

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Špela ČERPIČ

**EKSTRAKCIJA BARVNIH IN FENOLNIH SPOJIN V GROZDNI SOK  
MED MACERACIJO RDEČEGA GROZDJA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**EXTRACTION OF COLOUR AND PHENOLIC COMPOUNDS IN  
GRAPE JUICE DURING THE MACERATION OF RED GRAPE**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Delo je potekalo v laboratoriju Katedre za vinarstvo na Oddelku 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. Marjana Simčiča.

Mentorica: doc. dr. Tatjana Košmerl

Recenzent: doc. dr. Marjan Simčič

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Špela ČERPIČ

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 663.222:663.253.34:547.97(043)=863  
KG grozdni sok / rdeče vino / refošk / cabernet sauvignon / merlot / maceracija / fermentacija / encimi / hranilne snovi / fenolne spojine / tanini / antociani / stabilnost barve / kinetika ekstrakcije fenolnih spojin  
AV ČERPIČ, Špela  
SA KOŠMERL, Tatjana (mentor) / SIMČIČ, Marjan (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo  
LI 2006  
IN EKSTRAKCIJA BARVNIH IN FENOLNIH SPOJIN V GROZDNI SOK MED MACERACIJO RDEČEGA GROZDJA  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XII, 67 str., 6 pregl., 28 sl., 24 pril., 35 vir.  
IJ sl  
JI sl /en  
AI Med maceracijo se iz jagodne kože ekstrahirajo fenolne snovi, katere vplivajo na senzorične značilnosti, stabilnost in kakovost vina. Sorte rdečega grozdja imajo različne vsebnosti posameznih in skupnih fenolnih spojin. Namen tega diplomskega dela je bil ugotoviti, kako dodatek preparatov hranil in encimov v drozgo vpliva na kinetiko ekstrakcije fenolnih spojin ter stabilnost rdeče barve treh rdečih vinskih sort (refošk, cabernet sauvignon, merlot) iz Koprškega vinorodnega okoliša. Uporaba pektolitičnih encimov pri maceraciji drozge ima za posledico večjo koncentracijo antocianov, skupnih fenolov, intenziteto barve in bistrost rdečega vina. Specialni preparat hranila za dodajanje v rdečo drozgo vsebuje inaktivno kvasno kulturo. Uporaba omenjenega preparata omogoča tvorbo kompleksov med polisaharidi in polifenoli takoj, ko so le-ti ekstrahirani med maceracijo, kar ima za posledico večjo barvno intenziteto, polnost in vezavo taninov. Med maceracijo smo dnevno določali skupne fenole, antociane, tanine, netanine in barvne parametre (intenziteto barve, ton barve, delež barvnih snovi pri posameznih valovnih dolžinah in delež flavilijevega kationa). S primerjavo dobljenih rezultatov smo ugotovili, da je učinek preparatov sortno odvisen. Največji učinek encimskih preparatov smo ugotovili pri sorti refošk, kjer je zaradi delovanja encimov prišlo do hitrejše in večje ekstrakcije fenolnih in barvnih spojin. Z uporabo specifičnega preparata hranila za dodajanje v rdečo drozgo pa smo v vzorcih sorte cabernet sauvignon ugotovili, da je prišlo predvsem do velike barvne stabilnosti vse do konca maceracije. Med vzorci sorte merlot nismo opazili značilnega učinka dodanih preparatov.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN  
DC UDC 663.222:663.253.34:547.97(043)=863  
CX grape juice / red wine / Refošk / Cabernet sauvignon / Merlot / maceration /  
fermentation / enzymes / nutrition preparation / phenolic compounds / tannins /  
anthocyanins / colour stability / extraction kinetics of phenolic compounds  
AU ČERPIČ, Špela  
AA KOŠMERL, Tatjana (supervisor) / SIMČIČ, Marjan (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and  
Technology  
PY 2006  
TI EXTRACTION OF COLOUR AND PHENOLIC COMPOUNDS IN GRAPE  
JUICE DURING THE MACERATION OF RED GRAPE  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO XII, 67p., 6 tab., 28 fig., 24 ann., 35 ref.  
LA sl  
AL sl /en  
AB During the maceration time, the phenolic compounds are extracted from the berry skins,  
which have a high influence on sensorial characteristics, stability and quality of red wines.  
The amount of phenolic compounds depends on the variety of red grape. The main objective  
of the present study was to investigate how additions of nutrition and enzyme preparations  
influenced on the extraction kinetics of phenolic compounds and colour stability of three red  
wine varieties (Refošk, Cabernet sauvignon and Merlot) from the winegrowing region  
Koper. The usage of enzymes during maceration influenced on higher concentration of  
anthocyanins, total phenols, colour intensity and clearness of red wine. The special nutrition  
preparation for red wines contains inactivated yeasts. Usage of this preparation provides fast  
binding of polysaccharides available with polyphenols to form stable complex as soon as  
polyphenols are released. This reaction results in red wines with more intense colour,  
rounder mouthfeel and better tannin integration. During the maceration course we daily  
determined total phenolic compounds, anthocyanins, tannins, non-tannins and colour  
parameters (colour intensity, colour hue or tint, portions of particular colour compounds at  
individual wavelengths and portion of flavylum cation). With comparison of results we  
found that preparation effect depend on variety of red grape. The higher effect of enzyme  
preparations we established in samples of cv. Refošk, where we got a faster and higher  
extraction of phenolic and colour compounds because of enzymatic activity. With using a  
special nutrition for red wines we found that samples of cv. Cabernet sauvignon had first of  
all the highest colour stability at the end of maceration. Between samples of cv. Merlot we  
didn't find significant effect of any preparation addition in comparison to the control.

## 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	XII
<b>1</b>	<b>UVOD</b>	<b>1</b>
1.1	CILJ DELA	2
1.2	DELOVNA HIPOTEZA	2
<b>2</b>	<b>PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1	MACERACIJA RDEČEGA GROZDJA	3
<b>2.1.1</b>	<b>Čas ekstrakcije (izluževanja) jagodnih kožic</b>	<b>4</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Kinetika ekstrakcije fenolnih snovi med maceracijo</b>	<b>4</b>
2.2	FENOLNE SPOJINE V VINU	5
<b>2.2.1</b>	<b>Antociani</b>	<b>6</b>
2.2.1.1	Maceracija kot ekstrakcija antocianov iz jagodne kožice v vino	7
<b>2.2.2</b>	<b>Tanini</b>	<b>7</b>
2.2.2.1	Maceracija kot ekstrakcija taninov iz grozdja v vino	7
<b>2.2.3</b>	<b>Kompleksi antociani-fenoli</b>	<b>8</b>
2.3	BARVA RDEČIH VINSKIH SORT	8
2.4	DODATKI PRI PREDELAVI RDEČIH VINSKIH SORT	9
<b>2.4.1</b>	<b>Hrana za kvasovke</b>	<b>9</b>
<b>2.4.2</b>	<b>Komercialni encimski preparati</b>	<b>10</b>
2.4.2.1	Pektolitični encimi	10
2.5	POMEMBNE ZNAČILNOSTI POSAMEZNIH SORT	13
<b>2.5.1</b>	<b>Refošk</b>	<b>13</b>
<b>2.5.2</b>	<b>Cabernet sauvignon</b>	<b>13</b>
<b>2.5.3</b>	<b>Merlot</b>	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b>	<b>14</b>
3.1	POTEK POSKUSA	14

3.2	MATERIALI	14
3.2.1	<b>Vzorci</b>	<b>14</b>
3.2.2	<b>Enološka sredstva</b>	<b>15</b>
3.2.2.1	Selekcionirane kvasovke Uvaferm BDX	15
3.2.2.2	Hrana za kvasovke GO-FERM	15
3.2.2.3	Preparat hranila za kvasovke OPTI-RED	16
3.2.2.4	Encim Lallzyme OE	16
3.2.2.5	Encim Lallzyme EXV	16
3.2.3	<b>Laboratorijska oprema</b>	<b>16</b>
3.2.4	<b>Reagenti</b>	<b>17</b>
3.3	METODE DELA	18
3.3.1	<b>Določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin</b>	<b>18</b>
3.3.2	<b>Določanje koncentracije netaninskih fenolov</b>	<b>19</b>
3.3.3	<b>Določanje koncentracije taninskih fenolov</b>	<b>19</b>
3.3.4	<b>Določanje koncentracije antocianov</b>	<b>19</b>
3.3.5	<b>Določanje barvnih parametrov</b>	<b>20</b>
3.3.6	<b>Spremljanje fermentacijske kinetike na osnovi zmanjšanja sladkorne stopnje</b>	<b>21</b>
4	<b>REZULTATI</b>	<b>22</b>
4.1	SPREMLJANJE FERMENTACIJSKE KINETIKE NA OSNOVI ZMANJŠANJA VREDNOSTI SLADKORNE STOPNJE	22
4.2	SPREMLJANJE VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLOV MED MACERACIJO	27
4.3	SPREMLJANJE VSEBNOSTI TANINSKIH IN NETANINSKIH FENOLOV MED MACERACIJO	30
4.4	SPREMLJANJE VSEBNOSTI ANTOCIANOVI MED MACERACIJO	32
4.5	SPREMLJANJE BARVNIH PARAMETROV MED MACERACIJO	35
4.5.1	<b>Spremljanje barvnih parametrov pri vzorcih sorte refošk</b>	<b>36</b>
4.5.2	<b>Spremljanje barvnih parametrov pri vzorcih sorte cabernet sauvignon</b>	<b>40</b>
4.5.3	<b>Spremljanje barvnih parametrov pri vzorcih sorte merlot</b>	<b>44</b>
5	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>48</b>
5.1	RAZPRAVA	48
5.2	SKLEPI	51
6	<b>POVZETEK</b>	<b>52</b>
7	<b>VIRI</b>	<b>53</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razdelitev skupnih fenolov (Vrhovšek, 1996; Rihter, 1995).....	6
Preglednica 2: Pregled vzorcev in njihove oznake.....	15
Preglednica 3: Preglednica uporabljenih reagentov pri posameznih analizah .....	17
Preglednica 4: Vrednosti deležev (%) rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah med maceracijo vzorcev sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev....	39
Preglednica 5: Vrednosti deležev (%) rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	43
Preglednica 6: Vrednosti deležev (%) rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah med maceracijo vzorcev sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev ...	47

## KAZALO SLIK

Slika 1: Ekstrakcija posameznih spojin iz grozdja med maceracijo (Ribereau-Gayon in sod., 2000) .....	5
Slika 2: Potek postopka določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin .....	18
Slika 3: Potek postopka določanja netaninskih fenolov .....	19
Slika 4: Postopek poteka določanja koncentracije antocianov .....	20
Slika 5 Vrednosti sladkorne stopnje med alkoholno fermentacijo in maceracijo vzorca sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	22
Slika 6: Kinetika zmanjšanja sladkorne stopnje med alkoholno fermentacijo in maceracijo vzorca sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	23
Slika 7: Vrednosti sladkorne stopnje med alkoholno fermentacijo in maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	24
Slika 8: Kinetika zmanjšanja sladkorne stopnje med alkoholno fermentacijo in maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignona z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	24
Slika 9: Vrednosti sladkorne stopnje med alkoholno fermentacijo in maceracijo vzorca sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	25
Slika 10: Kinetika zmanjšanja sladkorne stopnje med alkoholno fermentacijo in maceracijo vzorca sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	26
Slika 11: Vsebnost skupnih fenolov med maceracijo vzorca sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	27
Slika 12: Vsebnost skupnih fenolnih spojin med maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	28
Slika 13: Vsebnost skupnih fenolnih spojin med maceracijo vzorca sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	29
Slika 14: Vsebnost taninski in netaninskih fenolov med maceracijo vzorca sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	30
Slika 15: Vsebnost taninskih in netaninskih fenolov med maceracijo vzorca cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	31
Slika 16: Vsebnost taninskih in netaninskih fenolov med maceracijo vzorca sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	32
Slika 17: Vsebnost antocianov med maceracijo vzorca sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	33



Slika 18: Vsebnost antocianov med maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	34
Slika 19: Vsebnost antocianov med maceracijo vzorca sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	35
Slika 20: Vrednosti intenzitete barve med maceracijo vzorca sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	36
Slika 21 : Vrednosti deležev (%) flavilijevega kationa med maceracijo vzorcev sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	37
Slika 22: Spremljanje tona barve med maceracijo vzorcev sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	38
Slika 23: Vrednosti intenzitete barve med maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	40
Slika 24: Vrednosti deležev (%) flavilijevega kationa med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	41
Slika 25: Spremljanje tona barve med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	42
Slika 26: Vrednosti intenzitete barve med maceracijo vzorca merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	44
Slika 27: Vrednosti deležev (%) flavilijevega kationa med maceracijo vzorcev sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	45
Slika 28: Spremljanje tona barve med maceracijo vzorcev sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev .....	46

## KAZALO PRILOG

- Priloga A1: Spreminjanje sladkorne stopnje med maceracijo vzorca sorte refošk
- Priloga A2: Spreminjanje sladkorne stopnje med maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon
- Priloga A3: Spreminjanje sladkorne stopnje med maceracijo vzorca sorte merlot
- Priloga B1: Spreminjanje vsebnosti skupnih fenolov med maceracijo vzorcev sorte refošk
- Priloga B2: Spreminjanje vsebnosti skupnih fenolov med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon
- Priloga B3: Spreminjanje vsebnosti skupnih fenolov med maceracijo vzorcev sorte merlot
- Priloga C1: Spreminjanje vsebnosti netaninskih polifenolov med maceracijo vzorcev sorte refošk
- Priloga C2: Spreminjanje vsebnosti netaninskih polifenolov med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon
- Priloga C3: Spreminjanje vsebnosti netaninskih polifenolov med maceracijo vzorcev sorte merlot
- Priloga D1: Spreminjanje vsebnosti taninskih polifenolov med maceracijo vzorcev sorte refošk
- Priloga D2: Spreminjanje vsebnosti taninskih polifenolov med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon
- Priloga D3: Spreminjanje vsebnosti taninskih polifenolov med maceracijo vzorcev sorte merlot
- Priloga E1: Spreminjanje vsebnosti antocianov med maceracijo vzorcev sorte refošk
- Priloga E2: Spreminjanje vsebnosti antocianov med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon
- Priloga E3: Spreminjanje vsebnosti antocianov med maceracijo vzorcev sorte merlot
- Priloga F1: Vrednosti absorbance pri posameznih valovnih dolžinah med maceracijo vzorcev sorte refošk
- Priloga F2: Vrednosti absorbance pri posameznih valovnih dolžinah med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon
- Priloga F3: Vrednosti absorbance pri posameznih valovnih dolžinah med maceracijo vzorcev sorte merlot

Priloga G1: Spreminjanje intenzitete barve med maceracijo vzorca sorte refošk

Priloga G2: Spreminjanje intenzitete barve med maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon

Priloga G3: Spreminjanje intenzitete barve med maceracijo vzorca sorte merlot

Priloga H1: Spreminjanje tona barve in vrednosti deleža flavilijevega kationa med maceracijo vzorca sorte refošk

Priloga H2: Spreminjanje tona barve in vrednosti deleža flavilijevega kationa med maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon

Priloga H3: Spreminjanje tona barve in vrednosti deleža flavilijevega kationa med maceracijo vzorca sorte merlot

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
A <sub>420</sub>	absorbanca pri valovni dolžini 420 nm
A <sub>520</sub>	absorbanca pri valovni dolžini 520 nm
A <sub>620</sub>	absorbanca pri valovni dolžini 620 nm
CS	cabernet sauvignon
dA <sub>420</sub> (%)	delež (%) barve pri valovni dolžini 420 nm
dA <sub>520</sub> (%)	delež (%) barve pri valovni dolžini 520 nm
dA <sub>620</sub> (%)	delež (%) barve pri valovni dolžini 620 nm
F.C.	Folin-Ciocateujev reagent
M	merlot
NT	netaninski fenoli
R	refošk
T	taninski fenoli
UV-VIS	ultravijolični – vidni spekter

## 1 UVOD

Legenda, ki pripoveduje o človeškem odkritju vina, govori o vladarju Šarmanu, ki je živel v Heratu. Šermanov sin je rešil orla pred smrtjo, ta pa mu je v zahvalo podaril več pečk. Čez čas je zrasla rastlina, ki je po nekaj letih dala grozdje. Grozdi so se v jeseni obarvali temno modro. Na dvoru so se odločili iztisniti sok iz sadeža. Dalj časa so ga pustili v posodi in opazovali, kaj se z njim dogaja. Ugotovili so, da grozdni sok vre brez ognja, zato so bili prepričani, da je strupen. Vladar se je odločil, naj dajo povreti rdeče obarvan grozdni sok, ki ga danes imenujemo rdeče vino, piti na smrt obsojenemu, ter tako ugotoviti njegov dejanski učinek. Če bo človek preživel, ga ne bo dal usmrtiti. Na smrt obsojeni je preživel, vendar se je kremžil, vino pa je opisal približno takole: kislo, trpko in grenko (Šikovec, 1996).

Dandanes si ni težko razlagati zakaj je na smrt obsojeni pil kislo, trpko in grenko vino, saj lahko grozdje visoke kakovosti ob neprimerni tehnologiji, da prav takšno vino.

Kakovost vina je najprej odvisna od kakovosti grozdja, za katero stojita narava in vinogradnik. Od tu naprej igra pomembno vlogo tehnologija pridelave vina, za kar odgovornost nosi enolog. Njegova naloga je, da z znanjem, tehnologijami in enološkimi prijemi optimalno predela grozdje v vino čim boljše kakovosti. V zadnjem času se vse pogosteje srečujemo z novimi tehnologijami in spoznanji, ki nam pomagajo iz grozdja primerne kakovosti pridelati dobro vino.

Postopek pridelave rdečih vin temelji na kontaktu jagodne kožice in grozdnega soka, po odstranitvi grozdnih pecljev. Cilj raztapljanja in izluževanja jagodnih kožic je bogatenje vina s fenolnimi snovmi (barvnimi in taninskimi) in aromatičnimi spojinami. Ta tehnološki postopek imenujemo maceracija. S tem postopkom lahko v največji meri vplivamo na karakter oziroma stil vina. Postopek maceracije mora biti zato voden v smeri, ki ohranja optimalne razmere ekstrakcije želenih sestavin.

Fenolne komponente v vinu so bile v zadnjih letih predmet mnogih raziskav, predvsem zaradi njihovega esencialnega učinka na senzorične lastnosti vina – barvo, aromo, astringenco in grenkobo. Vzrok za tako zanimanje na znanstvenem področju je iskati tudi v dejstvu, da imajo fenolne spojine biološki učinek na organizem (antioksidativno, proti vnetno delovanje, zaviranje agregacije trombocitov). Rdeča vina naj bi vsebovala štirikrat več fenolnih spojin kot bela vina, antioksidativna učinkovitost nekaterih spojin pa naj bi bila celo do nekajkrat večja kot aktivnost vitamina E in C ter  $\beta$ -karotena, ki veljajo za najučinkovitejše antioksidante, prisotne v sadju in zelenjavi.

Po odmevnem odkritju za zdravje zelo učinkovitih snovi v rdečem vinu, ki se je začelo bliskovito širiti po svetu s televizijsko oddajo "FRANCOSKI PARADOKS" leta 1991 v ZDA, je začelo rasti zanimanje za rdeča vina tudi v predelavi.

Francoski paradoks je tako pritegnil raziskovalce k ugotavljanju dejstev o maceraciji, ki omogoči nastanek vina z bogatejšo fenolno osnovo, bogatejšim telesom in intenzivnejšo barvo. Tako je do danes znanih veliko tehnologij in raznih enoloških prijemov, ki naj bi

zagotavljala pridelavo takih vin. Dejstvo pa je, da se tehnologija prilagaja letniku, sorti in stilu vina, ki ga želimo pridelati.

Z namenom doseganja zelene kakovosti rdečih vin, pa je bistvenega pomena razumevanje kinetike ekstrakcije fenolnih spojin in poznavanje vpliva posameznih vinarskih postopkov na samo kinetiko maceracije.

### 1.1 CILJ DELA

Namen tega dela je ugotavljanje vpliva dodatka hranil in encimskih preparatov na kinetiko ekstrakcije fenolnih spojin in stabilnost rdeče barve med maceracijo treh vzorcev rdečih vinskih sort (merlot, refošk in cabernet sauvignon). Vzorčenje je potekalo dnevno v času maceracije. Spremljali smo spreminjanje barvnih parametrov ter koncentracije skupnih fenolnih spojin, netaninskih in taninskih fenolov ter antocianov.

### 1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevali smo, da bo dodatek encimskega preparata značilno vplival na povečano ekstrakcijo fenolnih komponent in s tem na večjo stabilnost barve mošta ali vina. Prav tako naj bi že vzorec z dodatkom hranila značilno odstopal od kontrolnega vzorca.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 MACERACIJA RDEČEGA GROZDJJA

Za uspešno pridelovanje rdečega vina je zelo pomembna maceracija rdeče drozge. Večina naših vinskih sort, razen sorte gamay, ima neobarvan grozdni sok, zato se v procesu predelave grozdje rdečih vinskih sort macerira. Maceracijo (alkoholno fermentacijo rdeče drozge) imenujemo tisto stopnjo pri predelavi rdečega grozdja v vino, kjer pustimo drozgo, to so delno zmlete grozdne jagode in grozdni sok ležati, v vinifikatorju določen čas. Čas in način kontakta jagodnih kožic rdečega grozdja z jagodnim sokom oblikuje senzorične lastnosti vina. Za barvo rdečih vin so odgovorni antocijani, ki so locirani samo v zunanjih plasteh jagodne kožice. Bistven del je kontakt jagodnega soka z jagodnimi kožicami. Pri tem prehajajo iz vakuol celic jagodne kožice, ob občasnem mešanju, fenolne (barvne in taninske) snovi v jagodni sok. Intenzivnost prehajanja fenolnih spojin v jagodni sok je pogojena s:

- kemijskimi dejavniki: temperatura, koncentracija nastajajočega alkohola in CO<sub>2</sub>;
- fizikalnimi (mehanski) dejavniki: mešanje drozge, čas maceracije (Muhar in Košmerl, 2005).

Fenolne snovi na splošno, še posebno pa barvne snovi, se topijo veliko lažje pri višji temperaturi (Spranger in sod., 2004). Temperaturo je z današnjo tehniko možno poljubno uravnati, toda na osnovi današnjega znanja je priporočljivo višati temperaturo drozge do 30 °C (Nemanič in sod., 1997).

Največji vpliv na ekstrakcijo barvil ima koncentracija alkohola. Alkohol, ki nastaja med fermentacijo, ima na maceracijo kompleksen vpliv. Večje koncentracije lahko zmanjšujejo intenziteto barve, saj povzročajo razpad antocijansko-taninskih kompleksov (Ribereau-Gayon in sod., 2000; Canallas in sod., 2005).

Žveplov dioksid ali pogovorno žveplo povzroči poškodbe celic, kar ima za posledico olajšano ekstrakcijo spojin. Žveplanje drozge doprinese k topnosti mineralov, organskih kislin in fenolnih snovi (antocijanov in taninov). Učinek žveplanja je kratkotrajen, saj je aktiven le prosti SO<sub>2</sub> in ta na drozgi hitro izgine (Ribereau-Gayon in sod., 2000). Če je grozdje plesnivo, se z žveplanjem izognemo uničenju barvil, ki bi jo povzročila prisotnost laktaze v plesni (Klenar in Vrščaj, 2001).

Med maceracijo se zaradi izločanja CO<sub>2</sub> 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 oecetnokislinskih bakterij) in omogočamo hitrejše sproščanje toplote iz vinifikatorja (Košmerl in sod., 2001).

Izluževanje fenolnih snovi je v veliki meri odvisno 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).

Predfermentativna kriomaceracija vpliva na večjo vsebnost fenolov, antocianov (posebno malvidina-3-glukozida, ioniziranih in polimeriziranih antocianov) in aromatičnih snovi v rdečem vinu. Najboljše rezultate predfermentativne kriomaceracije daje postopek z uporabo suhega ledu pri temperaturi 6–8 °C (Alvarez in sod., 2006).

### **2.1.1 Čas ekstrakcije (izluževanja) jagodnih kožic**

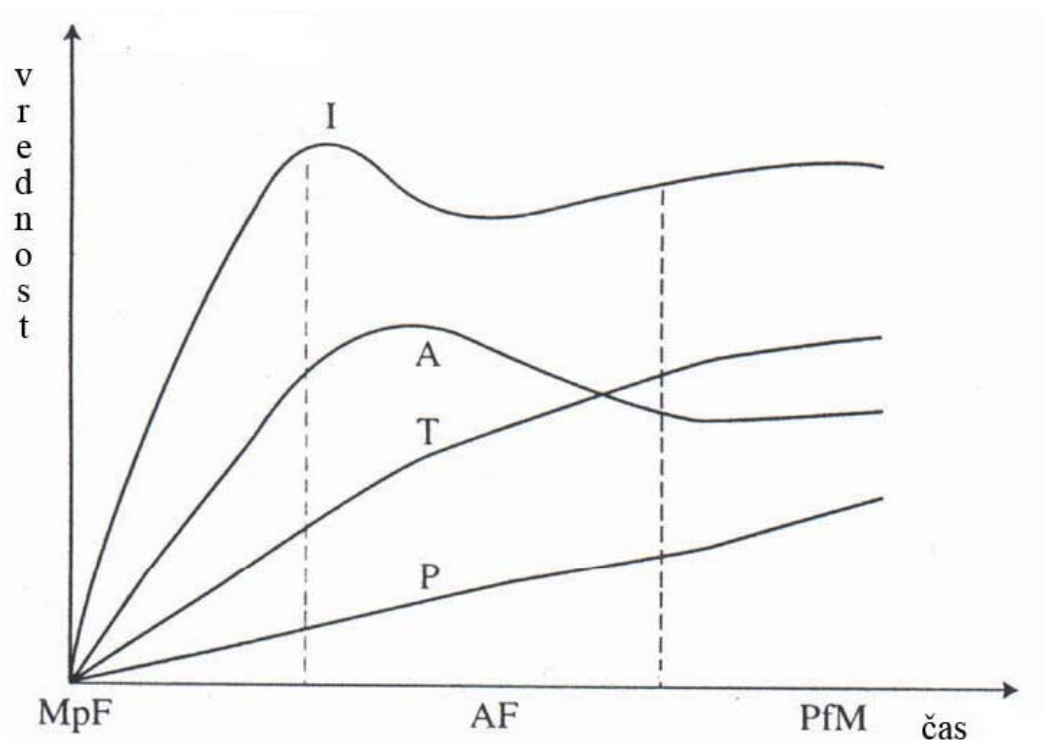
Z natančno predstavo o želenem in možnem karakterju vina, lahko smiselno usmerjamo raztapljanje fenolnih snovi iz jagodnih kožic (Nemanič in sod., 1997). S kratkotrajno maceracijo (krajšo od 24 ur) pridelamo rose vina. Drozga, iz katere pridelamo mlada vina, se macerira 3 do 5 dni. Tako dobimo lepo obarvana 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 v istem letu po trgatvi, pridobivajo na razvoju še približno dve leti, torej niso za arhiviranje, niti za zorenje v majhnih hrastovih sodih. Pri vinih, ki so namenjena za zorenje, maceracija traja najmanj 15 dni do treh tednov ali več. Dolgotrajna maceracija se odraža v oslABLjeni vsebnosti prostih antocianov, toda zelo povečani stabilnosti barve. Taka vina so lepo obarvana, ne vonjajo po drobnih rdečih sadežih, vonjave so manj sortne, sicer tople vinske, še večja je razlika v okusu, ki je bogatejši, polnejši, z izraženimi tanini. Taka vina so primerna za dolgo zorenje, ki omogoča lep razvoj predvsem v okusu (Nemanič in sod., 1997).

### **2.1.2 Kinetika ekstrakcije fenolnih snovi med maceracijo**

Proces maceracije lahko razdelimo v tri periode. Prva je predfermentativna maceracija, ki navadno traja le nekaj ur. Maceracija z alkoholno fermentacijo poteka od dva do sedem dni (refošk). Postfermentativna maceracija se izvaja po zaključeni alkoholni fermentaciji in se uporablja za vina, ki imajo velik zorilni potencial (merlot, cabernet sauvignon) (Boulton in sod., 1996).

Največ antocianov se ekstrahira med maceracijo pred in v začetku alkoholne fermentacije. Ko vsebnost alkohola doseže določeno vrednost, opazimo v drozgi zmanjšanje vsebnosti antocianov. V tej fazi je ekstrakcija antocianov praktično končana, vendar pa potekajo reakcije kondenzacije s tanini. Tanini iz jagodne kožice se ekstrahirajo istočasno z antociani, vendar sledijo počasnejši obliki ekstrakcijskega modela. Kasneje se zaradi delovanja etanola ekstrahirajo tudi tanini iz pečk, odvisno od trajanja maceracije. Intenzivnost barve med maceracijo doseže vrh na začetku procesa, med postfermentativno maceracijo pa ponovno naraste zaradi tvorbe kompleksov taninov z antociani.





**Slika 1:** Ekstrakcija posameznih spojin iz grozdja med maceracijo (Ribereau-Gayon in sod., 2000); Legenda: MpF-predfermentativna maceracija, AF-maceracija z alkoholno fermentacijo, PfM-postfermentativna maceracija, A-antocijani, T-tanini, P-polisaharidi, I-intenziteta barve

## 2.2 FENOLNE SPOJINE V VINU

To je velika skupina spojin v grozdju in vinu, ki so jo dolgo obravnavali kot »čreslovina in barvne snovi«. V novjšem času, z razvojem raziskovalne opreme, pa so to skupino snovi določili in razčlenili (Šikovec, 1996).

Fenolne spojine v vinu predstavljajo obsežno in pomembno skupino kemijskih spojin, ki so odločilne za barvo, vonj in okus vina. Prav tako se odlikujejo kot antioksidanti, poznano je njihovo antimikrobno delovanje in zmanjšanje tveganja za nastanek kardiovaskularnih bolezni (Vrščaj in Košmerl, 2005).

**Preglednica 1:** Razdelitev skupnih fenolov (Vrhovšek, 1996; Rihter, 1995)

<b>SKUPNI FENOLI</b>	
<b><u>glede na osnovno kemijsko strukturo</u></b>	<b><u>glede na taninski značaj</u></b>
<p>1. FLAVONOIDNI FENOLI</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>flavan-3-oli</b> (katehin, epikatehin)</li><li>• <b>proantocianidini</b> (dimeri in trimeri katehina in epikatehina)</li><li>• <b>antocianidini</b> (cianidin, peonidin, delfinidin, petunidin, malvidin)</li><li>• <b>flavonoli</b> (kamferol, kvarcetin, miricetin, izoramnetin)</li></ul> <p>2. NEFLAVONOIDNI FENOLI</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>hidroksicimetne kisline</b> (kaftarna, kutarna, fertarna, kavna, <i>p</i>-kumarna, ferulna)</li><li>• <b>hidroksibenzojske kisline</b> (galna, vanilijeve, siringilska)</li><li>• <b>stilbeni</b> (reservatrol)</li></ul>	<p>1. TANINSKI FENOLI</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>hidrolizabilni</b> (galna in elagova kislina)</li><li>• <b>kondenzirani</b> (katehini in levkoantociani)</li></ul> <p>2. NETANINSKI FENOLI</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• <b>antociani</b></li></ul>

### 2.2.1 Antociani

Antociane uvrščamo v skupino flavonoidnih fenolov in so glavna barvila grozdja in vina, ki dajejo rdečo in modro barvo. Antociani se nahajajo izključno raztopljeni v vakuolah celic (Nemanič in sod., 1997). V večini vinskih sort se nahajajo v celicah jagodne kožice, pri nekaterih pa tudi v jagodnem mesu.

Kemijsko so antociani *beta*-glukozidi, ki se pod vplivom encimov med alkoholnim vrenjem razcepijo v glukozo in antocianidine: cianidin, delfinidin, peonidin, petunidin in največ v malvinidin (Šikovec, 1996). 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). Kot proste molekule se antociani v vinu, odvisno od pH vrednosti, lahko nahajajo v štirih oblikah: kot rdeč flavilijev kation, moder kalkon, modra kinonska baza ter brezbarvna karbinol psevdobaza. Z naraščanjem pH in SO<sub>2</sub> se intenzivnost barve in delež flavilijevega kationa zmanjšujeta (Vrščaj in Košmerl, 2005). Pri nižjem pH je barva vina rubinasto rdeča, pri višjem pa prehaja v modro. Ob prisotnosti večje koncentracije SO<sub>2</sub> vino posvetli, vendar je intenziteta barve reverzibilna (Muhar in Košmerl, 2005). Razmerje med petimi skupinami antocianov grozdja ima velik vpliv na intenzivnost barve in je specifično za posamezno sorto.

### 2.2.1.1 Maceracija kot ekstrakcija antocianov iz jagodne kožice v vino

Antociani so locirani v jagodni kožici in se izločajo v mošt in vino med maceracijo. Ekstrakcija antocianov v vino je zato pravzaprav difuzijski proces, zato sta stopnja in obseg ekstrakcije odvisna od koncentracije in lokacije v jagodni kožici ter procesa metode. Stopnja difuzije je odvisna tudi od temperature, koncentracijskega gradienta med jagodno kožico in vinom, kemijskega ravnotežja ter reakcij v vinu.

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. Vsebnost antocianov v končnem vinu se razlikuje od vsebnosti v opazovanem svežem grozdju. Spremembe nastanejo tekom fermentacije in so po vsej verjetnosti posledica razlik v količini ekstrahiranih antocianov, degradacije ali polimerizacije in različne kapacitete absorpcije celične stene kvasovk (Romeo-Cascales in sod., 2005).

### 2.2.2 **Tanini**

Tanini predstavljajo polimerizirane molekule fenolnih spojin s proteini ali polisaharidi. V rdečih vinih imajo velik vpliv na okus in barvo vina. Ločimo hidrolizabilne in kondenzirane tanine. Hidrolizabilni tanini v grozdju niso prisotni, saj izvirajo iz lesa, vendar pa so zelo pomembni pri zorenju vina. Kondenzirani tanini so znani kot procianidini, ki predstavljajo polimere flavan-3-olov ali katehinov (Vrščaj in Košmerl, 2005).

Tanini se nasprotno od antocianov prisotni v več oblikah in v različnih prostorčkih jagodne kožice. Raztopljeni so v vakuolah in vezani na membrane vakuol in celične membrane. Raztopljeni tanini so v obliki zrn, ali v večjih ali manjših kupčkih. S stopnjevanjem zorenja grozdja se povečuje količina lahko izlužljivih taninov v jagodni kožici, zmanjšuje pa se količina ekstrahiranih taninov iz grozdnih pečk (Nemanič in sod., 1997).

#### 2.2.2.1 Maceracija kot ekstrakcija taninov iz grozdja v vino

Izluževanje taninov je bolj počasno 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. S pojavom alkohola med alkoholno fermentacijo, se začne razkroj membran vakuol in celic. Začnejo se sproščati tanini. Ker so vezani na proteine in polisaharide membran, je njihova ekstrakcija brez alkohola majhna in težavna (Nemanič in sod., 1997).

Podobnost ekstrakcijskih načinov (klasična in podaljšana maceracija) kaže, da se večina taninov ekstrahira med podaljšano maceracijo, saj kot je splošno znano, preidejo lažje in rajši iz pečk kot iz kožic (Košmerl in sod., 2001).

Njihov poseben status je rezultat njihove vloge pri polimerizaciji antocianov pri prvih letih "življenja" rdečega vina (Košmerl in sod., 2001).

### 2.2.3 Kompleksi antociani-fenoli

Ekstrahirani prosti antociani hitro reagirajo s polimeriziranimi tanini in tako dobimo stabilno rdečo barvo (Nemanič in sod., 1997). Tako nastali kondenzati so bolj stabilni in niso tako občutljivi na spremembe pH in SO<sub>2</sub>, kot prosti antociani. Ta značilnost je zlasti pomembna pri ohranitvi in stabilizaciji barve, da so prosti in razpoložljivi za sodelovanje pri polimerizaciji, ki poteka med zorenjem-staranjem, še zlasti v prvem letu, ko poteče polimerizacija večine barvil (Lorenzo in sod., 2005). Danes je znano, da najdemo procianidine v jagodnih kožicah večine rdečih sort, iz katerih se ekstrahirajo med alkoholnim vrenjem. Ponovno je pomembna izjema sorta modri pinot, za katero je značilno pomanjkanje procianidinov v jagodnih kožicah. Rezultat je nesposobnost tvorbe antocian-taninskih kompleksov, kar ima za posledico manjšo intenzivnost in nenadno slabo stabilnost barve (Košmerl in sod., 2001).

## 2.3 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 barve rdečih vin, medtem ko razmerje absorbance pri 420 nm in 520 nm pomeni odtenek ali nianso barve (Košmerl in Kač, 2004).

Dinamika opazovane barve je zelo zapletena, saj je rezultat vsaj treh glavnih vplivov.

- prvi vpliv je združevanje med molekulami antocianov pri koncentracijah nad 50 mg/L; to se kaže v zagotovitvi vsaj dvakratne pričakovane vrednosti barve iz antocininov pri normalnih koncentracijah v vinu med 300–500 mg/L.
- drugi vpliv je izguba barve med alkoholnim vrenjem zaradi vpliva topila, tj. naraščajoče koncentracije etanola med vrenjem.
- tretji vpliv je posledica razbarvanja, belila zaradi žveplovega dioksida (SO<sub>2</sub>), bodisi dodanega, bodisi da je produkt kvasnega metabolizma med alkoholnim vrenjem (Boulton in sod., 1996).

Perez-Magarino in Gonzalez-SanJose (2005) navajata, da datum trgatve grozdja (direktna korelacija s stopnjo zrelosti grozdja) pomembno vpliva na barvne karakteristike vina. Na splošno je bila opažena večja intenziteta modrih in vijoličnih tonov v vinih, pridelanih iz grozdja, potrzanega v drugem trgatvenem obdobju, v katerem je razmerje antocianini/proantocianidini in razmerje med antociani/(proantociani in katehini) manjše. Natančneje povedano; stanje dozorelosti grozdja je odločilno. Zdravo grozdje v polni fenolni zrelosti je okarakterizirano z močno prisotnostjo antocianov, lahko ekstrabilnih in z nežnimi žametnimi tanini. Grozdje, ki ni doseglo fenolne zrelosti, vsebuje malo antocianov, ki so težko ekstrabilni, in veliko agresivnih taninov (Klenar in Vrščaj, 2001).

Na spremembo barve vplivajo koncentracija in sestava fenolnih spojin, količina kisika in SO<sub>2</sub>, temperatura fermentacije in prisotnost kovin in pH. Med fermentacijo lahko izgubimo do 33 % barve. Del barve izgubimo pri nadaljnjih postopkih vinifikacije kot so npr. filtracija, centrifugiranje in hladna stabilizacija. Tudi med jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo izgubimo del barve, kar je posledica dviga pH zaradi zmanjšanja kislin. Najbolj pomembna je količina antocianov in taninov, ki jih dobimo med maceracijo.

Tvorijo komplekse, ki vplivajo na stabilnost barve. Ti kondenzacijski produkti imajo vijolične do temno rdeče odtenke (Zoecklein in sod., 1995).

Glede na to, da je akumulacija antocianov v kožici grozdne jagode genetsko pogojena, so znane razlike med sortami, tako v koncentraciji kot v profilu antocianov. Na osnovi antocianov temeljijo klasifikacije sort grozdja in sortnih vin. Iz grozdja, ki vsebuje nad 500 mg/kg antocianov, se da proizvesti vino, ki bo imelo zadovoljivo barvo, medtem ko so manjše vsebnosti antocianov v grozdju bolj kritične, še posebno, če grozdje vsebuje poleg manjših vsebnosti antocianov še velike vsebnosti proantocianidinov (npr. modri pinot). Večje vsebnosti antocianov omogočajo pridelavo vina z intenzivno barvo (Vrhovšek in sod., 2002).

## 2.4 DODATKI PRI PREDELAVI RDEČIH VINSKIH SORT

### 2.4.1 Hrana za kvasovke

Vinske kvasovke potrebujejo za nemoteno rast in razmnoževanje poleg ogljika kot oblike energije tudi dušik v obliki amonijaka ( $\text{NH}_4^+$ ) in proste aminokisliline za sintezo strukturnih in funkcijskih beljakovin. Med vsemi hranilnimi snovmi mošta je neravnotežje med ogljikom in dušikom, zlasti pa pomanjkanje dušikovih spojin, eden izmed najpogostejših vzrokov za slabše fermentacijske sposobnosti kvasovk, njihovo učinkovitost, kar lahko vodi v upočasnitev ali prekinitev fermentacije. Poleg omenjenih težav se temu pridružijo še drugi neželeni problemi, kot npr. tvorba reduciranih žveplovih spojin (sulfidov, dimetil sulfidov, tiolov), večjih količin hlapnih kislin in višjih alkoholov ter potencialna tvorba etilkarbamata.

Pogosto se v praksi tudi pomanjkanje prostih aminokislin korigira z dodatkom amoniakalnih soli. Najpogosteje uporabljena sta diamonijev fosfat ali sulfat v naslednji sestavi: 27 %  $\text{NH}_4^+$  + 73 %  $\text{PO}_4^{2-}$  ali  $\text{SO}_4^{2-}$ , katerima so lahko dodani tudi vitamini.

Kompleksnejše mešanice hrane za kvasovke se sestojijo v glavnem iz diamonijevega fosfata, kvasnega ekstrakta in avtoliziranih celičnih sten kvasovk (yeast hulls); najdemo pa na tržišču tudi druga hranila z različno setavo: npr. samo celično jedro in citoplazmo inaktiviranih kvasovk, z veliko vsebnostjo prostih aminokislin in vitaminov ali pa so prejšnji sestavi dodane še topne celične stene kvasovk, ki služijo za vezavo toksičnih maščobnih kislin. Celične stene kvasovk se sestojijo v glavnem iz polisaharidov in ostalih komponent celične membrane, kemijska setava pa je odvisna od seva kvasovk, starosti celic in pogojev rasti (Košmerl, 2003).

Vpliv celičnih sten kvasovk na potek fermentacije se kaže v počasni sprostitvi dušikovih spojin, ki jih kvasovke lahko asimilirajo, nadalje v stimulaciji celičnega mehanizma živih kvasovk, kar stimulira tako obseg fermentacije kot število celic v stacionarni fazi. Dodatek celičnih sten kvasovk je zlasti nepogrešljiv pri refermentacijah, kjer se vpliv kaže v njihovi adsorpciji toksičnih C8 in C10 maščobnih kislin, ki se akumulirajo v poznejših stopnjah alkoholne in/ali jabolčno-mlečnokislinske fermentacije.

Med fermentacijo kvasovke asimilirajo od 1 do 2 g/L aminokislin. Večina aminokislin mošta je praktično porabljenih do pretvorbe prvih 30 g reducirajočih sladkorjev/L, tj. v odvisnosti od seva kvasovk in fermentacijske temperature med drugim in tretjim dnevom. V normalnih anaerobnih pogojih, pri nemoteni rasti kvasnih celic in poteku fermentacije, je koncentracija prolina bolj ali manj konstantna. Del prolina lahko kvasovke tudi same sintetizirajo preko arginina in ornitina, oziroma se njegova koncentracija poveča nekoliko proti koncu fermentacije zaradi avtolize kvasovk, ko predstavlja njegova koncentracija več kot polovico izločenih aminokislin.

#### 2.4.2 Komerčni encimski preparati

Beseda encim izvira iz latinske besede , ki pomeni v kvasovkah (»in yeasts«). Leta 1926 je Sumner dokazal, da so encimi proteini, ki delujejo kot biološki katalizatorji. Kljub dejstvu, da so reakcije, ki jih katalizirajo encimi, omejene na hidrolizo, oksidacijo, redukcijo, idr., je njihovo število veliko. To je odvisno od njihove specifičnosti na eno samo snov ali omejeno število snovi, na kar vpliva prepoznavna specifične kemijske skupine ali substrata (Košmerl, 2002).

Encimi igrajo odločilno vlogo v kompleksnih biokemijskih procesih v vinarstvu. Z znanstvenega in tehnološkega stališča lahko smatramo vino kot produkt encimske pretvorbe grozdnega soka. Encimi katalizirajo številne reakcije biotransformacij od predfermentativne faze dalje, med alkoholno fermentacijo, postfermentativno fazo in fazo zorenja ali staranja vina.

Izvor teh biokatalizatorjev predstavljajo grozdje, vinske kvasovke in drugi mikroorganizmi (plesni in bakterije). Ti številni endogeni encimi , običajno niso niti dovolj učinkoviti, niti zastopani v dovolj velikem številu, da bi lahko uspešno katalizirali številne reakcije biotransformacij. Kot dodatek se jim v vinarstvu pogosto dodajajo komercialni encimski preparati.

Tudi po mednarodnem enološkem kodeksu je po priporočilih O.I.V. (1999) dovoljena uporaba:

- **pektolitičnih encimov** v drozgi ali moštu z namenom povečanja izplena, pospešitve ekstrakcije barvnih in/ali aromatičnih snovi ter pospešitve bistrenja in filtracije mošta (resolucija 16/70);
- **glukanaz** v vinu z namenom izboljšanja filtracijske sposobnosti vina zaradi encimske hidrolize glukanov plesni *Botrytis cinerea* in ali nekaterih sevov vinskih kvasovk (resolucija 3/85).

##### 2.4.2.1 Pektolitični encimi

###### 2.4.2.1.1 Struktura pektinskih snovi

Pektinske snovi so s strukturnega stališča heteropolisahridi, ki predstavljajo glavno komponento srednjih lamel in primarnih celičnih sten višjih rastlin. Pektinske snovi sestavljajo v glavnem  $\alpha$ -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  $\alpha$ -D-1,4 povezanih enot galakturonske kisline in  $\beta$ -1,2 ter  $\beta$ -1,4 povezanih

enot L-ramnoze (na približno vsakih 25 enot galakturonske kisline) s stranskimi verigami, ki variirajo po dolžini in sestavi.

#### 2.4.2.1.2 Encimska hidroliza pektinskih snovi

Grozdne in mikrobnne pektinaze razdelimo glede na njihov način delovanja na molekulo pektina. Z ozirom na specifičen encimski substrat ločimo:

- deesterifikacijske pektinaze (pektinesteraze) in
- depolimerizacijske pektinaze (poligalakturonaze, polimetilgalakturonaze, pektin liaze in pektat liaze).

**Protopektinaze** producirajo v vodi topne visoko polimerizirane pektinske snovi iz proto pektina (ki je netopen) z reakcijo na mestih s tremi ali več nemetiliranih enot galakturonske kisline in hidrolizo glikozidne vezi.

**Pektinmetilesteraze** odcepljajo metilno skupino iz galakturonske kisline, tj. osvobajajo metanol in pretvarjajo pektin v pektat. Njihovo delovanje ne skrajšuje pektinske verige.

**Poligalakturonaze** so glavni pektolitični encimi, ki cepijo glukoizidne vezi (ki povezujejo med seboj molekule galakturonske kisline) z absorpcijo ene molekule vode. Ker je njihovo delovanje omejeno na molekule s prostimi karboksilnimi kislinami, imajo zato zelo majhen vpliv na visoko metiliran pektin v odsotnosti pektinmetilesteraz (poligalakturonaze delujejo sinergistično s pektinmetilesterazami). Njihovo delovanje se kaže v povečanju reducirajočih končnih skupin, kar je združeno z močnim zmanjšanjem viskoznosti substrata v raztopini.

**Pektinliaze in pektatliaze:** liaze delujejo na  $\beta$ -vezi galakturonanov s tvorbo dvojne vezi med C4 in C5 v končnem ostanku nereducirajočega konca (dobimo oligomer s 4,5-nenasičenim galakturonozilom na koncu). Pektinliaze so specifične za visoko esterificirane pektine, medtem ko so endopektatilaze bolj specifične za nizko esterificirane pektine.

#### 2.4.2.1.3 Industrijski pektolitični preparati

Pogosta uporaba komercialnih pektolitičnih preparatov je predvsem posledica naslednjih inhibitornih dejavnikov endogenih pektinaz:

- delujejo v območju pH vrednosti 2–8; v moštu in vinu njihovo delovanje ni značilno ovirano,
- endogene pektinaze so aktivne v zelo ozkem temperaturnem območju,
- bistrenje, žveplanje, prisotnost taninov in alkohola ter čiščenje z bentonitom prav tako zmanjšajo njihovo učinkovitost.

Večina komercialnih preparatov pektolitičnih encimov je pridobljena iz plesni vrste *Aspergillus niger*. Z leti so nam postali komercialno dostopni najrazličnejši preparati z različnimi imeni, učinkovitostjo in predvsem čistostjo. Preparati z mešanimi encimi vsekakor pridobivajo na popularnosti zaradi produkta, ki ima več kot samo eno funkcijo: npr: sestavljen encimski preparat je lahko mešanica pektinaz, celulaz, hemicelulaz in glikozidaz.

### **Inhibitorni dejavniki aktivnosti pektolitičnih preparatov**

- Vrednost pH mošta ne vpliva inhibitorno (zaviralno) na aktivnost večine komercialnih pektolitičnih preparatov.
- Znano je, da temperatura značilno zmanjša učinkovitost pektolitične aktivnosti. Npr. temperatura pod 10 °C zmanjša njihovo aktivnost do stopnje, ki je premajhna za uspešno razgradnjo pektinskih snovi mošta in vina. Z naraščajočo temperaturo se obseg pektolitičnih reakcij podvoji za vsakih 10 °C.
- Temperaturna stabilnost je naslednji odločilni dejavnik, ki vpliva na njihovo aktivnost. Komercialni pektolitični preparati vsebujejo poleg 2–5 % aktivnih proteinov še sladkorje, anorganske snovi in sredstva za konzerviranje (stabilizacijo in standardizacijo specifične aktivnosti končnega produkta). Te komponente so protektorji v neustreznih pogojih skladiščenja in izpostavljenosti temperaturnim nihanjem: višja kot je temperatura skladiščenja, večje so izgube encimske aktivnosti. Npr. kratkotrajno skladiščenje pri 50 °C za eno uro zmanjša encimsko aktivnost za 30 %. Zanimivo je dejstvo, da lahko pektinaze tudi zmrznejo in po odtajanju ni nobenih izgub njihove aktivnosti.
- Žveplov dioksid kaže inhibitorno delovanje pektolitične aktivnosti pri koncentracijah več kot 500 mg/L.
- Alkohol kaže zaviralne učinke pri koncentracijah večjih kot 17 vol.%.
- Bentonit uporabljamo šele po zaključenem delovanju pektolitičnih encimov.

#### 2.4.2.1.3.1 Vpliv dodatka pektinaz na predelavo in kakovost vina

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 (van Rensburg in Pretorius, 1999).

Rdeča vina intenzivne barve z malo trpkosti ali astringentnosti navadno zahtevajo kratkotrajno maceracijo, kar pomeni krajši stik jagodnih kožic s tekočo fazo. Dodatek pektolitičnih encimov omogoča boljše izluževanje barvnih substanc ob hkratni manjši ekstrakciji taninov. Njihov učinek je ocenjen na 3–9 %. Encimi pospešujejo razbitje celic oziroma sproščanje strukture lamel. Encimi pa ne izboljšujejo le barve, temveč pripomorejo k bogatejšemu vonju in okusu vina.

Uporaba pektolitičnih encimov pri maceraciji rdeče drozge vpliva na boljšo in hitrejšo ekstrakcijo barvnih snovi med alkoholno fermentacijo, boljšo ekstrakcijo barvnih snovi med stiskanjem in izboljšanje čiščenja vina. Zaradi hitrejše ekstrakcije barve med maceracijo drozge je omogočeno hitrejšo stiskanje drozge (približno za 24 ur), kar omogoča ob krajšem času pridelavo vin vsaj z enako barvo in bistveno manjšo vsebnostjo taninov. Uporaba pektolitičnih encimov pri maceraciji drozge ima za posledico večjo koncentracijo antocianov, skupnih fenolov, intenziteto barve in bistrost rdečega vina (Munoz in sod., 2004). Tretirana vina imajo tudi izrazitejšo aromo, predvsem poudarjene sadne vonjave, v okusu pa so lahko poudarjeni pikantnost, astringentnost ter grenkoba (Košmerl, 2002).



Dodatek pektolitičnih encimov lahko vodi tudi k povečani koncentraciji metanola v vinu, na kar vplivajo številni dejavniki, kot so npr. sorta, enološka praksa in uporabljen sev kvasovk. Vsaka encimska obdelava vodi k značilno povečani tvorbi metanola v primerjavi s kontrolo, ni pa nujno, da je to povečanje tudi statistično značilno.

Revilla in Gonzales-SanJose (2003) ugotavljata, da tretiranje s pektolitičnimi encimi obogati rdeče vino z nizko molekularnimi fenoli in derivati flavan-3-olov ter da se njihova vsebnost ohranja v veliki količini tudi med staranjem.

Učinek encimov na povečanje ekstrakcije barvnih spojin je zelo različen in odvisen od mnogih dejavnikov, med drugimi tudi od sorte grozdja (Bautista-Ortin in sod., 2005).

## 2.5 POMEMBNE ZNAČILNOSTI POSAMEZNIH SORT

### 2.5.1 Refošk

V Sloveniji je sorta razširjena na Krasu in v Koprskem vinorodnem okolišu, sicer pa še v Istri in Makedoniji. Zaradi velike količine mineralnih snovi in aminokislin daje ta sorta na Kraški planoti vino, ki ga poznamo kot kraški teran. Kraški teran je enkratno temno rdeče vino z vijoličnim odtenkom. Njegova pglavitna odlika je izredno visoka mlečne kislina, ki nastane z biološkim razkisom. Na sorazmerno kratki zemljepisni razdalji dobimo zaradi povsem druge klime (višje srednje dnevne temperature in različnih tal), od istega kultivarja refošk, rdeče vino s povsem drugimi lastnostmi. To vino je nekoliko svetlejše, privlačno rubinasto rdeče barve pri pravilni maceraciji z manj taninskimi snovmi, ki so skladno vkomponirane, z ne previsokim alkoholom (Šikovec, 1996).

### 2.5.2 Cabernet sauvignon

Pri nas je sorta razširjena na Primorskem. Vino ima globoko, gosto rubinasto ali granatno rdečo barvo. Kot mlado vino je sveže, z značilno aromo, šele s staranjem se razvije zrel, sortno značilen buket. Niansa v aromi lahko niha od črnega ribeza, paprike, do grozdnih jagod v številnih njihovih odtenkih arome, odvisno od pridelovalnih razmer, vinifikacije, trajanja zorenja v sodu in pozneje v steklenici. V ustih ugotavljamo močno zastopanost taninov, ki so v prvem letu zelo grobi (strogi), toda s časoma omogočijo vinu lep razvoj; tanini postanejo hkrati krepki in mehki ali sladki (Nemanič, 1999). Zaradi ekstrakta in čvrstosti mu ustreza tehnologija barrique-vrenje ali zorenje v majhnih neovinjenih sodih za krajši čas, od koder vino pretočimo v lesene sode, kjer zori več let. Med zorenjem pride do intimne združitve sestavin vina in lesa, polimerizacije in izločanja najbolj grobih taninov ter do nastanka plemenite arome (Šikovec, 1996).

### 2.5.3 Merlot

Sorta je razširjena v Evropi in zlasti v Južni Ameriki, pri nas pa v vinorodni deželi Primorska. Vina so mehka z nekoliko siromašnejšim ekstraktom kot cabernet sauvignon, imajo več alkohola in so nežna. Razvoj vina merlot je bistveno hitrejši od caberneta sauvignona (Nemanič, 1999). S staranjem razvijejo lepo cvetico. Vino je finega okusa, nežno, s polno sortno značilno aromo, lepe, globoke, živahne rdeče barve (Šikovec, 1996).

### **3 MATERIAL IN METODE**

#### **3.1 POTEK POSKUSA**

Poskus je potekal na laboratorijskem nivoju v 5 litrskih erlenmajericah. Uporabili smo tri različne sorte grozdja. Drozgo vsake posamezne sorte smo razdelili na pet paralelk, kamor smo dodali različna enološka sredstva za pospeševanje maceracije. Eno od paralelk je predstavljal kontrolni vzorec, kjer je maceracija potekala spontano, brez dodatka enoloških sredstev.

Vzorčenje je potekalo od 14 do 16 dni (odvisno od sorte) v času maceracije. Spremljali smo spreminjanje barvnih parametrov ter koncentracijo skupnih fenolnih spojin, netaninskih fenolov, taninskih fenolov in antocianov. Z merjenjem sladkorne stopnje smo spremljali tudi kinetiko fermentacije.

#### **3.2 MATERIALI**

##### **3.2.1 Vzorci**

Vzorče je predstavljala rdeča drozga sort refošk, merlot in cabernet sauvignon letnika 2004 iz Koprškega vinorodnega okoliša, z različnimi dodatki enoloških sredstev, kar je razvidno iz preglednice 2.

## Preglednica 2: Pregled vzorcev in njihove oznake

Sorta	Oznaka	Dodana enološka sredstva	Sladkorna stopnja drozge
refošk	R1	25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX in 30 g/hL hrana za kvasovke GO-FERM	86 °Oe
	R2	25g /hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hrana za kvasovke GO-FERM in 1,5 g/hL encim Lallzyme OE	
	R3	25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hrana za kvasovke GO-FERM in 2 g/hL encim Lallzyme EXV	
	R4	25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hrana za kvasovke GO-FERM in 30 g/hL hrana za kvasovke OPTI RED	
	R5	spontana maceracija	
merlot	M1	25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX in 30 g/hL hrana za kvasovke GO-FERM	92 °Oe
	M2	25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hrana za kvasovke GO-FERM in 1,5 g/hL encim Lallzyme OE	
	M3	25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hrana za kvasovke GO-FERM in 2 g/hL encim Lallzyme EXV	
	M4	25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hrana za kvasovke GO-FERM in 30 g/hL hrana za kvasovke OPTI RED	
	M5	spontana maceracija	
cabernet sauvignon	CS1	25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX in 30 g/hL hrana za kvasovke GO-FERM	99 °Oe
	CS2	25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hrana za kvasovke GO-FERM in 1,5 g/hL encim Lallzyme OE	
	CS3	25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hrana za kvasovke GO-FERM in 2 g/hL encim Lallzyme EXV	
	CS4	25 g/hL kvasovke Uvaferm BDX, 30 g/hL hrana za kvasovke GO-FERM in 30 g/hL hrana za kvasovke OPTI RED	
	CS5	spontana maceracija	

### 3.2.2 Enološka sredstva

#### 3.2.2.1 Selekcionirane kvasovke Uvaferm BDX

Suhe aktivne kvasovke s komercialnim imenom Uvaferm BDX so kvasovke vrste *Saccharomyces cerevisiae* in so selekcionirane za pripravo močnih in izrazitih rdečih vin. Vplivale naj bi na povečano ekstrakcijo barvnih komponent v primerjavi z običajnimi kvasnimi kulturami. Celična struktura kvasovk BDX omogoča tudi manjšo adsorpcijo barvil pri rdečih vinih.

Proizvajalec: Danstar Ferment AG Alpenstrasse Zug., Švica za Lallemand Inc. Europe

#### 3.2.2.2 Hrana za kvasovke GO-FERM

GO-FERM vsebuje kvasovkam dostopna hranila. So neaktivne kvasovke, pridobljene v procesu avtolize biomase kvasovk. Hrana je bogata s potrebnimi vitamini (pantetonat, biotin), minerali, mikroelementi (cink in mangan) in aminokislinami. Go-ferm je pripravljen za direktno dodajanje v vodo za rehidracijo kvasovk.

Proizvajalec: Danstar Ferment AG Alpenstrasse Zug., Švica za Lallemand Inc. Europe

### 3.2.2.3 Preparat hranila za kvasovke OPTI-RED

OPTI-RED je neaktivna kvasna kultura in hrana za kvasovke namenjena rdečim sortam. Proizvod povečuje količino polisaharidov, ki so sposobni vezati reaktivne tanine; je tudi biološka hrana za kvasovke in oskrbuje mošt z *alfa*-aminokislinami, vitamini in minerali. Opti-red se lahko uporablja sam ali z enološkimi encimi in omogoča povezovanje taninov ter nastanek intenzivnejše in stabilnejše barve rdečih vin.

Proizvajalec: Danstar Ferment AG Alpenstrasse Zug., Švica za Lallemand Inc. Europe

### 3.2.2.4 Encim Lallzyme OE

Lallzyme OE so encimi pektinaze z zelo močno sekundarno aktivnostjo hemicelulaz in celulaz. Produkt sestavljajo poli-galakturonazne, pektin-liazne in pektin-esterazne enote. Lallzyme OE v rdečih sortah omogoča:

- sproščanje taninov, vezanih na polisaharide in vakuole membran,
- sproščanje prostih taninskih molekul,
- povečano barvno stabilnost preko taninsko-antocianskega kompleksa,
- polnost ter zaokroženost karakteristik okusa s taninsko-polisaharidno vezjo,
- ekstrakcijo polisaharidov in
- hitrejšo ekstrakcijo barvnih snovi.

Proizvajalec: Lallemand S.A. Francija.

### 3.2.2.5 Encim Lallzyme EXV

Lallzyme EXV vsebuje pektinaze, hemicelulaze in celulaze s sekundarno aktivnostjo. Je visoko aktiven encimski proizvod, ki omogoča:

- hitro in učinkovito ekstrakcijo antocianov,
- učinkovito ekstrakcijo taninov in njihovo vezavo z antociani in
- večjo ekstrakcijo aromatičnih komponent

Proizvajalec: Lallemand S.A. Francija

## 3.2.3 **Laboratorijska oprema**

Pri poskusu smo uporabili sledečo laboratorijsko opremo:

- refraktometer
- UV-VIS spektrofotometer,
- centrifuga,
- plastične epruvete (shranjevanje vzorcev),
- steklene epruvete (analiza vzorcev),
- centrifugirne epruvete,
- merilne bučke (100 mL),
- avtomatske pipete,
- pH meter: METTLER TOLEDO DL 50 Švica,
- 10 mm kvarčne kivete,
- kapalke,
- analitska tehtnica: AEA-220A,

- ročni refraktometer.

### 3.2.4 Reagenti

**Preglednica 3:** Preglednica uporabljenih reagentov pri posameznih analizah

Vrsta analize	Uporabljeni reagenti
Določanje netaninskih in taninskih polifenolov	<ul style="list-style-type: none"><li>- 4 % raztopina metilceluloze</li><li>- nasičena raztopina amonijevega sulfata (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li><li>- Folin-Ciocalteu reagent (razredčen pred uporabo z deionizirano vodo v razmerju 1:3)</li><li>- 20 % raztopina Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></li><li>- deionizirana voda</li></ul>
Določanje skupnih fenolov	<ul style="list-style-type: none"><li>- osnovna raztopina galne kisline (500 mg galne kisline, 10 mL absolutnega etanola, deionizirana voda do 100 mL)</li><li>- Folin-Ciocalteu reagent (razredčen pred uporabo z deionizirano vodo v razmerju 1:3)</li><li>- 20 % raztopina Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></li><li>- deionizirana voda</li></ul>
Določanje antocianov	<ul style="list-style-type: none"><li>- raztopina etanola: koncentrirano HCl razredčimo z 95 % etanolom, da dobimo 0,1 % raztopino HCl v etanolu (1,38 mL konc. HCl dopolnimo do 500 mL z 95 % etanolom)</li><li>- 2 % raztopina HCl: 45,23 mL konc. HCl (35-37 % HCl) dopolnimo do 1000 mL z deionizirano vodo</li><li>- pufrna raztopina: vrednost pH pufra mora biti enaka vrednosti pH vzorca</li><li>- deionizirana voda</li></ul>
Določanje intenzitete barve	<ul style="list-style-type: none"><li>- pufrna raztopina: vrednost pH pufra mora biti enaka vrednosti pH vzorca</li></ul>

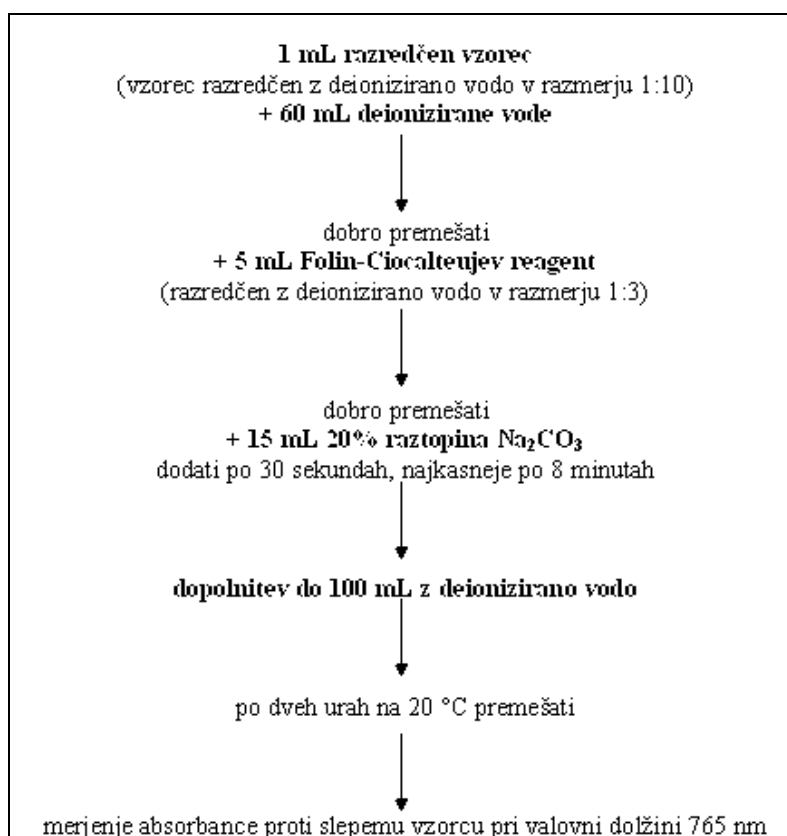
### 3.3 METODE DELA

#### 3.3.1 Določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin

##### Princip metode:

Skupne fenolne spojine smo določali s spektrofotometrično metodo po Singletonu in Rossiju. Vzorcju vina smo dodali Folin-Ciocalteujev reagent (vodna raztopina natrijevega volframata(VI), natrijevega molibdata(VI) in litijevega sulfata(VI), ki prepreči obarvanje F.C. reagenta), ki v alkalni raztopini (dodatek natrijevega karbonata) oksidira fenolne snovi. Raztopina, ki vsebuje reducirani volframat(VI) in/ali molibdat(VI), je modro obarvana, medtem ko je raztopina nereducirane oblike rumene barve.

Izmerjena absorbanca pri valovni dolžini 765 nm je premosorazmerna količini skupnih fenolov v vzorcu. Masno koncentracijo skupnih fenolnih spojin smo odčitali iz umeritvene krivulje in jo izrazili kot mg galne kisline/L. Galno kislino uporabimo kot standardno referenčno spojino za določanje skupnih fenolnih spojin (Košmerl in Kač, 2004).



Slika 2: Potek postopka določanje koncentracije skupnih fenolnih spojin

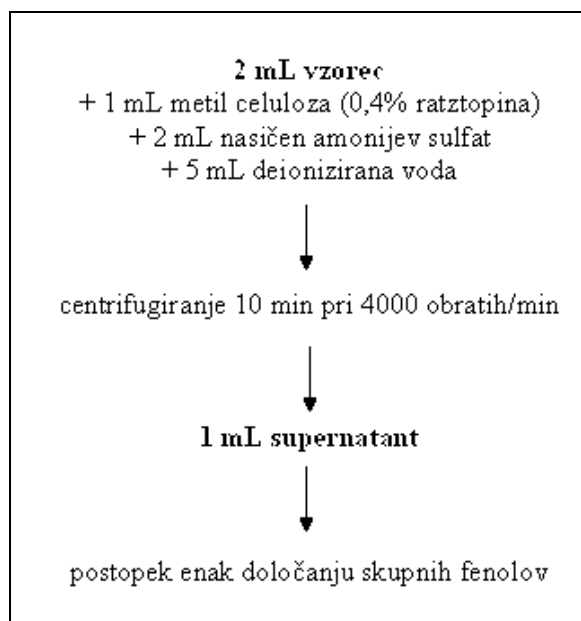
### 3.3.2 Določanje koncentracije netaninskih fenolov

#### Princip metode:

Koncentracijo netaninov smo določili spektrofotometrično. Postopek obarvanja temelji na reakciji metilceluloze ter diamonijevega sulfata z vzorcem; nato postopoma z raztopino enako, kot je opisano pri določevanju skupnih fenolov: obarvanje s F.C. reagentom v alkalni sredini (Boulton in sod., 1996).

#### Postopek:

Vzorec vina tretiramo z raztopinometil celuloze in nasičenega amonijevega sulfata, centrifugiramo in za analizo uporabimo supernatant, ki ga tretiramo po postopku za določevanje skupnih fenolov. Koncentracijo netaninskih fenolov odčitamo iz umeritvene krivulje za skupne fenole in jo izrazimo v mg galne kisline/L (Boulton in sod., 1996).



Slika 3: Potek postopka določanja netaninskih fenolov

### 3.3.3 Določanje koncentracije taninskih fenolov

Koncentracijo taninskih fenolov izračunamo iz razlike med skupnimi in taninskimi fenoli in jih prav tako izrazimo v mg galne kisline/L (Boulton in sod., 1996).

### 3.3.4 Določanje koncentracije antocianov

#### Princip metode:

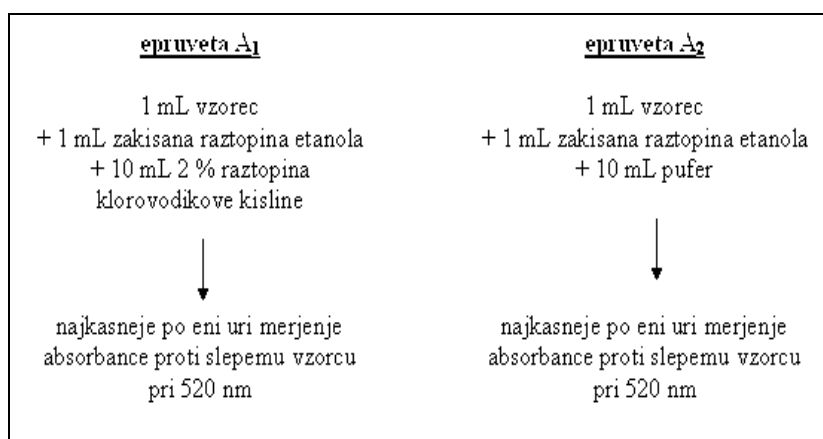
Pri pH vrednosti vina med 3,3–4,3 obstaja v ravnotežju več molekularnih oblik vsakega antociana. Z zmanjšanjem vrednosti pH vina na 0,5–0,8 preidejo vsi antociani v obarvano

obliko (flavilijev kation), zato lahko določimo njihovo masno koncentracijo tako, da izmerimo absorbanco vzorcev pri valovni dolžini 520 nm in izračunamo masno koncentracijo antocianov s pomočjo koeficienta, ki upošteva molarno absorptivnost in molsko maso prevladujočega barvila (Ough in Amerine, 1988).

**Postopek:**

Vzorec vina razdelimo na dva dela (Boulton in sod., 1996)). V prvega dodamo zakisano raztopino etanola in 2 % raztopino klorovodikove kisline. V drugem delu postopamo enako, le da namesto 2 % raztopine klorovodikove kisline dodamo pufrno raztopino s pH 3,5. Najkasneje po eni uri tretiranja vzorcev z reagenti izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 520 nm. Koncentracijo antocianov (C), izraženo v mg/L kot malvidin-3-monoglukozid, izračunamo po matematični zvezi 1.

$$C = (A_1 - A_2) \cdot 386,596 \quad \dots (1)$$



**Slika 4:** Postopek poteka določanja koncentracije antocianov

### 3.3.5 Določanje barvnih parametrov

**Princip metode:**

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 merjenih pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm predstavlja intenziteto barve, medtem ko razmerje absorbance pri 420 nm in 520 nm pomeni ton ali odtenek barve.

**Postopek:**

Barvo smo določili spektrofotometrično. Vzorec smo razredčili v razmerju 1:10 s pufrno raztopino. Tako razredčenemu vzorcu izmerimo absorbanco pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm proti slepemu vzorcu (voda) v steklenih kivetah z debelino optične plasti



10 mm. Dobljene vrednosti iz vrednotimo s pomočjo matematičnih zvez (2, 3, 4, 5 in 6) za intenziteto barve rdečega vina ( $I$ ), delež rdeče barve v obliki flavilijevega kationa ( $dA_F$ ) ter deleže rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah ( $dA_{420}$ ,  $dA_{520}$ ,  $dA_{620}$ ) (Košmerl in Kač, 2004).

$$I = \sum (A_{420} + A_{520} + A_{620}) \cdot R \quad \dots (1)$$

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

$$dA_{420}(\%) = \frac{A_{420}}{I} \cdot 100 \quad \dots (3)$$

$$dA_{520}(\%) = \frac{A_{520}}{I} \cdot 100 \quad \dots (4)$$

$$dA_{620}(\%) = \frac{A_{620}}{I} \cdot 100 \quad \dots (5)$$

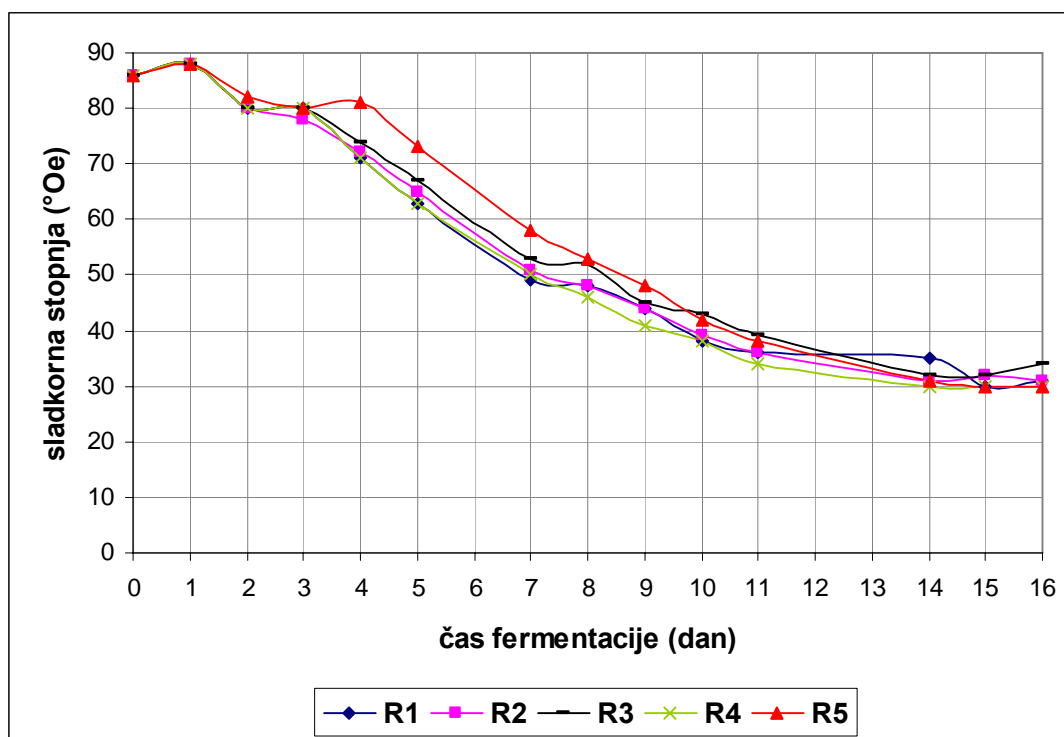
### 3.3.6 Spremljanje fermentacijske kinetike na osnovi zmanjšanja sladkorne stopnje

Spremljali smo potek fermentacije, to je pretvorbo sladkorjev v etanol in ogljikov dioksid. Posluževali smo se spremljanja fermentacijske kinetike na osnovi zmanjševanja sladkorne stopnje. Z ročnim refraktometrom smo dnevno merili sladkorno stopnjo v °Oe.

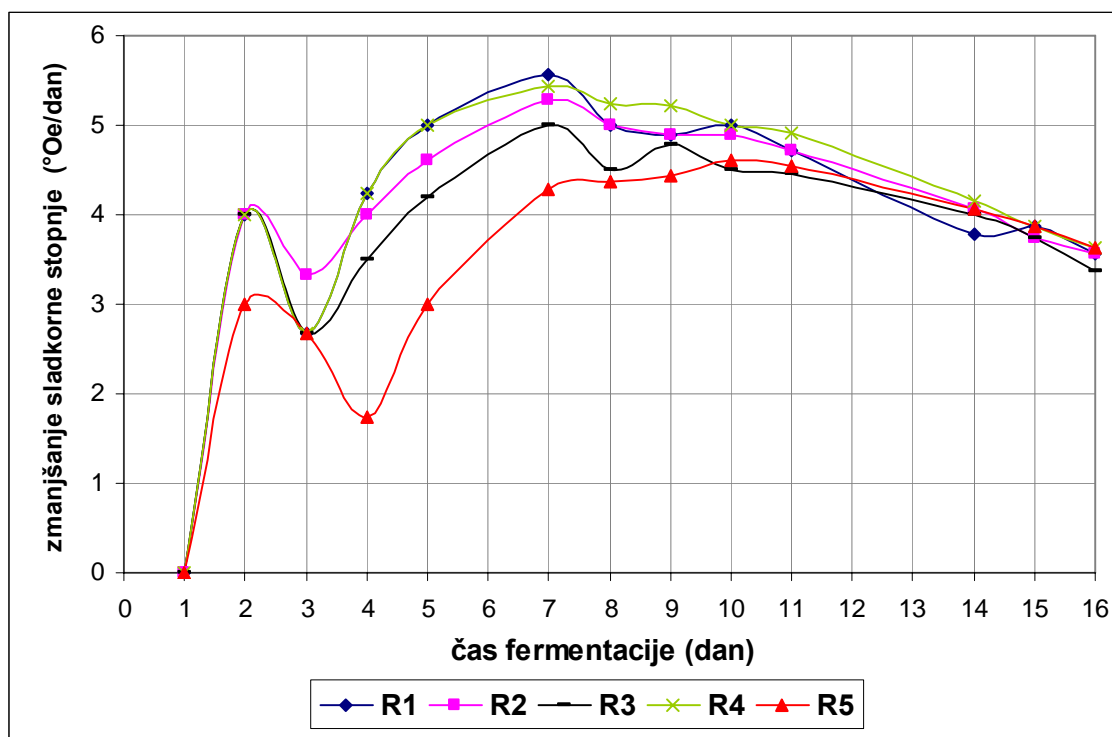
## 4 REZULTATI

### 4.1 SPREMLJANJE FERMENTACIJSKE KINETIKE NA OSNOVI ZMANJŠANJA VREDNOSTI SLADKORNE STOPNJE

Slike 5, 7 in 9 prikazujejo časovni potek alkoholne fermentacije vzorcev refoška, cabernet sauvignona in merlota na osnovi kinetike zmanjšanja sladkorne stopnje ( $^{\circ}\text{Oe}/\text{dan}$ ). Iz grafov je razvidno, da je hitrost zmanjšanja sladkorne stopnje najmanjša pri kontrolnih vzorcih (R5, CS5 in M5) in hitrejša v vseh ostalih vzorcih, v katerih je dodana kultura selekcioniranih kvasovk in hrana za kvasovke v enakih količinah (vzorci z oznakami od 1 do 4). Potek krivulj kaže na to, da dodatek encimskih preparatov ne vpliva na hitrost alkoholne fermentacije.

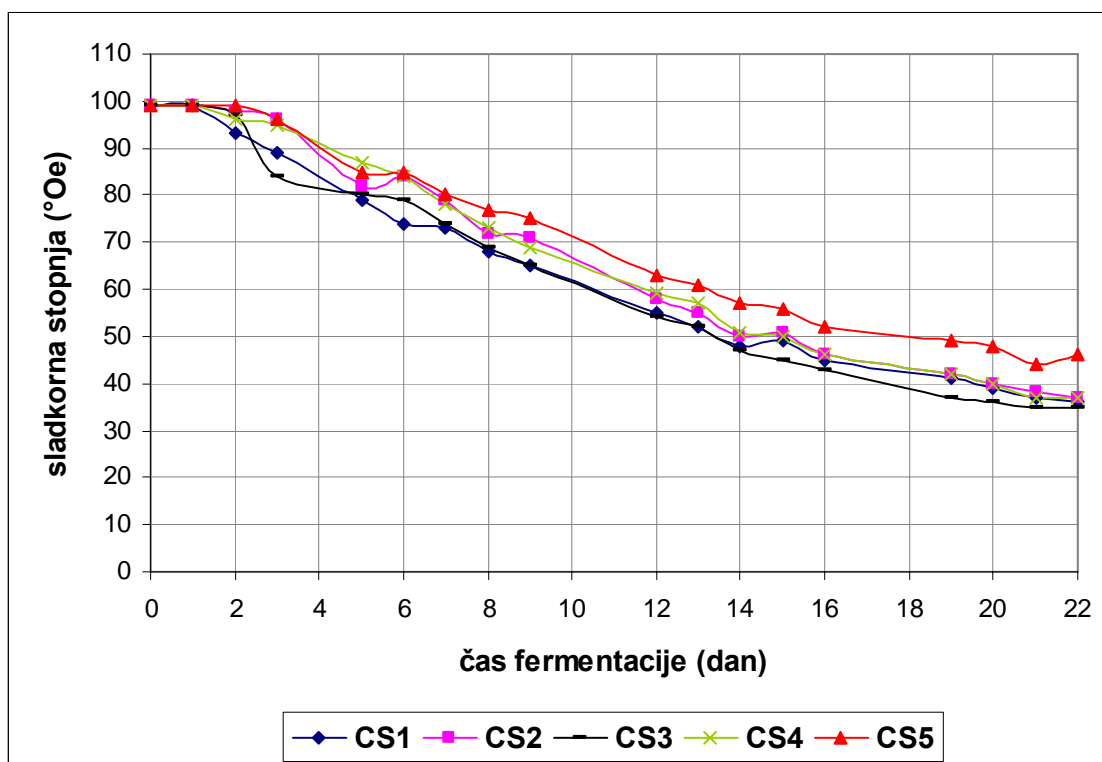


**Slika 5** Vrednosti sladkorne stopnje med alkoholno fermentacijo in maceracijo vzorca sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev

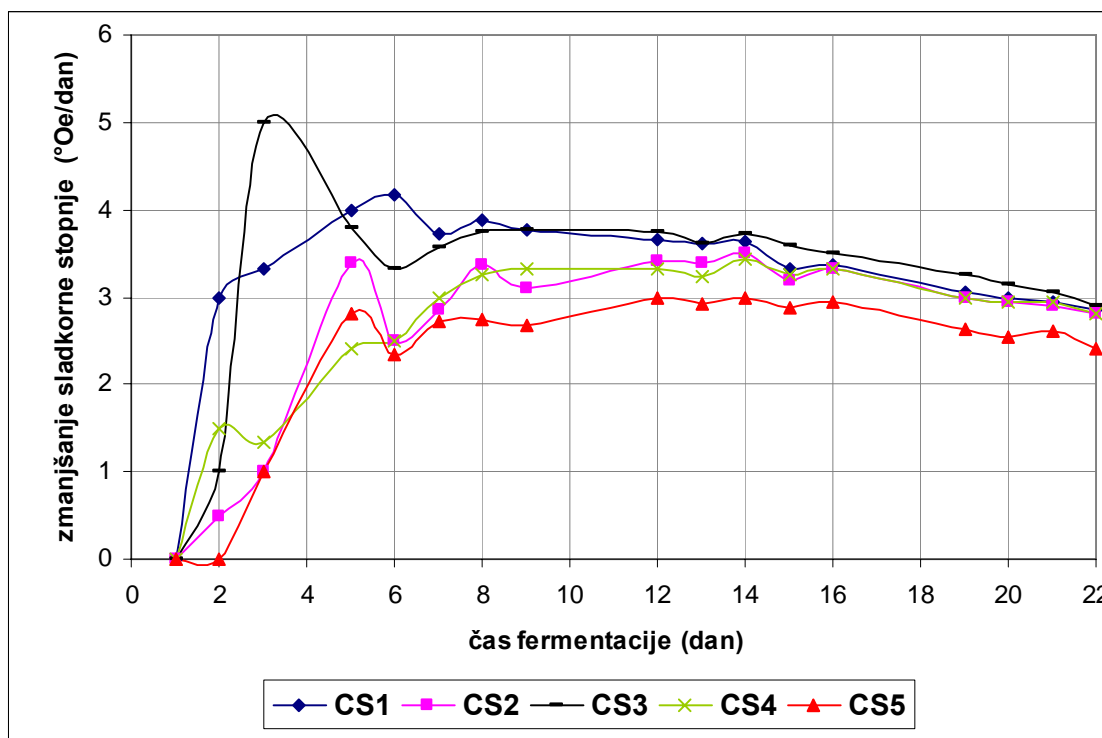


**Slika 6:** Kinetika zmanjšanja sladkorne stopnje med alkoholno fermentacijo in maceracijo vzorca sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev

Pri vzorcih refoška (sliki 5 in 6) pride do upočasnitve fermentacije po drugem dnevu in že naslednji dan zopet naraste. Vzrok temu je lahko sprememba zunanjih dejavnikov (sprememba temperature), saj gre za enak potek krivulje pri vseh petih vzorcih refoška.

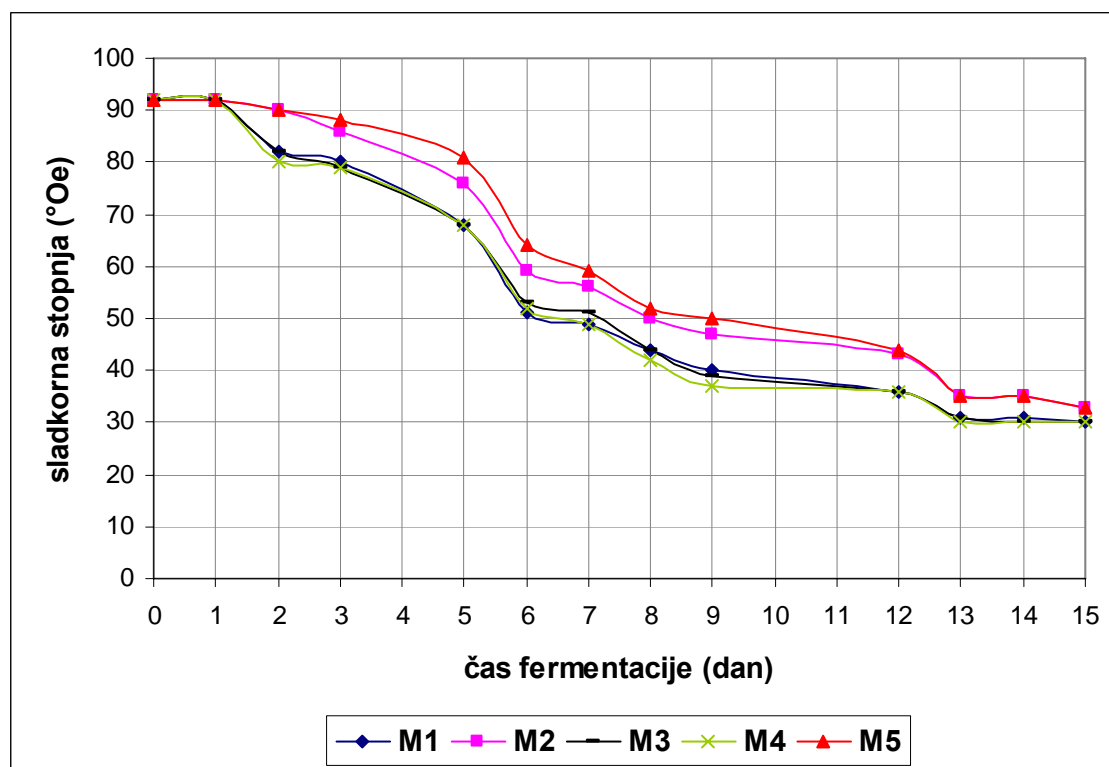


Slika 7: Vrednosti sladkorne stopnje med alkoholno fermentacijo in maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev

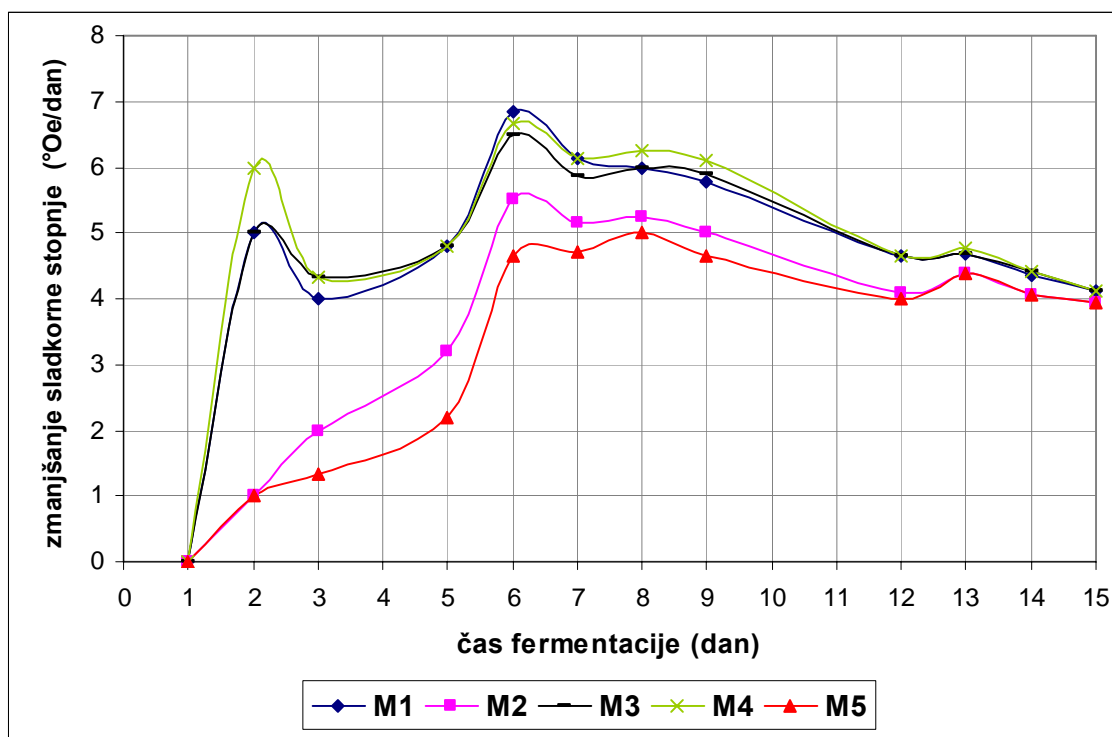


Slika 8: Kinetika zmanjšanja sladkorne stopnje med alkoholno fermentacijo in maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignona z različnimi dodatki enoloških sredstev

Sliki 7 in 8 prikazujeta skoraj nemoten potek alkoholne fermentacije. Vzorci cabernet sauvignona dosežejo vrh med četrtem in petim dnevom fermentacije z izjemo vzorca CS3, ki že v tretjem dnevu doseže maksimalno hitrost fermentacije. V vzorcu CS3 v primerjavi z ostalimi vzorci cabernet sauvignona poteka fermentacija najhitreje.



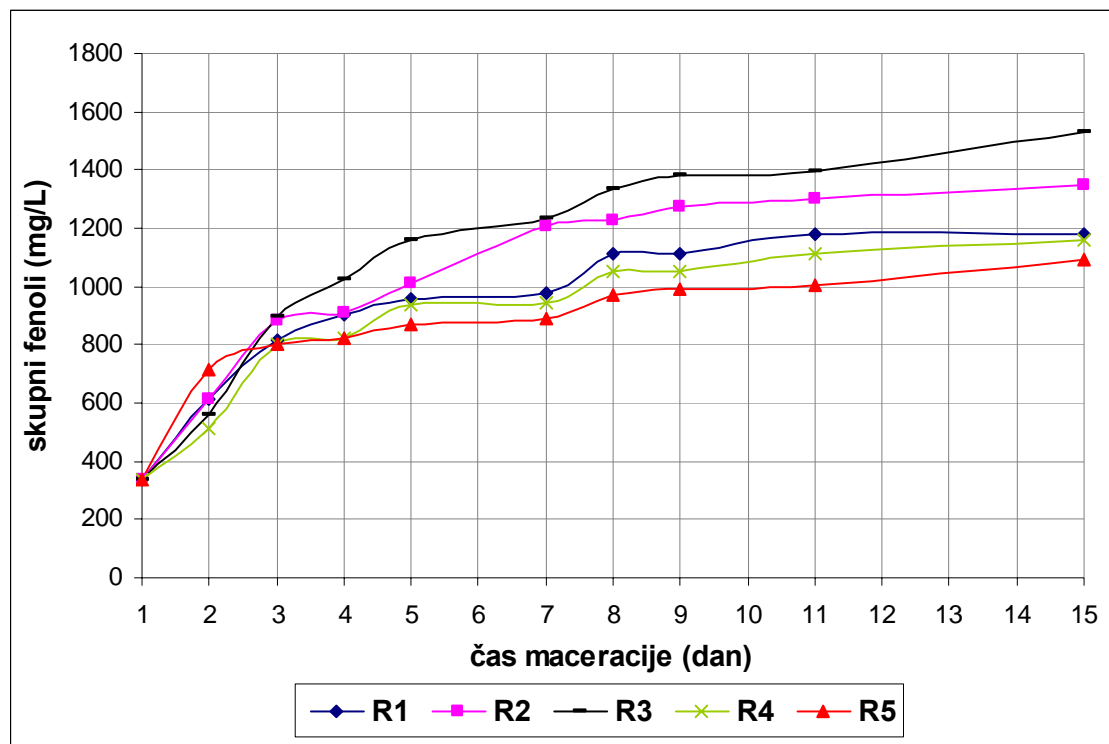
**Slika 9:** Vrednosti sladkorne stopnje med alkoholno fermentacijo in maceracijo vzorca sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev



**Slika 10:** Kinetika zmanjšanja sladkorne stopnje med alkoholno fermentacijo in maceracijo vzorca sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev

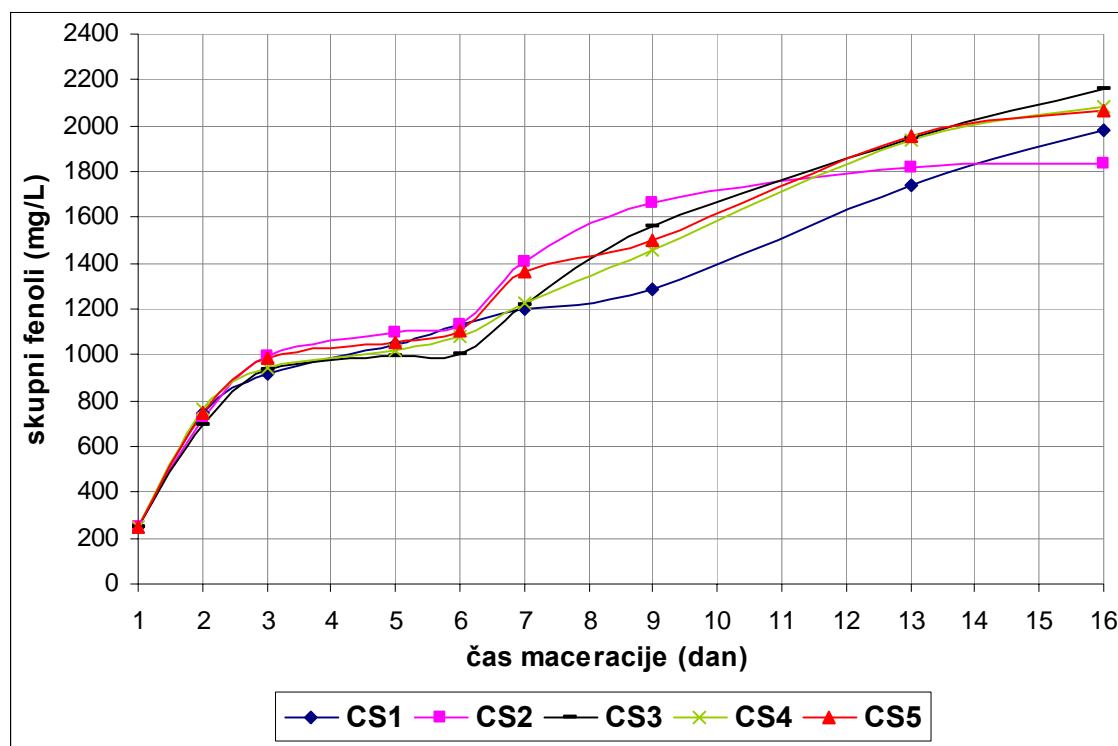
V vzorcih M1, M3 in M4 (sliki 9 in 10) krivulje strmo naraščajo do drugega dne, potem pa je hitrost fermentacije zmanjšana. Vzrokov za to je lahko več (zmanjšana temperatura, prehitra poraba sladkorjev v začetku). V vseh vzorcih merlota je dosežen vrh fermentacije v šestem dnevu.

#### 4.2 SPREMLJANJE VSEBNOSTI SKUPNIH FENOLOV MED MACERACIJO



**Slika 11:** Vsebnost skupnih fenolov med maceracijo vzorca sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev

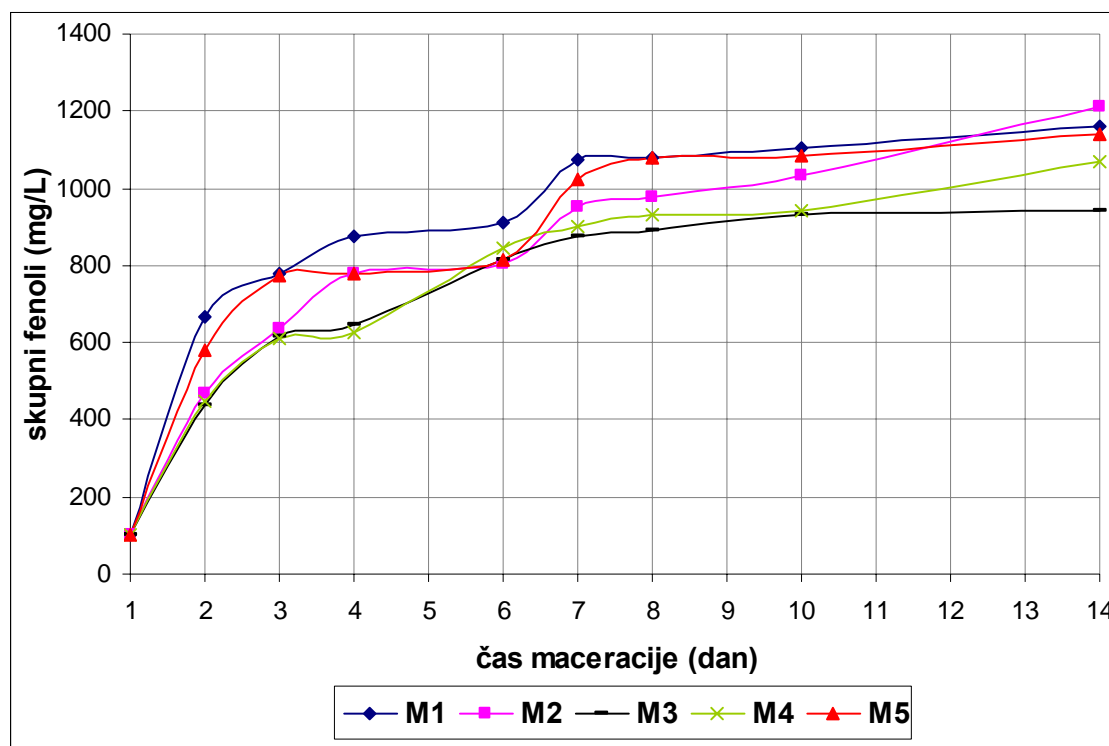
Krivulje na sliki 11 sledijo pričakovanemu trendu naraščanja skupnih fenolov s časom maceracije. Najmanjše vrednosti dosega kontrolni vzorec (1091 mg/L), največje pa vzorec R3 (1531 mg/L). Krivulja vzorca R1, kjer nismo dodali encimskega preparata, poteka po srednjih vrednostih.



**Slika 12:** Vsebnost skupnih fenolnih spojin med maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev

Vsebnost skupnih fenolov med maceracijo vzorca cabernet sauvignon prikazujejo krivulje na sliki 12. Trend gibanja skupnih fenolov je skladen s pričakovanji, z izjemo platoja, ki se pojavi po tretjem dnevu in traja do približno petega dne. Ta pojav bi lahko povezali z istočasno upočasnjeno fermentacijo. Kljub hitremu naraščanju najmanjše vrednosti doseže vzorec CS2 (1836 mg/L). Najpočasneje narašča krivulja CS1. Največjo vsebnost skupnih fenolov doseže vzorec CS3 (2156 mg/L). Kontrolni vzorec v primerjavi z ostalimi doseže srednje vrednosti (2066 mg/L).



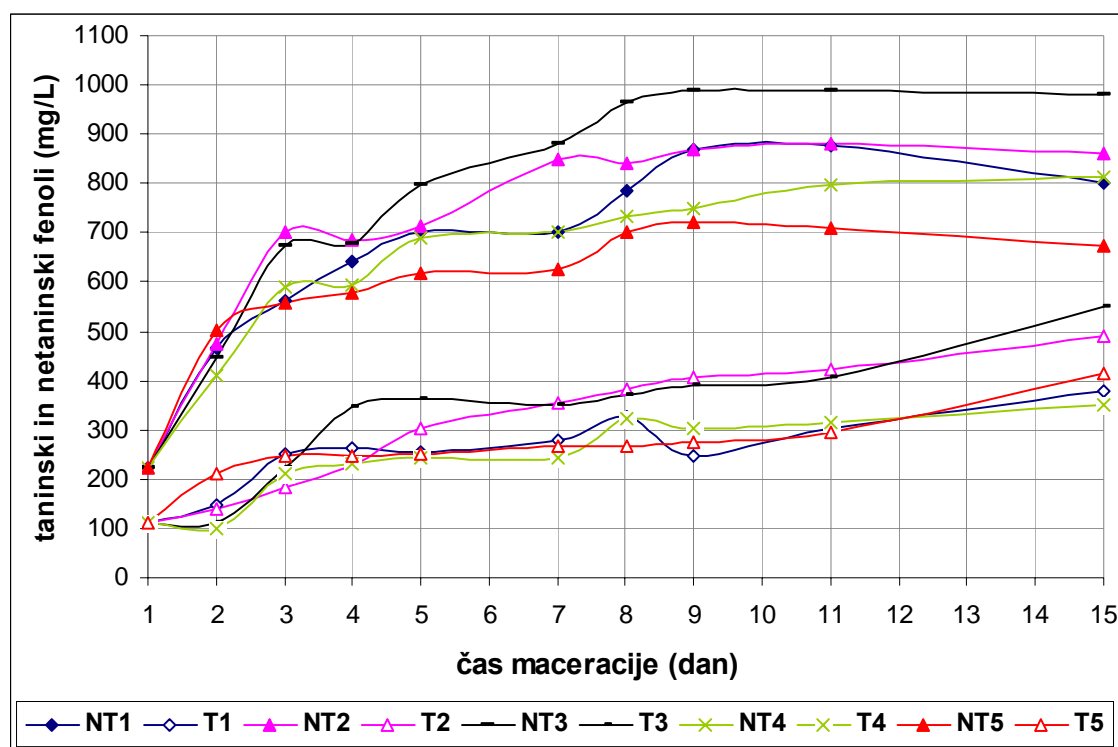


**Slika 13:** Vsebnost skupnih fenolnih spojin med maceracijo vzorca sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev

Slika 13 prikazuje naraščanje vsebnosti skupnih fenolov z vmesnim platojem v vseh petih vzorcih merlota. Plato nastane po tretjem dnevu in je enako kot pri vzorcih cabernet sauvignona lahko posledica zunanjih vplivov. Največjo vsebnost skupnih fenolov doseže vzorec M2 (1211 mg/L), čeprav vsebnost ne narašča najhitreje. Vzorec M3 narašča najpočasneje in doseže tudi najmanjšo vrednost (941 mg/L). Krivulja kontrolnega vzorca se drži sredine in zopet doseže srednje vrednosti skupnih fenolov. V prvem delu maceracije (do sedmega dneva) najhitreje narašča krivulja M1 in ob koncu doseže koncentracijo skupnih fenolov 1161 mg/L.

Vsi trije grafi (slike 11, 12 in 13) prikazujejo podoben trend gibanja skupnih fenolov. V začetnih dneh maceracije vsebnosti skupnih fenolnih snovi močno naraščajo, po dosegu določene vrednosti pa je trend naraščanja manjši.

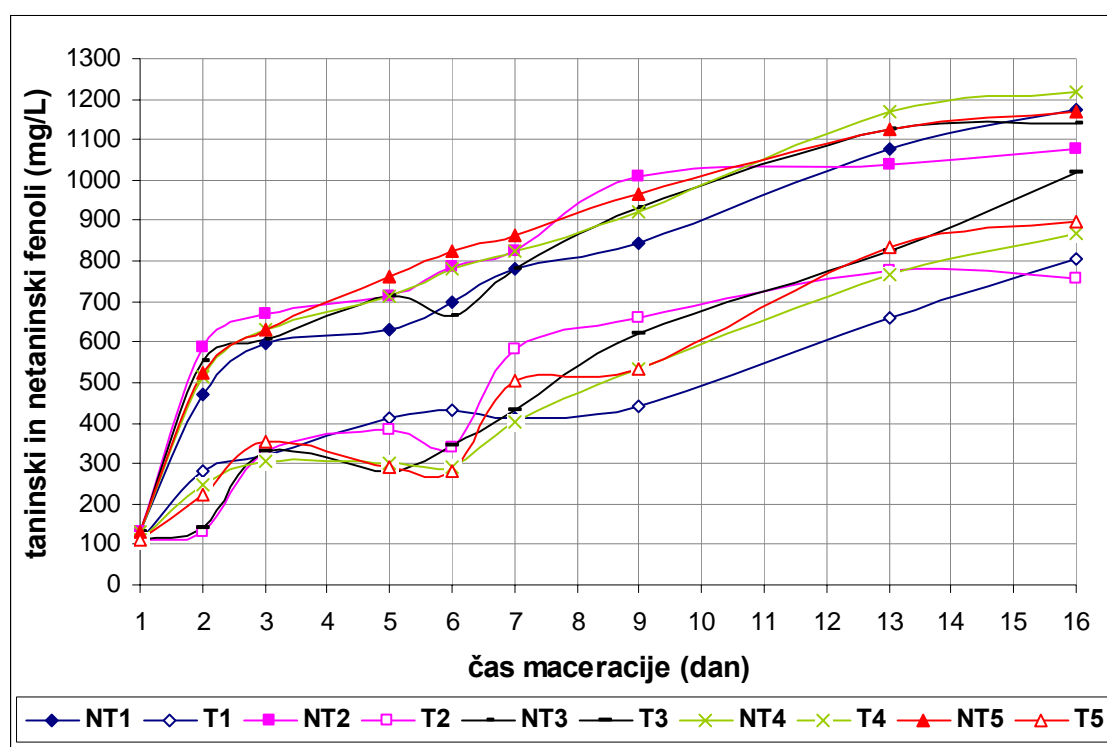
#### 4.3 SPREMLJANJE VSEBNOSTI TANINSKIH IN NETANINSKIH FENOLOV MED MACERACIJO



**Slika 14:** Vsebnost taninski in netaninskih fenolov med maceracijo vzorca sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev (Legenda: NT-netaninski fenoli, T-taninski fenoli)

Slika 14 prikazuje ekstrakcijo taninski in netaninskih fenolov med maceracijo vzorcev refoška. Vse krivulje ves čas maceracije nakazujejo trend naraščanja vrednosti. Vsebnost tako taninov kot netaninov se najhitreje povečuje v vzorcu R3. Tudi po končani maceraciji smo največ taninov in netaninov opazili v vzorcu R3 (551 mg/L in 990 mg/L).

Vsebnost netaninov najpočasneje narašča v kontrolnem vzorcu (R5), kjer je po devetem dnevu opazno celo zmanjševanje vrednosti, ki traja do zadnjega dne maceracije. Tako smo po končani maceraciji določili v vzorcu R5 675mg/L netaninskih fenolov. V vzorcih R1, R4 in R5 poteka izluževanje taninov približno enako hitro, a kljub temu določimo po končani maceraciji najmanjšo vrednost taninov v vzorcu R4 (349 mg/L), kontrolni vzorec pa doseže srednjo vrednost (416 mg/L).

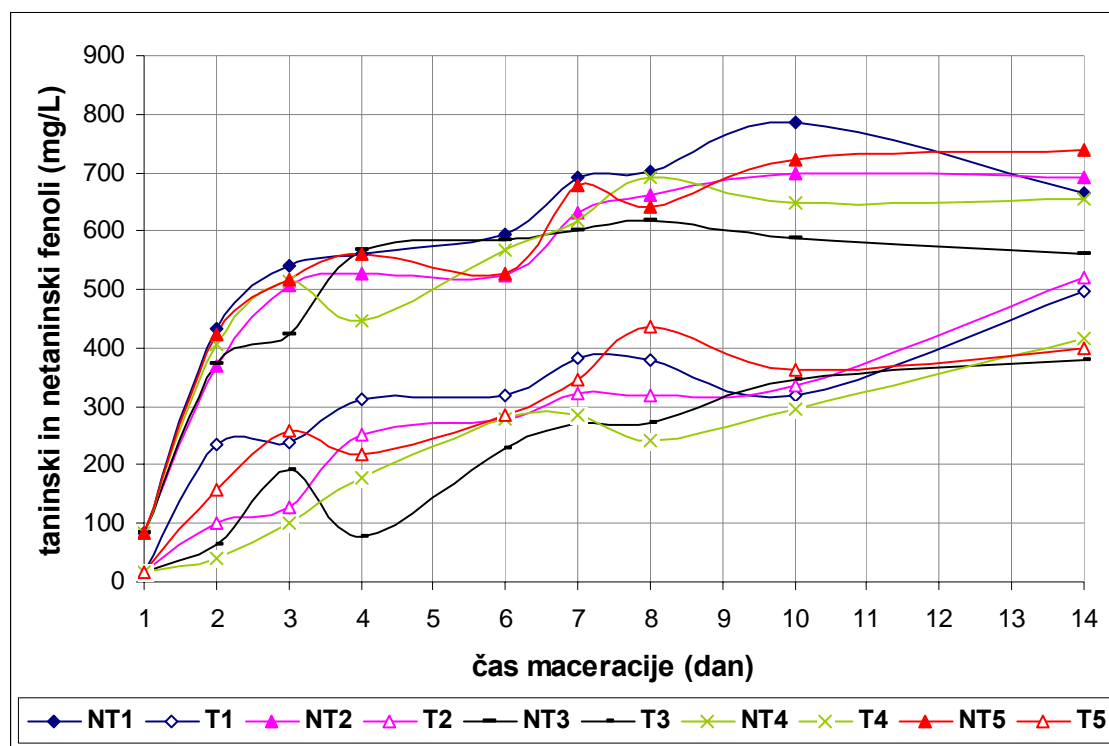


**Slika 15:** Vsebnost taninskih in netaninski fenolov med maceracijo vzorca cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev (Legenda: NT-netaninski fenoli, T-taninski fenoli)

Vsebnost ekstrahiranih taninskih in netaninskih fenolov (slika 15) v vzorcih cabernet sauvignona ves čas maceracije narašča.

Po približno tretjem dnevu pride do majhne upočasnitve ekstrakcije oziroma v vzorcih CS3, CS4 in CS5 celo do zmanjšanja vsebnosti taninov. Po sedmem dnevu hitrost ekstrakcije zopet naraste. Največjo vrednost taninov ob koncu maceracije doseže vzorec CS3 (1018 mg/L), najmanjšo pa CS2 (758 mg/L). V vzorcu CS2 vsebnost taninov do enajstega dne najhitreje narašča potem pa se do zadnjega dne zmanjšuje.

Vrednosti netaninskih fenolov se s časom maceracije konstantno povečujejo, razen šesti dan v vzorcu CS3, kjer pride do majhnega zmanjšanja v vsebnosti. Ob koncu maceracije smo največ netaninov določili v vzorcu CS4 (1218 mg/L), najmanj pa vzorcu CS2 (1078 mg/L). Vsebnost netaninskih fenolov v kontrolnem vzorcu v nasprotju s pričakovanji v začetku zelo hitro narašča. Na koncu maceracije krivulja kontrolnega vzorca doseže srednjo vrednost (1168 mg/L).



**Slika 16:** Vsebnost taninskih in netaninskih fenolov med maceracijo vzorca sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev (Legenda: NT-netaninski fenoli, T-taninski fenoli)

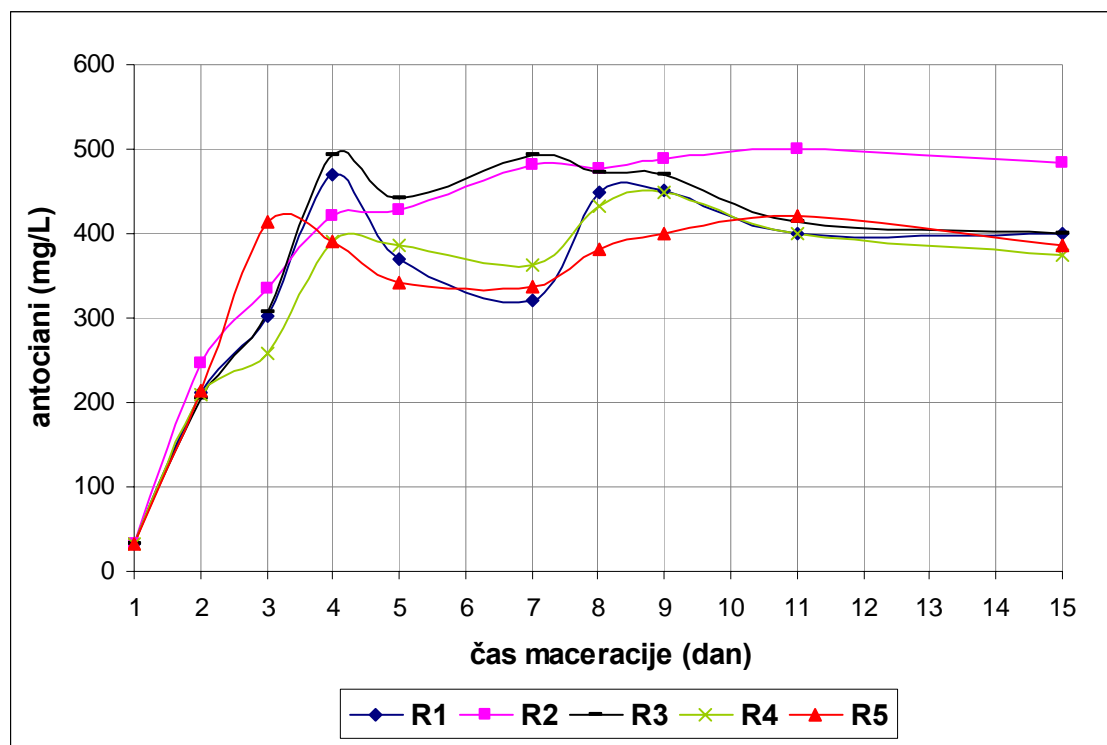
Krivulje na sliki 16 prikazujejo počasen trend naraščanja taninskih in netaninskih fenolov. Najmanj taninov v zadnjem dnevu maceracije doseže vzorec M3 (381 mg/L). V vzorcu M3 vsebnost taninov tudi najpočasneje narašča in po tretjem dnevu je opazno nepričakovano zmanjšanje vsebnosti taninov. Zadnji dan maceracije smo največ taninov določili vzorcu M2 (521 mg/L), čeprav je hitrost naraščanja med maceracijo v primerjavi z ostalimi vzorci povprečna.

Tudi med netaninskimi fenoli najmanjšo koncentracijo ob koncu maceracije doseže vzorec M3 (561 mg/L), njegova koncentracija v vzorcu se po osmem dnevu zmanjšuje. Kontrolni vzorec (M5) doseže največjo koncentracijo netaninskih fenolov (740 mg/L), čeprav je naraščanje koncentracije v vzorcu M1 hitrejše.

#### 4.4 SPREMLJANJE VSEBNOSTI ANTOCIANOV MED MACERACIJO

Pri antocianinih nismo opazili eksponencialne oblike ekstrakcijske krivulje. Ekstrakcijska krivulja antocianov na začetku hitro in strmo narašča, doseže maksimalno vrednost in se nato počasi zmanjšuje proti koncu alkoholnega vrenja. Ena izmed možnih razlag je izredno hitra ekstrakcija na začetku, kateri sledi počasno zmanjšanje koncentracije zaradi vzpostavitve sekundarnega ravnotežja vključenih barvil, etanola in drugih komponent. Ena izmed možnih skupin združevanja (gre za tvorbo parov), ki je lahko vključena v tako

zaporedje, so najverjetneje tanini grozdja, ki so po velikosti dosti večji in sledijo počasnejši (dvostopenjski) obliki ekstrakcijskega modela (iz pečk in kožic) (Košmerl in sod., 2001).

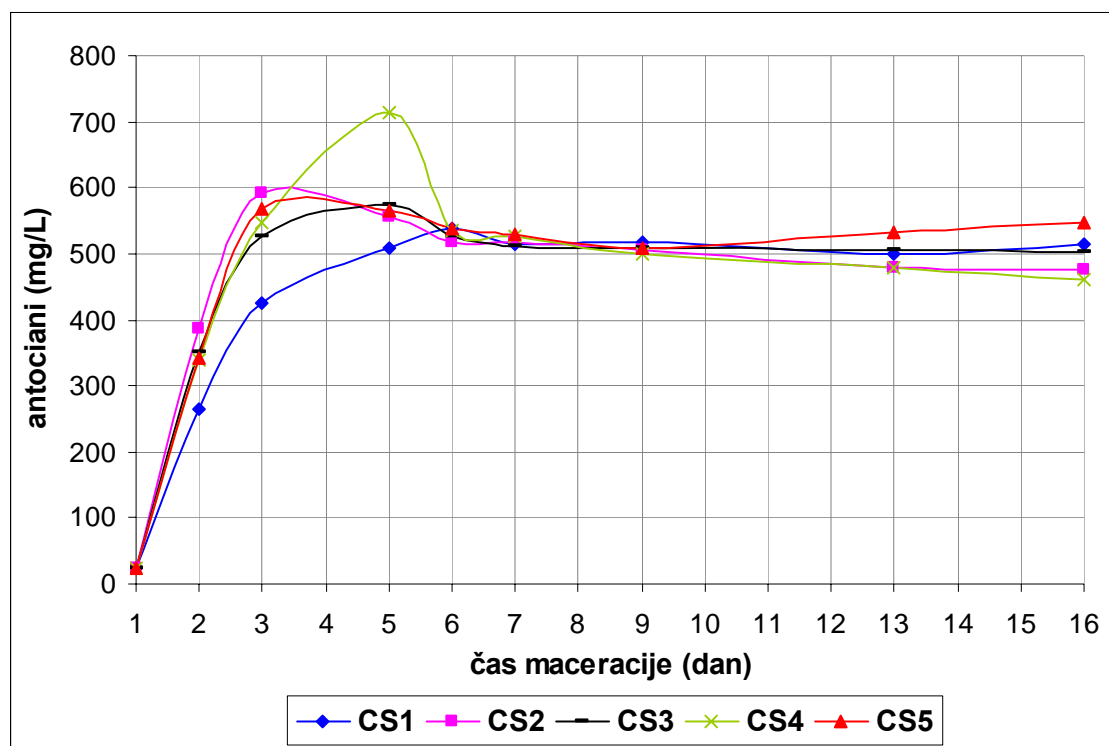


**Slika 17:** Vsebnost antocianov med maceracijo vzorca sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev

Ekstrakcijske krivulje antocianov vzorca refošk na začetku hitro in strmo naraščajo, po tretjem oziroma četrtem dnevu se zmanjšujejo, nato zopet naraščajo in dosežejo vrh od sedmega do enajstega dne. V začetku najhitreje narašča in tudi doseže najvišjo vrednost antocianov (500 mg/L) vzorec R2, vendar šele enajsti dan maceracije. Krivulja kontrolnega vzorca v nasprotju s pričakovanji v začetku zelo strmo narašča, a kljub temu doseže ob koncu maceracije vrednost primerljivo z najmanjšo doseženo vsebnostjo antocianov 374 mg/L (R4).

Zadnji (petnajsti) dan maceracije smo največ antocianov določili v vzorcu R2 (485 mg/L), najmanj pa v R4 (374 mg/L). V ostalih treh vzorcih R1, R3 in R5 so vrednosti antocianov ob koncu maceracije med seboj primerljive.

V prvem delu maceracije do vključno četrtega dne, krivulje na sliki 17 sledijo trendu gibanja antocianov iz literarnih podatkov (Košmerl in sod., 2001). Od četrtega dne dalje pa je potek krivulj zelo različen in je rezultat pestrih reakcij antocianov. Najbolj zanimiv potek krivulje je pri vzorcu R2, kjer se opazno konstantno vzdržuje visoka koncentracija antocianov do konca maceracije.

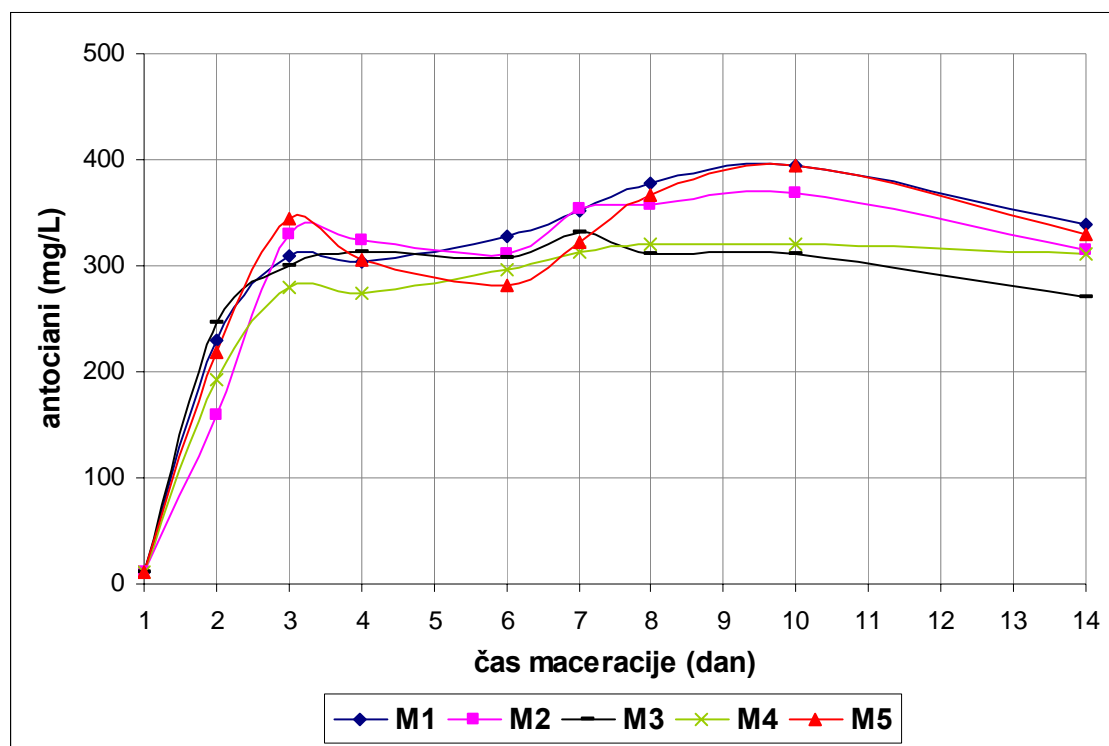


**Slika 18:** Vsebnost antocianov med maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev

Slika 18 predstavlja ekstrakcijski model antocianov vzorcev cabernet sauvignona. Krivulje v prvem delu maceracije strmo naraščajo, od tretjega do šestega dneva dosežejo vrh in se počasi zmanjšujejo. Najhitreje narašča krivulja CS2, ki doseže vrh že tretji dan maceracije. Tretji dan maceracije je dosegel maksimalno vsebnost antocianov še vzorec CS5. Največjo vrednost doseže krivulja CS4 (714 mg/L) peti dan maceracije. Najmanjšo vrednost antocianov (539 mg/L) smo določili šesti dan vzorcu CS1.

Ob koncu maceracije smo največ antocianov določili v kontrolnem vzorcu (CS5), najmanj pa v vzorcu CS4, kjer smo v času vrha ekstrakcije antocianov opazili največjo vsebnost. Krivulja CS4 od tretjega dne dalje najhitreje pada, CS5 pa po devetem dnevu celo narašča.

V primerjavi vzorcev se v kontrolnem vzorcu (CS5) antociani hitro ekstrahirajo in dosežejo visoko vrednost (567 mg/L).



**Slika 19:** Vsebnost antocianov med maceracijo vzorca sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev

Vsebnost antocianov v vzorcih merlota v prvih treh dneh hitro naraste, nato pa je opazno zmanjšanje njihove vsebnosti. Približno deseti dan so opazne najvišje vsebnosti, nato pa se koncentracija zmanjšuje. Največje koncentracije smo določili deseti dan v vzorcih M1 in M5 (394 mg/L), kjer ni dodanih encimskih preparatov. Najmanj antocianov (321 mg/L) je vseboval vzorec M3; to vrednost je dosegel osmi dan. V kontrolnem vzorcu je najhitreje naraščala vsebnost antocianov in dosegla tretji dan največjo vrednost, kar je bilo v nasprotju s pričakovanji.

Zadnji dan maceracije smo največ antocianov določili v vzorcu M1 (338 mg/L), najmanj pa v M3 (271 mg/L). Potek krivulj od dosega vrha pa do konca maceracije kaže na to, da se je koncentracija antocianov v vseh vzorcih merlota enakomerno zmanjševala. Izjema je le vzorec M4, kjer je opazno vzdrževanje konstantne vsebnosti antocianov po dosegu vrha pa do konca maceracije.

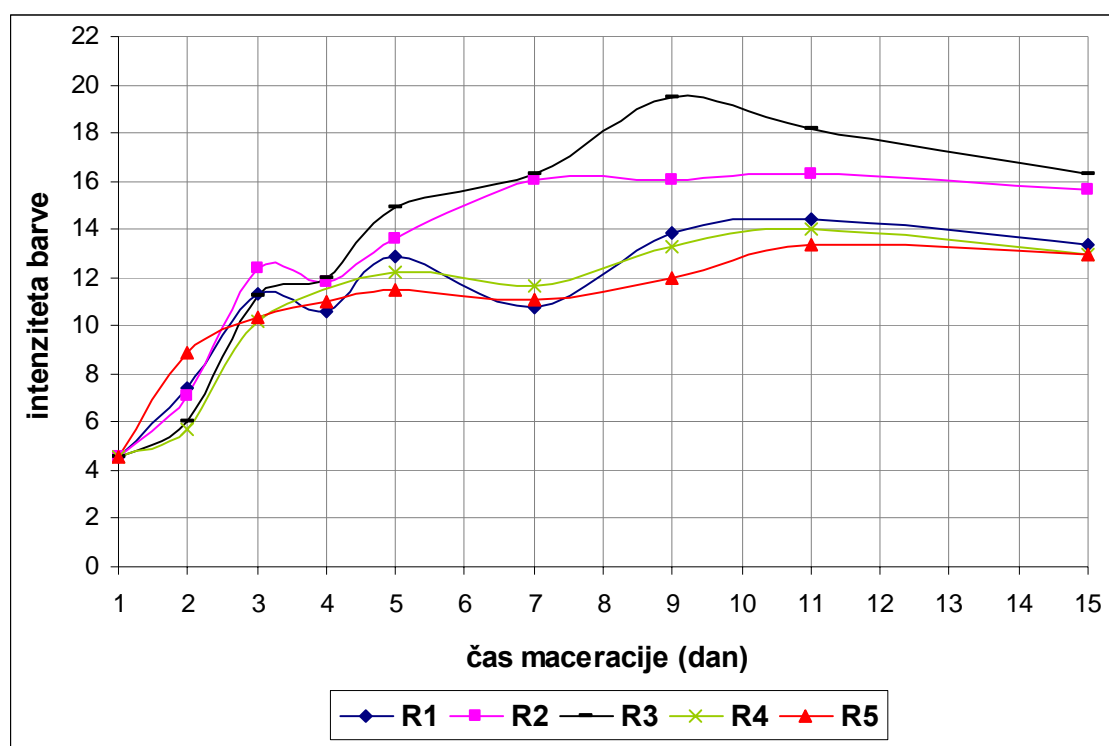
#### 4.5 SPREMLJANJE BARVNIH PARAMETROV MED MACERACIJO

Odvisnost med barvo rdečega vina in vsebnostjo fenolnih spojin je dobro poznana. Rdečo barvo dajejo predvsem antociani oziroma flavilijev kation. V rdečem grozdju so antociani izključno le kot monomeri, a vseeno je intenziteto in ton barve vina težko napovedovati, tudi, če je znana vsebnost antocianov grozdja. Med procesom maceracije se antociani namreč združujejo (kompleksi kopigmentov) in vključujejo v različne reakcije (oksidacija,

kovalentna povezava z drugimi fenolnimi spojinami in sekundarnimi metaboliti kvasovk) (Gutierrez in sod., 2005).

Spekter barve rdečih vin ima maksimum pri 520 nm, kar je odvisno od antocianov in flavilijevih kombinacij ter minimum pri 620 nm. Ton barve je pri mladih vinih 0,5 do 0,7. Delež barvnih snovi v obliki flavilijevega kationa (dAF) za mlada vina je med 40–60 % (Ribereau-Gayon in sod., 2000).

#### 4.5.1 Spremljanje barvnih parametrov pri vzorcih sorte refošk

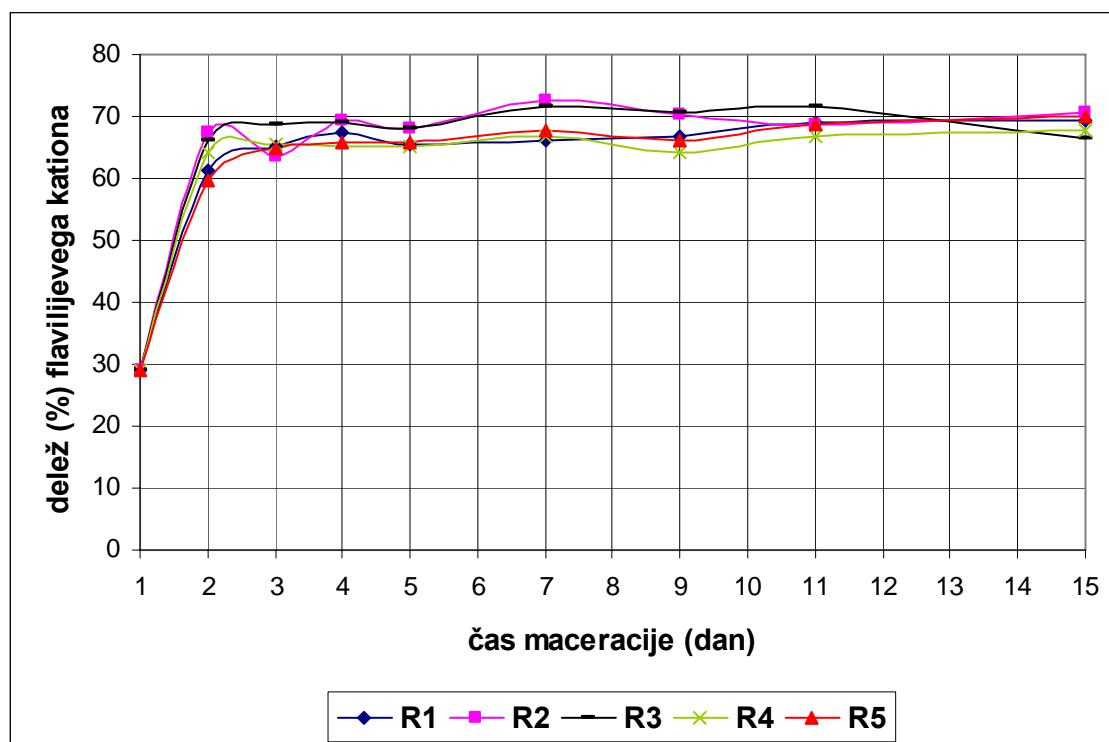


**Slika 20:** Vrednosti intenzitete barve med maceracijo vzorca sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev

Med maceracijo vzorcev refoška je sledil trend gibanja vrednosti intenzitete barve (slika 20) trendu gibanja vsebnosti antocianov (slika 17). Pri R1, R4 in kontrolnemu vzorcu R5 je po petem dnevu opazen plato oziroma rahlo zmanjšanje intenzitete barve, enak pojav smo opazili dan pred tem tudi pri določanju vsebnosti antocianov (slika 17). Krivulji intenzitete barve vzorcev R2 in R3 naraščata dokler ne dosežeta maksimalne vrednosti, potem pa se njuna vrednost zmanjšuje.

Največjo intenziteto barve smo določili deveti dan maceracije v vzorcu R3 (19,5), najmanjšo pa enajsti dan v kontrolnem vzorcu (13,4). Tudi končna intenziteta barve je najmanjša v kontrolnem vzorcu R5, kjer je vrednost primerljiva z vzorcema R1 in R4. Ob koncu maceracije smo največjo intenziteto barve določili v vzorcih R2 in R3, kjer smo pred začetkom maceracije dodali preparata encimov.

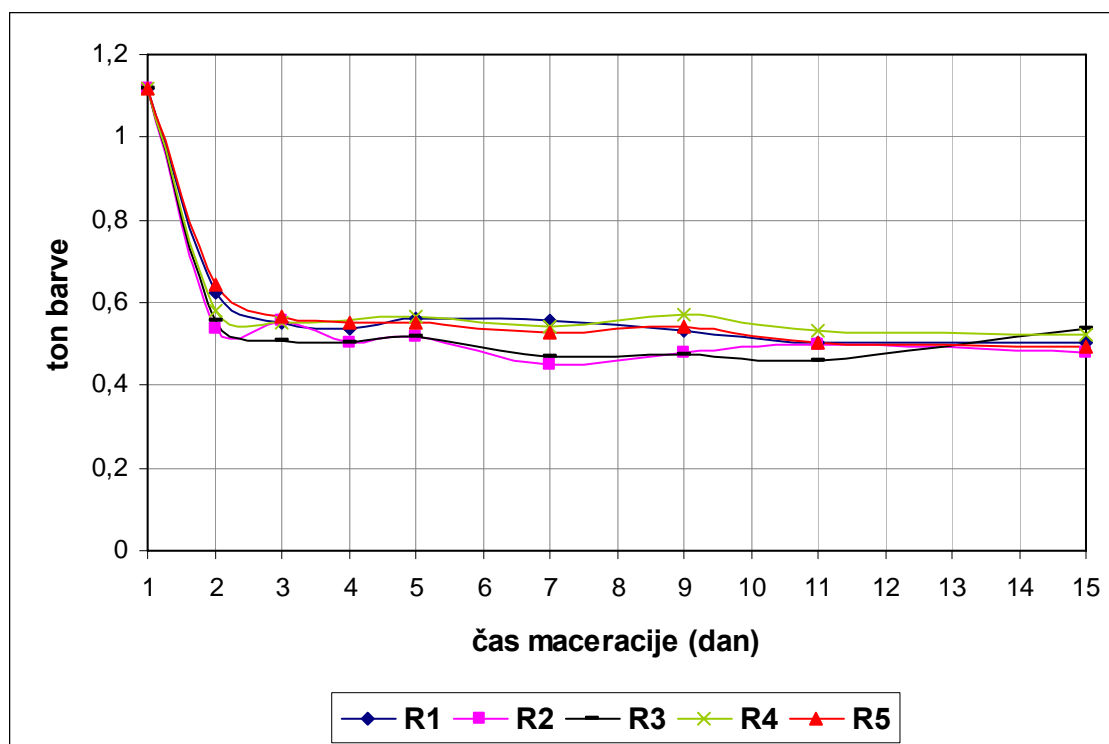




**Slika 21** : Vrednosti deležev (%) flavilijevega kationa med maceracijo vzorcev sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev

Slika 21 prikazuje vrednosti deležev flavilijevega kationa ( $dA_F$ ) med maceracijo vzorcev sorte refošk. Iz slike je razvidno, da je  $dA_F$  najhitreje naraščal do drugega dne maceracije, kjer se v vzorcu R2 poveča kar za 38,5 %. Od drugega dne dalje se je  $dA_F$  povečevala mnogo počasneje do približno sedmega dne, ko doseže vrh, od tukaj naprej pa se vrednost  $dA_F$  počasi zmanjšuje.

Največji  $dA_F$  smo opazili sedmi dan maceracije v vzorcu R2 (72,6 %), kjer smo tudi ob koncu maceracije zabeležili največji  $dA_F$  (70,6 %). Najpočasneje narašča  $dA_F$  v kontrolnem vzorcu, kjer se poveča v drugem dnevu le za 30,7 %. Ob koncu maceracije smo najmanjši  $dA_F$  določili v vzorcu R3 (66,4 %), kjer je po vrhu v enajstem dnevu prišlo do zmanjšanja za 5,2 %. Ob koncu maceracije je razlika  $dA_F$  med vzorcema z največjim in najmanjšim  $dA_F$  le 4,2 %



**Slika 22:** Spremljanje tona barve med maceracijo vzorcev sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev

Zmanjševanje tona barve v vzorcih refoška, predvsem v prvem delu maceracije, lahko opazujemo na sliki 22. Največje zmanjšanje lahko opazimo med prvim in drugim dnevom maceracije, potem pa se vrednosti počasneje zmanjšujejo do konca maceracije. V vzorcih R2 in R3 proti koncu maceracije opazimo manjše povečanje vrednosti tona barve, kar bi lahko pomenilo, da je v vzorcih preveč prostih antocianov in se je odtenek barve v tem času začel spreminjati iz rdeče v rumeno. Povečanje absorbance pri 420 nm je lahko tudi posledica oksidacije fenolnih spojin.

Do največjega zmanjšanja tona barve med maceracijo pride v vzorcu R2, zmanjšuje se vse do sedmega dne, nato pa opazimo manjši porast v vrednosti tona barve. Tudi zadnji dan maceracije smo najmanjši ton barve določili v vzorcu R2 (0,48), kar naj bi pomenilo, da ima ta vzorec najmanjši delež rumeno-rjavih odtenkov. Najpočasneje se ton barve zmanjšuje v vzorcu R4. Ob koncu maceracije najvišjo vrednost tona barve določimo v vzorcu R3 (0,54).

**Preglednica 4:** Vrednosti deležev (%) rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah med maceracijo vzorcev sorte refošk z različnimi dodatki enoloških sredstev

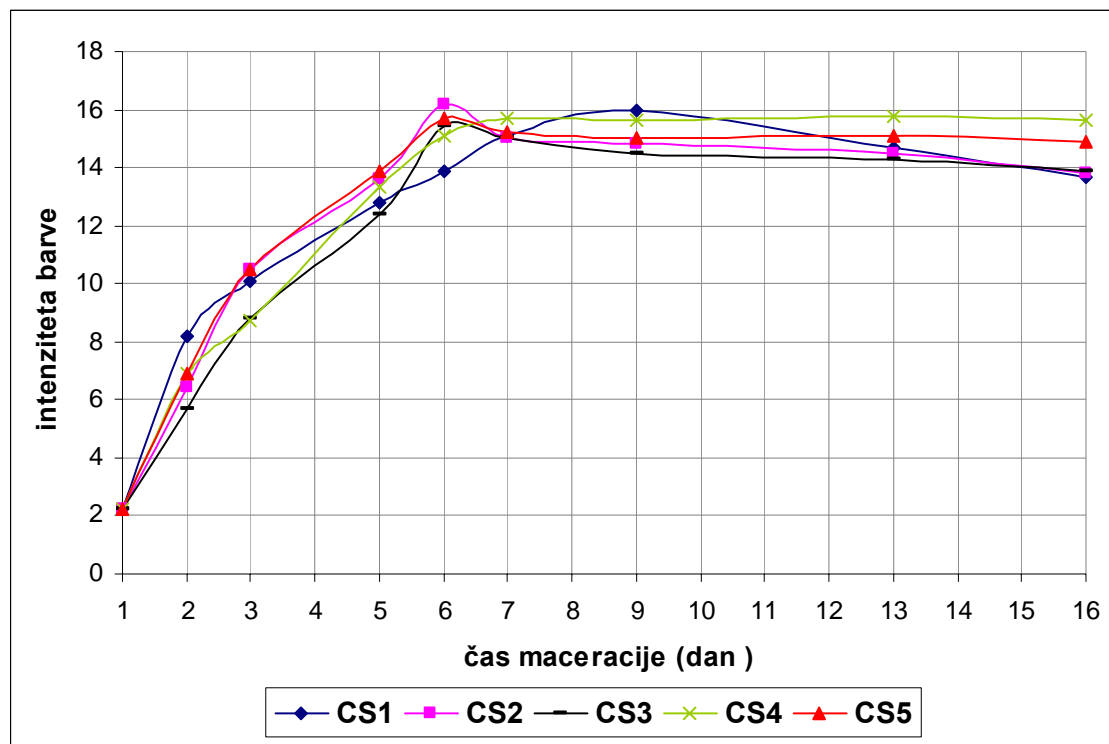
<b>delež (%) barve pri posamezni valovni dolžini</b>															
<b>čas (dan)</b>	<b>dA<sub>420</sub> (%)</b>					<b>dA<sub>520</sub> (%)</b>					<b>dA<sub>620</sub> (%)</b>				
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>
1	45,95	45,95	45,95	45,95	45,95	41,19	41,19	41,19	41,19	41,19	12,62	12,62	12,62	12,62	12,62
2	35,06	32,55	33,21	34,04	32,39	56,36	60,59	59,63	58,41	50,31	8,58	7,01	7,34	7,93	8,28
3	32,65	32,42	31,14	32,74	33,09	58,94	58,15	61,49	59,10	58,64	8,23	9,76	7,36	8,16	8,32
4	32,36	31,07	31,17	/	32,65	60,49	61,88	61,75	/	59,37	7,15	7,05	7,08	/	8,03
5	33,15	31,72	31,61	33,31	32,64	59,10	61,01	60,94	59,02	59,38	7,75	7,27	7,32	7,67	7,99
7	33,24	28,98	30,00	32,45	32,14	59,61	64,61	63,74	60,10	60,93	7,15	6,41	6,32	7,45	6,97
9	32,05	29,93	29,69	33,28	32,39	60,05	62,80	62,87	58,23	59,62	7,94	7,30	7,44	8,49	7,91
11	31,06	30,76	29,51	31,95	30,99	61,64	61,52	63,96	60,05	61,45	7,33	7,78	6,81	8,04	7,56
15	31,16	30,24	31,90	31,97	30,89	62,02	63,03	59,63	61,09	62,39	6,89	6,76	8,22	7,63	6,72

Skladno s predvidevanji je bil delež barve pri vseh vzorcih tekom maceracije, z izjemo prvega dne, največji pri valovni dolžini 520 nm, kjer človeško oko zazna rdečo barvo. Največjo vrednost 64,61 % smo opazili sedmi dan maceracije vzorca R2, v istem vzorcu smo tudi zadnji dan maceracije določili največji delež rdeče barve (63,03 %).

Vrednost deleža barve pri 420 nm, ki nam predstavljajo odtenek rjave barve, se med maceracijo postopoma zmanjšuje. Največji dA<sub>420</sub> smo ob koncu maceracije določili v vzorcu R4 (31,97 %), najmanjši pa v R2 (30,24 %).

Delež barve pri 620 nm, kjer zaznamo modro-vijolične odtenke, se tekom maceracije z občasnimi nihanji zmanjšuje. Največjo vrednost smo ob koncu maceracije izmerili v vzorcu R3 (8,22 %), najmanjšo pa v R5 (6,72 %).

#### 4.5.2 Spremljanje barvnih parametrov pri vzorcih sorte cabernet sauvignon



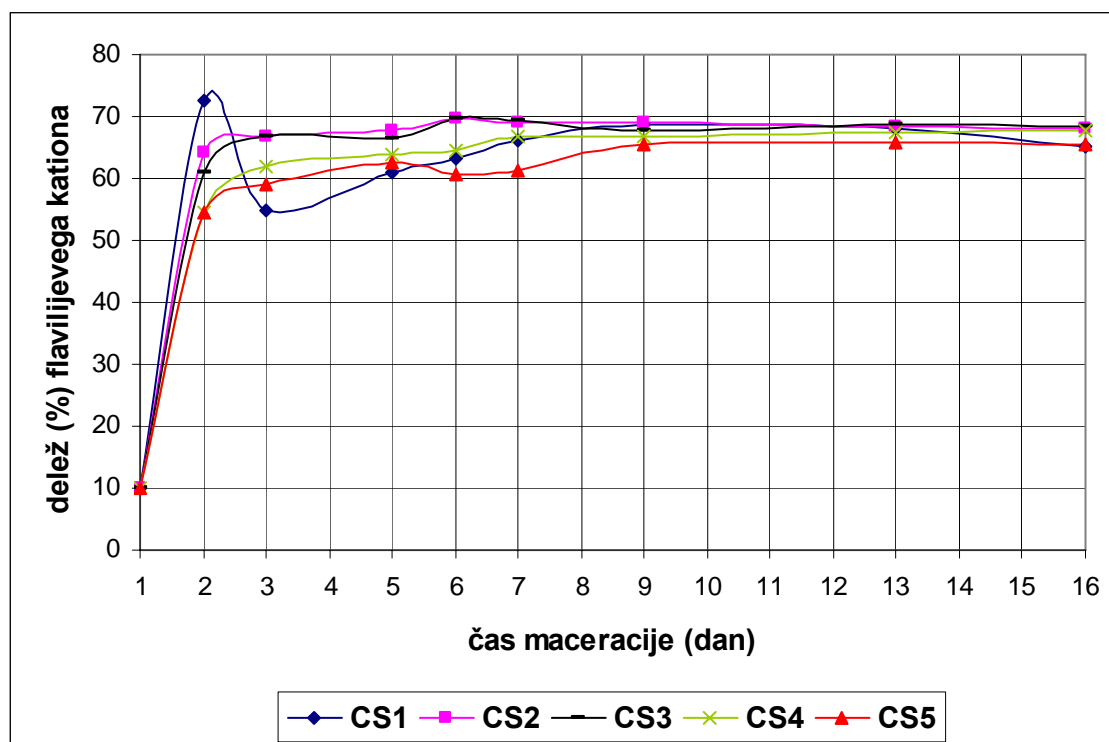
**Slika 23:** Vrednosti intenzitete barve med maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev

Vrednosti intenzitete barve, ki so jih dosegli vzorci cabernet sauvignona, so si zelo podobne. Šesti dan maceracije je dosežena maksimalna intenziteta barve v vseh vzorcih, razen vzorca CS1, ki doseže svoj maksimum deveti dan. Vseeno smo največjo vrednost intenzitete barve (16,2) izmerili v vzorcu CS2 šesti dan maceracije; isti dan smo določili tudi najmanjšo doseženo vrednost 15,4 v vzorcu CS3. V kontrolnem vzorcu vrednost intenzitete barve hitro narašča in šesti dan doseže maksimalno vrednost (15,7).

Ob koncu maceracije smo največjo intenziteto barve izmerili vzorcu CS4 (15,6), v katerem je intenziteta barve od sedmega dne pa do konca maceracije skoraj konstantna (vrednosti se gibljejo med 15,6 in 15,8). Med maceracijo vzorca CS4 trend gibanja vrednosti intenzitete barve ne sledi trendu gibanja vsebnosti antocianov. Vsebnost antocianov (slika 18) namreč v petem dnevu močno naraste, takoj za tem pa se vrednosti kar hitro zmanjšujejo in v zadnjem dnevu dosežejo celo najmanjšo vrednost. S spremljanjem intenzitete barve (slika 23) tega vzorca pa opazimo bolj ali manj konstantno naraščanje vrednosti, ki se od sedmega dne pa do konca maceracije zmanjšajo oziroma povečajo le za 0,6 %.

Najmanjšo vrednost intenzitete barve v zadnjem dnevu maceracije pa je opaziti pri vzorcu CS1, kjer se vrednosti od dosega maksimuma (16,0) hitro zmanjšujejo do vrednosti 13,7 (za 14,4 %). Vrednosti intenzitete barve vzorcev CS2 in CS3 ob koncu maceracije so primerljive z vrednostjo v vzorcu CS1 in se razlikujejo za največ 0,2 vrednosti.

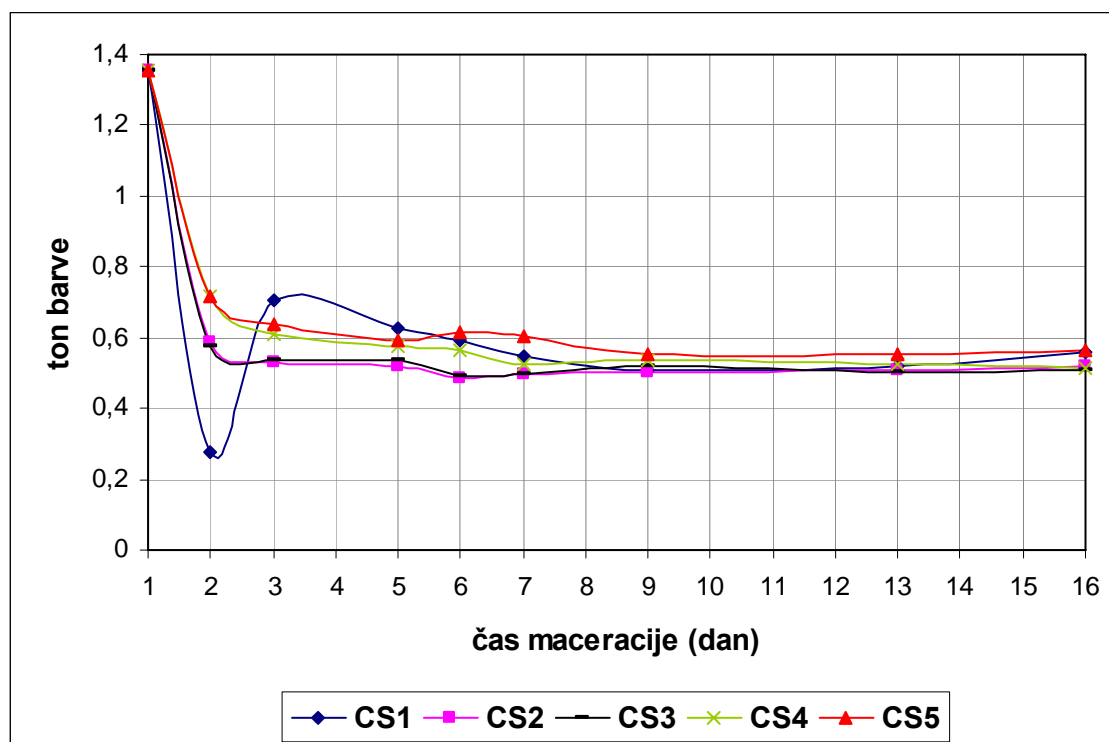
Predvsem nepričakovan je potek krivulje kontrolnega vzorca (CS5). Krivulja v prvem delu strmo narašča, že v šestem dnevu doseže vrh (15,7) in nato se vrednosti počasi zmanjšujejo do konca maceracije. Ob koncu maceracije smo v kontrolnem vzorcu izmerili vrednost intenzitete barve 14,9, kar je le za 4,5 % manj kot v vzorcu z največjo vrednostjo (CS4).



Slika 24: Vrednosti deležev (%) flavilijevega kationa med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev

Med šestnajstdnevno maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon smo opazili bolj ali manj podoben trend gibanja vrednosti deležev flavilijevega kationa (slika 24). V drugem dnevu vrednosti  $dA_F$  močno narastejo (za 44,5 do 62,4 %), se do približno sedmega dne še povečujejo, od tu naprej pa do konca maceracije pa so vrednosti bolj ali manj konstantne in med seboj primerljive. Nekoliko drugačen potek krivulj je opaziti le pri vzorcu CS1, kjer po drugem dnevu pride do zmanjšanja  $dA_F$  za 17,6 %.

Šestnajsti dan maceracije smo največji  $dA_F$  določili v vzorcu CS3 (68,5 %), za 0,3 % manj v vzorcu CS2 in za 0,7 % manj v CS4. Najmanjši  $dA_F$  smo določili v vzorcu CS1 (65,2 %) in za 0,2% večji v CS5.



**Slika 25:** Spremljanje tona barve med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev

V prvem delu maceracije vzorcev sorte cabernet sauvignon lahko opazujemo zmanjšanje tona barve (slika 25), ki se po devetem dnevu nekako ustali do konca maceracije.

Zopet je izjema vzorec CS1, v katerem se ton barve za razliko od ostalih vzorcev v drugem dnevu povečuje do približno tretjega dne. Proti koncu maceracije v istem vzorcu lahko opazimo rahlo povečanje tona barve.

Najmanjši ton barve v zadnjem dnevu maceracije lahko opazimo v vzorcu CS3 (0,508), največji pa v CS5 (0,563) in CS1 (0,561). Večji ton barve pomeni večjo absorbanco pri 420 nm, kar lahko pomeni, da je barva v teh dveh vzorcih proti koncu maceracije nestabilna.

**Preglednica 5:** Vrednosti deležev (%) rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon z različnimi dodatki enoloških sredstev

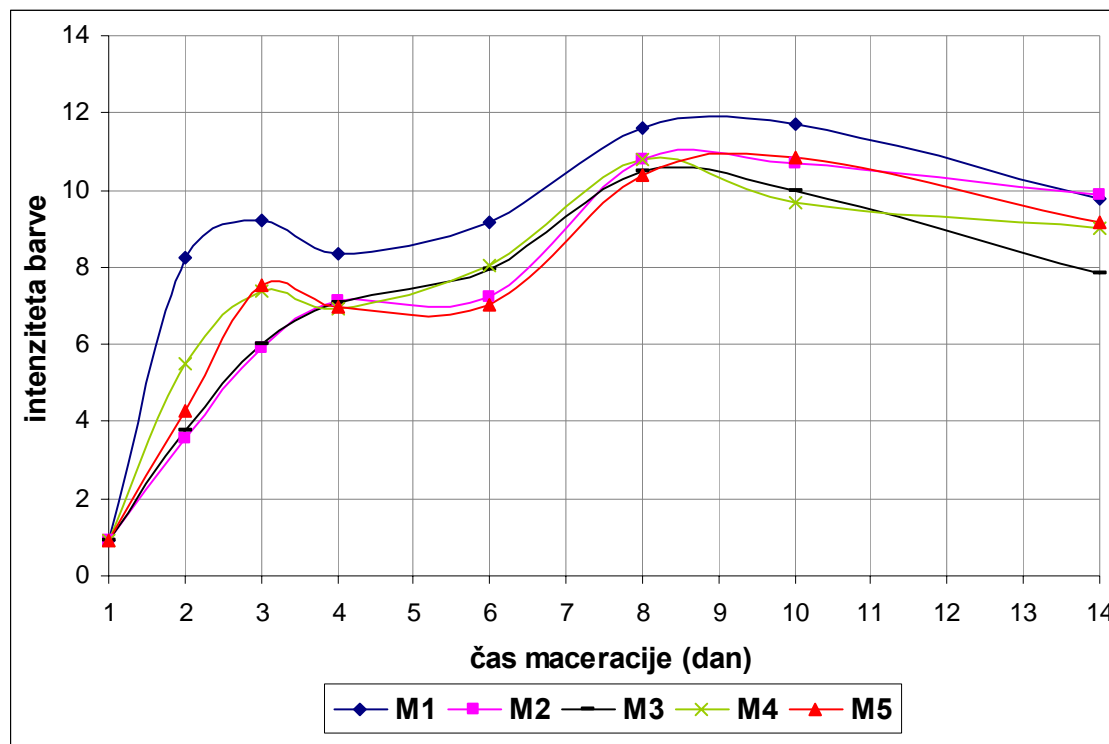
delež (%) barve pri posamezni valovni dolžini															
čas (dan)	dA <sub>420</sub> (%)					dA <sub>520</sub> (%)					dA <sub>620</sub> (%)				
	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5
1	48,64	48,64	48,64	48,64	48,64	35,91	35,91	35,91	35,91	35,91	15,91	15,91	15,91	15,91	15,91
2	12,68	34,22	33,68	37,68	37,68	46,10	58,13	58,77	52,46	52,46	12,68	7,34	12,11	10,14	10,00
3	37,23	32,10	32,27	34,48	35,05	52,77	60,38	60,00	56,78	55,14	10,40	8,00	7,73	8,74	10,10
5	35,16	31,54	32,18	/	33,67	56,33	60,96	60,00	/	56,98	8,91	7,79	7,98	/	9,06
6	33,67	30,37	30,58	32,98	34,33	56,98	62,35	62,14	58,68	55,86	8,20	7,53	7,21	8,54	9,68
7	32,58	30,53	30,60	31,40	34,01	59,80	61,80	61,93	60,06	56,32	7,88	7,60	7,27	8,34	9,47
9	31,31	30,81	31,52	32,31	32,73	61,50	61,49	60,97	60,06	59,20	7,19	7,43	7,79	7,50	8,13
13	31,56	31,10	30,98	31,77	32,91	60,82	61,31	61,33	60,57	59,47	7,28	7,79	7,41	7,59	7,62
16	33,07	31,59	31,22	31,09	33,22	58,91	61,16	61,51	60,90	58,99	7,88	7,32	7,55	8,14	7,65

Iz preglednice 5 je razvidno, da je bil delež rdeče barve pri vseh vzorcih med maceracijo največji pri 520 nm, se pravi v območju, kjer zaznamo rdečo barvo. Izjema je vzorec s prvega dne maceracije, kjer je dA<sub>420</sub> večji od dA<sub>520</sub>. Največja vrednost dA<sub>520</sub> je bila pri CS2 (62,35 %) šesti dan, ki se je nato zmanjševala in zadnji dan dosegla vrednost 61,16 %. Največjo vrednost dA<sub>520</sub> je ob koncu maceracije dosegel vzorec CS3 (61,51 %), najmanjšo pa CS1 (58,91 %).

Končna vrednost deleža barve pri 420 nm, kjer oko zazna rumeno-oranžno barvo, je bila največja pri vzorcih CS5 (33,22 %) in CS1 (33,07 %), najmanjša pa pri CS4 (31,09 %). Pri vseh vzorcih gre v prvem delu maceracije za povečevanje dA<sub>420</sub> in nato zadrževanje bolj ali manj konstantnih vrednosti do konca maceracije, razen v primeru CS1 in CS5, kjer se vrednosti dA<sub>420</sub> proti koncu zopet povečujejo.

Prvi dan maceracije smo zabeležili največji delež dA<sub>620</sub>, od tu naprej proti koncu maceracije pa se je vrednost dA<sub>620</sub> bolj ali manj zmanjševala. Največji delež dA<sub>620</sub> smo na koncu maceracije izmerili v vzorcu CS4 (8,14 %), najmanjši pa CS2 (7,32 %).

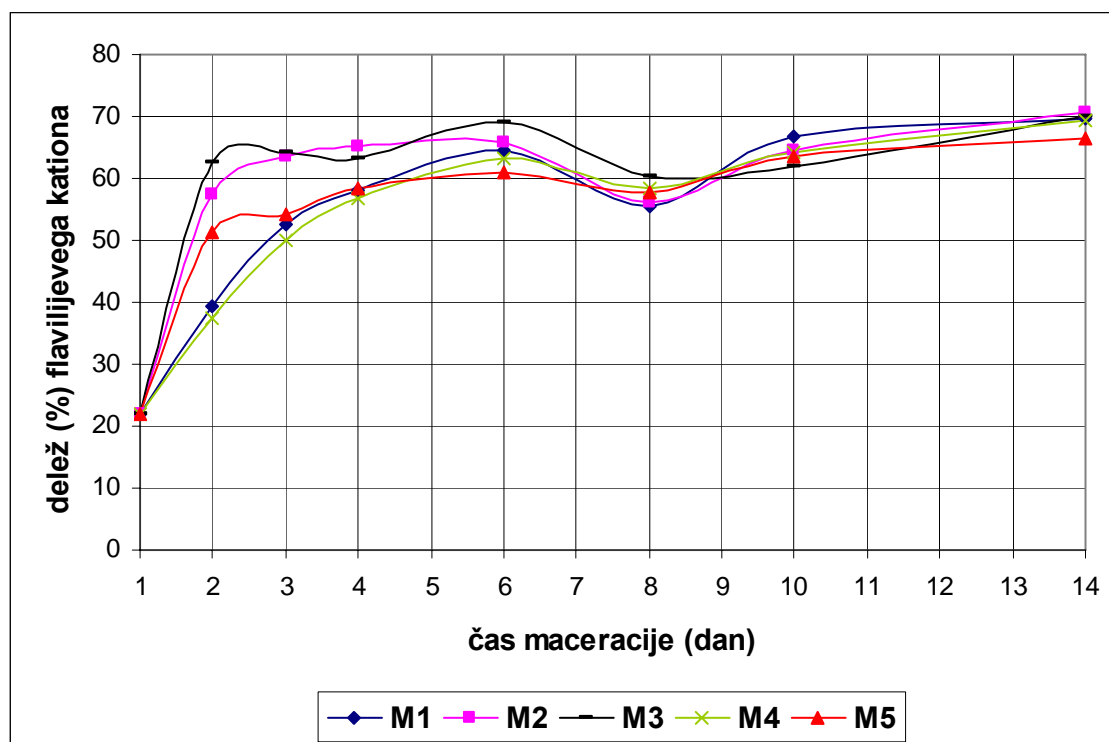
### 4.5.3 Spremljanje barvnih parametrov pri vzorcih sorte merlot



**Slika 26:** Vrednosti intenzitete barve med maceracijo vzorca merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev

Intenziteta barve je zelo povezana z vsebnostjo antocianov. Tako na sliki 26 opazimo prvi vrh krivulj že po tretjem dnevu, potem pa krivulje rahlo padejo in od osmega do desetega dneva maceracije dosežejo svoj maksimum. Največjo vrednost intenzitete barve doseže vzorec M1 (11,7) osmi dan, najmanjšo pa smo določili vzorcu M4 (10,8) enako osmi dan maceracije. V vzorcu M1 je opazno tudi najhitrejše naraščanje vrednosti intenzitete barve že od začetka maceracije, čeprav je končna vrednost primerljiva z vzorcem M2, ki je imel prve tri dni najpočasnejše naraščanje intenzitete barve. Po končni vrednosti sta nadalje primerljiva vzorca M4 in M5, značilno najmanjšo vrednost pa je dosegel vzorec M3.

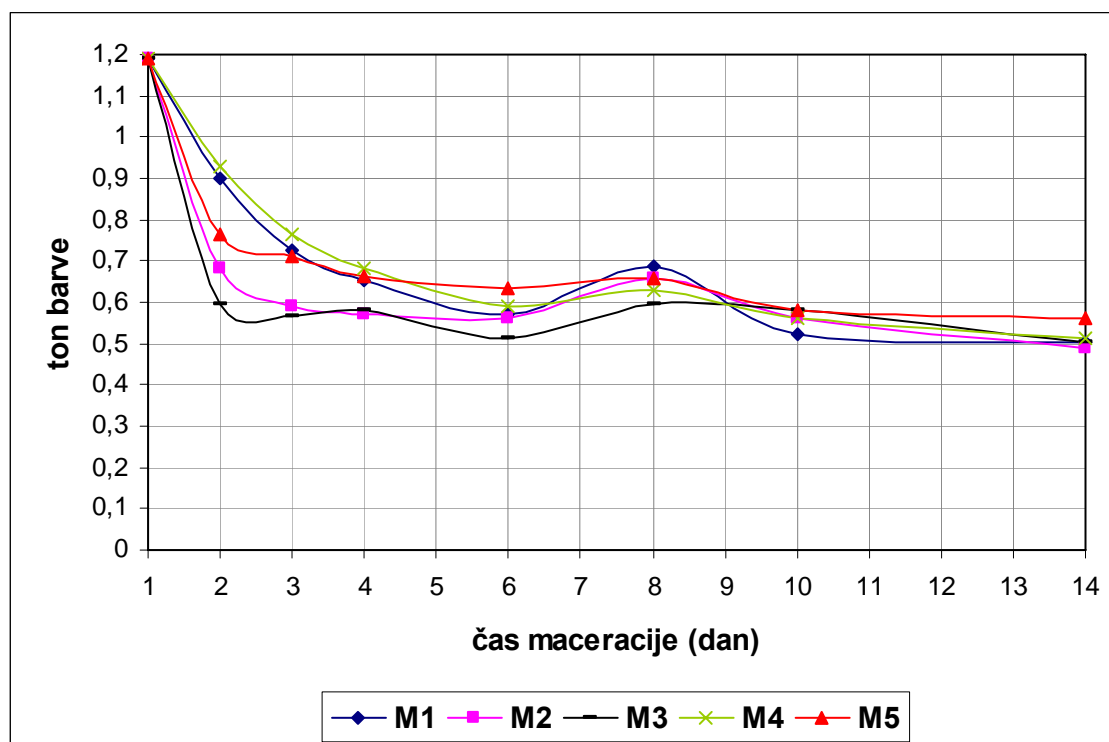




**Slika 27:** Vrednosti deležev (%) flavilijevga kationa med maceracijo vzorcev sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev

Vsem krivuljam na sliki 27 je skupen trend naraščanja v prvem delu maceracije, nenadno zmanjšanje vrednosti  $dA_F$  po šestem dnevu in po osmem dnevu zopet konstantno naraščanje vrednosti  $dA_F$ . Najhitreje narašča krivulja M3, ki ob koncu maceracije doseže vrednost  $dA_F$  primerljivo z vzorcem M2, v katerem smo izmerili največjo vrednost (70,6 %) ter vzorcema M1 in M4. Najmanjšo vrednost  $dA_F$  v štirinajstem dnevu smo izmerili kontrolnemu vzorcu (66,5 %).

Potek krivulj za delež flavilijevga kationa med šestim in osmim dnem je glede na to, da v tem času krivulje dosežejo maksimum v intenziteti barve (slika 26), nepričakovan.



**Slika 28:** Spremljanje tona barve med maceracijo vzorcev sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev

Trend gibanja krivulj vrednosti tona barve sledi hitremu zmanjševanju tona barve v začetku maceracije. Od četrtega dne dalje so vrednosti za ton barve v vzorcih merlota v povprečju konstantne oziroma se počasi zmanjšujejo proti koncu maceracije. Izjema je opazno povečanje tona barve osmega dne v vseh vzorcih merlota. Tak rezultat si lahko razlagamo kot povečanje vsebnosti rjavih odtenkov, ker v istem času pride do maksimuma v intenziteti barve (slika 26) in zmanjšanja deleža flavilijevega kationa (slika 27).

Iz slike 28 je razvidno, da je ob koncu maceracije imel kontrolni vzorec največji ton barve (0,559), najmanjšega pa M2 (0,488), kateremu sta najbolj primerljiva M3 (0,501) in M1 (0,502). V času maceracije pa je imel vzorec M3 v povprečju najnižji ton, najvišjega pa kontrolni vzorec.

**Preglednica 6:** Vrednosti deležev (%) rdeče barve pri posameznih valovnih dolžinah med maceracijo vzorcev sorte merlot z različnimi dodatki enoloških sredstev

<b>delež (%) barve pri posamezni valovni dolžini</b>															
<b>čas (dan)</b>	<b>dA<sub>420</sub> (%)</b>					<b>dA<sub>520</sub> (%)</b>					<b>dA<sub>620</sub> (%)</b>				
	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4</b>	<b>M5</b>
1	46,34	47,38	47,38	47,38	47,38	39,02	39,90	39,90	39,90	39,90	14,63	14,96	14,96	14,96	14,96
2	40,61	36,92	34,31	41,39	38,79	45,21	53,99	57,45	44,48	50,70	14,18	9,23	8,51	14,22	10,51
3	37,27	34,13	33,03	38,13	36,99	51,35	57,89	58,42	49,76	52,16	11,38	7,98	8,63	11,76	10,91
4	35,65	33,59	33,57	36,56	36,31	54,43	58,92	57,55	53,61	54,61	9,93	7,56	8,89	9,83	9,15
6	33,22	33,29	31,55	34,04	35,68	58,39	59,36	61,70	57,73	56,15	8,39	7,35	6,81	8,35	8,24
8	33,45	35,06	33,32	34,35	35,63	48,84	53,25	55,78	54,60	54,31	10,06	11,78	10,95	11,14	10,11
10	31,37	32,88	32,95	32,80	33,55	60,10	58,74	56,86	58,28	57,86	8,53	8,81	10,25	8,97	8,60
14	31,29	30,75	31,33	31,89	33,48	62,37	63,01	62,53	61,90	59,87	6,34	6,29	6,14	6,20	6,65

Zopet nam podatki v preglednici 6 kažejo, da je bil največji delež barve izmerjene pri valovni dolžini 520 nm, razen prvi dan maceracije, ko imamo največji delež pri 420 nm. Kot smo že ugotovili iz podatkov za delež flavilijevega kationa in vrednost tona barve se  $dA_{520}$  v osmem dnevu zmanjša, naraste pa delež  $dA_{420}$  in  $dA_{620}$ . Zmanjšanje rdečega odtenka je povezano z izgubo prostih antocianov. S kopigmentacijo ali kondenzacijo antocianov s tanini, bodisi elagotanini, proantocianidini ali katehini, pa se vijoličen oziroma moder odtenek vina poveča (Perez-Magarino in Gonzalez-SanJose, 2006).

Vrednosti  $dA_{420}$  in  $dA_{620}$  se proti koncu maceracije zmanjšujejo v vseh vzorcih merlota. Končni vrednosti  $dA_{420}$  in  $dA_{620}$  sta največja v vzorcu M5 (33,48 % in 6,65 %), ostali vzorci pa so si med seboj primerljivi. Prav tako vzorec M5 doseže ob koncu maceracije najnižjo vrednost  $dA_{520}$  (59,87 %).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Med maceracijo treh rdečih vinskih sort refošk, merlot in cabernet sauvignon letnika 2004 iz Koprskega vinorodnega okoliša, smo opazovali vpliv dodatka različnih enoloških sredstev na kinetiko ekstrakcije fenolnih spojin. Dnevno smo določali vsebnost skupnih fenolov, taninskih in netaninskih fenolov, antocianov ter vrednosti barvnih parametrov.

Kot pomoč pri lažji razlagi rezultatov, smo spremljali tudi kinetiko fermentacije. Dnevno smo vsakemu vzorcu izmerili sladkorno stopnjo v °Oe in tako na osnovi zmanjšanja sladkorne stopnje spremljali fermentacijsko kinetiko. V skladu s pričakovanji je hitrost fermentacije najpočasneje potekala v vzorcih spontane fermentacije (vzorci z oznakami R5, CS5 in M5). Oblike fermentacijskih krivulj vseh vzorcev so si med seboj zelo podobne. Najbolj burna fermentacija je v vseh vzorcih potekala tam, kjer smo dodali le kvasovke in hrano za kvasovke, ki smo jo dodali že v rehidracijsko vodo (oznake R1, CS1 in M1).

Slike 11, 12 in 13 prikazujejo **vsebnost skupnih fenolov** med maceracijo. V vzorcih vseh treh sort koncentracija skupnih fenolov je s časom maceracije narašča, kar je v skladu z literaturnimi podatki (Klenar in Vrščaj, 2001).

Glede na dobljene rezultate ugotavljamo, da je vpliv dodatka enoloških sredstev na ekstrakcijo skupnih fenolov sortno pogojen. Pričakovane rezultate smo namreč dobili samo v vzorcu refoška. Drozga refoška (oznaka R3), ki smo ji dodali poleg kvasovk in hranila še encimski preparat, je dosegla najvišjo stopnjo ekstrakcije skupnih fenolov, le za 11,8 % manjšo stopnjo ekstrakcije pa smo zabeležili v vzorcu z oznako R2. Najmanj ekstrahiranih polifenolov smo določili v vzorcu spontane fermentacije in je znašala 28,7 % manj od vzorca R3.

Komercialni encimski preparati naj bi v prvi vrsti vplivali na večjo hitrost ekstrakcije fenolnih komponent (Košmerl, 2002). To dejstvo lahko potrdimo predvsem pri poskusu dodatka encimskih preparatov v vzorec refoška, kjer je opazna večja hitrost ekstrakcije v vzorcih R2 in R3. Hitrost ekstrakcije skupnih fenolnih spojin v vzorcih cabernet sauvignona in merlota pa je večja le pri vzorcih CS2 in CS3 med osmim in desetim dnevom, drugače pa je med vzorci primerljiva oziroma pri merlotu v prvih dneh maceracije celo manjša.

Spremljanje **vsebnosti taninskih in netaninskih fenolnih spojin** so prikazane na slikah 14, 15 in 16. Tanini težijo k naraščanju ves čas fermentacije; v začetku bolj počasi, kasneje s povečevanjem alkoholne stopnje pa je ekstrakcija taninov večja (Klenar in Vrščaj, 2001). Podobnost ekstrakcijskih načinov (klasična in podaljšana maceracija) kaže, da se večina taninov ekstrahira med podaljšano maceracijo, saj kot je splošno znano, preidejo lažje in rajši iz pečk kot iz kožic (Košmerl in sod., 2001). Tudi v naših primerih je opazen po približno osmem dnevu maceracije bolj strm potek krivulj.

Dodatek pektolitičnega encima naj bi vplival na boljše izluževanje barvnih spojin, ob hkrati manjši ekstrakciji taninov. Pri vzorcih refoška smo vseeno opazili velik vpliv dodanih encimov na ekstrakcijo taninov (vzorca R2 in R3). V primeru ostalih dveh sort je bila kinetika ekstrakcije taninov pod vplivom dodanih enoloških sredstev drugačna. V vzorcu cabernet sauvignona je dosegel največjo vrednost vzorec z dodatkom encimskega preparata (CS3), vendar je ekstrakcija v vzorcu, v primerjavi z vzorci CS2, CS5, CS4 in CS1, potekala približno enako hitro. Med osmim in enajstim dnevom se je ekstrahiralo največ taninov v vzorcih CS2 in CS3. Med vzorci merlota je do najmanjše ekstrakcije taninov prišlo v vzorcu M3, največje pa v vzorcu M2, vendar je ekstrakcija potekala primerljivo hitro ostalim vzorcem in je večjo vrednost dosegla šele zadnji dan.

Iz literaturnih podatkov (Klenar in Vrščaj, 2001) naj bi ekstrakcijske krivulje za **antociane** v začetku hitro naraščale, dosegle vrh in se nato počasi zmanjševale do konca fermentacije. V našem poskusu pa smo pri vzorcih refoška (slika 17) in merlota (slika 19) opazili nastanek vrha, vmesni plato in zopet naraščanje koncentracije antocianov. Podobne oblike krivulj se odražajo tudi v določanju vrednosti intenzitete barve. Vsebnost antocianov in vrednost intenzitete barve sta nesporno v tesni povezavi, neobičajen potek krivulj v vzorcih merlota in refoška pa si lažje razložimo z ostalimi podatki o barvnih parametrih (delež rdeče barve v obliki flavilijevega kationa, ton barve in deleži barve pri posameznih valovnih dolžinah).

Učinek dodatka preparata encima na kinetiko ekstrakcije antocianov najbolj sledi našim predvidevanjem v primeru vzorca refoška. Krivulja R2 doseže vrednost 500 mg/L vendar šele v enajstem dnevu maceracije, kar ne potrjuje naših predvidevanj o hitrejši ekstrakciji antocianov zaradi dodatka istega preparata encima. Štiri dni pred tem je dosegel vzorec R3 samo 1,2 % manjšo vrednost antocianov, vendar se je vrednost do zadnjega dne maceracije zmanjšala kar za 19,2 %, v primeru vzorca R2 pa le za 3 %. Tako R2 daje ugodnejše rezultate, saj se kljub le malo počasnejši ekstrakciji (v času maksimuma vzorca R2 je bila koncentracija antocianov v vzorcu R2 le 2,4 % manjša od koncentracije v R3), konstantna koncentracija antocianov se je vzdrževala od doseženega vrha pa vse do konca maceracije.

Pri vzorcih merlota in cabernet sauvignona ne moremo potrditi dejstva, da encimski preparati vplivajo na hitrejšo in boljše ekstrakcijo antocianov. Med vzorci cabernet sauvignona je dosegel vzorec CS4, kjer smo dodali poleg kvasovk in osnovnega hranila še dodatno hranilo, največje vrednosti. Tudi ta pojav je nejasen, saj močno odstopa od ostalih vzorcev cabernet sauvignona in se v vrednostih intenzitete barve pokaže kot povprečen. Vrednosti ob koncu maceracije so si povsem primerljive. Krivulje, ki kažejo ekstrakcijo antocianov v vzorcu merlota, zelo pozno dosežejo vrh (približno 10. dan) in ne kažejo nobene prednosti v dodatku encimskih preparatov, saj največje vrednosti dosežeta vzorca M5 in M1 (spontana fermentacija in vzorec, kateremu smo dodali le kvasovke in osnovno hranilo). Med vzorci merlota je dal najbolj zanimiv rezultat glede ekstrakcije antocianov vzorec M4, kjer se je dosežena maksimalna vsebnost vzdrževala do konca maceracije. V zadnjem dnevu je bila vsebnost le za 5,5 % manjša kot v M5.

Kot smo že večkrat omenili, ima vsebnost antocianov velik vpliv na **barvo** rdečih vin (Bolton, 2001). Trend gibanja intenzitete barve naj bi sledil trendu gibanja vsebnosti antocianov pri posamezni sorti. Tako smo pri vzorcih refoška R3 in R2 dobili največje

vrednosti intenzitete barve ob dodatku encimskih preparatov (19,5 in 16,3). Najvišjo vrednost sta vzorca z dodatkom encima dosegla dva dni pred ostalimi, kar potrjuje dejstvo, da z dodajanjem encima lahko dosežemo hitrejšo ekstrakcijo barvnih komponent. Primernejše rezultate smo vseeno opazili v vzorcu R2, saj je imel višji delež rdečih barvil v obliki flavilijevega kationa in manjši ton.

Iz slike 23 je razvidno, da v primeru vzorca CS4 ni prišlo do enakega povečanja v intenziteti barve kot na sliki 18 kjer je prikazana kinetika ekstrakcije antocianov istega vzorca. Iz tega lahko sklepamo, da sta si intenziteta barve in vsebnost antocianov le v navidezni odvisnosti. Ne glede na začetno kinetiko, v primeru vzorca CS4 dobimo najbolj stabilno barvo. Intenziteta barve je bila namreč od šestega dne dalje konstantna in tudi končna vrednost je značilno največja. Tudi ostali barvni parametri so ostali do konca maceracije konstantni.

Vrednosti intenzitete barve v vzorcih merlota se navezujejo na rezultate za vsebnost antocianov in tako je največjo vrednost dosegel osmi dan maceracije vzorec M1, v katerega smo dodali samo kvasovke in osnovno hranilo. Isti vzorec je tudi med celotno maceracijo kazal trend najhitrejšega naraščanja vrednosti intenzitete barve, vendar je bila barva nestabilna in se od osmega pa do zadnjega dne zmanjša za 16,2 %. Končna vrednost je bila večja pri vzorcu M2, kjer se je intenziteta barve po dosegu maksimalne vrednosti do konca maceracije zmanjšala le za 8,3 %.

V drozgi refoška in merlota smo najvišjo vrednost intenzitete barve določili v fazi maceracije z alkoholno fermentacijo, v postfermentativni fazi pa se je njihova vrednost kar hitro zmanjševala. V vzorcih cabernet sauvignona (slika 23) je vrednost intenzitete barve sicer dosegla vrh med fazo fermentacije, vendar so se vrednosti dolgo časa vzdrževale oziroma veliko počasneje zmanjševale, kar je tehnološko zelo ustrezno in želeno. Posebno obliko krivulje je opaziti pri vzorcu CS4, kjer smo poleg kvasovk in osnovnega hranila dodali še poseben preparat hranila, priporočljiv za dodajanje med pridelavo rdečih vin. Krivulja CS4 v sedmem dnevu doseže vrh in vzdržuje vrednost intenzitete barve dalj časa, saj se začne rahlo zmanjševati šele v zadnjem, šestnajstem dnevu maceracije.

V drozgo vzorca CS4 smo pred začetkom maceracije dodali hranilo za kvasovke, ki vsebuje inaktivno kvasno biomaso oziroma kulturo kvasovk. Lastnost omenjenega preparata je v dobrem sproščanju polisaharidov iz celičnih membran kvasovk. Tako preparat omogoča tvorbo kompleksov med polisaharidi in polifenoli takoj, ko so le-ti ekstrahirani. Polisaharidi so sposobni vezati reaktivne tanine in jih zaščititi tako, da reducirajo njihovo reaktivnost z beljakovinami in tako zmanjšajo njihovo grobost. Molekule taninov so prisotne v moštu in vinu v velikih koncentracijah in predstavljajo visoko koloidne tanine. Ti tanini imajo sposobnost, da reagirajo z drugimi molekulami in tvorijo makromolekule, ki so nestabilne in povzročajo usedlino. Sedimentacijo koloidov se lahko prepreči, ko je v mediju dovolj polisaharidov. Zgodnja tvorba kompleksov polisaharidi-polifenoli ima za posledico večjo intenziteto barve, polnost in vezavo taninov. Zato kažejo vina zaščitena s polisaharidi večjo stabilnost pri procesu staranja in manjšo izgubo barve pred stekleničenjem (Lallemand, 2004; OptiRED, 2004).

## 5.2 SKLEPI

- Vsebnost fenolnih spojin in vrednosti barvnih parametrov so sortne značilnosti. Rezultati o vsebnosti fenolnih spojin in barvnih parametrov potrjujejo predvidevanja o največji ekstrakciji teh spojin oziroma vrednosti parametrov pri sorti cabernet sauvignon in najmanjši pri sorti merlot.
- Vpliv enoloških sredstev (encimov in preparatov za boljšo stabilnost barve) na ekstrakcijo fenolnih spojin in stabilnost barve je sortno pogojen.
- Molekule antocianov so kemijsko nestabilne in zato podvržene razbarvanju. Kadar je razmerje med antociani in tanini dovolj veliko (1:4 oziroma 1:10), ti hitro reagirajo in dobimo stabilno rdečo barvo. V primeru poskusa s cabernet sauvignonom smo v vzorcu, kjer smo dodali preparat hranila za kvasovke, ki je vseboval inaktivno kvasno biomaso, dobili zelene rezultate. V drozgi je že med maceracijo prišlo do nastanka kompleksov med polisaharidi in polifenoli. Intenziteta barve tega vzorca se je vzdrževala do konca maceracije. Preparat hranila, namenjen za dodajanje v rdečo drozgo, v vseh ni primeri dal enakega učinka. Podobno se je zgodilo še v vzorcu merlota, le da učinek ni tako izrazit.
- Uporaba pektolitičnih encimov pri maceraciji rdeče drozge vpliva na boljšo in hitrejšo ekstrakcijo barvnih snovi med alkoholno fermentacijo, boljšo ekstrakcijo barvnih snovi med stiskanjem in izboljšanje čiščenje vina. Tudi v našem poskusu maceracije vzorca drozge refoška, smo ob dodatku dveh različnih preparatov pektolitičnih encimov dobili podobne rezultate. Oba preparata sta vplivala na večjo hitrost ekstrakcije barvnih snovi, vendar smo ob dodatku preparata z oznako R2 opazili stabilnejšo barvo, manjši ton in večji delež flavilijevega kationa. Podobno je dodatek preparata v vzorec M2 vplival na večjo stabilnost barve, čeprav učinek kateregakoli dodanega sredstva v vzorec merlota ni kazal izrazitih značilnosti.
- Glede na dobljene rezultate bi bilo pri sorti cabernet sauvignon zanimivo preizkusiti podaljšano maceracijo z dodatkom kombinacije encima in dodatnega hranila, ki stabilizira barvo.
- Podaljševanje časa maceracije pri sortah refošk in merlot ni smiselno, ker nič ne pridobimo oziroma celo izgubimo (vrednost intenzitete barve kmalu doseže vrh, potem pa se zmanjšuje).

## 6 POVZETEK

Pri predelavi rdečih vin je maceracija drozge ena odločilnejših faz vinifikacije. V času njenega trajanja se iz jagodne kožice v vino ekstrahirajo fenolne spojine, katere imajo velik vpliv na senzorične značilnosti, stabilnost in kakovost rdečih vin. Vsaka sorta rdečega grozdja ima drugačno količino posameznih skupnih fenolnih spojin. Enolog na osnovi sorte in kakovosti grozdja ter zelenega karakterja vina, izbere optimalno obliko maceracije rdečega grozdja.

Namen tega diplomskega dela je bil ugotoviti, kako dodatek preparatov hranil in encimov v drozgo vpliva na kinetiko ekstrakcije fenolnih spojin ter stabilnost rdeče barve treh rdečih vinskih sort (refošk, cabernet sauvignon in merlot) iz Koprškega vinorodnega okoliša.

Uporaba pektolitičnih encimov pri maceraciji rdeče drozge naj bi vplivala na boljšo in hitrejšo ekstrakcijo barvnih snovi med alkoholno fermentacijo, boljšo ekstrakcijo barvnih snovi med stiskanjem in izboljšanje čiščenja vina. Uporaba encimov pri maceraciji drozge ima za posledico večjo koncentracijo antocianov, skupnih fenolov, intenziteto in bistrost rdečega vina.

Preparat hranila, namenjenega za dodajanje v rdečo drozgo, vsebuje inaktivno kulturo kvasovk. Njegova uporaba omogoča tvorbo kompleksov med polisaharidi in polifenoli takoj, ko so le-ti ekstrahirani med maceracijo, kar ima za posledico večjo barvno intenziteto, polnost in vezavo taninov. Vina, tretirana s takim preparatom, naj bi kazala predvsem večjo stabilnost barve.

Med maceracijo vzorcev omenjenih sort, tretiranimi z različnimi enološkimi sredstvi, smo dnevno spektrofotometrično določali vsebnost skupnih fenolnih spojin, taninskih in netaninskih fenolov ter antocianov. Barvne parametre vzorcev vina smo določali z merjenjem absorbanca pri posameznih valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm. S pomočjo matematičnih zvez smo izračunali intenziteto in ton barve, delež barvnih snovi pri posamezni valovni dolžini ter delež barvnih snovi v oblik flavilijevega kationa.

Kinetika opazovanih parametrov je potekala po pričakovanjih. S primerjavo dobljenih rezultatov smo ugotovili, da je učinek preparatov sortno odvisen. Tako smo največji učinek encimskih preparatov zabeležili pri sorti refošk, kjer je zaradi delovanja encimov prišlo do hitrejše in večje ekstrakcije fenolnih in barvnih spojin. Uporabo specifičnega preparata hranila za dodajanje v rdečo drozgo smo opravičili v vzorcih sorte cabernet sauvignon, kjer smo opazili velik delež flavilijevega kationa, najmanjši ton barve, veliko intenziteto barve ter stabilnost le-te vse do konca maceracije. Pri sorti merlot nismo opazili značilnega učinka dodanih preparatov.

Rezultati potrjujejo že odkrita dognanja, da imajo tako encimski preparati kot specifična hranila za dodajanje v rdečo drozgo pomembno vlogo pri vsebnosti fenolnih spojin, vrednosti barvnih parametrov ter stabilnosti barve.



## 7 VIRI

Alvarez I., Alexandre J.L., Garcia M.J., Lizama V. 2006. Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monstrell red wines. *Analytica Chimica Acta*, 563, 1-2: 109-115.

Bautista-Ortin A.B., Martinez-Cutillas A., Ros-Garcia J.M., Lopez-Roca J.M., Gomez-Plaza E. 2005. Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Technology*, 40, 8: 867-878.

Boulton R. 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 2: 67-87.

Boulton R.B., Singleton V.L., Bisson L.F., Kunkee R.E. 1996. Principles and practices of winemaking. New York, Chapman&Hall: 115-151.

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.

Canallas R., Landy M.C., Valls J., Canalls J.M., Zamora F. 2005. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 10: 4019-4025.

Gutierrez I.H., Lorenzo E.S., Espinosa A.V. 2005. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, 92: 269-283.

Klenar I., Berovič M., Wondra M. 2004. Phenolic compounds from the fermentation of cultivars Cabernet Sauvignon and Merlot from the Slovenian coastal region. *Food Technology and Biotechnology*, 42: 11-17.

Klenar I., Vrščaj T. 2001. Spremljanje ekstrakcije fenolnih spojin med maceracijo sort cabernet sauvignon in merlot v kleti Vinakoper. *Sodobno kmetijstvo*, 34: 482-487.

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: 15-29.

Košmerl T., Kač M. 2004. Osnovne kemijske analize mošta in vina. 2. izd.. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 97-106.

Košmerl T. 2002. Komercialni encimski preparati v praksi in njihov vpliv na kakovost vina. V: Vinogradi in vina za tretje tisočletje? 2.slovenski vinogradniško-vinarski kongres z mednarodno udeležbo, Otočec, 31.1-2.2.2002. Puconja M. (ur.). Ljubljana, Strokovno društvo vinogradnikov in vinarjev Slovenije; Ljutomer, Zveza društev vinogradnikov in vinarjev Slovenije; Celje, Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 417-431.

Košmerl T. 2003. Senzorično ocenjevanje vina. Študijsko gradivo za pokaševalce vina, mošta in drugih proizvodov iz grozdja in vina. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 76-85.

Lallemand. 2004. Colour: yeast and polyphenols. Winemaking Update, 1. 2004. Toulouse, Lallemand.  
<http://www.lallemandwine.com>: (20.4.2006) 2 str.

Lorenzo C., Pardop F., Zalacain A., Alonso G.L., Salinas M.R. 2005. Effect of red grapes co-winemaking in polyphenols and color of wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 19: 7609-7616.

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.

Munoz O., Sepulveda M., Schwartz M. 2004. Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from chilean wine. Food Chemistry, 87: 487-490.

Nemanič J. 1999. Spoznajmo vino: vinske arome v sortah in zvrsteh, degustacija in ocenjevanje, vino in hrana. Ljubljana, Kmečki glas: 200 str.

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.

OptiRED. 2004. More mouthfeel and colour for red wines. 2004. Toulouse, Lallemand.  
<http://www.lallemandwine.com>: (20.4.2006) 1 str.

Ough C.S., Amerine M.A. 1988. Methods for analysis of musts and wines. 2<sup>nd</sup> ed. New York, John Wiley & Sons: 377 str.

Perez-Magarino S., Gonzalez-SanJose M.L. 2006. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. Food Chemistry, 96, 2: 197-208.

Revilla I., Gonzales-SanJose M.L. 2003. Compositional changes during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flavan-3-ol derivative levels. *Food Chemistry*, 80: 205-214.

Ribereau-Gayon P., Dubourdieu D., Doneche B., Lonvaud A. 2000. Handbook of enology. Vol. 1.: The microbiology of wine and vinifications. New York, John Wiley&Sons, Ltd: 51-106.

Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dobourdieu D. 2000. Handbook of enology. Vol. 2.: The chemistry of wine stabilization and treatments. Chichester, Yohn Wiley&Sons: 129-185.

Rihter J. 1995. Tehnološke zrelosti grozdja sorte Refošk na kakovost vina. Diplomaska naloga. Ljubljana. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 10-12.

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.

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.

Spranger M.I., Climaco M.C., Sun B., Eiriz N., Fortunato C., Nunes A., Leandro M.C., Avelar M.L., Belchior A.P. 2004. Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition. *Analytica Chimica Acta*, 513: 151-161.

Šikovec S. 1996. Vino, pijača doživetja. Ljubljana, Kmečki glas: 239-241.

van Rensburg P., Pretorius I.S. 1999. Enzymes involved in wine production (Article3). Stellenbosch, University of Stellenbosch, Institute for Wine Biotechnology and Department of Viticulture and Oenology.  
<http://www.wynboer.co.za/recentarticles/0299enzymes.php3>  
(2.2.2006): 6 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., Vanzo A., Koruza B., Korošec-Koruza Z. 2002. Polifenolni potencial slovenskega rdečega grozdja. V: Vinogradi in vina za tretje tisočletje? 2. slovenski vinogradniško-vinarski kongres z mednarodno udeležbo, Otočec, 31.1.-2.2.2002, Puconja M. (ur.). Ljubljana, Strokovno društvo vinogradnikov in vinarjev Slovenije; Ljutomer, Zveza društev vinogradnikov in vinarjev Slovenije; Celje, Poslovna skupnost za vinogradništvo in vinarstvo Slovenije: 359-367.

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.

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 iskreno zahvaljujem za njeno strokovno in profesionalno pomoč pri nastajanju tega dela. Istočasno mi je omogočila seznanitev z nekaterimi skrivnostmi stroke, ki niso opisane v tem delu, so pa nepogrešljive pri strokovnem delu na tem področju.

Za dobro voljo, veliko smeha in dobrodošle nasvete pri opravljanju laboratorijskega dela, se še posebej zahvaljujem Zdenki Zupančič.

Recenzentu doc. dr. Marjanu Simčiču najlepša hvala za vse strokovne nasvete pri nastajanju pisnega izdelka in vse ostale življenske modrosti.

Vsem prijateljem, ki me spremljajo s svojim smehom in dobro voljo ter sošolcem za vse lepe trenutke v času študija, tudi vam posebej hvala.

Hvala vsem sponzorjem, tudi vi ste mi polepšali študijska leta.

Hvala mami in očetu, ker verjameta vame in mi nudita vse in še več.

## PRILOGE

### Priloga A1: Spreminjanje sladkorne stopnje med maceracijo vzorca sorte refošk

čas (dan)	Zmanjšana sladkorna stopnja (°Oe/dan)				
	R1	R2	R3	R4	R5
0	86	86	86	86	86
1	88	88	88	88	88
2	80	80	80	80	82
3	80	78	80	80	80
4	71	72	74	71	81
5	63	65	67	63	73
7	49	51	53	50	58
8	48	48	52	46	53
9	44	44	45	41	48
10	38	39	43	38	42
11	36	36	39	34	38
14	35	31	32	30	31
15	30	32	32	30	30
16	31	31	34	30	30

### Priloga A2: Spreminjanje sladkorne stopnje med maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon

čas (dan)	zmanjšana sladkorna stopnja (°Oe/dan)				
	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5
0	99	99	99	99	99
1	99	99	99	99	99
2	93	98	97	96	99
3	89	96	84	95	96
5	79	82	80	87	85
6	74	84	79	84	85
7	73	79	74	78	80
8	68	72	69	73	77
9	65	71	65	69	75
12	55	58	54	59	63
13	52	55	52	57	61
14	48	50	47	51	57
15	49	51	45	50	56
16	45	46	43	46	52
19	41	42	37	42	49
20	39	40	36	40	48
21	37	38	35	37	44
22	36	37	35	37	46

**Priloga A3:** Spreminjanje sladkorne stopnje med maceracijo vzorca sorte merlot

čas (dan)	zmanjšana sladkorna stopnja (°Oe/dan)				
	M1	M2	M3	M4	M5
0	92	92	92	92	92
1	92	92	92	92	92
2	82	90	82	80	90
3	80	86	79	79	88
5	68	76	68	68	81
6	51	59	53	52	64
7	49	56	51	49	59
8	44	50	44	42	52
9	40	47	39	37	50
12	36	43	36	36	44
13	31	35	31	30	35

**Priloga B1:** Spreminjanje vsebnosti skupnih fenolov med maceracijo vzorcev sorte refošk

čas (dan)	skupni fenoli (mg/L)				
	R1	R2	R3	R4	R5
1	336	336	336	336	336
2	613	613	558	513	713
3	814	884	894	802	802
4	902	913	1.024	824	824
5	958	1.013	1.158	935	869
7	980	1.204	1.234	945	891
8	1.114	1.224	1.336	1.054	969
9	1.114	1.274	1.380	1.054	994
11	1.180	1.302	1.394	1.113	1.004
15	1.181	1.351	1.531	1.161	1.091

**Priloga B2:** Spreminjanje vsebnosti skupnih fenolov med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon

čas (dan)	skupni fenoli (mg/L)				
	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5
1	246	246	246	246	246
2	750	717	694	761	750
3	916	996	936	939	986
5	1.046	1.096	994	1.016	1.056
6	1.128	1.128	1.006	1.076	1.106
7	1.196	1.406	1.216	1.226	1.366
9	1.286	1.666	1.556	1.456	1.496
13	1.736	1.816	1.946	1.936	1.956
16	1.976	1.836	2.156	2.086	2.066

**Priloga B3:** Spreminjanje vsebnosti skupnih fenolov med maceracijo vzorcev sorte merlot

čas (dan)	skupni fenoli (mg/L)				
	M1	M2	M3	M4	M5
1	102	102	102	102	102
2	669	469	436	447	580
3	780	634	614	613	774
4	874	780	647	624	780
6	913	802	813	847	813
7	1.074	954	874	902	1.024
8	1.080	980	891	934	1.080
10	1.104	1.034	934	944	1.084
14	1.161	1.211	941	1.071	1.141

**Priloga C1:** Spreminjanje vsebnosti netaninskih polifenolov med maceracijo vzorcev sorte refošk

čas (dan)	netaninski polifenoli (mg/L)				
	R1	R2	R3	R4	R5
1	223	223	223	223	223
2	468	473	446	412	501
3	562	700	672	590	557
4	640	686	679	592	577
5	701	712	796	690	617
7	701	850	882	701	624
8	787	840	964	732	701
9	868	867	990	750	721
11	877	880	987	797	708
15	801	860	980	812	675

**Priloga C2:** Spreminjanje vsebnosti netaninskih polifenolov med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon

čas (dan)	netaninski polifenoli (mg/L)				
	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5
1	133	133	133	133	133
2	469	586	553	514	525
3	598	668	608	633	633
5	633	713	714	714	764
6	697	786	663	783	823
7	783	823	783	823	863
9	843	1.008	933	923	963
13	1.078	1.038	1.123	1.168	1.123
16	1.173	1.078	1.138	1.218	1.168



**Priloga C3:** Spreminjanje vsebnosti netaninskih polifenolov med maceracijo vzorcev sorte merlot

čas (dan)	netaninski polifenoli (mg/L)				
	M1	M2	M3	M4	M5
1	84	84	84	84	84
2	434	368	373	407	423
3	540	507	422	512	517
4	562	529	568	447	562
6	596	523	584	568	529
7	692	632	602	618	679
8	701	662	618	692	642
10	785	697	587	647	722
14	666	691	561	656	740

**Priloga D1:** Spreminjanje vsebnosti taninskih polifenolov med maceracijo vzorcev sorte refošk

čas (dan)	taninski polifenoli (mg/L)				
	R1	R2	R3	R4	R5
1	112	112	112	112	112
2	146	140	112	101	212
3	252	184	222	212	246
4	262	227	346	232	247
5	257	301	362	245	252
7	279	354	352	244	267
8	327	384	372	322	268
9	246	407	390	304	273
11	303	422	407	316	296
15	381	491	551	349	416

**Priloga D2:** Spreminjanje vsebnosti taninskih polifenolov med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon

čas (dan)	taninski polifenoli (mg/L)				
	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5
1	113	113	113	113	113
2	281	131	142	247	225
3	318	328	328	306	353
5	413	383	281	302	292
6	431	342	343	293	283
7	413	583	433	403	503
9	443	658	623	533	533
13	658	778	823	768	833
16	803	758	1.018	868	898

**Priloga D3:** Spreminjanje vsebnosti taninskih polifenolov med maceracijo vzorcev sorte merlot

čas (dan)	taninski polifenoli (mg/L)				
	M1	M2	M3	M4	M5
1	18	18	18	18	18
2	235	101	62	40	157
3	240	127	192	101	257
4	312	251	79	177	218
6	318	279	229	279	284
7	382	322	272	284	345
8	379	318	273	242	438
10	319	337	347	297	362
14	496	521	381	416	401

**Priloga E1:** Spreminjanje vsebnosti antocianov med maceracijo vzorcev sorte refošk

čas (dan)	antociani (mg/L)				
	R1	R2	R3	R4	R5
1	33	33	33	33	33
2	211	246	206	209	215
3	302	335	308	258	413
4	469	421	493	390	390
5	370	428	442	385	341
7	320	482	494	363	337
8	449	478	472	432	382
9	451	488	469	448	399
11	400	500	414	401	421
15	399	485	399	374	386

**Priloga E2:** Spreminjanje vsebnosti antocianov med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon

čas (dan)	antociani (mg/L)				
	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5
1	25	25	25	25	25
2	265	387	350	338	343
3	426	592	528	548	567
5	510	556	574	714	565
6	539	518	525	534	538
7	515	516	511	527	530
9	518	505	510	501	508
13	499	477	505	480	533
16	514	475	503	460	547

**Priloga E3:** Spreminjanje vsebnosti antocianov med maceracijo vzorcev sorte merlot

čas (dan)	antociani (mg/L)				
	M1	M2	M3	M4	M5
1	12	12	12	12	12
2	229	159	246	192	218
3	310	330	300	280	345
4	304	324	313	275	305
6	328	311	307	296	281
7	352	354	331	313	322
8	378	357	312	321	366
10	394	368	311	321	394
14	338	315	271	311	329

**Priloga F1:** Vrednosti absorbance pri posameznih valovnih dolžinah med maceracijo vzorcev sorte refošk

čas (dan)	absorbanca pri 420, 520 in 620 nm														
	R1			R2			R3			R4			R5		
	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>
1	0,193	0,173	0,053	0,193	0,173	0,053	0,193	0,173	0,053	0,193	0,173	0,053	0,193	0,173	0,053
2	0,237	0,381	0,058	0,209	0,389	0,045	0,181	0,325	0,040	0,176	0,302	0,041	0,262	0,407	0,067
3	0,869	0,666	0,093	0,402	0,721	0,121	0,351	0,693	0,083	0,333	0,601	0,083	0,342	0,606	0,086
4	0,344	0,643	0,076	0,366	0,729	0,083	0,374	0,741	0,085	/	/	/	0,358	0,651	0,088
5	0,428	0,763	0,100	0,432	0,831	0,099	0,471	0,908	0,109	0,408	0,723	0,094	0,376	0,684	0,092
7	0,358	0,642	0,077	0,466	1,039	0,103	0,489	1,039	0,103	0,379	0,702	0,087	0,355	0,673	0,077
9	0,444	0,832	0,110	0,480	1,007	0,117	0,579	1,226	0,145	0,443	0,775	0,113	0,389	0,716	0,095
11	0,449	0,891	0,106	0,502	1,004	0,127	0,537	1,164	0,124	0,449	0,844	0,113	0,414	0,821	0,101
15	0,416	0,828	0,092	0,474	0,988	0,106	0,520	0,972	0,134	0,415	0,793	0,099	0,400	0,808	0,087

**Priloga F2:** Vrednosti absorbance pri posameznih valovnih dolžinah med maceracijo vzorcev sorte cabernet sauvignon

čas (dan)	absorbanca pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm														
	CS1			CS2			CS3			CS4			CS5		
	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>
1	0,107	0,079	0,0035	0,107	0,079	0,035	0,107	0,079	0,035	0,107	0,079	0,035	0,107	0,079	0,035
2	0,104	0,378	0,104	0,219	0,372	0,047	0,192	0,335	0,069	0,260	0,362	0,070	0,260	0,362	0,069
3	0,376	0,533	0,105	0,337	0,634	0,084	0,284	0,528	0,068	0,300	0,494	0,076	0,368	0,579	0,106
5	0,450	0,721	0,114	0,429	0,829	0,106	0,399	0,744	0,099	0,446	0,773	0,114	0,468	0,792	0,126
6	0,468	0,792	0,114	0,492	1,010	0,122	0,471	0,957	0,111	0,498	0,886	0,129	0,539	0,877	0,152
7	0,492	0,903	0,119	0,458	0,927	0,114	0,459	0,929	0,109	0,493	0,943	0,131	0,517	0,856	0,144
9	0,501	0,984	0,115	0,456	0,910	0,110	0,457	0,884	0,113	0,504	0,937	0,117	0,491	0,888	0,122
13	0,464	0,894	0,107	0,451	0,889	0,113	0,443	0,877	0,106	0,502	0,957	0,120	0,497	0,898	0,115
16	0,453	0,807	0,108	0,436	0,844	0,101	0,434	0,855	0,105	0,485	0,950	0,127	0,495	0,879	0,114

**Priloga F3:** Vrednosti absorbance pri posameznih valovnih dolžinah med maceracijo vzorcev sorte merlot

čas (dan)	absorbanca pri valovnih dolžinah 420, 520 in 620 nm														
	M1			M2			M3			M4			M5		
	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>	A <sub>420</sub>	A <sub>520</sub>	A <sub>620</sub>
1	0,038	0,032	0,012	0,038	0,032	0,012	0,038	0,032	0,012	0,038	0,032	0,012	0,038	0,032	0,012
2	0,335	0,373	0,117	0,132	0,193	0,033	0,129	0,216	0,032	0,227	0,244	0,078	0,166	0,217	0,045
3	0,344	0,474	0,105	0,201	0,341	0,047	0,199	0,352	0,052	0,282	0,368	0,087	0,278	0,392	0,082
4	0,298	0,455	0,083	0,240	0,421	0,054	0,238	0,408	0,063	0,253	0,371	0,068	0,254	0,382	0,064
6	0,305	0,536	0,077	0,240	0,428	0,053	0,250	0,489	0,054	0,273	0,463	0,067	0,251	0,395	0,058
8	0,389	0,568	0,117	0,378	0,574	0,127	0,350	0,586	0,115	0,370	0,588	0,120	0,370	0,564	0,105
10	0,368	0,705	0,100	0,351	0,627	0,094	0,328	0,566	0,102	0,318	0,565	0,087	0,363	0,626	0,093
14	0,306	0,610	0,062	0,303	0,621	0,062	0,245	0,489	0,048	0,288	0,559	0,056	0,307	0,549	0,061

**Priloga G1:** Spreminjanje intenzitete barve med maceracijo vzorca sorte refošk

čas (dan)	intenziteta barve				
	R1	R2	R3	R4	R5
1	4,6	4,6	4,6	4,6	4,6
2	7,4	7,1	6,0	5,7	8,9
3	11,3	12,4	11,3	10,2	10,3
4	10,6	11,8	12,0	/	11,0
5	12,9	13,6	14,9	12,3	11,5
7	10,8	16,1	16,3	11,7	11,0
9	13,9	16,0	19,5	13,3	12,0
11	14,5	16,3	18,2	14,1	13,4
15	13,4	15,7	16,3	13,0	13,0

**Priloga G2:** Spreminjanje intenzitete barve med maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon

čas (dan)	intenziteta barve				
	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5
1	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2
2	8,2	6,4	5,7	6,9	6,9
3	10,1	10,5	8,8	8,7	10,5
5	12,8	13,6	12,4	13,3	13,9
6	13,9	16,2	15,4	15,1	15,7
7	15,1	15,0	15,0	15,7	15,2
9	16,0	14,8	14,5	15,6	15,0
13	14,7	14,5	14,3	15,8	15,1
16	13,7	13,8	13,9	15,6	14,9

**Priloga G3:** Spreminjanje intenzitete barve med maceracijo vzorca sorte merlot

čas (dan)	intenziteta barve				
	M1	M2	M3	M4	M5
1	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
2	8,3	3,6	3,8	5,5	4,3
3	9,2	5,9	6,0	7,4	7,5
4	8,4	7,1	7,1	6,9	7,0
6	9,2	7,2	7,9	8,0	7,0
8	11,6	10,8	10,5	10,8	10,4
10	11,7	10,7	10,0	9,7	10,8
14	9,8	9,9	7,8	9,0	9,2

**Priloga H1:** Spreminjanje tona barve in vrednosti deleža flavilijevega kationa med maceracijo vzorca sorte refošk

čas (dan)	ton barve					delež flavilijevega kationa (%)				
	R1	R2	R3	R4	R5	R1	R2	R3	R4	R5
1	1,116	1,116	1,116	1,116	1,116	28,9	28,9	28,9	28,9	28,9
2	0,622	0,537	0,557	0,583	0,644	61,3	67,4	66,0	64,1	59,6
3	0,554	0,558	0,506	0,554	0,564	65,3	63,7	68,7	65,4	64,7
4	0,535	0,502	0,505	/	0,550	67,3	69,2	69,0	/	65,7
5	0,561	0,520	0,519	0,564	0,550	65,4	68,1	68,1	65,3	65,8
7	0,558	0,449	0,471	0,540	0,527	66,1	72,6	71,5	66,8	67,9
9	0,534	0,477	0,472	0,572	0,543	66,7	70,4	70,5	64,1	66,2
11	0,504	0,500	0,461	0,532	0,504	68,9	68,7	71,6	66,7	68,6
15	0,502	0,480	0,535	0,523	0,495	69,3	70,6	66,4	67,6	69,9

**Priloga H2:** Spreminjanje tona barve in vrednosti deleža flavilijevega kationa med maceracijo vzorca sorte cabernet sauvignon

čas (dan)	ton barve					delež flavilijevega kationa (%)				
	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5	CS1	CS2	CS3	CS4	CS5
1	1,354	1,354	1,354	1,354	1,354	10,1	10,1	10,1	10,1	10,1
2	0,275	0,589	0,573	0,718	0,718	72,5	64,2	61,0	54,4	54,6
3	0,705	0,532	0,538	0,607	0,636	54,9	66,8	66,7	61,9	59,1
5	0,624	0,517	0,536	0,577	0,591	60,9	67,7	66,5	63,8	62,5
6	0,591	0,487	0,492	0,562	0,615	63,3	69,6	69,6	64,6	60,6
7	0,545	0,494	0,494	0,523	0,604	66,2	69,1	69,4	66,9	61,4
9	0,509	0,501	0,517	0,538	0,553	68,7	68,9	67,8	66,9	65,5
13	0,519	0,507	0,505	0,525	0,553	68,1	68,3	68,7	67,5	65,9
16	0,561	0,517	0,508	0,511	0,563	65,2	68,2	68,5	67,8	65,4

**Priloga H3:** Spreminjanje tona barve in vrednosti deleža flavilijevega kationa med maceracijo vzorca sorte merlot

čas (dan)	ton barve					delež flavilijevega kationa (%)				
	M1	M2	M3	M4	M5	M1	M2	M3	M4	M5
1	1,188	1,188	1,188	1,188	1,188	21,9	21,9	21,9	21,9	21,9
2	0,898	0,684	0,597	0,930	0,765	39,4	57,3	62,7	37,5	51,4
3	0,726	0,589	0,565	0,766	0,709	52,6	63,6	64,3	49,9	54,1
4	0,655	0,570	0,583	0,682	0,665	58,1	65,1	63,1	56,7	58,4
6	0,569	0,561	0,511	0,590	0,635	64,4	65,8	68,9	63,3	60,9
8	0,685	0,659	0,597	0,629	0,656	55,5	56,0	60,3	58,3	57,9
10	0,522	0,560	0,580	0,563	0,580	66,8	64,5	62,0	64,2	63,6
14	0,502	0,488	0,501	0,515	0,559	69,8	70,6	70,0	69,2	66,5

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Špela ČERPIČ

**EKSTRAKCIJA BARVNIH IN FENOLNIH SPOJIN V  
GROZDNI SOK MED MACERACIJO RDEČEGA  
GROZDJA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006