,7	334,1	2,27
12	3,4	297,6	1,76
13	2,4	320,1	1,93
14	31,4	328,6	1,70
15	1,9	328,6	1,95
16	1,5	297,1	1,70
17	1,4	309,0	1,77
18	1,7	322,1	1,87
vina sorte sauvignon			
19	121,7	451,1	2,99
20	2,3	320,6	2,22
21	1,3	310,1	2,16
22	2,1	315,6	2,27
23	3,4	298,6	2,11
24	5,0	322,2	2,23
25	5,2	328,6	2,26
26	1,0	284,1	2,06
27	1,2	252,6	2,14
28	1,3	340,6	2,39
29	1,3	311,7	2,12
30	1,1	294,9	2,33
31	1,2	356,6	2,65
32	1,7	371,6	2,79
33	1,5	342,6	2,51
34	1,7	342,6	2,54
35	9,1	233,1	1,81

V preglednici 7 je prikazano celokupno zmanjšanje skupnih fenolnih spojin med zorenjem vina laški rizling in sauvignon.

Preglednica 7: Celokupno zmanjšanje skupnih fenolnih spojin (%) od časa vzorčenja t_1 do t_6

Vzorci vina laški rizling	Celokupno zmanjšanje skupnih fenolnih spojin (%)	Vzorci vina sauvignon	Celokupno zmanjšanje skupnih fenolnih spojin (%)
1	12,0	19	9,5
2	17,8	20	21,4
3	20,1	21	13,1
4	16,9	22	20,4
5	15,9	23	23,2
6	21,6	24	23,4
7	13,1	25	23,2
8	21,1	26	21,2
9	13,8	27	15,2
10	11,2	28	18,5
11	21,9	29	15,4
12	20,1	30	13,1
13	29,2	31	10,7
14	19,4	32	15,0
15	17,3	33	18,1
16	21,6	34	15,7
17	19,7	35	10,8
18	12,1		

Vsebnost skupnih fenolnih spojin se je v vzorcih vin sorte laški rizling zmanjšala v povprečju za 18,0 % (v razponu od 41 do 121 mg GAE/L) in v vzorcih vin sorte sauvignon za 16,9 % (v razponu od 36 do 96 mg GAE/L). V prilogi D so prikazane koncentracije skupnih fenolnih spojin pri posameznih vzorčenjih.

V preglednici 8 imamo podatke za povprečne vrednosti in standardni odklon koncentracije skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L) med zorenjem vina, ki smo jih ločili glede na sorto vina. Zanimale so nas razlike med vsebnostjo skupnih fenolnih spojin pri kontrolnima vzorcema ter pri vzorcih z in brez dodatka trsk iz hrastovega lesa.

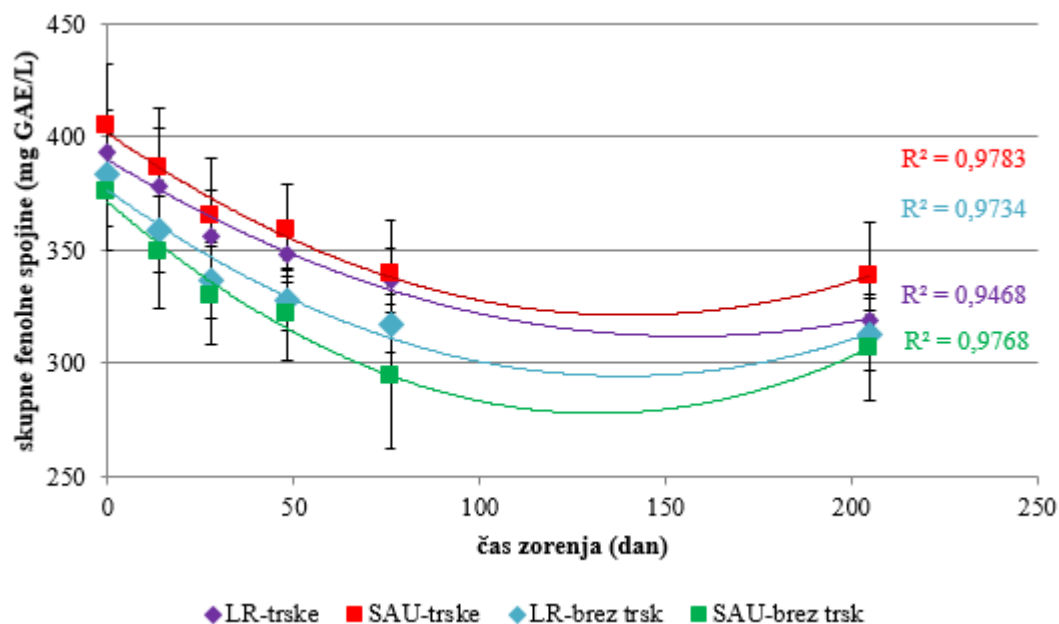
Preglednica 8: Povprečne vrednosti in standardni odklon koncentracije skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L) med zorenjem vina laški rizling (LR) in sauvignon (SAU), in sicer pri kontrolnih vzorcih, vzorcih z dodatkom hrastovih trsk in brez dodatka hrastovih trsk

Skupina vzorcev/sorta	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆
vsi vzorci (N=35)	392,90 ± 35,34	370,76 ± 38,12	349,86 ± 37,50	341,87 ± 36,57	325,11 ± 40,43	324,17 ± 36,14
kontrolna vzorca (N=2)	493,40 ± 5,66	485,90 ± 12,02	467,15 ± 17,32	460,80 ± 14,14	447,85 ± 4,60	440,45 ± 13,79
LR (N=1)	489,4	477,4	454,9	450,8	444,6	430,7
SAU (N=1)	497,4	494,4	479,4	470,8	451,1	450,2
vzorci z dodanimi trskami (N=10)						
LR (N=3)	393,07 ± 18,82	378,57 ± 25,59	356,40 ± 20,37	348,47 ± 12,90	336,67 ± 14,48	319,37 ± 4,01
SAU (N=7)	404,90 ± 27,15	386,33 ± 26,26	365,40 ± 25,65	358,80 ± 20,43	339,64 ± 23,98	338,49 ± 23,93
vzorci brez dodanih trsk (N=23)						
LR (N=14)	383,65 ± 22,81	358,83 ± 18,17	336,90 ± 16,65	328,21 ± 13,88	317,64 ± 13,17	312,63 ± 15,67
SAU (N=9)	375,57 ± 26,04	349,01 ± 24,70	329,68 ± 21,73	321,30 ± 19,66	294,29 ± 31,79	306,76 ± 23,47

Iz povprečnih vrednosti koncentracije skupnih fenolnih spojin vzorcev obeh sort vina lahko razberemo, da se je koncentracija s časom zorenja zmanjševala. Pri vzorcih obeh sort je standardni odklon večji v primerjavi z vzorci, ki smo jih razvrstili glede na kontrolo in dodatek trsk, kar kaže na raznolikost vzorcev.

S povprečno vrednostjo koncentracije fenolnih spojin kontrolnih vzorcev lahko znova potrdimo, da imata največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin, ki se s časom zorenja vina na drožeh zmanjšuje.

Pri primerjavi vzorcev z dodanimi trskami in vzorcev brez dodanih trsk opazimo razliko glede koncentracije skupnih fenolnih spojin. Z upoštevanjem standardnega odklona se koncentracije skupnih fenolnih spojin med tema dvema skupinama ne razlikujeta tako očitno kot ob primerjavi s kontrolnima vzorcema, vendar je vseeno opazna razlika.



Slika 10: Spreminjanje povprečne vrednosti skupnih fenolnih spojin v vzorcih s časom zorenja za vsako sorto vina posebej z ali brez dodatka trsk iz hrastovega lesa

Na sliki 10 je še grafično predstavljeno spreminjanje povprečne vrednosti skupnih fenolnih spojin v vzorcih s časom zorenja za vsako sorto vina posebej z ali brez dodatka trsk iz hrastovega lesa. Zmanjšanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin med zorenjem vina lahko zelo dobro opišemo s polinomom druge stopnje, kjer je R^2 višji od 0,97 (izjema so le vzorci LR brez dodanih trsk). Pri zadnjem vzorčenju je opaziti nekolikšno povečanje skupnih fenolnih spojin pri vzorcih. Z Duncanovim testom (preglednica 9) smo preverili, ali se povečanje vsebnosti skupnih fenolnih spojin statistično značilno razlikuje od vsebnosti skupnih fenolnih spojin pri predhodnjem vzorčenju.

Pri Duncanovem testu za vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih vina obeh sort smo dobili štiri statistične razrede, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo. Povprečna vsebnost skupnih fenolnih spojin se v c in d razredu statistično značilno razlikuje od ostalih vzorcev. Vsebnost skupnih fenolnih spojin se pri t_3 in t_4 statistično značilno ne razlikuje, prav tako se tudi ne pri t_5 in t_6 .

Preglednica 9: Rezultati Duncanovega testa za vsebnost skupnih fenolnih spojin v vzorcih vina obeh sort ob različnih časih vzorčenja

Čas vzorčenja	N	razred ($\alpha \geq 0,05$)			
		a	b	c	d
t ₁	33				386,8091
t ₂	33			363,7788	
t ₃	33		342,7485		
t ₄	33		334,6576		
t ₅	33	317,6697			
t ₆	33	317,1242			
Sig.		0,928	0,181	1,000	1,000

Legenda: a, b, c, d – različne črke označujejo razrede s statistično značilno razliko; α – stopnja tveganja, N – število vzorcev, sig. – stopnja značilnosti

Signifikacija razredov a (0,928) in b (0,181) je višja od mejne vrednosti statističnega zaupanja (0,05), tako da lahko potrdimo ničelni hipotezi. Prva hipoteza pravi, da se povprečne vrednosti skupnih fenolnih spojin pri času vzorčenja t₅ in t₆ statistično ne razlikujejo, druga pa, da se tudi vrednosti skupnih fenolnih spojin pri času vzorčenja t₃ in t₄ statistično značilno ne razlikujejo.

Iz rezultatov lahko trdimo, da je vsebnost skupnih fenolnih spojin v vseh vzorcih s časom zorenja na drožeh praviloma padala, le da je bilo ob času vzorčenja t₃ in t₄ ter t₅ in t₆ zmanjševanje skupnih fenolnih spojin neizrazito in se statistično ne razlikuje. Zmanjševanje vsebnosti skupnih fenolov je posledica oksidacije flavonoidov in flavan-3-olov, ki predstavljajo večji del fenolnih spojin v belih vinih. Z oksidacijo fenolnih spojin pride do izgube reaktivnih hidroksilnih skupin, ki sicer sodelujejo pri antioksidativnem delovanju. Spremembe flavan-3-ol monomerov, katehina in epikatehina vodijo do zmanjševanja vsebnosti skupnih fenolnih spojin med zorenjem vina (Singleton in sod., 1999).

4.3 ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL VINA

Antioksidanti so snovi, ki ščitijo celice pred učinki prostih radikalov. Z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov ter z odstranjevanjem in/ali popraviom poškodovanih biomolekul preprečujejo oksidativni stres. Oksidativni stres označuje porušeno ravnovesje med prostimi radikali in antioksidanti (Korošec, 2000). Prosti radikali neizogibno nastajajo v bioloških sistemih ali pridejo v sistem iz zunanjega okolja ter povzročajo različne degenerativne bolezni, kot so mutageneza, karcinogeneza, srčno-žilne bolezni in staranje (Kedare in Singh, 2011).

Antioksidanti so lahko encimi (superoksidna dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza, metionin sulfoksid reduktaza, DNA popravljalni encimi), vitamini (A, E, C), betakaroteni, bioflavonoidi, katehini, itn. ter mikroelementi – selen, cink, baker, mangan. Nekatere od naštetih antioksidantov lahko sintetizira telo samo (glutathion, sečno kislino, ubikinon), preostale pa dobimo s hrano (vitamini, minerali v sledovih) (Korošec, 2000).

Zanimalo nas je, kaj se dogaja z antioksidativnim potencialom vina od zaključka alkoholne fermentacije in med zorenjem vina na drožeh. Antioksidativni potencial vina je tesno povezan z vsebnostjo skupnih fenolnih spojin, saj so ključne spojine z antioksidativnim delovanjem.

Prilogi E1 in E2 nam prikazujeta spreminjanje AOP vina za vsak vzorec posebej pri obeh sortah vina. Zopet se je izkazalo, da je pri kontrolnih vzorcih največja vrednost AOP vina, kar sovpada z rezultati vsebnosti skupnih fenolnih spojin.

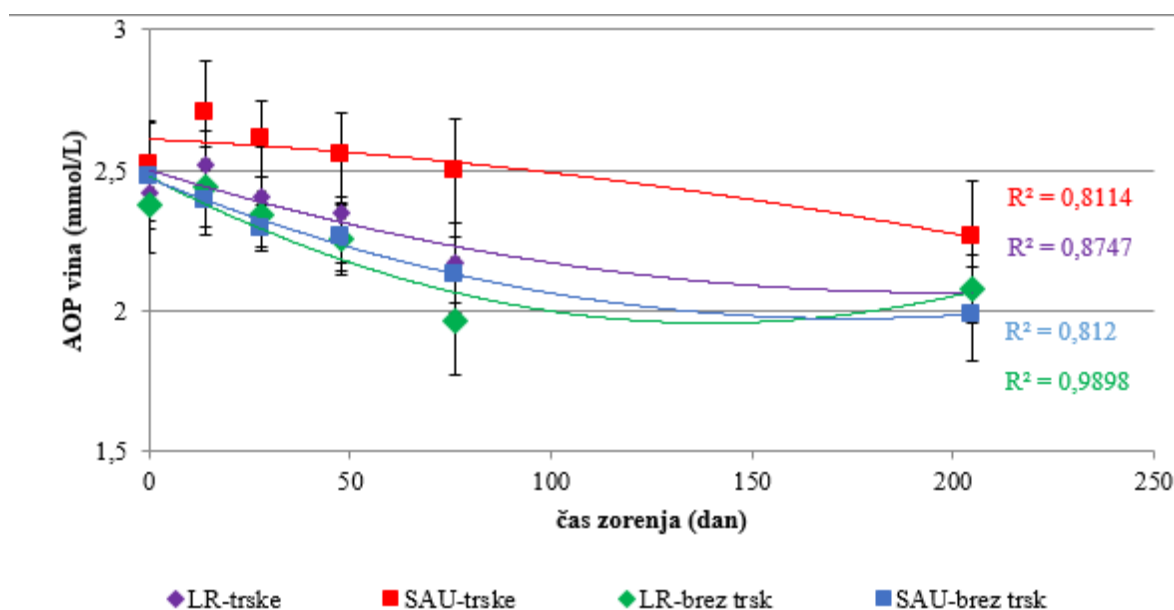
V preglednici 10 so zbrane povprečne vrednosti in standardni odklon AOP vina med zorenjem vzorcev na drožeh ločeno glede na sorto, kontrolo in dodatek hrastovih trsk. Nizka vrednost standardnega odklona nakazuje na manjšo razpršenost vrednosti AOP vina ter zato večjo zgostitev vrednosti AOP vina okoli povprečne vrednosti.

Preglednica 10: Povprečne vrednosti in standardni odklon AOP vina (mmol/L) med zorenjem vina laški rizling (LR) in sauvignon (SAU), in sicer pri kontrolnih vzorcih, vzorcih z dodatkom hrastovih trsk in brez dodatka hrastovih trsk

Skupina vzorcev/sorta	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆
vsi vzorci (N=35)	2,48 ± 0,23	2,52 ± 0,21	2,42 ± 0,21	2,36 ± 0,21	2,18 ± 0,31	2,12 ± 0,21
kontrolna vzorca (N=2)	3,11 ± 0,04	3,00 ± 0,04	2,93 ± 0,03	2,84 ± 0,01	2,85 ± 0,21	2,63 ± 0,13
LR (N=1)	3,14	3,03	2,91	2,83	2,70	2,54
SAU (N=1)	3,08	2,97	2,95	2,85	2,99	2,72
vzorci z dodanimi trskami (N=10)						
LR (N=3)	2,42 ± 0,10	2,52 ± 0,12	2,40 ± 0,18	2,35 ± 0,18	2,17 ± 0,14	2,07 ± 0,01
SAU (N=7)	2,52 ± 0,15	2,70 ± 0,18	2,61 ± 0,13	2,56 ± 0,15	2,50 ± 0,19	2,26 ± 0,20
vzorci brez dodanih trsk (N=23)						
LR (N=14)	2,38 ± 0,17	2,44 ± 0,14	2,34 ± 0,13	2,26 ± 0,13	1,96 ± 0,19	2,08 ± 0,12
SAU (N=9)	2,48 ± 0,19	2,39 ± 0,12	2,29 ± 0,08	2,26 ± 0,12	2,12 ± 0,14	1,99 ± 0,17

Povprečne vrednosti AOP obeh sort vina kažejo trend, da se AOP vina s časom zorenja zmanjšuje. S povprečno vrednostjo AOP kontrolnih vzorcev lahko znova potrdimo, da imata v primerjavi z ostalimi vzorci in ostalima skupinama največjo vrednost AOP vina.

Pri primerjavi vzorcev z dodanimi trskami in vzorcev brez dodanih trsk so razlike glede spreminjanja AOP vina s časom zorenja minimalne. S testom medsebojnih interakcij (Priloga F) smo potrdili, da se AOP vina statistično značilno ne razlikuje glede na zvezo med časom zorenja, dodatkom trsk in različno sorto vina (stopnja značilnosti 0,633). Ugotovljen pa je bil vpliv zveze med sorto vina in dodatkom trsk na AOP vina (stopnja značilnosti 0,006). Do potrditve omenjene zveze je prišlo, ker so bile pri sorti vina laški rizling dodane trske iz hrastovega lesa le v tri vzorce, medtem ko smo dodali trske v vino sauvignon pri sedmih vzorcih.



Slika 11: Spreminjanje povprečne vrednosti AOP vina s časom zorenja posebej za vino sorte laški rizling (LR) in sauvignon (SAU) ter z ali brez dodatka trsk iz hrastovega lesa

Slika 11 nam še grafično prikaže, kako se je povprečna vrednost AOP vina s časom spreminjala med zorenjem vina na drožeh. Zmanjšanje vrednosti AOP vina med zorenjem lahko zelo dobro opišemo s polinomom druge stopnje, kjer je R^2 višji od 0,81 (izjema so le vzorci SAU brez dodanih trsk). Tesnost zveze je bila pri posameznih skupinah že manj tesna kot pri spreminjanju skupnih fenolnih spojin. Zanimivo je, da se je med najdaljšim razmikom vzorčenja (od t_5 do t_6) vrednost AOP zmanjšala za manj kot prej v prvih petih vzorčenjih.

Preglednica 11: Rezultati Duncanovega testa za vrednost antioksidativnega potenciala vzorcev vina obeh sort ob različnih časih vzorčenja

Čas vzorčenja	N	Razred ($\alpha \geq 0,05$)			
		a	b	c	d
t_1	33			2,4400	2,4400
t_2	33				2,4909
t_3	33		2,3912	2,3912	
t_4	33		2,3288		
t_5	33	2,1382			
t_6	33	2,0912			
Sig.		0,322	0,188	0,303	0,283

Legenda: a, b, c, d - različne črke označujejo razrede s statistično značilno razliko; α – stopnja tveganja; N – število vzorcev, sig. – stopnja značilnosti

Pri Duncanovem testu za vrednost antioksidativnega potenciala vzorcev vina obeh sort smo dobili štiri statistične razrede, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo. Povprečne vrednosti AOP vzorcev se v a razredu statistično značilno razlikuje od vrednosti

AOP ostalih vzorcev. Vrednost AOP vzorcev se med t_1 in t_4 statistično značilno ne razlikuje, torej začetno povečanje AOP vina, ki je opazno na sliki 11, v resnici ni značilno povečanje.

V preglednici 12 je prikazano celokupno zmanjšanje antioksidativnega potenciala vina (%) od časa vzorčenja t_1 do t_6 .

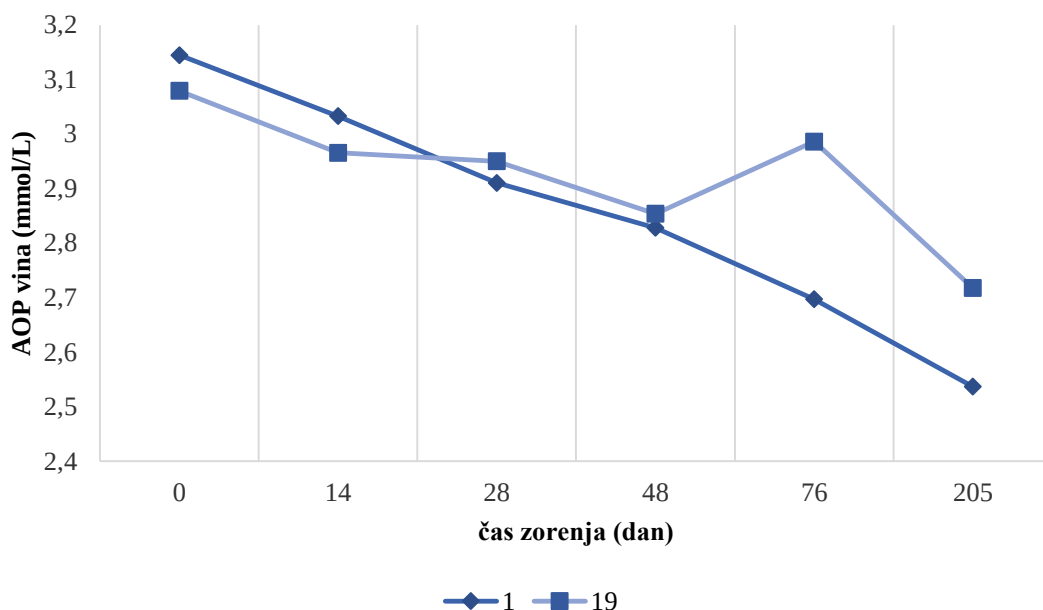
Preglednica 12: Celokupno zmanjšanje antioksidativnega potenciala vina (%) od časa vzorčenja

Vzorci vina laški rizling	Celokupno zmanjšanje AOP vina (%)	Vzorci vina sauvignon	Celokupno zmanjšanje AOP vina (%)
1	19,3	19	11,7
2	2,8	20	18,3
3	16,7	21	20,1
4	17,3	22	18,9
5	24,3	23	29,6
6	15,0	24	20,3
7	10,9	25	15,3
8	17,1	26	22,6
9	6,6	27	15,0
10	12,5	28	20,5
11	12,4	29	16,3
12	10,3	30	10,0
13	21,4	31	2,6
14	11,4	32	0,6
15	7,7	33	14,1
16	17,4	34	7,8
17	10,2	35	17,1
18	4,3		

Vrednost antioksidativnega potenciala se je v vzorcih vina sorte laški rizling zmanjšala v povprečju za 13,2 % (v razponu od 0,062 do 0,608 mmol/L) in v vzorcih vin sorte sauvignon za 15,3 % (v razponu od 0,017 do 0,739 mmol/L). V prilogi E so prikazane vrednosti AOP vina pri posameznih vzorčenjih.

4.3.1 Primerjava spreminjanja antioksidativnega potenciala vina glede na izbran sev kvasovk

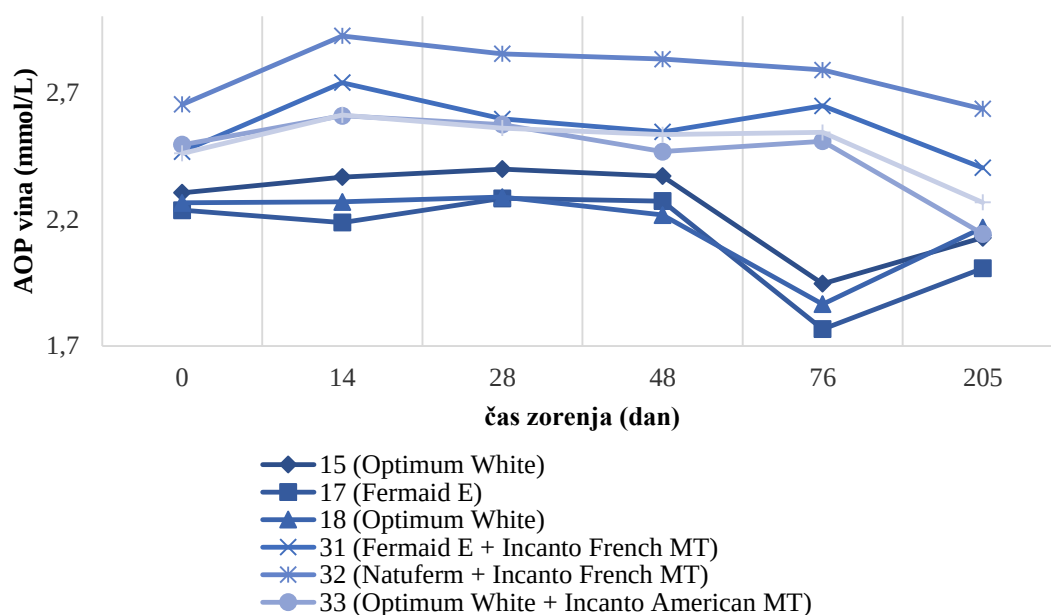
V nadaljevanju je prikazano spreminjanje antioksidativnega potenciala vina glede na izbran sev kvasovk, ki smo ga inokulirali v mošt. Izbrani so nekateri primeri, kjer je prišlo do dodatka istega seva kvasovk v več vzorcev vin.



Slika 12: Spreminjanje antioksidativnega potenciala (AOP) kontrolnih vzorcev z oznakama 1 in 19 v odvisnosti od časa zorenja

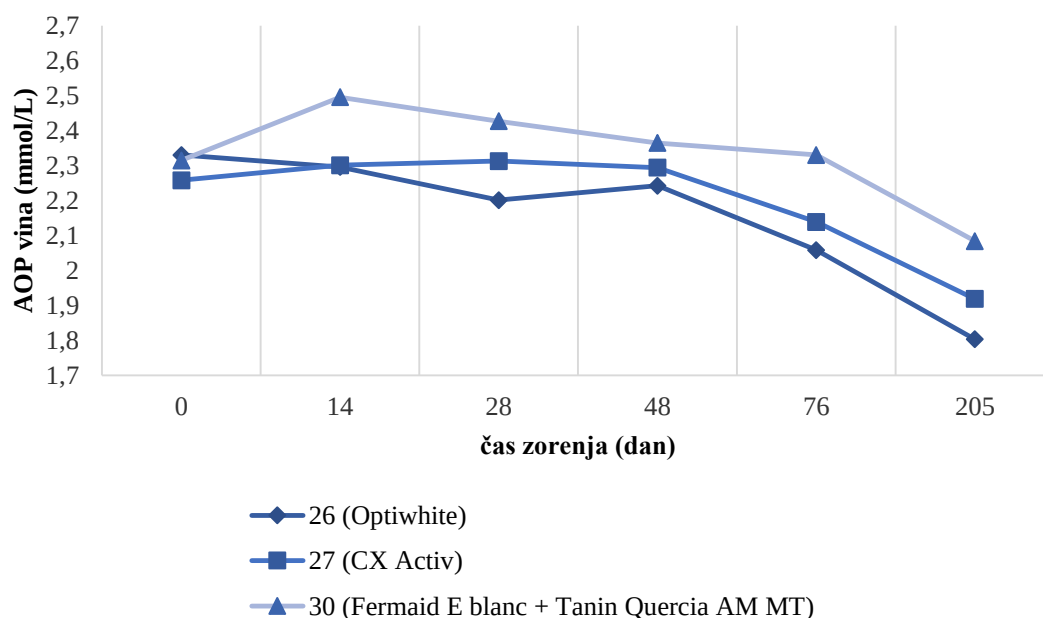
Slika 12 prikazuje spreminjanje antioksidativnega potenciala kontrolnih vzorcev vina sorte laški rizling (oznaka 1) in sauvignon (oznaka 19) med zorenjem na drožeh. V kontrolna vzorca nismo dodali starterske kulture, tako da je alkoholna fermentacija potekla z endogeno mikrobioto. S slike je očiten trend padanja AOP vina s časom zorenja na drožeh.

Na sliki 13 lahko vidimo, kako se je AOP vzorcev vina z dodanim komercialnim sevom CM spreminjal v odvisnosti od časa zorenja. Vzorcema vina sorte laški rizling z oznakama 15 in 18 je bilo pred začetkom alkoholne fermentacije dodano enako hranilo za kvasovke Optimum White v enaki količini (25 g/hL). Če primerjamo, kako se je spreminjal AOP pri njima, lahko vidimo, da se je skladno z obema vzorcema povečeval oz. padal. Tudi vzorca vina sorte sauvignon z oznakama 33 in 34 sta imela dodana enaka enološka sredstva – hranilo za kvasovke Optimum White in trske iz hrastovega lesa Incanto American MT. Spreminjanje AOP vina pri teh vzorcih je prav tako potekalo podobno.



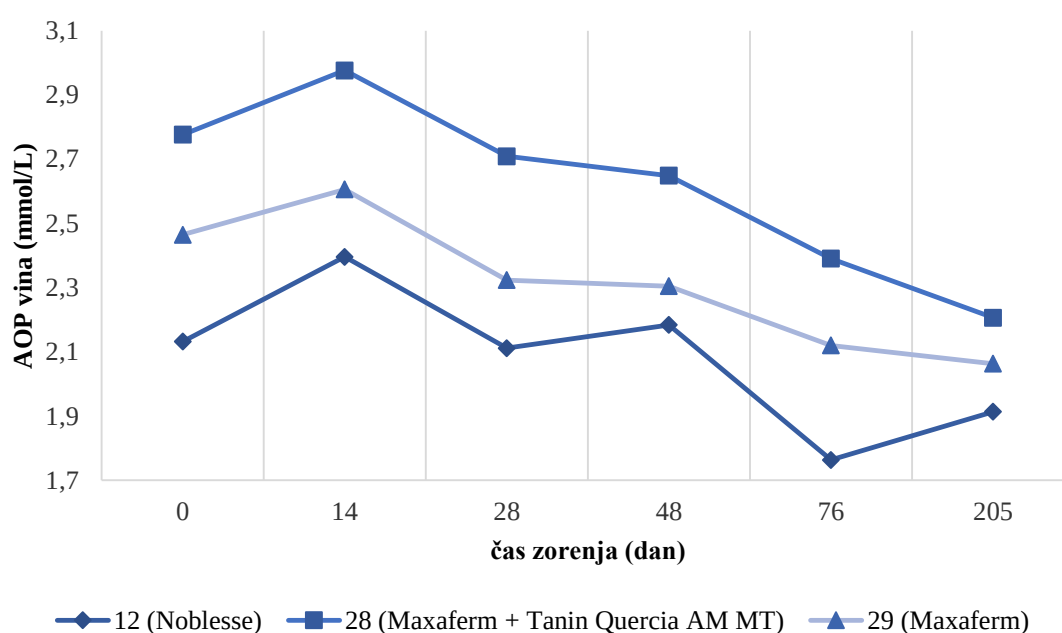
Slika 13: Spreminjanje AOP vzorcev vina s komercialnim sevom CM v odvisnosti od časa zorenja

Glede na sliko 13 lahko potrdimo tudi naša pričakovanja glede večjega antioksidativnega potenciala vzorcev, ki so jim bile dodane trske iz hrastovega lesa. Vsi štirje vzorci, katerim so bile dodane trske Incanto French MT ali Incanto American MT, so imeli večji AOP kot tisti, katerim so bila dodana zgolj hranila za kvasovke.



Slika 14: Spreminjanje AOP vzorcev vina s komercialnim sevom LVL1+LVL2 v odvisnosti od časa zorenja

Posebej nas je zanimalo spreminjanje AOP vzorcev vin z dodatkom kombinacije kvasovk vrste *Torulaspora delbrueckii* in *S. cerevisiae* (LVL1+LVL2), kjer dodatek kvasovk seva *Torulaspora delbrueckii* prispeva k posnemanju spontane alkoholne fermentacije. Že iz slik 7 in 9 smo videli, da je bila kombinacija teh dveh kvasovk uspešna in je najhitreje dosegla eksponentno fazo rasti. Na povečanje AOP vina pa ni imela kaj dosti vpliva, če primerjamo vrednost AOP vina vzorcev 26, 27 in 30 z ostalimi (slika 14). Znova pa lahko potrdimo vpliv dodatka trsk Tanin Quercia AM MT na vzorec 30, ki se kaže v večji vrednosti AOP. V prvih štirinajstih dneh je prišlo do povečanja AOP vzorca vina z oznako 30, ki je najbrž zaradi ekstrakcije fenolnih spojin iz trsk v vino.



Slika 15: Spreminjanje AOP vzorcev vina z dodanim komercialnim sevom D254 v odvisnosti od časa zorenja

Spreminjanje AOP vzorcev vina z dodanim komercialnim sevom D254 je prikazan na sliki 15. AOP vina se je pri vseh vzorcih v prvih štirinajstih dneh zorenja na drožeh povečal, nato je sledilo njegovo postopno zmanjševanje. Zopet lahko potrdimo vpliv dodatka trsk iz hrastovega čipsa na povečanje AOP vina. Tudi za hranilo za kvasovke Maxaferm bi lahko rekli, da ima posreden vpliv na večji AOP vina vzorca 29, saj ga lahko kvasovke D254 bolje izrabljajo za rast in posledično tudi za tvorbo antioksidantov. V primeru vzorca 12 z dodatkom hranila Noblesse je bil namreč AOP vina nekoliko nižji.

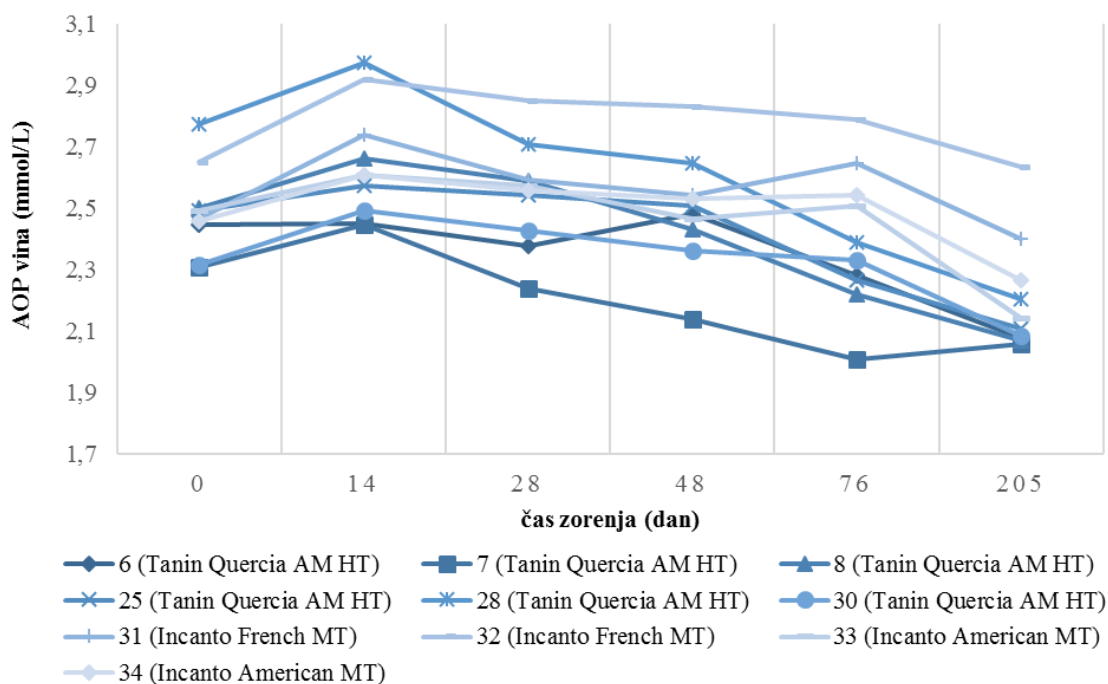
4.3.2 Primerjava spreminjanja antioksidativnega potenciala vina glede na dodatek trsk iz hrastovega lesa

Že v prejšnjem poglavju smo ugotovili, da dodatek trsk iz hrastovega lesa neposredno vpliva na večjo vsebnost koncentracije skupnih fenolnih spojin v vinu. Slika 16 prikazuje primerjavo vseh vzorcev, katerim so bile dodane trske iz hrastovega lesa. Pri primerjavi upoštevamo samo vpliv trsk iz hrastovega lesa, ne pa tudi dodatek starterskih kultur in hranil za kvasovke.

Zanima nas, ali na povečano vsebnost AOP vina vplivajo naslednji trije parametri:

- poreklo hrasta (trske, izdelane iz ameriškega ali iz francoskega hrasta)
- različna ožganost trsk: srednja stopnja ožganosti (ang. medium toasted - MT) in visoka ožganost (ang. heavy toasted – HT),
- dodatek različne količine trsk.

Vpliv stopnje ožganosti na nehlapne sestavine lesa - predvsem na elagotanine - se še proučuje. Elagotanini so fenolne spojine z veliko molekulsko maso, ki jim pripisujemo razne koristne biološke aktivnosti, kot so antioksidativni, estrogeni, protivnetni in protimikrobni učinek. Ožiganje lesa lahko namreč povzroči obširno razgradnjo elagotaninov in s tem prikrajša vina med zorenjem za obogatitev z večjo vsebnostjo funkcionalnih fitokemikalij. Kanaki in sod. (2015) so dokazali, da lahko že nizka stopnja ožganosti povzroči opazne spremembe v naravnem profilu lesnih elagotaninov. Hkrati pa med termično razgradnjo večjih polimerov lesa, kot so lignin in celuloza, nastajajo preprosti fenoli. Razgradnja elagotaninov je imela izrazit vpliv na antioksidativne lastnosti modelnega vina in se je odražala v slabšem lovljenju prostih radikalov. Med zorenjem vina z dodatki trsk iz hrastovega lesa se priporoča, da se ohranja razmerje med hlapnimi spojinami, ki nastajajo med ožiganjem lesa in vplivajo na senzorične lastnosti, ter med ohranitvijo lesnih elagotaninov, ki lahko obogatijo vino ne samo z aromatičnimi spojinami, ampak tudi povečajo njegovo hranilno vrednost (Kanakaki in sod., 2015).



Slika 16: Spreminjanje antioksidativnega potenciala vina glede na dodatek trsk iz hrastovega lesa

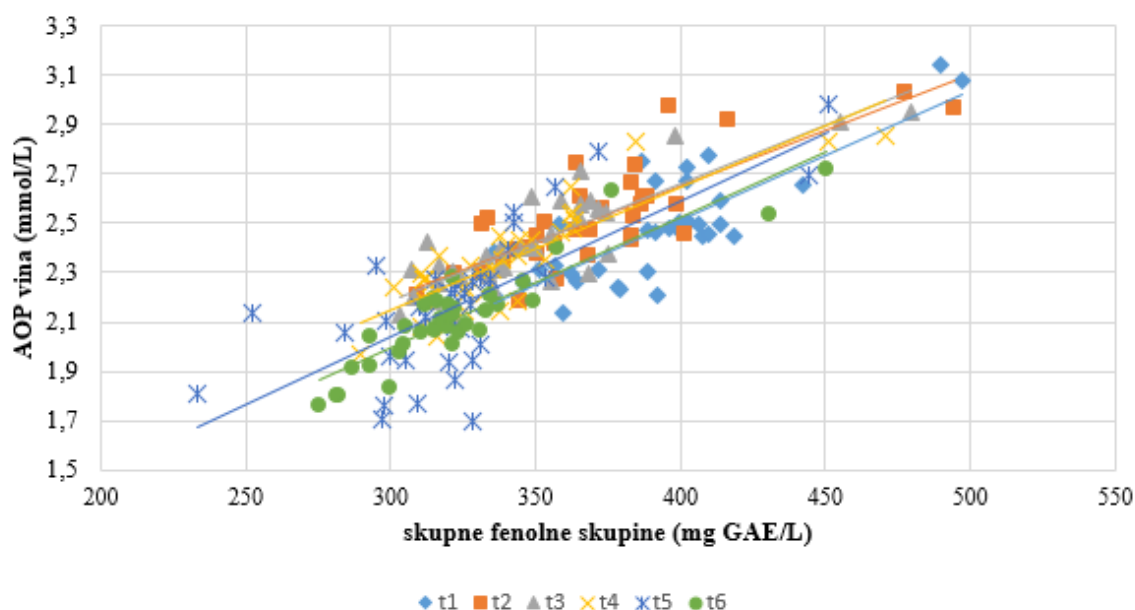
Iz slike 16 vidimo, da je bil antioksidativni potencial 205. dni zorenja vina na drožeh večji pri uporabi trsk s komercialnim imenom Incanto French MT (vzorca z oznako 31 in 32), ki so bile izdelane iz francoskega hrasta (vzorca z oznako 31 in 32). Že Cabrita in sod. (2011) so poročali o večji vsebnosti fenolnih spojin v trskah iz francoskega hrasta kot v trskah iz ameriškega hrasta.

Vzorcu vina z oznako 25 smo dodali 5 g/L trsk iz hrastovega lesa Tanin Quercia AM MT in je predstavljal največji dodatek trsk. Vzorcema z oznako 28 in 30 smo dodali 4 g/L trsk, vzorcema z oznako 31 in 32 3 g/L, preostalim vzorcem (6, 7, 8, 33 in 34) pa le 2 g/L trsk. Pričakovali bi, da bi prišlo do največje ekstrakcije fenolnih spojin v vino in s tem do večjega AOP vina pri vzorcu z oznako 25, ampak temu ni bilo tako. Tako da v našem primeru ne moremo trditi, da je imela količina dodatka trsk izrazit vpliv na porast AOP vina.

Primerjamo lahko tudi vpliv stopnje ožganosti trsk na AOP vina. Vzorci vina z dodanimi trskami Tanin Quercia AM HT (visoka stopnja ožganosti) so pričakovano imeli manjši antioksidativni potencial kot vzorci, kjer so bile uporabljene trske s srednjo stopnjo ožganosti (MT). Visoko ožgane trske sprostijo manj elagotaninov v primerjavi s srednje ožganimi trskami zaradi razgradnje elagotaninov.

4.4 ZVEZA MED SKUPNIMI FENOLNIMI SPOJINAMI IN AOP VINA

Slika 17 prikazuje zvezo med skupnimi fenolnimi spojinami in AOP vina sort laški rizling in sauvignon ter njeno spreminjanje s časom zorenja vina na drožeh.



Slika 17: Zveza med skupnimi fenolnimi spojinami in AOP vin sorte laški rizling in sauvignon ob različnih časih vzorčenja med zorenjem vina na drožeh

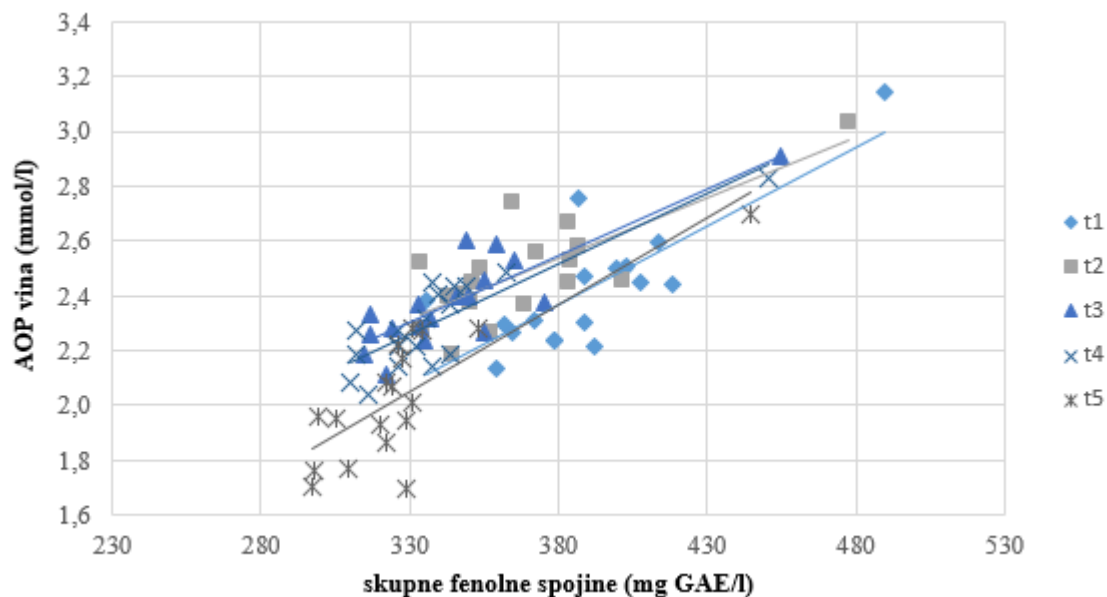
Preglednica 13: Koeficient korelacije (R^2) za vina sorte laški rizling in sauvignon ob različnih časih vzorčenja

Čas vzorčenja	Koeficient korelacije (R^2)
t ₁	0,6527
t ₂	0,6546
t ₃	0,7402
t ₄	0,7438
t ₅	0,5283
t ₆	0,8233

Zveza med skupnimi fenolnimi spojinami in AOP vina je med zorenjem na drožeh postajala tesnejša (z izjemo ob času vzorčenja t₅), kar pomeni, da je bil ob večji vsebnosti fenolnih spojin večji tudi antioksidativni potencial vina. Koeficient korelacije se je od začetka zorenja vina na drožeh zvišal iz 0,6527 na 0,8233. Takšni rezultati so bili pričakovani, saj so fenolne spojine najbolj znane spojine v živilih, ki imajo antioksidativen učinek.

Preglednica 14: Koeficient korelacije (R^2) za vina sorte laški rizling ob različnih časih vzorčenja

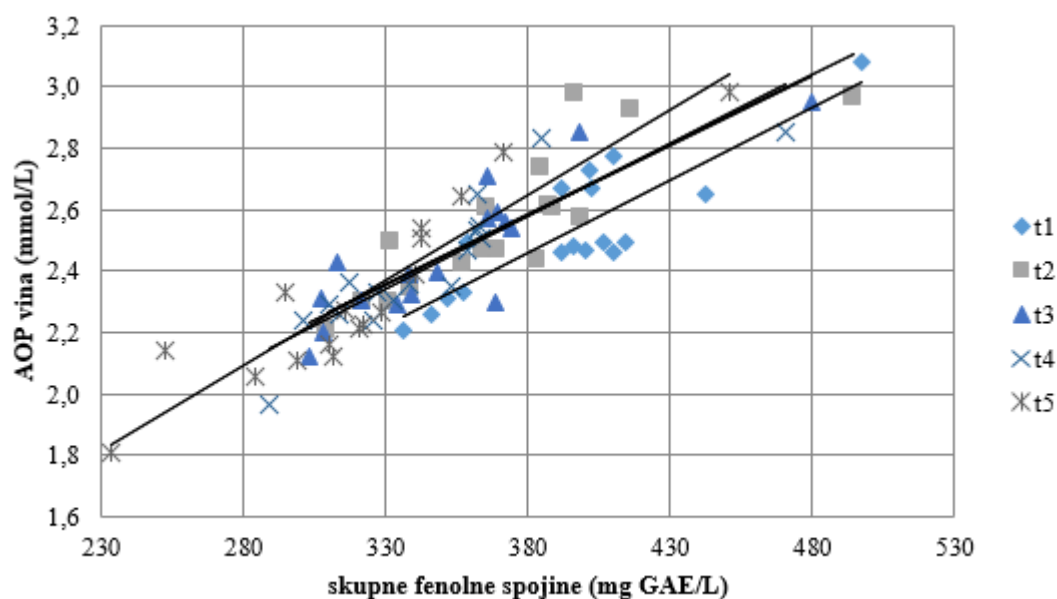
Čas vzorčenja	Koeficient korelacije (R^2)
t ₁	0,6538
t ₂	0,5850
t ₃	0,7224
t ₄	0,7398
t ₅	0,6530

**Slika 18: Zveza med skupnimi fenolnimi spojinami in AOP vin sorte laški rizling ob različnih časih vzorčenja med zorenjem vina na drožeh**

V nadaljevanju je s slikama 18 in 19 ter s preglednicama 14 in 15 predstavljena še tesnost zveze med vsebnostjo fenolnih spojin in AOP vina ločeno po vzorcih vina sorte laški rizling in sorte sauvignon.

Preglednica 15: Koeficient korelacije (R^2) za vina sorte sauvignon ob različnih časih vzorčenja

Čas vzorčenja	Koeficient korelacije (R^2)
t ₁	0,4690
t ₂	0,4989
t ₃	0,5552
t ₄	0,4908
t ₅	0,4116



Slika 19: Zveza med skupnimi fenolnimi spojinami in AOP vin sorte sauvignon ob različnih časih vzorčenja med zorenjem vina na drožeh

Linearna korelacija med AOP vina in vsebnosti fenolnih spojin je bila bolj tesna v primeru vzorcev vin sauvignon kot v vzorcih vin laški rizling. Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da je zveza med AOP vina in vsebnostjo fenolnih spojin delno odvisna od sortnih značilnosti, kar sta potrdila tudi Košmerl in Cigić (2008). Različne sorte grozdja imajo različno vsebnost skupnih in posameznih fenolnih spojin. Fenolna sestava določene sorte ima lahko različen vpliv na zvezo med AOP vina in vsebnostjo fenolnih spojin; fenolne spojine z večjim številom hidroksilnih (-OH) skupin in tiste, ki imajo hidroksilne skupine v *orto* pozicijah v aromatskih obročih, imajo večji antioksidativni potencial (Košmerl in Cigić, 2008).

4.5 ANTIOKSIDATIVNI POTENCIAL DROŽI

Za določanje antioksidativnega potenciala droži smo se poslužili metode znotrajcelične oksidacije kvasnih celic.

Vinske droži smo ob različnih časih vzorčenja pridobili tako, da smo odvzeli 10 mL vzorca vina, ga prenesli v 50-mL falkonko in centrifugirali 5 minut pri 4000 obratih na minuto. Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant, ki je predstavljal osnovo za fizikalno-kemijske analize vina, droži na dnu falkonke pa smo zamrznili pri temperaturi $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tik pred določanjem znotrajcelične oksidacije smo vzorce odtajali pri sobni temperaturi.

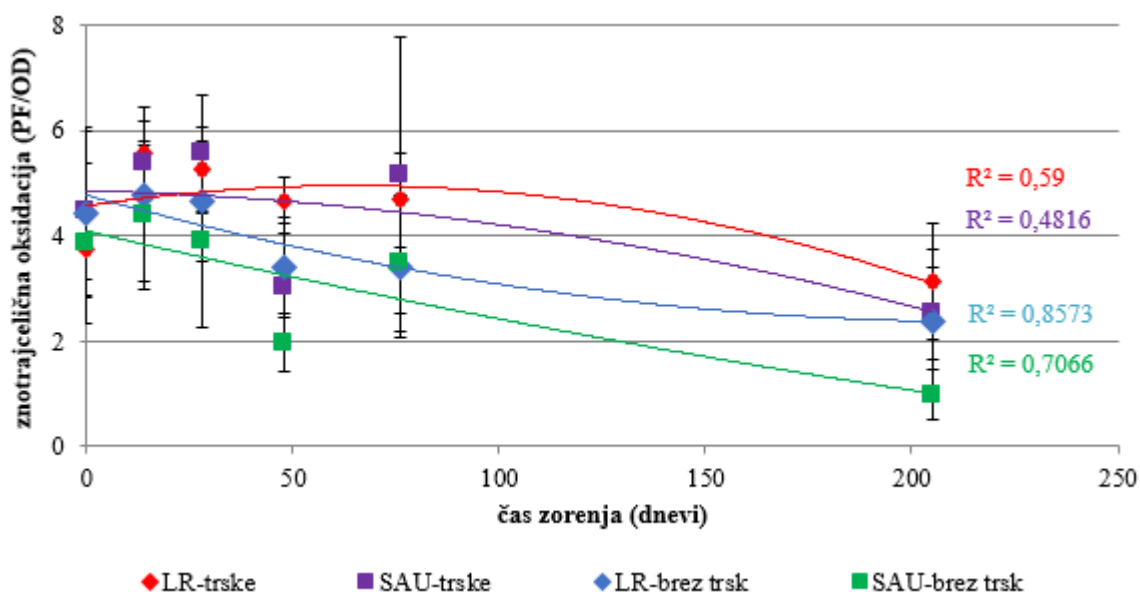
V Prilogi G1 in G2 so ločeno za vzorce vina sorte laški rizling in sorte sauvignon predstavljeni histogrami, ki prikazujejo razmerje med prirastom fluorescence in optično gostoto (PF/OD). Večja vrednost razmerja PF/OD pomeni večjo znotrajcelično oksidacijo in posledično manjši antioksidativni potencial droži.

V preglednici 16 so prikazane povprečne vrednosti in standardni odklon znotrajcelične oksidacije med zorenjem vina laški rizling in sauvignon. Povprečne vrednosti so prikazane za vse vzorce, za kontrolna vzorca, za vzorce z dodanimi trskami in za vzorce brez dodanih trsk.

Preglednica 16: Povprečne vrednosti in standardni odklon znotrajcelične oksidacije (PF/OD) med zorenjem vina laški rizling (LR) in sauvignon (SAU), in sicer pri kontrolnih vzorcih, vzorcih z dodatkom hrastovih trsk in brez dodatka hrastovih trsk

Skupina vzorcev/sorta	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆
vsi vzorci (N=35)	4,37 ± 1,58	5,13 ± 1,72	5,05 ± 1,98	3,29 ± 1,53	4,08 ± 1,83	2,25 ± 1,38
kontrolna vzorca (N=2)	7,06 ± 0,28	9,46 ± 1,03	10,92 ± 1,00	7,39 ± 1,57	6,80 ± 0,08	4,80 ± 0,98
LR (N=1)	6,86	8,73	10,21	6,28	6,86	4,10
SAU (N=1)	7,25	10,19	11,63	8,50	6,74	5,49
vzorci z dodanimi trskami (N=10)						
LR (N=3)	3,74 ± 0,57	5,58 ± 0,16	5,27 ± 0,81	4,67 ± 0,43	4,68 ± 0,89	3,13 ± 1,10
SAU (N=7)	4,46 ± 1,61	5,37 ± 0,79	5,55 ± 1,13	3,02 ± 1,03	5,15 ± 2,62	2,53 ± 0,88
vzorci brez dodanih trsk (N=23)						
LR (N=14)	4,41 ± 1,59	4,78 ± 1,65	4,64 ± 1,13	3,40 ± 0,94	3,42 ± 1,36	2,39 ± 1,37
SAU (N=9)	3,86 ± 1,51	4,39 ± 1,39	3,91 ± 1,65	1,96 ± 0,55	3,48 ± 1,30	0,98 ± 0,48

Iz povprečnih vrednosti znotrajcelične oksidacije vzorcev obeh sort vina težko opazimo trend spreminjanja oksidacije. Za kontrolna vzorca lahko z gotovostjo trdimo, da je bila v njunem primeru znotrajcelična oksidacija največja. Pri primerjavi vzorcev z dodanimi trskami in vzorcev brez dodanih trsk ne opazimo značilne razlike glede AOP vina.



Slika 20: Spreminjanje povprečne vrednosti znotrajcelične oksidacije s časom zorenja posebej za vino sorte laški rizling (LR) in sauvignon (SAU) ter z ali brez dodatka trsk iz hrastovega lesa

Zmanjšanje vrednosti znotrajcelične oksidacije med zorenjem vina smo podobno kot prej skupne fenolne spojine in AOP vina opisali s polinomom druge stopnje (slika 20). V posameznih skupinah vzorcev je koeficient korelacije izrazito manjši, kar kaže na nepovezanost oz. variiranje rezultatov. Razvidne pa so bistveno večje vrednosti koeficienta korelacije pri vzorcih brez dodanih trsk iz hrastovega lesa.

V nadaljevanju smo z Duncanovim testom preverili, ali so nihanja vrednosti znotrajcelične oksidacije glede na čas zorenja vina statistično značilna (preglednica 17).

Preglednica 17: Rezultati Duncanovega testa za vrednost znotrajcelične oksidacije pri obeh sortah vina ob različnih časih vzorčenja

Čas vzorčenja	N	Razred ($\alpha \geq 0,05$)			
		a	b	c	d
t ₁	33			4,2097	4,2097
t ₂	33				4,8688
t ₃	33				4,6906
t ₄	33		3,0388		
t ₅	33			3,9158	
t ₆	33	2,1006			
Sig.		1,000	1,000	0,396	0,072

Legenda: a, b, c, d - različne črke označujejo razrede s statistično značilno razliko; α – stopnja tveganja; N – število vzorcev; sig.– stopnja značilnosti

Pri Duncanovem testu za vrednost znotrajcelične oksidacije smo pri obeh sortah vina dobili štiri statistične razrede, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo. Povprečna vrednost

znotrajcelične oksidacije se v a in b razredu statistično značilno razlikuje od ostalih vzorcev. Vrednost znotrajcelične oksidacije se pri prvih treh časih vzorčenja statistično značilno ne razlikuje, pride pa do statistično značilne razlike pri času vzorčenja t_4 , kjer se znotrajcelična oksidacija zmanjša. Ob času vzorčenja t_5 je vrednost znotrajcelične oksidacije zopet narasla in se ob zadnjem vzorčenju statistično značilno zmanjšala.

Preglednica 18: Test medsebojnih interakcij časa zorenja, sorte vina in dodatka trsk na znotrajcelično oksidacijo

Odvisna spremenljivka		Znotrajcelična oksidacija				
Vir		Vsota kvadratov	df	Povprečna vrednost - kvadrat	F-vrednost	Stopnja značilnosti
čas	hipoteza	130,651	5	26,130	15,898	0,004
	napaka	8,218	5	1,644 ^b		
sorta	hipoteza	7,511	1	7,511	2,445	0,362
	napaka	3,073	1	3,073 ^c		
trske	hipoteza	33,786	1	33,786	7,945	0,119
	napaka	7,673	1,804	4,253 ^d		
čas * sorta	hipoteza	14,484	5	2,897	6,250	0,033
	napaka	2,317	5	0,463 ^e		
čas * trske	hipoteza	8,218	5	1,644	3,546	0,096
	napaka	2,317	5	0,463 ^e		
sorta * trske	hipoteza	3,073	1	3,073	6,629	0,050
	napaka	2,317	5	0,463 ^e		
čas * sorta * trske	hipoteza	2,317	5	0,463	0,266	0,931
	napaka	303,681	174	1,745 ^f		

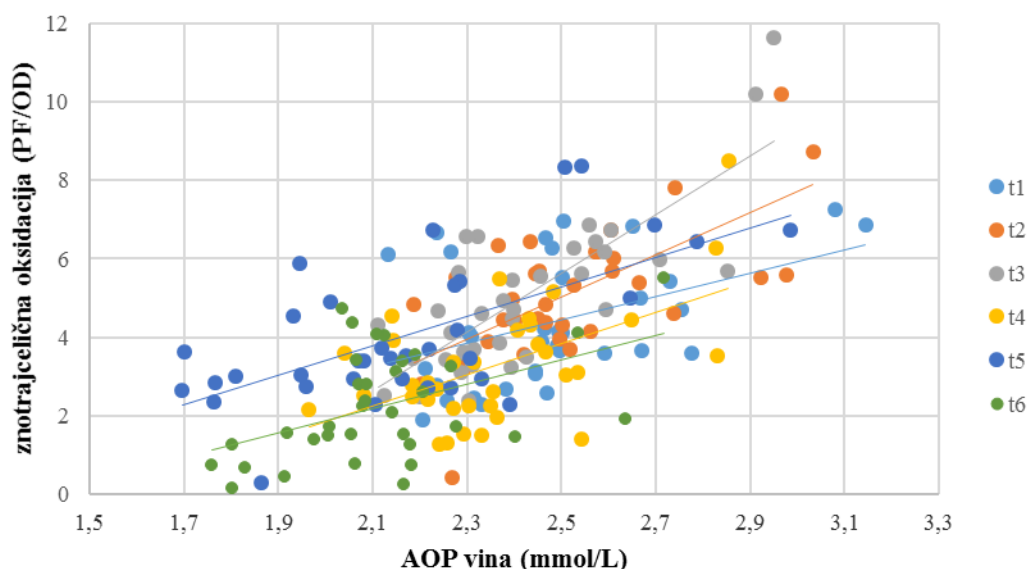
Legenda: ^{a, b, c, d, e, f} - različne črke označujejo statistično značilno razliko; df – stopinja prostosti

Na znotrajcelično oksidacijo značilno vplivata dve dvojni interakciji, in sicer čas*sorta in sorta*trske, kar pomeni, da se s časom znotrajcelična oksidacija spreminja drugače pri sorti sauvignon kot pri sorti laški rizling, prav tako pa na ta parameter dodatek trsk drugače vpliva pri sorti sauvignon kot pri sorti laški rizling (preglednica 18).

Rezultati torej kažejo na konstanten nivo oksidacije v celicah prva tri vzorčenja, tekom zadnjih treh vzorčenj pa so bila prisotna nihanja, ki so v povprečju nakazovala trend rahlega znižanja oksidacije. Slednje lahko kaže na prisotnost vse večjega števila mrtvih celic v drožeh ob koncu zorenja in s tem manjšo aktivnost esteraz, ki so ključne za pretvorbo barvila v obliki estra H_2DCFDA v H_2DCF in posledično DCF v primeru oksidacije, kar izmerimo v obliki fluorescence.

4.6 ZVEZA MED AOP VINA IN ZNOTRAJCELIČNO OKSIDACIJO

Po določitvi AOP vina in AOP droži nas je še zanimalo, v kakšni odvisnosti sta AOP vina in AOP droži. Pričakujemo, da mora med njima obstajati zveza, saj vse sproščene komponente v primeru avtolize kvasovk prehajajo v vino.



Slika 21: Zveza med AOP vina in znotrajcelično oksidacijo vinskih droži

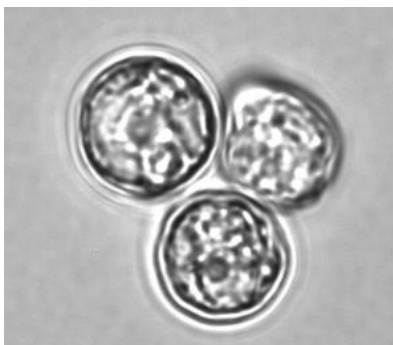
Preglednica 19: Koeficient korelacije (R^2) med AOP vina in znotrajcelično oksidacijo vinskih droži

Čas vzorčenja	Koeficient korelacije (R^2)
t ₁	0,1855
t ₂	0,4452
t ₃	0,6145
t ₄	0,2974
t ₅	0,398
t ₆	0,2261

Grafični prikaz zveze med AOP vina in AOP droži predstavlja slika 22. V preglednici 19 so predstavljeni koeficienti korelacije (R^2) zveze med AOP vina in znotrajcelično oksidacijo droži. Tesnost zveze je bila na začetku po zaključeni alkoholni fermentaciji ohlapna, z naslednjima dvema vzorčenjema pa se je tesnost zveze okrepila – iz 0,1855 je v času t₂ narasla na 0,4452 in v času t₃ na 0,6145. To nam pove, da je bila pri večji znotrajcelični oksidaciji v vinskih drožeh večja vrednost AOP vina. Oksidativni stres je bil prisoten v celicah, vendar predvidevamo, da na začetku zorenja še ni vplival na AOP vina. Glede na tesnost zveze, ki se je od časa vzorčenja t₄ znatno zmanjšala, predvidevamo, da je prišlo do avtolize kvasovk in posledično do manjše korelacije.

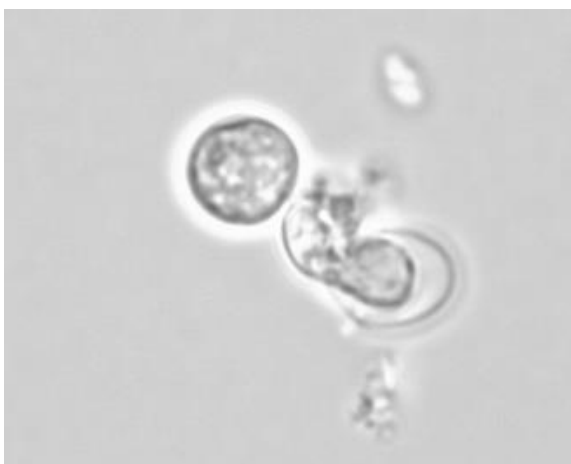
4.7 MIKROBIOLOŠKI PREGLED DROŽI

Mikrobiološki pregled droži smo opravili ob času vzorčenja t_5 . Večina kvasnih celic je imela znotraj granulirano strukturo, kar nakazuje na to, da so v stacionarni fazi rasti oz. v fazi odmiranja in avtolize.



Slika 22: Mikroskopski pregled droži vzorca 2 pri 1000x povečavi

Večina kvasovk v vzorcih je bila 76. dan zorenja vina videti tako, kot prikazuje slika 23. Oblika kvasnih celic je nepravilno okrogla. Notranjost kvasnih celic je granulirana in celična stena je nekoliko nagubana.



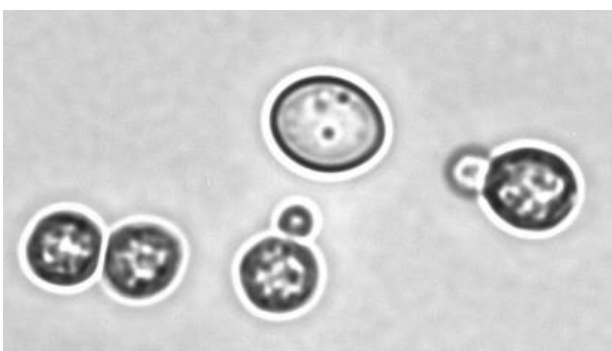
Slika 23: Mikroskopski pregled droži vzorca 19 pri 1000x povečavi

Na sliki 24 je prikazano, kako se celična vsebina kvasne celice izliva v medij (vino). Celična stena pri tem še vedno ohrani svojo obliko in se ne razgradi. Pri vzorcu 19 je potekala spontana fermentacija in pri pregledu droži smo opazili, da je približno polovica pregledanih droži bila nepoškodovanih, polovica pa poškodovanih. To je možno zaradi tega, ker je pri tem vzorcu manjša vsebnost etanola in ta v manjši količini ni deloval inhibitorno na njih. Kljub granulirani notranjosti in poškodovanosti kvasnih celic pa smo opazili tudi še brsteče celice (slika 25).



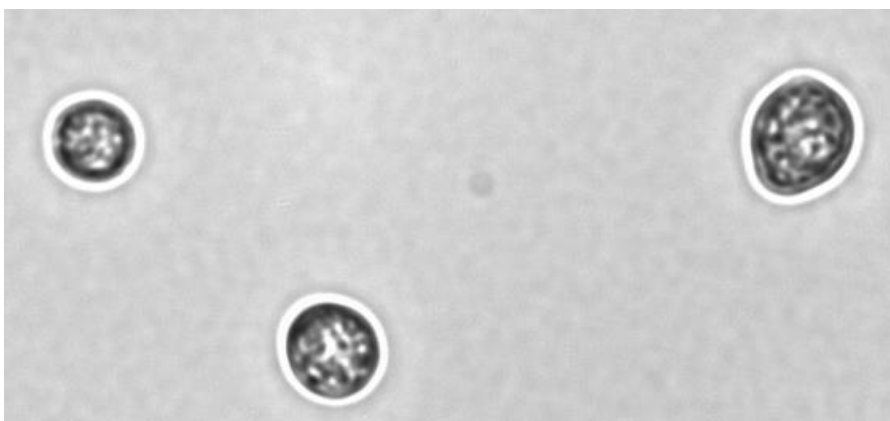
Slika 24: Mikroskopski pregled droži vzorca 13 pri 1000x povečavi

Na sliki 26 so prikazane kvasovke vzorca 30 (LVL1+LVL2). Pri tem vzorcu je bila uporabljena kombinacija kvasovk vrste *Torulaspora delbrueckii* in kvasovk vrste *Saccharomyces cerevisiae*. Predvidevamo, da manjše celice, katere so imele tudi vse brez izjeme granulirano notranjost, prikazujejo kvasovke vrste *Torulaspora delbrueckii*. Kvasovke vrste *S. cerevisiae* so bile ovalne oblike in večina brez granulirane notranjosti.



Slika 25: Mikroskopski pregled droži vzorca 30 pri 1000x povečavi

Na sliki 27 vidimo kvasne celice vzorca 35 (komercialni sev 71B), ki so po velikosti najmanjše od vseh drugih pregledanih droži. Če primerjamo z rezultati analiz, lahko vidimo, da je imel ta vzorec tudi najmanjšo vsebnost fenolnih spojin in najmanjšo vrednost AOP vina.



Slika 26: Mikroskopski pregled droži vzorca 35 pri 1000x povečavi

5 SKLEPI

Glede na dobljene rezultate analiz med zorenjem vina sorte laški rizling in sauvignon lahko dve hipotezi potrdimo, eno potrdimo le delno in eno zavrnamo:

- Hipoteza 1: predpostavljali smo, da bo večja vsebnost fenolnih spojin prispevala k večji vrednosti antioksidativnega potenciala (AOP) vina, saj fenolne spojine delujejo kot antioksidanti. Izkazalo se je, da je večja vsebnost fenolnih spojin res prispevala k večji vrednosti AOP vina, kar smo grafično prikazali tudi z zvezo med njima. S časom zorenja vina na drožeh je bila zveza vse bolj tesna.
- Hipoteza 2: potrdimo lahko tudi hipotezo, da dodatek trsk iz hrastovega lesa vzorcem mošta v predfermentativni fazi prispeva k večji vrednosti AOP vina. Za posebej učinkovite so se izkazale trske iz hrastovega lesa s srednjo stopnjo ožganosti (MT).
- Hipoteza 3: predvidevali smo, da bosta AOP vina in vinskih droži ob zaključku alkoholne fermentacije največja in da se bosta s časom zorenja postopoma zmanjševala. V primeru AOP vina lahko potrdimo hipotezo, kar smo preverili tudi z Duncanovim testom. AOP vinskih droži pa je bil pri prvih treh vzorčenjih najmanjši, nato pa se je pri zadnjih treh vzorčenjih povečeval. Hipotezo 3 lahko delno potrdimo.
- Hipoteza 4: pričakovali smo pozitivno korelacijo med AOP droži in AOP vina, dobili pa smo pozitivno korelacijo med AOP vina in znotrajcelično oksidacijo. Med zorenjem vina na drožeh je pri prvih treh vzorčenjih potekala konstantna znotrajcelična oksidacija, pri zadnjih treh vzorčenjih pa se je pokazal trend rahlega znižanja oksidacije oz. rahlega povečanja AOP droži. Medtem se je AOP vina s časom zorenja konstantno zmanjševal. Hipotezo lahko v celoti zavrnamo.

6 POVZETEK

Z izbrano temo magistrskega dela smo želeli ugotoviti, kako se spreminjajo različni parametri med zorenjem vina na drožeh. Spremljali smo vsebnost fenolnih spojin, vrednost antioksidativnega potenciala vina in antioksidativnega potenciala vinskih droži. Ker smo imeli več vzorcev, pri katerih smo v mošt dodali komercialni sev kvasovk, hranilo za kvasovke in trske iz hrastovega lesa, smo lahko določili še vpliv enoloških dodatkov na spreminjanje parametrov med zorenjem vina na drožeh.

Za izvedbo poskusa smo uporabili mošta sorte laški rizling in sauvignon, letnika 2015, ki predhodno nista bila žveplana. V predfermentativni fazi smo v vzorce mošta inokulirali komercialni sev kvasovk, ponekod še hranila za kvasovke in trske iz hrastovega lesa. Dva vzorca sta nam služila kot kontroli, saj jima nismo dodali nobenih enoloških sredstev.

Po zaključeni alkoholni fermentaciji je sledilo šestmesečno zorenje vina na drožeh. Vino smo po končani alkoholni fermentaciji prelili v plastenke in prenesli v hladilnico, kjer je potekalo zorenje vina na temperaturi 4 °C. Med zorenjem vina na drožeh smo šestkrat vzorčili in pri tem še premešali oz. dvignili droži, da ne bi prišlo do nastanka reduktivnih vonjav zaradi odsotnosti kisika.

Spremembe, do katerih je prišlo med zorenjem vina na drožeh, so bile bolj ali manj pričakovane. Vsebnost skupnih fenolnih spojin se je s časom zorenja zmanjševala zaradi postopne oksidacije fenolnih spojin. Ker delujejo fenolne spojine zaradi hidroksilnih (-OH) skupin kot antioksidanti in ker pride zaradi oksidacije fenolnih spojin do izgub reaktivnih hidroksilnih skupin, se posledično zmanjšuje vrednost antioksidativnega potenciala. Zaključimo lahko, da se je med zorenjem vina na drožeh antioksidativni potencial vina zmanjševal.

Ob primerjavi vzorcev z dodanimi trskami iz hrastovega lesa in ostalimi je razvidno, da so prvi imeli večjo vsebnost fenolnih spojin in posledično tudi večji antioksidativni potencial. Ker smo uporabili trske različne stopnje ožganosti, smo lahko primerjali tudi vpliv stopnje ožganosti trsk na ekstrakcijo fenolnih spojin oz. na povečanje antioksidativnega potenciala. Izkazalo se je, da je bil večji antioksidativni potencial vina ob dodatku trsk s srednjo stopnjo ožganosti. To gre pripisati obsežnejši razgradnji elagotaninov v primeru visoke stopnje ožganosti trsk v primerjavi s srednjo stopnjo ožganosti.

Med zorenjem vina na drožeh nas je zanimalo tudi, kakšne spremembe se odvijajo v vinskih drožeh. Spremljali smo znotrajcelično oksidacijo droži, do katere pride zaradi prisotnosti raztopljenega kisika v vinu in vodi do nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti v celicah. Kvasovke se lahko v določeni meri branijo pred reaktivnimi zvrstmi z endogeno

antioksidativno obrambo. Rezultati kažejo na konstanten nivo oksidacije v celicah prva tri vzorčenja, tekom zadnjih treh vzorčenj pa so bila prisotna nihanja, ki so v povprečju nakazovala trend rahlega znižanja oksidacije v celicah.

7 VIRI

- Alexandre H. 2011. Autolysis of yeasts. V: *Comprehensive biotechnology: Vol. 2. Engineering fundamentals of biotechnology*. 2nd ed. Moo-Young M. (ed.). Burlington, Academic Press: 641-649
- Alexandre H., Heintz D., Chassagne D., Guilloux-Benatier M., Charpentier C., Feuillat M. 2001. Protease A activity and nitrogen fractions released during alcoholic fermentation and autolysis in enological conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26: 240-255
- Bautista R., Fernández E., Falqué E. 2007. Effect of the contact with fermentation-lees or commercial-lees on the volatile composition of white wines. *European Food Research Technology*, 224: 405-413
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28: 25-30
- Bueno J.E., Peinado R.A., Medina M., Moreno J. 2006. Effect of a short contact time with lees on volatile composition of Airen and Macabeo wines. *Biotechnology Letters*, 28: 1007-1011
- Butzke C. 2010. Particular wine quality issues. V: *Winemaking problems solved*. Butzke C.E. (ed.). Cambridge, Woodhead Publishing: 345-386
- Cabrita M.J., Barrocas Dias C., Costa Freitas A.M. 2011. Phenolic acids, phenolic aldehydes and furanic derivatives in oak chips: American vs. French oaks. *South African Journal for Enology and Viticulture*, 32, 2: 204-210
- Charpentier C. 2010. Ageing on lees (sur lies) and the use of speciality inactive yeasts during wine fermentation. V: *Managing wine quality. Vol. 2: Oenology and wine quality*. Reynolds A.G. (ed.). Cambridge, Woodhead Publishing: 164-187
- Council Regulation (EEC) No 337/79 of 5 February 1979 on the common organization of the market in wine. 1979. *Official Journal of the European Union*, L54: 1-47
- Davies K.J.A. 1986. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: an hypothesis. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*, 2, 3: 155-173

- Doco T., Vuchot P., Cheynier V., Moutounet M. 2003. Structural modification of wine arabinogalactans during aging on lees. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54: 150-157
- Fornairon-Bonnefond C., Camarasa C., Moutounet M., Salmon J.-M. 2002. New trends on yeast autolysis and wine ageing on lees: a bibliographic review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 36, 2: 49-69
- Jakubowski W., Bartosz G. 1997. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29, 11: 1297-1301
- Jakubowski W., Bilinski T., Bartosz G. 2000. Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28, 5: 659-664
- Kanakaki E., Siderakou D., Kallithraka S., Kotseridis Y., Makris D.P. 2015. Effect of degree of toasting on the extraction pattern and profile of antioxidant polyphenols leached from oak chips in model wine systems. *European Food Research and Technology*, 240, 5: 1065-1074
- Kedare S.B., Singh R.P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48, 4: 412-422
- Kilmartin P.A. 2010. Understanding and controlling non-enzymatic wine oxidation. V: *Managing wine quality*. Reynolds A.G. (ed.). Cambridge, Woodhead Publishing: 432-458
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21
- Košmerl T., Cigić B. 2008. Antioxidant potential and phenolic composition of white and red wines. *Le Bulletin de l'OIV*, 81: 251-259
- Košmerl T., Kač M. 2010. Kemijske analize in postopki čiščenja vina: laboratorijske vaje pri izbirnem predmetu Vinarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 72 str.

- Lavigne V., Dubourdieu D. 1996. Demonstration and interpretation of the yeast lees ability to absorb certain volatile thiols contained in wine. *Journal of International Science Vigne Vin*, 30: 201-206
- Lužar J., Jug T., Jamnik P., Košmerl T. 2016. Comparison of total polyphenols content and antioxidant potential of wines from 'Welschriesling' and 'Sauvignon Blanc' varieties during ageing on fine lees. *Acta Agriculturae Slovenica*, 107: 473-482
- Marchal R., Jeandet P. 2010. Use of enological additives for colloid and tartrate salt stabilization in white wines and for improvement of sparkling wine foaming properties. V: *Wine chemistry and biochemistry*. Moreno-Arribas M.V., Polo M.C. (eds.). New York, Springer: 127-160
- Martinez-Rodriguez A.J., Polo M.C., Carrascosa A.V. 2001. Structural and ultrastructural changes in yeast cells during autolysis in a model wine system and in sparkling wines. *International Journal in Food Microbiology*, 71: 45-51
- Mataix E., Luque de Castro M.D. 2001. Simultaneous (or sequential) determination of the total polyphenol index (or I280) and density in wines by flow injection. *Analyst*, 126: 251-255
- McClanahan C. 2009. Antifungals. Bratislava, Sigma-Aldrich Co.: 1 str.
<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/antifungals.html>
(januar 2017)
- Moine-Ledoux V., Perrin A., Paladin I., Dubourdieu D. 1997. Premiers résultats de stabilisation tartrique des vins par addition de mannoprotéines purifiées (MANNOSTAB). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 331, 1: 23-31
- Pérez-Serradilla J.A., Luque de Castro M.D. 2008. Role of lees in wine production: a review. *Food Chemistry*, 111: 447-456
- Pueyo E., Martínez-Rodríguez A., Polo M.C., Santa-María G., Bartolomé B. 2000. Release of lipids during yeast autolysis in a model wine system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 116-122
- Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donéche B., Lonvaud A. 2006a. Handbook of enology. Vol. 1: The microbiology of wine and vinifications. 2nd ed. Chichester, Wiley: 497 str.

- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. 2006b. Handbook of enology. Vol. 2: The chemistry of wine, stabilization and treatments. 2nd ed. Chichester, Wiley: 441 str.
- Salmon J.-M., Fornairon-Bonnefond C., Mazauric J.-P., Moutounet M. 2000. Oxygen consumption by wine lees: impact on lees integrity during wine ageing. Food Chemistry, 71: 519-528
- Serafini M., Maiani G., Ferro-Luzzi A. 1998. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. Journal of Nutrition, 128, 6: 1003-1007
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamucla-Raventos R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, 299: 152-178
- Tao Y., García J.F., Sun D. 2014. Advances in wine aging technologies for enhancing wine quality and accelerating wine aging process. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 54: 817-835
- Vidal S., Williams P., Doco T., Moutounet M., Pellerin P. 2003. The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. Carbohydrate Polymers, 54, 4: 439-447
- Zhao J., Fleet G.H. 2005. Degradation of RNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* produces predominantly ribonucleotides. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 9: 415–423

ZAHVALA

Na prvem mestu se želim zahvaliti mentorici prof. dr. Tatjani Košmerl za vso strokovno pomoč, pridobljene izkušnje, hitro odzivnost, nasvete in vzpodbudne besede pri pisanju magistrskega dela.

Zahvalila bi se tudi somentorici prof. dr. Poloni Jamnik za temeljit pregled magistrskega dela in Zdenki Zupančič za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela.

Iskrena zahvala gre tudi moji družini in prijateljem, ki so me skozi študijska leta podpirala in verjeli vame. Na tem mestu bi se še posebej zahvalila Mariji Počivavšek za vsestransko pomoč med študijem in pri nastajanju magistrskega dela ter za vse napotke, ki so mi olajšali študij.

Klemen, najlepša hvala za podporo - predvsem v trenutkih, ko je bilo najtežje in ko sem jo najbolj potrebovala. Hvala za potrpežljivost in za bodrenje tekom pisanja magistrskega dela.

PRILOGE

Priloga A: Osnovni fizikalno-kemijski parametri mošta sorte sauvignon in mošta sorte laški rizling, letnika 2015, dobljeni z WineScan (WSC) analizo na Kmetijsko gozdarskem zavodu Nova Gorica

Parameter	Enota	Mošt sorte sauvignon	Mošt sorte laški rizling
Relativna gostota	/	1,0861	1,0862
Sladkorna stopnja	°Oe	86,1	86,2
Sladkorna stopnja	°Brix	20,31	20,32
Skupne kisline	g/L, kot vinska kislina	5,13	5,15
pH	/	3,47	3,47
Jabolčna kislina	g/L	2,7	2,73
Vinska kislina	g/L	3,23	3,26
FAN	mg/L	139,35	139,01
Vsota GLU+FRU	g/L	202,84	203,4
OD 280	/	327	325,2
Hlapne kisline	g/L, kot očetna kislina	0,13	0,13
FC indeks	/	0,13	0,13
Amonijak	mg/L	108	104
Kalij	mg/L	1281	1334
Etanol	vol. %	0,58	0,58
Glicerol	g/L	0	0
Etil acetat	mg/L	0	0
Mlečna kislina	g/L	0,09	0,2
Manitol	mg/L	0,04	0,05
3-metil-butanol	mg/L	0,1	0,11
Sorbitol	mg/L	0,08	0,08
Acetaldehid	mg/L	0,21	0,23
Glukoza	g/L	109,98	110,2
Fruktoza	g/L	106,6	106,79

Priloga B1: Dodana enološka sredstva (suhe aktivne kvasovke, komercialna hranila in trske iz hrastovega lesa) moštu sorte laški rizling

Oznaka vzorca	Komercialno ime kvasovke	Hranilo za kvasovke	Drugi dodatki
1	/	/	/
2	ICV OKAY (25 g/hL)	/	/
3	ICV OKAY (25 g/hL)	RESKUE (40 g/hL)	/
4	ICV OKAY (25 g/hL)	RESKUE (40 g/hL)	LAB Omega (1 g/hL)
5	71B (30 g/hL)	NOBLESSE (30 g/hL)	
6	228 (30 g/hL)	GO-FERM (30 g/hL)	Čips TANIN QUERCIA (200 g/hL)
7	CROSS EVOLUTION (25 g/hL)	SUPERVIT (30 g/hL)	Čips TANIN QUERCIA (200 g/hL)
8	CROSS EVOLUTION (25 g/hL)	REDULESS (23 g/hL)	Čips (200 g/hL)
9	RHONE 2056 (32 g/hL)	OPTIMUM WHITE (30 g/hL)	/
10	ANCHOR ALCHEMY I (30 g/hL)	FERMAID E blanc (35 g/hL)	/
11	228 (30 g/hL)	SUPERVIT (20 g/hL)	/
12	D254 (30 g/hL)	NOBLESSE (30 g/hL)	/
13	CEG (30 g/hL)	FERMAID E blanc (35 g/hL)	/
14	299 (30 g/hL)	INOFORM (20 g/hL)	/
15	CM (35 g/hL)	OPTIMUM WHITE (25 g/hL)	/
16	EC-1118 (40 g/hL)	NATUFERM (40 g/hL)	/
17	CM (30 g/hL)	FERMAID E (35 g/hL)	/
18	CM (35 g/hL)	OPTIMUM WHITE (25 g/hL)	/

Priloga B2: Dodana enološka sredstva (suhe aktivne kvasovke, komercialna hranila in trske iz hrastovega lesa) moštu sorte sauvignon

Oznaka vzorca	Komercialno ime kvasovke	Hranilo za kvasovke	Drugi dodatki
19	/	/	/
20	ICV OKAY (25 g/hL)	/	/
21	ICV OKAY (25 g/hL)	RESKUE (40 g/hL)	/
22	ICV OKAY (25 g/hL)	RESKUE (40 g/hL)	LAB Omega (1 g/hL)
23	71B (33 g/hL)	OPTIMUM WHITE (30 g/hL)	/
24	228 (40 g/hL)	FERMAID E (40 g/hL)	/
25	228 (40 g/hL)	FERMAID E (40 g/hL)	Čips TANIN QUERCIA (500 g/hL)
26	LVL1 (25 g/hL) + LVL2 (25 g/hL)	OPTIWHITE (30 g/hL)	/
27	LVL1 (25 g/hL) + LVL2 (25 g/hL)	CX ACTIVE (25 g/hL)	/
28	D254 (30 g/hL)	MAXAFERM (55 g/hL)	Čips TANIN QUERCIA (400 g/hL)
29	D254 (30 g/hL)	MAXAFERM (55 g/hL)	/
30	LVL1 (25 g/hL) + LVL2 (25 g/hL)	FERMAID E blanc (25 g/hL)	Čips AM. MT+ (4 g/L)
31	CM (30 g/hL)	FERMAID E (37 g/hL)	Čips INCANTO FRENCH MT+ (3 g/L)
32	CM (30 g/hL)	NATUFERM (30 g/hL)	Čips INCANTO FRENCH MT+ (3 g/L)
33	CM (35 g/hL)	OPTIMUM WHITE (30 g/hL)	Čips INCANTO AMERICAN (2 g/L)
34	CM (35 g/hL)	OPTIMUM WHITE (30 g/hL)	Čips INCANTO AMERICAN (2 g/L)
35	71B (35 g/hL)	FERMAID E blanc (35 g/hL)	/

Priloga C1: Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L) ob različnih časih vzorčenja (od t1 do t6) med zorenjem vina na drožeh

Vzorec	Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L)					
	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆
1	489,4	477,4	454,9	450,8	444,6	430,7
2	391,9	372,9	345,4	335,3	327,6	322,2
3	388,9	353,4	332,9	326,3	322,1	310,7
4	386,4	364,4	348,9	337,8	331,1	321,2
5	335,4	333,4	316,9	311,8	299,5	282,2
6	407,9	401,4	375,4	362,8	353,1	319,7
7	371,9	350,9	334,9	337,8	331,1	323,2
8	399,4	383,4	358,9	344,8	325,8	315,2
9	378,4	350,4	336,9	325,8	324,1	326,2
10	361,9	333,9	314,4	310,3	305,4	321,2
11	402,9	386,9	364,9	348,8	334,1	314,7
12	359,4	342,9	321,9	312,3	297,6	287,2
13	413,9	383,9	355,4	339,8	320,1	293,2
14	418,4	383,4	355,4	343,8	328,6	337,2
15	388,4	368,4	349,9	343,8	328,6	321,2
16	401,9	347,9	316,4	315,8	297,1	315,2
17	378,9	344,4	323,9	311,1	309,0	304,2
18	364,4	357,4	333,4	332,3	322,1	320,2
19	497,4	494,4	479,4	470,8	451,1	450,2
20	402,4	368,9	348,4	338,3	320,6	316,2
21	401,9	364,4	333,9	325,8	310,1	349,2
22	391,4	356,9	337,9	327,3	315,6	311,7
23	358,4	338,9	321,4	313,8	298,6	275,2
24	395,9	383,4	368,4	353,3	322,2	303,2
25	413,9	398,9	374,4	363,8	328,6	317,7
26	356,9	321,9	307,9	301,3	284,1	281,2
27	345,9	331,4	307,4	310,3	252,6	293,2
28	409,9	396,4	365,9	362,3	340,6	334,2
29	391,4	365,9	338,9	332,3	311,7	331,2
30	351,4	331,9	312,9	316,8	294,9	305,2
31	400,4	384,4	368,9	362,8	356,6	357,7
32	442,4	416,4	397,9	384,8	371,6	376,2
33	406,4	388,9	365,9	358,8	342,6	332,7
34	409,9	387,4	371,9	362,3	342,6	345,7
35	335,9	309,4	302,9	289,3	233,1	299,7

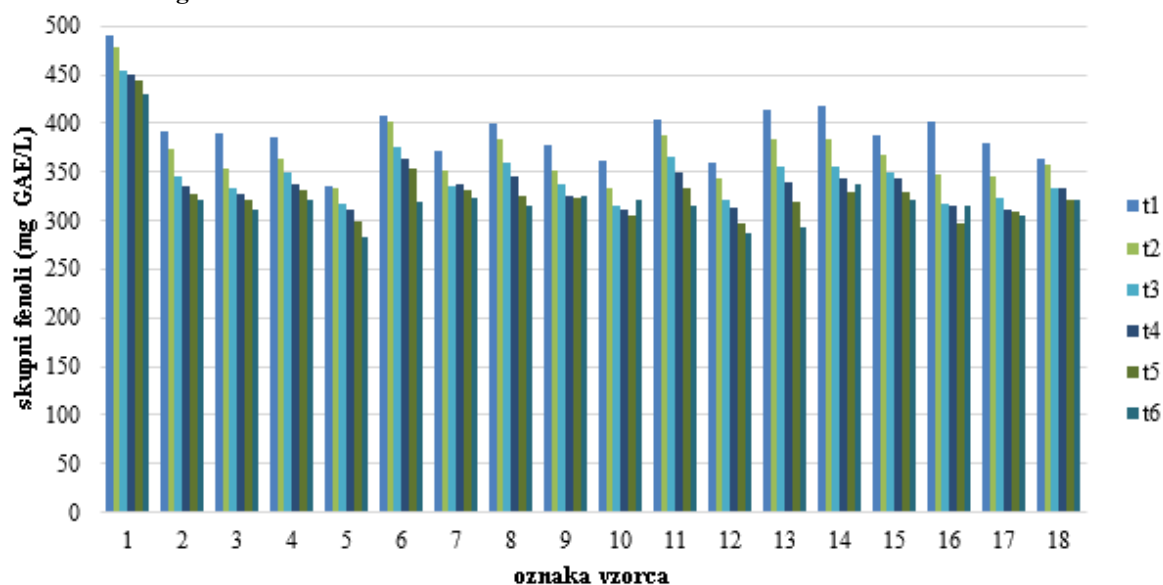
Priloga C2: Antioksidativni potencial vina (mmol/L) ob različnih časih vzorčenja (od t1 do t6) med zorenjem vina na drožeh

Vzorec	AOP vina (mmol/L)					
	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆
1	3,14	3,03	2,91	2,83	2,70	2,54
2	2,21	2,56	2,40	2,31	2,17	2,15
3	2,47	2,50	2,37	2,22	2,08	2,06
4	2,75	2,74	2,60	2,45	2,28	2,28
5	2,38	2,52	2,26	2,27	1,96	1,80
6	2,45	2,45	2,38	2,48	2,28	2,08
7	2,31	2,45	2,24	2,14	2,01	2,06
8	2,50	2,66	2,59	2,43	2,22	2,07
9	2,24	2,38	2,31	2,14	2,07	2,09
10	2,29	2,28	2,19	2,08	1,95	2,01
11	2,50	2,58	2,53	2,43	2,27	2,19
12	2,13	2,40	2,11	2,18	1,76	1,91
13	2,59	2,53	2,46	2,41	1,93	2,04
14	2,44	2,45	2,27	2,19	1,70	2,16
15	2,30	2,37	2,40	2,37	1,95	2,13
16	2,50	2,40	2,33	2,04	1,70	2,07
17	2,24	2,19	2,28	2,27	1,77	2,01
18	2,26	2,27	2,29	2,22	1,87	2,17
19	3,08	2,97	2,95	2,85	2,99	2,72
20	2,67	2,47	2,40	2,35	2,22	2,18
21	2,73	2,47	2,29	2,24	2,16	2,18
22	2,67	2,42	2,39	2,33	2,27	2,17
23	2,50	2,34	2,30	2,26	2,11	1,76
24	2,48	2,43	2,30	2,35	2,23	1,98
25	2,49	2,57	2,54	2,51	2,26	2,11
26	2,33	2,30	2,20	2,24	2,06	1,80
27	2,26	2,30	2,31	2,29	2,14	1,92
28	2,78	2,98	2,71	2,65	2,39	2,21
29	2,46	2,61	2,32	2,30	2,12	2,06
30	2,31	2,50	2,43	2,36	2,33	2,08
31	2,47	2,74	2,60	2,54	2,65	2,40
32	2,65	2,92	2,85	2,83	2,79	2,64
33	2,49	2,61	2,57	2,47	2,51	2,14
34	2,46	2,61	2,56	2,53	2,54	2,27
35	2,21	2,20	2,13	1,97	1,81	1,83

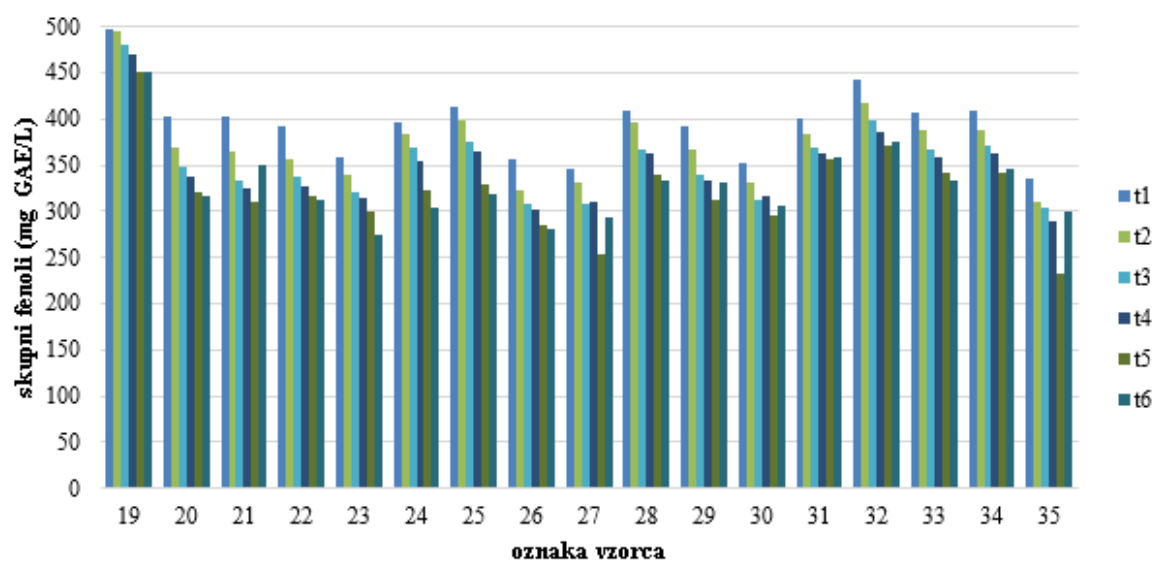
Priloga C3: Antioksidativni potencial droži (PF/OD) ob različnih časih vzorčenja (od t1 do t6) med zorenjem vina na drožeh

Vzorec	AOP droži (PF/OD)					
	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆
1	6,86	8,73	10,21	6,28	6,86	4,10
2	3,22	4,16	4,72	3,38	3,53	3,12
3	2,60	4,31	3,87	2,86	3,41	1,52
4	4,72	7,80	6,74	3,83	4,19	1,70
5	2,68	3,70	3,43	2,20	2,73	1,27
6	3,09	5,70	4,93	5,15	5,43	2,23
7	4,03	5,63	4,68	4,53	4,90	4,36
8	4,11	5,40	6,19	4,33	3,70	2,80
9	2,79	4,43	3,68	3,94	3,41	2,79
10	3,34	5,52	3,45	2,50	3,03	1,73
11	6,95	6,19	6,27	4,49	5,32	3,55
12	6,13	4,97	4,33	2,50	2,35	0,43
13	3,60	5,32	5,56	4,19	4,54	4,73
14	3,14	4,46	4,11	2,78	2,66	3,37
15	4,12	6,35	5,47	5,49	5,89	4,04
16	5,53	4,42	4,62	3,60	3,63	3,43
17	6,68	4,85	5,64	3,35	2,85	1,49
18	6,19	0,43	3,12	2,43	0,28	0,25
19	7,25	10,19	11,63	8,50	6,74	5,49
20	5,00	4,83	4,48	2,61	2,72	1,26
21	5,42	4,39	3,62	2,67	2,93	0,73
22	3,66	3,57	3,24	1,49	3,47	1,53
23	3,65	3,89	2,37	1,31	2,30	0,75
24	6,26	6,46	6,58	2,25	6,74	1,40
25	3,79	6,18	5,62	3,05	2,72	4,06
26	2,29	3,23	2,49	1,28	2,93	0,14
27	2,37	3,56	3,30	1,55	3,47	1,55
28	3,60	5,59	5,99	4,45	2,30	2,60
29	4,20	6,73	6,57	2,27	3,73	0,75
30	2,45	3,97	3,50	1,95	2,93	2,38
31	6,54	4,60	4,72	1,41	4,99	1,45
32	6,82	5,53	5,68	3,54	6,45	1,92
33	4,15	5,68	6,44	3,62	8,32	2,08
34	3,90	6,01	6,87	3,11	8,37	3,24
35	1,90	2,81	2,51	2,17	3,00	0,67

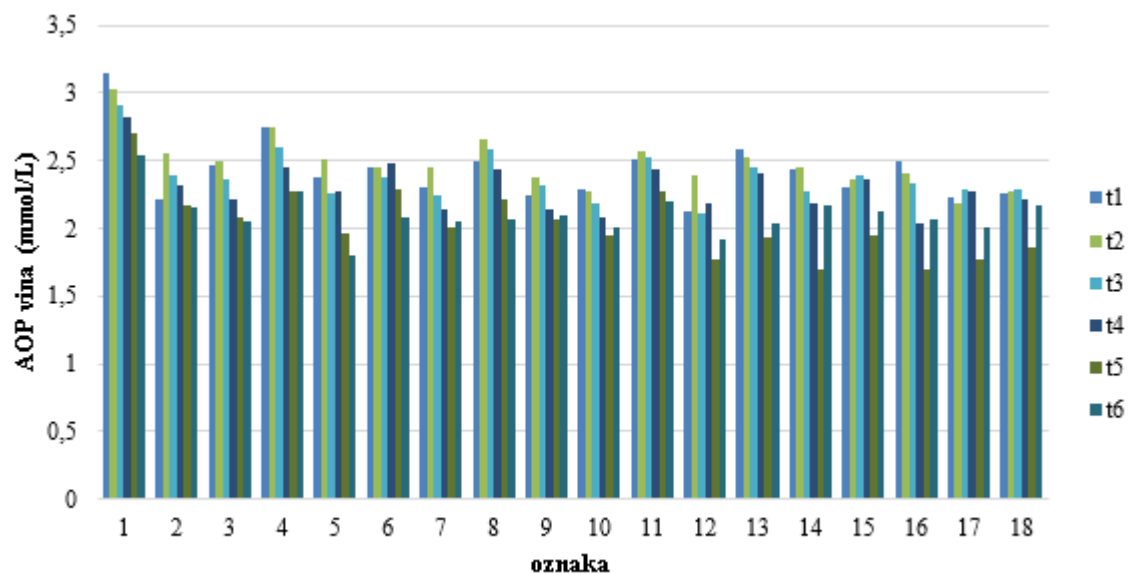
Priloga D1: Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L) ob različnih časih vzorčenja med zorenjem vina laški rizling na drožeh



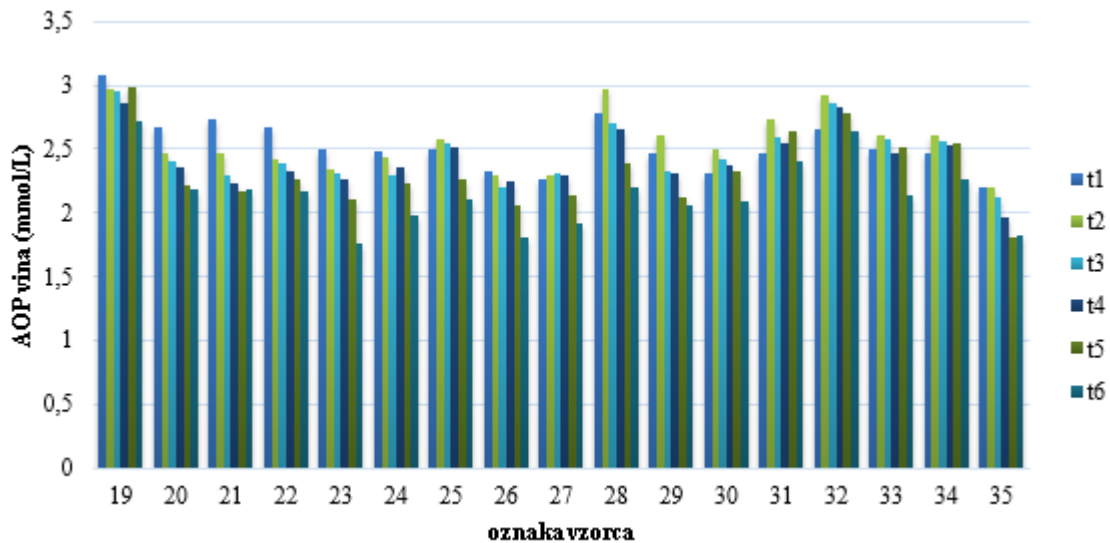
Priloga D2: Vsebnost skupnih fenolnih spojin (mg GAE/L) ob različnih časih vzorčenja med zorenjem vina sauvignon na drožeh



Priloga E1: AOP vina (mmol/L) sorte laški rizling ob različnih časih vzorčenja tekom zorenja na drožeh



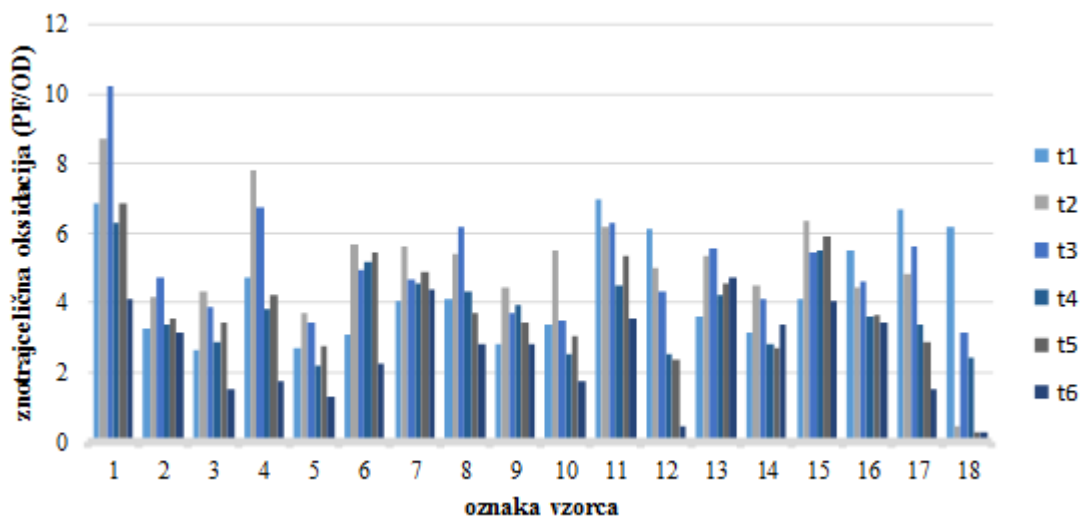
Priloga E2: AOP vina (mmol/L) sorte sauvignon ob različnih časih vzorčenja tekom zorenja na drožeh



Priloga F: Test medsebojne primerjave odvisnih spremenljivk (časa zorenja, sorte vina in dodatka trsk) na neodvisno spremenljivko – AOP vina

Odvisna spremenljivka		AOP vina				
Vir		Vsota kvadratov	df	Povprečna vrednost - kvadrat	F-vrednost	Stopnja značilnosti
čas	hipoteza	3,131	5	0,626	15,418	0,005
	napaka	0,203	5	0,041 ^b		
sorta	hipoteza	0,425	1	0,425	1,301	0,458
	napaka	0,327	1	0,327 ^c		
trske	hipoteza	1,107	1	1,107	3,146	0,301
	napaka	0,407	1,155	0,352 ^d		
čas * sorta	hipoteza	0,147	5	0,029	1,888	0,251
	napaka	0,078	5	0,016 ^e		
čas * trske	hipoteza	0,203	5	0,041	2,605	0,158
	napaka	0,078	5	0,016 ^e		
sorta * trske	hipoteza	0,327	1	0,327	20,971	0,006
	napaka	0,078	5	0,016 ^e		
čas * sorta * trske	hipoteza	0,078	5	0,016	0,688	0,633
	napaka	3,946	174	0,023 ^f		

Legenda: a, b, c, d, e, f - različne črke označujejo statistično značilno razliko; df – stopinja prostosti

Priloga G1: Znotrajcelična oksidacija vinskih droži (PF/OD) tekom zorenja vina laški rizling na drožeh

Priloga G2: Znotrajcelična oksidacija vinskih droži (PF/OD) tekom zorenja vina sauvignon na drožeh

