

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Andraž Podlogar

OHRANJANJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI RDEČIH VIN

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

PRESERVATION OF ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF RED WINES

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije.

Opravljeno je bilo na Katedri za vinarstvo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Tatjano Košmerl in za recenzenta doc. dr. Blaža Cigića.

Mentor: doc. dr. Tatjana Košmerl

Recenzent: doc. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik komisije:

Član komisije:

Član komisije:

Član komisije:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Diplomant: Andraž Podlogar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 663.222 : 663.252/.253 : 577.1 (043) = 863
- KG vino / rdeče vino / cabernet franc / merlot / refošk / enološka sredstva / antioksidacijski potencial / fenolne spojine / flavonoidi / tanini / antociani / barva /
- AV PODLOGAR, Andraž
- SA KOŠMERL, Tatjana (mentorica) / CIGIČ, Blaž (recezent)
- KZ 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- LI 2007
- IN OHRANJANJE ANTIOKSIDATIVNIH LASTNOSTI RDEČIH VIN
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XIV, 55 str., 11 pregl., 32 sl., 38 pril., 42 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Zaradi dokazanih antioksidativnih lastnosti fenolnih spojin vina v "*in vitro*" in "*in vivo*" raziskavah in pozitivnega učinka na naše zdravje, je pomembno, da jih z ustreznim znanjem in tehnološkimi postopki kar najbolj ohranimo in preprečimo njihovo oksidacijo. V mladih rdečih vinih sort cabernet franc, merlot in refošk letnika 2005 iz Koprškega vinorodnega okoliša smo takoj po končani alkoholni fermentaciji s spektrofotometričnimi metodami določili antioksidacijski potencial (AOP), merili hitro in počasno kinetiko redukcije radikala 1,1-difenil-2-pikrilhidrazila (DPPH[•]), določili skupne in posamezne fenolne spojine ter barvne parametre pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm. V nadaljevanju smo vzorcem vina dodali izbrana enološka antioksidacijska sredstva (SO₂, vitamin C in tanine) ter primerjali vrednosti analize med seboj, dobljene po tromesečnem zorenju brez ali z dodatkom enega od enoloških sredstev. Ugotovili smo, da je vsebnost tako skupnih kot posameznih fenolnih spojin, predvsem sortna lastnost. Potrdili smo, da imajo vina z večjo vsebnostjo skupnih fenolov značilno večji tudi antioksidacijski potencial. Največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin in AOP je imel merlot, sledita mu refošk in cabernet franc. Redukcija radikala DPPH[•] s fenolnimi spojinami v vinu po 400 minutah še ni v celoti končana (ravnotežje še ni vzpostavljeno). Po 30 minutah pri cabernet francu določimo le okoli 73 % zreaganega radikala DPPH[•], pri merlotu 73–80 % in pri refošku od 73–78 %. Pri določanju vrednosti AOP, skupnih fenolnih spojin, flavonoidov in taninov smo ugotovili, da so se kot najboljši enološki dodatek v vinu izkazali tanini. Kot drugi najboljši se je izkazal vitamin C, na zadnje mesto pa smo uvrstili SO₂. Pri določanju vrednosti antocianov in določanju barvnih parametrov pa smo ugotovili, da se je kot najboljši enološki dodatek v vinu izkazal SO₂, kateremu sledijo tanini in vitamin C. Najboljšo korelacijo med vsebnostjo fenolnih spojin in AOP smo dobili pri skupnih fenolih (R²=0,991) in flavonoidih (R²=0,982), nekoliko slabšo pri taninih (R²=0,896), najslabšo pa pri antocianih (R²=0,472).

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 663.222 : 663.252/.253 : 577.1 (043) = 863
- CX wines / red wines / Cabernet Franc / Merlot / Refošk / enological agents / antioxidant potential / phenols / flavonoids / tannins / anthocyanins / color
- AU PODLOGAR, Andraž
- AA KOŠMERL, Tatjana (supervisor) / CIGIČ, Blaž (reviewer)
- PP 1000 Ljubljana, SLO, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
- PY 2007
- TI PRESERVATION OF ANTIOXIDATIVE PROPERTIES OF RED WINES
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XIV, 55 p., 11 tab., 32 fig., 38 ann., 42 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Due to antioxidative properties of phenolic compounds of wines, proved by "*in vitro*" and "*in vivo*" researches and their beneficial effects on our health, it is important to preserve them and to prevent their oxidation with proper knowledge and various technological procedures. After the completion of alcoholic fermentation, the antioxidant potential (AOP), total phenols, flavonoids, tannins, anthocyanins and colour parameters were immediately determined spectrophotometrically in three young red wines cv. Cabernet Franc, Merlot and Refošk of vintage 2005 from Koper winegrowing district. We also measured fast and slow kinetics of reduction of radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]). We continued by adding selected antioxidant enological agents (SO₂, vitamin C and tannins) and compared the analytical results obtained during three months of wine maturation with added or in the absence of the enological agent. Content of total and individual phenols were found to be mainly varietal characteristic. We confirmed that wines with greater content of total phenols had also significantly greater AOP. According to our results Merlot had greater content of total phenols and also greater AOP than Refošk and Cabernet Franc. The reduction of a free radical DPPH[•] with phenolic compounds present in wines is a slow process and is not finished after 400 minutes of reaction (the equilibrium is not yet established). After 30 minutes we determined only 73% reduced form of DPPH[•] in Cabernet Franc, from 73 to 80% in Merlot and from 73 to 78% in Refošk. When we determined the values of AOP, total phenols, flavonoids and tannins we noticed that enological tannins added to the wine showed to be the best enological agent. Second one showed to be vitamin C and on the last place we put SO₂. When we determined the values of anthocyanins and colour parameters, we noticed that SO₂ showed to be the best enological agent, followed by tannins and vitamin C. The best correlation between AOP and phenolic compounds is found to be between AOP and total phenols content (R²=0.991) and between AOP and flavonoids (R²=0.982). Correlations between AOP and tannins (R²=0.896) and anthocyanins content (R²=0.472) were worse.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIV
1 UVOD	1
1.1 CILJ DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1. ANTIOKSIDANTI.....	3
2.2 FENOLNE SPOJINE	4
2.2.1 Flavonoidni fenoli.....	6
2.2.1.1 Flavan-3-oli	7
2.2.1.2 Proantocianidini	9
2.2.1.3 Antocianini	9
2.2.1.4 Flavonoli.....	11
2.2.2 Neflavonoidni fenoli	11
2.2.2.1 Hidroksicimetne kisline.....	12
2.2.2.2 Hidroksibenzojske kisline	13
2.2.2.3 Stilbeni	13
2.3 TANINI	14
2.4 PROSTI RADIKALI.....	15
2.4.1 Vloga in pomen	15
2.4.2 Oksidativni stres	16
2.4.3 Določanje antioksidativnega potenciala z DPPH[•] radikalom	16
2.5 DODATKI PRI PREDELAVI GROZDJA	18
2.5.1 Encimi.....	18
2.5.1.1 Struktura pektinskih snovi.....	18
2.5.1.2 Pomembnost pektolitičnih encimov	19
2.5.2 Žveplov dioksid (SO₂)	19
2.5.3 Vitamin C (L-askorbinska kislina)	20
2.6 BARVA RDEČIH VINSKIH SORT	21
3 MATERIAL IN METODE	23
3.1 NAČRT DELA.....	23
3.2 MATERIAL	24
3.2.1 Grozdje in maceracija.....	24
3.2.2 Enološka sredstva.....	24
3.2.3 Laboratorijska oprema.....	25
3.2.4. Reagenti.....	25
3.3 METODE DELA.....	26

3.3.1 Antioksidacijski potencial.....	26
3.3.1.1 Hitra kinetika zmanjševanja absorbanca raztopine DPPH [•] v odvisnosti od časa	26
3.3.1.2 Počasna kinetika redukcije radikala DPPH [•] v odvisnosti od časa	26
3.3.2 Določanje koncentracije skupnih fenolov	27
3.3.3 Določanje koncentracije neflavonoidov in flavonoidov	27
3.3.4 Določanje koncentracije netaninov in taninov	27
3.3.5 Določanje koncentracije antocianov.....	27
3.3.6 Določanje barvnih parametrov	28
4 REZULTATI	29
4.1 REZULTATI ANALIZE OSNOVNE KEMIJSKE SESTAVE VINA.....	29
4.2 REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDACIJSKEGA POTENCIALA (AOP).....	30
4.2.1 Hitra kinetika redukcije radikala DPPH[•].....	31
4.2.1.1 Odvisnost posamezne sorte pri različnih razredčitvah.....	31
4.2.1.2 Rezultati izračuna AOP po posameznih sortah pri dodatku različno razredčenega vina v raztopino DPPH [•] po 30 minutah	32
4.2.2 Počasna kinetika redukcije radikala DPPH[•]	33
4.2.2.1 Odvisnost posamezne sorte pri različnih razredčitvah.....	33
4.2.2.2 Povprečne vrednosti AOP pri različnih sortah	34
4.3 REZULTATI DOLOČANJA MASNIH KONCENTRACIJ SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN.....	35
4.4 REZULTATI DOLOČANJA MASNIH KONCENTRACIJ FLAVONOIDNIH FENOLOV	36
4.5 REZULTATI DOLOČANJA MASNIH KONCENTRACIJ TANINSKIH FENOLOV	37
4.6 REZULTATI DOLOČANJA MASNIH KONCENTRACIJ ANTOCIANINOV	38
4.7 REZULTATI DOLOČANJA BARVNIH PARAMETROV	39
4.8 REZULTATI KORELACIJE KONCENTRACIJ POSAMEZNIH FENOLNIH SPOJIN Z ANTIOKSIDACIJSKIM POTENCIALOM.....	42
4.9 REZULTATI PRISPEVKA DODANIH SREDSTEV K AOP IN KONCENTRACIJI SKUPNIH FENOLOV, FLAVONOIDOV, TANINOV, ANTOCIANOV TER K BARVNIM PARAMETROM.....	43
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	44
5.1 RAZPRAVA	44
5.2 SKLEPI	49
6 POVZETEK.....	50
7 VIRI.....	52
ZAHVALA.....	56
PRILOGE	57

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1	Porazdelitev fenolnih spojin (%) v grozdni jagodi (Košmerl in Kač, 2004)	5
Preglednica 2	Antociani v vinu (Higdon, 2005)	10
Preglednica 3	Flavonoli v vinu (Higdon, 2005)	11
Preglednica 4a	Estri hidroksicimetne kisline v vinu	12
Preglednica 4b	Hidroksicimetne kisline v vinu	12
Preglednica 5	Najpomembnejši encimi in njihov izvor (Košmerl, 2003)	18
Preglednica 6	Pregled enoloških dodatkov v drozgo	23
Preglednica 7a	Rezultati osnovne analize vina (relativne gostote vina, masne koncentracije skupnega suhega ekstrakta, koncentracije alkohola, pH, masne koncentracije skupnih titrabilnih kislin)	29
Preglednica 7b	Rezultati osnovne analize vina (hlapnih kislin ter kislinske, bazične in dejanske pufrne kapacitete)	29
Preglednica 8a	Prispevek enoloških sredstev (SO ₂ , vitamina C in tanina) v modelnih raztopinah k AOP in izmerjeni koncentraciji skupnih fenolov, flavonoidov, taninov in antocianov	43
Preglednica 8b	Prispevek enoloških sredstev (SO ₂ , vitamina C in tanina) v modelnih raztopinah k barvnim parametrom	43

KAZALO SLIK

Slika 1	Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000)	6
Slika 2	Strukturna formula katehina (Vrhovšek, 1996)	8
Slika 3	Strukturna formula epikatehina (Vrhovšek, 1996)	8
Slika 4	Strukturna formula proantocianidinov B ₁ , B ₂ , B ₃ in B ₄ (dimeri katehina) (Vrhovšek, 1996)	9
Slika 5	Strukturna formula antocianidinov (Higdon, 2005)	9
Slika 6	Strukturna formula flavonolov (Higdon, 2005)	11
Slika 7a	Strukturna formula estrov hidroksicimetne kisline v vinu (Vrhovšek, 1996)	12
Slika 7b	Strukturna formula hidroksicimetne kisline v vinu (Vrhovšek, 1996)	12
Slika 8	Galna kislina (Vrhovšek, 1996)	13
Slika 9	Vaniljeva kislina (Vrhovšek, 1996)	13
Slika 10	Siringinska kislina (Vrhovšek, 1996)	13
Slika 11	Strukturne formule izomer resveratrola (Vrhovšek, 1996)	14
Slika 12	Strukturna formula hidrolizabilnega tanina (Jackson, 2000)	14
Slika 13	Strukturna formula kondenziranega tanina (Jackson, 2000)	15
Slika 14	Strukturni formuli difenilpikrilhidrazila – DPPH [•] in difenilpikrilhidrazina – DPPH ₂ (reducirana oblika) (Molyneux, 2004)	17
Slika 15	Strukturna formula vitamina C (Vitamin C, 2007)	20
Slika 16	Povprečni antioksidacijski potencial (AOP) po posameznih sortah v osnovnem vinu (OV), v OV po treh mesecih zorenja, v OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	30
Slika 17	Hitra kinetika razlike absorbanc raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 µL različno razredčenega vina sorte cabernet franc	31
Slika 18	Hitra kinetika razlike absorbanc raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 µL različno razredčenega vina sorte merlot	31
Slika 19	Hitra kinetika razlike absorbanc raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 µL različno razredčenega vina sorte refošk	31

Slika 20	Vrednosti AOP po posameznih sortah pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina po 30 minutah	32
Slika 21	Vrednosti AOP pri merjenju počasne kinetike redukcije radikala DPPH [•] pri dodatku različno razredčenega vina sorte cabernet franc v raztopino DPPH [•]	33
Slika 22	Vrednosti AOP pri merjenju počasne kinetike redukcije radikala DPPH [•] pri dodatku različno razredčenega vina sorte merlot v raztopino DPPH [•]	33
Slika 23	Vrednosti AOP pri merjenju počasne kinetike redukcije radikala DPPH [•] pri dodatku različno razredčenega vina sorte refošk v raztopino DPPH [•]	33
Slika 24	Povprečne vrednosti AOP pri merjenju počasne kinetike redukcije radikala DPPH [•] pri dodatku različno razredčenega vina v raztopino DPPH [•] pri različnih sortah	34
Slika 25	Povprečna koncentracija skupnih fenolnih spojin v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	35
Slika 26	Povprečna koncentracija flavonoidov v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	36
Slika 27	Povprečna koncentracija taninov v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	37
Slika 28	Povprečna koncentracija antocianov v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	38
Slika 29	Povprečna intenziteta in ton barve v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	39
Slika 30	Deleži (%) rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah (A_{420} , A_{520} , A_{620}) v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	40
Slika 31	Delež (%) rdeče barve prostih in vezanih antocianov v obliki flavilijevega kationa (dA_F) v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	41
Slika 32	Korelacija koncentracije posameznih fenolnih spojin (mg/L) z antioksidacijskim potencialom (mmol/L) v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	42

KAZALO PRILOG

Priloga A1	Vpliv zorenja in dodatka enoloških sredstev na AOP ter na koncentracije skupnih fenolnih spojin, flavonoidov, taninov in antocianov v vinu posameznih sort	57
Priloga A2	Vpliv zorenja in dodatka enoloških sredstev na barvne parametre (intenziteto in ton barve ter na deleže rdeče barve (%) v obliki flavilijevega kationa oziroma pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm) v vinu posameznih sort	57
Priloga B1	Antioksidacijski potencial (AOP), izražen v mmol reduciranega DPPH [•] /L vina v OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	58
Priloga B2	Povprečni antioksidacijski potencial (AOP), izražen v mmol reduciranega DPPH [•] /L vina v OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi po posameznih vzorcih	58
Priloga B3	Graf povprečnega antioksidacijskega potenciala (AOP), izražen v mmol reduciranega DPPH [•] /L vina v OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi po posameznih vzorcih	59
Priloga C1	Koncentracije (mg/L) skupnih fenolov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	60
Priloga C2	Povprečne koncentracije (mg/L) skupnih fenolov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi po posameznih vzorcih vina	60
Priloga C3	Graf povprečnih koncentracij (mg/L) skupnih fenolov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi po posameznih vzorcih vina	61
Priloga C4	Koncentracije (mg/L) flavonoidov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	62
Priloga C5	Graf koncentracij (mg/L) flavonoidov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	62
Priloga C6	Koncentracije (mg/L) taninov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	63
Priloga C7	Graf koncentracij (mg/L) taninov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	63

Priloga C8	Koncentracije (mg/L) antocianov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	64
Priloga C9	Graf koncentracij (mg/L) antocianov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	64
Priloga C10	Intenziteta in ton barve OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi	65
Priloga C11	Vpliv zorenja in dodatka enoloških sredstev na deleže rdeče barve (%) v obliki flavilijevega kationa (dA_F) oziroma pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm	66
Priloga D1	Hitra kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte cabernet franc	67
Priloga D2	Hitra kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte merlot	67
Priloga D3	Hitra kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte refošk	67
Priloga D4	Rezultati počasne kinetike (sprememba absorbance raztopine vzorca DPPH [•] , absorbance referenčne raztopine DPPH [•] , razlike med obema absorbancama, antioksidacijskega potenciala izraženega v mmol reduciranega DPPH [•] /L vina, deleža reduciranega DPPH [•]) pri dodatku 50 μ L 10-krat razredčenega vina cabernet franc v raztopino DPPH [•]	68
Priloga D5	Rezultati počasne kinetike (sprememba absorbance raztopine vzorca DPPH [•] , absorbance referenčne raztopine DPPH [•] , razlike med obema absorbancama, antioksidacijskega potenciala izraženega v mmol reduciranega DPPH [•] /L vina, deleža reduciranega DPPH [•]) pri dodatku 50 μ L 14,2-krat razredčenega vina sort cabernet franc, merlot in refošk v raztopino DPPH [•]	68
Priloga D6	Rezultati počasne kinetike (sprememba absorbance raztopine vzorca DPPH [•] , absorbance referenčne raztopine DPPH [•] , razlike med obema absorbancama, antioksidacijskega potenciala izraženega v mmol reduciranega DPPH [•] /L vina, deleža reduciranega DPPH [•]) pri dodatku 50 μ L 20-krat razredčenega vina sort cabernet franc, merlot in refošk v raztopino DPPH [•]	69

Priloga D7	Rezultati počasne kinetike (sprememba absorbance raztopine vzorca DPPH [•] , absorbance referenčne raztopine DPPH [•] , razlike med obema absorbancama, antioksidacijskega potenciala izraženega v mmol reduciranega DPPH [•] /L vina, deleža reduciranega DPPH [•]) pri dodatku 50 μ L 33,3-krat razredčenega vina sort merlot in refošk v raztopino DPPH [•]	70
Priloga D8	Počasna kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte cabernet franc	70
Priloga D9	Počasna kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte merlot	71
Priloga D10	Počasna kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte refošk	71
Priloga D11	Počasna kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 μ L 14,2-krat razredčenega vina različnih sort	72
Priloga D12	Počasna kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 μ L 20-krat razredčenega vina različnih sort	72
Priloga D13	Počasna kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 μ L 33,3-krat razredčenega vina različnih sort	72
Priloga D14	Počasna kinetika večanja razlike absorbanc pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte cabernet franc v raztopino DPPH [•]	73
Priloga D15	Počasna kinetika večanja razlike absorbanc pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte merlot v raztopino DPPH [•]	73
Priloga D16	Počasna kinetika večanja razlike absorbanc pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte refošk v raztopino DPPH [•]	74
Priloga D17	Počasna kinetika večanja razlike absorbanc raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 μ L 14,2-krat razredčenega vina različnih sort v raztopino DPPH [•]	74
Priloga D18	Počasna kinetika večanja razlike absorbanc raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 μ L 20-krat razredčenega vina različnih sort v raztopino DPPH [•]	75
Priloga D19	Počasna kinetika večanja razlike absorbanc raztopine DPPH [•] pri dodatku 50 μ L 33,3-krat razredčenega vina različnih sort v raztopino DPPH [•]	75

Priloga D20	Počasna kinetika redukcije radikala DPPH [•] izražene v % pri dodatku 50μL različno razredčenega vina sorte cabernet franc v raztopino DPPH [•]	76
Priloga D21	Počasna kinetika redukcije radikala DPPH [•] izražene v % pri dodatku 50μL različno razredčenega vina sorte merlot v raztopino DPPH [•]	76
Priloga D22	Počasna kinetika redukcije radikala DPPH [•] izražene v % pri dodatku 50μL različno razredčenega vina sorte refošk v raztopino DPPH [•]	77

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ALK (vol.%)	koncentracija alkohola
AOP	antioksidacijski potencial
d_{20}^{20}	relativna gostota vina
dA ₄₂₀ (%)	delež barve pri valovni dolžini 420 nm
dA ₅₂₀ (%)	delež barve pri valovni dolžini 520 nm
dA ₆₂₀ (%)	delež barve pri valovni dolžini 620 nm
dA _F (%)	delež rdeče barve v obliki flavilijevega kationa
DPPH [•]	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
% DPPH [•]	delež redukcije radikala DPPH [•] , izražen v %
HK ₁ (g/L)	masna koncentracija hlapnih kislin
OV	osnovno vino
PK _B (mmol/L/0,5pH)	bazična pufna kapaciteta
PK _D (mmol/L/pH)	dejanska pufna kapaciteta
PK _K (mmol/L/0,5pH)	kislinska pufna kapaciteta
R	razredčitev
SO ₂	žveplov dioksid
SSE (g/L)	masna koncentracija skupnega suhega ekstrakta
TK ₁ (g/L)	masna koncentracija skupnih titrabilnih kislin pri titraciji do pH 7,00
TK ₂ (g/L)	masna koncentracija skupnih titrabilnih kislin pri titraciji do pH 8,20

1 UVOD

V minulem desetletju so se zelo razširile raziskave na področju antioksidativnih lastnosti vin in varovalnega učinka zmernega pitja vina. Dokazano je, da vino vsebuje številne naravne fenole, ki delujejo antioksidativno proti prostim radikalom ter s tem upočasnjujejo napredek tako bolezni srca in ožilja in tudi nekaterih vrst raka, prav tako pa deluje protibakterijsko in protivirusno (Vrhovšek, 1996).

Fenolne spojine s senzoričnega stališča vplivajo na barvo, okus (grenkoba, trpkost), s kemijskega stališča pa so zaradi svoje strukture (ene ali več hidroksilnih skupin) odgovorni za procese oksidacije in druge kemijske reakcije v moštu in vinu. Zaradi dokazanih antioksidativnih lastnosti fenolnih spojin vina v *in vitro* in *in vivo* raziskavah in pozitivnega učinka na naše zdravje, je pomembno, da jih z ustreznim znanjem in tehnološkimi postopki kar najbolj ohranimo in preprečimo njihovo oksidacijo (Košmerl, 2000).

Da pa bi lahko ocenili "antioksidativne lastnosti" v vinu, njihovo povezavo z različnimi fenolnimi spojinami, ter raziskovali kako se le te ohranjajo s časom, smo uporabili različne analitične metode. S spektrofotometričnimi metodami smo določali antioksidacijski potencial s pomočjo prostega radikala DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), določali smo skupne fenolne spojine, flavonoidne fenole, taninske fenole, antociane ter merili barvne parametre pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm. Ugotavljali smo korelacije med antioksidacijskim potencialom in vsebnostmi različnih fenolnih spojin.

Za ekstraktno bolj bogata vina z večjo vsebnostjo fenolnih spojin velja, da imajo večji antioksidacijski potencial. Rdeča vina imajo značilno večjo vsebnost fenolnih spojin v primerjavi z belimi vini, zato tudi večji antioksidacijski potencial, večji varovalni učinek in ugodnejši vpliv na zdravje ljudi (Košmerl, 2000). Dokazano je tudi, da so nekatere fenolne spojine v vinu močnejši antioksidanti v primerjavi z dosedaj na široko uporabljenimi, kot so na primer vitamin E, vitamin C in β -karoten.

1.1 CILJ DELA

Mlada rdeča vina sort cabernet franc, merlot in refošk letnika 2005 iz Koprškega vinorodnega okoliša smo po končani alkoholni fermentaciji zaščitili z izbranimi enološkimi antioksidacijskimi sredstvi (žveplov dioksid, askorbinska kislina in enološki tanin). Spektrofotometrično smo določali antioksidacijski potencial (AOP), hitro in počasno kinetiko redukcije prostega radikala DPPH[•], določali skupne fenolne spojine, flavonoidne fenole, taninske fenole, antociane ter merili barvne parametre pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm. V nadaljevanju smo primerjali vrednost AOP, vsebnost fenolnih spojin in barvne parametre teh vzorcev po treh mesecih zorenja v primerjavi z osnovnim vzorcem brez dodanih sredstev. Ugotavljali smo tudi korelacije med antioksidacijskim potencialom in vsebnostmi različnih fenolnih spojin.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakujemo, da bodo razlike v vsebnosti fenolnih spojin odvisne od sortnih lastnosti izbranih rdečih vin (cabernet franc, merlot, refošk). V nadaljevanju trimesečnega zorenja vina pričakujemo, da naj bi se z dodatkom posameznih enoloških sredstev, antioksidativne lastnosti mladih rdečih vin povečale oziroma vsaj ohranile. Predvidevamo tudi, da se dejanski zaščitni učinek na ohranjanje AOP in vsebnost posameznih fenolnih spojin in barvne parametre med sredstvi značilno razlikuje.

2 PREGLED OBJAV

2.1. ANTIOKSIDANTI

Antioksidanti so snovi, ki preprečujejo oksidacijo. Oksidacija je verižna reakcija, ki jo povzročajo oksidanti ali prosti radikali. Antioksidanti so lahko encimski ali neencimski sistemi, topni v vodi ali maščobah (Abram, 2000)

Glede na delovanje jih delimo na (Gelb, 2005):

- encimske (superoksid dismutaza, katalaza, glutathion peroksidaza, glutathion reduktaza), ki se nahajajo v glavnem intracelularno;
- neencimske (askorbinska kislina, glutathion, vitamin E, koencim Q, β -karoten), ki delujejo intra- in ekstracelularno, saj so majhne molekule.

Antioksidanti so lahko sintetičnega ali naravnega izvora (Gelb, 2005; Rajalakshmi in Narasimhan, 1995):

- sintetični antioksidanti so BHA (3-terciarni butil-4-hidroksi anizol), BHT (2,6-diterciarni butil-p-hidroksi toluen), PG (propil galat) in TBHQ (2-terciarni butil-hidrokinon);
- naravni antioksidanti so askorbinska in citronska kislina ter njune soli, tokoferoli, flavonoidi, karotenoidi, fenolne spojine, aminokisliline,...

Delimo jih tudi na (Gelb, 2005):

- fenolne antioksidante: BHA, BHT, TBHQ, PG, tokoferoli (vitamin E);
- reducirajoče spojine: askorbinska kislina, askorbilpalmitat, natrijev bisulfit, natrijev metabisulfit, natrijev sulfit, aceton natrijev bisulfit, natrijev formaldehid sulfoksalat, tioglicerol, tioglikolna kislina.

Antioksidante v živilih razdelimo v tri skupine (Rasporec in sod., 2000):

- primarni antioksidanti: nastajajo v organizmu ali pa so produkt metabolizma mikroorganizmov. Njihova vloga je preprečevanje tvorbe prostih radikalov. V to skupino prištevamo snovi, ki lahko reaktivne radikale spremenijo v bolj stabilne produkte in s tem prekinejo verižno reakcijo avtooksidacije. Najpogosteje antioksidant poseže v reakcijo avtooksidacije tako, da hitro odda vodikov atom radikal, ki bi sicer povzročil tvorbo peroksidnih radikalov ali hidroperoksidov.



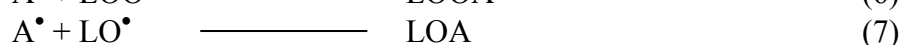
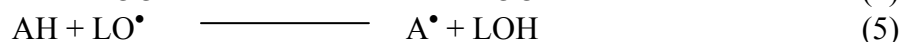
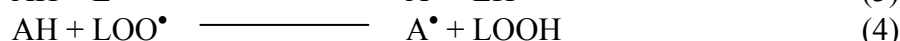
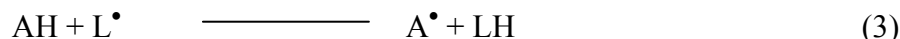
V to skupino antioksidantov uvrščamo fenole in njihove derivate.

- sekundarni antioksidanti: so snovi, ki zavirajo avtooksidacijo brez direktnega vstopanja verižne reakcije. Njihova značilnost je, da reagirajo s kovinskimi ioni, ki so katalizatorji oksidacije in odvezemajo kisik iz medija, razgrajujejo hidroperokside, absorbirajo UV svetlobo.
- sinergisti: ki sami po sebi niso antioksidanti, vendar pa ob prisotnosti primarnih antioksidantov pospešujejo tvorbo kelatov. Tako se tvorijo stabilni kompleksi s kovinskimi ioni, predvsem z železom in bakrom. Najpogostejši sinergisti so vinska kislina, citronska kislina in njeni estri, polifosfati in lecitin.

Antioksidanti lahko delujejo na več načinov:

- vežejo proste radikale,
- vežejo kisik,
- tvorijo komplekse s kovinskimi ioni, ki pospešujejo oksidacijo,
- delujejo kot reducenti (Pratt, 1992).

Fenolni antioksidanti (AH) zaustavljajo oksidacijo lipidov, ker se njihov vodikov atom hitro poveže z lipidnim radikalom (L^\bullet), lipidoksilnim radikalom (LO^\bullet) ali lipidperoksilnim radikalom (LOO^\bullet) (Abram, 2000):



Učinkovitost antioksidantov je tem večja, čim manjša je jakost vezi A-H. Pri tem nastali fenoksilni radikal (A^\bullet) ne sme sprožiti novih radikalskih reakcij, niti se hitro oksidirati. Fenolni antioksidanti so dobri donorji vodika ali elektronov, poleg tega so njihovi radikali relativno stabilni zaradi resonančne delokalizacije nesparjenih elektronov okrog aromatskega obroča (Abram, 2000).

2.2 FENOLNE SPOJINE

Fenolne spojine imenujemo vse tiste spojine, ki imajo najmanj en aromatski obroč in eno ali več hidroksilnih ($-OH$) skupin direktno vezanih na aromatski obroč. V naravi so običajne spojine z več $-OH$ skupinami in zato se je zanje uveljavilo tudi drugo ime – polifenoli. Pri poimenovanju fenolnih spojin je v literaturi dokajšnja zmeda, zato se priporoča uporaba razdelitve po številu C-atomov v molekuli (Abram in Simčič, 1997).

Z večanjem števila hidroksilnih skupin se antioksidativna učinkovitost fenolnih spojin povečuje (Cao in sod, 1997).

Velik vpliv na antioksidacijsko sposobnost ima položaj in razporeditev $-OH$ skupin. Tako je predvsem *orto* položaj $-OH$ skupin na B obroču tisti, ki prispeva k antioksidacijski sposobnosti in vsi flavonoidi s 3',4'-dihidroksi ali 3',4',5'-trihidroksi skupinami so dobri antioksidanti. Poleg tega je pomembna tudi karbonilna skupina na mestu 4 in prosta hidroksilna skupina na mestu 3 in/ali 5 (Abram in Simčič, 1997).

Fenolne spojine v rdečem vinu niso povezane z nikakršnimi škodljivimi učinki ali toksičnostjo. So zelo učinkoviti antioksidanti tudi v živilih (inhibirajo oksidacijo v oljih, zavirajo foto-oksidacijo, so odporni na vročino, inhibirajo barvne diskoloracije (razbarvanje) in oksidacijo naravnih arom ter delujejo sinergistično z nekaterimi organskimi kislinami in vitamini (npr. askorbinska, citronska, vinska kislina, tokoferol), ki imajo antioksidativno sposobnost ter jim poveča antioksidativnost.

Fenoli se nahajajo v vseh delih grozdnih jagod in v pecljih. V vinu lahko obstajajo v prosti monomerni obliki ali pa so polimerizirani. Zelo pogosta je oblika, pri kateri je ena ali več karboksilnih skupin zaestrenih s sladkorjem, neredko pa se pojavijo tudi v obliki estrov organskih kislin, še posebej očetne, kumarne in vinske kisline (Vrhovšek, 1996).

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

Del grozdne jagode	Rdeče grozdje	Belo grozdje
jagodna kožica	33,3 %	23,3 %
grozdni sok	3,4 %	4,5 %
grozdne pečke	62,6 %	71,4 %

Za ekstraktno bolj bogata vina z večjo vsebnostjo fenolnih spojin velja, da imajo večji antioksidacijski potencial. Rdeča vina imajo značilno večjo vsebnost fenolnih spojin v primerjavi z belimi vini, zato tudi večji antioksidacijski potencial, večji varovalni učinek in ugodnejši vpliv na zdravje ljudi (Košmerl, 2000).

Vina, še posebej rdeča vsebujejo velike koncentracije fenolnih spojin, ki so naravni antioksidanti (Davalos in sod., 2004). Vsebnost skupnih fenolnih spojin se v belih vinih giblje med 300 in 1200 mg/L, v rdečih vinih pa jih je bistveno več, med 500 in 3500 mg/L. Vsebnost fenolnih spojin je zelo odvisna od vinske sorte (de Beer in sod., 2004), na količino pa vplivajo tudi klimatski pogoji, vrsta tal, pomembna pa je tudi vinifikacija (pecljanje, drozganje, način in čas maceracije, alkoholna fermentacija,...) (Vrhovšek, 1996).

Fenolne spojine (barvne in taninske) prehajajo iz vakuol celic jagodne kožice v jagodni sok ob kontaktu jagodnih kožic z jagodnim sokom ob občasnem mešanju, v procesu imenovanem maceracija. Maceracija (alkoholna fermentacija rdeče drozge) imenujemo tisto stopnjo pri pridelavi rdečega grozdja v vino, kjer pustimo drozgo (delno zmlete grozdne jagode in grozdni sok) ležati v vinifikatorju določen čas. Intenzivnost prehajanja fenolnih spojin v jagodni sok je pogojena s kemijskimi dejavniki (temperatura, koncentracija nastajajočega alkohola in CO₂) in fizikalnimi dejavniki (mešanje drozge, čas maceracije) (Muhar in Košmerl, 2005).

Med maceracijo se zaradi izločanja CO₂ oblikuje na površini drozge kompakten klobuk jagodnih kožic, ki ga je potrebno čim večkrat potapljati. S tem pripomoremo k hitrejši ekstrakciji barvil in fenolnih snovi, preprečujemo delovanje škodljivih mikroorganizmov (predvsem očetnokislinskih bakterij) in omogočamo hitrejše sproščanje toplote iz vinifikatorja (Košmerl in sod., 2001).

Ekstrakcija fenolnih snovi je v veliki meri odvisna od same tehnologije. Termovinifikacija, kriomaceracija, tretiranje s pektolitičnimi encimi in podaljšana maceracija so tehnike v tehnologiji pridelave rdečih vin, ki naj bi vplivale na večjo ekstrakcijo fenolnih spojin (Budic-Leto in sod., 2006; Sacchi in sod., 2005).

S kratkotrajno maceracijo (krajšo od 24 ur) pridelamo rose vina. Drozga, iz katere pridelamo mlada vina, se macerira 3 do 5 dni. Tako dobimo lepo obarvana vina z vonjem in okusom po grozdju, z aromami po raznem jagodičevju (maline, ribez, jagode) in z majhno zalogo taninskih snovi. Taka vina so primerna za uživanje že po istem letu po trgatvi in niso primerna za arhiviranje, niti za zorjenje v hrastovih sodih. Pri vinih, ki so namenjena za zorjenje, maceracija traja najmanj 15 dni do treh tednov ali več. Taka vina so lepo obarvana, ne dišijo

po drobnih rdečih sadežih, vonjave so maj sorte, sicer tople vinske, še večja je razlika v okusu, ki je bogat, polnejši, z izraženimi tanini. Taka vina so primerna za dolgo zorjenje (Nemanič in sod., 1997)

Prisotnost fenolnih spojin v hrani ima pomemben vpliv na oksidativno in mikrobiološko stabilnost proizvoda, saj so nekatere fenolne komponente močni antioksidanti (Wang in sod., 1997).

Fenolne snovi dajejo trpek, grenak okus vinu. Vplivajo na barvo in okus vina; različne fenolne spojine so vzrok za razliko v okusu rdečih in belih vin (Košmerl, 2003).

Fenolne spojine imajo pomembno vlogo pri oblikovanju in razvoju organoleptičnih lastnosti (predvsem vplivajo na barvo, okus in aromo ter stabilnost vina), sodelujejo in služijo kot pomembni katalizatorji mnogih reakcij, odražajo raznovrstost grozdja in pogoje rasti, so indikatorji stopnje maceracije grozdnih jagod med vinifikacijo in imajo antioksidativno sposobnost, kot taki pa preventivno delujejo pri bolezni srca in ožilja, preprečujejo oksidacijo lipoproteinov in agregacijo trombocitov (Vrhovšek, 1996).

Skupne fenole delimo glede na osnovno kemijsko strukturo v dve skupini (Vrhovšek, 1996):

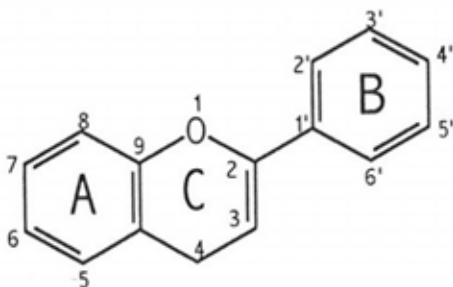
- flavonoidne fenole in
- neflavonoidne fenole

Glede na taninski značaj pa fenolne spojine delimo na (Barbo, 2001):

- taninske fenole: hidrolizabilni (galna, elagova kislina) in kondenzirani (katehini, levkoantociani),
- netaninske fenole: antociani,...

2.2.1 Flavonoidni fenoli

Flavonoidni fenoli ali krajše flavonoidi so fenolne spojine, zgrajene iz 15 C-atomov, z osnovno strukturo (C₆-C₃-C₆), ki se imenuje flavan oz. 2-fenilbenzopiran. V naravi so flavonoidi običajno glikozilirani, kar pomeni, da imajo vezane različne monosaharide (glukoza, galaktoza, ramnoza, arabinoza), ali pa tudi daljše verige na obroč. Največkrat je sladkor vezan na C₃, lahko pa tudi na C₅ ali C₇ atom. Le malo flavonoidov ima sladkor vezan na B obroču (Abram in Simčič, 1997). Nesladkorni del molekule imenujemo aglikon.



Slika 1: Osnovna strukturna formula flavonoidov (Abram, 2000)

Flavonoidi predstavljajo v rdečih vinih več kot 85% vseh fenolnih spojin, v belih pa le približno 20% (Jackson, 2000).

Nahajajo se v kožicah grozdnih jagod tako v belem kot v rdečem vinu, vendar jih je v rdečem lahko tudi do štirikrat več in imajo biološke učinke kot so naprimer: antioksidativno in protivnetno delovanje, zaviranje zlepljenja trombocitov, antimikrobno delovanje, preprečujejo pa tudi peroksidacijo maščobnih kislin v LDL (Wondra, 1997).

Flavonoidi so najbolj razširjeni antioksidanti v naši prehrani, saj se nahajajo v sadju, pijačah (čaj, kava, sok), veliko pa jih je tudi v čokoladi (Vrhovšek, 2000)

V rastlinah so flavonoidi rdeči, beli in rumeni pigmenti cvetov, sadežev, lubja in korenin (Abram, 2000).

Flavonoidi lahko preprečijo peroksidacijo lipidov na več načinov (Abram, 2000):

- z lovljenjem radikalov,
- z vezavo kovinskih ionov,
- z inhibicijo encimskih sistemov, ki katalizirajo nastanek prostih radikalov.

Po Kannerju in sodelavcih (1994) pa naj bi flavonoidi imeli:

- protivnetni (antiinflamatorni) učinek,
- antialergijski učinek,
- antivirusni učinek,
- antimutageni in antikancerogeni učinek,
- protimikrobni učinek.

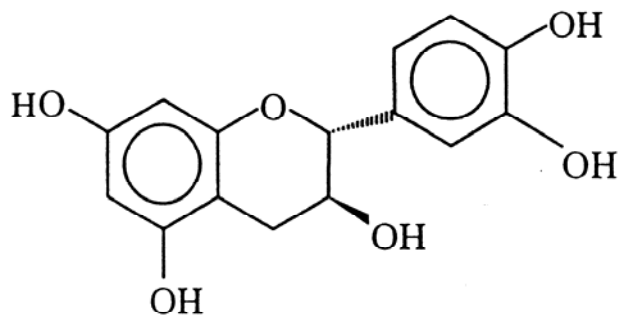
Flavonoide lahko razdelimo v naslednje podskupine (Vrhovšek, 1996):

- flavan-3-ole (katehin, epikatehin),
- proantocianidini (dimeri in trimeri katehina in epikatehina),
- antocianidini (cianidin, peonidin, delphinidin, petunidin, malvidin),
- flavonoli (kamferol, kvarcetin, miricetin, izoramnetin).

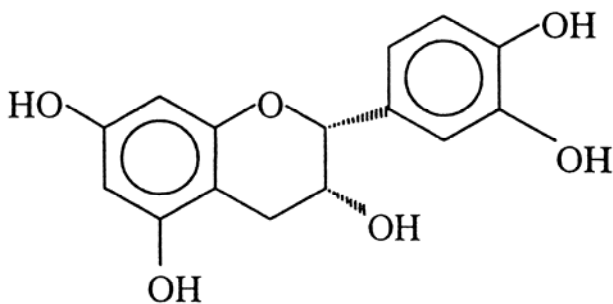
2.2.1.1 Flavan-3-oli

Monomerne in oligomerne oblike flavan-3-olov so najvažnejši fenoli v rdečih vinih. Flavan-3-oli in proantocianidini se nahajajo predvsem v trdih delih grozdne jagode (kožici, pečkih), medtem ko so njihove koncentracije v grozdnem soku zelo majhne. Zaradi tega je njihova količina vedno veliko večja v rdečih kot belih vinih. S podaljševanjem časa maceracije se njihova koncentracija močno povečuje (Vrhovšek, 1996).

V skupino flavan-3-olov prištevamo monomera katehin in epikatehin.



Slika 2: Strukturna formula katehina (Vrhovšek, 1996)



Slika 3: Strukturna formula epikatehina (Vrhovšek, 1996)

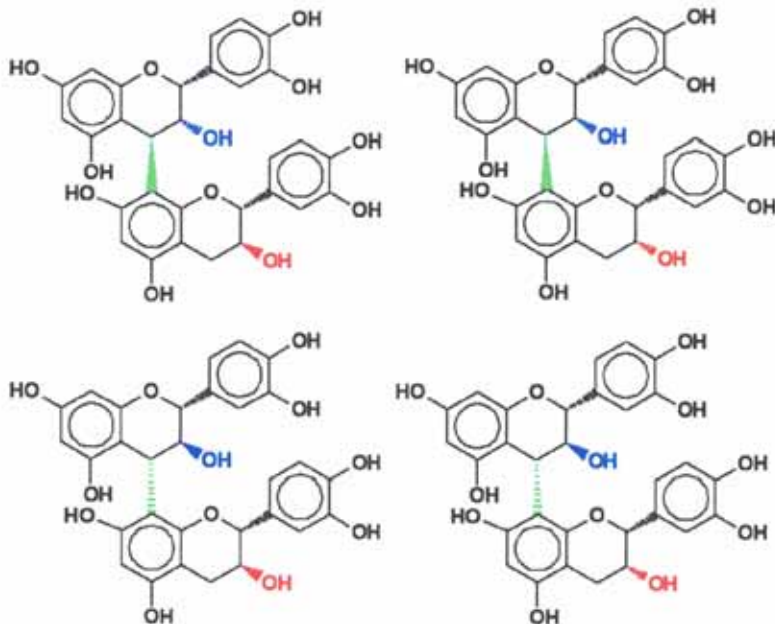
Koncentracije katehina v rdečih vinih variirajo med 130 in 400 mg/L, medtem ko so vrednosti epikatehina približno polovico manjše. V belih vinih se vrednosti katehina gibljejo med 20 in 50 mg/L in vrednosti epikatehina dosegajo približno polovico manjše vrednosti. Vsebnosti flavan-3-olov in proantocianidinov skupaj se v rdečih vinih gibljejo od 120 do 3500 mg/L (Vrhovšek, 1996). Visoka antioksidativna aktivnost te skupine je dokazana že dlje časa in zaradi njihove visoke vsebnosti predvsem v rdečih vinih so to spojine, ki so s tega stališča zelo pomembne (Vrhovšek, 1996).

Katehini imajo dokazano močnejše antioksidativne lastnosti kot nekateri vitamini in drugi naravni antioksidanti, s katerimi lahko tvorijo tudi sinergistične učinke. Nekateri primeri učinkovitega delovanja katehinov pred nekaterimi boleznimi sodobnega časa (npr rak, ateroskleroza, diabetes, staranje, idr.) so:

- zakasnitev določenih bolezni, ki so povezane z našim načinom življenja,
- inhibicija nastanka raka, rasti in metastaz,
- antimutageni, antipromotorski in antikancerogeni učinki zaviranja raka v obeh fazah nastanka raka (iniciaciji in promociji),
- zaviranje rasti tumorjev,
- izboljšanje parametrov v krvi (nižja koncentracija LDL, maščob in povečana koncentracija HDL in antioksidativna kapaciteta krvi), zaviranje nastanka ateroskleroze in zmanjšanje tveganja za te bolezni,
- zaviranje oksidacije lipidov (preprečevanje nastanka in akumuliranja aktivnega kisika ter lipidnega peroksida v telesu), idr.

2.2.1.2 Proantocianidini

Proantocianidini so di-, tri-, in tetrameri flavan-3-olov. Dimeri flavan-3-olov so znani kot proantocianidini skupine B (B_1 , B_2 , B_3 , B_4), trimeri pa so proantocianidini skupine C (C_1 , C_2) (Heim in sod., 2002; Vrhovšek, 1996; Bourzeix in sod., 1986).

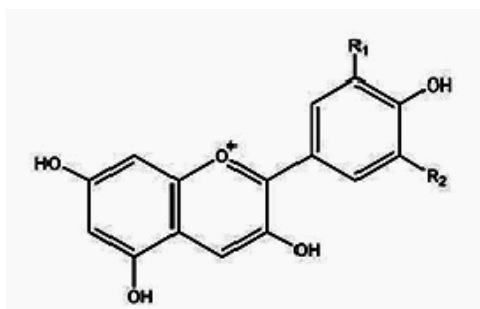


Slika 4: Strukturne formule proantocianidinov B_1 , B_2 , B_3 in B_4 (dimeri katehina) (Vrhovšek, 1996)

Koncentracije flavan-3-olov in proantocianidinov se v rdečih vinih gibljejo med 120 in 3500 mg/L. Njuna vsebnost je močno sortno pogojena in sorte si sledijo v tem vrstnem redu: cabernet sauvignon > modri pinot > merlot (Vrhovšek, 1996).

2.2.1.3 Antocianini

Antocianini ali krajše antociani so barvila, ki se nahajajo predvsem v rdečih vinih in so odgovorni za rdečo barvo vin. (Nemanič in sod., 1997). Kemijsko so antocianini *beta*-glukozidi, ki se pod vplivom encimov med alkoholnim vrenjem razcepijo v glukozo in antociane (cianidin, delphinidin, peonidin, petunidin) in največ v malvidin (Šikovec, 1996).



Slika 5: Strukturna formula antocianinov (Higdon, 2005)

Preglednica 2: Antociani v vinu (Higdon, 2005)

Ime antociana	R₁	R₂
cianidin	H	OH
peonidin	H	OCH ₃
delfinidin	OH	OH
petunidin	OH	OCH ₃
malvidin	OCH ₃	OCH ₃

Razmerje med petimi skupinami antocianov ima velik vpliv na intenzivnost barve ki je specifična za posamezno sorto.

Molekule antocianov so kemijsko zelo nestabilne in podvržene razbarvanju. Rdeče barvne snovi se ob prisotnosti kisika oksidirajo (rdeča barva prehaja v rjavo) in preidejo v koloidno obliko (usedlina rdečega vina) (Vrščaj in Košmerl, 2005).

Antociani se predvsem v odvisnosti pH-ja, nekaj malega tudi v odvisnosti od SO₂-ja in alkohola nahajajo v štirih oblikah (Vrščaj in Košmerl, 2005):

- kot rdeč flavilijev kation,
- rumen kalkon,
- modra kinonska baza,
- brezbarvna karbinol psevdobaza.

Pri nižjem pH (naprimer pri pH 3,5) je barva rubinasto rdeča, pri višjem pa prehaja v modro. Ob prisotnosti večje koncentracije SO₂ vino posvetli, vendar je intenziteta barve reverzibilna (Muhar in Košmerl, 2005). Z naraščanjem pH in SO₂ se intenzivnost barve in delež flavilijevega kationa zmanjšujeta (Vrščaj in Košmerl, 2005).

Antociani so prisotni v jagodni kožici in se izločajo v mošt in vino med maceracijo. Največ antocianov se izloči med prvimi dnevi maceracije, potem pa navadno ni več opazna ekstrakcija, ne glede na dejstvo, da 30-40% antocianov ostane v zmečkani kožici. Njihova ekstrakcija je odvisna od same koncentracije in lokacije v jagodni kožici ter od same tehnologije maceracije. Stopnja prehajanja je odvisna tudi od drugih dejavnikov (temperatura, koncentracijski gradient med jagodno kožico in vinom, kemijskega ravnotežja v vinu, idr.). Največ antocianov se izloči med prvimi dnevi maceracije. (Romeo-Cascales in sod., 2005).

Antioksidativna učinkovitost antocianov je odvisna od njihove strukture. Antioksidativne lastnosti monoglukozidov in aglikonov so enake, medtem ko se antociani razlikujejo v antioksidativnih lastnostih glede na število –OH skupin na B-obroču.

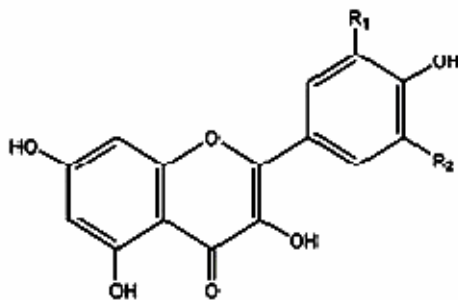
Najbolj zastopana antociana v rdečem vinu sta malvidin in peonidin, ki imata samo eno prosto –OH (hidroksilno) skupino na B-obroču in nista tako dobra antioksidanta kot so delfinidin, cianin, petunidin, ki so običajno zastopani v vinu v manjših koncentracijah, so pa to antociani z dvema oziroma s tremi prostimi hidroksilnimi skupinami na B-obroču.

Koncentracija antocianov v vinih je v veliki meri sortno pogojena in se giblje med 40 in 1300 mg/L. Koncentracije posameznih antocianov lahko variirajo v veliki meri, od 14 mg/L do 400 mg/L. V veliki večini vin prevladuje malvidin-3-monoglukozid kot glavni prosti antocian, medtem ko je količina drugih zelo sortno specifična. V nekaterih sortah so vrednosti skupnih antocianidinov podobne vrednostim flavan-3-olov in proantocianidinom (cabernet

sauvignon), medtem ko so za nekatere sorte te vrednosti dosti manjše (modri pinot). Glede na skupno koncentracijo prostih antocianidinov si sorte ponavadi sledijo v naslednjem vrstnem redu: cabernet sauvignon > merlot > modri pinot (Vrhovšek, 1996).

2.2.1.4 Flavonoli

Kemijsko se flavonoli predstavljajo kot 3-glukozidi. Najdemo jih predvsem v jagodni kožici in pecljevini.



Slika 6: Strukturna formula flavonolov (Higdon, 2005)

Preglednica 3: Flavonoli v vinu (Higdon, 2005)

Ime flavonola	R ₁	R ₂
kamferol	H	H
kvercetin	OH	H
miricetin	OH	OH
izoramnetin	OCH ₃	H

Najpomembnejša flavonola sta kvercetin-3-glukoronid in kvercetin-3-glukozid (Vrhovšek, 1996). Tudi koncentracije flavonolov v vinih so močno sortno pogojene. Koncentracije flavonolov se gibljejo okrog 50 mg/L pri mladih rdečih vinih in 10 mg/L pri starejših vinih, kar je verjetno posledica vezave s tanini (Zoecklein in sod., 1994).

Vrednosti kvercetina v rdečih vinih so med 2 in 17 mg/L, vrednosti miricetina pa med 0 in 18,3 mg/L. V belih vinih je njuna koncentracija ponavadi pod mejo detekcije (Vrhovšek, 1996).

2.2.2 Neflavonoidni fenoli

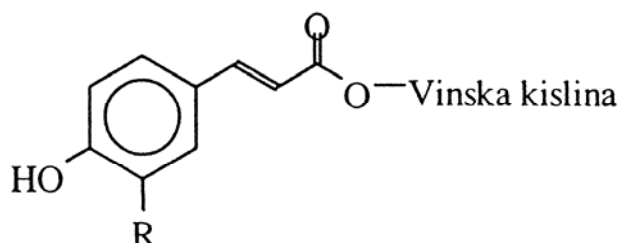
Neflavonoidi se nahajajo v celičnih vakuolah in med stiskanjem prehajajo v grozdni sok (Jackson, 2000).

Neflavonoide lahko razdelimo na naslednje podskupine (Vrhovšek, 1996):

- hidroksicimetne kisline (kaftarna, kutarna, fertarna, kavna, p-kumarna, ferulna),
- hidroksibenzojske kisline (galna, vanilijeva, siringinska),
- stilbeni (resveratrol).

2.2.2.1 Hidroksicimetne kisline

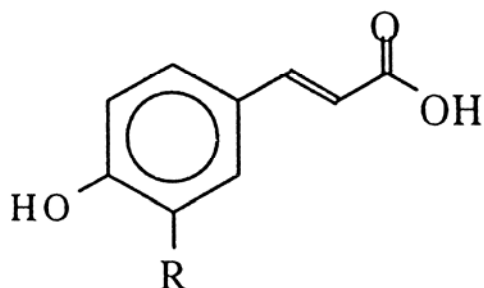
Hidroksicimetne kisline so najpomembnejša skupina neflavonoidov, tako v rdečih kot tudi v belih vinih, poleg tega pa so to najpomembnejše fenolne spojine belih vin. Te kisline so glavni fenoli grozdnega soka in zaradi tega glavni fenoli belega vina, pridelanega brez maceracije.



Slika 7a: Strukturna formula estra hidroksicimetnih kislin v vinu (Vrhovšek, 1996)

Preglednica 4a: Estri hidroksicimetnih kislin v vinu

Ime hidroksicimetne kisline	R
kaftarna kislina	OH
kutarna kislina	H
fertarna kislina	OCH ₃



Slika 7b: Strukturna formula hidroksicimetnih kislin v vinu (Vrhovšek, 1996)

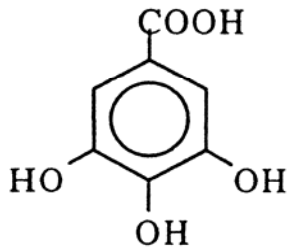
Preglednica 4b: Hidroksicimetne kisline v vinu

Ime hidroksicimetne kisline	R
kavna kislina	OH
<i>p</i> -kumarna kislina	H
ferulna kislina	OCH ₃

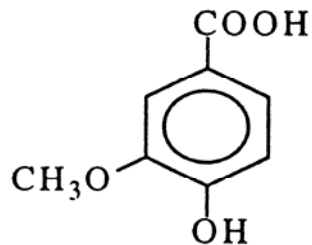
Koncentracije hidroksicimetnih kislin se v povprečju gibljejo med 20 in 120 mg/L za rdeča vina, medtem ko so pri belih vinih ponavadi za polovico manjše. Koncentracijsko si v vinu hidroksicimetne kisline sledijo takole: *trans*-kaftarna > *trans-p*-kutarna > *trans*-kavna, *trans-p*-kutarna, *cis-p*-kutarna, fertarna, ferulna kislina. Sorte vinske trte pa bi po skupni količini hidroksicimetnih kislin lahko razvrstili takole: grenage, barbera > cabernet sauvignon > modri pinot > merlot (Vrhovšek, 1996).

2.2.2.2 Hidroksibenzojske kisline

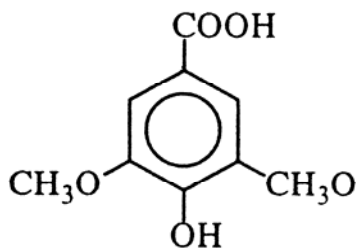
Hidroksibenzojske kisline v rdečem vinu so galna, vanilijeva in siringinska kislina.



Slika 8: Galna kislina (Vrhovšek, 1996)



Slika 9: Vanilijeva kislina (Vrhovšek, 1996)



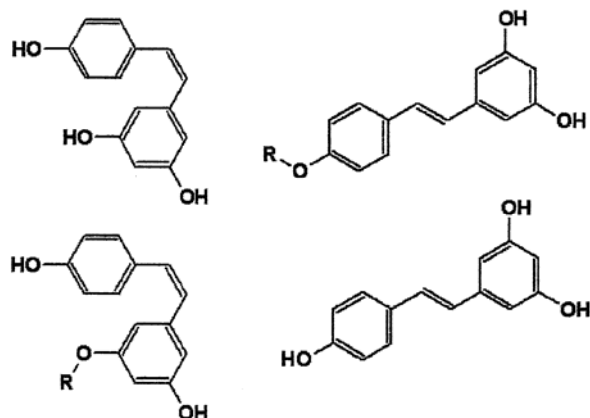
Slika 10: Siringinska kislina (Vrhovšek, 1996)

Galna kislina, glavna hidroksibenzojska kislina v rdečih vinih, vsebuje tri proste hidroksilne skupine, zaradi česar je ta kislina izredno dober antioksidant. Ekstrahira se iz grozdnih pečk, sama ekstrakcija galne kisline pa poteka razmeroma počasi, tako da lahko večje koncentracije dosežemo z daljšim časom maceracije. V rdečih vinih se njene koncentracije gibljejo okoli 80 mg/L, medtem ko so koncentracije v belih vinih le okoli 10 mg/L (Vrhovšek, 1996).

Siringinska in vanilijeva kislina sta ekstrahirani iz jagodne kožice in celičnega soka. Njune koncentracije pa v rdečih vinih ne presegajo nekaj mg/L, v belih vinih pa so njune koncentracije pod mejo detekcije (Vrhovšek, 1996).

2.2.2.3 Stilbeni

Glavni predstavnik stilbenov je resveratrol. Resveratrol v vinu nahaja v štirih različnih oblikah: *cis*- in *trans*-resveratrol ter *cis*- in *trans*-glukozid resveratrola.



Slika 11: Strukturne formule izomer resveratrola (Vrhovšek, 1996)

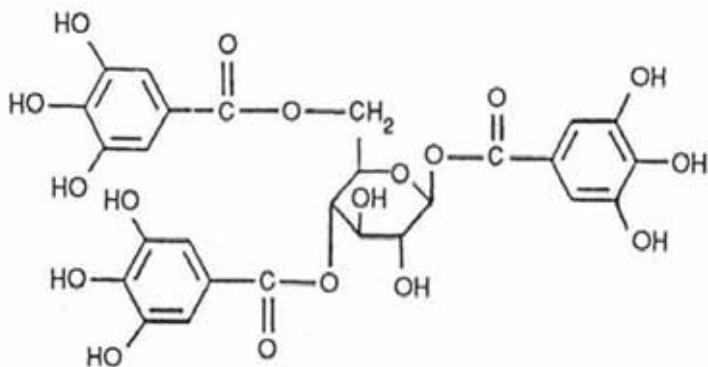
V grozdju se resveratrol nahaja predvsem v jagodni kožici, zato se njegova koncentracija med maceracijo hitro povečuje. Zaradi tega je koncentracija resveratrola vedno veliko večja v rdečih kot v belih vinih. Največje koncentracije vsote vseh štirih oblik resveratrola, dosegajo v rdečih vinih do 30 mg/L, medtem ko se povprečne vrednosti za rdeča vina gibljejo med 5 in 7 mg/L, manjše vrednosti pa v rose in belih vinih, do 1 mg/L. Dokazano je, da je sinteza resveratrola močno sortno pogojena. Sorti, ki sta še posebno poznani po visoki vsebnosti resveratrola, sta modri pinot in modra frankinja. Znane so tudi velike razlike med letniki, kar kaže na vplive okolja, npr. temperature, vlažnosti (Vrhovšek, 1996).

2.3 TANINI

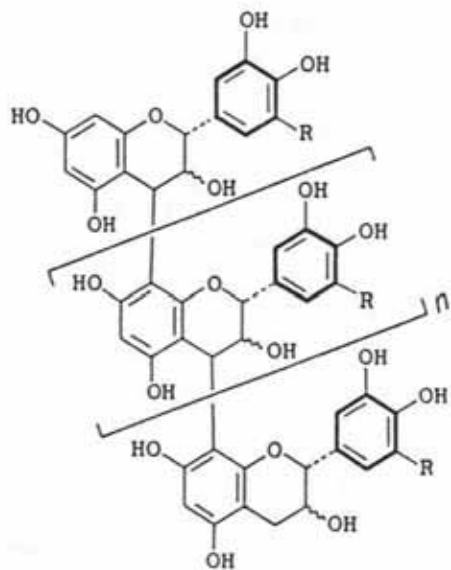
Tanini predstavljajo polimerizirane molekule fenolnih spojin, ki se lahko vežejo s proteini ali polisaharidi. V rdečih vinih imajo velik vpliv na okus (trpkost, grenkoba) in barvo vina, hkrati pa so odlični antioksidanti in naravni konzervansi.

Tanine lahko razdelimo na:

- hidrolizabilne (galna, elagova kislina) in
- kondenzirane tanine (katehini, levkoantociani).



Slika 12: Strukturna formula hidrolizabilnega tanina (Jackson, 2000)



Slika 13: Strukturna formula kondenziranega tanina (Jackson, 2000)

Hidrolizabilni tanini v grozdju niso prisotni, ker izvirajo iz lesa, vendar pa so zelo pomembni pri zorjenju vina. Kondenzirani tanini so znani kot procianidini, ki predstavljajo polimere flavan-3-olov ali katehinov (Vrščaj in Košmerl, 2005).

V grozdju se tanini nahajajo v jagodni kožici, pečkih in pecljevini. Najdemo jih tudi v številnih rastlinah: v lubju ali skorji dreves, kavi, čaju, grozdju, idr. Ekstrakcija taninov v postopku maceracije je počasnejše od antocianov. Odvisno je od krhkosti membran celičnih sten. Čim bolj je grozdje zrelo, bolj so krhke celične stene in več taninskih snovi se lahko izluži. Ker so tanini vezani na proteine in polisaharide membran, je njihova ekstrakcija brez alkohola majhna in težavna (Nemačič in sod, 1997). Večina taninov se ekstrahira med podaljšano maceracijo, saj kot je splošno znano, preidejo lažje iz pečk kot iz kožic (Košmerl in sod., 2001).

V procesu zorenja ali staranja vin, pa prehajajo tanini v vino iz hrastovih sodov, kot razgradni produkti lignina in hemiceluloze. Močnejše stiskanje grozdja, daljša maceracija in daljše zorenje v hrastovih sodih povzroči močnejšo zaznavo okusa po taninih. V vinih, kjer so tanini zastopani v večjih koncentracijah, zaznamo trpek okus v ustih ter na koncu grla, ki ga včasih spremlja grenak pookus. Vina z nizko vsebnostjo taninov, naj bi se zaužila že v prvem letu po trgatvi in niso primerna za arhiviranje, niti za zorjenje v hrastovih sodih. mlada. Starana vina (tri ali več let) pa naj bi vsebovala veliko taninov. Okus pri takih vinih je bogat, polnejši, z izraženimi tanini. Koncentracija taninov se s staranjem zaradi oksidacije ter tvorbe usedline zmanjšuje.

2.4 PROSTI RADIKALI

2.4.1 Vloga in pomen

Prosti radikali so atomi, molekule ali ioni z vsaj enim elektronom brez para. So visoko reaktivne molekule, ki poškodujejo celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami, lipidi in proteini. Prosti radikali nastajajo pri cepitvi kovalentne vezi in so rezultat normalne celične

presnove (dihanja) ter posledica dejavnikov okolja (UV- in gama žarkov, toplote, kajenja, onesnaženega okolja). Tudi nekatere snovi in zdravila (aflatoksini, alkohol, analgetiki, anestetiki, citostatiki) povzročajo nastajanje prostih radikalov (Korošec, 2000).

Radikali so zaradi težnje po pritegnitvi še enega elektrona praviloma neobstojni in kemijsko reaktivni. Ponavadi reagirajo kar s snovmi, ki jih srečajo v svoji neposredni okolici na tri načine (Gelb, 2005):

- tako, da pritegnejo elektron iz neke spojine,
- da se adirajo na dvojno vez,
- da reagirata dva radikala med seboj.

V prvih dveh primerih vedno nastane nov radikal, ki reagira najprej po enem od omenjenih načinov. Ti dve reakciji ponavadi vodita v smer nastajanja stabilnejših in manj reaktivnih radikalov. V primeru reakcije dveh radikalov pa nastane nova nereaktivna spojina (Gelb, 2005).

2.4.2 Oksidativni stres

Oksidativni stres imenujemo porušeno ravnotežje med prostimi radikali in antioksidanti. Antioksidanti ga preprečujejo z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravilom oksidativno poškodovanih biomolekul (Korošec, 2000).

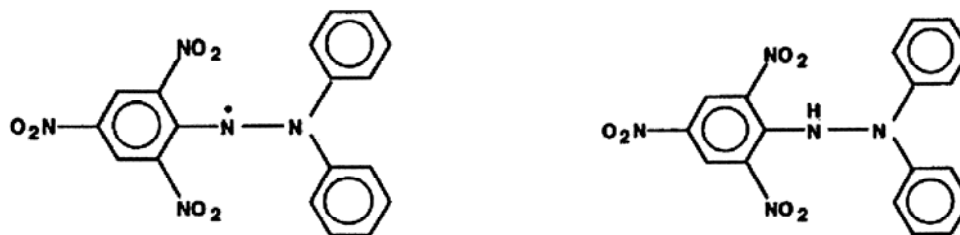
Oksidativni stres se v bioloških sistemih pokaže potem, ko je bil sistem dalj časa podvržen oksidantom, ali če je prišlo do zmanjšanja antioksidativne sposobnosti organizma. Oksidativni stres je večkrat povezan ali pa vodi v nastanek reaktivnih zvrsti kisika (reactive oxygen species, ROS), med katerimi so: hidrosilni radikal (HO^\bullet), hidroperoksilni radikal (HOO^\bullet), hiperoksidni radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), tripletni kisik ($^3\text{O}_2$), singletni kisik ($^1\text{O}_2$), vodikov peroksid (H_2O_2), alkoksilni radikal (RO^\bullet), alkilperoksilni radikal (ROO^\bullet), fenoksilni radikal (ArO^\bullet) (Abram, 2000; Korošec, 2000). Reaktivne vrste kisika naj bi bile zelo povezane s staranjem in z razvojem kroničnih bolezni kot so diabetes, ateroskleroza, karcinom. Prosti radikali reagirajo z lipidi, beljakovinami in DNA (Abram, 2000).

2.4.3 Določanje antioksidativnega potenciala z DPPH^\bullet radikalom

Metoda s prostim radikalom DPPH^\bullet je ena izmed najstarejših indirektnih metod za določanje antioksidativne aktivnosti. Metoda temelji na reakciji med stabilnim prostim radikalom DPPH^\bullet in donorji vodika (npr. fenoli) (Brand-Williams in sod., 1995).

Molyneux (2004) je karakteriziral radikal DPPH^\bullet (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) kot stabilen prosti radikal, saj zaradi delokalizacije prostega elektrona molekule ne tvorijo dimer. Ta delokalizacija elektronov tudi povzroča močno vijolično barvo raztopine DPPH^\bullet v etanolu oz metanolu. Ko zmešamo raztopino DPPH^\bullet s snovjo, ki lahko odda vodikov atom, se tvori difenilpikrilhidrazin, ki je reducirana oblika molekule. Raztopina zato izgublja vijolično barvo (ostane pa blede svetla rumena barva zaradi prisotnosti pikrilne skupine).

Če molekula DPPH^\bullet reagira samo z 1 molekulo antioksidanta, potem je stehiometrija reakcije 1:1. V spodnji enačbi (8) je prikazan primer reakcije antioksidanta z DPPH^\bullet :



Slika 14: Strukturni formuli difenilpikrilhidrazila – DPPH[•] in difenilpikrilhidrazina – DPPH₂ (reducirana oblika) (Molyneux, 2004)

Ker ima DPPH[•] velik molarni ekstinkcijski koeficient v vidnem delu spektra, lahko koncentracijo radikala DPPH[•] določamo spektrofotometrično. Možno pa je tudi določanje z elektronsko spinsko resonanco. Za merjenje absorbance DPPH[•] pa so v literaturi podane različne valovne dolžine: od 515 nm do 520 nm (Roginsky in Lissi, 2005). Za razliko od nekaterih drugih prostih radikalov (npr. ABTS^{•+}), DPPH[•] ne reagira z nekaterimi flavonoidi in aromatskimi kislinami, ki ne vsebujejo -OH skupin na obroču B oz. imajo samo eno -OH skupino (Roginsky in Lissi, 2005).

Rezultate meritev pa lahko podamo na več načinov. Prvi način je tako imenovana koncentracija učinkovitosti oz. vrednost EC₅₀ (tudi IC₅₀). Definirana je kot koncentracija antioksidanta, ki je potrebna za redukcijo 50 % barve (absorbance) radikala DPPH[•]. Ta način podajanja rezultatov se pogosto pojavlja v literaturi, vendar ima več pomanjkljivosti. Prva je ta, da avtorji pogostokrat ne podajo koncentracije radikala DPPH[•] v testirani raztopini, kar onemogoča direktno primerjanje antioksidativne aktivnosti z deli drugih avtorjev. Druga pomanjkljivost pa je, da se z večanjem antioksidativne aktivnosti zmanjšuje vrednost EC₅₀, kar je predvsem nerodno pri grafičnem predstavljanju (Molyneux, 2004).

Drug način podajanja podatkov je, da se izračuna razmerje med množino DPPH[•], ki zreagira z ustrežno množino določenega antioksidanta. Antioksidanti z večjim razmerjem DPPH[•]/antioksidant so bolj učinkoviti. Vzorci katerim določamo antioksidativno aktivnost so pogostokrat kompleksni, npr. rastlinski ekstrakti, kar pomeni, da ne poznamo dejanske sestave in molarne koncentracije. Takrat je smiselno podati antioksidativno učinkovitost vzorca kot razmerje med množino DPPH[•], ki reagira z antioksidanti v 1 g suhe snovi (Molyneux, 2004).

Porabljene mole DPPH[•] v vzorcu lahko enostavno izračunamo iz Beer-Lambertovega zakona.

$$\Delta A = \varepsilon \cdot \Delta c \cdot l \quad (9)$$

$$n_{\text{DPPH}_2} = c \cdot V \quad (10)$$

ΔA ustreza razliki absorbance med referenčno raztopino kateri je dodan samo DPPH[•] in raztopino, kjer je poleg DPPH[•] še antioksidant, ε je molarni ekstinkcijski koeficient DPPH[•] pri 515 nm, c je koncentracija nastalega DPPH₂, l je dolžina poti svetlobe skozi vzorec in V

volumen reakcijske zmesi. Vrednost ϵ v metanolu ali etanolu pri 515 nm je v literaturi navedena med 11600 in 12500 L/(mol·cm) (Molyneux, 2004).

Ne glede na to, ali DPPH raztopimo v etanolu ali metanolu, je metoda enako učinkovita, ker ne povzročata interferenc. Osnovni opis metode je priporočal, da se reakcijo izvaja v pH območju med 5,0 in 6,5, vendar so kasnejše raziskave pokazale, da pH nima posebne vloge pri reakciji. Koncentracijo DPPH[•] izberemo v območju med 50 in 100 μ M, zato da so absorbance referenčne raztopine manjše od 1,0. Reakcijski čas metode je običajno 30 min, vendar so nekateri avtorji uporabljali tudi krajši čas (Molyneux, 2004).

2.5 DODATKI PRI PREDELAVI GROZDJA

2.5.1 Encimi

Encimi so ključnega pomena v kompleksnih biokemijskih procesih v vinarstvu. Katalizirajo številne reakcije biotransformacij:

- od predfermentativne faze dalje,
- med alkoholno fermentacijo,
- postfermentativno fazo in
- fazo zorenja ali staranja vina.

Izvor endogenih encimov oz. "biokatalizatorjev" predstavljajo:

- grozdje,
- vinske kvasovke in
- drugi mikroorganizmi (plesni in bakterije).

Preglednica 5: Najpomembnejši encimi in njihov izvor (Košmerl, 2003)

Izvor encimov	Encimi
grozdje (<i>Vitis vinifera</i>)	glikozidaze, protopektinaze, pektinmetilesteraze, pektinliaze, poligalakturonaze, proteaze, peroksidaze, tirozinaze (oksidoreduktaze)
plesni (<i>Botrytis cinerea</i>)	glikozidaze, lakaze, pektinaze, celulaze, fosfolipaze, esteraze, proteaze
vinske kvasovke (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	β -glukozidaze, β -glukanaze, proteaze, pektinaze

Ker pa ti endogeni encimi običajno niso niti dovolj učinkoviti, niti zastopani v dovolj velikem številu, da bi lahko uspešno katalizirali številne reakcije biotransformacij, se jim kot dodatek v vinarstvu pogosto dodajo komercialni encimski preparati. Med njimi pa so najpomembnejši pektolitični encimi (Košmerl, 2003).

2.5.1.1 Struktura pektinskih snovi

Pektinske snovi so s strukturnega stališča heteropolisharidi, ki predstavljajo glavno komponento srednjih lamel in primarnih celičnih sten višjih rastlin. Pektinske snovi sestavljajo v glavnem α -D-1,4-povezane galakturonske kisline ali njihovi metilni estri. V pektinu je najmanj 75 % karboksilnih skupin zaestrenih z metanolom. Primarna veriga se

sestoji iz ravnih α -D-1,4-povezanih enot galakturonske kisline in β -1,2 ter β -1,4 povezanih enot L-ramnoze (na približno vsakih 25 enot galakturonske kisline) s stranskimi verigami, ki variirajo po dolžini in sestavi.

Pektinske snovi grozdja, skupaj z drugimi polisaharidi, kot sta glukan (celuloza) in ksilan (hemiceluloza), vplivajo na čiščenje, bistrost in stabilizacijo mošta in vina. Omenjene polisaharide najdemo v vinu v koncentracijah 300–1000 mg/L in so pogosto vzrok za motnost, povečano viskoznost ali težave pri filtraciji (zamašitve) (Košmerl, 2003).

2.5.1.2 Pomembnost pektolitičnih encimov

V vinarstvu uporabljamo pektolitične encime za:

- povečanje izplena grozdnega soka z razgradnjo strukturnih polisaharidov, ki ovirajo ali preprečujejo ekstrakcijo,
- sproščanje barvnih snovi iz jagodne kožice,
- sproščanje aromatičnih snovi iz jagodne kožice ter
- izboljšanje bistrenja mošta in filtrabilnosti vina.

Na svoji popularnosti pa pridobivajo preparati z mešanimi encimi, zaradi produkta, ki ima več kot samo eno funkcijo: npr. sestavljen encimski preparat je lahko mešanica pektinaz, celulaz, hemicelulaz in glikozidaz. Encimski preparati, ki poleg pektolitične aktivnosti vsebujejo tudi celulaze in hemicelulaze, so znani pod imenom encimi za utekočinjanje (liquefaction enzymes).

Običajno dodamo pektinaze takoj po stiskanju grozdja. Dodatek pektinaz zmanjša viskoznost grozdnega soka in povzroči agregacijo motnih delcev v večje enote, ki sedimentirajo in se s pretokom zlahka odstranijo. Če dodamo pektinaze v drozgo pred stiskanjem, povečamo izplen soka in izboljšamo barvo; dobimo večji delež samotoka in preostanek z zelo dobrimi lastnostmi za stiskanje. Če uporabimo pektinaze v običajnih koncentracijah 2–4 g/hL, dobimo med 4–10 urnim bistrenjem približno 15 % več soka (Ribéreau-Gayon in sod., 2000; Košmerl, 2003).

2.5.2 Žveplov dioksid (SO₂)

Žveplov dioksid ali pogovorno imenovano žveplo uporabljamo v vinarstvu kot 5–6 % vodno raztopino SO₂, kot kalijev metabisulfit (K₂S₂O₅), plin ali žveplenico zaradi:

- protimikrobnega delovanja (preprečevanje rasti in razmnoževanja neželenih mikroorganizmov: bakterij rodov *Lactobacillus* in *Pediococcus* ter kvasovk vrste *Saccharomyces*);
- antioksidativnega delovanja; preprečevanje delovanja oksidacijskih encimov (polifenoloksidaz ali lakaz);
- preprečevanja reakcij porjavenja;
- povezovanja z parabniki žvepla.

Žveplov dioksid, raztopljen v moštu ali vinu, se obnaša kot kislina, kar se kaže v treh različnih disociacijskih oblikah, katerih delež je odvisen od pH vrednosti:

- molekularna oblika (SO₂): glavna oblika pri pH vrednosti pod 1,86;
- bisulfitna oblika (HSO₃⁻): glavna oblika pri pH vrednostih od 1,86–7,18;
- sulfitna oblika (SO₃²⁻): glavna oblika pri pH vrednostih nad 7,18.

Največ žveplovega dioksida je v vinu v obliki bisulfitnega iona, delež ostalih oblik pa je odvisen od vrednosti pH posameznega vzorca vina. Za ohranjanje čim boljše kakovosti vina med shranjevanjem pa je najpomembnejša molekularna oblika SO_2 , to je prosto žveplo, ki zagotavlja kemijsko in mikrobiološko stabilnost vina.

Molekularna oblika žveplovega dioksida je pomembna zaradi antimikrobnega delovanja, hkrati pa je tudi senzorično zaznavna z vonjanjem. Večkrat je bilo potrjeno, da je koncentracija 35–50 mg dodanega žveplovega dioksida/L v mošt zadostna in ustrezna, da se zmanjša oksidacijska aktivnost encimov zdravega grozdja za najmanj 90 %. Ponavadi se v rdeča vina dodaja 15–25 mg SO_2 /L, v bela pa 25–35 mg SO_2 /L.

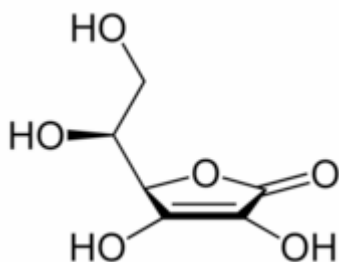
Bisulfitna oblika SO_2 je najmanj pomembna zaradi reakcij vezave žvepla s porabniki, ki nastanejo med alkoholnim vrenjem: acetaldehidom, keto kislinami, oksidiranimi fenolnimi spojinami, antociani in glukozo. Ti produkti so α -hidroksi sulfonati in vplivajo na vezano obliko SO_2 . Pozitiven vidik vezave žvepla pa je senzoričen (preprečuje oksidacijo in porjavenje fenolnih spojin zaradi delovanja encimov). Bisulfitna oblika predstavlja največji delež v okviru SO_2 (od 94 % pri pH 3 do 99 % pri pH 4).

Sulfitna oblika SO_2 pa deluje kot antioksidant, čeprav je prisotna v zelo majhnih koncentracijah (od 0,006 % pri pH 3,0 do 0,06 % pri pH 4,0). Reakcija sulfitnega iona s kisikom je relativno hitra; upočasnijo oksidacijo fenolnih spojin v kinone, tvorbo acetaldehida in rjavih pigmentov (Košmerl, 2000).

2.5.3 Vitamin C (L-askorbinska kislina)

Zaradi antioksidativne lastnosti je vitamin C ali L-askorbinska kislina v živilski industriji vsestransko uporaben, predvsem kot konzervans, ki ohranja barvo, aromo in teksturo proizvodov ter izboljša splošno obstojnost prehrabmenih izdelkov. Kot antioksidacijsko sredstvo (tudi v obliki natrijeve in kalcijeve soli) ga npr. dodajajo pri proizvodnji piva, sadnih sokov, vina, konzerviranega sadja in zelenjave, pri prekajevanju mesnih izdelkov, v ind. moke za povečanje pecilne kvalitete in videza kruha (Rudan-Tasič, 2000).

V vinarstvu askorbinsko kislino uporabljamo kot antioksidant, samostojno ali v kombinaciji z SO_2 . Askorbinska kislina reagira s kisikom in na ta način zmanjša encimsko aktivnost polifenoloksidaz, torej le zadrži začetek porjavenja, ne povzroči pa inhibicije encimske aktivnosti ali antimikrobnega delovanja. Vpliva tudi na zmanjšanje koncentracije prostega SO_2 zaradi tvorbe peroksida v vinu. Dodaja se v koncentracijah od 50–200 mg/L, odvisno od pH vrednosti. Primarni oksidacijski produkt, dehidroaskorbinska kislina, je potencialni porabnik žvepla (bisulfitnih ionov) in prekursor neoksidativnih reakcij porjavenja v vinu (Košmerl, 2003).



Slika 15: Strukturna formula vitamina C (Vitamin C, 2007)

2.6 BARVA RDEČIH VINSKIH SORT

Barvo opisujemo različno glede na spekter absorbirane in prepuščene svetlobe, pri čemer vse subjektivne zaznave ne pomenijo jasno definirane fizikalne veličine (intenziteta barve, odtenek barve, spekter svetlobe). Vsota absorbanc pri valovnih dolžinah 420 nm, 520 nm in 620 nm predstavlja intenziteto (gostoto) barve rdečih vin, medtem ko razmerje absorbanc pri 420 nm in 520 nm pomeni ton barve (odtenek ali nianso) (Košmerl in Kač, 2004).

Valovno dolžino 420 nm vidimo s prostim očesom kot oranžnorjavo barvo, valovno dolžino 520 nm kot rdečo barvo, valovno dolžino pri 620 nm pa kot modrovijolično barvo.

Človeško oko ni sposobno razlikovati posameznih komponent barve ločeno po valovnih dolžinah, ampak jih zaznamo samo kot celoto. Številna barvila in pigmenti, ki so prisotni v vinu zaznamo običajno kot odtenek ali intenziteto barve (Košmerl in Kač, 2004). Intenziteto barve lahko definiramo kot vrednost, ki nam pove kako močno vidimo barvo (npr. cviček ima zelo majhno intenziteto barve, toda močnejšo kot rose vina in bistveno manjšo v primerjavi z rdečimi vini).

Ton barve nam pove stopnjo oksidiranosti vina. Večji kot je ton barve, večja je absorbanca pri 420nm (več rjavkasto-oranžne barve) in ponavadi se to zgodi, ko pride do oksidacije in posledično do izgube barve. Delež rdeče barve v obliki flavilijevega kationa nam pove, koliko je le tega v obarvani obliki, da vidimo to kot rdeče. Mi lahko pri enaki intenziteti barve vidimo bolj ali manj rdeče. Večja bo vrednost deleža barve v obliki flavilijevega kationa, več vidne rdeče barve je v vinu.

Za barvo rdečih vin so odgovorni antocianini, ki so locirani samo v zunanjih plasteh jagodne kožice in se izločajo v mošt in vino med maceracijo. Največ antocianov se izloči med prvimi dnevi maceracije (Romeo-Cascales in sod., 2005). Na spremembo barve vplivajo: koncentracija in sestava fenolnih spojin, količina kisika in SO₂, pH, temperatura fermentacije, prisotnost kovin, idr.

Najbolj pomembna je količina antocianov in taninov, ki jih dobimo med maceracijo. Pomembno je tudi njuno razmerje in sposobnost tvorbe antocian-taninskih kompleksov, kar vpliva tako na barvo kot tudi na stabilnost barve rdečih vin. Ekstrahirani prosti antociani hitro reagirajo s polimeriziranimi tanini in tako dobimo stabilno barvo. Stabilna barva rdečih vin je: rdeča, temno rdeča in oranžnordeča. Tako nastali kondenzati so bolj stabilni in niso tako občutljivi na spremembe pH in SO₂, kot prosti antociani. Pri rdečkastih vinih se barva zaradi premajhnega razmerja A/T, spremeni od prijetno svetlo rdeče v oranžnorjavo (večja absorbanca pri 420 nm). Idealno razmerje med antociani in tanini je 1:10; če je prostih antocianov več, se odtenek barve značilno spremeni od rdeče v rumeno (Košmerl in Kač, 2004).

Fenolne spojine se ob prisotnosti kisika lahko:

- oksidirajo v popolnosti (rdeča barva prehaja v oranžnorjavo, kar pomeni poveča absorbanco pri 420 nm. Tukaj poteka oksidacija fenolnih spojin v kinone;
- delno oksidirajo (ponavadi je to manjši delež fenolnih spojin, ki se v prisotnosti kisika oksidira v kinon in peroksid, potem pa reagirata etanol in peroksid in nastane acetaldehid. Ta acetaldehid stabilizira barvo (gre za tako imenovane acetaldehidne mostičke med posameznimi antociani). Posledica je povečana absorbanca pri 620 nm (barvo vidimo bolj modrovijolično).

Pri nižjem pH (na primer pri pH 3,5) je barva rubinasto rdeča, pri višjem pa prehaja v modro. Ob prisotnosti večje koncentracije SO₂ vino posvetli, vendar je intenziteta barve reverzibilna (Muhar in Košmerl, 2005). Z naraščanjem pH in SO₂ se intenzivnost barve in delež flavilijevega kationa zmanjšujeta (Vrščaj in Košmerl, 2005).

Med fermentacijo lahko izgubimo do 33 % barve. Del barve lahko izgubimo pri nadaljnih postopkih vinifikacije kot so npr. filtracija, centrifugiranje in hladna stabilizacija (Zoecklein in sod., 1995)

3 MATERIAL IN METODE

3.1 NAČRT DELA

Mlada rdeča vina sort cabernet franc, merlot in refošk letnika 2005 iz Koprškega vinorodnega okoliša smo po končani alkoholni fermentaciji zaščitili z izbranimi enološkimi antioksidacijskimi sredstvi (žveplov dioksid, askorbinska kislina in enološki tanin). Določali smo antioksidacijski potencial, skupne fenolne spojine, flavonoidne fenole, taninske fenole, antociane ter merili barvne parametre pri valovnih dolžinah 420 nm, 520 nm in 620 nm. V nadaljevanju smo primerjali antioksidativnost, vsebnost fenolnih spojin in barvne parametre teh vzorcev po treh mesecih zorenja v primerjavi z osnovnim vzorcem. Ugotavljali smo tudi korelacije med antioksidacijskim potencialom in vsebnostmi različnih fenolnih spojin.

Drozgo smo razdelili na tri paralelke in jim dodali različna enološka sredstva za pospeševanje maceracije.

Preglednica 6: Pregled enoloških dodatkov v drozgo

Sorta	Oznaka vzorca	Enološki dodatek
cabernet franc	CF1	1,5 g/hL encim Lallzyme OE, 25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hranilo Go-ferm
	CF2	2 g/hL encim Lallzym EXV, 25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hranilo Go-ferm
	CF3	30 g/hL hranilo Opti-red, 25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hranilo Go-ferm
merlot	M1	1,5 g/hL encim Lallzyme OE, 25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hranilo Go-ferm
	M2	2 g/hL encim Lallzym EXV, 25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hranilo Go-ferm
	M3	30 g/hL hranilo Opti-red, 25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hranilo Go-ferm
refošk	R1	1,5 g/hL encim Lallzyme OE, 25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hranilo Go-ferm
	R2	2 g/hL encim Lallzym EXV, 25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hranilo Go-ferm
	R3	30 g/hL hranilo Opti-red, 25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hranilo Go-ferm

V mladih rdečih vinih sort cabernet franc, merlot in refošk letnika 2005 iz Koprškega vinorodnega okoliša smo takoj po končani alkoholni fermentaciji najprej analizirali osnovno kemijsko sestavo vina, nato pa smo z spektrofotometričnimi metodami določili vsem vzorcem antioksidacijski potencial, merili hitro in počasno kinetiko redukcije radikala DPPH[•] (odvisnost posamezne sorte pri različnih razredčitvah in odvisnost posamezne razredčitve pri različnih sortah), določili skupne in posamezne fenolne spojine ter barvne parametre pri različnih valovnih dolžinah. Zanimalo nas je tudi, kako vpliva dodatek enološkega sredstva (predvsem pektolitični encimi) na ekstrakcijo fenolnih spojin. V nadaljevanju smo vzorcem vina dodali izbrana enološka antioksidacijska sredstva (žveplov dioksid – 15 g K₂S₂O₅/hL, vitamin C – 15 g/hL askorbinske kisline, izbrani enološki tanin "tanenol rouge" – 15 g/hL) ter primerjali antioksidacijski potencial, skupne in posamezne fenolne spojine ter barvne parametre pri različnih valovnih dolžinah po tromesečnem zorenju vina v primerjavi z osnovnim vinom. Ugotavljali smo tudi katere fenolne spojine najbolj korelirajo z antioksidacijskim potencialom vina.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Grozdje in maceracija

Grozdje sort cabernet franc, merlot in refošk letnika 2005 iz Koprskega vinorodnega okoliša je bilo pecljano in drozgano na Katedri za vinarstvo Biotehniške fakultete. Drozgam so bile dodane kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (komercialno ime: Uvaferm BDX) in enološka sredstva za pospeševanje maceracije (preglednica 6), maceracija pa je potekala v erlenmajericah prostornine 5 L z vrelo veho.

3.2.2 Enološka sredstva

Suha aktivna kvasovka Uvaferm BDX

Je čista, osušena aktivna kvasovka vrste *Saccharomyces cerevisiae*, za neposredno dodajanje, brez dodatkov. Proizvajalec: Danstar Ferment AG Alpenstrasse 12, Zug, Švica.

Go ferm

Vsebuje kvasovkam dostopna hranila. So neaktivne kvasovke, pridobljene v procesu avtolize biomase kvasovk: proizvod je obogaten z vitamini (pantetonat, biotin), minerali, mikroelementi (cink in mangan) ter aminokislinami. Proizvajalec: Danstar Ferment AG za Lallemand Inc. Europe.

Lallzyme OE

Je mešanica encimov pektinaz, hemicelulaz in celulaz. Uporabljamo ga za povečanje ekstrakcije barve, taninov in prekurzorjev arom. Omogoča optimiranje maceracije za ekstrakcijo polifenolnega potenciala, nežnejšega, polnejšega in bolj zaokroženega tipa. Proizvajalec: Lallemand S.A. Francija.

Lallzym EXV

Vsebina: dekstrin E 332, poligalakturonaza. Visoko aktiven encimski preparat za pospešitev bistrenja, sproščanje aromatskih komponent, barve in taninov iz grozdne kaše. Proizvajalec: Lallemand S.A. Francija.

Opti-red

Je proizvod inaktivne kvasne kulture in hrana za kvasovke za rdeča vina. Opti-red povečuje količino polisaharidov, ki so sposobni vezati reaktivne tanine, je tudi biološka hrana za kvasovke in oskrbuje mošt z alfa-aminokislinami, vitamini in minerali. Proizvajalec: Danstar Ferment AG za Lallemand Inc. Europe .

Kalijev metabisulfit

Kalijev metabisulfit je enološko sredstvo, ki vsebuje žveplo. Pospešuje čiščenje moštov in vin, raztaplja fenolne spojine, preprečuje delovanje antioksidacijskih encimov in deluje na upočasnjeno rast in razmnoževanje kvasovk in bakterij. Doziranje: 15 g/hL. Proizvajalec: Esseco Spa, Italija.

L-askorbinska kislina

L-askorbinska kislina, poznana tudi kot vitamin C, je bel kristalni prah brez vonja in primesi, namenjen za kemično in fizikalno stabilizacijo vina. Zaradi antioksidativnega delovanja preprečuje oksidacijo vin, ohranja stabilnost barve in organoleptične lastnosti vina. Raztaplja se direktno v vinu. Doziranje: 15 g/hL. Proizvajalec: Esseco Spa, Italija.

Tanenol rouge

Je tanin za rose in rdeča vina. Predstavlja kombinacijo kondenziranih in hidrolizabilnih taninov. Daje aromo po usnju, sladki češnji, lesu in začimbah. Njegove značilnosti sta bistrenje in stabilizacija barve. Doziranje: 15 g/hL. Proizvajalec: Esseco Spa, Italija.

3.2.3 Laboratorijska oprema

- refraktometer
- UV-160 A SHIMADZU spektrofotometer (za določanje skupnih fenolov, flavonoidov, taninov, antocianov ter barvnih parametrov)
- spektrofotometer (za določanje antioksidacijskega potenciala)
- kvarčne kivete (10 mm)
- merilne bučke (100 mL, 50 mL, 25 mL)
- avtomatske pipete
- epruvete
- centrifuga
- filter z velikostjo por 0,45 μm
- mikrocentrifugirke (1,5 mL)
- plastične kivete (10 mm, 1,5 mL)

3.2.4. Reagenti

- osnovna raztopina galne kisline: 500 mg galne kisline, 10 mL absolutnega etanola, deionizirana voda do 100 mL
- Folin-Ciocalteujev reagent: pred uporabo redčen v razmerju 1:3 z deionizirano vodo
- 20 % vodna raztopina Na_2CO_3
- 0,4 % metilceluloza
- nasičen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- HCl (1:4)
- formaldehid (8 g/L)
- 2 % raztopina HCl
- 0,1 % HCl v etanolu
- DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), Sigma, ZDA
- metanol

3.3 METODE DELA

3.3.1 Antioksidacijski potencial

AOP smo določili s stabilnim prostim radikalom DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikril-hidrazil) (Brand-Williams in sod., 1995). Uporabili smo metanolno raztopino radikala DPPH[•] z absorbanco približno 1,0 pri valovni dolžini 515 nm, kjer je absorpcijski maksimum. Po redukciji DPPH[•] z antioksidantom (fenolne spojine v vinu) nastane DPPH₂, ki ne absorbira pri tej valovni dolžini, zato absorbanca metanolne raztopine radikala DPPH[•] pade. Bolj kot se absorbanca zmanjša, večji antioksidacijski potencial ima vino. Za analizo smo 50 µL predhodno razredčenega vzorca vina (R=20x) dodali k 1,5 mL raztopine reagenta DPPH[•]. Referenčne raztopine smo pripravili tako, da smo zmešali 1,5 mL raztopine DPPH[•] in 50 µL metanola. Pripravljene vzorce smo dobro premešali in po 240 minutah izmerili absorbanco pri 515 nm. Nato smo izračunali razliko absorbanc med referenčno raztopino in vzorcem, ki je proporcionalna antioksidacijskemu potencialu vina; večja kot je razlika absorbanc, večji antioksidacijski potencial ima vino. Iz poznanega molarnega ekstincijskega koeficienta DPPH[•] (Molyneux, 2004) in z upoštevanjem razredčitev smo izračunali AOP in ga izrazili kot množino reduciranega DPPH[•] na liter vina (mmol/L).

3.3.1.1 Hitra kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH[•] v odvisnosti od časa

Na spektrofotometru, ki je bil povezan z računalnikom, smo merili padec absorbance v odvisnosti od časa, zaradi dodatka različno razredčenega vina sort cabernet franc, merlot in refošk v raztopino DPPH[•]. Uporabili smo metanolno raztopino radikala DPPH[•] z absorbanco približno 1,0 pri valovni dolžini 515 nm, kjer je absorpcijski maksimum. Za vsako sorto vina smo pripravili različne razredčitve. Za vino sorte cabernet franc smo pripravili 10-, 14,2- in 20-kratno razredčitev, za vino sorte merlot 14,2-, 20- in 33,3-kratno razredčitev ter za vino sorte refošk tudi 14,2-, 20- in 33,3-kratno razredčitev. Nato smo 50 µL razredčenega vina dodali k 1,5 mL raztopine DPPH[•]. Spektrofotometer je vsake 4 sekunde izmeril vrednost absorbance raztopine DPPH[•], ki se je takoj po meritvi izpisala na ekranu računalnika. Celotno merjenje za vsak različno razredčen vzorec traja 30 minut, zato pravimo da je kinetika hitra. Rezultate smo grafično prikazali kot razliko med dvema absorbancama (izmerjene absorbance prve meritve in absorbance zmerjene v določenem času).

3.3.1.2 Počasna kinetika redukcije radikala DPPH[•] v odvisnosti od časa

Kot je opisano v točki 3.3.1 smo merili zmanjšanje absorbance raztopine radikala DPPH[•] pri dodatku 50 µL različno razredčenega vina sort cabernet franc, merlot in refošk v raztopino radikala DPPH[•]. Pri cabernetu franc smo uporabili 10-, 14,2- in 20-kratno razredčitev, za vino sorte merlot 14,2, 20 in 33,3-kratno razredčitev in za vino sorte refošk tudi 14,2-, 20- in 33,3-kratno razredčitev. Prva meritev absorbance raztopine DPPH[•] (tako raztopine DPPH[•] z dodatkom razredčenega vina, kakor tudi referenčne raztopine) je bila opravljena po 30 minutah. Nato smo vsakih 30 minut ponovno zmerili absorbanco, zadnjo meritev pa smo opravili pri času 400 minut. Zato tudi pravimo kinetiki, počasna kinetika. Iz razlike absorbanc med referenčno raztopino in raztopino vzorca, smo nato izračunali razliko absorbanc, iz nje pa izračunali v nadaljevanju AOP. Vse rezultate (tako zmanjšanje absorbance v odvisnosti od

časa, razlika absorbanca v odvisnosti od časa in AOP v odvisnosti od časa) smo tudi grafično prikazali (odvisnost posamezne sorte pri različnih razredčitvah, odvisnost posamezne razredčitve pri različnih sortah).

3.3.2 Določanje koncentracije skupnih fenolov

Vsebnost skupnih fenolov smo določali spektrofotometrično pri valovni dolžini 765 nm. V 100 mL merilno bučko odpipetiramo 1 mL vzorca vina ($R=10$), dodamo približno 60 mL deionizirane vode, 5 mL reagenta Folin-Ciocalteu (1:3) in 15 mL 20 % raztopine natrijevega karbonata. Dopolnimo do 100 mL z deionizirano vodo, premešamo in po 2 urah izmerimo absorbanco pri 765 nm. Masno koncentracijo skupnih fenolov v vzorcu smo odčitali iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravili z galno kislino s koncentracijo od 0–500 mg/L. Rezultat izražamo v mg galne kisline/L.

3.3.3 Določanje koncentracije neflavonoidov in flavonoidov

Vsebnost neflavonoidov smo določali spektrofotometrično (Boulton in sod., 1996) z reagentom Folin-Ciocalteu v prefiltriranem vzorcu vina (10 mL), kateremu smo predhodno dodali raztopini klorovodikove kisline (10 mL) in formaldehida (5 mL); premešamo in raztopino pustimo stati 24 ur. Naprej postopamo enako kot za določevanje skupnih fenolov. Rezultat odčitamo iz umeritvene krivulje skupnih fenolov in ga izrazimo v mg galne kisline/L. Vsebnost flavonoidov izračunamo iz razlike med skupnimi fenoli in neflavonoidi.

3.3.4 Določanje koncentracije netaninov in taninov

Vsebnost netaninov smo določali spektrofotometrično (Boulton in sod., 1996): vzorcu vina (2 mL) dodamo raztopini metilceluloze (1 mL) in nasičenega amonijevega sulfata (2 mL) in dopolnimo do 10 mL. Sledi centrifugiranje raztopine vzorca 10 minut pri 4000 obratih/minuto in analiza supernatanta po postopku za določevanje skupnih fenolov. Rezultat odčitamo iz umeritvene krivulje skupnih fenolov in ga izrazimo v mg galne kisline/L. Vsebnost taninov izračunamo iz razlike med skupnimi fenoli in netanini.

3.3.5 Določanje koncentracije antocianov

Antociane smo določali s spektrofotometrično analizo (Boulton in sod., 1996). Vzorec vina razdelimo na dva dela po 1 mL: v prvega dodamo zakisano raztopino etanola (1 mL) in vodno raztopino klorovodikove kisline (10 mL), v drugega pa ravno tako zakisano raztopino etanola (1 mL) ter pufer s pH 3,5 (10 mL) namesto vodne raztopine klorovodikove kisline (10 mL). Po eni uri obema raztopinama izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 520 nm. Vsebnost antocianov (mg/L) izračunamo iz razlike absorbanca in jo izrazimo kot malvidin-3-monoglukozid (relacija 11).

$$c \text{ (mg/L)} = (A_1 - A_2) \cdot 386,596 \quad (11)$$

kjer pomeni A absorbanco (A_1 pri dodatku HCl in A_2 pri dodatku pufera), 386,596 empirični faktor.

3.3.6 Določanje barvnih parametrov

V predhodno razredčenem vzorcu vina ($R=10$) izmerimo absorbance pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm. Dobljene vrednosti smo ovrednotili s pomočjo matematičnih zvez (Košmerl in Kač, 2004) za izračun naslednjih barvnih parametrov: intenziteto barve, ton barve, delež rdeče barve v obliki flavilijevega kationa (dA_F , %) ter deleže rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah 420 nm (dA_{420} , %), 520 nm (dA_{520} , %) in 620 nm (dA_{620} , %).

Intenziteta barve:

$$I = \sum (A_{420} + A_{520} + A_{620}) \quad (12)$$

Ton barve:

$$T = \frac{A_{420}}{A_{520}} \quad (13)$$

Delež rdeče barve v obliki flavilijevega kationa:

$$dA_F(\%) = \left(A_{520} - \frac{(A_{420} + A_{620})}{2} \right) \cdot \frac{1}{A_{520}} \cdot 100 \quad (14)$$

Delež barve pri valovni dolžini 420 nm (dA_{420} , %):

$$dA_{420}(\%) = \left(\frac{A_{420}}{I} \right) \cdot 100 \quad (15)$$

Delež barve pri valovni dolžini 520 nm (dA_{520} , %):

$$dA_{520}(\%) = \left(\frac{A_{520}}{I} \right) \cdot 100 \quad (16)$$

Delež barve pri valovni dolžini 620 nm (dA_{620} , %):

$$dA_{620}(\%) = \left(\frac{A_{620}}{I} \right) \cdot 100 \quad (17)$$

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI ANALIZE OSNOVNE KEMIJSKE SESTAVE VINA

Analiza osnovne kemijske sestave vina zajema določitev:

- relativne gostote vina,
- masne koncentracije skupnega suhega ekstrakta,
- koncentracije alkohola,
- pH-ja,
- masne koncentracije skupnih titrabilnih kislin,
- masne koncentracije hlapnih kislin,
- kislinske, bazične in dejanske pufrne kapacitete.

Rezultati so prikazani v spodnjih dveh preglednicah (preglednica 7a in 7b).

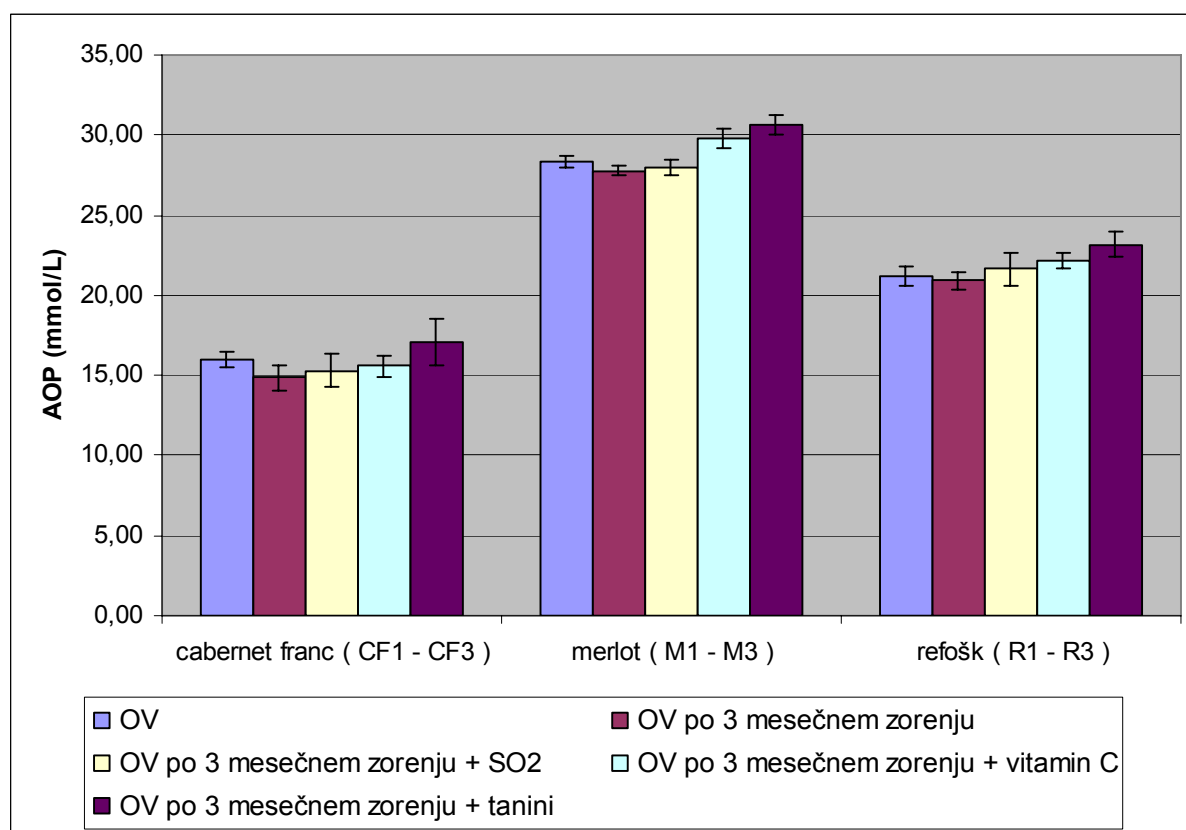
Preglednica 7a: Rezultati osnovne analize vina (relativne gostote vina, masne koncentracije skupnega suhega ekstrakta, koncentracije alkohola, pH-ja, masne koncentracije skupnih titrabilnih kislin po dveh formulah)

Vzorec vina	d_{20}^{20}	SSE (g/L)	ALK (vol.%)	pH	TK ₁ (g/L)	TK ₂ (g/L)
CF1	0,99634	31,03	11,82	3,47	6,77	6,99
CF2	0,99647	27,56	10,57	3,51	6,72	6,98
CF3	0,99617	26,57	10,49	3,49	6,77	7,03
M1	0,99588	29,85	11,82	3,50	7,07	7,47
M2	0,99602	29,17	11,47	3,54	6,78	7,16
M3	0,99572	29,08	11,70	3,54	6,74	7,10
R1	0,99726	31,65	11,23	3,21	9,58	9,92
R2	0,99718	31,27	11,16	3,17	9,64	9,94
R3	0,99665	29,91	11,17	3,18	9,40	9,70

Preglednica 7b: Rezultati osnovne analize vina (hlapnih kislin ter kislinske, bazične in dejanske pufrne kapacitete)

Vzorec vina	HK ₁ (g/L)	PK _K (mmol/L/0,5pH)	PK _B (mmol/L/0,5pH)	PK _D (mmol/L/pH)
CF1	0,18	18,32	24,48	42,80
CF2	0,21	17,93	23,74	41,70
CF3	0,21	17,97	22,71	40,70
M1	0,21	18,22	23,59	41,80
M2	0,23	18,74	23,83	42,60
M3	0,21	18,94	23,56	42,50
R1	0,30	19,89	27,53	47,40
R2	0,27	20,55	27,04	47,60
R3	0,26	19,93	27,44	47,40

4.2 REZULTATI DOLOČANJA ANTIOKSIDACIJSKEGA POTENCIALA (AOP)



Slika 16: Povprečni antioksidacijski potencial (AOP) po posameznih sortah v osnovnem vinu (OV), v OV po treh mesecih zorenja, v OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

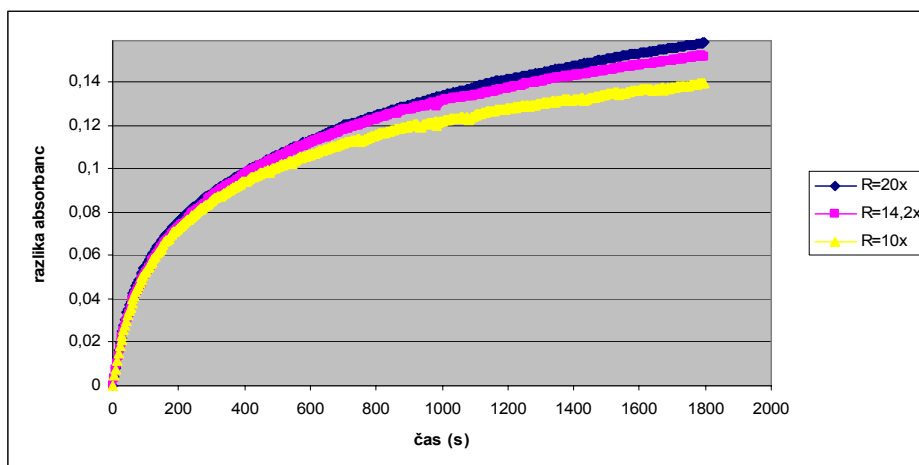
Na sliki 16 je prikazan povprečni antioksidacijski potencial (AOP) po posameznih sortah, izražen v mmol reduciranega DPPH[•]/L vina. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti posameznih sort. Vsak stolpec na zgornji sliki tako predstavlja povprečno vrednost devetih meritev, in sicer po tri meritve na vsak vzorec vina. Razviden je vpliv dodanih antioksidantov na ohranjanje oziroma povečanje antioksidacijskega potenciala, res pa je, da je standardna deviacija pri vzorcu z dodanimi tanini nekoliko večja.

Največji antioksidacijski potencial (AOP) ima vino sorte merlot po tromesečnem zorenju z dodatkom taninov (31 mmol/L), najmanjšo pa vino sorte cabernet franc po tromesečnem zorenju brez dodatka enološkega sredstva (15 mmol/L).

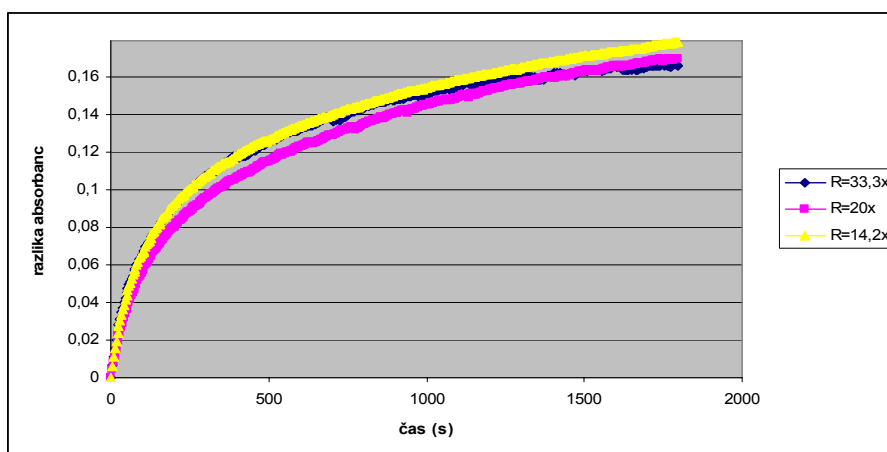
Iz slike 16 je razvidno, da imajo najmanjši AOP vina, po tromesečnem zorenju brez dodatka enološkega sredstva. Za cabernet franc in merlot po tromesečnem zorenju z dodatkom SO₂ lahko rečemo, da se je AOP ohranil, nekoliko višja vrednost je v tem primeru pri refošku, vendar je tudi tukaj standardna deviacija največja. Dodatek vitamina C je povečal AOP v sorti cabernet franc, pri merlotu in refošku je ta povečava še bolj vidna. Največji AOP pa smo določili pri osnovnih vinih po tromesečnem zorenju z dodatkom taninov. Pri vseh sortah je dodatek tanina povečal antioksidacijski potencial v primerjavi z osnovnimi vini.

4.2.1 Hitra kinetika redukcije radikala DPPH[•]

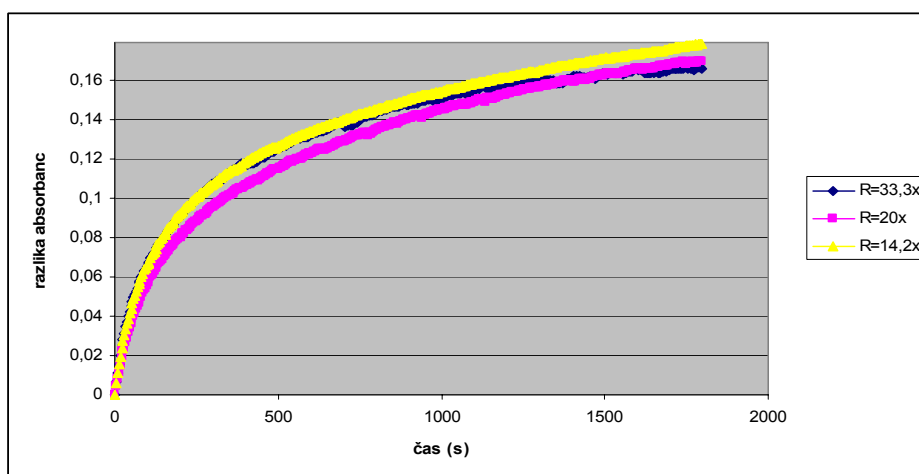
4.2.1.1 Odvisnost posamezne sorte pri različnih razredčitvah



Slika 17: Hitra kinetika razlike absorbanc raztopine DPPH[•] pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte cabernet franc



Slika 18: Hitra kinetika razlike absorbanc raztopine DPPH[•] pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte merlot



Slika 19: Hitra kinetika razlike absorbanc raztopine DPPH[•] pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte refošk

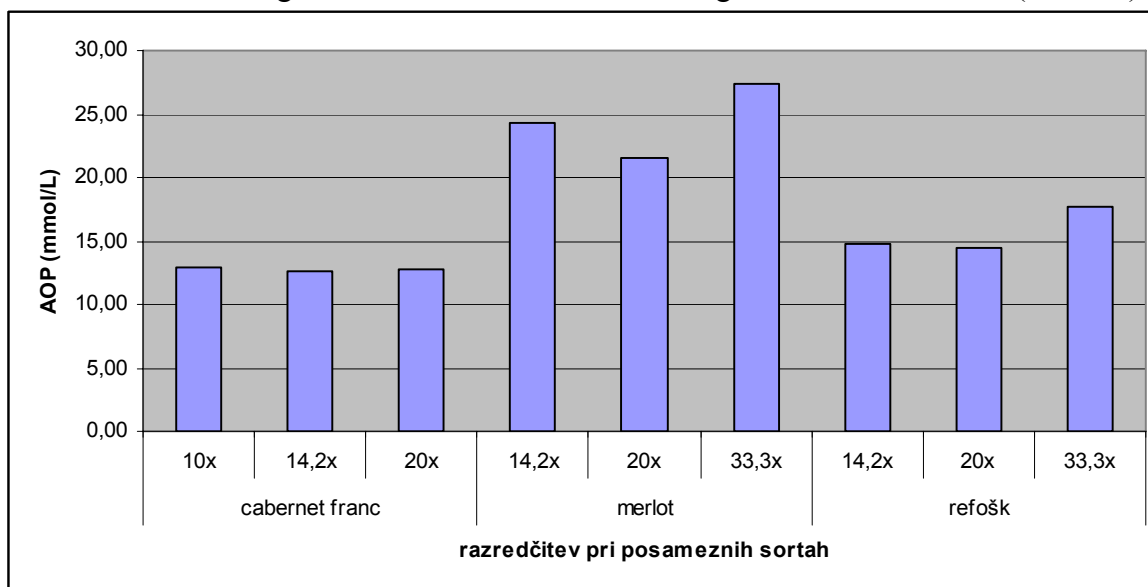
Na slikah 17–19 so predstavljeni rezultati hitre kinetike redukcije DPPH[•] radikala z antioksidanti v vinih določenih sort. Ker se absorbanca zaradi redukcije radikala s časom zmanjšuje (priloge D1–D3), smo rezultate predstavili kot razliko začetne absorbance in izmerjene absorbance ob določenem času. Ker smo želeli ugotoviti, ali koncentracija prisotnih antioksidantov vpliva na vrsto kinetike in pravilnost določitve AOP, smo pridobljene podatke normirali na največjo razredčitev, tako da smo pri obeh manjših razredčitvah pridobljene podatke pomnožili s kvocientom ($\text{razredčitev}_i / \text{razredčitev}_{\text{max}}$).

Iz zgornjih treh grafov (slike 17, 18 in 19) je razvidno, da sama razredčitev malo vpliva na pravilnost določanja AOP, saj imajo normirane krivulje podobno obliko in pri posameznem vinu tudi približno enako vrednost po 30 minutah. Izstopa le krivulja najmanjše razredčitve pri cabernet francu.

4.2.1.2 Rezultati izračuna AOP po posameznih sortah pri dodatku različno razredčenega vina v raztopino DPPH[•] po 30 minutah

Glede na rezultate, ki smo jih dobili pri merjenju počasne kinetike po 30 minutah (skoraj identični padci absorbance ob dodatku 50 μL različno razredčenega vina v raztopino DPPH[•]) lahko sklepamo, da so rezultati tako pri merjenju hitre, kakor tudi počasne kinetike po 30 minutah praktično enaki.

S pomočjo izračuna razlike absorbance med referenčno raztopino in raztopino vzorca, ki je proporcionalna antioksidacijskemu potencialu vina in poznane ekstincijskega koeficienta DPPH[•] (Molyneux, 2004) in z upoštevanjem razredčitev, smo izračunali vrednost AOP po natanko 30 minutah in ga izrazili kot množino reduciranega DPPH[•] na liter vina (mmol/L).

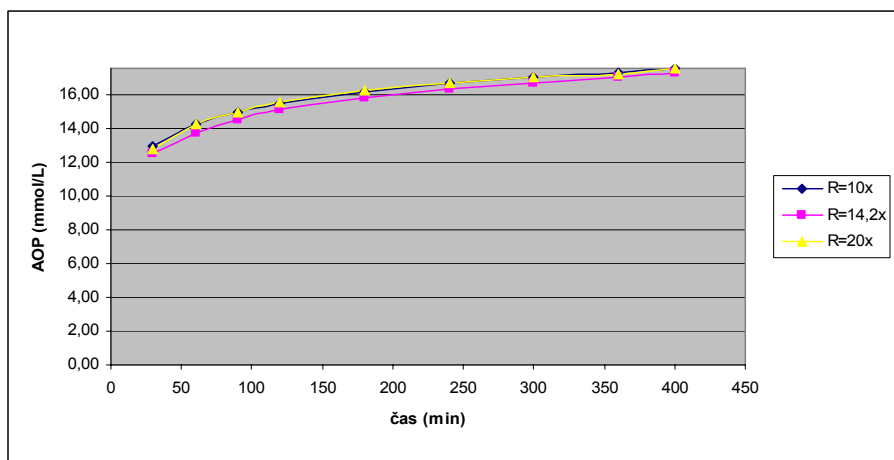


Slika 20: Vrednosti AOP po posameznih sortah pri dodatku 50 μL različno razredčenega vina po 30 minutah

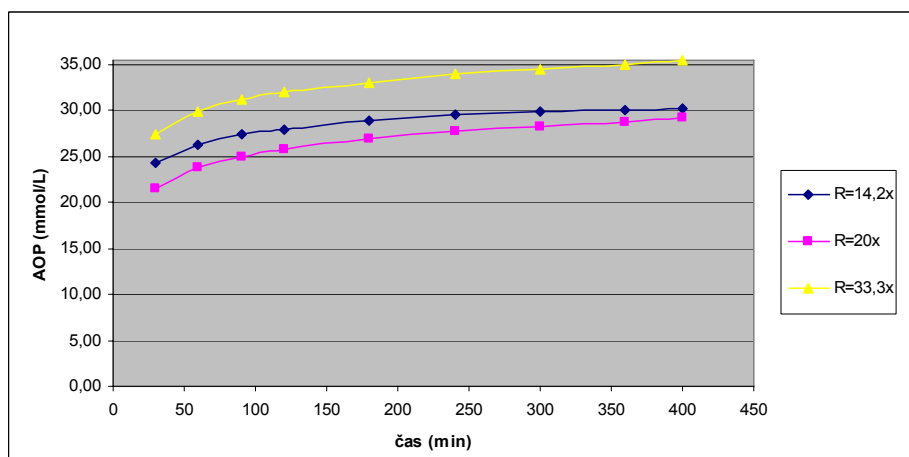
Končni izračun antioksidacijskega potenciala po času 30 minut pokaže, da pri cabernet francu praktično ni nobenih razlik, ker so vrednosti od 12,6 do 13,0 mmol/L. Pri merlotu je razlika največja (od 21,5 do 27,4 mmol/L), se pravi, da pri večji razredčitvi dobimo večjo vrednost antioksidacijskega potenciala, enako kot pri refošku, čeprav je razlika med vrednostmi manjša. Pri refošku pri 14,2- in 20-kratni razredčitvi dobimo praktično identično vrednost (14,7 in 14,4 mmol/L).

4.2.2 Počasna kinetika redukcije radikala DPPH[•]

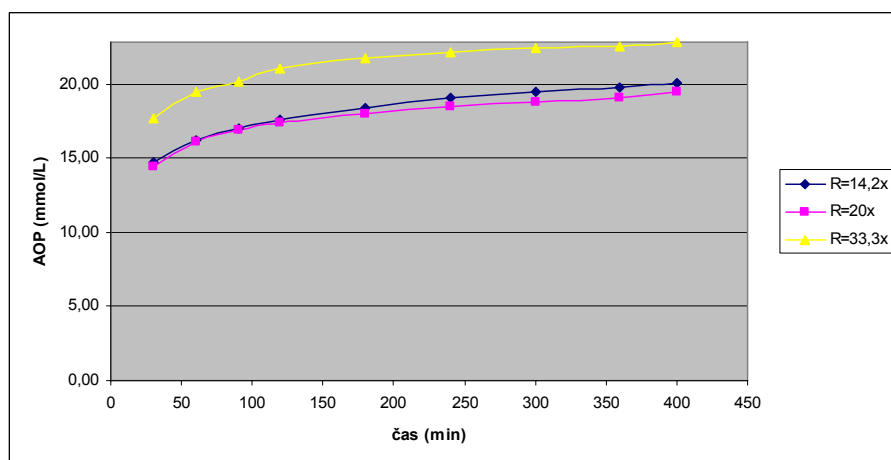
4.2.2.1 Odvisnost posamezne sorte pri različnih razredčitvah



Slika 21: Vrednosti AOP pri merjenju počasne kinetike redukcije radikala DPPH[•] pri dodatku različno razredčenega vina sorte cabernet franc v raztopino DPPH[•]



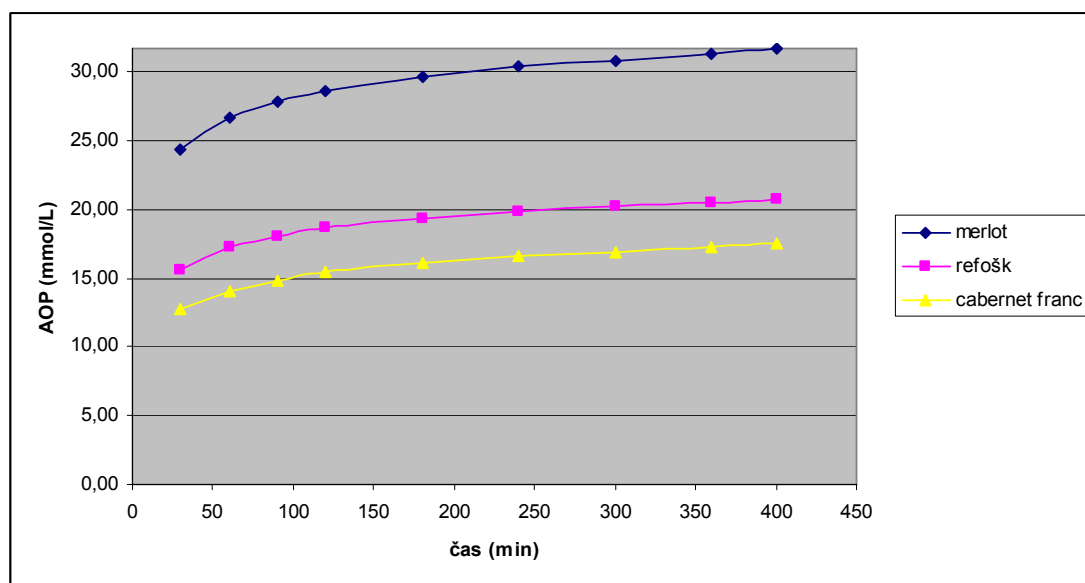
Slika 22: Vrednosti AOP pri merjenju počasne kinetike redukcije radikala DPPH[•] pri dodatku različno razredčenega vina sorte merlot v raztopino DPPH[•]



Slika 23: Vrednosti AOP pri merjenju počasne kinetike redukcije radikala DPPH[•] pri dodatku različno razredčenega vina sorte refošk v raztopino DPPH[•]

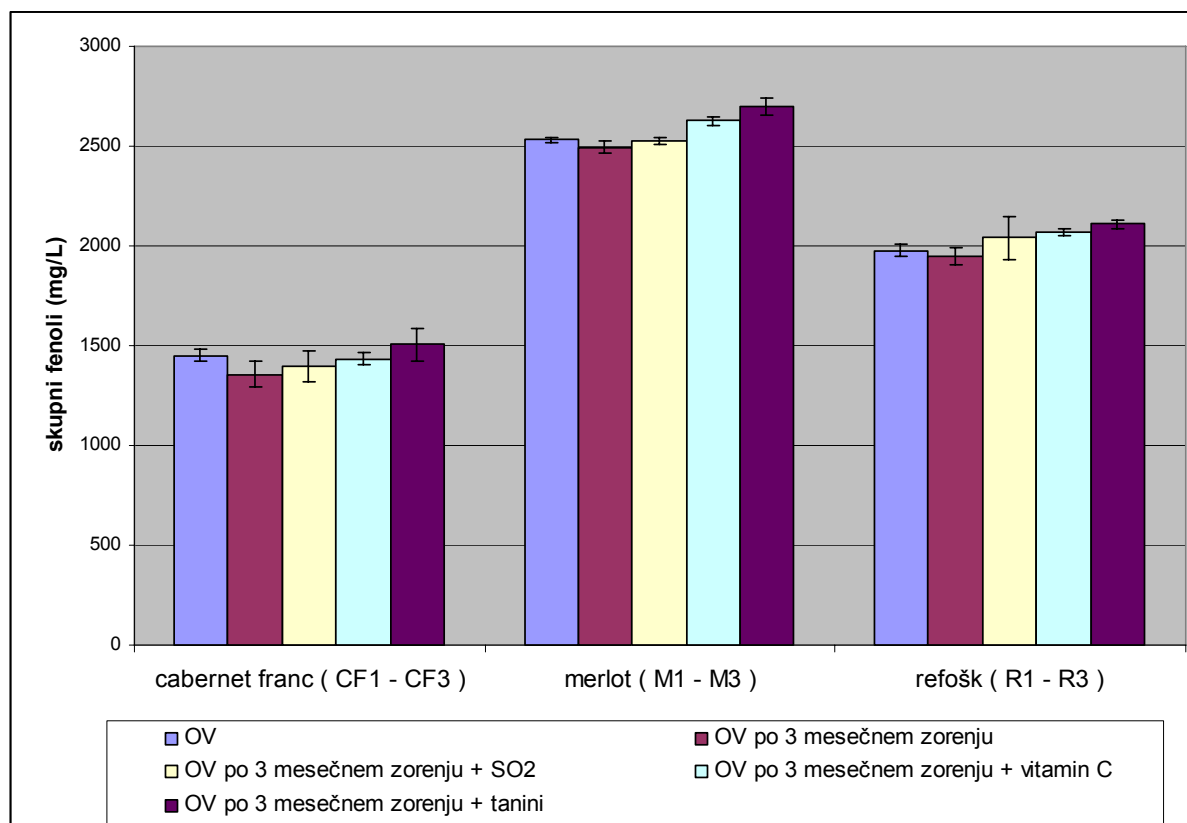
Iz vseh treh slik (21–23) je razvidno, da se vrednosti antioksidacijskega potenciala, izražene v mmol reduciranega DPPH[•] na liter vina, v času 400 minut (6 ur in 40 minut) še vedno nekoliko povečujejo. Iz slik 22 in 23 je razvidno, da so tako pri merlotu in refošku pri najvišji razredčitvi najvišje vrednosti antioksidacijskega potenciala, pri cabernet francu (slika 21) so vrednosti praktično izenačene. Zanimivo je tudi, da se krivulji vrednosti AOP pri najmanj razredčenem vinu nahajajo med drugima krivuljima za srednjo in najvišjo razredčitev (sliki 22 in 23). Da bi lahko nedvoumno podali zvezo med različnimi razredčitvami in pravilnostjo določanja AOP, bi bilo potrebno opraviti več meritev.

4.2.2.2 Povprečne vrednosti AOP pri različnih sortah



Slika 24: Povprečne vrednosti AOP pri merjenju počasne kinetike redukcije radikala DPPH[•] pri dodatku različno razredčenega vina v raztopino DPPH[•] pri različnih sortah

4.3 REZULTATI DOLOČANJA MASNIH KONCENTRACIJ SKUPNIH FENOLNIH SPOJIN (SKUPNIH FENOLOV)

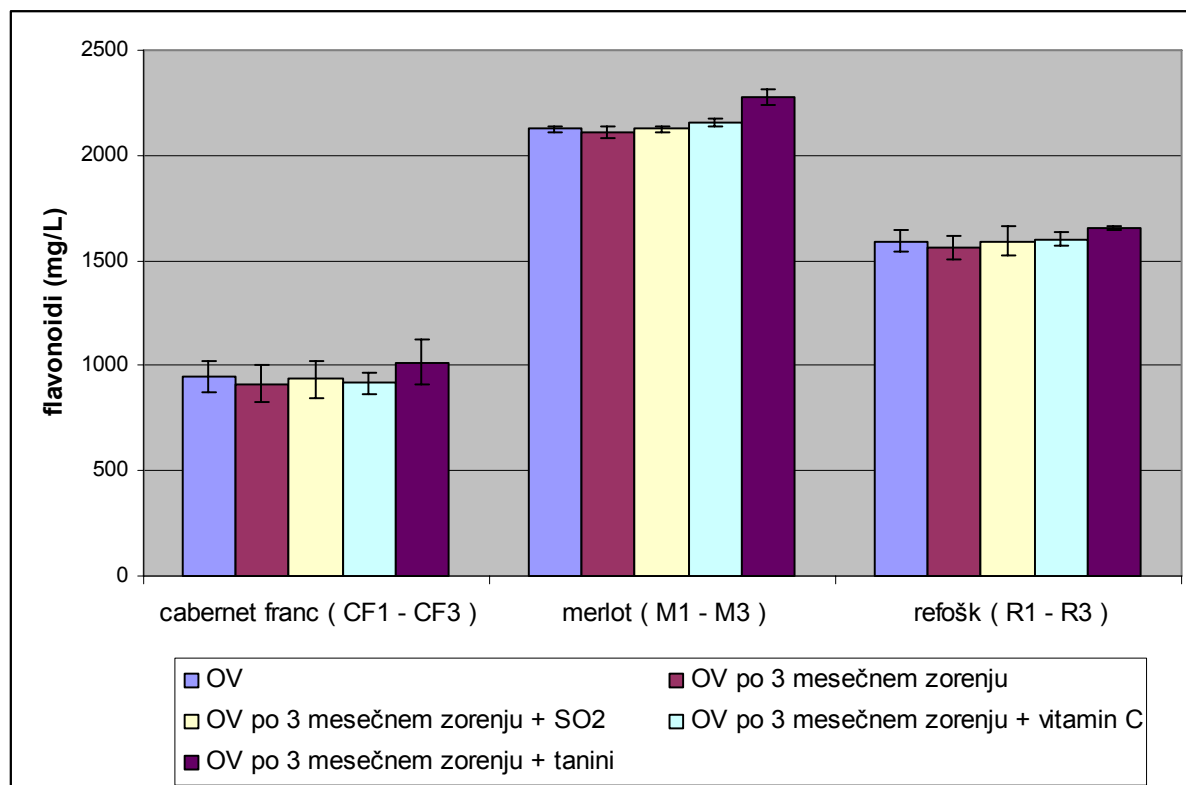


Slika 25: Povprečna koncentracija skupnih fenolnih spojin v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

Na sliki 25 je prikazana povprečna koncentracija skupnih fenolnih spojin po posameznih sortah, izražen v mg galne kisline/L vina. Rezultate prikazujemo kot povprečne vrednosti posameznih sort. Vsak stolpec na sliki 25 predstavlja povprečno vrednost devetih meritev in sicer po tri meritve na vsak vzorec vina. Zgornji graf (slika 25) je zelo podoben grafu na sliki 16, kjer je prikazan povprečni antioksidacijski potencial po posameznih sortah. Največjo koncentracijo skupnih fenolov ima vino sorte merlot po tromesečnem zorenju z dodatkom taninov (2700 mg/L), najmanjšo pa vino sorte cabernet franc po tromesečnem zorenju brez dodatka enološkega sredstva (1360 mg/L).

Iz slike 25 je razvidno, da imajo najmanjšo koncentracijo skupnih fenolov vina, po tromesečnem zorenju brez dodatka enološkega sredstva (koncentracija fenolnih spojin se je v osnovnem vinu po tromesečnem zorenju zmanjšala v primerjavi z osnovnim vinom pri vseh treh sortah). Za cabernet franc in merlot po tromesečnem zorenju z dodatkom SO₂ lahko rečemo, da se je vrednost skupnih fenolov ohranila, nekoliko višja vrednost je v tem primeru pri refošku, vendar je tudi tukaj standardna deviacija največja. Dodatek vitamina C je povečal koncentracijo skupnih fenolov v vseh treh sortah v primerjavi z osnovnim vinom po tromesečnem zorenju brez dodatka enoloških sredstev. Največjo koncentracijo skupnih fenolov smo določili pri osnovnih vinih po tromesečnem zorenju z dodatkom taninov. Pri vseh sortah je dodatek tanina še povečal vsebnost skupnih fenolov.

4.4 REZULTATI DOLOČANJA MASNIH KONCENTRACIJ FLAVONOIDNIH FENOLOV (FLAVONOIDOV)



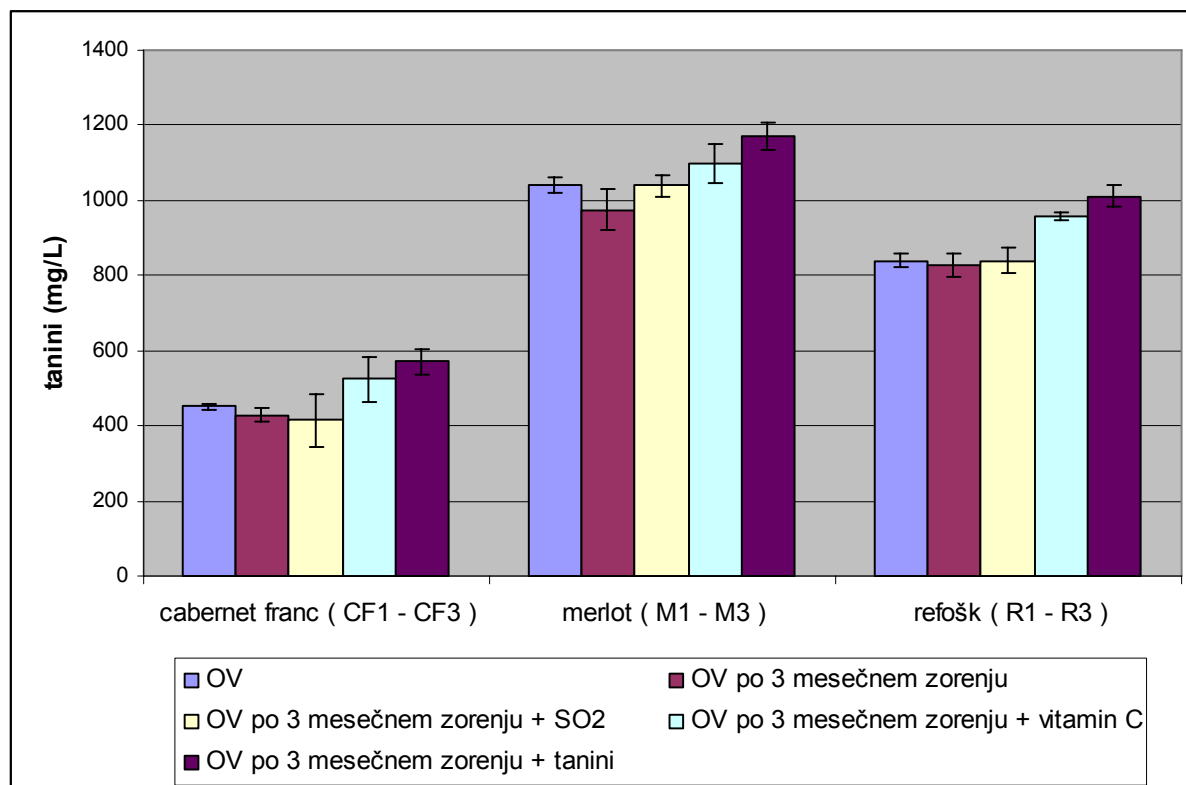
Slika 26: Povprečna koncentracija flavonoidov v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

Na sliki 26 je prikazana povprečna koncentracija flavonoidnih fenolov po posameznih sortah, izraženih v mg galne kisline/L vina. Rezultate prikazujemo kot povprečne vrednosti posameznih sort. Vsak stolpec na sliki 26 predstavlja povprečno vrednost treh meritev (tri meritve na vsak vzorec vina). Največjo koncentracijo flavonoidov ima vino sorte merlot po tromesečnem zorenju z dodatkom taninov (2280 mg/L), najmanjšo pa vino sorte cabernet franc po tromesečnem zorenju brez dodatka enološkega sredstva (910 mg/L).

Iz slike 26 je razvidno, da imajo osnovna vina po tromesečnem zorenju z dodanimi tanini največjo vsebnost flavonoidov. Pri vseh sortah je dodatek taninov povečal koncentracijo flavonoidov v primerjavi z osnovnimi vini. Za vina po tromesečnem zorenju z dodanim SO₂ in vitaminom C lahko rečemo, da so ohranile vrednost flavonoidov. Najmanjšo koncentracijo flavonoidov imajo vina po tromesečnem zorenju brez dodatka enološkega sredstva (koncentracija flavonoidov se je v osnovnem vinu po tromesečnem zorenju zmanjšala v primerjavi z osnovnim vinom v vseh treh primerih).

Vidi se, da so izbrana enološka antioksidacijska sredstva (žveplov dioksid, askorbinska kislina in enološki tanin) v pretežni meri ohranila, v nekaterih primerih celo povečala koncentracijo flavonoidov, res pa je, da je standardna deviacija pri cabernetu franc največja (v vseh primerih vzorcev), nekoliko manjša pri refošku, najmanjša pa pri merlotu.

4.5 REZULTATI DOLOČANJA MASNIH KONCENTRACIJ TANINSKIH FENOLOV (TANINOV)

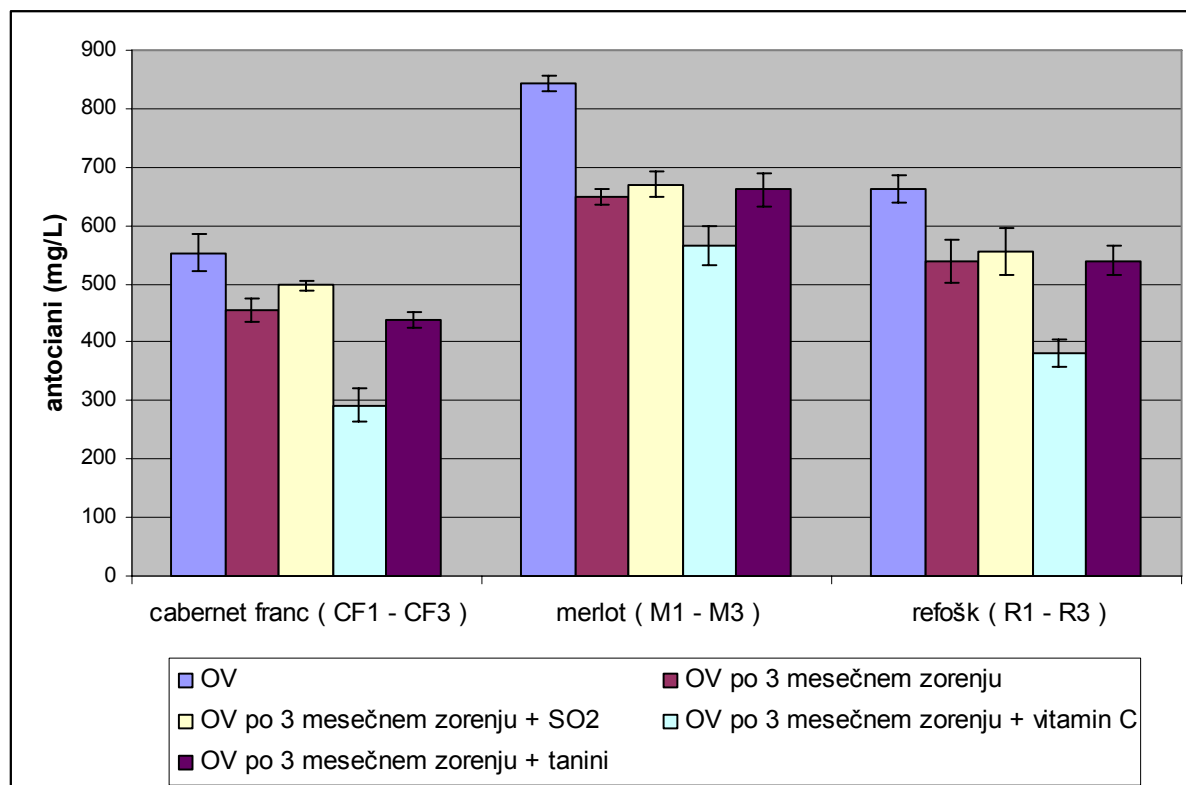


Slika 27: Povprečna koncentracija taninov v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

Na sliki 27 je prikazana povprečna koncentracija taninskih fenolov po posameznih sortah, izraženih v mg galne kisline/L vina. Rezultate prikazujemo kot povprečne vrednosti posameznih sort. Vsak stolpec na sliki 27 predstavlja povprečno vrednost treh meritev (tri meritve na vsak vzorec vina).

Iz slike 27 je razvidno, da imajo osnovna vina po tromesečnem zorenju z dodanimi tanini največjo vsebnost taninov, nekoliko manjšo vrednost taninov imajo vina po tromesečnem zorenju z dodanim vitaminom C. Tako dodatek taninov, kot tudi dodatek vitamina C je povečal koncentracijo taninov v primerjavi z osnovnimi vini. Pri sorti cabernet franc po tromesečnem zorenju z dodanim SO₂ lahko rečemo, da so se vrednosti taninov za spoznanje zmanjšale, pri refošku so se ohranile, pri merlotu pa so se nekoliko povečale. V vseh treh primerih so se koncentracije taninov v osnovnih vinih po tromesečnem zorenju zmanjšale.

4.6 REZULTATI DOLOČANJA MASNIH KONCENTRACIJ ANTOCIANINOV (ANTOCIANOV)

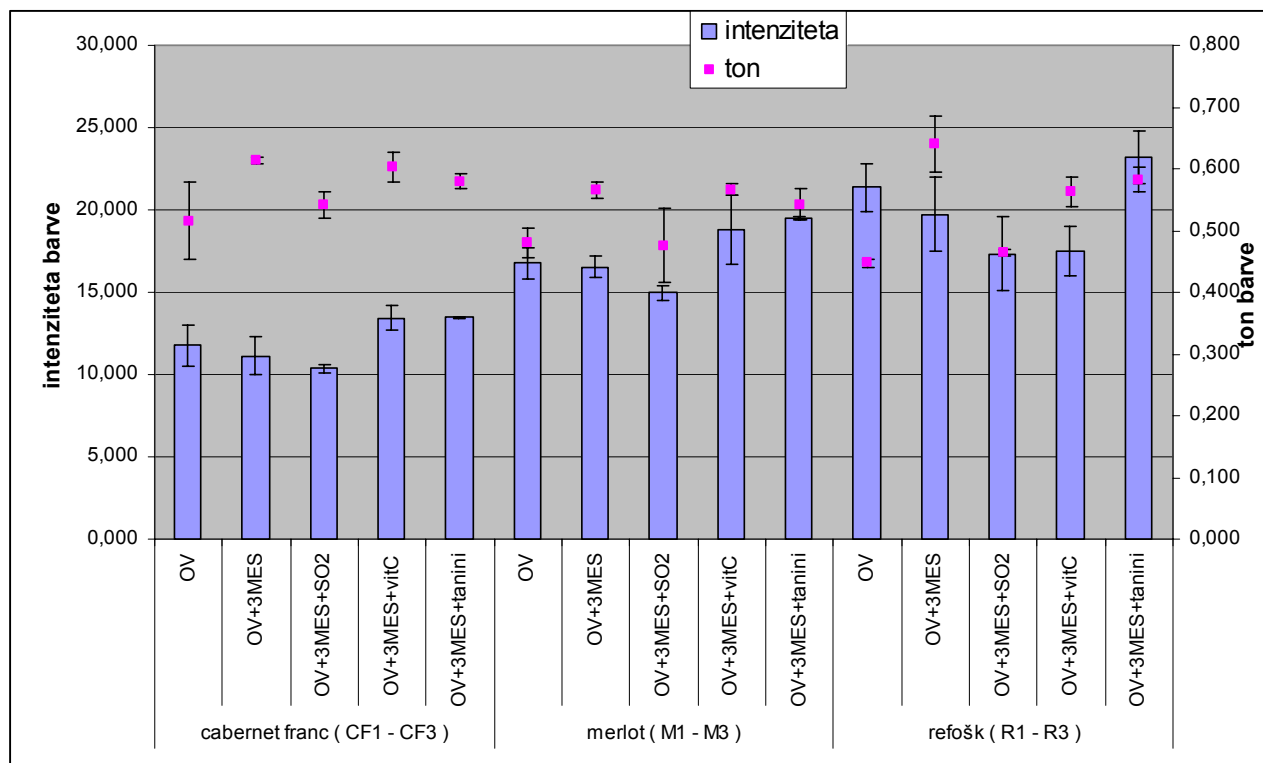


Slika 28: Povprečna koncentracija antocianov v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

Na sliki 28 je prikazana povprečna koncentracija antocianov po posameznih sortah, izraženih v mg/L vina. Rezultate prikazujemo kot povprečne vrednosti posameznih sort. Vsak stolpec na sliki 28 predstavlja povprečno vrednost treh meritev (tri meritve na vsak vzorec vina).

Iz slike 28 je razvidno, da so se v vseh treh sortah koncentracija antocianov zmanjšala v osnovnem vinu po tromesečnem zorenju. Največje zmanjšanje opazimo pri merlotu. V osnovnem vinu po tromesečnem zorenju z dodatkom SO₂-ja je razvidno, da so vrednosti antocianov nekoliko večje v primerjavi z osnovnim vinom po tromesečnem zorenju brez dodatka enoloških sredstev. Pri vinu po tromesečnem zorenju z dodatkom vitamina C pa opazimo, da smo pri vseh treh sortah določili velik padec koncentracije antocianov (najmanjše koncentracije). Največji padec koncentracije opazimo pri sorti cabernet franc. Dodatek enološkega tanina je pri sortah merlot in refošk ohranil koncentracijo antocianov, pri cabernet franku pa se je koncentracija antocianov ob dodatku taninov nekoliko zmanjšala.

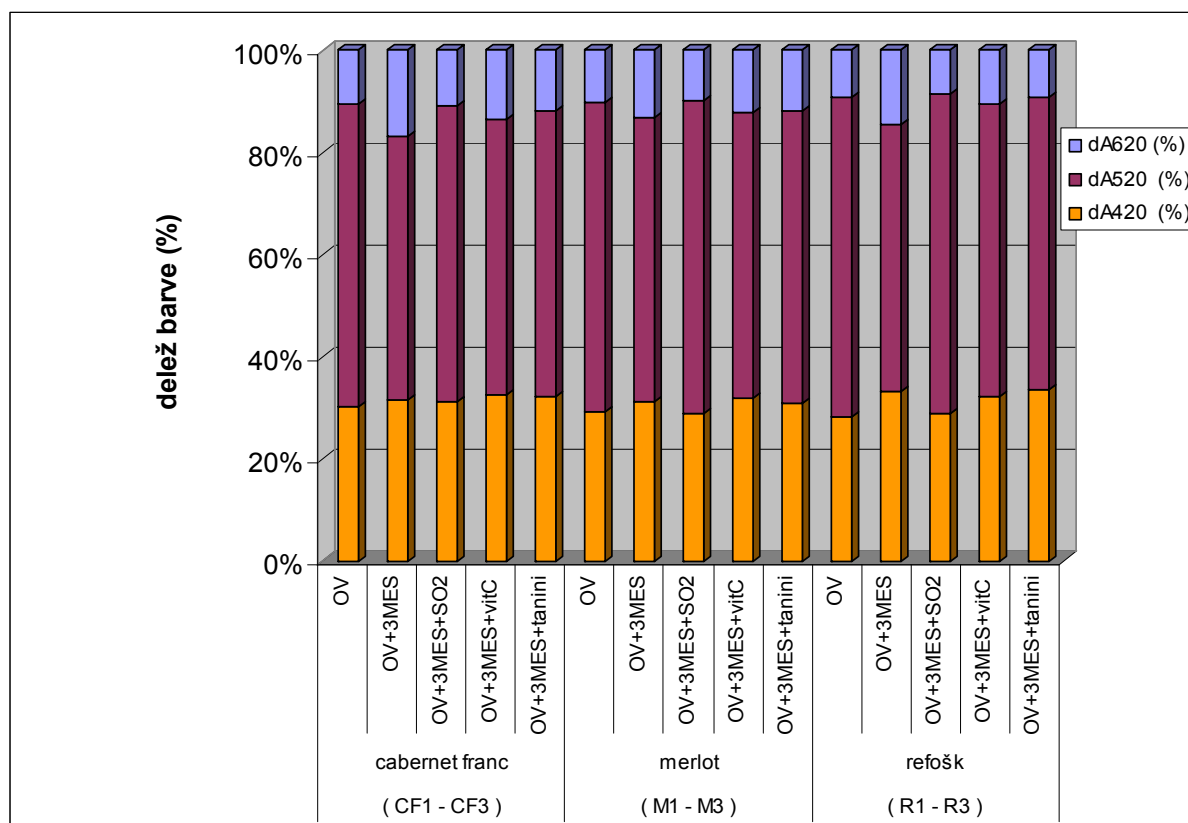
4.7 REZULTATI DOLOČANJA BARVNIH PARAMETROV



Slika 29: Povprečna intenziteta in ton barve v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

V vseh treh sortah se je intenziteta barve (slika 29) zmanjšala v osnovnem vinu po tromesečnem zorenju. Bistveno bolj se je zmanjšala z dodatkom SO₂. Z dodatkom vitamina C, se je povečala (izstopa samo vzorec pri refošku), še bolj pa se je povečala z dodatkom taninov.

Ton barve (slika 29) se je v vseh treh sortah v osnovnem vinu po tromesečnem zorenju bistveno povečal. Z dodatkom SO₂ se je zmanjšal, pri dodatku vitamina C se pri cabernet francu in merlotu ni spremenil, pri refošku se pa je nekoliko znižal v primerjavi z osnovnim vinom po tromesečnem zorenju. Pri dodatku taninov se je ton barve nekoliko znižal, vendar ne toliko kot pri dodatku SO₂, nekoliko izstopa le vzorec pri refošku.

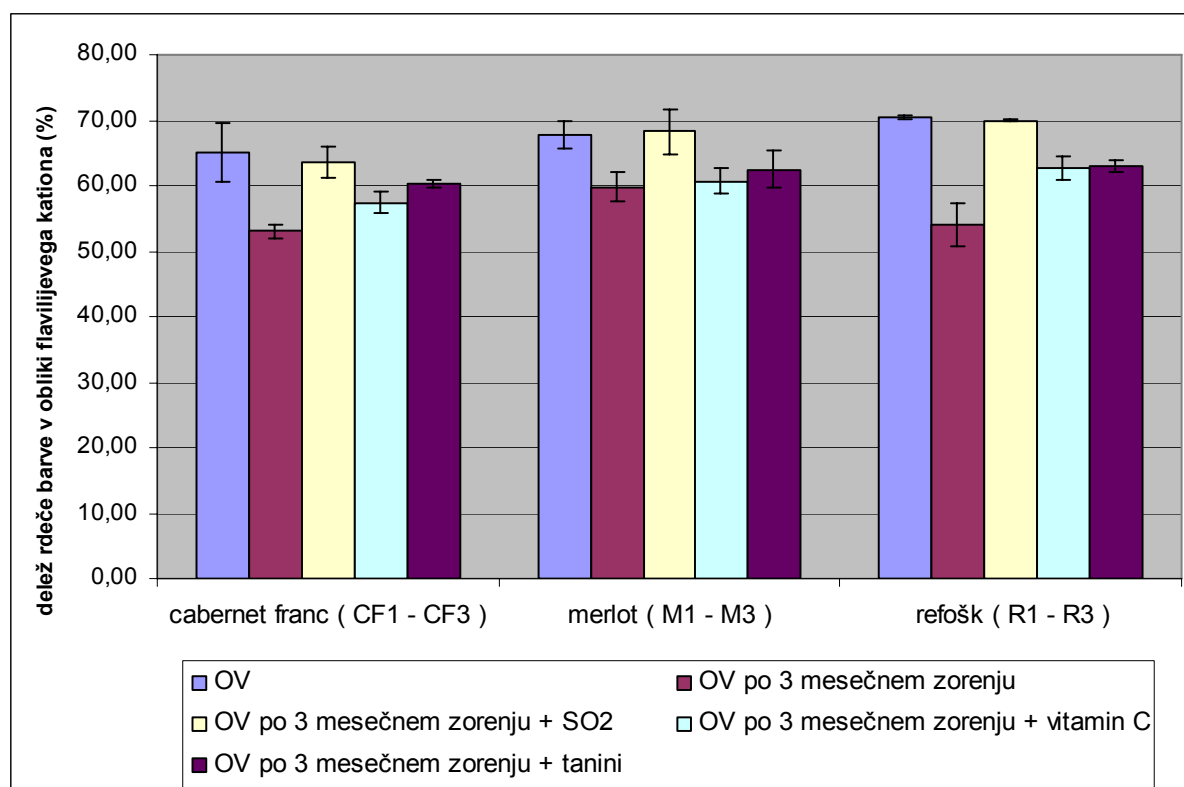


Slika 30: Deleži (%) barve pri posameznih valovnih dolžinah (A_{420} , A_{520} , A_{620}) v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

V vseh treh sortah se je delež barve pri valovni dolžini 420 nm (slika 30) povečal v osnovnem vinu po tromesečnem zorenju, kar kaže na oksidacijo posameznih barvnih snovi. Delež barve pri tej valovni dolžini, se je najbolj zmanjšal ob dodatku SO₂ pri vseh treh sortah, kar kaže na to, da je dodatek SO₂ v tem primeru najučinkovitejši antioksidant. Dodatek tanina je pri cabernet francu in merlotu nekoliko bolj zmanjšal delež barve pri tej valovni dolžini v primerjavi z dodatkom vitamina C (izstopa tukaj konkretno le vzorec refoška).

Iz slike 30 je razvidno, da se je v vseh treh sortah delež barve pri valovni dolžini 520 nm zmanjšal po tromesečnem zorenju. Delež barve pri tej valovni dolžini se je najbolj ohranil v osnovnih vinih po tromesečnem zorenju z dodatki po naslednjem vrstnem redu: SO₂→tanini→vitamin C.

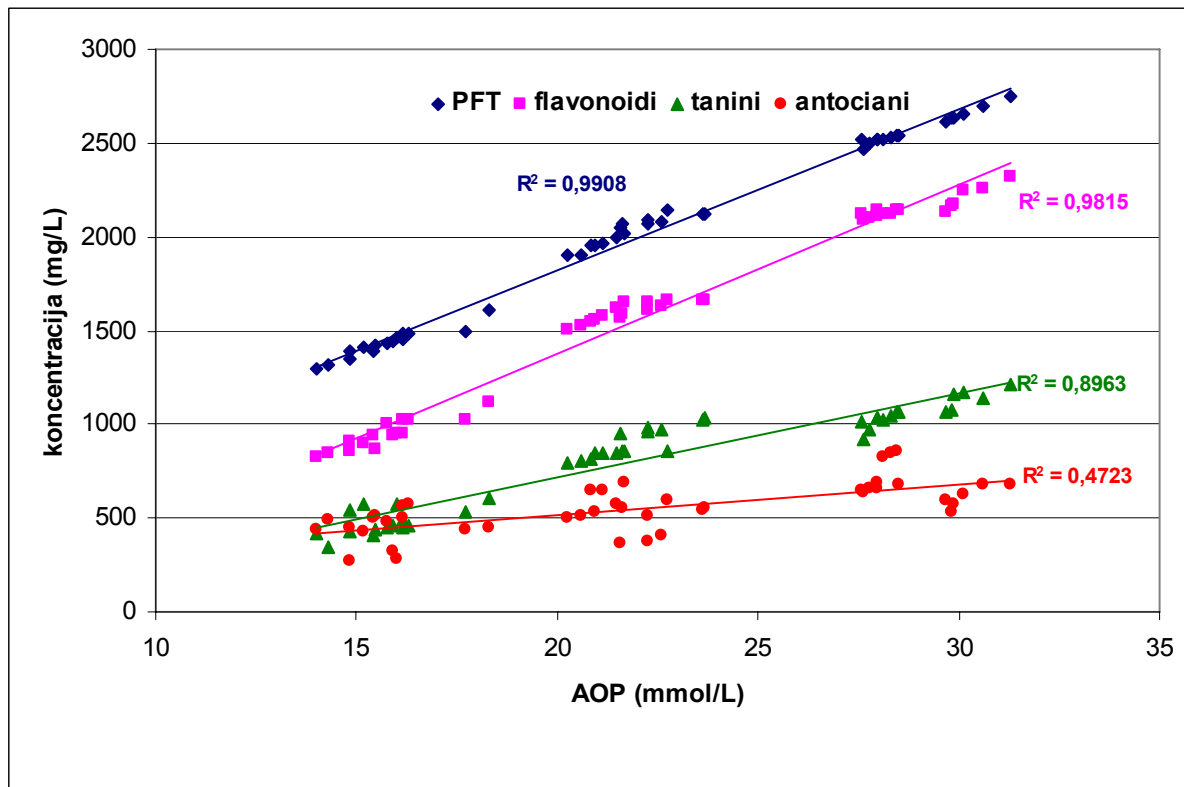
Rezultati deleža barve pri valovni dolžini 620 nm (slika 30) so ravno obratni kot pri rezultatih za delež barve pri valovni dolžini 520 nm. Največji delež barve pri tej valovni dolžini je pri vseh treh sortah opažen v osnovnem vinu po tromesečnem zorenju brez dodatka enoloških sredstev. Glede na dodatek enoloških sredstev, smo dobili največji delež pri dodatku vitamina C, sledi mu dodatek tanina in najmanjši delež smo dobili pri dodatku SO₂.



Slika 31: Delež (%) rdeče barve prostih in vezanih antocianov v obliki flavilijevega kationa (dA_F) v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

Iz slike 31 je razvidno, da se je delež rdeče barve v obliki flavilijevega kationa drastično zmanjšal v osnovnem vinu po tromesečnem zorenju. Delež rdeče barve se je z dodatkom SO₂ ohranil. Z dodatkom vitamina C se je delež rdeče barve tudi ohranil pri cabernet francu in refošku, pri merlotu pa ni bistvene razlike. Z dodatkom tanina se je tudi delež barve ohranil nekoliko boljše kot z dodatkom vitamina C. Delež rdeče barve v obliki flavilijevega kationa se je najbolj ohranil v osnovnih vinih po tromesečnem zorenju z dodatki po naslednjem vrstnem redu: SO₂ → tanini → vitamin C.

4.8 REZULTATI KORELACIJE KONCENTRACIJ POSAMEZNIH FENOLNIH SPOJIN Z ANTIOKSIDACIJSKIM POTENCIALOM



Slika 32: Korelacija koncentracije posameznih fenolnih spojin (mg/L) z antioksidacijskim potencialom (mmol/L) v osnovnih vinih, OV po treh mesecih zorenja in OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

Korelacija med koncentracijami posameznih fenolnih spojin in AOP za vse vzorce vin je prikazana na sliki 32. Vidimo, da linearno z naraščajočo vsebnostjo skupnih fenolov ($R^2=0,991$) in flavonoidov ($R^2=0,982$) narašča tudi AOP, nekoliko slabša je korelacija z vsebnostjo taninov ($R^2=0,896$), najslabša pa z antociani ($R^2=0,472$).

4.9 REZULTATI PRISPEVKA DODANIH SREDSTEV K AOP IN KONCENTRACIJI SKUPNIH FENOLOV, FLAVONOIDOV, TANINOV, ANTOCIANOV TER K BARVNIM PARAMETROM

Preglednica 8a: Prispevek enoloških sredstev (SO₂, vitamina C in tanina) v modelnih raztopinah k AOP in koncentraciji skupnih fenolov, flavonoidov, taninov in antocianov

Parameter (enote)	SO ₂ (150 mg/L)	vitamin C (150 mg/hL)	tanin (150mg/L)
DPPH (mmol/L)	0,29	0,79	1,72
skupni fenoli (mg/L)	0	90	103
flavonoidi (mg/L)	0	26	18
tanini (mg/L)	0	46	99
antociani (mg/L)	0	0	0

Preglednica 8b: Prispevek enoloških sredstev (SO₂, vitamina C in tanina) v modelnih raztopinah k barvnim parametrom

Sredstvo	A ₄₂₀	A ₅₂₀	A ₆₂₀	l	ton	dA _F (%)	dA ₄₂₀ (%)	dA ₅₂₀ (%)	dA ₆₂₀ (%)
SO ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0
vit C	0	0	0	0	0	0	0	0	0
tanini	0,067	0,025	0,009	0,101	2,680	-52,00	66,34	24,75	8,91

V zgornjih dveh preglednicah so podani prispevki enološkega SO₂-ja, vitamina C in tanina k AOP, koncentraciji skupnih fenolov, flavonoidov, taninov, antocianov ter prispevek k izmerjenim barvnim parametrom. Dobili smo jih tako, da smo pripravili raztopine z SO₂, vitaminom C in taninom v destilirani vodi v taki koncentraciji, kot so bila dodana vinom (15 g/hL). Iz preglednic je razvidno, da vodna raztopina SO₂ prispeva minimalno le k vrednosti AOP. Vodna raztopina vitamina C prispeva minimalno k vrednosti AOP, z njo tudi določimo okoli 90 mg/L skupnih fenolov, 25 mg/L flavonoidov, 45 mg/L taninov in 0 mg/L antocianov. Kljub dodanih 150 mg/L taninov v raztopini, določimo le okoli 100 mg/L skupnih fenolov, 20 mg/L flavonoidov, 100 mg/L taninov ter 0 mg/L antocianov. Prispevek taninov k AOP je nekoliko večji kot pri SO₂ in vitaminu C. Le raztopina taninov prispeva k spremembi barvnih parametrov.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen naše diplomske naloge je bil določiti "antioksidativne lastnosti" mladih rdečih vin sort cabernet franc, merlot in refošk letnika 2005 iz Koprškega vinorodnega okoliša in ugotoviti kako se le te s časom in dodatkom določenih enoloških antioksidativnih dodatkov spreminjajo. Dokazano je, da na antioksidativne lastnosti v rdečih vinih vplivajo fenolne spojine, ki so prisotne v vinih. Da pa bi lahko ocenili "antioksidativne lastnosti" v vinu, njihovo povezavo s fenolnimi spojinami, ter raziskovali kako se le te ohranjajo s časom, smo se poslužili različnih analitičnih metod. Takoj po končani alkoholni fermentaciji smo s spektrofotometričnimi metodami določili vsem vzorcem antioksidacijski potencial, merili hitro in počasno kinetiko redukcije radikala DPPH^{*} (odvisnost posamezne sorte pri različnih razredčitvah in odvisnost posamezne razredčitve pri različnih sortah), določili skupne in posamezne fenolne spojine ter barvne parametre pri valovnih dolžinah 420 nm, 520 nm in 620 nm. V nadaljevanju smo vzorcem vina dodali izbrana enološka antioksidacijska sredstva (žveplov dioksid – 15 g K₂S₂O₅/hL, vitamin C – 15 g/hL askorbinske kisline, izbrani enološki tanin – 15 g/hL) ter primerjali antioksidacijski potencial, skupne in posamezne fenolne spojine ter barvne parametre pri različnih valovnih dolžinah po tromesečnem zorenju vina v primerjavi z osnovnim vinom. Ugotavljali smo tudi katere fenolne spojine najbolj korelirajo z antioksidacijskim potencialom vina.

Predpostavljali smo, da imajo vina z večjo vsebnostjo fenolnih spojin večji antioksidacijski potencial, da je odvisnost vsebnosti fenolnih spojin sortna lastnost in da naj bi se z dodatkom posameznih enoloških sredstev antioksidativne lastnosti mladih rdečih vin povečale oziroma vsaj ohranile.

Potrdili smo, da je vsebnost skupnih fenolnih spojin, prav tako pa tudi vsebnosti flavonoidov, taninov in antocianov sortna lastnost. V povezavi z večjo vsebnostjo skupnih fenolov, je značilno večji tudi antioksidacijski potencial vina.

Vse rezultate smo prikazali kot povprečne vrednosti posameznih sort, saj smo ugotovili, da so vrednosti AOP, skupnih fenolnih spojin, flavonoidov, antocianov, taninov in barvnih parametrov v veliko večji meri odvisne od sorte v primerjavi z uporabo pri tem diplomskem delu različne tehnologije (uporabe različnih encimov in hranil za pospeševanje maceracije). Rezultati o tem, kako je dodatek pektolitičnih encimov (encim Lallzyme OE, encim Lallzym EXV) in hranil (Opti-red) v drozgo pred maceracijo vplival na ekstrakcijo fenolnih spojin in na nadaljne vrednosti AOP, skupnih fenolnih spojin, flavonoidov, antocianov, taninov in barvnih parametrov pri posamezni sorti (cabernet franc, merlot, refošk) so prikazani v prilogah.

Iz slike 16 je razvidno, da se je v vseh treh sortah antioksidacijski potencial zmanjšal v osnovnem vinu po tromesečnem zorenju (v cabernet francu za 7 %, v merlotu za 2 % in refošku za 2 %). Tako je imel cabernet franc po tromesečnem zorenju brez dodatka najmanjši AOP (14,89 mmol/L). Za cabernet franc in merlot po tromesečnem zorenju z dodatkom SO₂ lahko rečemo, da se je AOP v primerjavi z osnovnim vinom po tromesečnem zorenju brez dodatka ohranil, nekoliko višja vrednost je v tem primeru pri refošku (povečal AOP za 4 %), vendar je tudi tukaj standardna deviacija največja. Dodatek vitamina C je povečal AOP v vseh treh sortah (v cabernet francu za 5 %, v merlotu za 7 % in v refošku za 6 %). Največji AOP pa smo določili pri osnovnih vinih po tromesečnem zorenju z dodatkom taninov. Pri vseh sortah

je dodatek tanina še povečal antioksidacijski potencial (v cabernet francu za 15 %, v merlotu za 10 %, v refošku za 11 %). Tako ima največji antioksidacijski potencial (AOP) vino sorte merlot po tromesečnem zorenju z dodatkom taninov (31 mmol/L).

Pri merjenju hitre kinetike (slike 17-19), nas je zanimalo, kako posamezne razredčitve vplivajo na samo kinetiko. Ugotovili smo, da sama razredčitev nima velikega vpliva na kinetiko, kar pomeni, da lahko merimo pri katerikoli od navedenih razredčitev pri danih sortah in pri tem ne bomo naredili velike napake.

Hitre metode ovrednotenja AOP vin z uporabo prostega organskega radikala DPPH[•] temeljijo na tem, da je reakcija s polifenoli v vinih končana po največ 30 minutah. To se pri kinetiki zmanjševanja absorbance raztopine DPPH[•] v odvisnosti od časa opazi tako, da absorbanca raztopine DPPH[•] ne pada več. Čas, ki je potreben, da se vzpostavi to ravnotežje je tudi primeren čas za določanje AOP vina. Ko se vzpostavi ravnotežje, se s pomočjo izračuna razlike absorbanc med referenčno raztopino in raztopino vzorca, ki je proporcionalna antioksidacijskemu potencialu vina, poznanega ekstincijskega koeficienta DPPH[•] (Molyneux, 2004) in z upoštevanjem razredčitev, izračuna vrednost AOP, ki smo jo izrazili kot množino reduciranega DPPH[•] na liter vina (mmol/L). Nekateri avtorji so opravljali analize AOP, npr. po 15 minutah (Katalinić in sod, 2003), drugi pa označujejo meritve po 30 minutah kot primeren čas analize AOP (Arnous in sod., 2002). Ker analize AOP ponavadi trajajo 30 minut pravimo tem metodam določanja, hitre metode določanja AOP.

Glede na lastno raziskovanje, je zelo težko reči, da je kinetika zmanjševanja absorbance v odvisnosti od časa hitra, saj je razvidno iz rezultatov (priloge D8– D13), da v času 400 minut še vedno ni bilo vzpostavljeno ravnotežje, ampak so se vrednosti absorbance še vedno nekoliko zmanjševale.

Ker smo se odločili, da bomo AOP izrazili kot množino reduciranega DPPH[•] na liter vina (mmol/L), je v tem primeru iz slik 21– 23 razvidno, da so pri cabernet francu vrednosti AOP glede na različne razredčitve zelo izenačene, pri merlotu in refošku pa pri najvišji razredčitvi dosežemo najvišje vrednosti AOP. Razvidno je tudi, da po 30 minutah pri sorti cabernet franc določimo vrednost AOP od 12,6 do 13 mmol/L, po 400 minutah pa znaša vrednost AOP od 17,3 do 17,6 mmol/L (odvisno od uporabljene razredčitve). Pri sorti merlot je odstopanje med uporabljenimi razredčitvami večje (po 30 minutah znaša AOP od 21,5 do 27,4 mmol/L, po 400 minutah pa od 29,3 do 35,5 mmol/L). Pri refošku je relativno majhna razlika pri 14,2-kratni in 20-kratni razredčitvi (AOP po 30 minutah znaša od 14,4 do 14,7 mmol/L, po 400 minutah pa od 19,5 do 20,0 mmol/L) za razliko od 33,3-kratne razredčitve (AOP po 30 minutah znaša 17,7 mmol/L in po 400 minutah 22,8 mmol/L). Če predpostavimo, da je v 400 minutah DPPH[•] v celoti zreagiralo (100 % zreagiralo), potem velja, da smo pri cabernet francu po 30 minutah določili približno 73 % zreagirane radikal DPPH[•], pri merlotu od 73 do 80 % in pri refošku od 73 do 78 %. Kakor sem opisal že v metodah dela, smo AOP po posameznih sortah v osnovnem vinu (OV), v OV po treh mesecih zorenja, v OV po treh mesecih zorenja z dodatkom ali žveplovega dioksida ali vitamina C ali enološkega tanina določali v času 240 minut, saj je iz grafov kinetike razvidno (slike 21–23), da so razlike v vrednosti AOP ki ga določimo po času 240 minut in 400 minut zelo majhne. Pri meritvah AOP po 240 minutah pa lahko rečemo, da smo pri cabernet francu določili približno 95 % zreagirane radikal DPPH[•], pri merlotu od 94 do 96 % in pri refošku od 95 do 97 %. Rezultati so prikazani v prilogah (D4– D7, D20– D22).

Vpliv zorenja vina in dodatka enoloških sredstev na koncentracijo skupnih fenolnih spojin prikazuje slika 25, iz katere je razvidno, da se je po treh mesecih zorenja v vseh treh sortah koncentracija fenolnih spojin zmanjšala (v cabernet francu za 7 %, pri merlotu za 2 % in pri refošku za 1 %). Najmanjšo koncentracijo skupnih fenolov ima vino sorte cabernet franc po tromesečnem zorenju brez dodatka enološkega sredstva (1360 mg/L). Za cabernet franc in merlot po tromesečnem zorenju z dodatkom SO₂ lahko rečemo, da se je vrednost skupnih fenolov glede na osnovno vino po tromesečnem zorenju ohranila, nekoliko višja vrednost je v tem primeru pri refošku (koncentracija skupnih fenolov se je povečala za 5 %). Dodatek vitamina C je povečal koncentracijo skupnih fenolov v vseh treh sortah (v cabernetu francu za 7 %, v merlotu za 5 % in v refošku za 6 %). Največjo koncentracijo skupnih fenolov pa smo določili pri osnovnih vinih po tromesečnem zorenju z dodatkom taninov. Pri vseh sortah je dodatek tanina še povečal vsebnost skupnih fenolov (v cabernetu francu za 11 %, v merlotu za 8 % in v refošku za 8 %). Tako ima največjo koncentracijo skupnih fenolov vino sorte merlot po tromesečnem zorenju z dodatkom taninov (2700 mg/L).

Pri določevanju koncentracije flavonoidov, je iz slike 26 razvidno, da sta enološka dodatka SO₂ in vitamin C v pretežni meri ohranila koncentracijo flavonoidov v primerjavi z osnovnim vzorcem vina po tromesečnem zorenju brez dodatka enološkega sredstva. Dodatek enološkega tanina pa je povečal vsebnost flavonoidov pri vseh treh sortah (v cabernet francu za 11 %, v merlotu za 8 % in v refošku za 6 %). Največjo koncentracijo flavonoidov ima vino sorte merlot po tromesečnem zorenju z dodatkom taninov (2280 mg/L), najmanjšo pa vino sorte cabernet franc po tromesečnem zorenju brez dodatka enološkega sredstva (910 mg/L).

Dodatek enološkega tanina (slika 27) je dobro ohranil in stabiliziral prisotne tanine v osnovnih vinih saj je pri vseh treh sortah najbolj povečal koncentracijo taninov v primerjavi z osnovnim vinom po tromesečnem zorenju brez dodatka enološkega sredstva (v cabernet francu za 33 %, v merlotu za 20 % in v refošku za 22 %). Največjo koncentracijo taninov vsebuje vino sorte merlot po tromesečnem zorenju z dodatkom taninov (1171 mg/L). Nekoliko manj se poveča koncentracija taninov z dodatkom vitamina C (v cabernet francu za 22 %, v merlotu za 13 % in v refošku za 16 %). Pri sorti cabernet franc po tromesečnem zorenju z dodanim SO₂, lahko rečemo, da so se koncentracije taninov za spoznanje zmanjšale (zmanjšanje za 3 %), pri refošku so se ohranile (povečanje za 1 %) , pri merlotu pa so se nekoliko zvišale (povečanje za 7 %). V vseh treh primerih so se koncentracije taninov v osnovnih vinih po tromesečnem zorenju zmanjšale (pri cabernet francu za 5 %, pri merlotu za 6 % in pri refošku za 1 %).

Pri določanju koncentracije antocianov (slika 28) smo ugotovili, da so imeli vzorci osnovnega vina pri vseh treh sortah največje vrednosti. Tako smo izmerili največjo koncentracijo antocianov v osnovnem vzorcu vina sorte merlot (843 mg/L). Vsebnost antocianov se je v osnovnem vinu po treh mesecih zorenja močno zmanjšala v vseh treh sortah (slika 28). Največje zmanjšanje opazimo v merlotu (kar za 23 %), v refošku in cabernet francu pa je bilo zmanjšanje koncentracije tudi zelo veliko (v refošku za 19 %, v cabernet francu pa za 18 %). V osnovnem vinu po tromesečnem zorenju z dodatkom SO₂ je razvidno, da je dodatek SO₂ ohranil koncentracije antocianov, saj so le te nekoliko večje v primerjavi z osnovnim vinom po tromesečnem zorenju brez dodatka enoloških sredstev (v cabernet francu za 9 %, v merlotu za 3 % in v refošku za 3 %). Dodatek vitamina C v osnovno vino je po tromesečnem zorenju povzročil še dodatno izgubo koncentracije antocianov v primerjavi z osnovnim vinom po tromesečnem zorenju brez dodatka enološkega sredstva. Največjo izgubo koncentracije antocianov opazimo v sorti cabernet franc (kar za 36 %), tukaj smo določili tudi najmanjšo koncentracijo antocianov (292 mg/L), pri refošku se je zmanjšala koncentracija antocianov za

29 % in v merlotu za 13 %. Dodatek enološkega tanina je pri sortah merlot in refošk ohranil koncentracijo antioksidantov, pri cabernet francu pa se je koncentracija antocianov ob dodatku taninov nekoliko zmanjšala (zmanjšanje za 4 %).

Kakor je razvidno iz slike 29, se je v vseh treh sortah intenziteta barve zmanjšala v osnovnem vinu po treh mesecih zorenja (pri cabernet francu za 5 %, pri merlotu za 1 % in pri refošku za 8 %), ton barve pa se je bistveno povečal (pri cabernet francu za 19 %, pri merlotu za 18 % in pri refošku za kar 43 %), kar pomeni, da je prišlo zaradi prisotnosti kisika po treh mesecih zorenja do oksidacije rdečih barvnih snovi (rdeča barva je prehajala v oranžnorjavo) in posledično do izgube barve. Dodatek SO₂ je osnovnemu vinu po treh mesecih zorenja zmanjšal tako intenziteto, kakor tudi ton barve. Zmanjšanje intenzitete barve je lahko posledica vezave SO₂ na mesto, ki je namenjeno vezavi antocianov na ostale fenole in tanine. Tako prepreči tvorbo antocian-taninskih kompleksov, ki so pomembni za tvorbo močne in stabilne barve v vinu. Žveplo je znano kot belilno sredstvo v vinu. Intenziteta barve se je v primerjavi z osnovnim vinom po tromesečnem zorenju brez dodatka enoloških sredstev zmanjšala pri cabernet francu za 7 %, pri merlotu za 10 % in pri refošku za 12 %. Zmanjšanje tona barve pa pomeni, da je SO₂ uspešno zaustavil procese oksidacije v vinu. Pri merlotu je SO₂ v celoti preprečil oksidacijo, tudi pri refošku je skoraj v celoti zaščitil vino pred oksidacijo, nekoliko manj učinkovit je bil pri cabernet francu. Dodatek vitamina C je osnovnemu vinu po treh mesecih zorenja povečal intenziteto barve (v cabernet francu za 20 % in pri merlotu za 13 %), izstopa samo vzorec refoška, kjer se je intenziteta barve zmanjšala (za 11 %). Ton barve se pri osnovnem vinu z dodatkom vitamina C po tromesečnem zorenju pri cabernet francu in merlotu ni spremenil v primerjavi z osnovnim vinom po tromesečnem zorenju brez dodatka enološkega sredstva, pri refošku se je pa zmanjšal (zmanjšanje za 12 %), kar pomeni, da je vitamin C v določeni meri zaustavil procese oksidacije samo pri refošku. Z dodatkom taninov se je intenziteta barve še bolj povečala pri vseh treh sortah, ton barve se je nekoliko zmanjšal, vendar ne toliko kot pri dodatku SO₂, nekoliko izstopa le vzorec pri refošku, kjer se je ton barve nekoliko povečal.

Slika 30 pokaže, da se je delež barve pri valovni dolžini 420 nm v vseh treh sortah povečal v osnovnem vinu po tromesečnem zorenju, kar kaže na oksidacijo posameznih barvnih snovi. Delež barve pri tej valovni dolžini, se je najbolj zmanjšal ob dodatku SO₂ pri vseh treh sortah, kar kaže na to, da je dodatek SO₂ v tem primeru najučinkovitejši antioksidant. Dodatek tanina je pri cabernet francu in merlotu nekoliko bolj zmanjšal delež barve pri tej valovni dolžini v primerjavi z dodatkom vitamina C (izstopa tukaj konkretno le vzorec refoška).

Delež barve pri valovni dolžini 520 nm se je v vseh treh sortah po treh mesecih zorenja zmanjšal. Delež barve pri tej valovni dolžini se je najbolj ohranil v osnovnih vinih po tromesečnem zorenju z dodatki po naslednjem vrstnem redu: SO₂ → tanini → vitamin C. Rezultati deleža barve pri valovni dolžini 620 nm so ravno obratni kot pri rezultatih za delež barve pri valovni dolžini 520 nm. Največji delež barve pri tej valovni dolžini je pri vseh treh sortah opažen v osnovnem vinu po tromesečnem zorenju brez dodatka enoloških sredstev. Glede na dodatek enoloških sredstev, smo dobili največji delež pri dodatku vitamina C, sledi mu dodatek tanina in najmanjši delež smo dobili pri dodatku SO₂. Najboljši antioksidant za barvo vina, je tisti enološki dodatek, ki najbolje ohrani oz. poveča delež barve pri valovni dolžini 520 nm ter čim bolj zmanjša delež barve pri valovnih dolžinah 420 in 620 nm. Kot najboljši antioksidant, se je v tem primeru izkazal SO₂, sledijo mu tanini in na zadnjem mestu je vitamin C.

Iz slike 31 je razvidno, da se je delež rdeče barve v obliki flavilijevega kationa drastično zmanjšal v osnovnem vinu po tromesečnem zorenju. Z dodatkom SO₂ se je bistveno povečal,

neglede na sorto (delež rdeče barve se je z dodatkom SO₂ ohranil). Z dodatkom vitamina C se je delež rdeče bave tudi ohranil pri cabernet francu in refošku, pri merlotu pa ni bistvene razlike. Z dodatkom tanina se je tudi delež barve ohranil nekoliko boljše kot z dodatkom vitamina C. Delež rdeče barve v obliki flavilijevega kationa se je najbolj ohranil v osnovnih vinih po tromesečnem zorjenju z dodatki po naslednjem vrstnem redu: SO₂→ tanini→ vitamin C.

Korelacija med koncentracijami posameznih fenolnih spojin in AOP za vse vzorce vin je prikazana na sliki 32. Vidimo, da linearno z naraščajočo vsebnostjo skupnih fenolov ($R^2=0,991$) in flavonoidov ($R^2=0,982$) narašča tudi AOP, nekoliko slabša je korelacija z vsebnostjo taninov ($R^2=0,896$), najslabša pa z antociani ($R^2=0,472$). Tudi v literaturi smo zasledili najslabšo korelacijo med antociani in AOP. Tudi Košmerl in sod. (2005), de Beer in sod. (2005), Katalinić in sod. (2003) in Arnous in sod. (2002) ugotavljajo najslabšo korelacijo med antociani in AOP. Rački (2005) navaja dobro korelacijo med flavonoidi in AOP ($R^2=0,969$) ter med skupnimi fenoli in AOP ($R^2=0,954$), nekoliko slabšo korelacijo med tanini in AOP ($R^2=0,802$) ter najslabšo z antociani ($R^2=0,396$).

5.2 SKLEPI

- Vsebnost fenolnih spojin, flavonoidov, taninov in antocianov je sortna lastnost.
- V povezavi z večjo vsebnostjo skupnih fenolnih spojin je značilno večji tudi antioksidacijski potencial vina.
- Največjo vsebnost skupnih fenolnih spojin in AOP je imelo vino sorte merlot, sledita mu refošk in cabernet franc.
- Po 400 minutah še vedno poteka redukcija radikala DPPH[•] s fenolnimi spojinami v vinu (ravnotežje še ni v celoti vzpostavljeno).
- Če predpostavimo, da radikal DPPH[•] po 400 minutah v celoti zreagira s fenolnimi spojinami v vinu (100 % zreagira), potem velja, da po 30 minutah pri cabernet francu določimo okoli 73 % zreagiranega radikala DPPH[•], pri merlotu od 73 do 80 % in pri refošku od 73 do 78 %. Pri meritvah AOP po 240 minutah tako določimo pri cabernetu franc približno 95 % zreagiranega radikala DPPH[•], pri merlotu od 94 do 96 % in pri refošku od 95 do 97 %.
- Z dodatkom posameznih enoloških sredstev, so se antioksidativne lastnosti mladih rdečih vin v večini primerov povečale oziroma vsaj ohranile.
- Dodatek taninov je najboljše enološko sredstvo za izboljšanje vrednosti AOP-ja, skupnih fenolnih spojin, flavonoidov in taninov. Sledi mu vitamin C, na zadnje mesto se je uvrstil SO₂.
- Dodatek SO₂ je najboljše enološko sredstvo za ohranjanje vsebnosti antocianov in barve vina (kljub temu, da je nekoliko znižal intenziteto barve je v celoti preprečil oksidacijo rdeče barve). Na drugo mesto so se uvrstili tanini, in kot zadnji vitamin C.
- Za vsa vina skupaj smo določili najboljšo korelacijo med AOP in skupnimi fenoli ($R^2=0,991$) ter med AOP in flavonoidi ($R^2=0,982$), nekoliko slabša je korelacija z vsebnostjo taninov ($R^2=0,896$), najslabša pa z antociani ($R^2=0,472$).

6 POVZETEK

Zaradi dokazanih antioksidativnih lastnosti fenolnih spojin vina v *in vitro* in *in vivo* raziskavah in pozitivnega učinka na naše zdravje, je pomembno, da jih z ustreznim znanjem in tehnološkimi postopki kar najbolj ohranimo in preprečimo njihovo oksidacijo.

Da pa bi lahko ocenili "antioksidativne lastnosti" v vinu, njihovo povezavo z različnimi fenolnimi spojinami, ter raziskovali kako se le te ohranjajo s časom, smo uporabili različne analitične metode. S spektrofotometričnimi metodami smo določali antioksidacijski potencial s pomočjo prostega radikala DPPH[•] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), določali smo skupne fenolne spojine, flavonoidne fenole, taninske fenole, antociane ter merili barvne parametre pri valovnih dolžinah 420 nm, 520 nm in 620 nm. Ugotavljali smo korelacije med antioksidacijskim potencialom in vsebnostmi različnih fenolnih spojin.

V mladih rdečih vinih sort cabernet franc, merlot in refošk letnika 2005 iz Koprškega vinorodnega okoliša smo takoj po končani alkoholni fermentaciji s spektrofotometričnimi metodami določili vsem vzorcem antioksidacijski potencial, merili hitro in počasno kinetiko redukcije radikala DPPH[•] (odvisnost posamezne sorte pri različnih razredčitvah in odvisnost posamezne razredčitve pri različnih sortah), določili skupne in posamezne fenolne spojine ter barvne parametre pri različnih valovnih dolžinah. V nadaljevanju smo vzorcem vina dodali izbrana enološka antioksidacijska sredstva (žveplov dioksid, vitamin C in tanin) ter primerjali antioksidacijski potencial, skupne in posamezne fenolne spojine ter barvne parametre pri različnih valovnih dolžinah po tromesečnem zorenju vina v primerjavi z osnovnim vinom.

Potrdili smo, da je vsebnost skupnih fenolnih spojin, prav tako pa tudi vsebnosti flavonoidov, taninov in antocianov sortna lastnost.

Koncentracije skupnih fenolnih spojin, flavonoidov, taninov in antocianov ter rezultati AOP in barvnih parametrov so v veliko večji meri odvisne od sorte, v primerjavi z uporabo različnih encimov in hranil za pospeševanje maceracije

V skladu z literaturo smo dokazali, da je v povezavi z večjo vsebnostjo skupnih fenolov, značilno večji tudi antioksidacijski potencial vina. Največjo vsebnost fenolov in AOP je takoj po alkoholni fermentaciji imelo vino sorte merlot (skupni fenoli=2532 mg/L ter AOP=28,30 mmol/L), sledita mu refošk (skupni fenoli=1978 mg/L, AOP=21,21 mmol/L) in cabernet franc (skupni fenoli=1452 mg/L, AOP=15,97 mg/L).

Redukcija radikala DPPH[•] s fenolnimi spojinami v vinu še ni popolnoma zaključena po 400 minutah, je pa iz grafov kinetike odvisnosti AOP od časa razvidno, da so razlike v vrednosti AOP ki ga določimo po času 240 minut in 400 minut majhne. Če predpostavimo, da radikal DPPH[•] po 400 minutah v celoti zreagira z fenolnimi spojinami v vinu (100 % zreagira), potem velja, da po 30 minutah pri cabernet francu določimo okoli 73 % zreagiranega radikala DPPH[•], pri merlotu od 73 do 80 % in pri refošku od 73 do 78 %. Pri meritvah AOP po 240 minutah pa določimo potemtakem pri cabernet francu približno 95 % zreagiranega radikala DPPH[•], pri merlotu od 94 do 96 % in pri refošku od 95 do 97 %. Določevanje AOP s hitrimi metodami (čas analize okoli 30 minut) zaradi zgoraj navedenih razlogov ni primerno, ker daje za 20–27 % manjše vrednosti AOP v primerjavi s 400 minutami reakcije. Tudi v času 240 minutne reakcije so vrednosti podcenjene za 3–6 % v primerjavi s 400 minutami.

Pri določanju vrednosti AOP, skupnih fenolnih spojin, flavonoidov in taninov smo ugotovili, da se je kot najboljši enološki dodatek v vinu izkazal tanin. Kot drugi najboljši se je izkazal vitamin C, na zadnje mesto pa smo uvrstili SO₂. Ko smo primerjali vrednosti osnovnega vina po tromesečnem zorenju z dodatkom enološkega tanina z osnovnim vinom po tromesečnem zorenju brez dodatka enoloških sredstev smo ugotovili da je dodatek tanina najbolj povečal AOP, koncentracijo skupnih fenolov, flavonoidov in taninov v primerjavi z dodatkom vitamina C in SO₂.

Pri določanju vrednosti antocianov in določanju barvnih parametrov, pa smo ugotovili, da se je kot najboljši enološki dodatek v vinu izkazal SO₂, kot drugi najboljši se je izkazal dodatek tanina in kot najslabši dodatek se je izkazal vitamin C. Ko smo primerjali vrednosti osnovnega vina po tromesečnem zorenju z dodatkom enološkega tanina z osnovnim vinom po tromesečnem zorenju brez dodatka enoloških sredstev, smo ugotovili, da je le dodatek SO₂ pri vseh treh sortah nekoliko povečal vrednost antocianov, pri dodatku enološkega tanina ni bilo spremembe, pri dodatku vitamina C pa je vrednost antocianov močno padla. Kljub temu, da se je pri analizah barve intenziteta barve ob dodatku SO₂ nekoliko zmanjšala v vseh treh sortah v primerjavi z osnovnim vinom po treh mesecih zorenja, je dodatek SO₂ v celoti preprečil oksidacijo rdeče barve v vzorcih vina (ton barve se ni povečal po treh mesecih zorenja v primerjavi z osnovnim vinom takoj po končani alkoholni fermentaciji); najbolj uspešno je povečal delež rdeče barve pri valovni dolžini 520 nm in delež rdeče barve v obliki flavilijevega kationa, ter najbolj je uspel zmanjšati delež rdeče barve pri valovnih dolžinah 420 in 620 nm. Z Dodatkom tanina in vitamina C se je intenziteta barve v primerjavi z osnovnim vinom po treh mesecih zorenja resda nekoliko povečala, vendar nista bila tako uspešna pri preprečevanju oksidacije rdeče barve v vinu kot SO₂.

Najboljšo korelacijo med vsebnostjo fenolnih spojin in AOP smo dobili pri skupnih fenolih ($R^2=0,991$) in pri flavonoidih ($R^2=0,982$), nekoliko slabšo pri taninih ($R^2=0,896$), najslabšo pa pri antocianih ($R^2=0,472$).

7 VIRI

- Abram V. 2000. Antioksidativno delovanje flavonoidov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. okt., 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23-32
- Abram V., Simčič M. 1997. Fenolne spojine kot antioksidanti. Farmaceutski vestnik, 48: 573-589
- Arnous A., Makris P. D., Kefalas P. 2002. Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. Journal of Food Composition and Analysis, 15: 655-665
- Barbo E. 2001. Vpliv fizikalno kemijskih parametrov na barvo cvička. Diplomsko naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 68 str.
- Boulton R. B., Singleton V. L., Bisson L. F., Kunkee R. E. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, Chapman & Hall: 115-151
- Bourzeix M., Weyland D., Heredia N. 1986. Study of catehin and procyanidins in grape clusters, wine, and other products. Bulletin de l' O.I.V., 59, 669/670: 1171-1254
- Brand-Williams W., Cuvelier M.E., Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie/Food Science and Technology, 28: 25-30
- Budic-Leto I., Lovric T., Kljusuric J.G., Pezo I., Vrhovsek U. 2006. Anthocyanin composition of the red wine Babic affected by maceration treatment. European Food Research and Technology, 222, 3-4: 397-402.
- Cao G., Sofic E., Pror R. L. 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure activity relationship. Free Radical Biology & Medicine, 22, 5: 749-760
- De Beer D., Joubert E., Gelderblom C.A.W., Manley M. 2005. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines and selected phenolic compounds: In vitro inhibition of microsomal lipid peroxidation. Food Chemistry, 90: 569-577
- Gelb T. 2005. Antioksidanti kot pomožne snovi in kot zdravilne učinkovine. Seminarska naloga pri predmetu Farmacevtsko tehnološke operacije in farmacevtske oblike. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo: 5-10
- Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry, 13: 572-584
- Higdon J. 2005. Flavonoids. Oregon, State University, Linus Pauling Institute. (25.1.2007). <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids/index.html> (12.5.2007): 3 str.

- Jackson R. S. 2000. Wine science: principles, practice, perception. 2nd ed. San Diego, Academic Press: 242-254
- Kanner J., Frankel E., Granit R., German B., Kinsella E.J. 1994. Natural antioxidants in grape and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 64-69
- Katalinić V, Milos M, Modun D., Musić I., Boban M. 2003. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chemistry*, 86: 593-600
- Korošec L. 2000. Prosti radikali in vloga antioksidantov v bioloških sistemih. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. okt., 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 11-21
- Košmerl T. 2000. Preprečevanje oksidacije vin in ohranjanje njihovih antioksidacijskih lastnosti. V: *Antioksidanti v živilstvu*. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. okt., 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 167-177
- Košmerl T. 2003. Predavanja pri izbirnem predmetu Enologija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- Košmerl T., Bajuk A., Wondra M. 2001. Vpliv maceracije na kemijsko sestavo in senzorično kakovost vina sorte 'modra frankinja'. V: *Vinarski dan*, Ljubljana, 7. februar 2001. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 5-29.
- Košmerl T., Kač M. 2004. Osnovne kemijske analize mošta in vina. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 106 str.
- Košmerl T., Rački M., Cigić B. 2005. Zveza med antioksidacijskim potencialom vina in vsebnostjo fenolnih spojin. V: Glavič P., Brodnjak-Vončina D. (ur.). *Slovenski kemijski dnevi 2005*, Maribor 22. in 23. september 2005. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, str. 1/10-10/10
- Muhar S.U., Košmerl T. 2005. Izboljšanje kakovosti vina malvazija in teran. V: *Vinarski dan*, Ljubljana, 14. april 2005. Marinček L. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 25-47
- Molyneux P. 2004. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar Journal of Science and Technology*, 26, 2: 211-219
- Nemanič J., Kocjančič M., Resnik M., Žnidaršič-Pongarc V. 1997. Novi trendi v predelavi rdečega grozdja. V: *Moderne tehnologije predelave in kakovosti živil*. 18. Bitenčevi živilski dnevi, Ljubljana 12. in 13. junij 1997. Žlender B., Gašperlin L., Hočevar I. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 199-209
- Pratt D. E. 1992. Natural antioxidants from plant material. V: *Phenolic compounds in food and their effects on health: Vol.2: Antioxidants and cancer prevention*. Huang M.T., Ho C-T., Lee C. (eds.). Washington, American Chemical Society: 45-71

- Rajalakshmi D., Narasimhan S. 1995. Food antioxidants: Sources and methods of evaluation. V: Food antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives. Madhavi D. L., Deshpande S. S., Salunkhe D. K. (eds.). New York, Marcel Dekker, Inc.: 65-76
- Raspor P., Batič M., Berglez D. 2000. Bioprocesi pridobivanja antioksidantov. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26 in 27. oktober 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.) Ljubljana, BF, Oddelek za živilstvo: 53-56
- Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dobourdieu D. 2000. Handbook of enology. Vol 2.: The chemistry of wine stabilization and treatments. Chichester, John Wiley & Sons: 129-185.
- Roginsky V., Lissi A. E. 2005. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chemistry, 92: 235-254
- Romeo-Cascales I., Fernandez-Fernandez J.I., Lopez-Roca J.M., Gomez-Plaza E. 2005. The maceration process during winemaking extraction of anthocyanins from grape skins into wine. European Food Research and Technology, 221: 163-167
- Rudan-Tasič D. 2000. Vitamin C, vitamin E in koencim Q₁₀. V: Antioksidanti v živilstvu. 20. Bitenčevi živilski dnevi, Portorož, 26. in 27. okt., 2000. Žlender B., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 39-42
- Sacchi K.L., Bisson L.F., Adams D.O. 2005. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. American Journal of Enology and Viticulture, 56, 3: 197-206.
- Šikovec S. 1996. Vino, pijača doživetja. Ljubljana, Kmečki glas: 239-241.
- Vitamin C. 2007. V: Wikipedija: the free encyclopedia, Wikimedia Foundation (20.3.2007). http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C (20.3.2007): 1 str.
- Vrhovšek U. 1996. Fenoli kot antioksidanti v vinu. V: Zbornik referatov 1. slovenskega vinogradniško-vinarskega kongresa, Portorož od 4. do 6. decembra 1996. Ptuj, Slovenska vinska akademija Veritas: 124-134.
- Vrhovšek U. 2000. Bioaktivne polifenolne spojine grozdja in vina. V: Stokovni posvet: Vino – hrana, zdravje 2000, Ljubljana, 5.4. 2000. Celje, Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 42-56
- Vrščaj Vodošek T., Košmerl T. 2005. Določanje barvnih parametrov in fenolnih spojin med maceracijo rdeče drozge. V: Slovenski kemijski dnevi 2005, Maribor, 22. in 23. september 2005. Glavič P., Brodnjak-Vončina D. (ur.). Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Mariboru: 10 str.
- Wang H., Cao G., Prior R.L. 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 304-309

Wondra M. 1997. Zdravstveni učinki vina. V: Tehnologija, hrana, zdravje. 1. slovenski kongres o hrani in prehrani z mednarodno udeležbo. Vol.1. Bled, 21-25. aprila 1996. Ljubljana, Društvo živilskih in prehranskih strokovnih delavcev Slovenije: 39-45

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

Zoecklein B.W., Fugelsang K.C., Gump B.H., Nury F.S. 1995. Wine analysis and production. New York, Chapman & Hall: 621 str.

ZAHVALA

Mentorici doc. dr. Tatjani Košmerl se zahvaljujem za konstantno nudenje strokovnih nasvetov in pomoči pri izdelavi diplomskega dela ter za obilico dobre volje, ki jo je pri tem spremljala ves čas.

Recezentu doc. dr. Blažu Cigiću se zahvaljujem za strokovne nasvete pri pregledovanju diplomske naloge.

Zdenki Zupančič se zahvaljujem za številne praktične nasvete, pomoč in družbo ter za vse usluge pri delu v laboratoriju.

Za iskanje literature najlepša hvala Barbari Slemenik in Ivici Hočevnar.

PRILOGE**Priloga A1: Vpliv zorenja in dodatka enoloških sredstev na AOP ter na koncentracije skupnih fenolnih spojin, flavonoidov, taninov in antocianov v vinu posameznih sort**

Parameter	Sorta	OV	OV po 3 mesecih	OV po 3 mesecih + SO ₂	OV po 3 mesecih + vitamin C	OV po 3 mesecih + tanini
AOP (mmol/L)	cabernet franc	15,97	14,89	15,30	15,58	17,05
	merlot	28,30	27,78	28,02	29,78	30,67
	refošk	21,21	20,89	21,64	22,15	23,19
skupni fenoli (mg/L)	cabernet franc	1452	1356	1397	1435	1506
	merlot	2532	2494	2524	2627	2699
	refošk	1978	1951	2040	2070	2112
flavonoidi (mg/L)	cabernet franc	946	913	936	917	1014
	merlot	2127	2111	2125	2155	2276
	refošk	1592	1561	1594	1602	1657
tanini (mg/L)	cabernet franc	450	429	415	524	571
	merlot	1042	975	1039	1101	1171
	refošk	839	827	839	958	1012
antociani (mg/L)	cabernet franc	553	455	497	292	439
	merlot	843	649	670	566	662
	refošk	662	538	555	382	539

Priloga A2: Vpliv zorenja in dodatka enoloških sredstev na barvne parametre (intenziteto in ton barve ter na deleže rdeče barve (%)) v obliki flavilijevega kationa oziroma pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm) v vinu posameznih sort

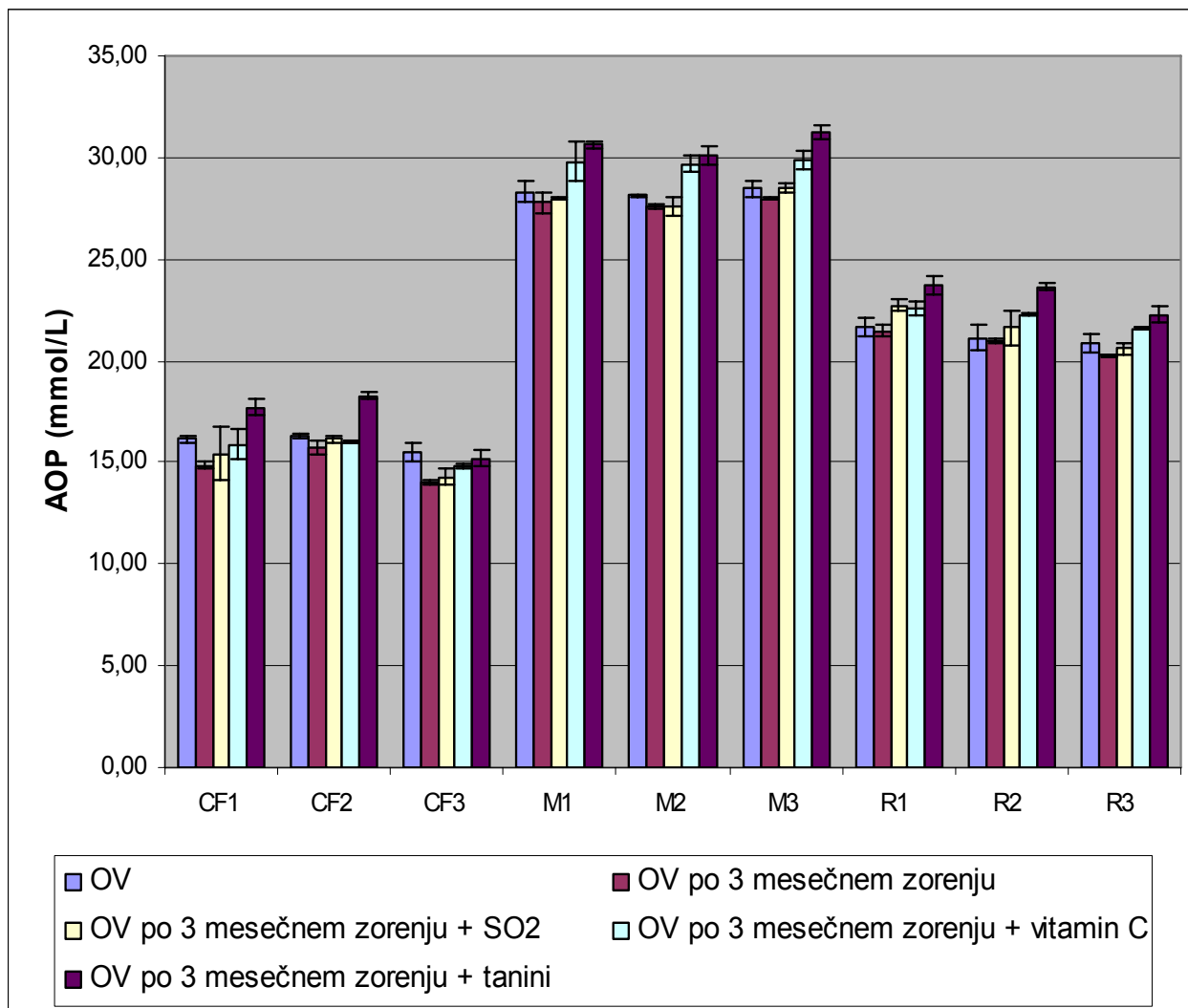
Parameter	Sorta	OV	OV po 3 mesecih	OV po 3 mesecih + SO ₂	OV po 3 mesecih + vitamin C	OV po 3 mesecih + tanini
intenziteta barve	cabernet franc	11,787	11,151	10,383	13,417	13,467
	merlot	16,773	16,553	14,977	18,767	19,470
	refošk	21,387	19,750	17,343	17,490	23,227
ton barve	cabernet franc	0,515	0,614	0,541	0,602	0,579
	merlot	0,480	0,566	0,476	0,566	0,542
	refošk	0,447	0,640	0,465	0,563	0,582
dA _F (%)	cabernet franc	65,20	53,00	63,64	57,42	60,34
	merlot	67,64	59,76	68,24	60,74	62,46
	refošk	70,36	54,00	69,97	62,65	62,99
dA ₄₂₀ (%)	cabernet franc	30,32	31,67	31,34	32,53	32,30
	merlot	29,16	31,34	29,03	31,71	30,94
	refošk	28,05	33,29	29,03	32,21	33,46
dA ₅₂₀ (%)	cabernet franc	59,07	51,55	57,93	54,02	55,77
	merlot	60,74	55,43	61,23	56,03	57,16
	refošk	62,78	52,13	62,47	57,26	57,47
dA ₆₂₀ (%)	cabernet franc	10,61	16,78	10,73	13,45	11,93
	merlot	10,11	13,23	9,75	12,26	11,90
	refošk	9,17	14,58	8,50	10,53	9,07

Priloga B1: Antioksidacijski potencial (AOP), izražen v mmol reduciranega DPPH[•]/L vina v OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

Sorta	Vzorec vina	AOP (mmol/L)				
		OV	OV po 3 mesecih	OV po 3 mesecih + SO ₂	OV po 3 mesecih + vitamin C	OV po 3 mesecih + tanini
cabernet franc	CF1	16,00	14,96	14,19	16,25	17,42
	CF1	16,23	14,96	15,43	15,01	17,52
	CF1	16,17	14,65	16,72	16,41	18,14
	CF2	16,28	15,42	16,00	16,00	18,09
	CF2	16,44	16,09	16,20	16,05	18,30
	CF2	16,21	15,84	16,25	16,00	18,45
	CF3	15,21	14,13	14,08	14,76	14,84
	CF3	15,19	13,92	14,70	14,91	15,10
	CF3	16,01	14,03	14,14	14,81	15,61
merlot	M1	28,11	27,36	27,98	28,81	30,80
	M1	28,96	27,56	27,88	30,00	30,60
	M1	27,93	28,39	28,09	30,62	30,44
	M2	28,15	27,51	28,09	29,22	30,13
	M2	28,11	27,62	27,47	29,74	29,67
	M2	28,06	27,72	27,16	30,05	30,60
	M3	28,92	27,93	28,24	30,26	31,42
	M3	28,21	27,98	28,50	29,33	31,53
	M3	28,29	27,98	28,76	30,00	30,85
refošk	R1	21,54	21,21	22,76	22,20	23,88
	R1	22,18	21,78	22,40	22,82	23,16
	R1	21,26	21,47	23,02	22,82	23,98
	R2	20,44	20,85	21,37	22,30	23,72
	R2	21,20	21,05	20,90	22,25	23,72
	R2	21,73	20,95	22,56	22,25	23,41
	R3	20,33	20,23	20,80	21,58	22,12
	R3	20,92	20,23	20,70	21,58	22,74
	R3	21,33	20,28	20,28	21,63	21,97

Priloga B2: Povprečni antioksidacijski potencial (AOP), izražen v mmol reduciranega DPPH[•]/L vina v OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi po posameznih vzorcih

Sorta	Vzorec vina	AOP (mmol/L)				
		OV	OV po 3 mesecih	OV po 3 mesecih + SO ₂	OV po 3 mesecih + vitamin C	OV po 3 mesecih + tanini
cabernet franc	CF1	16,13	14,85	15,44	15,89	17,69
	CF2	16,31	15,78	16,15	16,01	18,28
	CF3	15,47	14,03	14,31	14,82	15,18
merlot	M1	28,33	27,77	27,98	29,81	30,61
	M2	28,11	27,62	27,57	29,67	30,13
	M3	28,47	27,96	28,50	29,86	31,27
refošk	R1	21,66	21,48	22,73	22,61	23,67
	R2	21,12	20,95	21,61	22,26	23,62
	R3	20,86	20,24	20,59	21,59	22,28



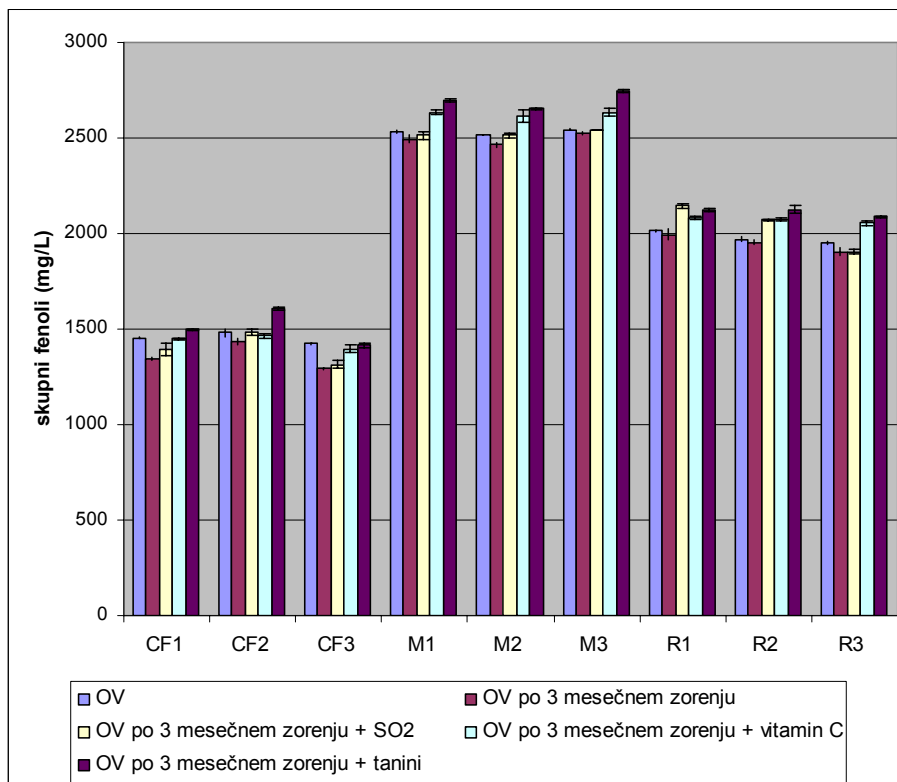
Priloga B3: Graf povprečnega antioksidacijskega potenciala (AOP), izražen v mmol reduciranega DPPH^{*}/L vina v OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi po posameznih vzorcih

Priloga C1: Koncentracije (mg/L) skupnih fenolov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

Sorta	Vzorec vina	Skupni fenoli (mg/L)				
		OV	OV po 3 mesecih	OV po 3 mesecih + SO ₂	OV po 3 mesecih + vitamin C	OV po 3 mesecih + tanini
cabernet franc	CF1	1460	1344	1364	1454	1494
	CF1	1450	1334	1424	1444	1494
	CF1	1450	1354	1394	1444	1504
	CF2	1500	1414	1504	1454	1604
	CF2	1460	1454	1464	1464	1604
	CF2	1480	1434	1484	1474	1614
	CF3	1430	1284	1334	1394	1424
	CF3	1420	1294	1314	1414	1404
merlot	M1	2530	2494	2494	2624	2704
	M1	2540	2474	2514	2634	2694
	M1	2530	2514	2534	2644	2694
	M2	2520	2454	2514	2654	2664
	M2	2520	2474	2504	2594	2664
	M2	2520	2464	2524	2594	2654
	M3	2540	2534	2544	2654	2744
	M3	2540	2524	2544	2614	2754
refošk	R1	2010	1994	2154	2074	2114
	R1	2020	2024	2144	2084	2124
	R1	2010	1964	2134	2084	2134
	R2	1970	1954	2074	2074	2124
	R2	1980	1944	2074	2064	2144
	R2	1960	1964	2064	2084	2104
	R3	1940	1884	1914	2044	2094
	R3	1960	1924	1904	2064	2084
	R3	1950	1904	1894	2054	2084

Priloga C2: Povprečne koncentracije (mg/L) skupnih fenolov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi po posameznih vzorcih vina

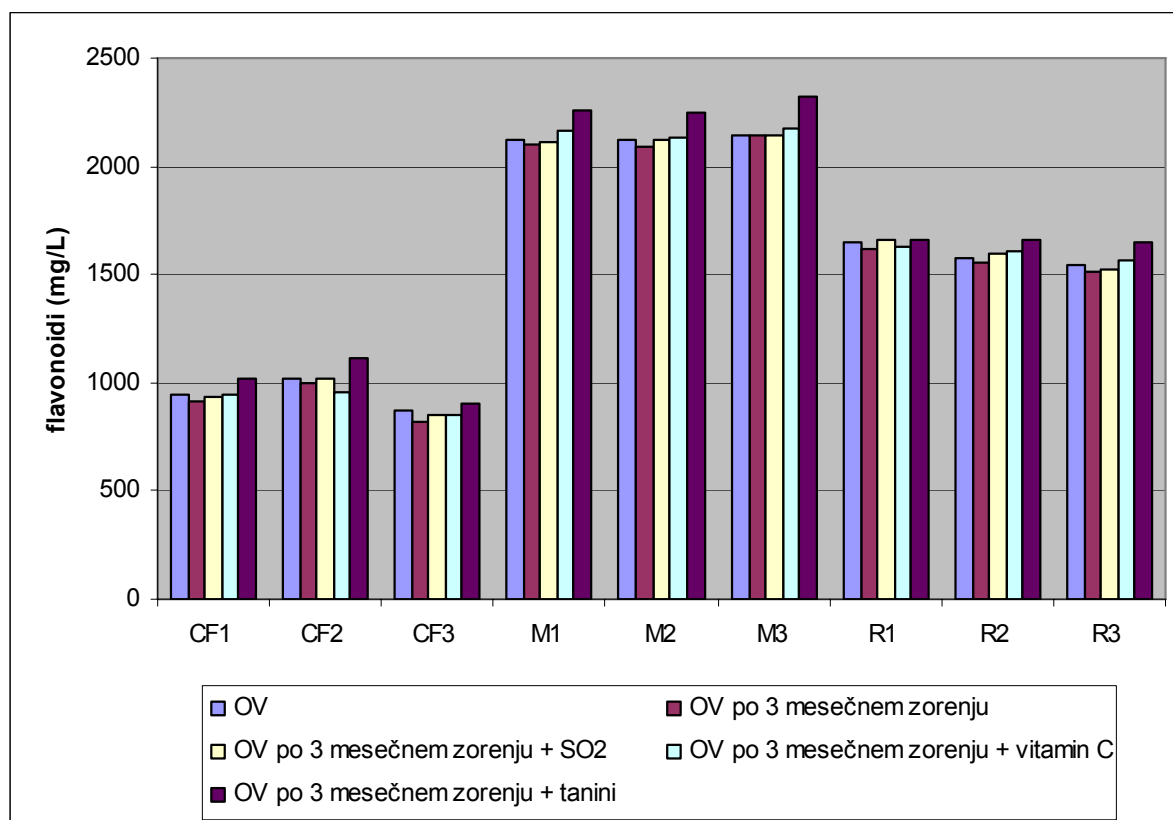
Sorta	Vzorec vina	Skupni fenoli (mg/L)				
		OV	OV po 3 mesecih	OV po 3 mesecih + SO ₂	OV po 3 mesecih + vitamin C	OV po 3 mesecih + tanini
cabernet franc	CF1	1453	1344	1394	1447	1497
	CF2	1480	1434	1484	1464	1607
	CF3	1423	1291	1314	1394	1414
merlot	M1	2533	2494	2514	2634	2697
	M2	2520	2464	2514	2614	2654
	M3	2543	2524	2544	2634	2747
refošk	R1	2013	1994	2144	2081	2124
	R2	1970	1954	2071	2074	2124
	R3	1950	1904	1904	2054	2087



Priloga C3: Graf povprečnih koncentracij (mg/L) skupnih fenolov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi po posameznih vzorcih vina

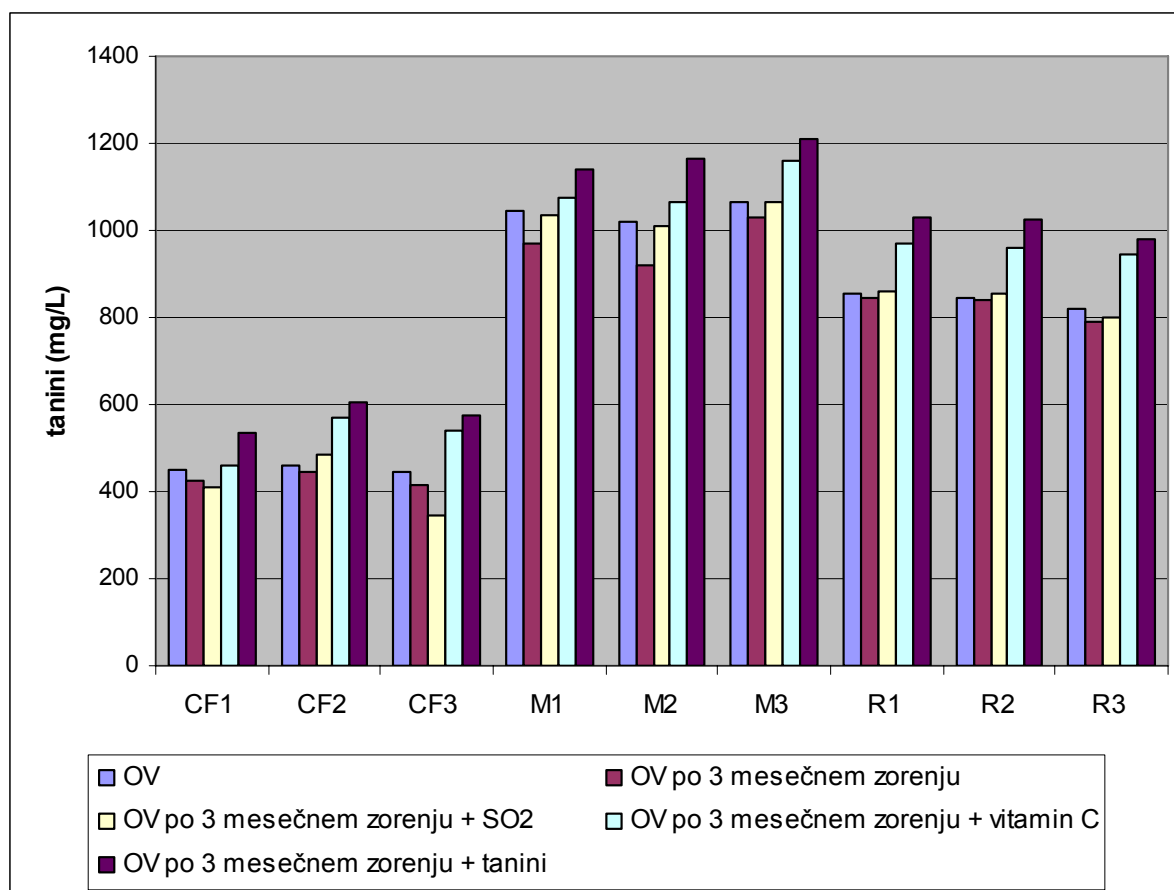
Priloga C4: Koncentracije (mg/L) flavonoidov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

Sorta	Vzorec	Flavonoidi (mg/L)				
		OV	OV po 3 mesecih	OV po 3 mesecih + SO ₂	OV po 3 mesecih + vitamin C	OV po 3 mesecih + tanini
cabernet franc	CF1	950	912	937	943	1023
	CF2	1020	1002	1022	952	1118
	CF3	869	824	847	855	902
merlot	M1	2117	2105	2112	2160	2260
	M2	2120	2087	2120	2135	2250
	M3	2143	2140	2142	2170	2318
refošk	R1	1648	1617	1665	1629	1660
	R2	1579	1555	1592	1612	1662
	R3	1549	1510	1524	1565	1648

**Priloga C5: Graf koncentracij (mg/L) flavonoidov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi**

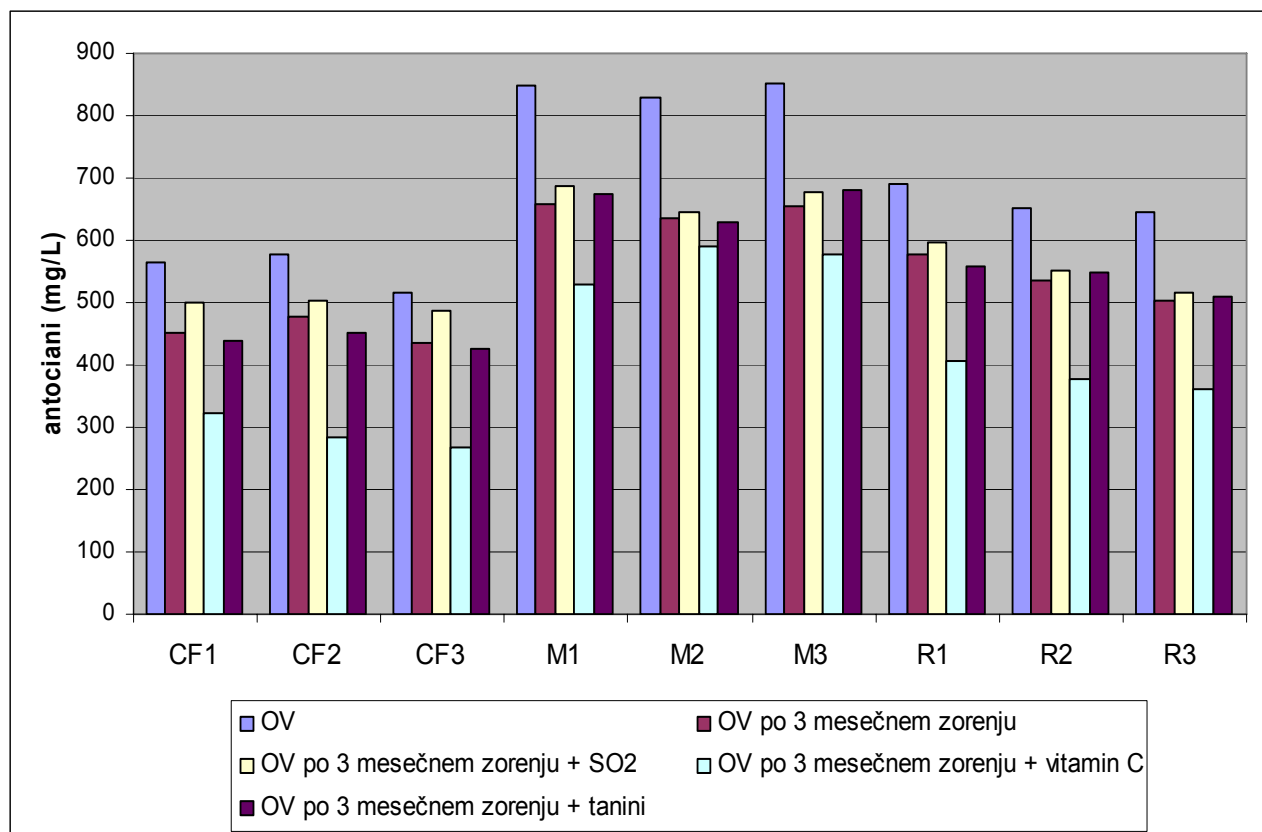
Priloga C6: Koncentracije (mg/L) taninov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

Sorta	Vzorec	Tanini (mg/L)				
		OV	OV po 3 mesecih	OV po 3 mesecih + SO ₂	OV po 3 mesecih + vitamin C	OV po 3 mesecih + tanini
cabernet franc	CF1	448	427	412	459	534
	CF2	460	447	487	571	604
	CF3	443	414	347	541	576
merlot	M1	1043	972	1037	1076	1139
	M2	1020	922	1012	1066	1166
	M3	1063	1032	1067	1161	1209
refošk	R1	853	847	862	968	1031
	R2	845	842	854	961	1026
	R3	820	792	802	946	979

**Priloga C7: Graf koncentracij (mg/L) taninov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi**

Priloga C8: Koncentracije (mg/L) antocianov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

Sorta	Vzorec	Antociani (mg/L)				
		OV	OV po 3 mesecih	OV po 3 mesecih + SO ₂	OV po 3 mesecih + vitamin C	OV po 3 mesecih + tanini
cabernet franc	CF1	566	453	501	323	439
	CF2	577	476	504	284	452
	CF3	516	437	487	269	426
merlot	M1	847	657	686	529	675
	M2	829	635	646	591	629
	M3	853	655	678	577	681
refošk	R1	689	577	596	407	559
	R2	651	535	553	377	547
	R3	646	503	515	361	511

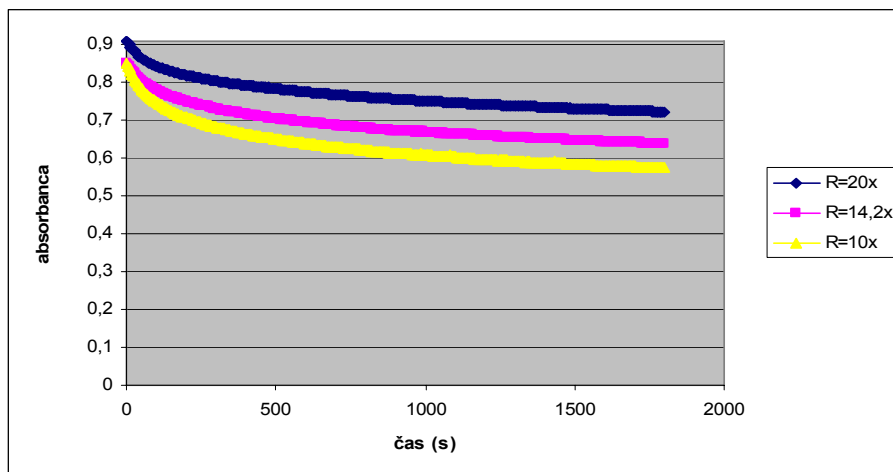
**Priloga C9: Graf koncentracij (mg/L) antocianov OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi**

Priloga C10: Intenziteta in ton barve OV, OV po treh mesecih zorenja ter OV po treh mesecih zorenja z dodanimi enološkimi sredstvi

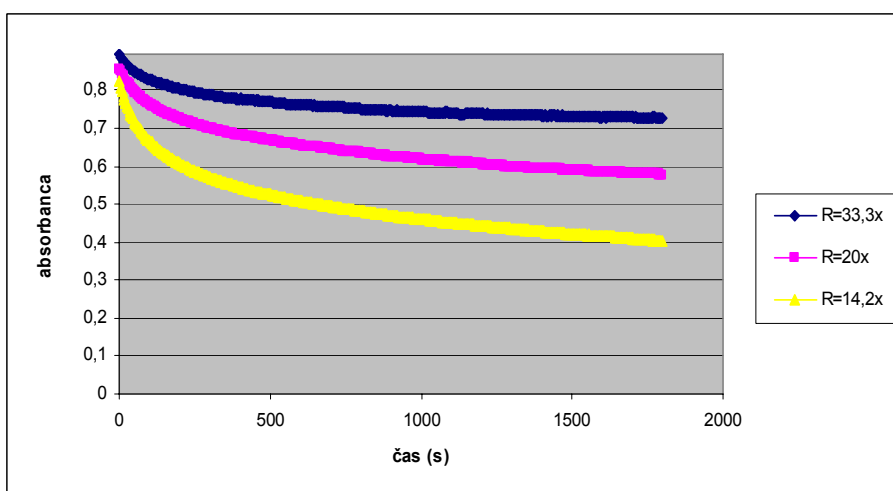
Parameter	Sorta	Vzorec	OV	OV po 3 mesecih	OV po 3 mesecih + SO ₂	OV po 3 mesecih + vitamin C	OV po 3 mesecih + tanini
intenziteta barve	cabernet franc	CF1	10,810	11,060	10,410	13,020	13,390
		CF2	11,340	12,320	10,610	12,960	13,540
		CF3	13,210	10,070	10,130	14,270	13,470
	merlot	M1	17,570	16,530	14,460	19,570	19,480
		M2	15,710	15,900	15,380	20,330	19,380
		M3	17,040	17,220	15,090	16,400	19,550
	refošk	R1	21,840	22,340	17,300	17,370	24,340
		R2	22,550	18,530	19,580	19,020	23,920
		R3	19,770	18,380	15,150	16,080	21,420
ton barve	cabernet franc	CF1	0,477	0,608	0,552	0,578	0,566
		CF2	0,482	0,619	0,516	0,605	0,581
		CF3	0,587	0,616	0,557	0,624	0,590
	merlot	M1	0,461	0,569	0,476	0,556	0,539
		M2	0,473	0,577	0,416	0,574	0,568
		M3	0,507	0,551	0,535	0,568	0,518
	refošk	R1	0,452	0,642	0,466	0,543	0,567
		R2	0,439	0,593	0,458	0,556	0,576
		R3	0,449	0,685	0,470	0,589	0,605

Priloga C11: Vpliv zorenja in dodatka enoloških sredstev na deleže rdeče barve (%) v obliki flavilijevega kationa (dA_F) oziroma pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm

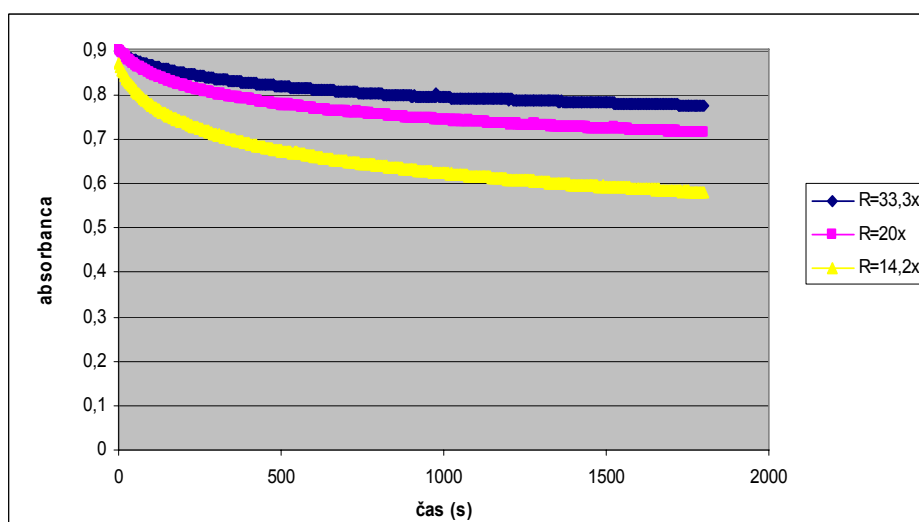
Parameter	Sorta	Vzorec	OV	OV po 3 mesecih	OV po 3 mesecih + SO ₂	OV po 3 mesecih + vitamin C	OV po 3 mesecih + tanini
dA_F (%)	cabernet franc	CF1	68,11	54,16	61,63	58,95	60,97
		CF2	67,47	52,99	66,32	57,69	60,33
		CF3	60,01	51,85	62,97	55,62	59,72
	merlot	M1	69,11	59,38	69,40	61,61	62,80
		M2	68,60	57,77	70,97	58,51	59,44
		M3	65,22	62,14	64,36	62,11	65,15
	refošk	R1	70,06	53,21	69,91	64,52	63,69
		R2	70,60	57,72	70,15	62,19	63,27
		R3	70,41	51,08	69,84	61,26	62,00
dA_{420} (%)	cabernet franc	CF1	29,14	31,74	31,22	31,72	31,81
		CF2	29,19	31,90	30,82	32,79	32,42
		CF3	32,63	31,38	31,98	33,08	32,67
	merlot	M1	28,51	31,40	29,53	31,43	30,90
		M2	29,03	31,26	26,33	31,38	31,37
		M3	29,93	31,36	31,21	32,32	30,54
	refošk	R1	28,25	33,17	29,08	31,78	32,83
		R2	27,67	32,11	28,70	31,65	33,19
		R3	28,22	34,60	29,31	33,21	34,36
dA_{520} (%)	cabernet franc	CF1	61,05	52,17	56,58	54,92	56,16
		CF2	60,58	51,54	59,75	54,17	55,76
		CF3	55,56	50,94	57,45	52,98	55,38
	merlot	M1	61,81	55,17	62,03	56,57	57,34
		M2	61,43	54,21	63,26	54,65	55,21
		M3	58,98	56,91	58,38	56,89	58,93
	refošk	R1	62,55	51,66	62,43	58,49	57,93
		R2	62,97	54,18	62,61	56,94	57,65
		R3	62,82	50,54	62,38	56,34	56,82
dA_{620} (%)	cabernet franc	CF1	9,81	16,09	12,20	13,36	12,02
		CF2	10,23	16,56	9,43	13,04	11,82
		CF3	11,81	17,68	10,56	13,95	11,95
	merlot	M1	9,68	13,43	8,44	12,01	11,76
		M2	9,55	14,53	10,40	13,97	13,42
		M3	11,09	11,73	10,40	10,79	10,54
	refošk	R1	9,20	15,17	8,50	9,73	9,24
		R2	9,36	13,71	8,68	11,41	9,16
		R3	8,95	14,85	8,32	10,45	8,82



Priloga D1: Hitra kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH[•] pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte cabernet franc



Priloga D2: Hitra kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH[•] pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte merlot



Priloga D3: Hitra kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH[•] pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte refošk

Priloga D4: Rezultati počasne kinetike (sprememba absorbance raztopine vzorca DPPH[•], absorbance referenčne raztopine DPPH[•], razlike med obema absorbancama, antioksidacijskega potenciala izraženem v mmol reduciranega DPPH[•]/L vina, deleža reduciranega DPPH[•]) pri dodatku 50 μ L 10-krat razredčenega vina cabernet franc v raztopino DPPH[•]

R=10x	Čas (min)	A _{VZORCA}	A _{REFERENCA}	Razlika absorbanc	AOP (mmol/L)	DPPH (%)
cabernet franc	30	0,531	1,032	0,501	12,95	73,6
	60	0,472	1,023	0,552	14,26	81,0
	90	0,434	1,015	0,581	15,02	85,4
	120	0,407	1,008	0,601	15,54	88,3
	180	0,368	0,996	0,628	16,22	92,2
	240	0,341	0,988	0,647	16,70	95,0
	300	0,320	0,980	0,660	17,04	96,9
	360	0,303	0,973	0,670	17,31	98,4
	400	0,285	0,966	0,681	17,59	100,0

Priloga D5: Rezultati počasne kinetike (sprememba absorbance raztopine vzorca DPPH[•], absorbance referenčne raztopine DPPH[•], razlike med obema absorbancama, antioksidacijskega potenciala izraženem v mmol reduciranega DPPH[•]/L vina, deleža reduciranega DPPH[•]) pri dodatku 50 μ L 14,2-krat razredčenega vina sort cabernet franc, merlot in refošk v raztopino DPPH[•]

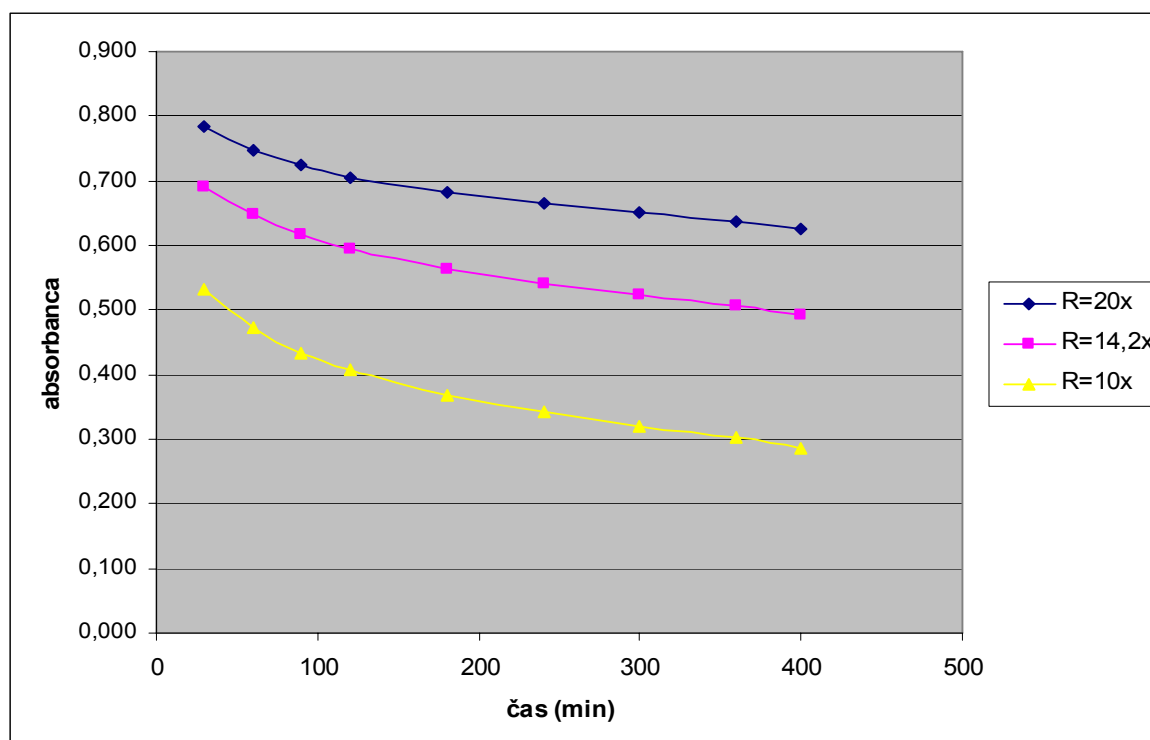
R=14,2x	Čas (min)	A _{VZORCA}	A _{REFERENCA}	Razlika absorbanc	AOP (mmol/L)	DPPH (%)
cabernet franc	30	0,689	1,032	0,343	12,57	72,5
	60	0,647	1,023	0,376	13,80	79,6
	90	0,617	1,015	0,398	14,59	84,2
	120	0,595	1,008	0,413	15,16	87,5
	180	0,564	0,996	0,432	15,85	91,5
	240	0,542	0,988	0,446	16,35	94,4
	300	0,524	0,980	0,456	16,73	96,6
	360	0,507	0,973	0,465	17,07	98,5
	400	0,494	0,966	0,472	17,33	100,0
merlot	30	0,368	1,032	0,664	24,34	80,3
	60	0,306	1,023	0,718	26,32	86,8
	90	0,268	1,015	0,747	27,40	90,4
	120	0,244	1,008	0,764	28,02	92,4
	180	0,208	0,996	0,788	28,91	95,4
	240	0,182	0,988	0,806	29,55	97,5
	300	0,166	0,980	0,814	29,85	98,5
	360	0,151	0,973	0,822	30,16	99,5
	400	0,140	0,966	0,826	30,31	100,0
refošk	30	0,630	1,032	0,402	14,74	73,4
	60	0,583	1,023	0,441	16,17	80,5
	90	0,551	1,015	0,464	17,02	84,8
	120	0,527	1,008	0,481	17,63	87,8
	180	0,494	0,996	0,502	18,43	91,8
	240	0,469	0,988	0,519	19,05	94,9
	300	0,450	0,980	0,530	19,45	96,9
	360	0,433	0,973	0,539	19,79	98,6
	400	0,419	0,966	0,547	20,08	100,0

Priloga D6: Rezultati počasne kinetike (sprememba absorbance raztopine vzorca DPPH[•], absorbance referenčne raztopine DPPH[•], razlike med obema absorbancama, antioksidacijskega potenciala izraženem v mmol reduciranega DPPH[•]/L vina, deleža reduciranega DPPH[•]) pri dodatku 50 μ L 20-krat razredčenega vina sort cabernet franc, merlot in refošk v raztopino DPPH[•]

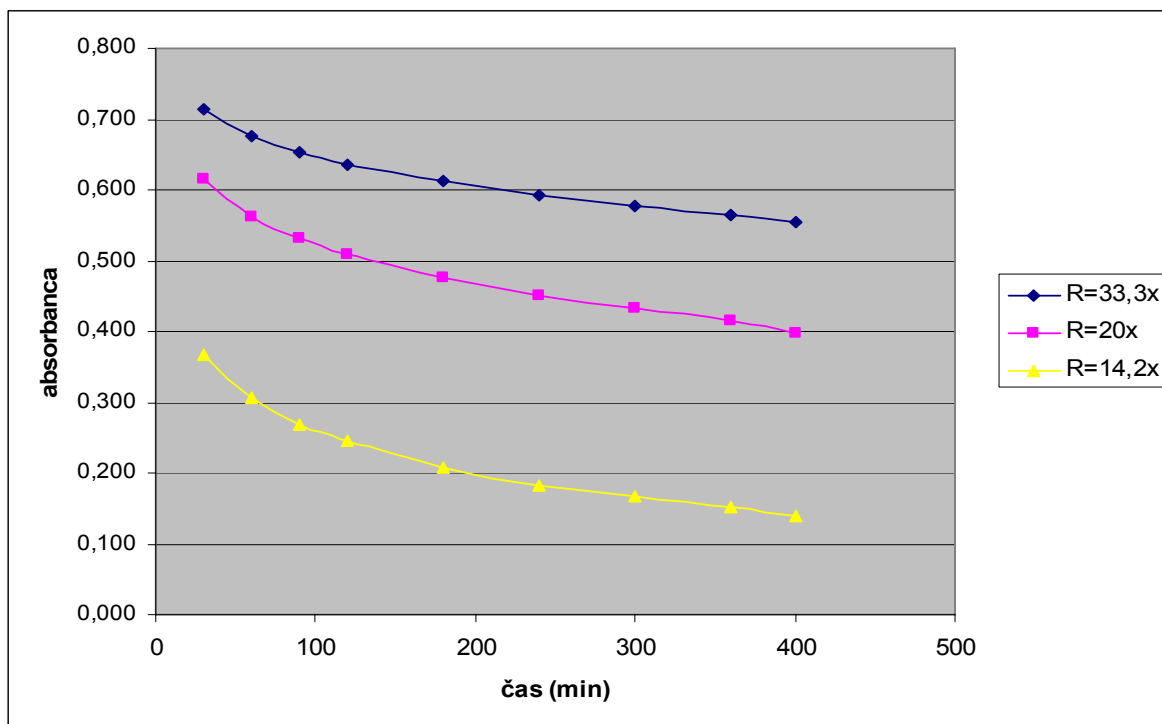
R=20x	Čas (min)	A _{VZORCA}	A _{REFERENCA}	Razlika absorbanc	AOP (mmol/L)	DPPH (%)
cabernet franc	30	0,783	1,032	0,248	12,84	73,1
	60	0,747	1,023	0,277	14,30	81,4
	90	0,725	1,015	0,290	15,01	85,4
	120	0,706	1,008	0,302	15,60	88,8
	180	0,681	0,996	0,315	16,29	92,7
	240	0,664	0,988	0,324	16,73	95,2
	300	0,650	0,980	0,330	17,05	97,0
	360	0,638	0,973	0,335	17,29	98,4
	400	0,626	0,966	0,340	17,57	100,0
merlot	30	0,615	1,032	0,417	21,52	73,4
	60	0,562	1,023	0,461	23,84	81,3
	90	0,530	1,015	0,485	25,05	85,4
	120	0,508	1,008	0,500	25,84	88,1
	180	0,476	0,996	0,520	26,89	91,7
	240	0,452	0,988	0,536	27,70	94,5
	300	0,433	0,980	0,547	28,25	96,3
	360	0,415	0,973	0,558	28,82	98,3
	400	0,398	0,966	0,568	29,33	100,0
refošk	30	0,753	1,032	0,279	14,41	74,1
	60	0,712	1,023	0,311	16,09	82,7
	90	0,689	1,015	0,326	16,86	86,6
	120	0,672	1,008	0,336	17,36	89,2
	180	0,647	0,996	0,349	18,02	92,6
	240	0,629	0,988	0,358	18,51	95,1
	300	0,617	0,980	0,363	18,74	96,3
	360	0,603	0,973	0,370	19,10	98,2
	400	0,589	0,966	0,377	19,46	100,0

Priloga D7: Rezultati počasne kinetike (sprememba absorbance raztopine vzorca DPPH[•], absorbance referenčne raztopine DPPH[•], razlike med obema absorbancama, antioksidacijskega potenciala izraženem v mmol reduciranega DPPH[•]/L vina, deleža reduciranega DPPH[•]) pri dodatku 50 μ L 33,3-krat razredčenega vina sort cabernet merlot in refošk v raztopino DPPH[•]

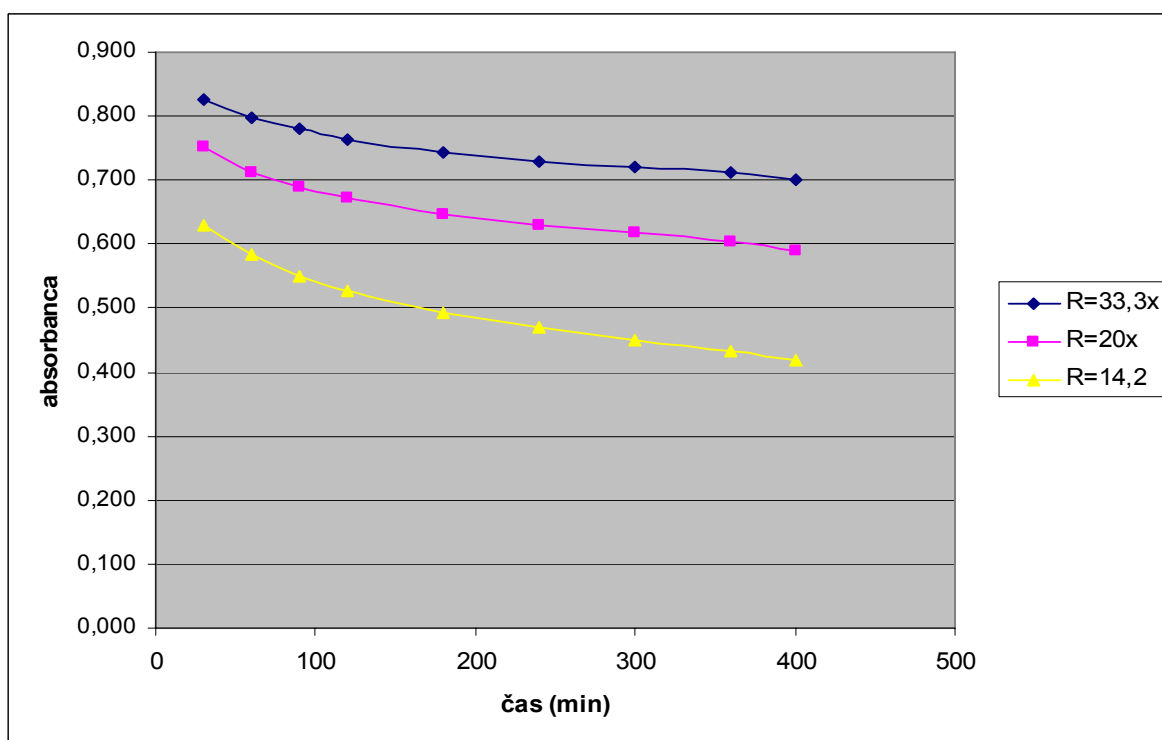
R=33,3x	Čas (min)	A _{VZORCA}	A _{REFERENCA}	Razlika absorbanc	AOP (mmol/L)	DPPH (%)
merlot	30	0,714	1,032	0,318	27,38	77,1
	60	0,676	1,023	0,347	29,86	84,1
	90	0,653	1,015	0,362	31,18	87,9
	120	0,636	1,008	0,372	32,01	90,2
	180	0,612	0,996	0,384	33,05	93,1
	240	0,592	0,988	0,395	34,01	95,8
	300	0,578	0,980	0,402	34,55	97,3
	360	0,565	0,973	0,407	35,04	98,7
	400	0,553	0,966	0,413	35,49	100,0
refošk	30	0,826	1,032	0,206	17,72	77,7
	60	0,797	1,023	0,226	19,47	85,3
	90	0,781	1,015	0,235	20,18	88,4
	120	0,764	1,008	0,244	21,02	92,1
	180	0,743	0,996	0,253	21,74	95,3
	240	0,730	0,988	0,258	22,17	97,2
	300	0,719	0,980	0,260	22,40	98,1
	360	0,711	0,973	0,262	22,50	98,6
	400	0,701	0,966	0,265	22,82	100,0



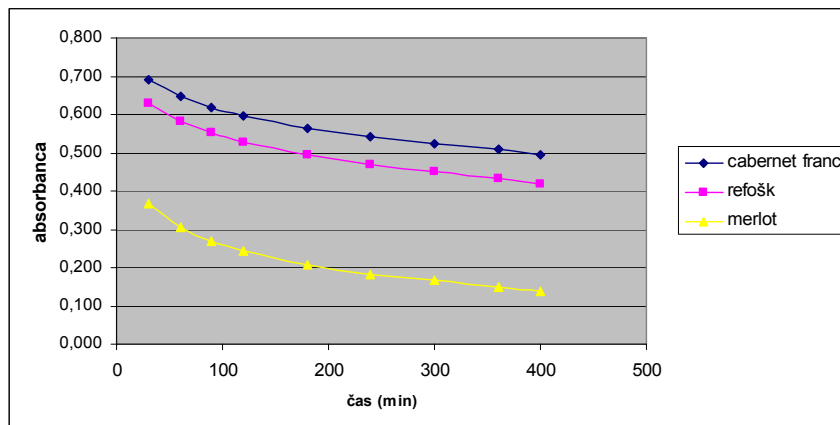
Priloga D8: Počasna kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH[•] pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte cabernet franc



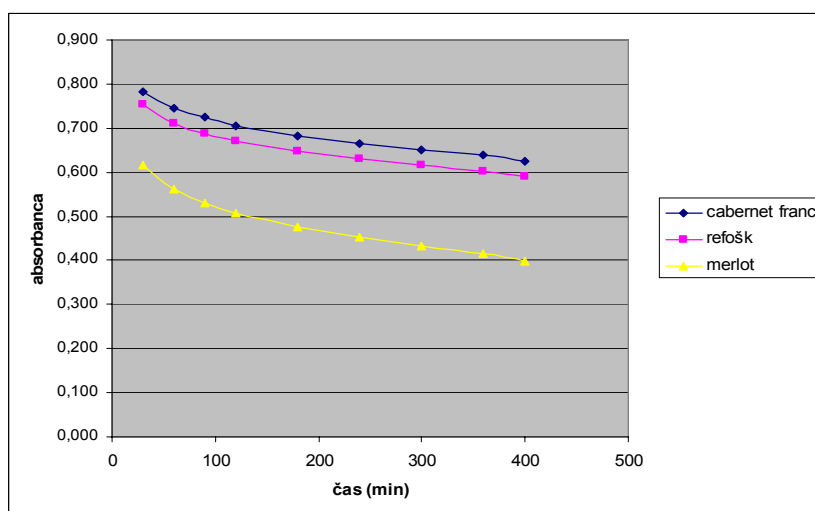
Priloga D9: Počasna kinetika zmanjševanja absorbanca raztopine DPPH* pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte merlot



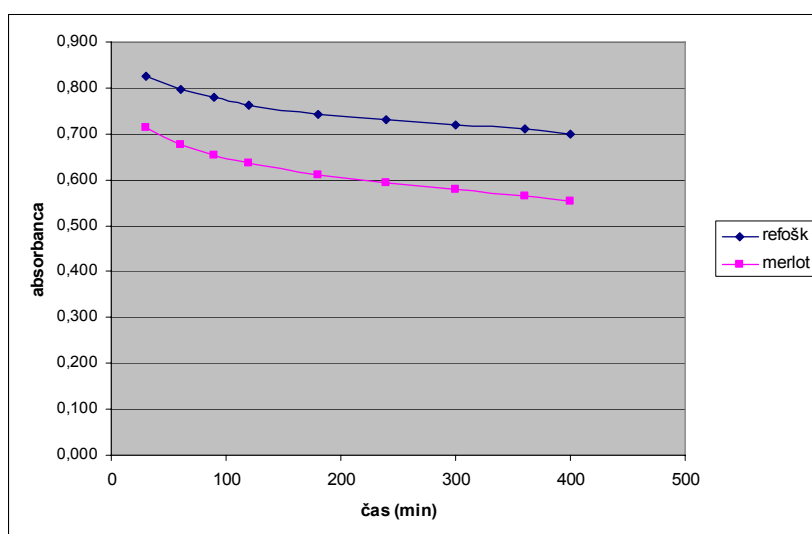
Priloga D10: Počasna kinetika zmanjševanja absorbanca raztopine DPPH* pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte refošk



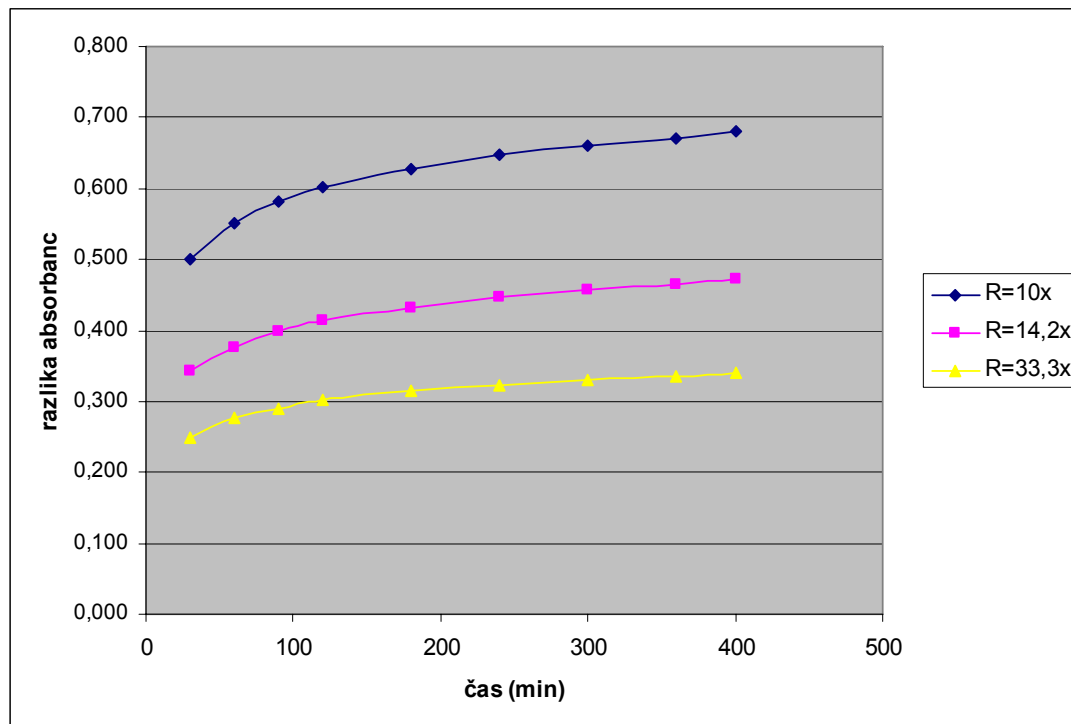
Priloga D11: Počasna kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH[•] pri dodatku 50 μ L 14,2-krat razredčenega vina različnih sort



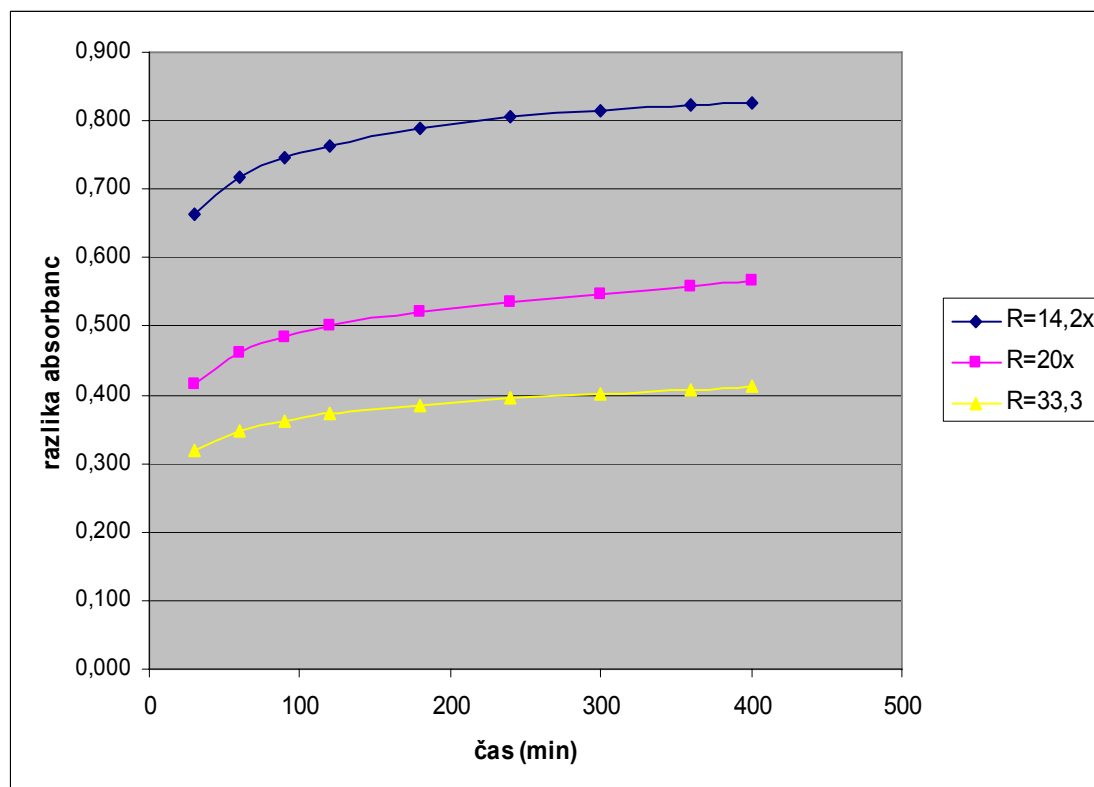
Priloga D12: Počasna kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH[•] pri dodatku 50 μ L 20-krat razredčenega vina različnih sort



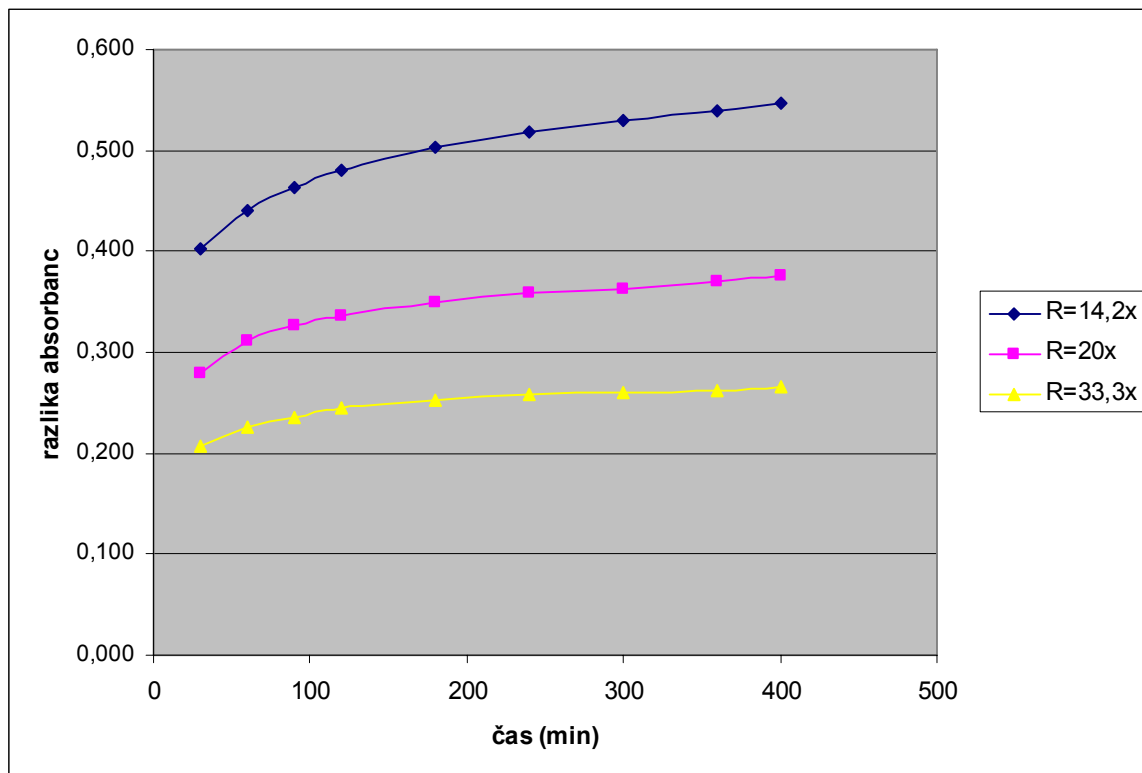
Priloga D13: Počasna kinetika zmanjševanja absorbance raztopine DPPH[•] pri dodatku 50 μ L 33,3-krat razredčenega vina različnih sort



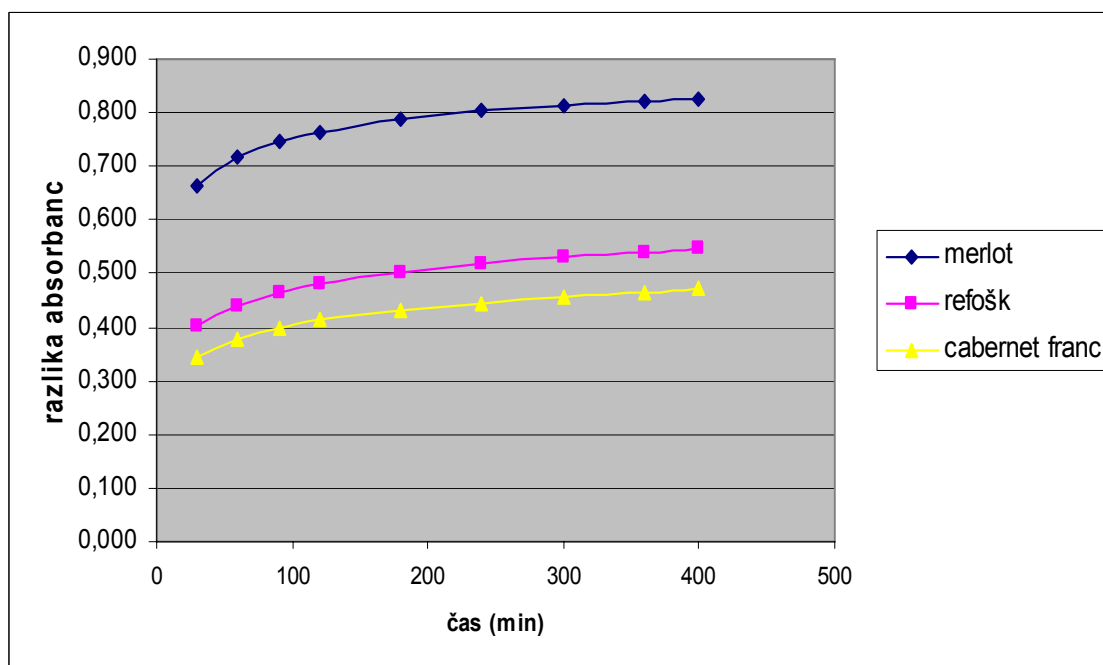
Priloga D14: Počasna kinetika večanja razlike absorbanc pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte cabernet franc v raztopino DPPH*



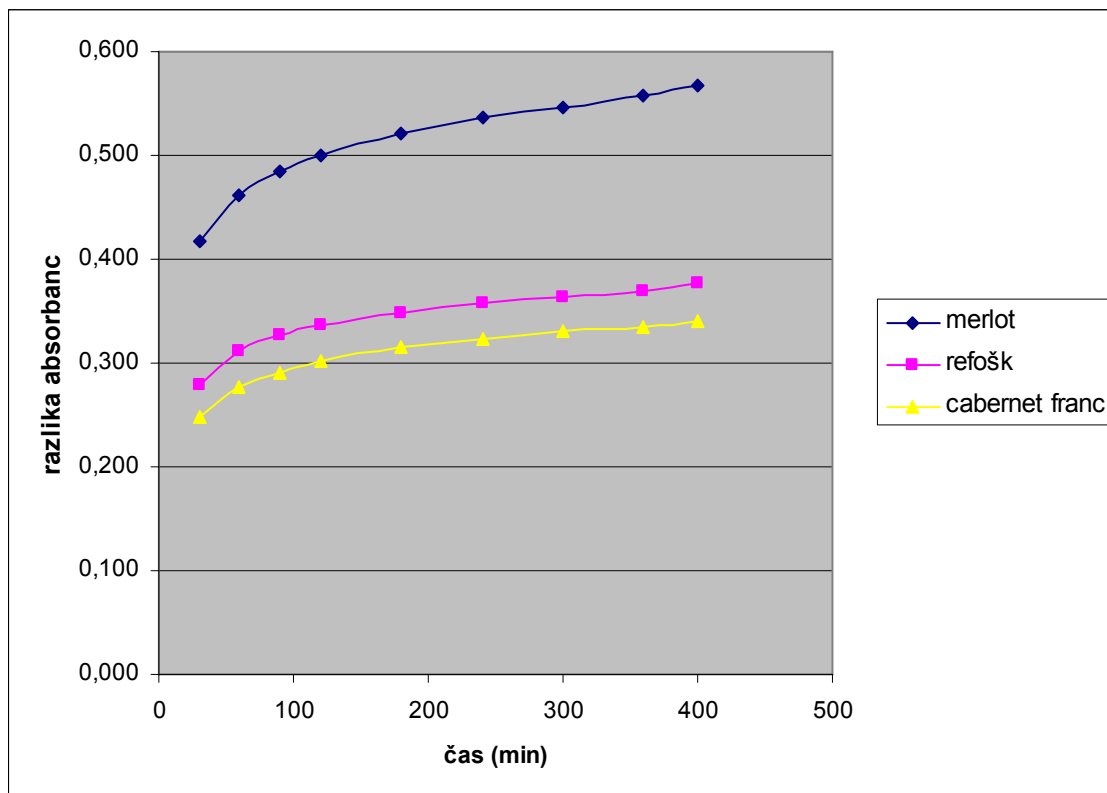
Priloga D15: Počasna kinetika večanja razlike absorbanc pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte merlot v raztopino DPPH*



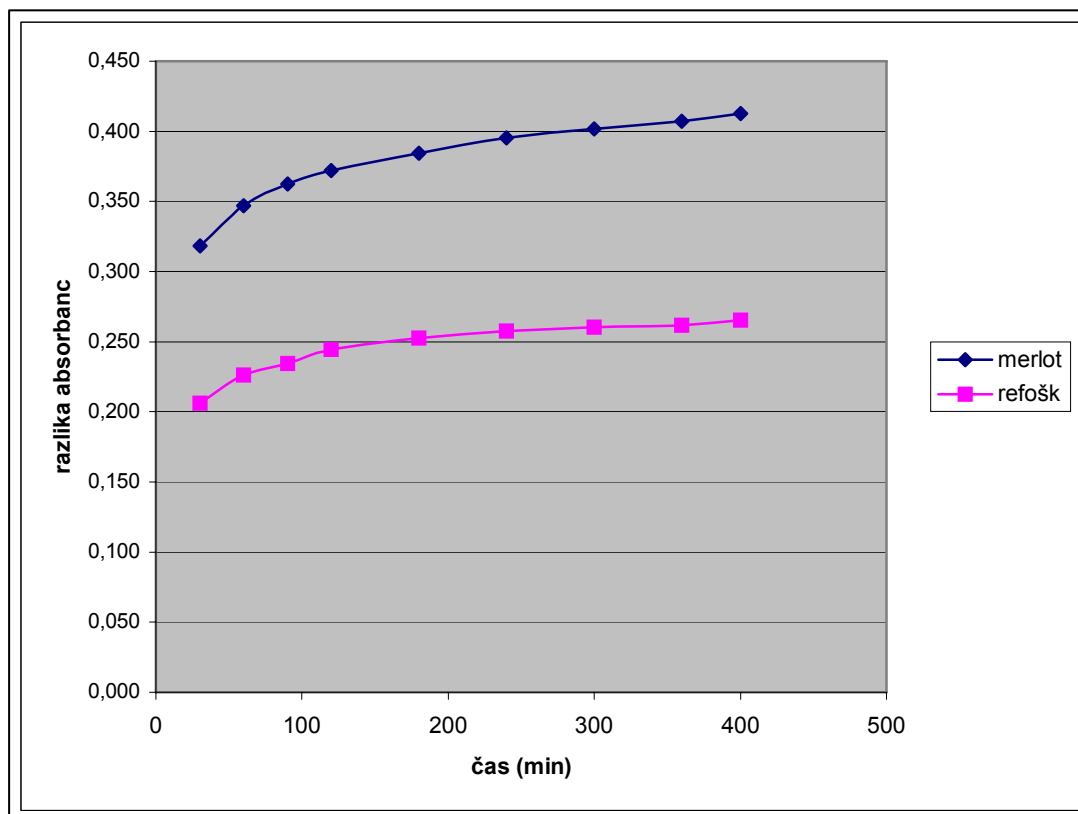
Priloga D16: Počasna kinetika večanja razlike absorbanc pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte refošk v raztopino DPPH*



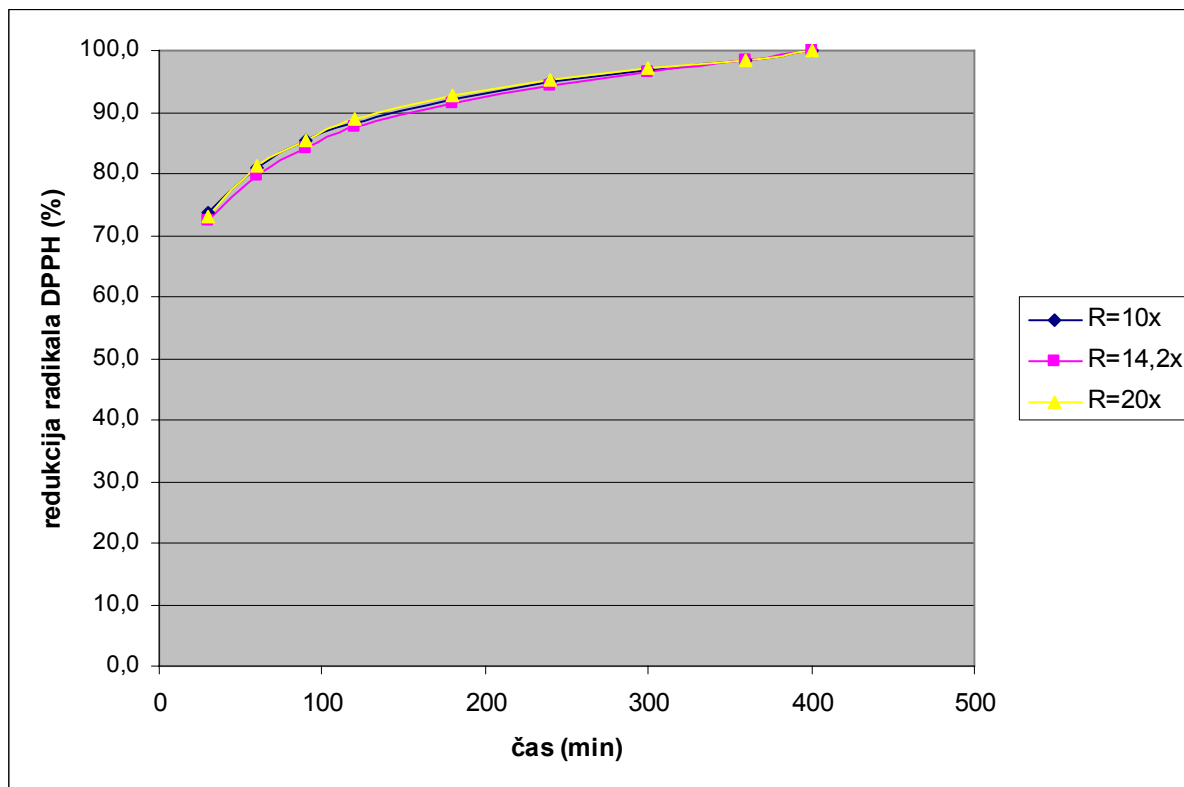
Priloga D17: Počasna kinetika večanja razlike absorbanc raztopine DPPH* pri dodatku 50 μ L 14,2-krat razredčenega vina različnih sort v raztopino DPPH*



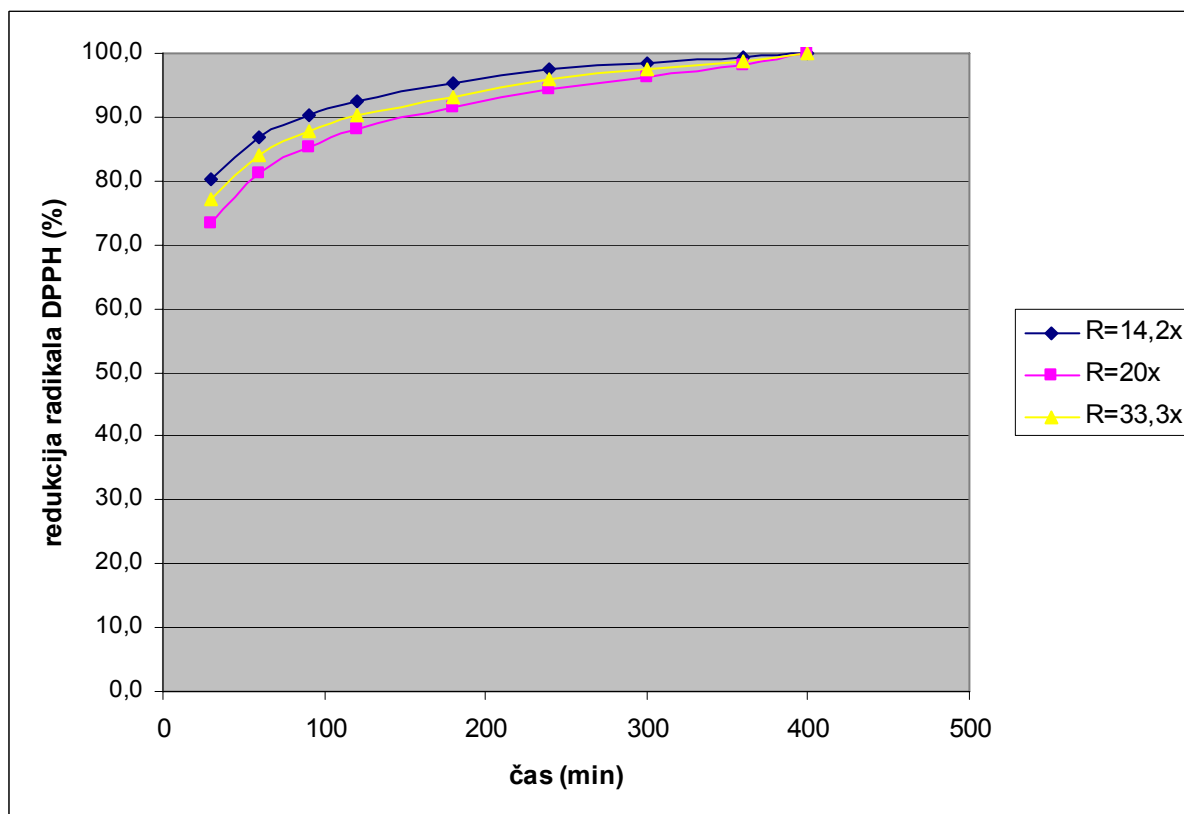
Priloga D18: Počasna kinetika večanja razlike absorbanc raztopine DPPH* pri dodatku 50 μ L 20-krat razredčenega vina različnih sort v raztopino DPPH*



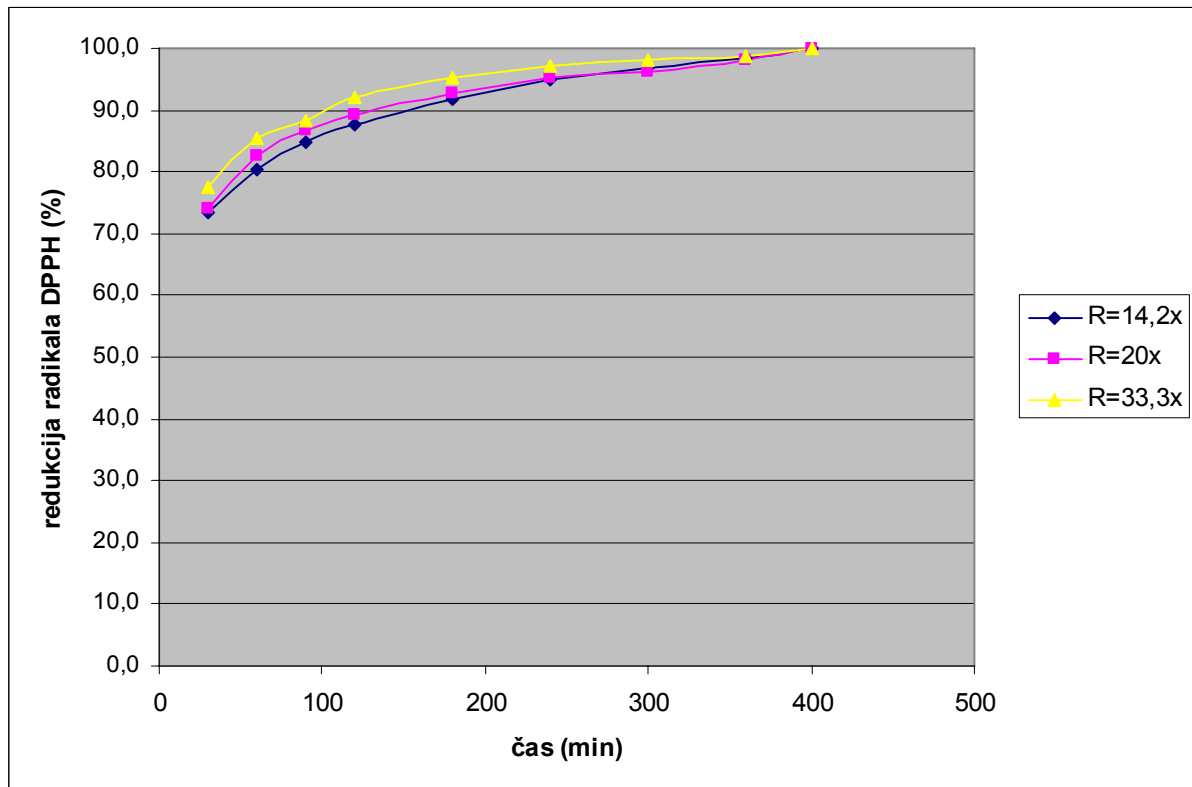
Priloga D19: Počasna kinetika večanja razlike absorbanc raztopine DPPH* pri dodatku 50 μ L 33,3-krat razredčenega vina različnih sort v raztopino DPPH*



Priloga D20: Počasna kinetika redukcije radikala DPPH[•] izražene v % pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte cabernet franc v raztopino DPPH[•]



Priloga D21: Počasna kinetika redukcije radikala DPPH[•] izražene v % pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte merlot v raztopino DPPH[•]



Priloga D22: Počasna kinetika redukcije radikala DPPH[•] izražene v % pri dodatku 50 μ L različno razredčenega vina sorte refošk v raztopino DPPH[•]