

Izbrana poglavja za študente vinarstva



IZBRANA POGLAVJA ZA ŠTUDENTE VINARSTVA

Uredili
Branka Mozetič Vodopivec in
Melita Sternad Lemut



Založba Univerze v Novi Gorici, 2026



Izbrana poglavja za študente vinarstva Copyright © 2026 by University of Nova Gorica Press is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/), except where otherwise noted.

CONTENTS

Spremna beseda urednic	vii
------------------------	-----

Part I. Main Body

1. Napredne sklopljene kromatografske tehnike za določanje glavnih metabolitov v (brez)alkoholnih pijačah	1
2. Sestava vinske arome	12
3. Metabolizem dušika – biokemijske pretvorbe	41
4. Antociani, piranoantociani in barva vina	59
5. Polifenoli belega grozdja in vina	77
6. Analiza biogenih aminov v vinu in določanje sposobnosti mlečnokislinskih bakterij za tvorbo biogenih aminov	92
7. Maceracijski pristopi v pridelavi vina – klasične in modernejše tehnike za izboljšanje ekstrakcije želenih spojin iz trdnih delcev grozdne jagode	110
8. Moderna enologija v pridelavi belih in rdečih vin	136
9. Trendi v vinarski opremi	158
Appendix	173
Kolofon	174

SPREMNA BESEDA UREDNIC

Spoštovane študentke in študenti vinarstva,

s ponosom vam predstavljamo učbenik, ki je plod skupnega dela sodelavcev Centra za raziskave vina ter Fakultete za vinogradništvo in vinarstvo, pa tudi vas, naših študentov. Učbenik je zasnovan kot sodoben učni pripomoček, ki temelji na najnovejših znanstvenoraziskovalnih in strokovnih dognanjih, hkrati pa se opira na praktične izkušnje, ki jih imamo kot učitelji, raziskovalci, in tudi pridelovalci vina, saj so nekateri izmed nas aktivni vinogradniki in vinarji. Vse nas druži želja, da vam pokažemo, kako zanimiva je znanost, ki se skriva za kozarcem vina, in kaj vse preučujemo raziskovalci, da bi izboljšali znanje in pridelavo vina. Naša poglavja so osredotočena na različna področja, vsa pa bodo lahko v pomoč študentom vinarstva pri študiju različnih, a z vinarstvom povezanih predmetov.

Naša fakulteta in raziskovalni center si že dve desetletji prizadevata krepiti znanje in inovativnost na področju vinarstva in vinogradništva. Obe panogi sta tesno povezani z identiteto in gospodarstvom Slovenije. Slovenska vina, ki slovijo po svoji kakovosti in edinstvenosti, so rezultat trdega dela in tradicije, pa tudi modrega sledenja znanstvenemu napredku. Razvoj na tem področju je hiter, morda še hitrejši kot pri drugih kmetijskih panogah. Zato je ključno, da študentom omogočimo dostop do najnovejših spoznanj ter jih opremimo s kompetencami, ki bodo lahko prispevale k nadaljnjemu razvoju in spoštovanju tega pomembnega področja.

V učbeniku boste našli poglavja, ki obravnavajo nekatere ključne teme za vaše strokovno izobraževanje – od tehnoloških postopkov pridelave vina do analiz kemijske sestave grozdja in vin ter zagotavljanja kakovosti. Poseben poudarek smo namenili aktualnim izzivom, s katerimi se srečujejo vinogradniki in vinarji. Zato verjamemo, da bo ta učbenik več kot le pripomoček za študij – želimo, da postane vir navdiha in znanja, ki vas bo spremljal na vaši poklicni poti. Naj bo tudi dokaz, da znanje, pridobljeno v sodelovanju med študenti, profesorji in raziskovalci, ne ostaja le v učilnicah in znanstvenih revijah, temveč ima cilj in moč oblikovanja prihodnosti vinarstva v Sloveniji.

Želimo vam vse dobro pri študiju in vas spodbujamo, da z radovednostjo, vztrajnostjo in strastjo stopate po poti, ki ste jo izbrali. Vsak od vas in vsi skupaj lahko prispevamo k razvoju slovenskega vinarstva in s tem tudi k prepoznavnosti naše dežele kot pomembne vinske dežele v svetu.

Branka Mozetič Vodopivec in Melita Sternad Lemut

1.

NAPREDNE SKLOPLJENE KROMATOGRFSKE TEHNIKE ZA DOLOČANJE GLAVNIH METABOLITOV V (BREZ)ALKOHOLNIH PIJAČAH

Mitja Martelanc

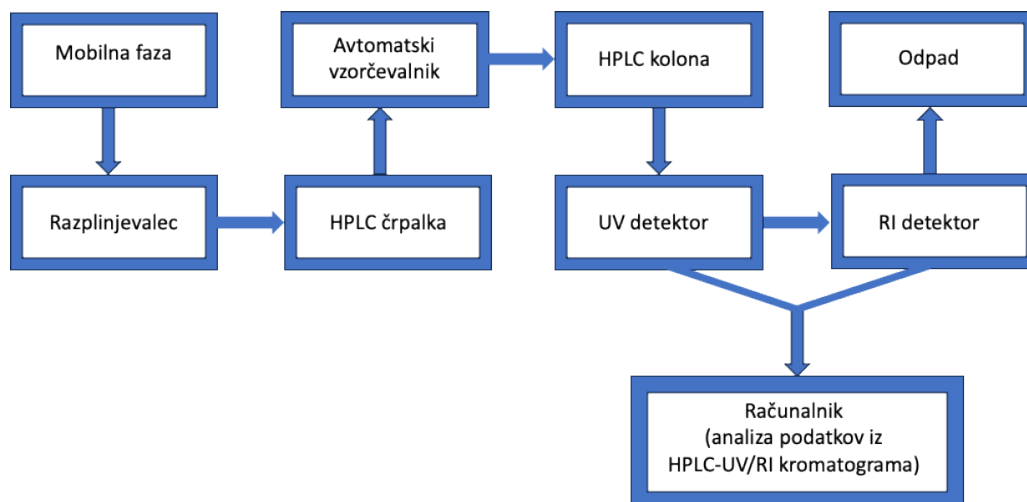
Center za raziskave vina, Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo, Univerza v Novi Gorici, Glavni trg 8,
Vipava
mitja.martelanc@ung.si

Uvod

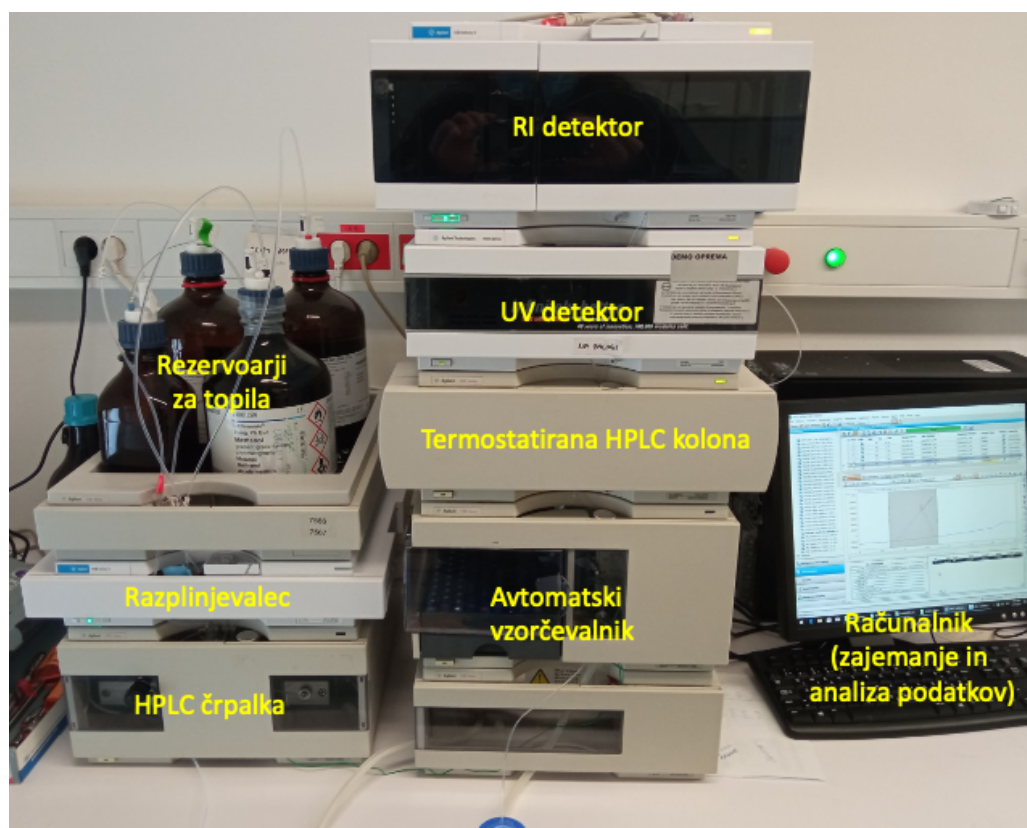
Sladkorji in organske kisline kot esencialni primarni metaboliti so ključni pri razvoju jagod vinske trte in jabolk, pa tudi pri proizvodnji soka, vina in ciderja, kjer se s fermentacijo sladkorji pretvarjajo v etanol. Tako so poleg vrednosti pH ter prostega in skupnega žvepla sladkorji, organske kisline in etanol ključni kemijski parametri, ki se jih določa v procesih kontrole kakovosti od pridelave grozdja in jabolk do soka, vina in ciderja, saj pomembno vplivajo na organoleptične lastnosti, mikrobiološko in kemično stabilnost (brez)alkoholnih pijač in kot taki prispevajo k splošni kakovosti (brez)alkoholnih pijač. Zato je proces fermentacije po svoji naravi najbolj kritičen korak v proizvodnji alkoholnih pijač. Pri fermentaciji je bistvena hitra in natančna določitev organskih kislin, etanola in sladkorjev z minimalno pripravo vzorca. Hitra, natančna in točna analitika tovrstnih vzorcev je še posebej potrebna na raziskovalnem področju, ko se mikrofermentacije izvajajo v velikem obsegu in se med poskusi analizirajo le majhne količine velikega števila vzorcev. Poleg tega je jabolčno-mlečnokislinska fermentacija zelo pomemben korak v proizvodnji vina in ciderja, zato jo je treba nadzorovati. Pri tem mora biti pretvorba jabolčne kisline v mlečno izvedena hitro in kvantitativno oziroma jo je treba celo zaustaviti pri določeni ravni mlečne in jabolčne kisline.

Sklopljene kromatografske tehnike (shematično prikazano na Sliki 1), ki združujejo ločevanje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), sklopljeno z ultravijoličnim (UV) detektorjem in detektorjem lomnega količnika (RI), omogočajo avtomatizirano, zanesljivo, robustno, hitro in natančno določanje glavnih sladkorjev, organskih kislin in etanola v pijačah (Riccardo, 2008). Poleg tega je potrebna minimalna priprava vzorca, in sicer filtracija skozi 0,45- μ m filter brez kakršne koli predhodne derivatizacije.

Na Sliki 2 je prikazan pravi sistem HPLC-UV/RI, ki je v Centru za raziskave vina Univerze v Novi Gorici, z označenimi komponentami.



Slika 1. Shematski prikaz sistema HPLC-UV/RI (vir: Martelanc, 2025).

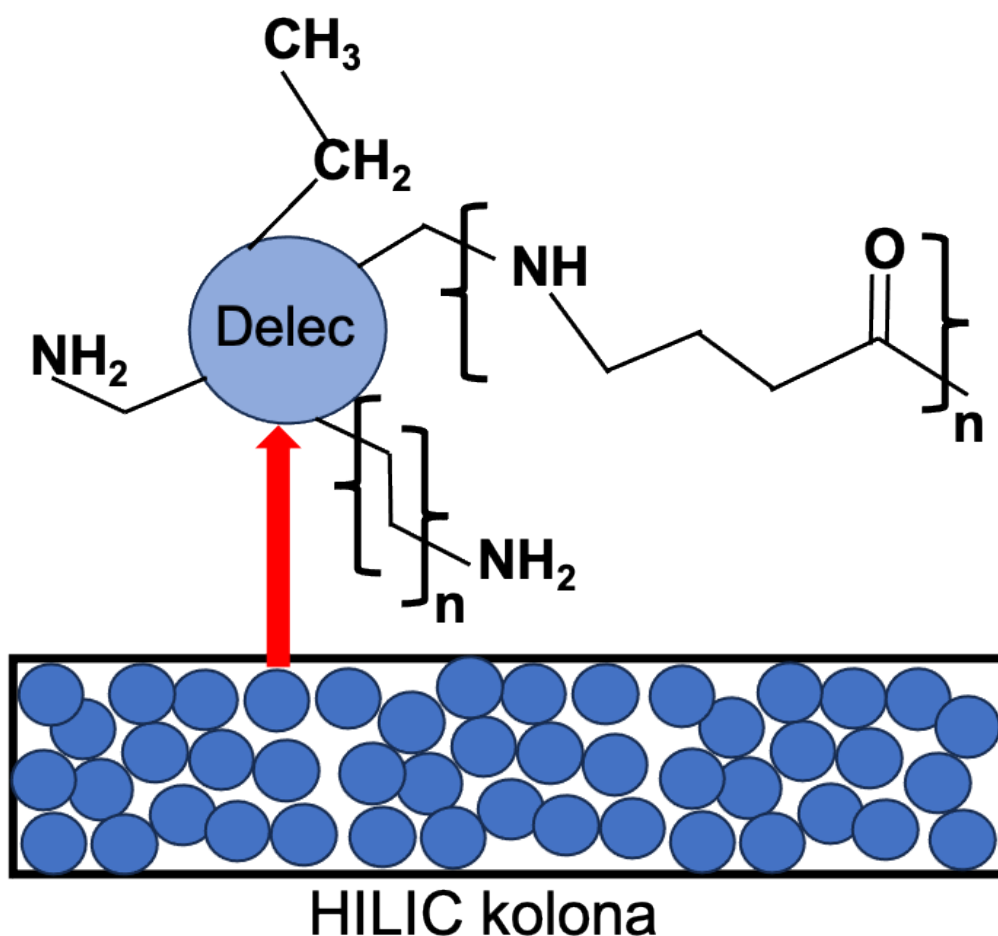


Slika 2. Sistem HPLC-UV/RI v Centru za raziskave vina (vir: Martelanc, 2025).

Analiza sladkorjev

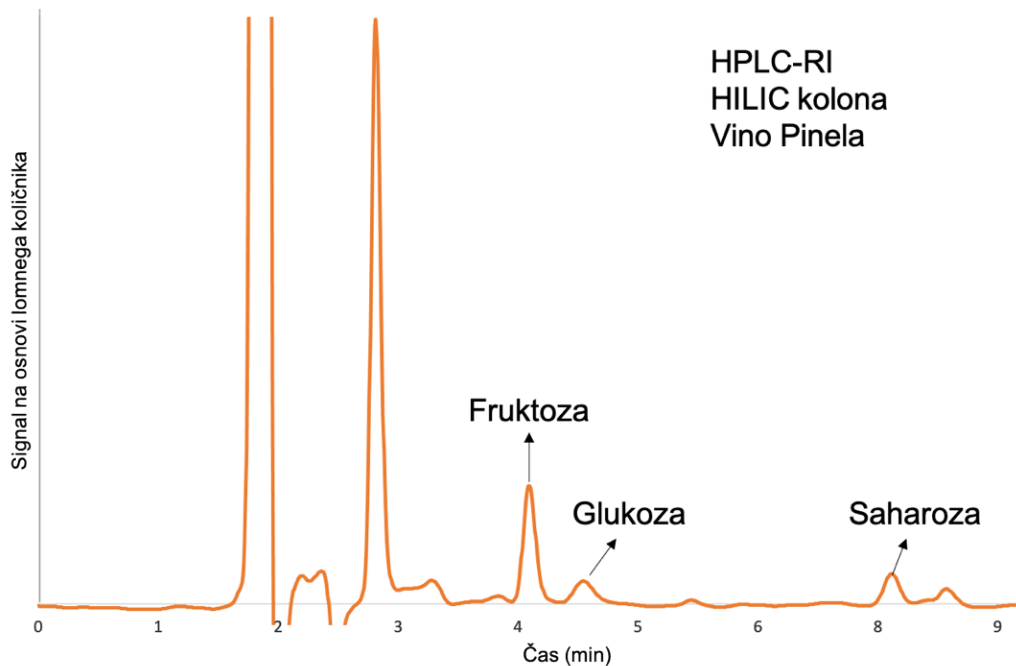
Sladkorje, predvsem glukozo, fruktozo in saharozo, lahko hitro in točno določimo v sokovih in alkoholnih pijačah s kolonami HPLC na osnovi hidrofilne interakcijske tekočinske kromatografije (HILIC) brez predpriprave vzorca v kombinaciji z detektorjem na lomni količnik (RI). Kolona HILIC omogoča ustrezno

zadrževanje in selektivnost ločevanja med polarnimi analiti, kot so fruktoza, glukoza in saharoza kot glavni sladkorji v pijačah. Primer modifikacije silikagelne kolone HILIC s poliamidnimi/aminskimi funkcionalnimi skupinami je prikazan na Sliki 3 (Buszewski in Noga, 2012).



Slika 3.
Modificirana
kolona HILIC s
poliamidnimi/
aminskimi
verigami,
vezanimi na
stacionarno fazo v
obliki sferičnih
delcev (modre
krogle), ki so
polnjeni v koloni
HILIC za ločevanje
sladkorjev (vir:
Martelanc, 2025).

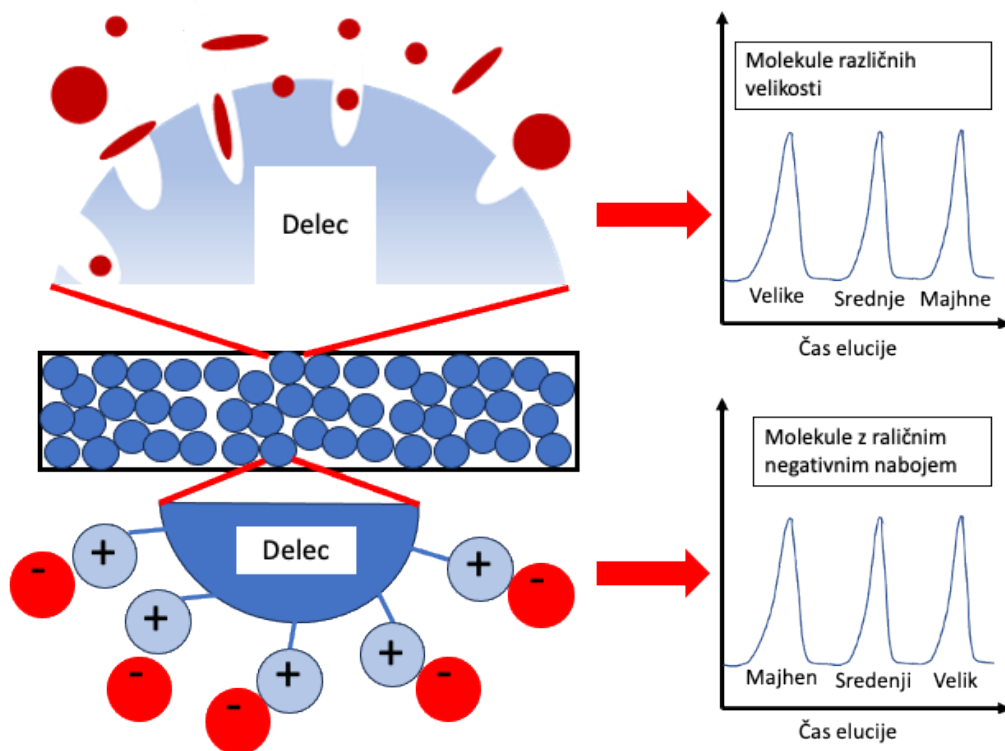
Primer uspešnega ločevanja in kvantifikacije je uporaba termostatirane kolone HILIC pri 30 °C z dimenzijami 150 mm x 4,6 mm in velikostjo delcev 3 μm (Øvsthus in sod., 2024; Česnik in sod., 2023). Hitrost pretoka mobilne faze, ki jo sestavlja mešanica topil acetonitrila in vode (75 : 25, v/v), je 0,9 mL/min. Detekcija in kvantifikacija spojin poteka z RI detektorjem. Slika 4 prikazuje HPLC-RID ločbo fruktoze, glukoze in saharoze v vzorcu vina sorte pinela. Glukoza (0,2 g/L) je v tem vzorcu prisotna v sledih, medtem ko je vsebnost fruktoze večja (1,5 g/L). Glede na to, da ima ta metoda nizko mejo zaznave in mejo določanja (0,01 g/L oziroma 0,03 g/L), je bilo možno ovrednotiti tudi sledi saharoze v koncentraciji okoli 0,2 g/L.



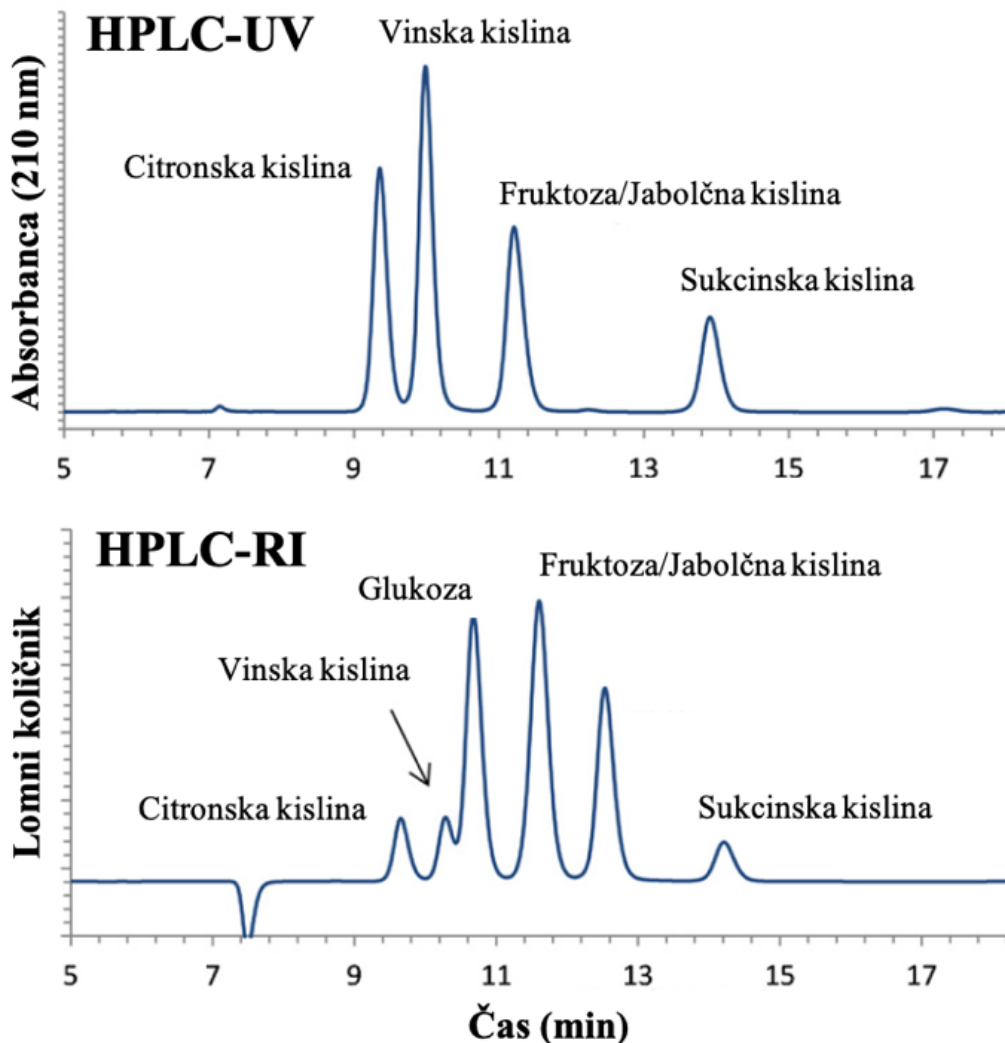
Slika 4. Analiza vzorca vina pinela s kolono HILIC na sistemu HPLC-RID (vir: Martelanc, 2025).

Kolone HPLC na osnovi polimerne nosilca

Kolone HPLC na osnovi polimerne stacionarne faze lahko hkrati omogočajo več mehanizmov ločevanja, in sicer prek ionske izmenjave, izključitve, hidrofobnih interakcij, vodikove vezi in π - π interakcij, ter delovanje v širšem območju pH-ja (1–14). Na Sliki 5 sta prikazana dva od mehanizmov (Nguyen, 2022). Te kolone omogočajo sočasno določanje organskih kislin, sladkorjev in alkoholov. Kljub temu da takšne kolone HPLC zagotavljajo določanje omenjenih spojin, imajo nekaj slabosti, in sicer nepopolno ločbo oziroma interference med citronsko kislino in vinsko kislino, vinsko kislino in glukozo ter med jabolčno kislino in fruktozo, kot je prikazano na Sliki 6. Te omejitve ločevanja zmanjšajo uporabo takšnih kolon, saj so sladkorji in glavne organske kisline v moštu, vinu in jabolčniku najpomembnejši parametri kontrole kakovosti. Po drugi strani je mogoče natančno določiti etanol, metanol, glicerol, jantarno kislino (sukcinska kislina), piruvično kislino in očetno kislino – s kombiniranjem takih zmožnosti ločevanja z UV in RI detektorji.



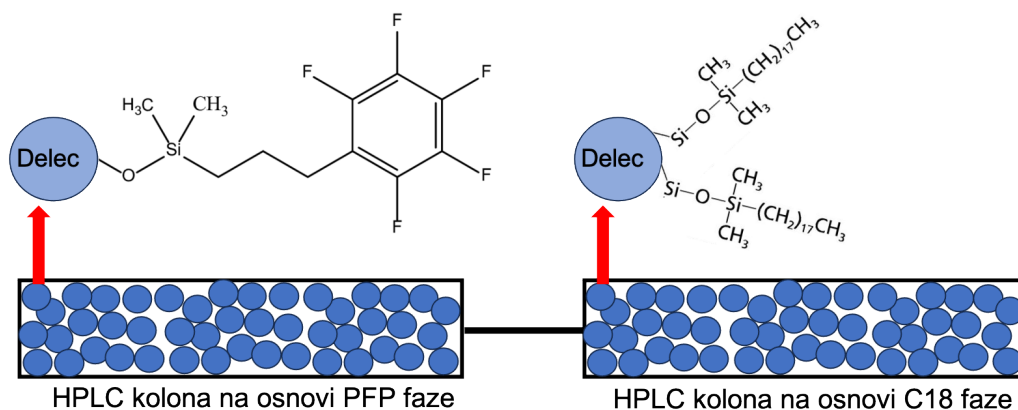
Slika 5. Kolone HPLC na osnovi polimerne stacionarne faze s prikazom hkratnega ločevanja na osnovi izključitvene kromatografije (glede na velikost molekul) in ionske izmenjave (vir: Martelanc, 2025).



Slika 6. HPLC-UV/RI ločba organskih kislin in sladkorjev na osnovi polimerne stacionarne faze z več mehanizmi hkratnega ločevanja (vir: Martelanc, 2025).

Hkratno določanje glavnih organskih spojin z reverznofaznim sistemom HPLC-UV-RID

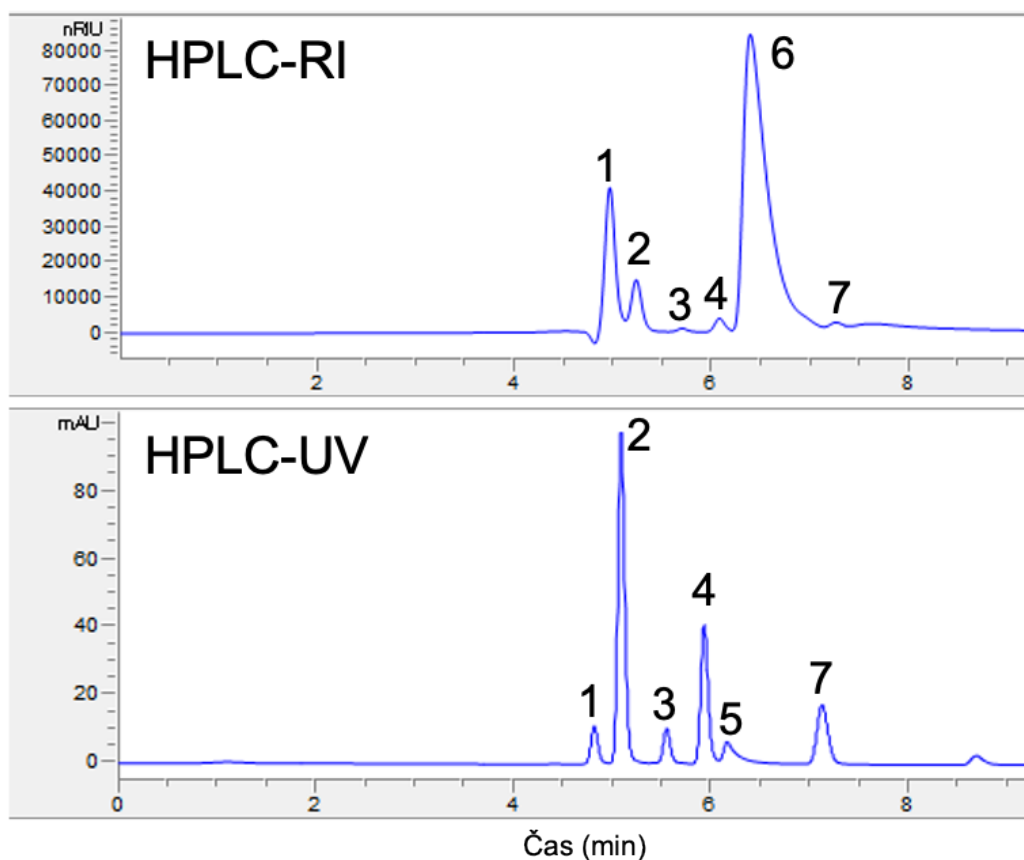
Kolone HPLC z reverzno fazo (C18) so najbolj vsestranske in najpogostejše uporabljene kolone v analiznih laboratorijih – zaradi vzdržljivosti, visokih zmogljivosti ločevanja in možnosti uporabe v številnih aplikacijah. Tako je tukaj predstavljena preprosta, točna in učinkovita metoda za sočasno kvantifikacijo organskih kislin (vinska, jabolčna, mlečna, očetna in citronska kislina), sladkorjev (glukoza + fruktoza) in etanola z uporabo dveh kolon na osnovi reverzne faze, povezanih z UV/RI detekcijo. Da bi dosegli ustrezno zadrževanje visokopolarne spojin, kot so sladkorji in organske kisline, se kot mobilna faza uporablja vodna raztopina H_2SO_4 . Za uspešno ločitev med vsemi merjenimi spojinami se uporabita dve različni reverznofazni koloni, ki sta vezani zaporedno (Slika 7), in sicer stacionarni fazi na osnovi pentafluorofenilne (PFP) funkcionalne skupine v kombinaciji s polnilom C18 (oktadecilna linearna veriga nasičenega ogljikovodika) (Øvsthus in sod., 2024).



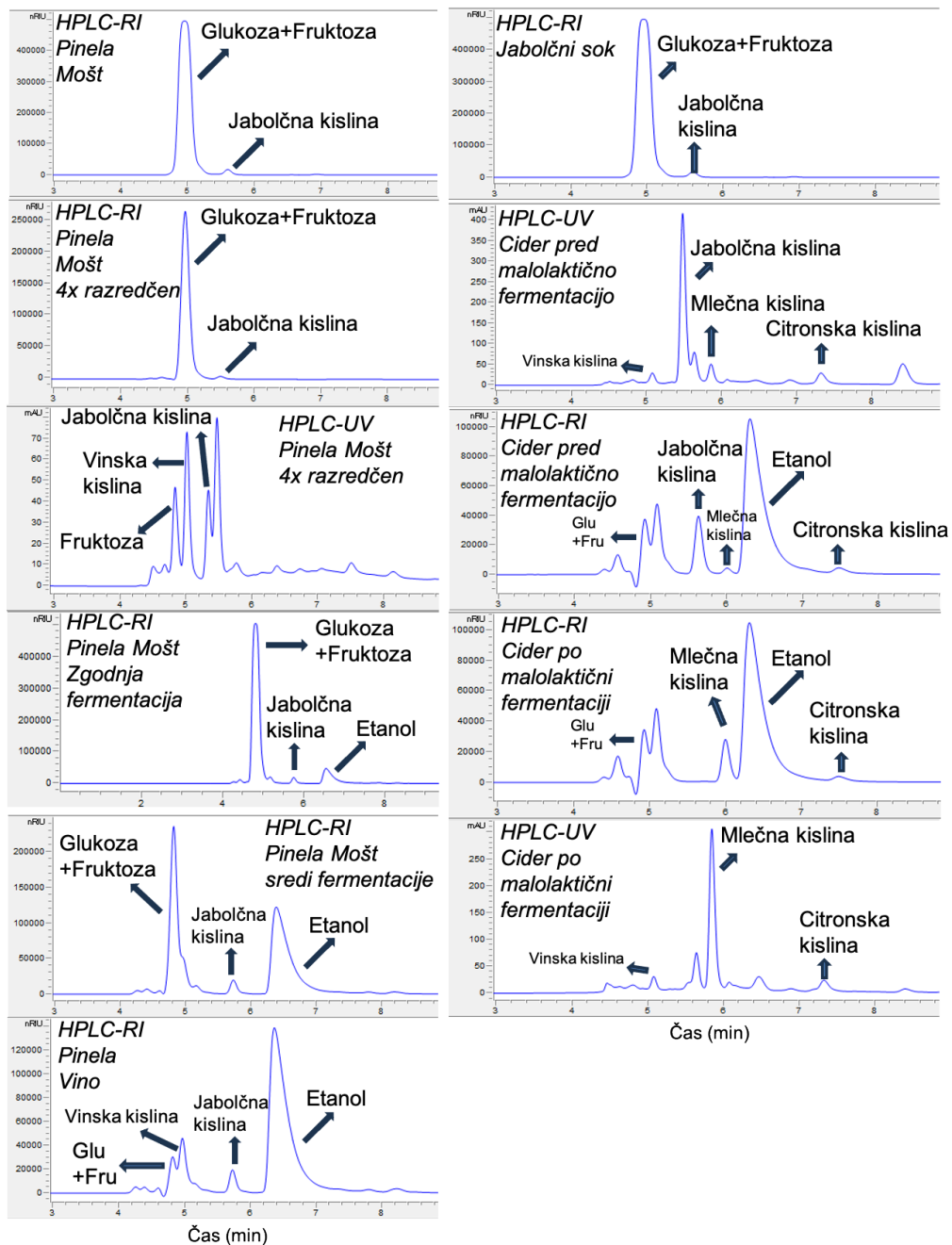
Slika 7. Zaporedno vezani koloni HPLC – PFP in C18 (vir: Martelanc, 2025).

Določanje vinske, jabolčne, mlečne, očetne in citronske kisline, sladkorjev (glukoza + fruktoza) in etanola poteka na dveh kolonah HPLC, ki sta zaporedno vezani skupaj: Kinetex PFP (dimenzije 100 x 4,6 mm z velikostjo delcev 2,6 μm) s predkolono (dolžine 5 mm in $\varnothing$ 4,6 mm, velikost delcev 2,6 μm) in C18 Kinetex EVO (dimenzije 250 x 4,6 mm z velikostjo delcev 5 μm). Volumen vbrizga je 4 μL , mobilna faza je 5-mM vodna raztopina H_2SO_4 , hitrost pretoka 0,7 mL/min.

Kot je prikazano na Sliki 8, je HPLC-UV/RI analiza standardne raztopine mešanice omenjenih sedmih spojin narejena v 8 minutah, medtem ko Slika 9 prikazuje HPLC-UV/RI analizo sedmih spojin v moštu, moštu v fermentaciji, vinu, jabolčnem soku in ciderju pred jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo in po njej. Očetne kisline nismo zaznali, saj je bila njena koncentracija v vzorcih pod 0,2 g/L.



Slika 8. HPLC-UV/RI ločba in detekcija standardne raztopine sladkorjev (1 – glukoza + fruktoza), vinske kisline (2), jabolčne kisline (3), mlečne kisline (4), očetne kisline (5), etanola (6) in citronske kisline (7) na osnovi HPLC stacionarnih faz PFP in C18 (vir: Martelanc, 2025).



Slika 9. HPLC-UV/RI analiza mošta, mošta v fermentaciji in vina sorte grozdja *Vitis vinifera* L. pinela (kromatogrami na levi strani) ter jabolčnega soka in jabolčnega vina – ciderja pred malolaktično fermentacijo in po njej (vir: Martelanc, 2025).

Primer uporabe metode

Določanje koncentracij merjenih kemijskih parametrov v realnih vzorcih

Pri metodah HPLC-UV/RI imamo opravka z instrumentalno tehniko, pri čemer je izmerjeni signal (ploščina kromatografskega vrha) na UV in RI detektorju odvisen od koncentracije merjenega analita (Slika 10). Oba detektorja je treba umeriti, pri čemer so uporabljene metode umerjanja pri instrumentalni analizi večinoma relativne. Pri postopku umerjanja (kalibracije) ugotovimo zvezo med merjenim signalom (absorbanca analita pri UV detektorju in odklon svetlobe pri RI detektorju, v obeh primerih izražena kot ploščina kromatografskega vrha) in dejansko koncentracijo analita (Skoog et al., 1999). Pri tehniki HPLC je najuporabnejša metoda eksterne standarda, pri čemer za raztopine znanih koncentracij analita izmerimo intenziteto signala na detektorju. Največkrat pri tem dobimo linearno zvezo med signalom in koncentracijo (premico) z Enačbo 1.

$$y = k \cdot x + n \quad (\text{Enačba 1})$$

y – ploščina kromatografskega vrha

k – naklon premice

x – koncentracija analita

n – odsek na osi y

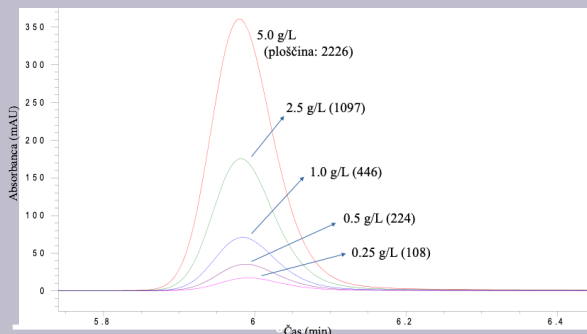
Metoda standardnega dodatka se uporablja tudi za določanje vsebnosti analitov, vendar to zahteva veliko več dela in analiz za posamezen vzorec. Metoda standardnega dodatka se večinoma uporablja za izračun izkoristka metode, saj določimo točnost analizne metode za vsak posamezni analit v vzorcu.

Umeritveno krivuljo dobimo tako, da analiziramo standardne raztopine analita, ki vsebujejo različne znane koncentracije analita v ustreznem koncentracijskem razponu (Slika 10B), pri čemer mora UV detektor dati linearen odziv (Slika 11). Nekatere vzorce je treba pred meritvijo ustrezno razredčiti (ali primerno skoncentrirati), tako da je koncentracija komponente, ki jo določamo, v koncentracijskem območju umeritvene krivulje. Nato določimo ploščino kromatografskega vrha iz HPLC-UV kromatograma vzorca za izbrani analit, kot kaže Slika 11. To ploščino vstavimo v Enačbo 1 in izračunamo koncentracijo analita: $x = (y - n) / k$.

Pri metodi standardnega dodatka dodamo raztopini vzorca znano količino merjenega analita. Vzorec in vzorec z dodatkom analita analiziramo tako, da določimo koncentracijo merjenega

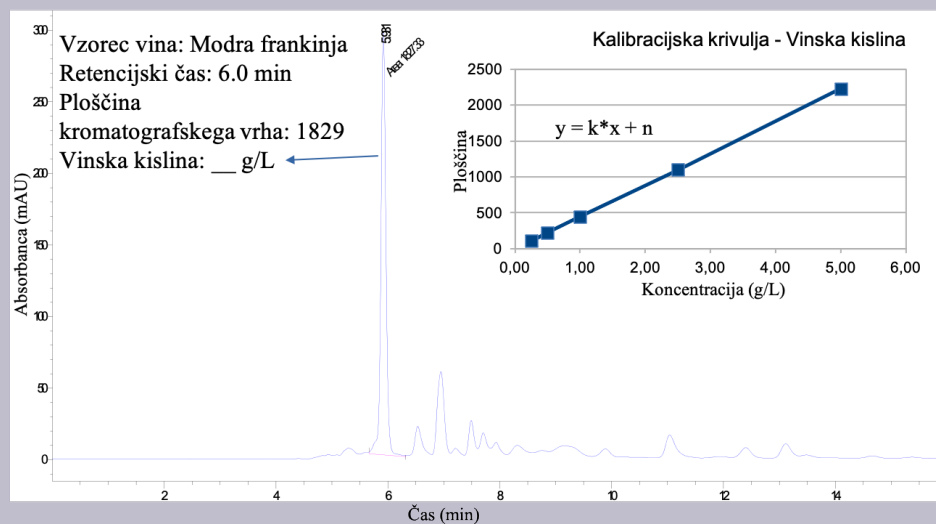
analita v obeh vzorcih prek dobljenih ploščin kromatografskega vrha. Izkoristek metode (% R) za merjeni analit izračunamo po Enačbi 2:

$$\% R = 100 \cdot (C_{\text{vzorec+dodatek}} - C_{\text{vzorec}}) / C_{\text{dodatek}} \quad (\text{Enačba 2})$$



Slika 10. Skupaj prikazani posamezni integrirani kromatografski vrhovi pri 210 nm za vinsko kislino pri analizi standardnih raztopin vinske kisline različnih koncentracij – za pridobitev umeritvene krivulje z metodo HPLC-UV (vir: Martelanc, 2025).

Slika 11. Integrirani kromatografski vrh za vinsko kislino v HPLC-UV kromatogramu, dobljen pri analizi vzorca vina modra frankinja. Zraven je prikazana še teoretična umeritvena krivulja za izračun koncentracije vinske kisline (vir: Martelanc, 2025).



Pri analizi vinske kisline v vzorcu vina dobimo HPLC-UV kromatogram, v katerem je prikazan integriran kromatografski vrh za vinsko kislino z ustrezno ploščino (Slika 11) pri valovni dolžini 210 nm. Na sliki 10 pa so prikazani signali za različne koncentracije standardnih raztopin vinske kisline. Iz teh podatkov pridobite umeritveno krivuljo (linearna premica) s pomočjo programa (npr. Excel) in izračunajte koncentracijo vinske kisline po Enačbi 1.

Pri validaciji metode HPLC-UV smo uporabili metodo standardnega dodatka za izračun izkoristka metode. Vzorcju vina (analiziran in prikazan na Sliki 11) smo dodali standardni dodatek vinske kisline 2 g/L. Analiza tega vzorca je dala ploščino kromatografskega vrha za vinsko kislino 1977. Iz vseh navedenih podatkov izračunajte izkoristek metode po Enačbi 2.

Povzetek

Namenska kolona HPLC za ciljno analizo (npr. pri analizi sladkorja z uporabo stacionarnih faz HILIC) omogoča hitro in zelo točno določanje fruktoze, glukoze in saharoze v katerem koli homogenem tekočem vzorcu mošta, vina ali ciderja. Kolona HPLC na osnovi polimerne stacionarne faze (več različnih mehanizmov hkratnega ločevanja) omogoča tudi hitro in sočasno analizo več spojin v eni analizi (sladkorji, alkoholi in organske kisline), vendar pa je točnost določanja sladkorjev in nekaterih organskih kislin slaba. Po drugi strani je mogoče natančno določiti metanol, etanol, glicerol, ocatno, jantarno in piruvično kislino, medtem ko teh spojin ni mogoče določiti z omenjeno kolono HILIC. Kompromis med visoko točnostjo in številom parametrov za nadzor kakovosti, ki jih je mogoče določiti hkrati, je mogoče doseči z dvema zaporedno vezanima kolonama na osnovi reverzne faze. Zato je reverznofazni sistem HPLC-UV/RI še posebej uporaben za hitro, preprosto in točno določanje glavnih kemijskih parametrov pri spremljanju alkoholnih in malolaktičnih fermentacij.

Viri

Buszewski, B., & Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—A powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(1), 231–247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>

Česnik, U., Martelanc, M., Øvsthus, I., Radovanović Vukajlović, T., Hosseini, A., Mozetič Vodopivec, B., & Butinar, L. (2023). Functional characterization of *Saccharomyces* yeasts from cider produced in Hardanger. *Fermentation*, 9(9), 824. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090824>

Nguyen, N. V. T. (2022). Analytical liquid chromatography – New perspectives. In *Mixed-mode chromatography* (Perspective chapter). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104545>

Øvsthus, I., Martelanc, M., Albreht, A., Radovanović Vukajlović, T., Česnik, U., & Mozetič Vodopivec, B. (2024). Chemical characterization of cider produced in Hardanger—From juice to finished cider. *Beverages*, 10(3), 73. <https://doi.org/10.3390/beverages10030073>

Øvsthus, I., Martelanc, M., Radovanović Vukajlović, T., Lesica, M., Butinar, L., Mozetič Vodopivec, B., & Antalick, G. (2023, April). Chemical composition of apple cider: A comparative study of Norwegian and French ciders. In *III International Symposium on Beverage Crops* (Vol. 1387, pp. 303–310). ISHS. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2023.1387.40>

Riccardo, F. (2008). *Hyphenated techniques in grape and wine chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd.

Skoog, D. A., & Holler, F. J. (1999). *Analytical chemistry: An introduction* (7th ed.). Brooks Cole.

2.

SESTAVA VINSKE AROME

Diana Alexandra Martin Rojas, Melita Sternad Lemut in
Guillaume Antalick

Center za raziskave vina, Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo, Univerza v Novi Gorici, Glavni trg 8,
Vipava
diana.martin@ung.si

Uvod

S kemijskega vidika je vino kompleksna matrica, sestavljena iz ogromnega števila različnih hlapnih in nehlapnih spojin, ki lahko vzbudijo zaznave različnih odtenkov vonja in arome¹ (Sáenz-Navajas in sod., 2012). Njegova kompleksnost je odvisna od sorte, geografskega porekla, lastnosti vinograda, vinogradniških tehnik ter postopkov vinifikacije in zorjenja (Marín-San Román in sod., 2020; Ruiz in sod., 2019; Sáenz-Navajas in sod., 2012). Vonj je ena od značilnosti, ki pomembno odražajo kakovost vina, izraz vonja pa je povezan s hlapnimi organskimi spojinami (v nadaljevanju za to besedno zvezo rabimo mednarodno uveljavljeno kratico VOC, angl. *volatile organic compounds*). V vinu je bilo do danes prepoznanih več sto takšnih spojin; med njimi so kemijske družine, kot so terpeni, pirazini, tioli, laktoni, višji alkoholi in estri, pa tudi druge vrste molekul, npr. hlapni fenoli.

Uvodoma je pomembno opozoriti, da se slovenska in tuja literatura ter praksa razlikujejo v razumevanju terminov vonj in aroma. Razliko med njima opredeljuje tudi v slovenski jezik preveden standard ISO 5492:2008 »Senzorična analiza – Slovar«. V njem je vonj definiran kot organoleptična lastnost, zaznavna z vohalnim organom med vdihavanjem hlapnih snovi. Aroma pa se zazna šele, ko vino vlijemo v ustno votlino, kjer se zaradi višje telesne temperature hitro ogreje, to poveča hlapnost aromatičnih spojin, dodatno pa jo pospeši mešanje tekočine z jezikom. Aromatične spojine torej soustvarjajo tako vonj kot aromo vina.

1. Aroma ali celokupni okus (angl. *flavour*): senzorični vtis živila, ko ga imamo v ustih in ga praviloma pojasnjuje kombiniran učinek vohalnih in okušalnih zaznav.

V nadaljevanju besedila bomo zaradi terminološke poenostavitve uporabljali izraz vonj, razen kadar bo potrebno razlikovanje ali pri ustaljeni terminologiji.

Človek je sposoben zaznave velikega števila VOC v zelo majhnih koncentracijah. VOC zaznavamo z vohalnim sistemom bodisi ortonazalno (skozi nos)² bodisi retronazalno (skozi usta)³ s posebnimi celičnimi receptorji. Da jih je mogoče zaznati, morajo imeti spojine določene lastnosti, kot so visok parni tlak, delna topnost v vodi, lipofilnost in nizka molekulska masa (Genovese in sod., 2009). Prav tako morajo biti prisotne vsaj v najmanjši koncentraciji, pri kateri jih je še mogoče zaznati. Ta raven, t. i. prag zaznave,⁴ je odvisna od vinske matrice ter se lahko močno razlikuje med posameznimi spojinami. Razmerje med koncentracijo in vrednostjo praga zaznave se imenuje vrednost aktivnosti vonja (angl. *Odour Activity Value* – OAV) in se pogosto uporablja kot pokazatelj aromatičnega potenciala hlapnih spojin. Čeprav je ta pristop ustrezen pri enostavnih matricah, je njegova uporabnost pri kompleksnih matricah, kot je vino, omejena zaradi pomembnih kemičnih in senzoričnih interakcij, opisanih v nadaljevanju. Po drugi strani pa vse hlapne spojine ne prispevajo enako k aromatični sestavi vina, niti niso prisotne v enakih koncentracijah. Tako lahko nekatere spojine, prisotne v vinu le v sledovih (ng/L ali celo pg/L), prispevajo več kot druge v območju mg/L (Ribéreau-Gayon in sod., 2017). Zaznavanje vonja sicer še ni povsem pojasnjeno. Analize VOC v vinu so pokazale, da so aromatične spojine in njihovi predhodniki (v uporabi je tudi izraz prekurzorji) skupni vsem sortam grozdja, vendar se njihove koncentracije in razmerja med njimi v vinih razlikujejo, kar povzroča različne zaznave v različnih posameznih vinih (Atanasova in sod., 2005). Poleg tega se je izkazalo, da lahko tudi nekatere nehlapne spojine medsebojno učinkujejo in vplivajo na zaznavo vonja (Sáenz-Navajas in sod., 2010). Prav tako lahko nekateri sinergijski učinki med VOC vplivajo na značilnosti celotne matrice (Ruiz in sod., 2019). V kompleksni matrici, kot je vino, pa lahko tudi nekatere spojine, čeprav prisotne pod njihovim pragom zaznave, vseeno prispevajo k celokupnemu aromatičnemu profilu vina (Atanasova in sod., 2005). Splošno gledano lahko številne oblike kemičnih in senzoričnih interakcij povzročajo kvalitativne senzorične zaznave, povezane z velikimi aromatičnimi razlikami med vini (Atanasova in sod., 2005; Ruiz in sod., 2019).

Klasifikacija aromatičnih spojin v vinu je odvisna od njihovega izvora oziroma od tega, kdaj se te spojine tvorijo, pred ali med vinifikacijskim procesom. Tako lahko aromatične spojine opredelimo kot sortne ali primarne arome, če nastanejo že v grozdju. Fermentacijske ali sekundarne arome so spojine, ki običajno nastanejo z delovanjem encimov mikroorganizmov, predvsem vinskih kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*) med alkoholno fermentacijo (v nadaljevanju tudi AF) in nekaterih mlečnokislinskih bakterij. Zorilne ali terciarne arome pa nastajajo po fermentaciji, med zorjenjem oz. staranjem vina. Sproščanje in/ali biosinteza novih spojin povzroča spremembe vonja med vinifikacijo. Tudi po končani vinifikaciji, med zorjenjem in staranjem vina, lahko potekajo različne vrste reakcij. Zato vonj vina ni nekaj statičnega, temveč se lahko

2. Ortonazalno: vonj, zaznan neposredno z nosom.

3. Retronazalno: vonj, ki ga zaznamo v ustni votlini med žvečenjem oz. uživanjem hrane (požirek vina).

4. Prag zaznave: najmanjša koncentracija spojine, pri kateri lahko vsaj 50 % posameznikov zazna razliko v vonjalnem dražljaju (Perry in Hayes, 2016).

razvija sčasoma, pri čemer je njegova zaznava pri potrošnikih odvisna od sestave vinske matrice. Naslednje poglavje podrobneje obravnava nastanek in klasifikacijo spojin, povezanih z vonjem in aromo vina.

Primarne arome

Primarne oziroma sortne arome so povezane s spojinami, ki jih najdemo v grozdju in so lahko prisotne v prosti ali vezani obliki kot njihovi predhodniki, ki so brez vonja (Ribéreau-Gayon in sod., 2017; Ruiz in sod., 2019). Ti nehlapni predhodniki se med vinifikacijskim procesom lahko spremenijo v hlapno obliko bodisi na račun delovanja mikroorganizmov (kvasovk, mlečnokislinskih bakterij) bodisi prek kemičnih reakcij, ki jih omogoča vinski medij – glejte [Poglavje 8](#) (Moreno-Arribas in Polo, 2009). Včasih so primarne arome povezane s kakovostjo vina oz. senzorično tipiko vina, saj lahko izražajo edinstvenost posamezne sorte. Takšni primeri so cvetlične note pri sorti muškat, vonj paprike pri nekaterih sortah, kot je npr. cabernet sauvignon, ali vonj popra pri sorti shiraz (Ribéreau-Gayon in sod., 2017). Skupina primarnih arom vključuje različne kemijske družine, med katerimi so npr. metokspirazini, tioli, terpeni in norizoprenoidi.

Metokspirazini

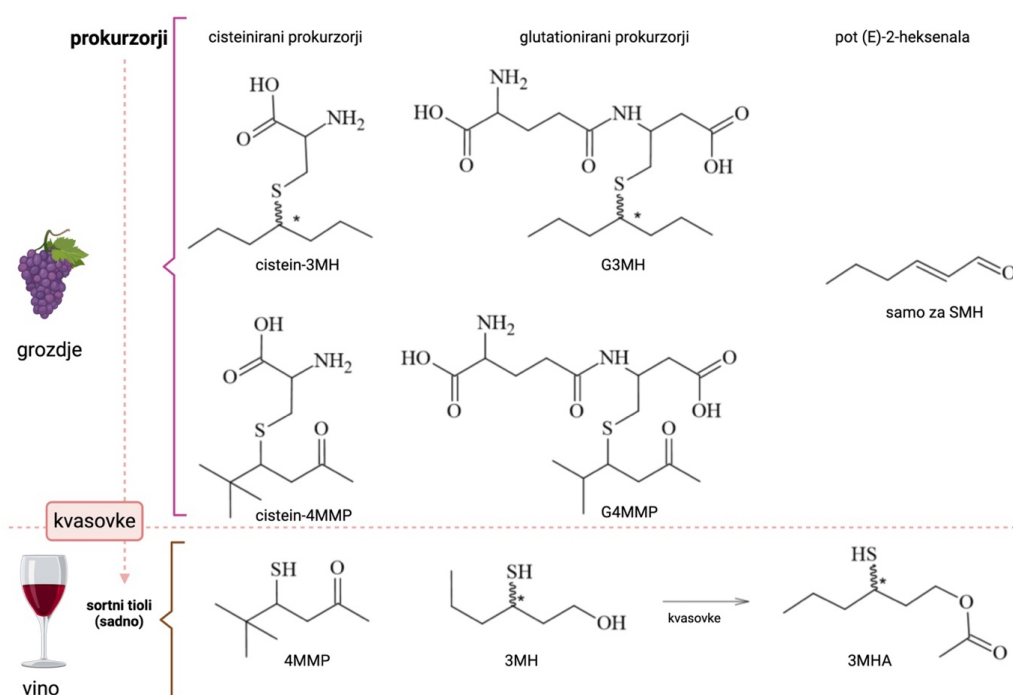
Nekatera vina opisujemo z izrazom (deskriptorjem) “rastlinsko”, kar je pogosto povezano s prisotnostjo metokspirazinov (v nadaljevanju tudi MP) (Ruiz in sod., 2019). Ti so dušikovi heterocikli, ki nastajajo pri metabolizmu aminokislin. Rastline biosintetizirajo metokspirazine, da zaščitijo dozorevajoče sadje (grozdje) pred zaužitjem plenilcev. Vsebnost metokspirazinov v vinih je odvisna od sorte, podnebja ter lastnosti vinograda in vinogradniških praks (tla, klon, koreninska podlaga, upravljanje listne stene vinske trte). Prisotni so predvsem v vinih, pridelanih iz grozdja t. i. bordojskih sort, kot so sauvignon, cabernet franc, cabernet sauvignon, merlot in še nekaj drugih. Te spojine so močni povzročitelji vonjev z zelo nizkimi pragovi zaznave (Tabela 1). V vinih je najbolj zastopan *3-izobutil-2-metokspirazin* (IBMP) (1–30 ng/L). Vonj te spojine opisujemo kot vonj po zeleni papriki in grahu (Ribéreau-Gayon in sod., 2017; Ruiz in sod., 2019). IBMP se tvori v grozdnih jagodah med zeleno fazo, njegova koncentracija pa se od fenološke faze *véraison* dalje zmanjšuje (Bindon in sod., 2014; Roujou De Boubée in sod., 2000). Običajno so metokspirazini prisotni v grozdju in vinih v razponu koncentracije 2–30 ng/L (Lei in sod., 2018). Pri nekaterih sortah, na primer cabernet sauvignon, lahko prisotnost teh spojin prispeva h kompleksnosti. Na splošno pa se obravnavajo kot negativne za kakovost vina, zlasti pri rdečih vinih (Ruiz in sod., 2019), in so v prevelikih koncentracijah nezaželene pri potrošnikih.

Tioli

Spojine s tiolno funkcionalno skupino (-SH) imenujemo s skupnim imenom tioli in so običajno povezane z napakami v vinu. Vendar pa lahko tioli, ki izhajajo iz grozdja, predstavljajo redke pozitivne izjeme, saj so ključni za aromatično sestavo, ki določa note tropskih sadežev, kot so pasijonka, grenivka in gvava.

Tovrstni vonji so zaznavni v nekaterih belih in rosé vinih in so dobro sprejeti med potrošniki (Iobbi in sod., 2023; King in sod., 2011). Tioli se lahko v grozdju pojavljajo kot nearomatični in nehlapni prekursorji (predhodniki), ki jih lahko kvasovke sprostijo med fermentacijo zaradi aktivnosti encimov β -liaz (Ruiz in sod., 2019). Najpogosteje so prisotni kot S-konjugati s cisteinom. Poleg tega se pojavljajo še v drugih oblikah, kot so glutationski konjugati ali vezave s tripeptidi (Glu-Cys-Gly) ter dipeptidi (Cys-Gly oziroma Glu-Cys) (Slika 1) (Ribéreau-Gayon in sod., 2017; Roland in sod., 2011). Ti prekursorji izhajajo iz grozdja, njihova koncentracija pa je večja v kožici kot v mesu grozdne jagode. Po drugi strani se vsebnost in vrste teh spojin razlikujejo glede na sorto; npr. vsebnosti so večje pri sortah, kot je sauvignon (Roland in sod., 2011).

V rdečih in belih vinih je bilo do danes ugotovljenih in kvantificiranih več različnih tiolov. Gre za molekule z močnim prispevkom k vonju vina. Med vsemi najdenimi molekulami so bili nekateri tioli, kot so 4-merkapt-4-metil-2-pentanon (4MMP), 3-merkaptohexil acetat (3MHA) in 3-merkapt-1-heksanol (3MH), prepoznani kot molekule v ozadju močnih sortnih značajev. Posebej pomembni so za aromatično tipičnost vin, pridelanih iz grozdja sorte sauvignon, lahko pa prispevajo tudi k sortni aromi vin iz drugih sort in specifičnih regij (Schlich in sod., 2015). V francoskih in novozelandskih vinih iz grozdja sorte sauvignon se koncentracije gibljejo od 4 do 40 ng/L za 4MMP, od 26 do 18.000 ng/L za 3MH ter do 2.500 ng/L za 3MHA. Te vrednosti so precej nad pragom zaznave (Tabela 1). Na vsebnost in ohranitev tiolov med vinifikacijskim procesom lahko vplivajo razni dejavniki, kot so ustrezna izbira kvasovk, višja fermentacijska temperatura, ki lahko poveča njihove koncentracije, ter dodatek SO_2 , ki pomaga pri njihovem ohranjanju skozi čas (Coetzee in du Toit, 2012).



Slika 1. Predlagana biogeneza 4MMP, 3MH in 3MHA (povzeto po Roland in sod., 2011). Ustvarjeno v BioRender. Martin, D. (2025) <https://BioRender.com/bru4tir>.

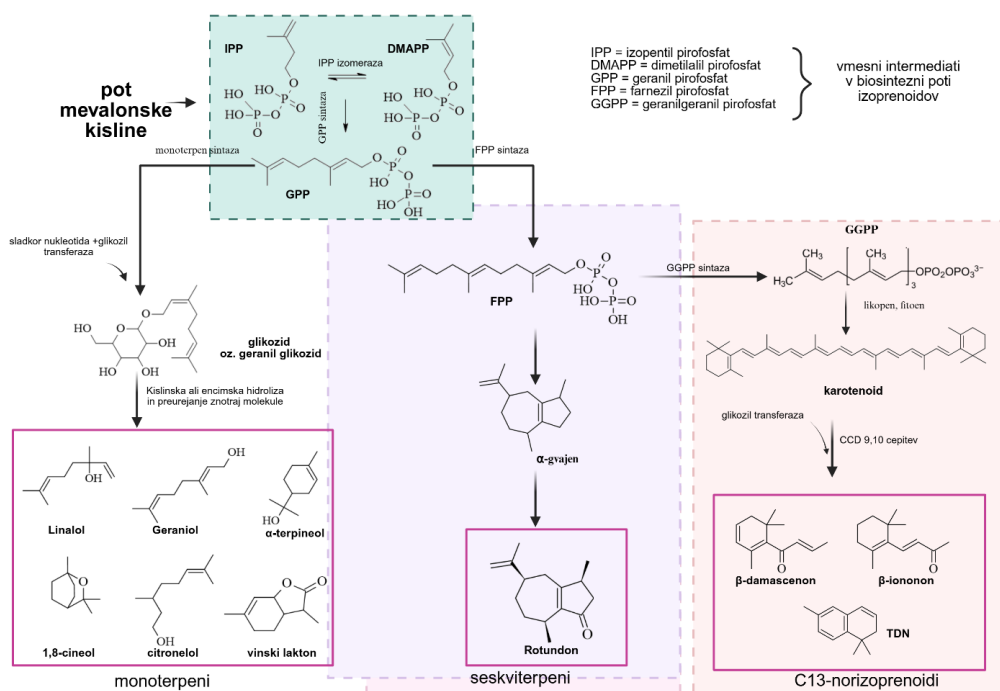
Terpenoidi

Pri muškatnih sortah so terpenoidi prisotni v mesu in kožici grozdnih jagod tako v prosti obliki kot vezani na sladkorje (glikozidi), običajno na disaharide (Ribereau-Gayon in sod., 1975). Pri drugih sortah

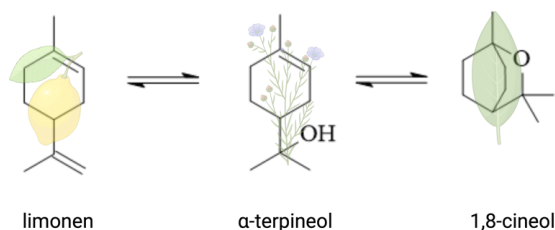
so terpenoidi večinoma (kot glikozidi) v jagodni kožici. V grozdju in vinu je širok spekter terpenoidov, ki pa vsi izvirajo iz t. i. poti mevalonske kisline (Slika 2). Glede na število ogljikovih atomov jih delimo na monoterpenoide (10 C), seskviterpenoide (15 C), diterpenoide (20 C) in triterpenoide (30 C) (Goodwin, 1964; Ruiz in sod., 2019). Monoterpenoidi v vinu vključujejo ogljikovodike, aldehide, alkohole, kisline in estre (Ribéreau-Gayon in sod., 2017). V vinih je bilo do danes določenih približno 50 različnih aromatičnih spojin, ki izhajajo iz skupine monoterpenoidov, večina pa pomembno prispeva k citrusnim in cvetličnim senzoričnim zaznavam (Black in sod., 2015). Monoterpenoidi se lahko uporabijo tudi za določanje nekaterih sort. Muškatne sorte na primer izstopajo s svojim prepoznavnim in izrazitim vonjem zaradi bistveno večjih koncentracij monoterpenoidov v primerjavi z drugimi sortami (Linsenmeier in sod., 2022; Ribéreau-Gayon in sod., 2017). Med njimi so v velikih koncentracijah, okoli 5 ppm, prisotni linalol, geraniol, citral, citronelol, nerol in α -terpineol. Po drugi strani pa lahko terpenoidi pomembno prispevajo tudi k vonju drugih, nemuškatnih sort, kot sta npr. renski rizling in dišeči traminec (Ruiz in sod., 2019). Najbolj značilni monoterpenoidi v vinih so linalol, (E)-hotrienol, citronelol, geraniol, nerol, (–)-*cis*-rose oksid in α -terpineol, ki jih povezujemo predvsem s cvetličnimi, sadnimi in začimbnimi notami.

Pomembnost terpenoidov je potrjena tudi v aromatični sestavi rdečih vin. Kot kaže, lahko spojine, kot so 1,8-cineol, 1,4-cineol in drugi derivati *p*-mentana, prispevajo k svežim notam mete (mint), črnega ribeza, sena in suhih zelišč, tudi če so prisotne v majhnih koncentracijah (Antalick in sod., 2015; Fariña in sod., 2005; Poitou in sod., 2017; Slaghenaufi in sod., 2022). V različnih rdečih vinih je bil ugotovljen tudi seskviterpen rotundon, povezan z začimbnimi deskriptorji, kot je "črni poper".

Koncentracije terpenoidov v vinu so odvisne od številnih dejavnikov, med drugim od tipa tal, podnebnih razmer in vinogradniških praks; pri nemuškatnih sortah se vrednosti gibljejo v razponu od ng/L do μ g/L (Black in sod., 2015; Carrau in sod., 2008; Yuan in sod., 2015). Med vinifikacijo pa se vsebnosti lahko spreminjajo glede na sev kvasovk, vrednost pH medija, dolžino trajanja maceracije ter temperaturo po trgatvi in med zorenjem, kar lahko privede bodisi do povečanja bodisi do zmanjšanja koncentracij teh spojin – več o tem v [osmem poglavju](#) (Carrau in sod., 2008; Hjelmeland in Ebeler, 2015; Yuan in sod., 2015). Med zorjenjem oz. staranjem vina so terpenoidi podvrženi različnim kemičnim transformacijam, kot so izomerizacija, zapiranje obroča (ciklizacija), hidratacija, dehidratacija in oksidacija (Cheynier in sod., 2010). Aromatična spojina (aglikon) se iz svoje glikozidne oblike sprošča z encimsko ali kemično hidrolizo. Med alkoholno in jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo (MLAF) se nekatere od teh spojin sproščajo z β -glukozidazami, ki jih proizvajajo mikroorganizmi (Ruiz in sod., 2019). Med staranjem vina so zaznali tudi kislinsko hidrolizo, pri kateri se terpenoidi lahko preuredijo in tvorijo nove aromatične spojine (Slika 3) (Black in sod., 2015; Carrau in sod., 2008; Fariña in sod., 2005).



Slika 2.
Biosintezna pot terpenov in norizoprenoidov (Black in sod., 2015). Ustvarjeno z BioRender. Martin, D. (2025) <https://BioRender.com/vwww8lr>.



Slika 3. Hidratacija limonena, ki vodi do nastanka α -terpineola, sledi ciklizacija trans-1,8-cineola v 1,8-cineol (povzeto po Carrau in sod., 2008). Ustvarjeno z BioRender. Martin, D. (2025) <https://BioRender.com/a3y4ksk>.

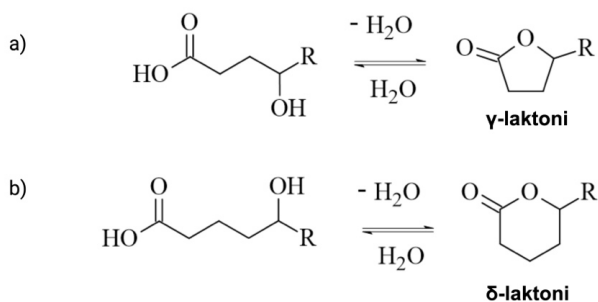
Norizoprenoidi

Tako kot terpenoidi so tudi norizoprenoidi pomembni za številne aromatične profile vin, saj lahko prispevajo različne note, od cvetličnih in sadnih do petrolejskih (Black in sod., 2015). Njihove koncentracije v vinih se gibljejo v razponu od ng/L do μ g/L. Nastajajo kot produkti biološke razgradnje karotenoidov (Slika 2). Norizoprenoidi lahko vsebujejo 9, 10, 11 ali 13 ogljikovih atomov, pri čemer so v grozdju najpogostejši C13-norizoprenoidi (Ribéreau-Gayon in sod., 2017). V grozdju so njihovi nehlapni

predhodniki prisotni v velikih koncentracijah kot glikozidi, njihova pretvorba v končne aromatično aktivne spojine pa naj bi potekala med procesom vinifikacije in staranjem v steklenici, in sicer s kislinsko katalizirano reakcijo (Black in sod., 2015).

Po začetku zorenja grozdja (*post-véraison*) začne koncentracija karotenoidov upadati zaradi tvorbe C13-podenot, ki se nato glikozilirajo. V grozdju je koncentracija nehlapnih predhodnikov ali glikozidov C13-norizoprenoidov večja kot koncentracija prostih hlapnih spojin (Black in sod., 2015; Mendes-Pinto, 2009). Iz predhodnikov jih med vinifikacijo pomaga sprostiti β -glukozidazna encimska aktivnost kvasovk, medtem ko jih kislina hidroliza med alkoholno fermentacijo in po njej običajno preuredi v aromatične norizoprenoide. Znano je, da abiotski dejavniki, kot so svetloba, temperatura in voda, vplivajo na koncentracijo C13-norizoprenoidov. Vinogradniške prakse, kot je odstranjevanje listov, lahko vplivajo na povečano tvorbo norizoprenoidov (Bubola in sod., 2020; Palai in sod., 2023; Zhu in sod., 2022).

Najpogostejši C13-norizoprenoidi v vinih so β -damascenon ter α - in β -iononi. Pri tem so α - in β -iononi bolj povezani s cvetličnimi deskriptorji (npr. vijolice) kot β -damascenon (note kuhanega jabolka in medu) (Ferreira in sod., 2000). Poleg tega nekateri izoprenoidi izkazujejo sinergijske učinke z drugimi vrstami spojin, kar tudi lahko vpliva na zaznavanje vonja. Prisotnost β -damascenona, tudi v majhnih koncentracijah, lahko v kombinaciji z drugimi spojinami okrepi sadni vonj jagodičevja (Escudero in sod., 2007; Pineau in sod., 2007). V to družino spada tudi TDN (1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen), ki ga običajno opisujemo kot vonj po kerozinu ali petroleju. Ta spojina prispeva predvsem k vonju renskega rizlinga, čeprav je prisotna tudi v nekaterih drugih belih in rdečih sortah. Njena koncentracija se med staranjem povečuje (Black in sod., 2015).



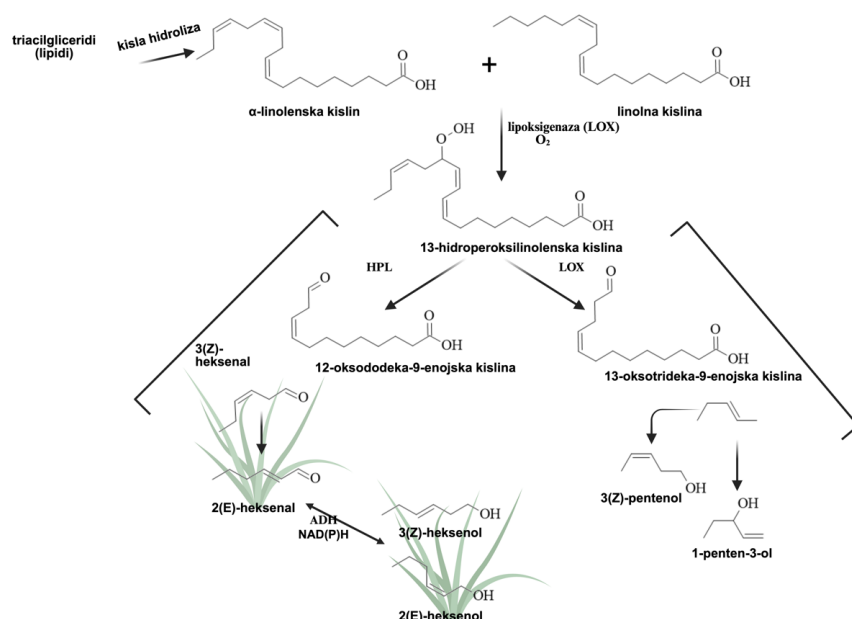
Slika 4. Tvorba linearnih alifatskih: (a) γ -laktonov in (b) δ -laktonov iz pripadajočih 4- in 5-hidroksi-kislin (povzeto po Miller in sod., 2022).

Laktoni

Laktoni so spojine, ki nastanejo z esterifikacijo, pri čemer sta funkcionalna karboksilna skupina in

alkoholna skupina za reakcijo prisotni v isti molekuli. Ta skupina zajema številne nasičene 5-členske (γ) in 6-členske (δ) laktone z enostavnimi alkilnimi substituenti (Slika 4). Nekateri laktoni, prisotni v vinih, izhajajo iz hrastovih sodov (*trans-whiskey* lakton, kokos) in fermentacije (butirolakton, maslo/karamela). Po drugi strani pa so laktoni, ki izhajajo iz grozdja, povezani s sadnimi zaznavami, kot so breskev, marelica, kokos, suho sadje, in z začimbno zelenim ter z vonjem po maščobah in olju (Allamy in sod., 2018a). Koncentracija laktonov v vinu je v velikostnem razredu $\mu\text{g/L}$, pogosto pa je večja v rdečih kot v belih vinih (Miller in sod., 2022). V vinih so do danes ugotovili in kvantificirali različne predstavnike te skupine, med njimi γ -nonalakton, δ - in γ -dekalakton, 2-nonen-4olid, masojev lakton in nekatere *p*-mentanske laktone, znane tudi kot vinske laktone, ki prispevajo k aromatičnemu profilu (Ferron in sod., 2020). Običajno jih najdemo v večjih koncentracijah v vinih iz dehidriranega grozdja (izsušene jagode) (Allamy in sod., 2018a; Šuklje in sod., 2016).

Pri tvorbi laktonov naj bi sodelovali različni predhodniki, med drugim 4-oksanojska kislina pri nastanku γ -nonalaktona (Ferron in sod., 2020), masojev lakton pri nastanku δ -dekalaktona (Pons in sod., 2017) ter ustrezne 4-hidroksikarboksilne kisline pri nastanku drugih linearnih alifatskih laktonov (Slika 4) (Miller in sod., 2022). Eden najpomembnejših predstavnikov je γ -nonalakton, ki spominja na kompleksno mešanico kokosa, breskve in kuhanega sadja. Čeprav je njegova koncentracija v vinu običajno manjša od njegovega praga zaznave, lahko prisotnost tega laktona skupaj z drugimi laktoni prispeva k vonju vina zaradi sinergijskih učinkov, hkrati pa lahko okrepi učinek drugih spojin in prispeva k notam suhega sadja, kot so slive in fige, ki jih najdemo v nekaterih vinih sorte merlot (Allamy in sod., 2018a).



Slika 5. LOX-pot (lipooksigenazna pot). Ustvarjeno z BioRender. Martin, D. (2025) <https://BioRender.com/p0ihhpd>.

Spojine s šestimi ogljikovimi atomi

Alkoholi in aldehidi s šestimi ogljikovimi atomi (C6) so hlapne spojine, ki lahko prispevajo k zeliščnim senzoričnim zaznavam vina. Nastanejo z oksidacijo maščobnih kislin (angl. *fatty acids*) po lipooksigenazni

(LOX) poti (Slika 5), npr. med drozganjem grozdnih jagod (Mozzon in sod., 2016). Nekateri C6-karbonilni derivati so povezani z zeleno-sadnimi notami, medtem ko so nekateri C9-karbonili odgovorni za kumarične in melonine note (Salas in sod., 2013). C6-aldehidi so pomembne hlapne spojine v moštu, a se kasneje med alkoholno fermentacijo večinoma reducirajo v C6-alkohole.

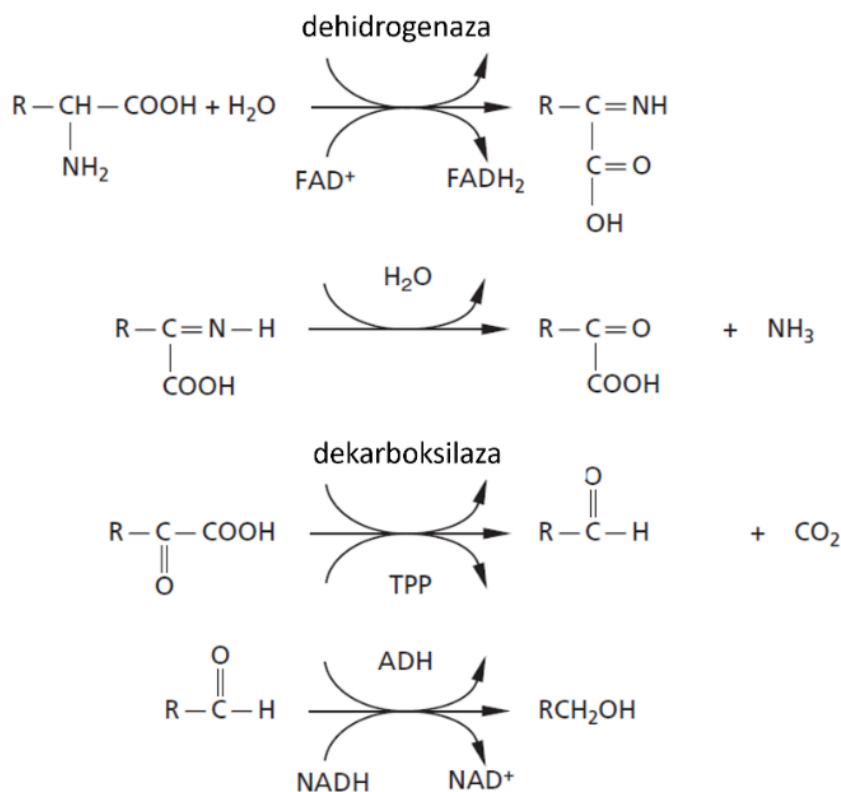
Koncentracija C6-spojnin se giblje od nekaj $\mu\text{g/L}$ do mg/L in je odvisna od sorte in zrelosti grozdja. Opišemo jih kot vonj po pokošeni travi. Pogostejše določeni C6-alkoholi v vinih so 1-heksanol, (Z)-3-heksenol in (E)-2-heksenol; med aldehidi pa 1-heksanal in (E)-2-heksenal (Mozzon in sod., 2016).

Furanoni

Karamela in kuhana jagoda sta deskriptorja, ki sta pogosto povezana s prisotnostjo Furaneola® (4-hidroksi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona) in homofuraneola (2-etil-4-hidroksi-5-metil-3(2H)-furanona) v vinu. To je pogosto opisano predvsem pri ne-*Vitis vinifera* vinih, pri katerih se koncentracije lahko povzpnejo do 1 mg/L . Tudi pri *Vitis vinifera* vinih so bile te spojine ugotovljene in kvantificirane nad pragom zaznave (furaneol $49 \mu\text{g/L}$ in homofuraneol $26,5 \mu\text{g/L}$) (Ribéreau-Gayon in sod., 2017). Poleg tega so lahko koncentracije teh spojin večje v vinih iz grozdja poznih trgateg (Allamy in sod., 2018b) in v vinih iz grozdja, okuženega z *Botrytis cinerea* (Sarrazin in sod., 2007). Furanoni izhajajo iz grozdja, vendar natančnejši mehanizmi njihove tvorbe v grozdju in vinu še niso pojasnjeni. Čeprav so koncentracije teh spojin večje pri vinih iz grozdja ameriških vrst trte kot evropskih, se domneva, da ima njihova prisotnost v slednjih sinergijski učinek na sadno zaznavo (Ferreira in sod., 2002; Sasaki in sod., 2015).

Sekundarne arome

Med alkoholno fermentacijo kvasovke tvorijo pomembne aromatične spojine, kot so višji alkoholi, maščobne kisline in estri.



Slika 6. Ehrlichova pot – biosinteza višjih alkoholov (povzeto po Ribéreau Gayon in sod., 2017).

Višji alkoholi

Višji alkoholi so alkoholi z več kot dvema ogljikovima atomoma v verigi. Njihove koncentracije se gibljejo od 0,2 do 1,2 g/L v belih vinih in od 0,4 do 1,4 g/L v rdečih vinih (Ribéreau-Gayon in sod., 2017). Te spojine pomembno prispevajo k aromatični kompleksnosti vin. Pri koncentracijah pod 300 mg/L lahko prispevajo k izrazitejšim zaznavam sadnih in cvetličnih not, medtem ko lahko koncentracije nad 400 mg/L zakrijejo nekatere lastnosti vina in povzročijo ostre in neprijetne note (de-la-Fuente-Blanco in sod., 2016a; Etievant, 1991; Rapp in Mandery 1986). Te molekule kvasovke sintetizirajo iz sladkorjev in nekaterih aminokislin (Slika 6), nastale koncentracije pa so spremenljive in odvisne od seva kvasovk (Ribéreau-Gayon in sod., 2017).

Višji alkoholi kot skupina pomembno prispevajo k aromatičnemu ozadju vseh fermentiranih pijač. Poleg tega so substrati za nastanek acetatnih estrov višjih alkoholov, ki se običajno opisujejo kot spojine s pomembnim prispevkom k sadnemu značaju vin.

Pri tvorbi višjih alkoholov (zaradi delovanja kvasovk) je ključna vsebnost dušika v moštu (Cordente in sod., 2021). Poleg tega lahko temperatura fermentacije, pH, raztopljeni kisik, motnost mošta in prisotnost prehodnih kovin prav tako vplivajo na količino teh spojin – glejte [Poglavje 8](#) (Muñoz in sod., 2006; Pires in sod., 2014). Običajno so višji alkoholi prisotni v večjih koncentracijah v rdečih vinih.

Hlapne kisline

Približno 10–15 % celokupne vsebnosti kislin v vinih predstavljajo hlapne kisline, pri čemer največ prispeva očetna kislina, ki je glavni vir hlapne kislosti vina. Hlapne kisline pomembno modulirajo aromatične značilnosti vina, vendar koncentracije očetne kisline nad pragom zaznave (0,7 g/L) povzročajo vonj po kislu

in lahko poslabšajo kakovost vina. Njihova vsebnost je zato regulirana z zakonodajo. Večje koncentracije očetne kisline lahko kažejo na delovanje določenih kvasovk *ne-Saccharomyces* pred fermentacijo ali pa nastanejo kasneje zaradi delovanja mlečnokislinskih ali očetnokislinskih bakterij (Ribéreau-Gayon in sod., 2017). V odvisnosti od stila vina se za optimalne lahko smatrajo vsebnosti 0,2–0,7 g/L.

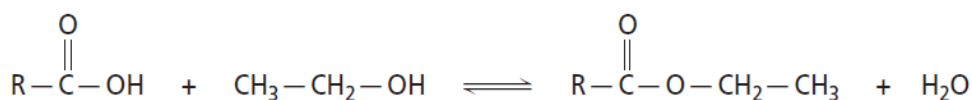
Maščobne kisline s srednje dolgo verigo

V fermentiranih pijačah maščobne kisline s srednje dolgo verigo (MCFA) predstavljajo karboksilne kisline z verigami, dolgimi od štiri do dvanajst ogljikovih atomov. Kvasovke tvorijo te kisline med biosintezo lipidov kot vmesne produkte, ki se nato vgrajujejo v njihove lipidne membrane. Te spojine so pomembni regulatorji stresa, hkrati pa so lahko toksične za kvasne celice in imajo inhibitorni učinek tudi na mlečnokislinske bakterije (Lambrechts in Pretorius, 2000). To pojasnjuje kasnejšo esterifikacijo dela teh spojin. Po drugi strani se razvejane kisline lahko tvorijo iz aminokislin po isti poti kot višji alkoholi (Slika 6). Najpomembnejše razvejane kisline so izobutanojska kislina, izovalerijanska kislina in 2-metilbutanojska kislina. Posamezno spominjajo na vonj po siru in znoju, vendar lahko v vinski matrici prispevajo k aromatični kompleksnosti in so predhodniki nekaterih najbolj aromatičnih estrov v vinih.

Estri

Tvorba estrov je rezultat reverzibilne reakcije med alkoholi in organskimi kislinami (Slika 7). V vinu je širok spekter alkoholov in kislin, kar omogoča nastanek različnih vrst estrov. Ti se lahko tvorijo tako encimsko (z encimi katalizirane reakcije) med alkoholno fermentacijo kot tudi kemično, glede na ravnotežje substratov med staranjem vina (Ribéreau-Gayon in sod., 2017). Na splošno lahko njihove koncentracije dosežejo velikost reda mg/L, vendar je njihova tvorba močno odvisna od seva kvasovke. S to skupino spojin je običajno povezan sadni značaj vina (Cameleyre in sod., 2015; Falcao in sod., 2012; Lytra in sod., 2016; Ribéreau-Gayon in sod., 2017).

Aromatične estre lahko razdelimo v tri skupine: etilni estri maščobnih kislin (EEFA); acetati višjih alkoholov (HAA) in etilni estri razvejanih kislin (Cheynier in sod., 2010; Ribéreau-Gayon in sod., 2017). Na splošno tvorba estrov temelji na sevu kvasovk, sestavi grozdnega mošta in tehnoloških odločitvah v vinifikacijskem procesu (Lambrechts in Pretorius, 2000).

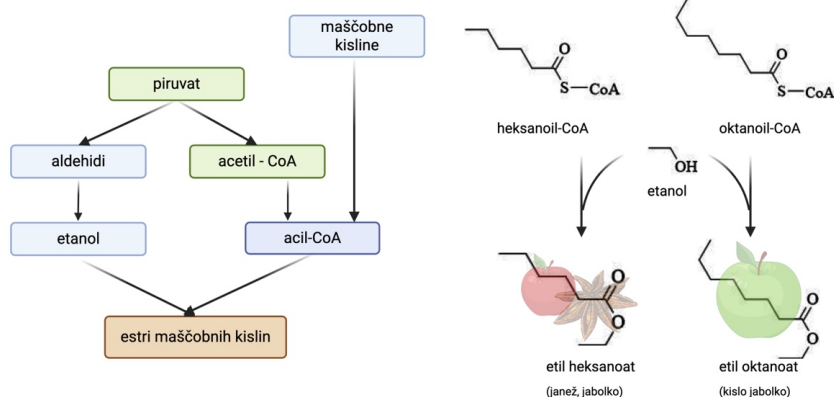


Slika 7. Reakcija esterifikacije (povzeto po Ribéreau-Gayon in sod., 2017).

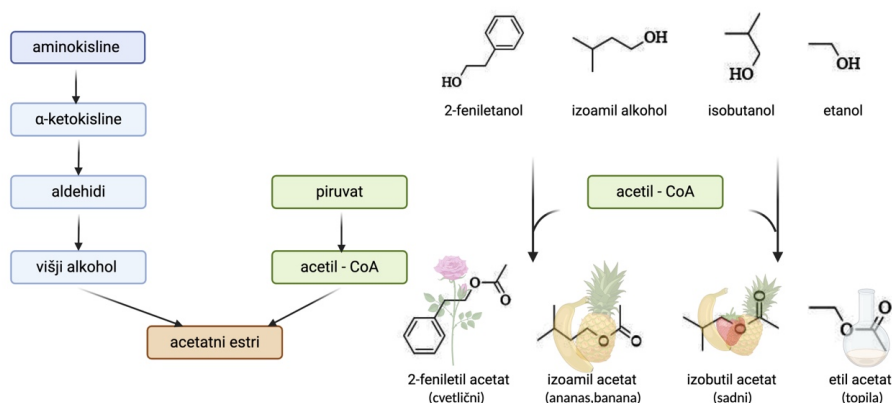
Etilni estri maščobnih kislin

Etilni estri maščobnih kislin (EEFA) prispevajo k sadnim vonjem vina in vključujejo predstavnike kot so: etil butirat (zrela jagoda, kivi), etil heksanoat (jagoda, ananas), etil oktanoat (kislo jabolko) in etil dekanoat

(jabolčna lupina, cvetlične note) (Aznar in Arroyo, 2007). Na splošno se te spojine smatra kot pomemben prispevek k vonju mladih belih vin. Sintetizirajo se prek encimskih reakcij med alkoholno fermentacijo, pri čemer kvasovke izkoriščajo etanol in maščobne kisline s srednje dolgo verigo (Slika 8) (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Xue in sod., 2022). Modulacija EEFA je povezana z različnimi dejavniki. Poročali so, da je dodajanje predhodnikov MCFA v fermentacijski medij povzročilo povečano tvorbo etilnih estrov (Saerens in sod., 2008). Nižja temperatura fermentacije pa vodi do večjih vsebnosti MCFA in pripadajočih EEFA (Kong in sod., 2021; Saerens in sod., 2008).



Slika 8.
Proizvodnja
estrov maščobnih
kislin (povzeto po
Dzialo in sod.,
2017). Ustvarjeno
v BioRender.
Martin, D. (2025)
<https://BioRender.com/3by5tb9>.



Slika 9. Sinteza
acetatnih estrov
razvejanih
alkoholov
(povzeto po
Dzialo in sod.,
2017). Ustvarjeno
v BioRender.
Martin, D. (2025)
<https://BioRender.com/lwmhli2>

Acetatni estri višjih alkoholov

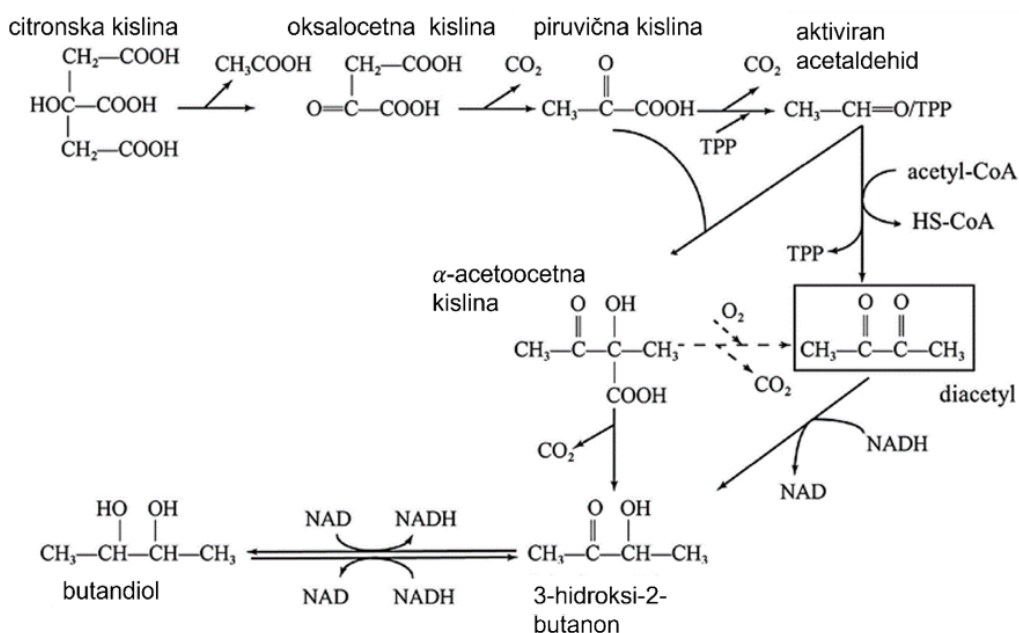
Acetatni estri višjih alkoholov (HAA) se tvorijo s pomočjo encimov iz acetil-CoA (predhodnik očetne kisline) in višjega alkohola (Slika 9). HAA so še posebej podvrženi hidrolizi z leti staranja belega vina (Antalick in sod., 2014). Prispevajo k aromatični kompleksnosti, vendar imajo hkrati velik aromatični potencial in lahko zakrijejo sortni značaj vina (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Etil acetat je eden najpomembnejših estrov v vinu s kvantitativnega vidika. Med fermentacijo ga kvasovke tvorijo v zmernih količinah, med staranjem v lesenih sodih pa lahko razvoj oetnokislinskih bakterij povzroči nastanek velikih količin skupaj z očetno kislino. Odgovoren je za pojav angl. *acescence*, to je zadušljiv vonj po kislu. Prag zaznav te spojine je 200-krat nižji kot pri očetni kislini. Kadar je koncentracija nad 150 mg/L, lahko poslabša aromatično sestavo vina (Amerine in Cruess, 1960), medtem ko lahko manjše količine, pod 120 mg/L, prispevajo k aromatični kompleksnosti (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Izoamil acetat je ena najpomembnejših spojin med HAA in ima vonj po banani. Njegova koncentracija v vinu lahko doseže 6 mg/L (Aznar in Arroyo, 2007), običajno pa je prisoten v količinah nad pragom zaznave (Tabela 1). Podobno je heksil acetat povezan z vonji po hruški in nekaterimi drugimi deskriptorji, kot so zeliščne, sadne in grozdne note (Sumbly in sod., 2010). Pogosto te spojine v grozdnem moštu še niso prisotne, saj nastanejo kot produkt alkoholne fermentacije. Sev kvasovk in sestava grozdnega mošta (dušik, lipidi) sta glavna dejavnika, ki vplivata na pojavnost HAA, pri čemer ima sestava grozdja večji vpliv na njihov nastanek v primerjavi z EEFA (Antalick in sod., 2015).

Estri razvejanih kislin

Ti estri nastanejo z reakcijo razvejanih kislin z etanolom, predvsem med staranjem vina (Díaz-Maroto in sod., 2005). Glavni predstavniki te skupine vključujejo: etil izobutirat, etil 2-metilbutirat, etil izovalerat s sadnimi notami ter etil fenilacetat z vonjem po vrtnici, medu in tobaku (Ribéreau-Gayon in sod., 2017). Posamezno spadajo med najbolj aromatične estrske spojine v vinu. Dokazano je, da prispevajo k vonju po temnem sadju in so še posebej pomembni za vonj rdečih vin (de-la-Fuente-Blanco in sod., 2016b; Lytra in sod., 2013). Njihova vsebnost v vinu je neposredno povezana s prisotnostjo pripadajočih razvejanih kislin. Zato so sestava grozdja, sev kvasovk in pogoji fermentacije ključni dejavniki, ki določajo vsebnost estrov razvejanih kislin v vinu. Večje koncentracije so običajnejše v rdečih vinih, zlasti po nekaj letih staranja (Antalick in sod., 2014).



Slika 10.
Biosinteza
diacetila
mlečnokislinskih
bakterij (Wang in
sod., 2019).

Druge fermentacijske spojine

Diacetil

Kvasovke med alkoholno fermentacijo proizvedejo le majhne količine diacetila (butan-2,3-dion), glavna pa nastane med jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo (Slika 10). Mlečnokislinske bakterije sintetizirajo spojine, kot je diacetil, iz citronske kisline ali drugih karbonilnih spojin, pri čemer produkti pomembno prispevajo k značilnim mlečnim oziroma maslenim notam. Ta vrsta spojin lahko prispeva h kompleksnosti terciarne arome, saj so zelo reaktivne in lahko reagirajo z drugimi spojinami ter tvorijo tiazole in heterociklične spojine z vonjem po kavi in lešnikih (Marchand in sod., 2000, 2011).

Terciarne arome

Zorjenje oz. staranje vina se nanaša na razvoj kemijske sestave vina po fermentaciji. Poteka lahko v sodih, posodah iz nerjavnega jekla ali celo neposredno v steklenici – v vseh primerih pa se arome sčasoma spreminjajo.

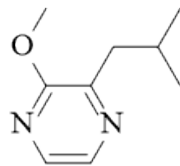
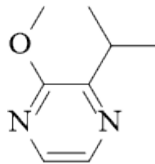
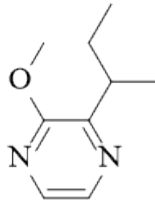
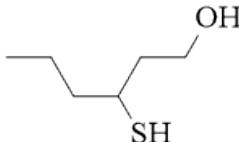
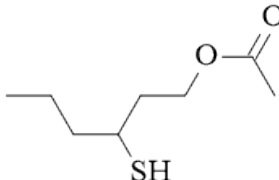
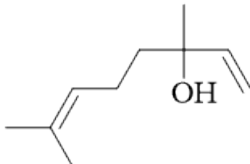
V predhodnih razdelkih tega poglavja smo že obravnavali nastanek spojin različnega izvora (sortnega in fermentacijskega), ki lahko prispevajo h kemičnim reakcijam med zorjenjem vina, kar vodi v nastanek terciarne arome vina, imenovane tudi cvetica (*bouquet*).

Ena najpomembnejših terciarnih spojin, ki prispeva k cvetici, je dimetil sulfid (DMS). DMS spominja na vonj konzervirane koruze in rakovih palčk, vendar lahko v vinski matrici prispeva note tartufov in temnega sadja. Posebej pomemben je pri izražanju značilne cvetice rdečih vin, pridelanih iz bordojskih sort (Picard in sod., 2015). DMS nastaja pretežno med zorjenjem vina prek hidrolize S-metilmetionina (Segurel in sod., 2005). Njegov prag zaznave so določili pri 25 µg/L, pri čemer so v vinih zaznane koncentracije med 11 in 760 µg/L (Siebert in sod., 2010).

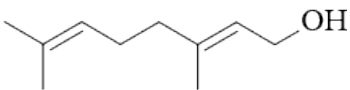
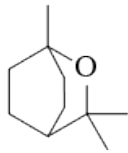
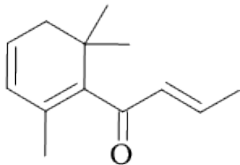
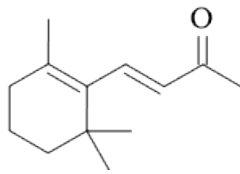
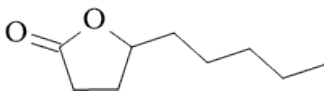
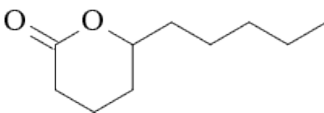
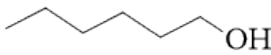
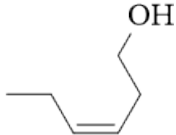
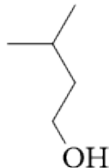
Terciarna aroma lahko izvira tudi iz stika vina z lesenim (najpogostejše hrastovim) sodom med zorjenjem – glejte [osmo poglavje](#). Spojine, kot so hrastovi laktoni, furanove spojine, derivati vanilina in fenolni derivati, lahko prehajajo iz soda v vino (Castro-Vázquez in sod., 2011). Na sestavo hrastovega lesa, uporabljenega v pridelavi sodov, in s tem na potencial ekstrakcije v vino pomembno vplivajo različni dejavniki, kot so botanična vrsta hrasta, rastišče (poreklo), prostornina in oblika soda (razmerje med notranjo površino soda in volumnom vina, ki je z njo v stiku). Pomembna je tudi starost sodov, saj se dinamika ekstrakcije spojin z leti uporabe spreminja (Pérez-Prieto in sod., 2002). V Evropi se za sode največ uporabljata vrsti hrasta *Quercus robur* in *Q. petraea*, v ZDA pa *Q. alba* (Chatonnet in sod., 1999). Glede aromatičnih spojin ameriški hrast praviloma prispeva več transviski (whiskey) laktona, ki daje intenzivno noto kokosa. Razlike so opazne tudi v koncentraciji C13-norisoprenoidnih spojin (Ortega-Heras in sod., 2004; Sefton in sod., 1990).

Iz hrasta je bilo doslej ekstrahiranih in določenih več kot 200 hlapnih spojin (Ortega-Heras in sod., 2004), pri čemer so vrste in koncentracije teh spojin v veliki meri odvisne od stopnje žganja lesa med obdelavo (Courregelongue in Pons, 2024). Stopnja žganja hrasta (temperatura, trajanje) vpliva na nastanek aromatičnih spojin zaradi razgradnje (termolize) lesnih polimerov – lignina, celuloze in hemiceluloze – ter Maillardove reakcije (Castro-Vázquez in sod., 2011; Sefton in sod., 1990; Ortega-Heras in sod., 2004; Qian in sod., 2022). Med njimi so pomembni hlapni fenoli, kot sta gvajakol in 4-metilgvajakol, ki nastaneta iz lignina med segrevanjem hrastovih sodov in v vino vnašata značilne dimne note (Ortega-Heras in sod., 2004; Qian in sod., 2022). Proces zorjenja v sodu je tudi na splošno povezan s povečanjem števila in koncentracije hlapnih fenolov, pri čemer variacije izvirajo tako iz različne vsebnosti hidroksicimetnih kislin v grozdju kot tudi iz že omenjenih lastnosti lesa ter trajanja stika med vinom in lesom (Qian in sod., 2022). Nastanek hlapnih fenolov je lahko odvisen tudi od prisotnosti kvarnih mikroorganizmov, kot je *Brettanomyces bruxellensis*; v takih primerih velike koncentracije teh spojin povzročijo note, ki se štejejo za napako in negativno vplivajo na kakovost vina (Ribéreau-Gayon in sod., 2017). Rdeča vina, ki zorijo v lesenih sodih, so ob neustreznem nadzoru procesa zorjenja posebej občutljiva na kontaminacijo s kvasovko *Brettanomyces*; možne so velike koncentracije 4-etilfenola in 4-etilgvajakola, ki vinu dajeta značilne živalske, hlevske in usnjene note (Chatonnet in sod., 1993, 1994). Vanilin, ki prav tako izvira iz lignina, je eden glavnih derivatov hrastovih sodov in pogosto presega prag zaznave (400 µg/L v belem vinu in 320 µg/L v rdečem vinu) (Spillman in sod., 2004). Iz pentoz, osnovnih komponent hemiceluloze, se lahko tvori furfural, ki prispeva note mandljev. Nadaljnja reakcija furfurala z vodikovim sulfidom vodi do nastanka furfuriltiola, odgovornega za vonj po popečenem kruhu in kavi, pogosti zaznavi v vinih, zorjenih v novih sodih.

Tabela 1. Glavne družine spojin, povezanih s sestavo arome vina.

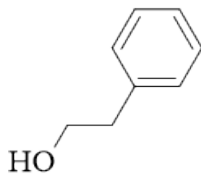
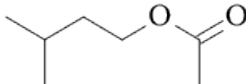
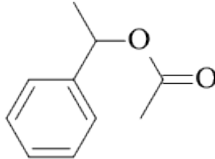
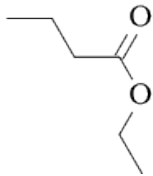
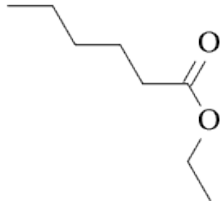
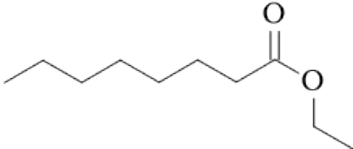
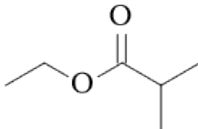
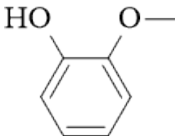
Družina	Ime	Zgradba	Vonj, opisno ⁵	Prag zaznave ⁶	Konce
pirazini	2-metoksi-3-izobutilpirazin (IBMP)		zelena paprika	1 ng/L 16 ng/L ⁷	2–56
	3-izopropil-2-metoksipirazin (IPMP)		grah (sladkast), šparglji	40 ng/L ⁹	1–10
	3-sec-butil-2-metoksipirazin (SBMP)		zeleni grah, po zatohlem, paprika	2-5 ng/L ¹¹	2–16
tioli	4-merkapt-4-metil-2-pentan-2-on (4MMP)		pušpan, žuka	0,8 ng/L	0–120
	3-sulfanilheksan-1-ol (3-SH)		pasijonka, grenivka	60 ng/L	150–ng
	3-sulfanilheksil acetat (3SHA)		pasijonka, pušpan	4ng/L	0–500
terpeni	linalool		sivka	25 µg/L 100 µg/L ¹⁶	0–10

-
5. Opisni izrazi (deskriptorji) po podatkih flavornet.org, obiskano januarja 2025.
 6. Vsi pragovi so bili določeni v vodno-etanolni raztopini (9:1), razen če je navedeno drugače (Siebert in sod., 2018).
 7. Prag določen v vodi s sladkorjem (Ribéreau-Gayon et al., 1975; Sala in sod., 2004).
 8. (Sala in sod., 2004)
 9. Prag določen v vodi s sladkorjem (Ribereau-Gayon in sodl., 1975).
 10. (Sala in sod., 2004)
 11. Prag določen v vodi (Mateo-Vivaaracho in sod., 2010).
 12. (Sala in sod., 2004).
 13. (Mateo-Vivaracho in sod., 2010).
 14. (Mateo-Vivaracho in sod., 2010).
 15. (Mateo-Vivaracho in sod., 2010).
 16. Prag določen v vodi s ladkorjem (Ribereau-Gayon in sod., 1975).

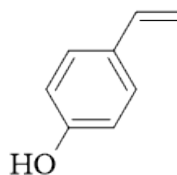
	geraniol		cvetlične note, citrusi	30 µg/L 130 µg/L ¹⁷	0–70
	1,8-cineol (evkaliptol)		mentol/meta,kafra	3,2 µg/L ¹⁸	0–50
	β-damascenon		jabolko, vrtnica, med	0,05 µg/L	1–10
C13-norizoprenoidi	β-ionon		vijolica	90 ng/L ¹⁹	1–5
laktoni	γ-nonalakton		kokos, breskev	30 µg/L ²⁰	do 20
	δ-dekalakton		marelica, kokos, ojlno, breskev	386 µg/L ²²	5–50
C6-alkoholi	heksanol		rozine, cvetje, zeleno	8000 µg/L	< 2
	(Z)-3-heksanol		trava	400 µg/L	
višji alkoholi	izomilni alkohol		slad	40000 µg/L	mg

17. Prag določen v vodi s sladkorjem (Ribereau-Gayon in sod., 1975).

-
18. Prag določen v rdečem vinu (Herve in sod., 2003).
 19. Prag določen v modelnem vinu (Kotseridis in sod., 1999).
 20. Prag določen v raztopini vinskih ekstraktov (Nakamura in sod., 1988).
 21. (Ferreira in sod., 2004).
 22. (Ferreira in sod., 2004).

	2-feniletanol		vrtnica, lilija	10000 µg/L	
	izoamil acetat		banana	313 µg/L	
	fenetil acetat		vrtnica	250 µg/L	
	etilbutirat		jabolko	20 µg/L	
estri	etilheksanoat		jabolčna lupina, sadje	14 µg/L	mg
	etiloktanoat		sadje, mastno	5 µg/L	
	etil izobutirat		sladko, guma	15 µg/L	
hlapni fenoli	gvajakol		dim, sladko, zdravila	20 µg/L 95 ²³	10- µg

4-vinilfenol



mandljeva lupina

180
μg/L²⁵0–1
μg/L

Viri

Allamy, L., Darriet, P., in Pons, A. (2018a). Molecular interpretation of dried-fruit aromas in Merlot and Cabernet Sauvignon musts and young wines: Impact of over-ripening. *Food Chemistry*, 266, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.022>

Allamy, L., Darriet, P., in Pons, A. (2018b). Molecular interpretation of dried-fruit aromas in Merlot and Cabernet Sauvignon musts and young wines: Impact of over-ripening. *Food Chemistry*, 266, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.022>

Amerine, M. A., in Cruess, W. V. (1960). *The Technology of Wine Making*, by M.A. Amerine and W.V. Cruess. Avi Publishing Company. <https://books.google.si/books?id=IL8lcgAACAAJ>

Antalick, G., Tempère, S., Šuklje, K., Blackman, J. W., Deloire, A., de Revel, G., in Schmidtke, L. M. (2015). Investigation and Sensory Characterization of 1,4-Cineole: A Potential Aromatic Marker of Australian Cabernet Sauvignon Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(41), 9103–9111. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03847>

Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Chabanet, C., Langlois, D., Nicklaus, S., in Etievant, P. (2005). Perceptual Interactions in Odour Mixtures: Odour Quality in Binary Mixtures of Woody and Fruity Wine Odorants. *Chemical Senses*, 30(3), 209–217. <https://doi.org/10.1093/chemse/bji016>

Aznar, M., in Arroyo, T. (2007). Analysis of wine volatile profile by purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry. Application to the analysis of red and white wines from different Spanish regions. *Journal of Chromatography. A*, 1165(1–2), 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.031>

Bindon, K., Holt, H., Williamson, P. O., Varela, C., Herderich, M., in Francis, I. L. (2014). Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon 2. Wine sensory properties and consumer preference. *Food Chemistry*, 154, 90–101. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.099>

Black, C. a., Parker, M., Siebert, T. e., Capone, D. l., in Francis, I. l. (2015). Terpenoids and their

24. Prag zaznave, določen v belih vinih (Summerson in sod., 2021).

25. (López n sod., 2002).

26. (Ribéreau-Gayon in sod., 2017)

role in wine flavour: Recent advances. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21(S1), 582–600. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12186>

Bubola, M., Rusjan, D., in Lukić, I. (2020). Crop level vs. leaf removal: Effects on Istrian Malvasia wine aroma and phenolic acids composition. *Food Chemistry*, 312, 126046. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126046>

Cameleyre, M., Lytra, G., Tempere, S., in Barbe, J.-C. (2015). Olfactory Impact of Higher Alcohols on Red Wine Fruity Ester Aroma Expression in Model Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(44), Article 44. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03489>

Carrau, F. M., Boido, E., in Dellacassa, E. (2008). Terpenoids in Grapes and Wines: Origin and Micrometabolism during the Vinification Process. *Natural Product Communications*, 3(4), 1934578X0800300. <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300419>

Castro-Vázquez, L., Alañón, M. E., Calvo, E., Cejudo, M. J., Díaz-Maroto, M. C., in Pérez-Coello, M. S. (2011). Volatile compounds as markers of ageing in Tempranillo red wines from La Mancha D.O. stored in oak wood barrels. *Journal of Chromatography A*, 1218(30), 4910–4917. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.094>

Chatonnet, P., Cutzach, I., Pons, M., in Dubourdieu, D. (1999). Monitoring Toasting Intensity of Barrels by Chromatographic Analysis of Volatile Compounds from Toasted Oak Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4310–4318. <https://doi.org/10.1021/jf981234t>

Cheyrier, V., Schneider, R., Salmon, J.-M., in Fulcrand, H. (2010). 3.26—Chemistry of Wine. In H.-W. (Ben) Liu in L. Mander (Eds.), *Comprehensive Natural Products II* (pp. 1119–1172). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00088-5>

Coetzee, C., in du Toit, W. J. (2012). A comprehensive review on Sauvignon blanc aroma with a focus on certain positive volatile thiols. *Food Research International*, 45(1), 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.017>

Cordente, A. G., Espinase Nandorfy, D., Solomon, M., Schulkin, A., Kolouchova, R., Francis, I. L., in Schmidt, S. A. (2021). Aromatic Higher Alcohols in Wine: Implication on Aroma and Palate Attributes during Chardonnay Aging. *Molecules*, 26(16), Article 16. <https://doi.org/10.3390/molecules26164979>

Dekoninck, T. M. L., Verbelen, P. J., Delvaux, F., Van Mulders, S. E., in Delvaux, F. R. (2012). The Importance of Wort Composition for Yeast Metabolism during Accelerated Brewery Fermentations1. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 70(3), 195–204. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2012-0809-01>

de-la-Fuente-Blanco, A., Sáenz-Navajas, M.-P., in Ferreira, V. (2016). On the effects of higher alcohols on red wine aroma. *Food Chemistry*, 210, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.021>

Díaz-Maroto, M. C., Schneider, R., in Baumes, R. (2005). Formation Pathways of Ethyl Esters of Branched Short-Chain Fatty Acids during Wine Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(9), 3503–3509. <https://doi.org/10.1021/jf048157o>

Dzialo, M. C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B., in Verstrepen, K. J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(Supp_1), S95–S128. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux031>

Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., in Ferreira, V. (2007). Analytical Characterization of

the Aroma of Five Premium Red Wines. Insights into the Role of Odor Families and the Concept of Fruitiness of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4501–4510. <https://doi.org/10.1021/jf0636418>

Etievant, P. (1991). Volatile compounds in food and beverages. *Wine*, 483–546.

Falcao, L. D., Lytra, G., Darriet, P., in Barbe, J.-C. (2012). Identification of ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate in red wines, a compound involved in blackberry aroma. *Food Chemistry*, 132(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.061>

Fariña, L., Boido, E., Carrau, F., Versini, G., in Dellacassa, E. (2005). Terpene Compounds as Possible Precursors of 1,8-Cineole in Red Grapes and Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), 1633–1636. <https://doi.org/10.1021/jf040332d>

Farrell, R. R., Wellinger, M., Gloess, A. N., Nichols, D. S., Breadmore, M. C., Shellie, R. A., in Yeretizian, C. (2015). Real-Time Mass Spectrometry Monitoring of Oak Wood Toasting: Elucidating Aroma Development Relevant to Oak-aged Wine Quality. *Scientific Reports*, 5(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep17334>

Fernández De Simón, B., Martínez, J., Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., in Muñoz, A. M. (2014). Volatile compounds and sensorial characterisation of red wine aged in cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood barrels. *Food Chemistry*, 147, 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.158>

Ferreira, V., Jarauta, I., Ortega, L., in Cacho, J. (2004). Simple strategy for the optimization of solid-phase extraction procedures through the use of solid-liquid distribution coefficients: Application to the determination of aliphatic lactones in wine. *Journal of Chromatography A*, 1025(2), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.086>

Ferreira, V., López, R., in Cacho, J. F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(11), 1659–1667. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20000901\)80:11%253C1659::AID-JSFA693%253E3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000901)80:11%253C1659::AID-JSFA693%253E3.0.CO;2-6)

Ferreira, V., Ortín, N., Escudero, A., López, R., in Cacho, J. (2002). Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rosé Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), Article 14. <https://doi.org/10.1021/jf0115645>

Ferron, P. de, Thibon, C., Shinkaruk, S., Darriet, P., Allamy, L., in Pons, A. (2020). Aromatic Potential of Bordeaux Grape Cultivars: Identification and Assays on 4-Oxononanoic Acid, a γ -Nonalactone Precursor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(47), 13344–13352. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04171>

Genovese, A., Piombino, P., Gambuti, A., in Moio, L. (2009). Simulation of retronasal aroma of white and red wine in a model mouth system. Investigating the influence of saliva on volatile compound concentrations. *Food Chemistry*, 114(1), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.022>

Goodwin, T. W. (1964). Chapter 19—The Biogenesis of Terpenes and Steroids. In S. Coffey (Ed.), *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds (Second Edition)* (pp. 54–137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-044453345-6.50248-0>

Guth, H. (1997). Quantitation and Sensory Studies of Character Impact Odorants of Different White

Wine Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3027–3032. <https://doi.org/10.1021/jf970280a>

Herve, E., Price, S., in Burns, G. (2003). Eucalyptol in wines showing a “eucalyptus” aroma. *Proceedings of VIIeme Symposium International d’Oenologie*, Eds A. Lonvaud, G. de Revel, and P. Darriet (Parise: Tec in Doc Lavoisier), 598–600.

Hjelmeland, A. K., in Ebeler, S. E. (2015). Glycosidically Bound Volatile Aroma Compounds in Grapes and Wine: A Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(1), 1–11. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14104>

Iobbi, A., Di, Y., in Tomasino, E. (2023). Revealing the sensory impact of different levels and combinations of esters and volatile thiols in Chardonnay wines. *Heliyon*, 9(1), e12862. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e12862>

Jordão, A. M., in Cosme, F. (2022). The Application of Wood Species in Enology: Chemical Wood Composition and Effect on Wine Quality. *Applied Sciences*, 12(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/app12063179>

King, E. s., Osidacz, P., Curtin, C., Bastian, S. e. p., in Francis, I. l. (2011). Assessing desirable levels of sensory properties in Sauvignon Blanc wines – consumer preferences and contribution of key aroma compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17(2), 169–180. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2011.00133.x>

Kong, C.-L., Ma, N., Yin, J., Zhao, H.-Y., in Tao, Y.-S. (2021). Fine tuning of medium chain fatty acids levels increases fruity ester production during alcoholic fermentation. *Food Chemistry*, 346(128897). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128897>

Kosseva, M. R., Joshi, V. K., in Panesar, P. S. (2016). *Science and Technology of Fruit Wine Production*. Academic Press.

Kotseridis, Y., Baumes, R. L., Bertrand, A., in Skouroumounis, G. K. (1999). Quantitative determination of β -ionone in red wines and grapes of Bordeaux using a stable isotope dilution assay. *Journal of Chromatography A*, 848(1), 317–325. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00422-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00422-7)

Lambrechts, M. G., in Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its Importance to Wine Aroma—A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(1), Article 1. <https://doi.org/10.21548/21-1-3560>

Lei, Y., Xie, S., Guan, X., Song, C., Zhang, Z., in Meng, J. (2018). Methoxypyrazines biosynthesis and metabolism in grape: A review. *Food Chemistry*, 245, 1141–1147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.056>

Ling, M., Bai, X., Cui, D., Shi, Y., Duan, C., in Lan, Y. (2023). An efficient methodology for modeling to predict wine aroma expression based on quantitative data of volatile compounds: A case study of oak barrel-aged red wines. *Food Research International*, 164, 112440. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112440>

Linsenmeier, A. W., Rauhut, D., in Sponholz, W. R. (2022). Aging and flavor deterioration in wine. In *Managing Wine Quality* (pp. 559–594). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102065-4.00037-7>

López, R., Aznar, M., Cacho, J., in Ferreira, V. (2002). Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 966(1–2), 167–177. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00696-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00696-9)

Lytra, G., Tempere, S., Marchand, S., de Revel, G., in Barbe, J.-C. (2016). How do esters and dimethyl sulphide concentrations affect fruity aroma perception of red wine? Demonstration by dynamic sensory profile evaluation. *Food Chemistry*, 194, 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.143>

Marchand, S., Almy, J., in de Revel, G. (2011). The cysteine reaction with diacetyl under wine-like conditions: Proposed mechanisms for mixed origins of 2-methylthiazole, 2-methyl-3-thiazoline, 2-methylthiazolidine, and 2,4,5-trimethyloxazole. *Journal of Food Science*, 76(6), C861-868. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02261.x>

Marchand, S., de Revel, G., in Bertrand, A. (2000). Approaches to wine aroma: Release of aroma compounds from reactions between cysteine and carbonyl compounds in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4890–4895. <https://doi.org/10.1021/jf000149u>

Marín-San Román, S., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. P., in Garde-Cerdán, T. (2020). Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds. *Food Research International*, 137, 109712. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109712>

Mateo, J. J., in Jiménez, M. (2000). Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A*, 881(1), 557–567. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01342-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01342-4)

Mateo-Vivaracho, L., Zapata, J., Cacho, J., in Ferreira, V. (2010). Analysis, occurrence, and potential sensory significance of five polyfunctional mercaptans in white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10184–10194. Scopus. <https://doi.org/10.1021/jf101095a>

Mendes-Pinto, M. M. (2009). Carotenoid breakdown products the—Norisoprenoids—In wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(2), 236–245. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.01.008>

Miller, G. C., Pilkington, L. I., Barker, D., in Deed, R. C. (2022). Saturated Linear Aliphatic γ - and δ -Lactones in Wine: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(49), 15325–15346. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c04527>

Montalvo, F. F., García-Alcaraz, J. L., Cámara, E. M., Jiménez-Macías, E., in Blanco-Fernández, J. (2021). Environmental impact of wine fermentation in steel and concrete tanks. *Journal of Cleaner Production*, 278, 123602. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123602>

Moreno-Arribas, M. V., in Polo, M. C. (Eds.). (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5>

Mozzon, M., Savini, S., Boselli, E., in Thorngate, J. H. (2016). The herbaceous character of wines. *Italian Journal of Food Science*, 28(2), 190–207. <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v304>

Muñoz, D., Peinado, R. A., Medina, M., in Moreno, J. (2006). Higher alcohols concentration and its relation with the biological aging evolution. *European Food Research and Technology*, 222(5–6), 629–635. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0161-4>

Murat, M.-L., Tominaga, T., in Dubourdieu, D. (2001). Assessing the Aromatic Potential of Cabernet Sauvignon and Merlot Musts Used to Produce Rose Wine by Assaying the Cysteinylated Precursor of 3-Mercaptohexan-1-ol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5412–5417. <https://doi.org/10.1021/jf0103119>

Nakamura, S., Crowell, E. a., Ough, C. s., in Totsuka, A. (1988). Quantitative Analysis of γ -Nonalactone in Wines and Its Threshold Determination. *Journal of Food Science*, 53(4), 1243–1244. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb13578.x>

Ortega-Heras, M., González-Huerta, C., Herrera, P., in González-Sanjosé, M. L. (2004). Changes in wine volatile compounds of varietal wines during ageing in wood barrels. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.10.051>

Palai, G., Caruso, G., Gucci, R., in D'Onofrio, C. (2023). Water deficit before veraison is crucial in regulating berry VOCs concentration in Sangiovese grapevines. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2023.1117572>

Pérez-Prieto, L. J., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., Pardo Mínguez, F., in Gómez-Plaza, E. (2002). Maturing Wines in Oak Barrels. Effects of Origin, Volume, and Age of the Barrel on the Wine Volatile Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3272–3276. <https://doi.org/10.1021/jf011505r>

Perry, D. M., in Hayes, J. E. (2016). Effects of Matrix Composition on Detection Threshold Estimates for Methyl Anthranilate and 2-Aminoacetophenone. *Foods*, 5(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/foods5020035>

Pichler, A., Ivić, I., Mesić, J., Drenjančević, M., Kujundžić, T., Marković, T., in Kopjar, M. (2024). Aroma Profile of Merlot Red Wine Stored in Stainless-Steel Tanks and Wooden Barrels with Different Toasting Methods. *Foods*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/foods13010045>

Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., in Dubourdieu, D. (2007). Which Impact for β -Damascenone on Red Wines Aroma? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), Article 10. <https://doi.org/10.1021/jf070120r>

Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., in Dubourdieu, D. (2009). Examples of Perceptive Interactions Involved in Specific “Red-” and “Black-berry” Aromas in Red Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3702–3708. <https://doi.org/10.1021/jf803325v>

Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., in Vicente, A. A. (2014). Yeast: The soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>

Poitou, X., Thibon, C., in Darriet, P. (2017). 1,8-Cineole in French Red Wines: Evidence for a Contribution Related to Its Various Origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(2), Article 2. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03042>

Pons, A., Allamy, L., Lavigne, V., Dubourdieu, D., in Darriet, P. (2017). Study of the contribution of massoia lactone to the aroma of Merlot and Cabernet Sauvignon musts and wines. *Food Chemistry*, 232, 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.151>

Qian, X., Jia, F., Cai, J., Shi, Y., Duan, C., in Lan, Y. (2022). Characterization and Evolution of Volatile Compounds of Cabernet Sauvignon Wines from Two Different Clones during Oak Barrel Aging. *Foods*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/foods11010074>

Rapp, A., in Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia*, 42(8), 873–884. <https://doi.org/10.1007/BF01941764>

Ribereau-Gayon, P., Boidron, J. N., in Terrier, A. (1975). Aroma of Muscat grape varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(6), 1042–1047. <https://doi.org/10.1021/jf60202a050>

Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., in Donèche, B. (2006). *Handbook of enology* (2nd ed). John Wiley.

Ribereau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., in Dubourdieu, D. (2017). *Traité d'oenologie—Tome 2*

(6th ed., Vol. 2). Dunod. <https://www.dunod.com/sciences-techniques/traite-d-oenologie-tome-2-chimie-du-vin-stabilisation-et-traitements-0>

Roland, A., Schneider, R., Charrier, F., Cavelier, F., Rossignol, M., in Razungles, A. (2011). Distribution of varietal thiol precursors in the skin and the pulp of Melon B. and Sauvignon Blanc grapes. *Food Chemistry*, 125(1), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.050>

Roland, A., Schneider, R., Razungles, A., in Cavelier, F. (2011). Varietal Thiols in Wine: Discovery, Analysis and Applications. *Chemical Reviews*, 111(11), 7355–7376. <https://doi.org/10.1021/cr100205b>

Roujou De Boubée, D., Van Leeuwen, C., in Dubourdieu, D. (2000). Organoleptic Impact of 2-Methoxy-3-isobutylpyrazine on Red Bordeaux and Loire Wines. Effect of Environmental Conditions on Concentrations in Grapes during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4830–4834. <https://doi.org/10.1021/jf000181o>

Ruiz, J., Kiene, F., Belda, I., Fracassetti, D., Marquina, D., Navascués, E., Calderón, F., Benito, A., Rauhut, D., Santos, A., in Benito, S. (2019). Effects on varietal aromas during wine making: A review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7425–7450. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10008-9>

Sáenz-Navajas, M.-P., González-Hernández, M., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., in Ferreira, V. (2012). Orthonasal aroma characteristics of Spanish red wines from different price categories and their relationship to expert quality judgements: Aroma properties and quality of Spanish red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18(3), Article 3. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2012.00195.x>

Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., in Delvaux, F. R. (2008). Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 454–461. <https://doi.org/10.1128/AEM.01616-07>

Sala, C., Busto, O., Guasch, J., in Zamora, F. (2004). Influence of Vine Training and Sunlight Exposure on the 3-Alkyl-2-methoxypyrazines Content in Musts and Wines from the *Vitis vinifera* Variety Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3492–3497. <https://doi.org/10.1021/jf049927z>

Salas, J., Harwood, J., in Martínez Force, E. (2013). Lipid Metabolism in Olive: Biosynthesis of Triacylglycerols and Aroma Components. In *Handbook of olive oil: Analysis and properties* (pp. 97–127). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8_4

Sarrazin, E., Dubourdieu, D., in Darriet, P. (2007). Characterization of key-aroma compounds of botrytized wines, influence of grape botrytization. *Food Chemistry*, 103(2), 536–545. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.08.026>

Sasaki, K., Takase, H., Tanzawa, F., Kobayashi, H., Saito, H., Matsuo, H., in Takata, R. (2015). Identification of Furaneol Glucopyranoside, the Precursor of Strawberry-like Aroma, Furaneol, in Muscat Bailey A. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(1), 91–94. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.14072>

Sefton, M. A., Francis, I. L., in Williams, P. J. (1990). Volatile norisoprenoid compounds as constituents of oak woods used in wine and spirit maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(11), 2045–2049. <https://doi.org/10.1021/jf00101a009>

Siebert, T. E., Barker, A., Pearson, W., Barter, S. R., de Barros Lopes, M. A., Darriet, P., Herderich, M.

J., in Francis, I. L. (2018). Volatile Compounds Related to 'Stone Fruit' Aroma Attributes in Viognier and Chardonnay Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(11), 2838–2850. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05343>

Slaghenaufl, D., Vanzo, L., Luzzini, G., Arapitsas, P., Marangon, M., Curioni, A., Mattivi, F., Piombino, P., Moio, L., Versari, A., Ricci, A., Segade, S. R., Rolle, L., in Ugliano, M. (2022). Monoterpenoids and norisoprenoids in Italian red wines: This article is published in cooperation with Macrowine 2021, 23-30 June 2021. *OENO One*, 56(3), Article 3. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2022.56.3.5387>

Slovenski standard. SIST ISO 5492, Senzorična analiza, Slovar: Ekvivalenten ISO 5492:1992 (Version 1st edition). (1997). Urad Republike Slovenije za standardizacijo in meroslovje. <https://plus.cobiss.net/cobiss/si/sl/bib/um/65856768>

Spillman1, P. J., Sefton, M. A., in Gawel, R. (2004). The contribution of volatile compounds derived during oak barrel maturation to the aroma of a Chardonnay and Cabernet Sauvignon wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(3), 227–235. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2004.tb00026.x>

Šuklje, K., Zhang, X., Antalick, G., Clark, A. C., Deloire, A., in Schmidtke, L. M. (2016). Berry Shriveling Significantly Alters Shiraz (*Vitis vinifera* L.) Grape and Wine Chemical Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(4), 870–880. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05158>

Sumby, K. M., Grbin, P. R., in Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*, 121(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.004>

Summerson, V., Gonzalez Viejo, C., Pang, A., Torrico, D. D., in Fuentes, S. (2021). Review of the Effects of Grapevine Smoke Exposure and Technologies to Assess Smoke Contamination and Taint in Grapes and Wine. *Beverages*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/beverages7010007>

Tominaga, T., Baltenweck-Guyot, R., Gachons, C. P. D., in Dubourdieu, D. (2000). Contribution of Volatile Thiols to the Aromas of White Wines Made From Several *Vitis vinifera* Grape Varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51(2), 178–181. <https://doi.org/10.5344/ajev.2000.51.2.178>

Wang, S., Chen, P., in Dang, H. (2019). Lactic Acid Bacteria and γ -Aminobutyric Acid and Diacetyl. In W. Chen (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Bioengineering and Industrial Applications* (pp. 1–19). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7283-4_1

Wei, Y., Chen, Z., Zhang, X.-K., Duan, C.-Q., in Pan, Q.-H. (2021). Comparative Analysis of Glycosidic Aroma Compound Profiling in Three *Vitis vinifera* Varieties by Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.694979>

Xue, S.-J., Zhang, J.-R., Zhang, R.-X., Qin, Y., Yang, X.-B., Jin, G.-J., in Tao, Y.-S. (2022). Oxidation-reduction potential affects medium-chain fatty acid ethyl ester production during wine alcohol fermentation. *Food Research International*, 157, 111369. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111369>

Yuan, F., Feng, H., in Qian, M. C. (2015). C₁₃-Norisoprenoids in Grape and Wine Affected by Different Canopy Management. In S. B. Ebeler, G. Sacks, S. Vidal, in P. Winterhalter (Eds.), *ACS Symposium Series* (Vol. 1203, pp. 147–160). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1203.ch010>

Zhu, Y., Sun, M., Harrison, R., Jordan, B., Creasy, G., in Hofmann, R. (2022). Effects of UV-B and Water Deficit on Aroma Precursors in Grapes and Flavor Release during Wine Micro-Vinification and Consumption. *Foods*, 11(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/foods11091336>

3.

METABOLIZEM DUŠIKA – BIOKEMIJSKE PRETVORBE

Tatjana Radovanović Vukajlović

Center za raziskave vina, Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo, Univerza v Novi Gorici, Glavni trg 8,
Vipava
tatjana.radovanovic@ung.si

Vloga kvasovk in hranilnih snovi v alkoholni fermentaciji

Kaj potrebujejo kvasovke za rast?

Kvasovke so enocelični mikroorganizmi, naravno prisotni na kožicah grozdnih jagod. V odsotnosti kisika kvasovke sprožijo alkoholno vrenje oz. fermentacijo. V reakcijah alkoholnega vrenja kvasovke pretvorijo ogljikove hidrate (sladkor) v ogljikov dioksid (CO₂) in etanol. V spontanah fermentacijah grozdnega soka ali drozge sodelujejo različne vrste in sevi naravno prisotnih kvasovk. Na splošno pa velja, da so sevi kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* odporni na veliko koncentracijo etanola, zato proti koncu fermentacije največkrat te kvasovke prevzamejo dominantno vlogo.

Med fermentacijo se kvasovke seveda razvijajo in razmnožujejo, pri čemer za rast novih celic kvasovk potrebujejo kompleksna hranila, ki hkrati olajšajo potek same fermentacije. Ta hranila vključujejo makroelemente, kot sta ogljik (C) in dušik (N), mikroelemente – minerale (npr. kalcij (Ca), magnezij (Mg), mangan (Mn), cink (Zn), fosfat (P) in kalij (K)) ter rastne dejavnike (vitamini, steroli in nenasičene maščobne kisline). Glavni vir ogljika in energije za rast kvasovk predstavljajo grozdni sladkorji, ki so v grozdnem soku običajno prisotni v velikem presežku (pogosto skupaj presegajo 20 % m/v) glede na količino, ki jo kvasovke potrebujejo za maksimalno rast. Vsebnost dušika (N) v grozdnem soku je povprečno od 60 do 2400 mg/L (Amerine in sod., 1980; Ough, in sod., 1988) in je lahko omejujoč dejavnik rasti, če ga ni dovolj.

Potrebe kvasovk po dušiku in dušikovih spojinah v moštu in vinu

Za razmnoževanje potrebujejo kvasovke določene količine presnovljivega dušika, ki ga lahko uporabijo za

izgradnjo celic. Koncentracija topnega dušika v moštu se giblje med 0,1 in 1 g/L (Henschke in Jiranek, 1993). Vsebnost dušikovih spojin v grozdnem soku pa je odvisna od sorte grozdja, okužbe grozdja s sivo plesnijo *Botrytis cinerea* (te lahko porabijo hranila, namenjena kvasovkam), časa trgatve, uporabe gnojil, dodatka hranil za kvasovke in bistrenja mošta pred fermentacijo. Razlike v količini in obliki dušika v grozdnem moštu vplivajo na rast celic, hitrost fermentacije in toleranco kvasovk na etanol (Zoecklein in sod., 1995).

Glavne dušikove spojine v grozdnem soku so: aminokisline (25–30 %), polipeptidi (25–40 %), amonijak (3–10 %) in beljakovine (5–10 %). V majhnih koncentracijah so prisotni tudi nitrati, amini in vitamini, dušikove baze (npr. adenin in uracil s koncentracijami od 4 do 15 mg/L in od 4 do 8 mg/L, ki jih kvasovke lahko vgradijo v svoje nukleinske kisline) (Monteiro in Bisson, 1992).

Asimilacijski dušik in njegova razpoložljivost v moštu in vinu

Kot vir dušika kvasovke lahko asimilirajo samo amonijev ion (ki je glavni vir dušika za rast kvasovk in se najlažje asimilira) ter aminokisline (razen prolina). Grozdne jagode za optimalen razvoj potrebujejo večjo količino dušikovih spojin. Privzem dušika v vinski trti poteka v dveh vrhovih. Prvi največji privzem so zaznali v kabernikih (socvetju) od dveh tednov pred cvetenjem do štirih tednov po njem, ko se že oblikujejo grozdne jagode. Drugi največji privzem pa je na začetku dozorevanja grozdja. Med dozorevanjem se v grozdnih jagodah vsebnost amonijevega iona (NH_4^+) zmanjšuje, medtem ko se vsebnost organskega dušika povečuje (Verdenal in sod., 2020).

Večina dušika, prisotnega v grozdju, je v obliki glutamina, ki se v grozdni jagodi pretvori v druge aminokisline s transaminacijo. Vsebnost dušika v grozdu pa je lahko zelo različna, in sicer glede na sorto, letnik, podlago, vinogradniško prakso, namakanje in gnojenje. Na primer, v grozdju iz trt, ki so bile izpostavljene pomanjkanju vode, lahko pričakujemo manjšo koncentracijo dušika. V nekaterih primerih je vsebnost naravno prisotnih virov dušika (amonija in aminokislin v moštu) razmeroma nizka, kar je lahko omejujoč dejavnik za fermentacijo ter vodi do njenega upočasnevanja ali zaustavitve. Zato v vinarstvu ta primanjkljaj mošta pogosto rešujemo z dodajanjem amonijevih soli, ki so poznane kot hrana za kvasovke. Kljub temu da dodana sol omogoča normalen in predvidljiv potek fermentacije, se ne dodaja vsepovprek in brez upoštevanja priporočil in informacije o dejanski založenosti mošta z dušikom. Preveliki odmerki namreč lahko povzročijo ostanek dušika v vinu, kar vodi do mikrobiološke nestabilnosti v vinu in nastanka strupenega etil karbamata (Suárez-Lepe in Uthurry, 2007; Stevens in Ough, 1993).

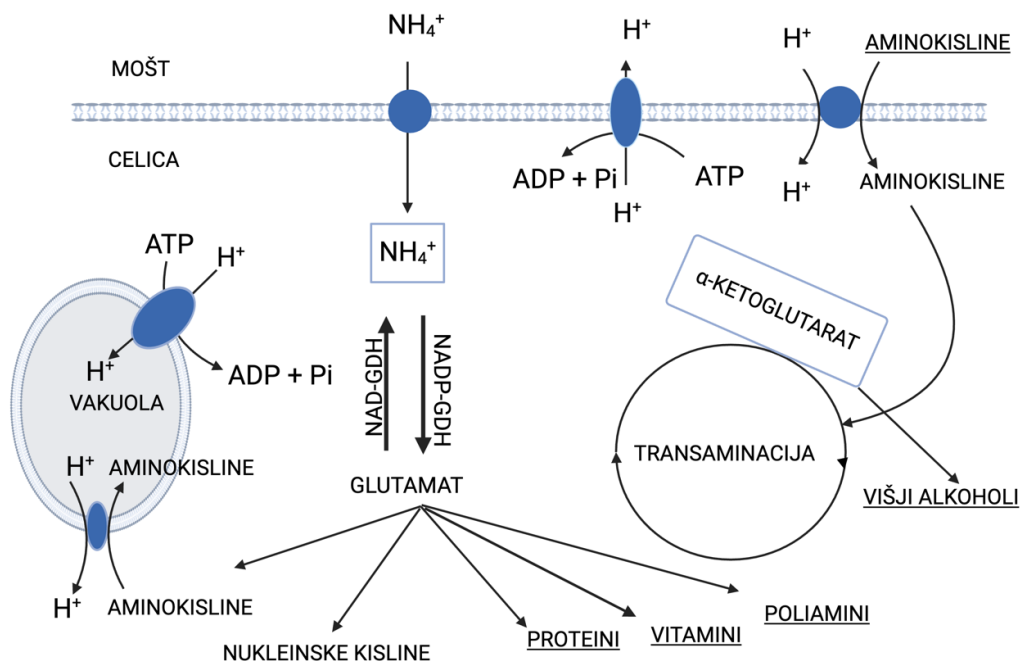
Transport in asimilacija dušikovih spojin pri kvasovkah med fermentacijo

Celice kvasovk privzamejo amonijak in aminokisline iz mošta skozi celično membrano in jih prenesejo v citoplazmo kvasovk z mehanizmom, imenovanim aktivni transport (Slika 1). Aminokisline se sprva kopičijo v vakuolah, nato pa se porabijo za sintezo beljakovin. Kvasovke potrebujejo dušik za sintezo novih beljakovin (in tudi drugih molekul), kot so encimi glikolize (ki omogočajo biopretvorbo glukoze in fruktoze v etanol) ali encimi permeaze, ki so v celični membrani kvasovk in odgovorni za transport aminokislin in sladkorjev v celice kvasovk.

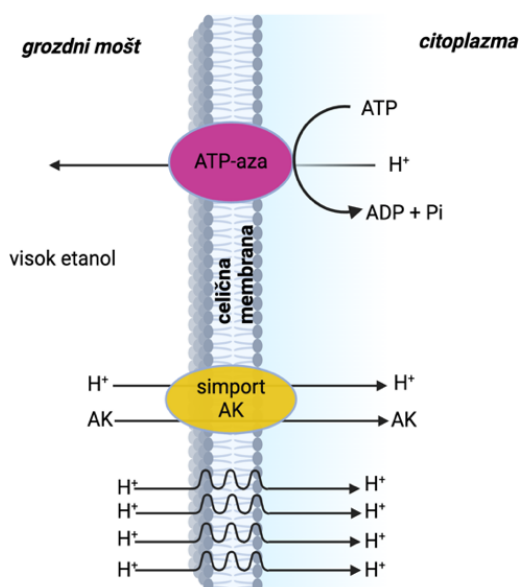
Beljakovine se porabijo tudi za izgradnjo celičnih struktur pri nastanku novih kvasnih celic. Učinkovita sinteza beljakovin kvasovk je ključna za učinkovit transport sladkorja in potek celotnega metabolizma kvasovk. Razpoložljivost dušikovih spojin neposredno spodbuja sintezo beljakovin, zato vsak dejavnik, ki vpliva na znotrajcelično raven dušika, neposredno vpliva tudi na metabolizem kvasovk.

Aminokisline potujejo torej iz mošta v celico z aktivnim transportom. Pri aktivnem transportu aminokislin, ki za nastanek molekul adenosin trifosfata (ATP – iz angl. *adenosine triphosphate*), zahteva prisotnost glukoze, se v isto smer prenaša tudi vodikov ion (H^+) (Cooper, 1982) (Slika 1, Slika 2). Ta oblika transporta se imenuje simport. Koncentracija vodikovih ionov v danem mediju je povezana z vrednostjo pH medija. Grozdni mošt ima običajno vrednost pH med 3 in 4, notranjost celice kvasovk pa med 6 in 7, kar pomeni, da je koncentracija ionov H^+ zunaj večja kot znotraj. Za optimalno delovanje kvasovk med fermentacijo mora kvasovka v citoplazmi vzdrževati stabilno vrednost pH. Med fermentacijo, ko se koncentracija etanola povečuje, postaja celična membrana kvasovk postopoma vse bolj prepustna za ione H^+ , kar posledično pomeni večjo pasivno difuzijo vodikovih ionov v celico kvasovk. Kvasovka nima nadzora nad tem spontanim dotokom ionov H^+ v citoplazmo, vendar lahko nadzoruje vnos ionov H^+ , ki vstopajo v celico med absorpcijo aminokislin. Z energijskega vidika je vzdrževanje stabilne vrednosti pH v citoplazmi celice zelo potratno. V zgodnji fazi fermentacije kvasovke absorbirajo aminokisline skupaj s spremljajočimi ioni H^+ in jih nato izločijo nazaj v mošt po poti, ki potrebuje vključitev energijsko bogatih molekul ATP-ja (encimi ATP-aze, glejte Sliko 2). Posledično kvasovke takrat ustavijo privzem aminokislin, tako prihranijo energijo in ohranijo stabilno notranjo vrednost pH. Učinek tega na absorpcijo aminokislin je, da ko kvasovke inokuliramo v mošt, začnejo nemudoma privzemati (asimilirati) ves razpoložljivi dušik. Dušikove spojine se tako najbolj asimilirajo v prvih nekaj urah fermentacije, v zgodnjih fazah, tj. prvih 20–30 g/L fermentiranega sladkorja. Potem se asimilacija aminokislin ustavi, da se prepreči vnos protonov v celico in posledično znižanje vrednosti pH.

Od vseh virov dušika se prav **amonijevi ioni** absorbirajo najhitreje, zato jih je najenostavneje uporabiti za hrano kvasovk. Dušik v obliki amonijevih ionov (NH_4^+) hitro vstopa v biosintezno pot aminokislin s pomočjo encima nikotinamid adenin dinukleotid fosfat ($NADP^+$) glutamat dehidrogenaze ($NADP$ -GDH). Po drugi strani je amonijak končni produkt razgradnje dušikovih spojin v reakciji, ki jo katalizira encim od nikotinamid adenin dinukleotida (NAD^+) odvisna glutamat dehidrogenaza (NAD -GDH). Aminokisline so podvržene reakciji transaminacije, v kateri ima glutamat ključno vlogo kot donor in akceptor aminoskupin (Carrascosa in sod., 2011). Amonijev ion (NH_4^+) (Slika 1) se v kvasno celico prav tako prenaša z aktivnim transportom kot aminokisline, vendar absorpcija poteka dlje časa kot pri aminokislinah in se torej ustavi pozneje med fermentacijo.



Slika 1. Shematski prikaz privzema in metabolizma dušikovih spojin v celici kvasovke (prirejeno po Carrascosa in sod., 2011, ter Llauro, 2002). Ustvarjeno v BioRender. Radovanović Vukajlović, T. (2025) <https://BioRender.com/ahxe0ap>.

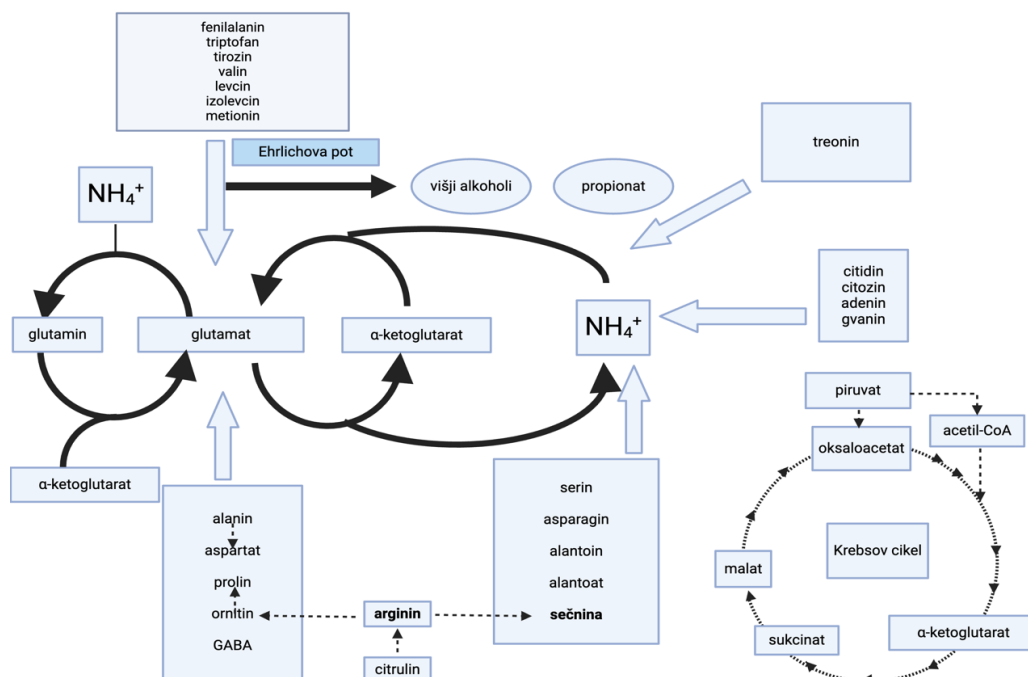


Slika 2. Transport aminokislin in učinek prisotnosti etanola na pasivni pretok protonov (prirejeno po Boulton in sod., 1996). Ustvarjeno v BioRender. Radovanović Vukajlović, T. (2025) <https://BioRender.com/0l4gqp3>.

Aminokisline v moštu

V grozdnem moštu najdemo različne aminokisline. Prevladujoči sta prolin in arginin, kadar je mošt pridelan iz grozdja vinogradov, v katerih se je uporabilo malo gnojil. Amerine in sod. (1980) je ugotovil, da koncentracija aminokislin v moštu variira med 65 in 1130 mg/L, odvisno od sorte, regije, časa trgatve, količine dušika v zemlji in gnojenja (Bell in sod., 1979). Arginin je večinoma v koži grozdja, zato postopki predelave grozdja, ki vključujejo drozganje in stiskanje, v primerjavi s stiskanjem celega grozda lahko

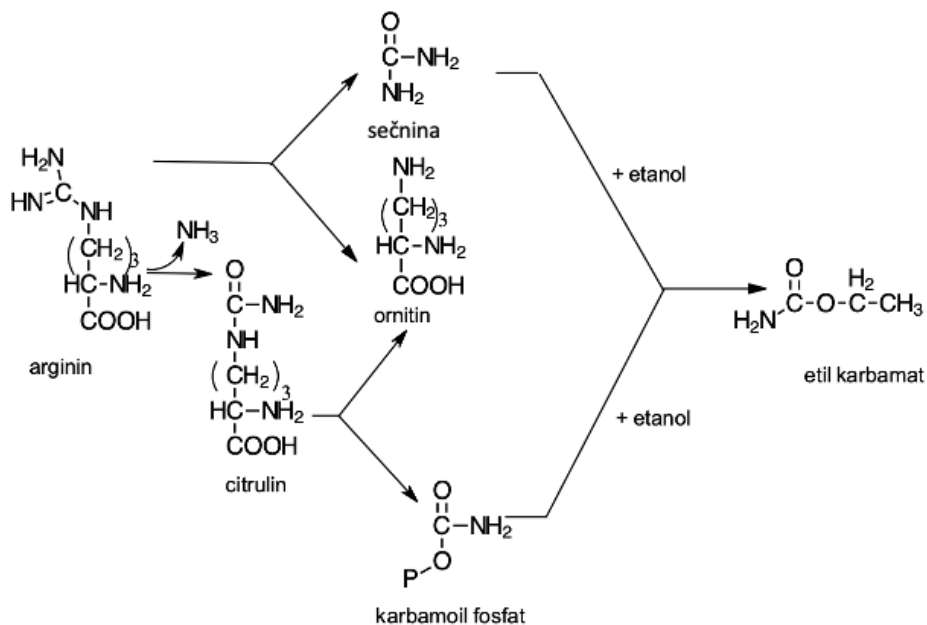
vplivajo na povečanje vsebnosti arginina v grozdnem soku. Študija, ki jo je objavil Petrovic s sod. (2019), je pokazala, da sta prolin in arginin najbolj zastopani aminokislini v moštu s povprečno koncentracijo 697,7 mg/L in 388,3 mg/L, le da prolin lahko doseže koncentracijo tudi 4000 mg/L (Bell in Henscke, 2005). Med bolj zastopanimi aminokislinami so še glutamat, alanin, serin in treonin. Z dodatkom gnojil trtam lahko glutamin postane glavna aminokislina v grozdju. Na splošno kvasovke najprej prevzamejo glutamat in amonijeve ione, ki imajo ključno vlogo v metabolizmu dušika pri kvasovkah, kot je razvidno iz Slike 3. Glutamin je pri kvasovkah pomemben, ker se lahko razgradi na glutamat in amonijak (Godard in sod., 2007; Jiranek in sod., 1995). Nasprotno pa so najmanjše izmerjene koncentracije aminokislin glicina (3,2 mg/L), metionina (3,6 mg/L) in lizina (3,9 mg/L) (Petrovic in sod., 2019).



Slika 3.
Metabolizem
dušika pri
kvasovkah
(prirejeno po
Godard in sod.,
2007). Ustvarjeno
v BioRender.
Radovanović
Vukajlović, T.
(2025)
<https://BioRender.com/18g8uhq>.

Absorpcija aminokislin je v veliki meri odvisna od relativnih koncentracij aminokislin v moštu. Kvasovke prevzamejo aminokislino in jih večinoma skladiščijo v vakuolah (Slika 1) ter v kasnejših fazah rasti uporabijo za sintezo beljakovin (Jiranek in sod., 1995). Ko anorganski dušik (v obliki amonijevih ionov) ni več dostopen oz. se porabi, kvasovke začnejo razgrajevati shranjene aminokislino kot vir dušika za biosintezo. Na koncentracije aminokislin v grozdnem moštu zelo vplivajo vinogradniške prakse in klimatske razmere. Velike koncentracije prolina so povezane s pomanjkanjem vode (vodnim/sušnim stresom) pri vinski trti, kar pa na dostopnost dušika ne vpliva, ker ga kvasovke ne morejo izkoriščati kot vir amonijaka v aerobnih razmerah. Najbolj dostopna aminokislina za kvasovke v grozdju ob trgatvi je arginin. Kljub visoki vsebnosti arginina kvasovke najprej porabljajo amonijak in glutamat kot vir dušika. Arginin je pomemben vir dušika za kvasovke, vendar je njegovo kopičenje v njih odvisno od prisotnosti drugih prednostnih virov dušika, kot je amonijev ion (Henscke in Jiranek, 1993; Jiranek in sod., 1995). Dodatek hrane kvasovkam v obliki diamonijevega fosfata – DAP (diamonijev hidrogen fosfat $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) torej zavira uporabo arginina, dokler se amonij ne porabi. Arginin v reakciji z encimom arginazo pripelje do tvorbe ornitina in sečnine. Ti dve spojini pod določenimi pogoji tvorita glutamat in amonijev ion, ki sta prekurzorja biosinteze aminokislin v kvasovkah (Large, 1986) (Slika 4) na eni strani ali karbamoil fosfat na drugi. Sečnina pa

se lahko, odvisno od seva kvasovk, izloči v mošt, tako da se s tem tudi uravna količina dušika v kvasnih celicah. Prisotnost sečnine v vinu ni problematična, vendar lahko med staranjem vina reagira z etanolom in tvori potencialno rakotvoren etil karbamata (Stevens in Ough, 1993; Mirvish in sod., 1994). Količine etil karbamata v vinu se v nekaterih državah nadzorujejo tudi z zakonodajo, medtem ko za Slovenijo o tem ni podatka, se pa vsebnost etil karbamata lahko določi v različnih boljše opremljenih kontrolnih laboratorijih v Sloveniji, ki lahko uporabijo certificirane metode.



Slika 4. Nastanek etil karbamata iz citrulina ali sečnine (prirejeno od Ribéreau-Gayon, 2000). Ustvarjeno v BioRender. Radovanović Vukajlović, T. (2025) <https://BioRender.com/gj608r9>.

Če so dostopne zadostne količine asimilacijskega dušika v obliki amonijaka, glutamata in glutamina, se razgradnja arginina zmanjšuje in s tem tudi tvorba etil karbamata (Mirvish in sod., 1994; Stevens in Ough, 1993; Suárez-Lepe in Uthurry, 2007).

Kvasovke lahko aminokisline neposredno porabijo za sintezo beljakovin. Koncentracije posameznih razpoložljivih aminokislin niso vedno v skladu s trenutnimi potrebami celice, tako da je možno pomanjkanje ali presežek omenjenih aminokislin. Kvasovke pa lahko presežne aminokisline pretvorijo v tiste, ki jih trenutno potrebujejo. Ob pomanjkanju amonijevih soli lahko kvasovke začnejo presnavljati tudi aminokisline, ki vsebujejo žveplo, kot sta cistein in metionin. Kot produkt nastaja vodikov sulfid (H₂S) in v nadaljnjih stopnjah fermentacije, ob neukrepanju kletarja, tudi merkaptani (Vos in sod., 1978; Vos in Gray, 1979), ki pa na kakovost vina vplivajo negativno zaradi neprijetnega vonja. Pri odpravljanju tovrstnih napak vina je pomemben ukrep dodatek amonijevih soli.

Metode za določanje koncentracije asimilacijskega dušika za kvasovke

Da bi lahko dodali primerno količino dušikovih hranil, je treba zaradi sezone variabilnosti založenost z dušikom tudi meriti. Pomemben vir kvasovkam dostopnega dušika v grozdju in moštu so amonijeve soli (NH₄⁺) ter aminokisline z dostopnim dušikom, poznane pod skupnim imenom oziroma kratico

YAN (iz angl. *yeast assimilable nitrogen*, slov. asimilacijski dušik za kvasovke). Ti viri dušika so poleg sladkorja najpomembnejši vir hranil za optimalno delovanje kvasovk med fermentacijo mošta v vino. YAN predstavlja seštevek dušika anorganskega in organskega izvora. Amonijevi ioni predstavljajo anorganski vir, prosti aminokislinski dušik FAN (iz angl. *free amino nitrogen*), proste α -aminokisliline in majhni peptidi pa organski vir dušika.

$$\text{YAN} = \text{dušik iz amonijevih ionov} + \alpha\text{-aminokislinski dušik} \quad (1)$$

Za izračun YAN-a moramo sešteti tako koncentracijo amonijevih ionov kot FAN, oboje pa izraziti v ekvivalentih dušika v mg/L, kot je predstavljeno v Enačbi 2.

$$\text{YAN} = 0,824 \times \text{koncentracija amonijevih ionov} + \text{FAN} \quad (2)$$

Faktor 0,824 pretvori koncentracijo amonijaka v ekvivalente dušika.

Za določitev vrednosti YAN se izmeri FAN, ki vključuje tako α -aminokisliline kot tudi majhne peptide (velikost od 1 do 3 aminokislinski ostanki). Oba vira (amonijeve ione in FAN) kvasovka potrebuje za razvoj in metabolizem. Celokupni dušik (N) v moštu tako poleg YAN-a zajema tudi peptide in proteine, ki pa nimajo pomembne vloge v prehrani kvasovk med fermentacijo. Priporočene minimalne koncentracije YAN-a za popolno alkoholno fermentacijo so med 140 in 160 mg/L (Bell in Henschke, 2005).

Oba vira dušika se lahko določita v moštu z ločenimi analiznimi metodami. Analizo amonijaka lahko izvedemo z encimskim diagnostičnim kompletom in UV/VIS spektrofotometrom (obstajajo različni komercialno dostopni kompleti), ali pa s posebno ionoselektivno elektrodo, ki je občutljiva za amonijeve ione in jo lahko pritrdimo na večino merilnikov vrednosti pH.

Za analizo aminokislinskega dušika v grozdnem moštu poznamo več načinov:

Formolna titracija je postopek titracije aminokislin s kalijevim hidroksidom v prisotnosti formaldehida. Uporablja se za določanje vsebnosti posameznih aminokislin in proteinov v različnih vzorcih (Sørensen, 1907).

NOPA (angl. *nitrogen by o-phthalaldehyde*), spektrofotometrična metoda za določanje aminokislinskega dušika z reagentom *o*-ftalaldehid/N-acetil-L-cistein pri valovni dolžini 335 nm, pa tudi različni encimski testi (Dukes in Butzke, 1998; Iland in sod., 2021; Weeks in Henscke, 2007).

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC, iz angl. – *High Pressure Liquid Chromatography*) v kombinaciji s fluorescenčnim (FLD) ali ultravijoličnim (UV) detektorjem. Vzorci zahtevajo derivatizacijo aminokislin z o-ftalaldehidom, z metodo pa določamo posamezne aminokisline (Cooper in sod., 1984; Illand in sod., 2021; Sørensen in sod., 1999).

Spektroskopija v bližnjem infrardečem predelu (NIR – iz angl. *Near Infra-Red Spectroscopy*) (Cozzolino in sod., 2006).

Vsebnosti virov dušika v grozdju lahko zelo variirajo glede na letnik, sorto in vinograd, zato posploševanje ni primerno, še posebno če podatki o določeni sorti temeljijo na raziskavah iz drugih držav ali na drugačnih metodah (nekateri encimski kompleti lahko dajo nekoliko drugačne rezultate). Illand in sod. (2021) pravijo, da koncentracija YAN-a v groznem moštu lahko variira od 130 do 240 mg/L (po nekaterih virih lahko tudi od 50 do 450 mg/L), prav tako lahko med sortami variira razmerje med anorganskim in organskim virom dušika, in to vedno v korist organskega. Po avtorjih Bell in Henschke (2005) je priporočljiva vsebnost dušika za uspešno fermentacijo med 140 in 150 mg/L.

Skupna potreba po dušiku med fermentacijo je odvisna od uporabljenega seva kvasovk, začetne koncentracije sladkorja in specifičnih pogojev fermentacije. Nekateri sevi kvasovk imajo večjo potrebo po dušiku kot drugi, zato je pomembno poznati karakteristike uporabljenega seva in seveda spremljati začetno založenost z asimilacijskim dušikom v moštu. Sevi kvasovk z manjšo potrebo po dušiku morda dejansko ne potrebujejo dodatnega dušika ali dušikovih spojin. Na vrednost YAN-a vpliva tudi prisotnost kisika, ki je kvasovkam potreben za sintezo sterola in nenasičenih maščobnih kislin. Te spojine omogočajo rast in popolno fermentacijo sladkorjev v moštu ter jim pomagajo, da preživijo velike koncentracije alkohola na koncu fermentacije. Temperatura prav tako vpliva na koncentracijo YAN-a, saj imajo pri višji temperaturi fermentacije kvasovke večjo potrebo po dušiku. Vrednost YAN-a je treba obravnavati kot indikativno, da bi se zadovoljile minimalne potrebe po dušiku in preprečile resne težave (O’Kennedy in Reid, 2008) med fermentacijo.

Kot pravijo Illand in sod. (2021), lahko pri premajhni koncentraciji YAN-a med fermentacijo pričakujemo povečano koncentracijo H₂S (vodikov sulfid) in drugih neželenih arom, ki vsebujejo žveplo. Manjše koncentracije dušika omejujejo nastanek prekurzorjev aminokislin z žveplom, kot sta metionin in cistein, ki jih kvasovke sintetizirajo med fermentacijo. Posledično se sulfid, ki nastane iz sulfata in sulfitnih ionov, za vgradnjo v te prekurzorje nakopiči in difundira iz celice v mošt. Večina vinarjev rešuje pomanjkanje dušika z dodajanjem diamonijevih soli fosfata (DAP) in/ali hranil, ki vsebujejo dušik (kot so aminokisline in peptidi) že kar v mošt. Meritve koncentracije YAN-a v moštu pred dodatkom povedo vinarju, koliko teh dodatkov je potrebno za uspešen potek fermentacije. Zadostna koncentracija YAN-a preprečuje nastanek H₂S ali drugih neželenih žveplastih spojin in upočasnitev fermentacije ter omogoča nastanek zelenih arom. Merjenje vrednosti YAN-a zagotavlja informacijo o založenosti z dušikom v moštu, ne pa informacije o drugih potrebnih hranilih. Te hranilne snovi je treba dodajati, najbolje na podlagi priporočil proizvajalcev kvasovk.

Pri preveliki začetni koncentraciji YAN-a (večji od 150 mg/L) lahko po dodatku DAP-a včasih nastanejo H₂S ali druge žveplave spojine. Takšna fermentacija lahko poteka preveč burno, kar lahko negativno vpliva na sam proces. Pri rdečih moštih lahko prevelika koncentracija YAN-a povzroči nastanek tiolov, kar

ni skladno z želenim aromatskim profilom vina. Prevelika koncentracija YAN-a prav tako spodbuja rast neželenih mikroorganizmov.

Med letniki vsebnost YAN-a v moštih lahko znatno variira, zato ga je priporočljivo določati pred vsako trgatvijo. Pri tem imajo pomembno vlogo tudi izkušnje vinogradnika oziroma vinarja, ki na podlagi poznavanja posameznih vinogradov in značilnosti mošta lahko predvidi, katero grozdje ali mošt bi lahko imelo težave z nezadostno vsebnostjo kvasovkam dostopnega dušika. V tem primeru je vinar praviloma pozornejši tako, da kakovost mošta dodatno spremlja z analizami, kar omogoča boljše upravljanje fermentacijskih procesov (Iland in sod., 2021).

Oblike dodajanja dušika v grozdni mošt

Dodajanje dušika v grozdni mošt je že dobro uveljavljena enološka praksa. Najpogosteje se dušik dodaja v obliki DAP-a, ki zagotavlja lahko dostopen vir dušika in je bistven za presnovo in rast kvasovk. **DAP vsebuje 21,54 % (m/m) dušika glede na izračunan masni delež.** Če želimo povečati YAN z začetnih 100 mg/L na priporočeno vrednost 150 mg/L, je treba moštu dodati 45 g DAP/hL (450 mg/L). Pri dodajanju dušika v obliki DAP so v nekaterih državah zakonske omejitve glede dovoljene količine diamonijevega fosfata v vinu, ki jih morajo vinarji upoštevati. Amonijev ion, prisoten v diamonijevem fosfatu (DAP-u), se lahko vgradi v celice kvasovk, ki ga nato uporabljajo za svoj metabolizem. V Evropski uniji je dovoljeni dodatek od 30 g DAP-a na hL mošta (300 mg $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4/\text{L}$).

Dodatek 100 mg DAP-a prispeva približno 22 % vsebnosti dušika – kar pomeni povečanje YAN-a za 22 mg/L (O’Kennedy in Reid, 2008). DAP dodajamo enkratno ali postopoma v korakih, pri čemer količino vedno določimo na podlagi začetne koncentracije YAN-a v moštu. DAP lahko dodajamo tudi med fermentacijo v količinah med 100 do 300 mg/L. Običajno jih dodamo po prvi tretjini pretečene fermentacije ali če opazimo zastoj fermentacije, vendar ne kasneje od 60 % pretečene fermentacije. Dodatek DAP-a je priporočljiv tudi, ko med fermentacijo zaznavamo vodikov sulfid in je koncentracija YAN-a manjša od 100 mg/L. Odsvetuje se, da čakamo na zelo upočasnjeno fermentacijo, saj je v tem primeru učinkovitost dodatka DAP-a zelo omejena.

Sečnina, ki se je včasih tudi uporabljala kot dodaten vir dušika, danes večinoma ni več dovoljena, ker lahko povzroči nastanek potencialno karcinogenega etil karbamata (Mirvish in sod., 1994). Z alternativnimi viri dušika, kot so na primer tekoči amonijak (ni dovoljen v nekaterih državah) ali soli amonijevega sulfata, se lahko izognemo presežku fosfata. V Južni Afriki je uporaba tekočega amonijaka, primerne za živila, prav tako dovoljen dodatek dušika med fermentacijo. Rastopina amonijaka, ki se uporablja v industriji, ima 25-odstotno vsebnost dušika, tako da je dodatek najmanj 40 mL/hL te raztopine enakovreden 100 mg/L YAN-a. Prednost uporabe tekočega amonijaka je, da s tem ne dodajamo fosfatov, zato se lahko po potrebi uporabijo veliko večji odmerki. Nekateri vinarji poleg DAP-a uporabljajo še hranila, ki vsebujejo aminokisline, minerale, vitamine in/ali druge sestavine, pomembne za rast kvasovk (Iland in sod., 2021). Med drugimi viri dušika se uporabljajo tudi inaktivirane kvasovke ali kvasni avtolizati, ki se dodajajo poleg DAP-a (Iland in sod., 2021). Pri uporabi teh hranilnih dodatkov je nujno upoštevati navodila proizvajalcev in zakonodajo – pri tem ne smemo pozabiti niti na potencialni izvoz vina v države z morda drugačno zakonodajo od države pridelovalke, na kar morajo biti vinarji tudi pozorni.

V praksi je pomembno, da vinarji na začetku fermentacije omogočijo kvasovkam, da privzamejo naravno prisotne aminokisline, saj proizvedeni etanol kasneje zavira absorpcijo aminokislin. Dejavnika, ki lahko negativno vplivata na zgodnji privzem aminokislin, sta presežena koncentracija dodanega anorganskega dušika (npr. DAP-a) v mošt in bistrenje mošta z bentonitom (sredstvo za bistrenje mošta/vina) v zgodnjih fazah fermentacije. Amonijevi ioni so za kvasovke zaželen vir dušika, saj jih lahko absorbirajo lažje kot aminokisline, ki zahtevajo dodatne reakcije za sproščanje dušika. Zgodnje dodajanje amonijevih ionov spodbuja rast kvasovk in tako povečuje potrebo po dušiku pozneje med fermentacijo. Čezmerna uporaba DAP-a lahko pripelje do zakisanosti vina, ker kvasovke privzamejo spremljajoče vodikove ione, nato pa se izločajo v medij, da ohranijo celično citoplazmo pri nevtralnem pH-ju (O’Kennedy in Reid, 2008).

Bentonit veže beljakovine in aminokisline precej nespecifično. Dodatek bentonita v začetnih fazah pridelave vina lahko odstrani aminokisline, ki so ključne za delovanje kvasnih celic. Nekateri aminokisline so tudi pomembni prekursorji arom, tako da se z njihovo odstranitvijo iz soka lahko odstranijo arome vina in zmanjša kakovost vina. Zato je priporočljivo stabilizirati beljakovine med fermentacijo šele, ko kvasovke absorbirajo največjo količino aminokislin (O’Kennedy in Reid, 2008).

Kdaj je treba dodati DAP?

DAP se lahko doda kot enkratni odmerek ali večkrat med fermentacijo. Če se DAP doda na začetku fermentacije, lahko povzroča zmanjšan vnos aminokislinskega (ali malih peptidov) dušika. Dodatek amonijevih ionov zgodaj med fermentacijo bo delno zaviral privzem dušika aminokislin, saj je amonijev ion eden najenostavnejših virov dušika za kvasovke. Poleg tega presežek dušika na začetku fermentacije spodbuja rast in razmnoževanje kvasovk ter tako povečuje potrebo po dušiku pozneje med fermentacijo. Povečana je tudi presnova kvasovk in ustvarjanje toplote, ki se sprošča med reakcijo alkoholne fermentacije. Če dodatek dušikovih hranil ni nadzorovan, je možen nenaden porast temperature, znan kot vročinski vrh, ki lahko povzroči poškodbe kvasovk in s tem zmanjša njihovo sposobnost preživetja, zlasti proti koncu fermentacije. Večina moštov naravno vsebuje zadostno količino dušika za začetek fermentacije, razen če je grozdje okuženo s plesnijo.

V praksi se najpogosteje dodaja kar pri inokulaciji kvasovk, kar pa lahko spodbudi rast kvasovk *Nesaccharomyces*. Nekateri strokovnjaki predlagajo dodajanje DAP-a 48 in 72 ur po inokulaciji kvasovk v eksponentni fazi rasti (v prvi tretjini fermentacije ali pri proizvodnji H₂S) (Mendes-Ferreira in sod., 2010; Thomas in sod., 1993). Vos in sod. (1978) ter Sablayrolles in sod. (1996) so pokazali, da je enkratni odmerek, dodan sredi fermentacije, enako učinkovit kot enkratni odmerek na začetku fermentacije. Beltran s sod. (2005) je ugotovil, da je dodatek amonijaka pozno v fermentaciji nezaželen, ker kvasovke *Sacharomyces* v tej fazi ne porabljajo anorganskega dušika. Čezmerna količina amonijaka v vinu pa lahko spodbuja rast kvarljivih mikroorganizmov po končani fermentaciji.

Količina in čas dodajanja DAP-a grozdnemu moštu lahko vpliva na presnovo aminokislin. Ko se koncentracija amonijaka zmanjša, se shranjene aminokisline presnovijo, kar lahko vodi v slabšo kakovost vina. Pomanjkanje amonijaka lahko povzroči ne le nastanek H₂S, ampak tudi sečnine ali večjih koncentracij višjih alkoholov (glejte Sliko 4). Preprečevanje tvorbe H₂S ni edini namen dodajanja dušika. H₂S lahko vedno odstranimo bodisi s pretokom in zračenjem bodisi z enološkimi čistili, ne moremo pa odstraniti

nastale sečnine in višjih alkoholov. Med fermentacijo je treba dodati amonijak v pravih koncentracijah ob pravem času, da se omogoči optimalen vnos aminokislin in amonijaka v celice kvasovk. Upoštevati je treba začetno vrednost YAN-a v grozdnem moštu, metabolizem kvasovk in izbrano vrsto kvasovk. Vsako fermentacijo je treba obravnavati ločeno, ne moremo posploševati, saj ima grozdni sok (mošt) drugačno sestavo, različni pa so tudi drugi pogoji fermentacije. Upravljanje vsebnosti dušika je torej pomemben dejavnik pri pridelavi kakovostnega vina (Ugliano in sod., 2007). Raziskave, ki so jih objavili Vos in sod. (1978) ter Vos in Gray (1979), so pokazale, da dodatek DAP-a v mošt ni pomemben samo pri zagotavljanju optimalne učinkovitosti fermentacije, ampak pomembno vpliva tudi na profil arome in okusa vin. Če se fermentacija zaključi z majhno količino proizvedenega H_2S ali brez njega, to ne pomeni, da je bila uspešna z vidika arome in okusa vina.

Pomembno si je tudi zapomniti, da zvišanje temperature fermentacije poveča potrebo po dušiku, saj se pri višji temperaturi spodbuja rast kvasovk, fermentacija je hitrejša in torej večja poraba dušikovih spojin v izgradnji novih celic. Če je dodatek dušika v moštu neustrezen, je tudi potencialno nastajanje H_2S v moštu večje pri višjih temperaturah. Absorpcija dušika v kvasovke je odvisna od razpoložljivosti kisika v moštu/drozgi. Dodajanje kisika moštu (npr. s prečrpavanjem) lahko pospeši absorpcijo dušika, drugače kot pri fermentacijah, ki potekajo v anaerobnih pogojih. Večje ko so začetne koncentracije grozdnega sladkorja, večje bodo potrebe po dušiku. Kljub temu dodajanje prevelikih količin amonijaka med fermentacijo ni priporočljivo. Čezmerni dodatki amonijaka lahko povzročijo prisotnost neasimiliranega amonijaka na koncu fermentacije. To lahko vpliva na mikrobno stabilnost vina. Mlečnokislinske bakterije ne morejo asimilirati amonijaka, lahko pa to storijo različni mikroorganizmi, ki povzročajo kvarjenje, npr. *Brettanomyces*. Prevelik dodatek DAP-a lahko vinu daje slan okus ter povzroči nastajanje etil acetata in včasih sulfidov (zaradi neravnovesja v razmerju pantotenske kisline in YAN-a). Nezadostne koncentracije dušika lahko povzročijo redukcijske arome v vinu, pa tudi prevelike koncentracije neprijetno dišečih višjih alkoholov in majhne koncentracije prijetno dišečih estrov. Preveč dodatkov lahko spodbudi proizvodnjo etil acetata in jantarne kisline v kvasovkah. Če so prisotni v preveliki koncentraciji, lahko negativno vplivajo na organoleptiko vina. Zmerni dodatki torej zagotavljajo optimalno ravnovesje prijetnih dišečih estrov in višjih alkoholov ter odsotnost negativnih arom, povezanih s previsokim ali prenizkim YAN-om. Iz tega je razvidno, da je treba strogo nadzorovati dodajanje dušika med fermentacijo in da standardno dodajanje DAP-a (npr. 30 g/hL) ali enkratni dodatek samo na podlagi vrednosti YAN-a ne bo zadovoljiva rešitev (Vos in sod., 1978; Vos, 1993).

Povezava med pomanjkanjem dušika in nastajanjem neprijetnega vonja po žveplu

Obstaja obratno sorazmerje med pomanjkanjem dušika in nastajanjem vodikovega sulfida, tj. manj ko je dušika, ki ga kvasovke lahko asimilirajo, več bo nastalo vodikovega sulfida (kar je že objavljeno v študiji avtorjev Jiranek in Henschke, 1991). V najslabšem primeru pomanjkanje asimilacijskega dušika lahko ustavi fermentacijo. To se zgodi, ker je razpolovna doba beljakovin (v citoplazemski membrani), ki transportirajo sladkorje v celice kvasovk, približno šest ur in se redno razgrajujejo, zato je za sintezo novih transportnih beljakovin potreben asimilacijski dušik. Če za sintezo aminokislin in kasnejšo sintezo

beljakovin nimamo asimilacijskega dušika, transportnih beljakovin ni mogoče proizvesti in sladkorja ni mogoče transportirati v kvasno celico. Vendar pa se transport sladkorja v kvasno celico popolnoma zaustavi šele 50 ur po popolni porabi dušika. Pri pomanjkanju dušika za kvasovke med fermentacijo večinoma nastane žveplu podoben neprijeten vonj, kot so na primer vodikov sulfid, merkaptani in acetatni estri, ki vsebujejo žveplo (Jiranek in Henscke, 1991). Te spojine začnejo nastajati 30 minut po porabi amonijaka. Vodikov sulfid in merkaptane iz pokvarjenih vin učinkovito odstranijo prečrpavanja in tretmaji z bakrom, vendar acetatni estri, ki vsebujejo žveplo, ostanejo v končnih vinih, kjer sčasoma hidrolizirajo v vodikov sulfid in merkaptane; to pa pomeni težavo v že stekleničenem vinu.

Vzroki za nastanek neprijetnih vonjev v moštu in vinu

Če fermentacija poteka brez težav, je najpomembnejši vir proizvodnje vodikovega sulfida redukcija sulfata po sulfat reducirajoči poti. Kvasovke uporabljajo proizvedeni vodikov sulfid za biosintezo aminokislin, ki vsebujejo žveplo (metionin in cistein). V odsotnosti znotrajceličnih virov dušika se proces redukcije sulfata ali sulfita nadaljuje, pri čemer nastane presežek H_2S , ki ga ni mogoče vgraditi v aminokisline in se nato izloči v medij – to je fermentirajoči mošt. To nam pomaga razumeti, zakaj pravočasen dodatek dušika pomaga odpraviti vonj po H_2S v fermentiranem moštu, če ga zaznamo dovolj zgodaj. Zgodnje nastajanje majhnih količin H_2S v moštu ni nujno problem za kakovost vina, saj lahko kvasovke še vedno prevzamejo dodan dušik in ga porabijo za sintezo aminokislin. Ogljikov dioksid (CO_2), ki je nastal med fermentacijo in izhaja v prostor, pa lahko pomaga pri odstranjevanju H_2S iz mošta. Za kakovost vina je bistvena količina vonjev, podobnih žveplu, ki ostanejo na koncu fermentacije zaradi pozne porabe dušika in kvasovk, ki niso učinkoviti pri sprejemanju dodanega dušika in proizvodnji zadostne količine CO_2 (Jiranek in Henscke, 1991).

Velike količine žveplovega dioksida (SO_2) (več kot 80 ppm), ki se dodajajo pri pecljanju in drozganju mošta, lahko pospešijo nastanek žveplu podobnih vonjev, saj žveplovemu dioksidu omogočijo, da vstopi neposredno v celico kvasovk, tako da se izogne sulfat reducirajoči poti. Vendar pa tako veliki dodatki v začetnih fazah pridelave vina niso običajna praksa, saj lahko inhibirajo metabolizem kvasovk.

Na nastanek neprijetnega vonja po žveplu lahko vpliva tudi motnost mošta/vina, ki jo izražamo v enotah NTU (angl. *Nephelometric Turbidity Unit*). Motnost se, v odvisnosti od tipa pridelanega vina, giblje med 50 in 250 NTU. Načeloma velja, da manjša ko je motnost mošta, bolj izražena je kasneje aromatika pridelanega vina. Če je NTU prenizek (manjša motnost mošta), je mošt verjetno osiromašen s hranilnimi snovmi, kar ima za posledico nizek YAN in lahko povzroči neprijeten vonj po žveplu. Previsoka motnost pa po drugi strani lahko povzroči nastanek neželenih arom po žveplu (Zoecklein, 2008).

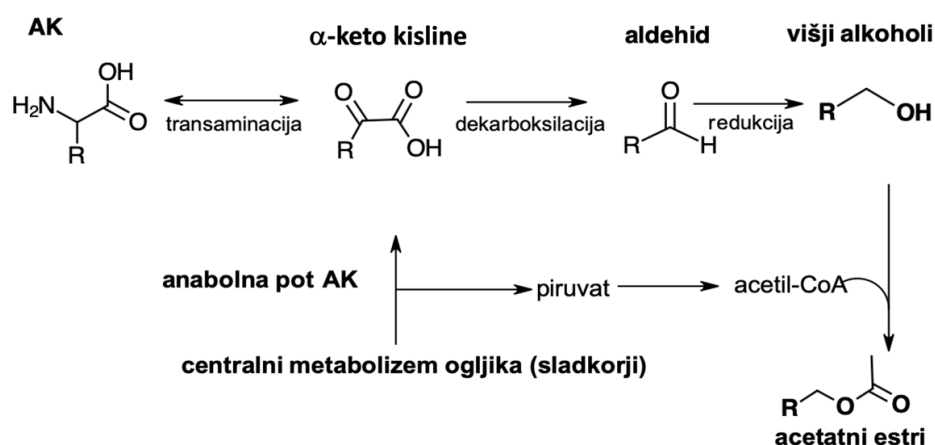
Postopki pridelave vina, kot je npr. hladna maceracija, lahko pospešijo rast kvasovk *Nesaccharomyces* (npr. *Kloeckera spp.*). Ta rast lahko povzroči porabo naravno prisotnih aminokislin in mikrohranil, kar bi lahko vplivalo na proizvodnjo H_2S . Drugi viri nastanka neprijetnega vonja, podobnega žveplu, so lahko razgradnja metionina kot vira aminoskupine, pomanjkanje pantotenske kisline (vitamina) v moštih z visoko vsebnostjo YAN-a ter zmanjšanje vsebnosti elementarnega žvepla, ki se uporablja kot fungicid v vinogradih, ali pa uporaba fitofarmacevtskih sredstev, ki vsebujejo žveplo. Ob običajnem poteku

fermentacije (to je brez težav, upočasnitev ipd.) omenjeni dejavniki ne pripomorejo bistveno k nastanku H_2S (Wang in sod., 2003; Zoecklein, 2008).

Vloga dušika v metabolizmu hlapnih spojin

Poleg etanola in ogljikovega dioksida, ki sta glavna produkta alkoholne fermentacije, kvasovke proizvajajo še širok spekter sekundarnih metabolitov, kot so na primer estri, hlapne maščobne kisline, višji alkoholi in hlapne žveplove spojine. Ti metaboliti pomembno prispevajo k okusu in aromi vina. Kvasovke vrste *S. cerevisiae* običajno uporabljajo amonijak ali glutamin kot glavna vira dušika. Če pa zmanjka teh virov, lahko kvasovke začnejo razgrajevati asimilirane aminokisline po Ehrlichovi poti (Slika 5), da bi izpolnile svoje potrebe po dušiku.

Po Ehrlichovi poti iz dušikovih spojin neposredno nastajajo nekatere fermentacijske arome, kot so višji alkoholi in acetatni estri (Slika 5).



Slika 5. Ehrlichova pot razgradnje aminokislin pri kvasovkah (prirejeno po Cordente in sod., 2019). Ustvarjeno v BioRender. Radovanović Vukajlović, T. (2025) <https://BioRender.com/32sczl6>.

Ehrlichova metabolna pot v treh korakih:

1. transaminacija aminokislin v alfa-ketokisline
2. dekarboksilacija alfa-ketokisline v aldehid
3. konverzija aldehida v kislino ali višje alkohole

Pri deaminaciji (transaminaciji) aminokislin (reakcija odstranitve aminoskupine) iz ostanka ogljikove verige nastanejo višji alkoholi, ki se z encimom acetiltransferazo pretvorijo v acetatne estre. Višji alkoholi lahko nastanejo po Ehrlichovi poti razgradnje dušika (Slika 5) ali pa poti metabolizma ogljika, ki je anabolna pot.

Višji alkoholi lahko v velikih koncentracijah (večji od 300 mg/L) negativno vplivajo na organoleptične lastnosti ter kakovost vina. V manjših količinah pa lahko pozitivno prispevajo k aromi vina. Nekateri višji alkoholi imajo prav tako zelo pomembno vlogo pri tvorbi aromatskih estrov, zato je uravnavanje razgradnje aminokislin ključno za vzpostavljanje ravnotežja. To bi lahko pojasnilo, zakaj so nekatere sorte grozdja v

primerjavi z drugimi dovzetnejše za razvoj določenih arom in okusov ali ugodnejše za tvorbo H₂S (tako imenovano reduktivno grozdje). Poleg tega bi to pojasnilo sezonske razlike v vinogradnih pri pridelavi iste sorte grozdja.

Druge dušikove spojine v moštu in vinu

Dejavniki rasti ali vitamini

Vitamini so rastni faktorji, ki sodelujejo pri presnovi kvasovk. Nekatere vitamine kvasovke sintetizirajo same, nekatere pa morajo pridobiti iz gojišča. Grozdni mošt običajno vsebuje zadostno količino vitaminov za nemoten potek fermentacije, vendar je pod določenimi pogoji možno njihovo pomanjkanje. Vitamini delujejo kot kofaktorji v encimskih reakcijah in se med reakcijo kemijsko ne spremenijo (Castor, 1953), zato jih je mogoče uporabiti večkrat. Pomanjkanje vitamina je možno iz različnih razlogov, na primer zaradi okužbe s plesnijo (npr. *Botrytis*) na grozdnih jagodah in s čezmernimi dodatki DAP-a (ki povzroča neravnovesje vitaminov, ne pa nujno njihovega pomanjkanja). Zaradi okužbe s plesnijo iz grozdnih jagod se pred trgatvijo izčrpajo različna hranila, kar je eden od razlogov, zakaj so fermentacije iz botritičnega ali gnilega grozdja skoraj vedno problematične. V takih primerih je pri fermentaciji treba dodajati hranila za kvasovke.

Najpomembnejši vitamini pri alkoholnem vrenju so biotin, tiamin in pantotenska kislina. Dodatek biotina v mošt lahko poveča populacijo kvasovk in pospeši fermentacijo. Biotin ima pomembno vlogo pri presnovi sladkorja, dušika in maščobnih kislin. Kvasovka ne more rasti brez biotina, a je na srečo za rast potrebna zelo majhna koncentracija (1 µg/L). Za doseganje optimalne rasti in želene proizvodnje hlapnih arom (prave koncentracije višjih alkoholov in estrov) je potrebna večja koncentracija (10 µg/L). Grozdni mošt običajno vsebuje 0,6–60,0 µg/L biotina (Evers in sod., 2021). Tiamin (vitamin B₁) je pomembna sestavina mošta in se delno razgrajuje zaradi dodatka sulfita, ki preprečuje pojav neželenih organizmov. V EU-ju je dovoljen dodatek tiamina do 50 mg/hL. Piridoksin (vitamin B₆) ima vlogo v metabolizmu aminokislin – z dodatkom sredstev za bistrenje se zmanjšuje količina tega vitamina. Ob pomanjkanju pantotenske kisline in piridoksina je možna tvorba neželenih spojin, kot sta očetna kislina in H₂S (Xing in Edwards, 2006).

Biogeni amini

Biogeni amini so dušikove spojine, ki nastanejo iz aminokislin v reakciji dekarboksilacije z mlečnokislinskimi bakterijami. V vinu so najpogostejše prisotni histamin, putrescin, kadaverin, feniletilamin in drugi. Na vsebnost biogenih aminov po eni strani vplivajo pogoji pridelave vina, tehnike vinifikacije, staranje vina, kmetijske prakse in podnebne razmere (Ortega-Heras in sod., 2014), po drugi strani pa vrste mikroorganizmov (ki jih proizvajajo z encimi dekarboksilazami), vsebnost prekurzorjev aminokislin v mediju, pa tudi parametri vina (pH, koncentracija alkohola, prisotnost žveplovega dioksida), ki vplivajo na rast bakterij. Vsebnost teh spojin je v enologiji ključna, saj so pomembni pokazatelji kakovosti vina (Smit in sod., 2008; Moreno-Arribas in sod., 2010; Ortega-Heras in sod., 2014).

Viri

- Amerine, M. A., Berg, H. W., Kunkee, R. E., Ough, C. S., Singleton, V. L., & Webb, A. D. (1980). *The composition of grapes. V The technology of wine making* (4. izd., str. 77–139). AVI Publishing Company: Westport, Connecticut. https://primopmtca01.hosted.exlibrisgroup.com/primoeexplore/fulldisplay/01SFUL_ALMA21178231760003611/SFUL
- Bell, A. A., Ough, C. S., & Kliwer, W. M. (1979). Effects on must and wine composition, rates of fermentation and wine quality of nitrogen fertilization *Vitis vinifera* var. Thompson Seedless grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30(2), 124–129. <https://doi.org/10.5344/ajev.1979.30.2.124>
- Bell, S. J., & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242–295. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
- Beltran, G., Esteve-Zarzoso, B., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2005). Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 996–1002. <https://doi.org/10.1021/jf0487001>
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (1996). *Principles and practices of winemaking*. Chapman & Hall: New York. <https://www.scribd.com/doc/137738857/Principles-and-Practices-of-Winemaking>
- Carrascosa, A. F., Muñoz, R., & González, R. (2011). *Molecular wine microbiology* (1. izd.). Academic Press Elsevier.
- Castor, J. G. B. (1953). The B-complex vitamins of musts and wines as microbial growth factors. *Applied Microbiology*, 1(2), 97–102. <https://doi.org/10.1128/am.1.2.97-102.1953>
- Cooper, T. G. (1982). Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. V J. N. Strathern, E. W. Jones, & J. R. Broach (ur.), *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: Metabolism and gene expression* (str. 39–99). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cooper, J. D. H., Ogden, G., McIntosh, J., & Turneel, D. C. (1984). The stability of the o-phthaldehyde/2-mercaptoethanol derivatives of amino acids: An investigation using high-pressure liquid chromatography with a pre-column derivatization technique. *Analytical Biochemistry*, 142, 98–102. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90522-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90522-0)
- Cordente, A. G., Schmidt, S., Beltran, G., Torija, M. J., & Curtin, C. D. (2019). Harnessing yeast metabolism of aromatic amino acids for fermented beverage bioflavouring and bioproduction. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 4325–4336. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09840-w>
- Cozzolino, D., Damberg, R. G., Janik, L., Cynkar, W. U., & Gishen, M. (2006). Analysis of grapes and wine by near-infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 14, 279–289. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09840-w>
- Dukes, B. C., & Butzke, C. E. (1998). Rapid determination of primary amino acids in grape juice using an o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine spectrophotometric assay. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 125–134. <https://doi.org/10.5344/ajev.1998.49.2.125>
- Evers, M. S., Roullier-Gall, C., Morge, C., Sparrow, C., Gobert, A., & Alexandre, H. (2021). Vitamins

in wine: Which, what for, and how much? *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20, 2991–3035. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12743>

Godard, P., Urrestarazu, A., Vissers, S., Kontos, K., Bontempi, G., van Helden, J., & André, B. (2007). Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 27, 3065–3086. <https://doi.org/10.1128/mcb.01084-06>

Henschke, P. A., & Jiranek, V. (1993). Yeasts – metabolism of nitrogen compounds. V *Wine microbiology and biotechnology* (str. 77–164). Australian Wine Research Institute.

Iland, P., Ford, C., Bruer, D., Wilkes, E., & Bruer, N. (2021). *Theory and concepts of chemical, physical and sensory analyses and tests of grapes and wine*. Patrick Iland Wine Promotions Pty Ltd.

Jiranek, V., & Henschke, P. A. (1991). Assimilable nitrogen: Regulator of hydrogen sulphide production during fermentation. *Australian Grapegrower and Winemaker*, 328, 27–30.

Jiranek, V., Langridge, P., & Henschke, P. A. (1995). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(1), 75–83. <https://doi.org/10.5344/ajev.1995.46.1.75>

Large, P. J. (1986). Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast*, 2, 1–34. <https://doi.org/10.1002/yea.320020102>

Llauradó i Reverchon, J. M. (2002). *Avaluació dels condicionants del most en el desenvolupament de la fermentació alcohòlica a baixes temperatures* [Doktorska disertacija, Universitat Rovira i Virgili]. Tarragona, Španija.

Mendes-Ferreira, A., Barbosa, C., Inês, A., & Mendes-Faia, A. (2010). The timing of diammonium phosphate supplementation of wine must affects subsequent H₂S release during fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 108(2), 540–549. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04457.x>

Mirvish, S. S., Smyrk, T., Payne, S., Tuatoo, H., & Chen, S. C. (1994). Weak carcinogenicity of 2-hydroxyethyl carbamate in strain A mice: Indication that this is not a proximal metabolite of ethyl carbamate. *Cancer Letters*, 77(1), 1–5. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(94\)90340-9](https://doi.org/10.1016/0304-3835(94)90340-9)

Monteiro, F. F., & Bisson, L. F. (1992). Nitrogen supplementation of grape juice. I. Effect on amino acid utilization during fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43, 1–10. <https://doi.org/10.5344/ajev.1992.43.1.1>

Moreno-Arribas, M. V., Smit, A. Y., & du Toit, M. (2010). Biogenic amines and the winemaking process. V A. G. Reynolds (ur.), *Understanding and managing wine quality and safety* (str. 494–509). Woodhead Publishing Limited. <http://dx.doi.org/10.1533/9781845699987.2.494>

O’Kennedy, K., & Reid, G. (2008). Yeast nutrient management in winemaking. *The Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 537, 92–100.

Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., Del-Villar-Garrachón, V., González-Huerta, C., Moro Gonzalez, L. C., Guadarrama Rodríguez, A., Villanueva Sanchez, S., Gallo González, R., & Martín de la Helguera, S. (2014). Study of the effect of vintage, maturity degree, and irrigation on the amino acid and biogenic amine content of a white wine from the Verdejo variety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 2073–2082. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6526>

Ough, C. S., & Amerine, M. A. (1988). *Methods analysis of musts and wines* (2. izd.). John Wiley and Sons.

- Petrovic, G., Aleixandre-Tudo, J. L., & Buica, A. (2019). Grape must profiling and cultivar discrimination based on amino acid composition and general discriminant analysis with best subset. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 40(2). <http://dx.doi.org/10.21548/40-2-3373>
- Ribéreau-Gayon, P. (2000). *Handbook of enology. The microbiology of wine and vinifications*. Wiley.
- Sablayrolles, J.-M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.-L., & Barre, P. (1996). Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(4), 377–381. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89154-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89154-9)
- Smit, A. Y., du Toit, W. J., & du Toit, M. (2008). Biogenic amines in wine: Understanding the headache. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 29, 109–127. <https://doi.org/10.21548/29-2-1444>
- Sørensen, S. P. L. (1907). Enzymstudien I: Über die quantitative Messung proteolytischer Spaltungen. *Die Formoltitrierung – Biochemische Zeitschrift*.
- Sørensen, H., Sørensen, S., Bjerregaard, C., & Michaelsen, S. (1999). *Chromatography and capillary electrophoresis in food analysis*. Royal Society of Chemistry Press.
- Stevens, D. F., & Ough, C. S. (1993). Ethyl carbamate formation: Reaction of urea and citrulline with ethanol in wine under low to normal temperature conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 309–312. <https://doi.org/10.5344/ajev.1993.44.3.309>
- Suárez-Lepe, J., & Uthurry, C. (2007). Incidence of nitrogenous compounds of must on ethyl carbamate formation induced by lactic acid bacteria. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 41(4), 215–223. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2007.41.4.842>
- Thomas, C. S., Boulton, R. B., Silacci, M. W., & Gubler, D. W. (1993). The effect of elemental sulfur, yeast strain, and fermentation medium on hydrogen sulfide production during fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 44, 211–216. <https://doi.org/10.5344/ajev.1993.44.2.211>
- Ugliano, M., Henschke, P. A., Herderich, M. J., & Pretorius, I. S. (2007). Nitrogen management is critical for wine flavour and style. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 22(6), 24–30.
- Verdenal, T., Dienes-Nagy, Á., Spangenberg, J. E., Zufferey, V., Spring, J.-L., Viret, O., Marin-Carbonne, J., & van Leeuwen, C. (2021). Understanding and managing nitrogen nutrition in grapevine: A review. *OENO One*, 55(1), 1–43. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.1.3866>
- Vos, P. J. A., Zeeman, W., & Heymann, H. (1978). The effect on wine quality of diammonium phosphate additions to musts. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 87–104.
- Vos, P. J. A., & Gray, R. S. (1979). The origin and control of hydrogen sulphide during fermentation of grape must. *American Journal of Enology and Viticulture*, 30, 187–197. <https://doi.org/10.5344/ajev.1979.30.3.187>
- Vos, P. J. A. (1993). Evaluation of 27 internationally available yeast strains with special reference to fermentation activity, assimilable nitrogen, composition of metabolites and the sensory qualities of wines. *10th International Enological Symposium*, Montreux, Switzerland.
- Wang, X. D., Bohlscheid, J. C., & Edwards, C. G. (2003). Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 349–359. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01827.x>

Weeks, S. M., & Henschke, P. A. (2007). Yeast assimilable nitrogen. *The Australian Wine Research Institute's Analytical Service*, oktober 2007.

Xing, H., & Edwards, C. E. (2006). Impact of thiamine and pyridoxine on wine fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 393A–393A.

Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., & Nury, F. S. (1995). Nitrogen compounds. V *Wine analysis and production*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6978-4_8

Zoecklein, B. W. (2008). Management of sulphur-like off odours in wine: A HACCP plan. *Enology Notes*, 139.

4.

ANTOCIANI, PIRANOANTOCIANI IN BARVA VINA

Jelena Topić Božić

Center za krožno gospodarstvo, Rudolfovo – Znanstveno in tehnološko središče, Novo mesto, Slovenija

Fakulteta za industrijski inženiring Novo mesto, Novo mesto, Slovenija

jelena.topic.bozic@rudolfovo.eu

Uvod

Fenolne spojine so spojine, ki prispevajo k organoleptičnim lastnostim vina, zlasti barvi, trpkosti in grenkobi. Kemijsko imajo fenolne spojine vsaj en fenolni obroč z vsaj eno hidroksilno skupino (Waterhouse in sod., 2016). V enološkokemijski literaturi za to skupino sekundarnih metabolitov najdemo tudi izraze, kot so polifenoli, biofenoli.

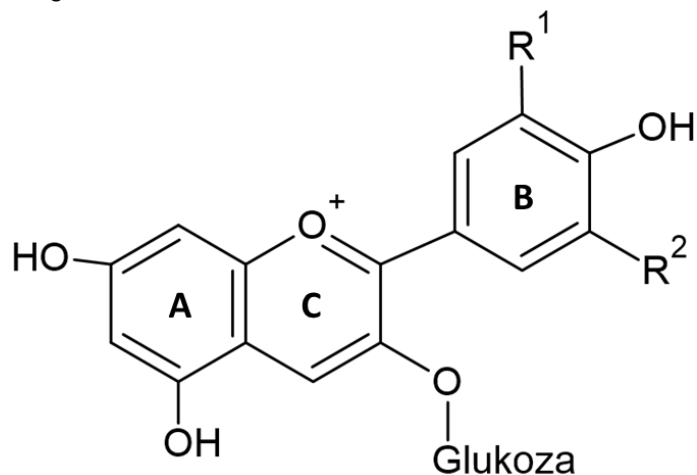
Fenolne spojine v vinu lahko razdelimo v dve skupini: neflavonoidne in flavonoidne fenolne spojine (He in sod., 2012a). Flavonoidi so najpogostejše fenolne spojine v grozdju in vinih. Družina flavonoidov se nadalje deli na podskupine flavonov, flavanolv, flavanonov in antocianov. Neflavonoidne fenole pa delimo na fenolne alkohole, fenolne kisline, hidroksicimetne kisline in stilbene (Waterhouse in sod., 2016).

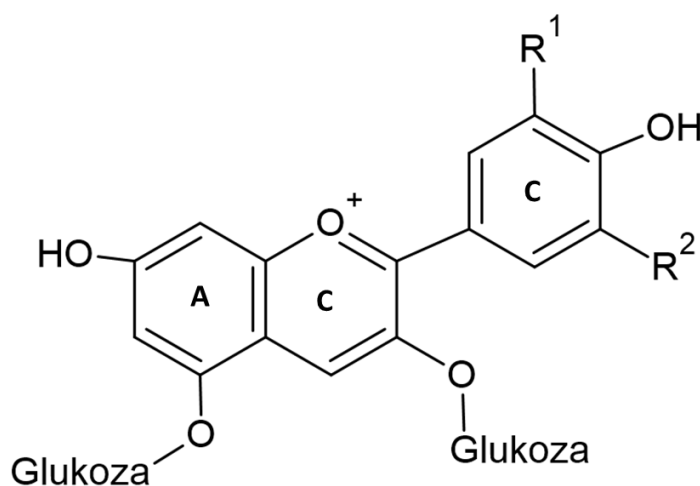
Po Macheixu (1990) antociani vključujejo antocianidine in glikozilirane derivate antocianidinov – antocianine. Antocianidini so v naravi le redko prisotni in nastajajo v vzorcih največkrat zaradi priprav bioloških vzorcev za analizo. Brez glikozilacije so namreč zelo nestabilni in kmalu razpadejo (Macheix, 1990).

Naravno prisotni antociani so torej glikozilirani derivati aglikonskih delov antocianidinov. Najpogostejše antocianidine med njimi poznamo pod imenom delfinidin, petunidin, cianidin, peonidin in malvidin. Med sabo se razlikujejo po barvi, ki jo odraža stopnja hidroksilacije in metoksilacije obroča B – mesti R1 in R2 na fenolnem obroču (Slika 1). Nadaljnja raznolikost antocianov iz vina/grozdja je posledica acilacije glikozidno vezane glukoze s hidroksicimetnimi kisljinami (kavna kislina, *p*-kumarna kislina) ali alifatskimi kisljinami, kot je očetna kislina (He in sod., 2010; Lorrain in sod., 2013; Panche in sod., 2016; Waterhouse in sod., 2016). Antociani so naravni pigmenti, odgovorni za rdečo, modro in vijolično barvo sadja, zelenjave, rož in zelišč. Njihovo ime izhaja iz grškega *anthos*, kar pomeni roža, in *kyanos*, kar pomeni modro (Welch in sod., 2008).

Rdeča barva vin in grozdja izvira iz antocianov, ki so značilni predvsem za rdeče sorte grozdja. Večinoma se nahajajo v jagodni kožici, razen pri nekaterih sortah grozdja z obarvanim mesom. V pridelavi rdečih vin se po drozganju in med maceracijo izločajo v mošt in vino. Med maceracijo se izplen antocianov povečuje, vendar je odvisen tudi od fenolne zrelosti grozdja. Grozdje sort *Vitis vinifera* L. vsebuje večinoma monomerne antociane, kot so -3-*O*-monoglikozidi delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina in malvidina. Najbolj zastopan antocian v rdečem vinu sort *Vitis vinifera* L. je malvidin-3-*O*-glukozid, ki ima na mestu R1 in R2 metoksi skupino (sledi -3-*O*-glukozid peonidina, ki imata eno prosto skupino -OH na B-obroču (Freitas in sod., 2017; He in sod., 2010; Lorrain in sod., 2013) (Tabela 1). Pri sortah, ki niso *Vitis vinifera* L., pa se glikozilacija zgodi na mestih 3 in 5 (Sabra in sod., 2021).

Celokupna koncentracija antocianov v vinih je sortno pogojena. Waterhouse (2002) je ocenil, da je koncentracija v mladih vinih največkrat okoli 500 mg/L, v staranih vinih pa 90 mg/L (Waterhouse, 2002). V nekaterih primerih lahko skupna koncentracija preseže 2000 mg/L. Med različnimi sortami se koncentracije antocianov lahko zelo razlikujejo (Nikfardjam in sod., 2006). Nikfardjam in sod. (2006) so izvedli raziskavo, v kateri so ugotovili, da je povprečna koncentracija monomernih antocianov 831 mg/L v vinu sorte cabernet franc, medtem ko je bila koncentracija v vinu pinot noir 447 mg/L. Povprečna koncentracija v portovcih je bila 1642 mg/L (Nikfardjam in sod., 2006). Koncentracije posameznih antocianov zelo variirajo, v večini vin pa je prisoten malvidin-3-*O*-glikozid kot glavni prosti antocian (Lorrain in sod., 2013). Osnovna struktura glikoziliranih antocianov je prikazana na Sliki 1. Sladkorji so vezani prek glikozidne vezi na mestu C-3, diglikozidi pa tudi na mestu C-5 antocianidina. V grozdju in vinu so glikozilirani z glukozo. Antocianini so razširjeni v rdečem in modrem sadju ter zelenjavi, njihova vsebnost v rastlinah pa je med vrstami zelo različna. Poleg glikozilacije z glukozo se pojavljajo še drugi sladkorji, med njimi galaktoza, ramnoza, arabinoza in ksiloza (Merecz-Sadowska in sod., 2023).





Slika 1. Osnovna struktura antocianov, ki spadajo v kategorijo monoglikozidov (zgoraj) in diglikozidov (spodaj).

Med seboj se razlikujejo glede na to, kateri skupini sta vezani na obroč B (Tabela 1) na mestih R¹ in R² (Slika 1). Njihov izplen pri pridelavi vina je odvisen od sorte grozdja, zrelosti, sezonskih razmer, vinogradniških praks, lege vinogradov in samih tehnoloških parametrov pridelave vina. Koncentracija antocianov v vinu je namreč odvisna tudi od pogojev fermentacije, kot so temperatura med fermentacijo ter čas in temperatura maceracije. Prisotnost skupnih antocianov in posameznih antocianov pa se v vinih spreminja tudi med staranjem vina (Champ in Kundu-Champ, 2019; He in sod., 2012a; Minnaar in sod., 2018).

Tabela 1. Kemijske strukture najpogostejših antocianov v rdečem grozdju in vinu (R¹ in R² v povezavi s Sliko 1).

Antocianin	Struktura R ¹	Struktura R ²
delfinidin-3-O-glikozid	OH	OH
cianidin-3-O-glikozid	OH	H
petunidin-3-O-glikozid	OH	OCH ₃
peonidin-3-O-glikozid	OCH ₃	H
malvidin-3-O-glikozid	OCH ₃	OCH ₃

Antociani se pri mletju in drozganju že izločajo v grozdni sok ter že takrat začnejo reagirati z drugimi spojinami vina, kot so drugi fenoli, pa tudi polimerne spojine, kot so polisaharidi, ki pomagajo zaščititi monomerne antociane pred razbarvanjem zaradi kislega pH-ja mošta, ki je po navadi v območju 3,1 – 3,6 (Boulton in sod., 1996; Moreno in Peinado, 2012).

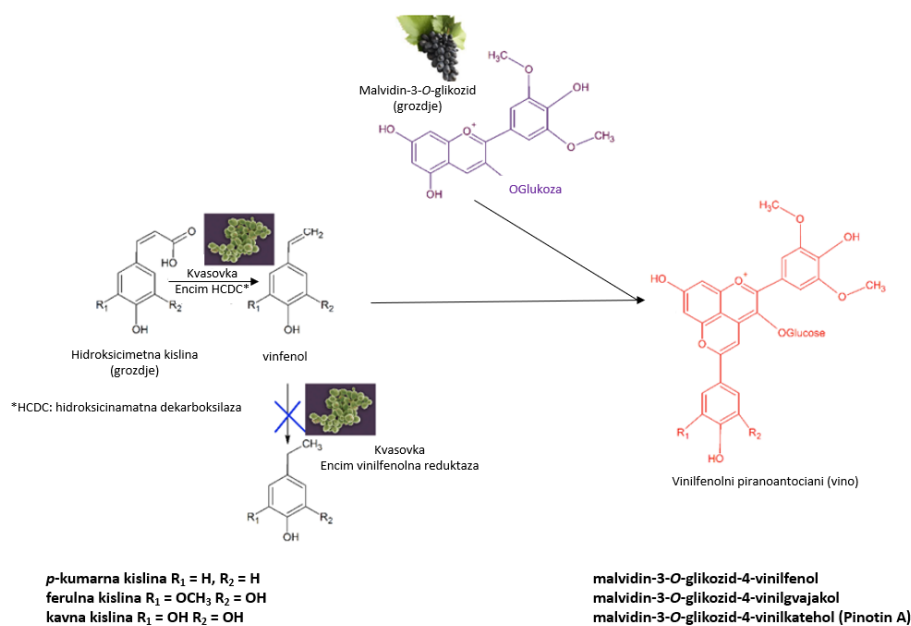
To lahko opazimo s spremembo barve iz začetne modrovijolične barve v temno rdečo barvo, kar imenujemo kopigmentacija. Gre za pomemben pojav v pridelavi rdečih vin, saj vpliva na barvno stabilnost in intenzivnost vina v različnih življenjskih obdobjih. Kopigmentacija je kemijska interakcija med

antocianini, naravnimi pigmenti v grozdnih jagodah in brezbarvnimi fenolnimi spojinami, kot so flavonoli ali hidroksicimetne kisline, ter drugimi spojinami vina. Kopigmentacija izboljša barvo vina, tako da poveča absorpcijo svetlobe (hiperkromni učinek) in premakne barvni odtenek v modrordeče tone (batohroni premik). Ta interakcija ohranja intenzivno barvo v zgodnjih fazah staranja vina, ko so antociani še v velikih koncentracijah (Boulton in sod., 1996; Moreno in Peinado, 2012). Kopigmentacija tako omogoča pridelovalcem rdečih vin izboljšanje vizualne kakovosti vina, povečuje njegovo stabilnost in podaljšuje trajnost barvne intenzitete, kar je ključno za tržno privlačnost vina.

Reakcije antocianov z drugimi spojinami se nadaljujejo tudi pri fermentaciji in maceraciji, ko začnejo reagirati z drugimi produkti fermentacije in grozdja ter fenolnimi spojinami. Poznavanje teh sprememb lahko pomaga vinarju izboljšati kakovost vina oz. spremembe v vinu glede na čas. Te spremembe so še posebej vidne v rahleje obarvanih rdečih ali rosé vinih, pri katerih barvne note prehajajo iz lepe rdeče ali rožnate barve (pri roséjih) v opečnate tone.

Tudi med zorjenjem in staranjem vina antociani nadalje reagirajo z drugimi spojinami v vinu, kar povzroči nastanek novih pigmentov. Imenujemo jih piranoantociani. Med njimi so najbolj poznani vitizini in vinilfenolni piranoantociani. Zaradi prisotnosti teh spojin se spreminja barva vina med staranjem (Alcalde-Eon in sod., 2006; He in sod., 2012b), saj je zanje značilna večja intenzivnost barve, poleg tega so stabilnejše v kemijskem okolju vina (če vino razumemo kot raztopino). Manj so dovzetne za spremembe v vrednosti pH in koncentraciji kisika, odpornejše pa na razbarvanje z žveplovim dioksidom in temperaturo (Freitas in sod., 2017). Zato so te spojine zanimive tudi kot možna naravna barvila v drugih živilskih izdelkih.

Pri sintezi piranoantocianov so kvasovke s sproščanjem metabolitov, prekurzorjev za nastanek vinilfenolnih piranoantocianov, zelo pomembne (Božič in sod., 2020a); prikazano na Sliki 2. Kvasovke z visoko aktivnostjo encima hidroksicinatna dekarboksilaza (HCDC) lahko dekarboksilirajo fenolne spojine hidroksicimetne kisline v reaktivne vinilfenole, ki se kondenzirajo z antocianini, tako da nastanejo piranoantociani. Hidroksicimetne kisline *p*-kumarna, kavna, ferulna, sinapinska kislina lahko tudi neposredno reagirajo z antocianini, a ta mehanizem poteka počasi med staranjem vina (Suárez-Lepe in Morata, 2012).



Slika 2. Shematski prikaz nastanka vinilfenolnih piranoantocianov s pomočjo metabolitov kvasovk. Kvasovke z visoko aktivnostjo encima hidroksicimetna dekarboksilaza (HCDC) lahko dekarboksilirajo hidroksicimetne kisline v reaktivne vinilfenole, ki se kondenzirajo z antocianini, tako da nastanejo vinilfenolni piranoantociani (prirejeno po Topić Božič in sod., 2019).

Kvasovke lahko pomembno pripomorejo tudi k izgubi barve vina. Sestava in poroznost celičnih sten fermentiranih kvasovk lahko povzroči znatno adsorpcijo hlapnih spojin oziroma adsorpcijo antocianinov na celične stene. Ta lastnost je še posebej pomembna pri sortah grozdja z manjšo vsebnostjo antocianov, kot je modri pinot (Morata in sod., 2005).

Metode za določanje antocianov in piranoantocianov v vinu

Pri analizi fenolov in antocianov v vinu se uporabljata dva glavna pristopa. Prvi temelji na določanju skupne vrednosti monomernih antocianov z različnimi spektrofotometričnimi metodami. Drugi pristop pa na uporabi separacijskih metod z različnimi sistemi za odkrivanje, kvantifikacijo in prepoznavanje antocianov in piranoantocianov v vinih in drugih matricah.

Ključno pri analizi antocianov in piranoantocianov je ustrezna predpriprava vzorcev na analizo, ki mora imeti čim boljši izplen, čim boljše mora ponazarjati dejansko stanje v naravi, seveda pa mora biti tudi cenovno ustrezna glede na namen tovrstnih analiz vina.

Predpriprava vzorcev vključuje postopek čiščenja vzorcev in predkoncentracije zlasti pri določanju piranoantocianov, saj so ti prisotni v manjših koncentracijah v primerjavi z antociani in zaradi kompleksnosti vinske matrice, ki lahko prekrije spojine, v manjših koncentracijah. Najpogostejši metodi priprave vzorcev sta ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE) in ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE). Poznamo

več različnih pristopov, ki se razlikujejo v uporabi organskih topil in različnih sorbentov. Ekstrakcija na trdnem nosilcu omogoča večjo avtomatizacijo postopkov, hitrejšo obravnavo večjega števila vzorcev, in tudi enake pogoje ekstrakcij. Pri pripravi vzorcev vina se najpogosteje uporablja zgolj predhodna filtracija brez predhodne dodatne obdelave vzorcev (Aleixandre-Tudo in sod., 2017; Blanco-Vega in sod., 2014; He in sod., 2012a; Lorrain in sod., 2013).

Spektrofotometrične metode za določanje antocianov in piranoantocianov v vinu

Za določanje skupnih vrednosti monomernih antocianov se uporabljajo spektrofotometrične metode, naštetje v nadaljevanju.

- *Diferencialna metoda glede na pH*

Metoda izhaja iz dejstva, da monomerni antociani reverzibilno spreminjajo strukturo in barvo v odvisnosti od pH-ja. Tako je razlika absorbance pigmentov pri 520 in 700 nm ter pri pH 1 in 4,5 proporcionalna koncentraciji antocianinov. Za preračunavanje v koncentracijo se uporablja molski ekstinkcijski koeficient antocianina (glavnega) v izbrani raztopini.

- *Metoda s klorovodikovo kislino*

Metoda se uporablja za oceno skupne vsebnosti antocianov. Vzorci vina se razredčijo v 1-M raztopini HCl. Čez čas (30 min) se izmeri absorbanca pri valovni dolžini 520 nm. Običajno se uporabijo 20- ali 50-kratne razredčitve. Koncentracije antocianov se izrazijo kot ekvivalenti malvidin-3-*O*-glikozida (mg/L).

- *Metoda razbarvanja z metabisulfitom (angl. Bisulfite bleaching method)*

Metoda temelji na dveh kemijskih lastnostih antocianov: na odvisnosti od pH-ja in učinku razbarvanja. Metoda podaja kvantitativne informacije o skupni koncentraciji rdečih pigmentov. Pri tem upošteva lastnosti metabisulfitu, ki ga ima na barvne pigmente. Antociane razbarva, medtem ko se polimerni pigmenti ne razbarvajo, ker so odpornejši na razpadanje v prisotnosti SO₂. Absorbanca vzorca, ki se tretira z bisulfitom, se primerja z absorbanco netretiranega vzorca pri 520 nm. Antociani so izraženi kot ekvivalenti malvidin-3-*O*-glikozida (mg/L). Metoda poda informacije o skupni vsebini monomernih antocianov ob odštetju polimerne frakcije (Aleixandre-Tudo in sod., 2017; Giusti and Wrolstad, 2001). Piranoantociana, kot sta vitizin A in vitizin B, se ob prisotnosti bisulfitu ne razbarvata in sta izražena kot polimerna barva. Po tej metodi lahko rezultati pokažejo preveliko koncentracijo antocianov, ker na nekatere polimerne pigmente vpliva tudi učinek razbarvanja (bolj izraženo v mladih vinih). Pri staranju vin nastanejo kompleksnejši pigmenti, ki so manj občutljivi za SO₂ (Aleixandre-Tudo in sod., 2017).

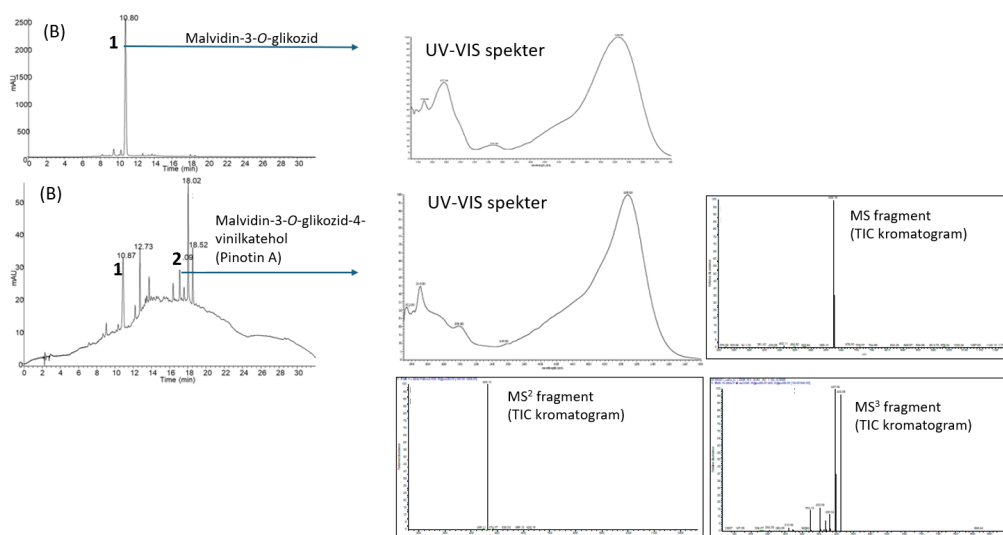
Separacijske metode za določanje antocianov in piranoantocianov

v vinu

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) je najpogostejše uporabljena analizna tehnika za ločevanje in separacijo ter prepoznavanje polifenolnih spojin grozdja in vina, med njimi tudi antocianov. Pri tem se uporabljajo različni detektorji: masni spektrometer (MS), detektor na niz diod (DAD), UV-VIS detektor. Najpogostejše se pri potrjevanju uporabijo podatki vseh detektorjev, zlasti če standardne spojine niso dostopne na trgu.

Trenutno ni enotne kromatografske tehnike, ki bi lahko ločila različne skupine fenolnih spojin z eno kromatografsko analizo. Zato moramo, če želimo celoten profil fenolnih spojin, optimizirati izbor stacionarne faze, mobilne faze, gradientno elucijo, temperaturo in hitrost pretoka mobilne faze. Običajno se ločevanje fenolnih skupin izvaja z reverznofazno kromatografijo, pri kateri se uporabita nepolarna stacionarna faza in polarna mobilna faza (López-Fernández in sod., 2020). Polifenolne spojine grozdja in vina se med seboj razlikujejo v polarnosti, tako da pri reverznofazni kromatografiji iz kolone najprej eluirajo najbolj polarne spojine in nazadnje najmanj polarne spojine. Vrstni red teh spojin je bil že večkrat omenjen in ga lahko najdemo v literaturi – lahko nam tudi pomaga pri prepoznavanju fenolnih spojin grozdja in vina (Kalogiouri in sod., 2022).

Kombinacija, ki se danes najpogostejše uporablja za določanje profila antocianov, je tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z detektorji na niz diod (DAD detektor), masnim spektrometrom (MS) ali tandemsko masno spektrometrijo (MS/MS) (He in sod., 2012a; Lorrain in sod., 2013). Pri uporabi DAD detektorja prepoznavanje spojin temelji na merjenju UV-VIS spektra spojine, retencijskega časa ter na primerjavi z retencijskim časom in UV-VIS spektrom analitskega standarda. Glavna pomanjkljivost DAD detektorja je nezmožnost razlikovanja med spojinami, ki imajo podobne spektroskopske značilnosti, čeprav lahko na podlagi spektrov v UV in VIS območju antocianine ločimo od flavonolov, flavan-3-olov in fenolnih kislin. Težavno je tudi razlikovanje med spojinami, ki koeluirajo pod izbranimi kromatografskimi pogoji. Kvantifikacija antocianinov poteka z eksterno kalibracijo z antocianinom samim, če je standardna spojina tržno dostopna, drugače pa antocianine lahko izražamo kot ekvivalente glavnega antocianina grozdja in vina, to je malvidin-3-*O*-glukozid. Na Sliki 3 sta prikazana kromatograma vina modri pinot na dan stekleničenja (A) in po treh mesecih staranja (B). Prikazana sta UV-VIS spektra malvidin-3-*O*-glikozida (spojina je označena s številko 1) in piranoantociana malvidin-3-*O*-glikozid-4-vinilkatehola (spojina, označena s številko 2). Za malvidin-3-*O*-glikozid-4-vinilkatehol so prikazani tudi MS, MS² in MS³ spektri, saj komercialni standardi niso na voljo za prepoznavanje. Pri UV-VIS spektru piranoantocianov je viden ožji absorpcijski vrh, prav tako valovna dolžina, pri čemer je maksimalna absorpcija premaknjena, saj je absorpcijski vrh pri malvidin-3-*O*-glikozid-4-vinilkateholu 509 nm, medtem ko je pri malvidin-3-*O*-glikozidu 526 nm (Božič in sod., 2020b).



Slika 3. Primer kromatograma vina modri pinot. Na sliki A je prikazan kromatogram pri 520 nm na dan stekleničenja vina, na sliki B pa kromatogram po treh mesecih staranja pri 30 °C (prirejeno po: Božič in sod., 2020b; Topić Božič in sod., 2022). Na desni strani sta prikazana UV-VIS spektra malvidin-3-O-glikozida (spojina je označena s številko 1) in piranoantociana malvidin-3-O-glikozid-4-vinilkatehola (spojina, označena s številko 2), ki ima značilen ožji absorpcijski vrh. Za piranoantocian malvidin-3-O-glikozid-4-vinilkatehol so prikazani tudi MS, MS² in MS³ fragmenti, ki prikazujejo značilno fragmentacijo.

Uporaba HPLC-DAD metod pri prepoznavanju piranoantocianov je zelo omejena, saj komercialni analizni standardi niso na voljo. Za poglobljenejšo analizo antocianov in piranoantocianov se uporablja HPLC skupaj z masno spektrometrijo (MS) ali tandemsko masno spektrometrijo (MS/MS), ki omogočata prepoznavanje in kvantifikacijo analitov v vzorcu ali potrditev molekulske strukture. MS temelji na ločevanju analitov glede na njihovo razmerje med maso in nabojem (m/z). Poleg metode HPLC se za separacijo antocianov in piranoantocianov uporablja tudi tekočinska kromatografija ultravioke ločljivosti (UPLC). V primerjavi s HPLC-jem so analize krajše, manjša je tudi poraba topil (Blanco-Vega in sod., 2014; Dipalmo in sod., 2016; Lorrain in sod., 2013; Valls in sod., 2009).

Določanje barve vina

Spektrofotometrična analiza

Barvo vina določamo z merjenjem absorbanco svetlobe pri določenih valovnih dolžinah, običajno v območju od 400 do 700 nm. Spektrofotometer pošlje svetlobo skozi vzorec filtriranega vina, absorbanco (koliko svetlobe vino absorbira) pa merimo pri različnih valovnih dolžinah. Če je pri rdečih vinih absorbanca vzorca prevelika (večja od 1 AU), je treba vzorec redčiti s pufrom, ki ima pH enak pH-ju vina, ali pa uporabimo kiveto s krajšo optično potjo (1 mm namesto 10 mm). Za rdeča vina se običajno uporabljajo tri ključne valovne dolžine (OIV, 2019):

- 420 nm za rumenkaste odtenke,
- 520 nm za rdečkaste odtenke,
- 620 nm za modrikaste odtenke.

S seštevkom absorbanco vseh treh valovnih dolžin dobimo parameter intenzivnost, z razmerjem med absorbanco 420 nm in 520 nm pa parameter, ki ga imenujemo odtenek (*hue*). Metoda je enostavna, hitra in ponovljiva. Primerna je za rutinsko uporabo in omogoča primerjavo med različnimi vzorci vin. Vendar pa ne upošteva kompleksnosti zaznavanja barve, saj jo določa samo na podlagi absorbanco pri določenih valovnih dolžinah. Prav tako ne zagotavlja podatkov o barvnem tonu in nasičenosti (OIV, 2019).

Metoda CIE Lab

CIE Lab je barvni prostor, ki temelji na človekovem zaznavanju barve. Vzpostavila ga je Mednarodna komisija za osvetlitev (CIE) leta 1976. Barva je opredeljena s tremi koordinatami:

- L^* : svetlost oziroma temnost (0 = črna, 100 = bela);
- a^* : zeleno-rdeča os (negativne vrednosti = zelena, pozitivne vrednosti = rdeča);
- b^* : modro-rumena os (negativne vrednosti = modra, pozitivne vrednosti = rumena) (CIE, 2007).

Barva vzorca vina se izmeri s spektrofotometrom ali kolorimetrom, ki podatke pretvori v vrednosti L^* , a^* in b^* . Te vrednosti omogočajo tridimenzionalno predstavitev barve vina, kar omogoča natančno in objektivno primerjavo med različnimi vini (Hunter and Harold, 1987; Wrolstad, 2005).

Metoda CIE Lab ponuja popolno sliko barve, vključno s svetlostjo, nasičenostjo in odtenkom. Omogoča natančno kvantifikacijo barvnih razlik, kar je pomembno za kakovostno kontrolo in raziskave. Zahteva bolj sofisticirano opremo in je nekoliko bolj zapletena za izvedbo v primerjavi s klasično spektrofotometrijo. Poleg tega je dražja (Hunter and Harold, 1987; Wrolstad, 2005).

Primerjava metode CIE Lab in klasične spektrofotometrije

Natančnost in kompleksnost. CIE Lab je bistveno natančnejša in upošteva celotno spektralno zaznavanje barve, medtem ko klasična spektrofotometrija meri le intenziteto svetlobe pri določenih valovnih dolžinah.

Stroški in zahtevnost. Klasična metoda je cenejša in lažja za izvedbo, medtem ko je CIE Lab zapletenejša in dražja, vendar ponuja podrobnejše podatke.

Uporaba v praksi. Spektrofotometrija je še vedno široko uporabljena v rutinskih analizah zaradi enostavnosti in stroškovne učinkovitosti, medtem ko se CIE Lab uporablja v raziskavah in za visokokakovostno kontrolo, kjer je potrebna natančna analiza barve (Hunter in Harold, 1987; Wrolstad, 2005).

Vaja

Določanje profila antocianov v grozdju in vinu

Priprava vzorcev

Določanje profila antocianov v grozdnih kožicah

Grozdne kožice ločimo od pešk in pulpe ter jih liofiliziramo do suhega. Tako pripravljene zmeljemo v terilnici do homogenega vzorca. Tako pripravljen 1 g zmletih in liofiliziranih kožic zmešamo z 20 mL metanola (MeOH) čistoče HPLC in postavimo v ultrazvočno kopel za 15 min na stresanje. Uporabimo polietilensko centrifugirko. Sledi centrifugiranje (4 °C, 5 min, 5000 vrt./min). Postopek ekstrakcije se ponovi štirikrat, pri čemer ločeno zbiramo supernatant, sediment pa ponovno izpostavimo ekstrakciji z metanolom v ultrazvočni kopeli.

Supernatant zbiramo in v tako pripravljenem vzorcu odstranimo metanol z odparevanjem v vakuumskem izparilniku pri 35 °C do suhega preostanka. Ekstrakt antocianov iz kožic grozdja ponovno raztopimo v natančno odmerjenem volumnu mobilne faze A (kisla mobilna faza) metode HPLC in ga filtriramo v vialo z 0,45-µm PTFE filtrom. Vzorec je tako pripravljen za analizo HPLC-DAD.

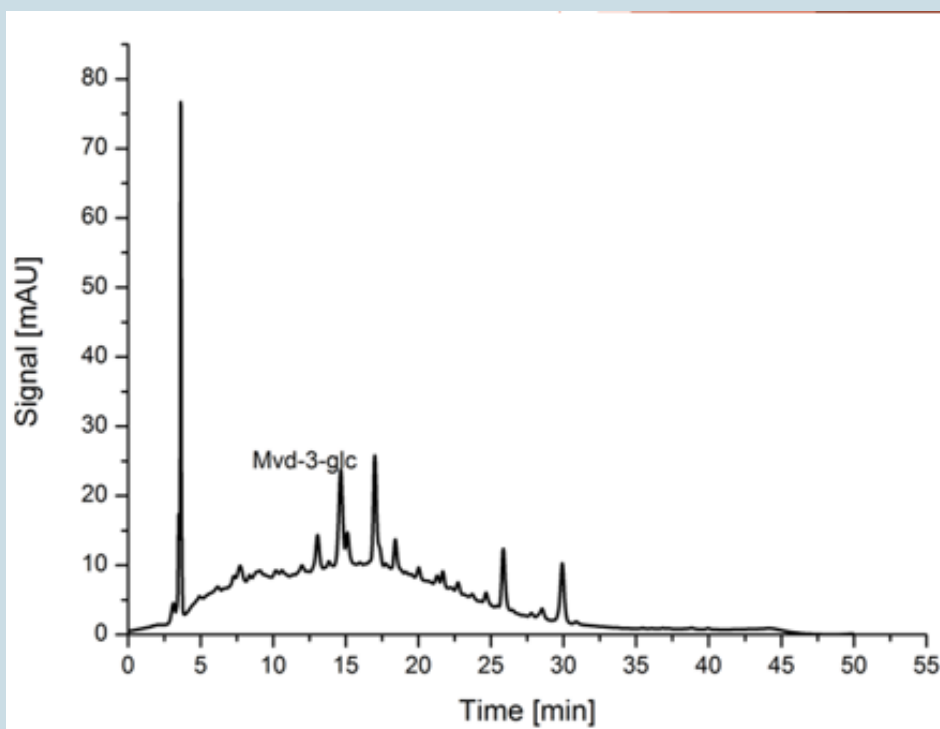
Protokol ekstrakcije fenolnih spojin iz liofiliziranih kožic grozdja:

- V 50-ml centrifugalno epruveto (polietilensko) natehtamo 1 g liofiliziranih kožic grozdja.
- Dodamo 20 mL MeOH (HPLC čistoče).
- Ultrazvočna kopel 15 min.
- Centrifuga: 5 min, 5000 vrt./min (nizka temperatura).
- Zberemo supernatant v čašo/steklenico.

- Postopek ponovimo še 3-krat.
- Supernatante dopolnimo do 100 mL z metanolom.
- Vzamemo alikvot vzorca ter prenesemo v 4-ml vialo za shranjevanje. Shranimo pri -20°C .

Analiza vin – neposredno injiciranje

Pri tovrstni analizi vina nimamo predpriprave s prečiščenjem in koncentriranjem analitov. Kromatogrami bodo zaradi tega malce grši, ampak še vedno dovolj dobri, da iz njih razberemo podatke o vrhovih polifenolov ter njihovih retencijskih in spektralnih karakteristikah. Takšno analizo lahko izvedemo le pri analizi HPLC-DAD in ob kombinaciji predkolone s kolono. Vzorce vina pred analizo HPLC-MS moramo vedno prečistiti z ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE). Vzorec filtriramo skozi $0,45\text{-}\mu\text{m}$ PTFE filter in analiziramo z analizo HPLC-DAD. Tudi pred LC-MS analizo ni vedno potrebna priprava vzorca, je pa ta priporočljiva, da se zmanjšajo morebitni matrični učinki, ki vplivajo na kvantitativno analizo, in da se odstrani morebitne delce iz vzorca ali pa če je potrebno koncentriranje oz. redčenje vzorca. Na Sliki 4 je prikazan primer neposrednega injiciranja vzorca.



Slika 4.:
Kromatogram
neposrednega
injiciranja vina
modri pinot
(povzeto po Topić
in sod., 2017).

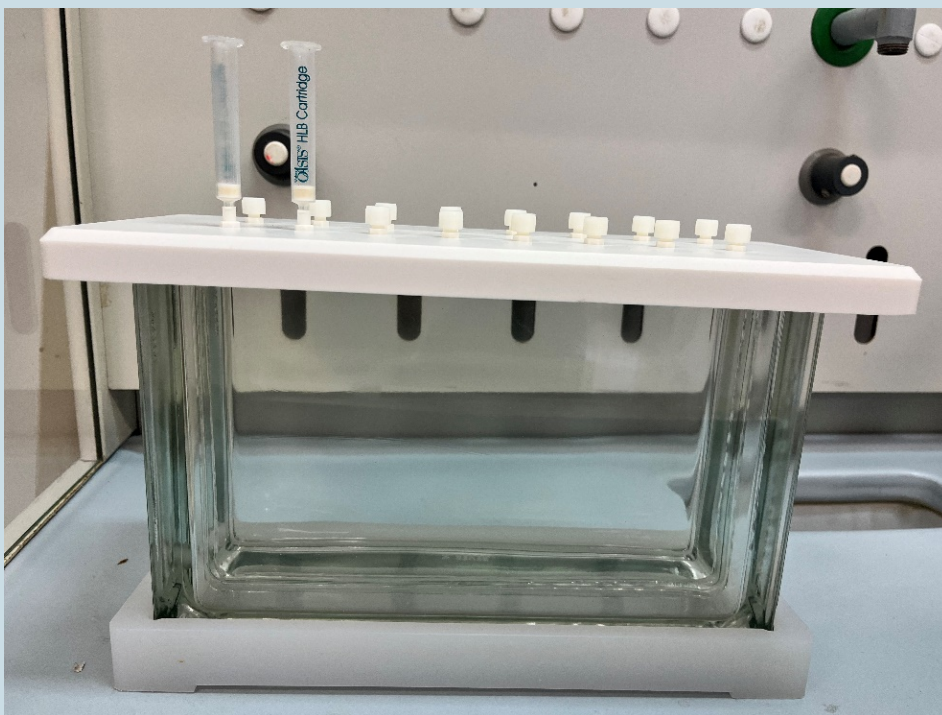
Analiza vina – ekstrakcija na trdnem nosilcu

Zaradi kompleksnosti vinske matrice je včasih potrebna ekstrakcija SPE. Njen namen je čiščenje in predkoncentriranje vzorcev, kar je pomembno zlasti pri analizi spojin, prisotnih v manjših koncentracijah (piranoantociani).

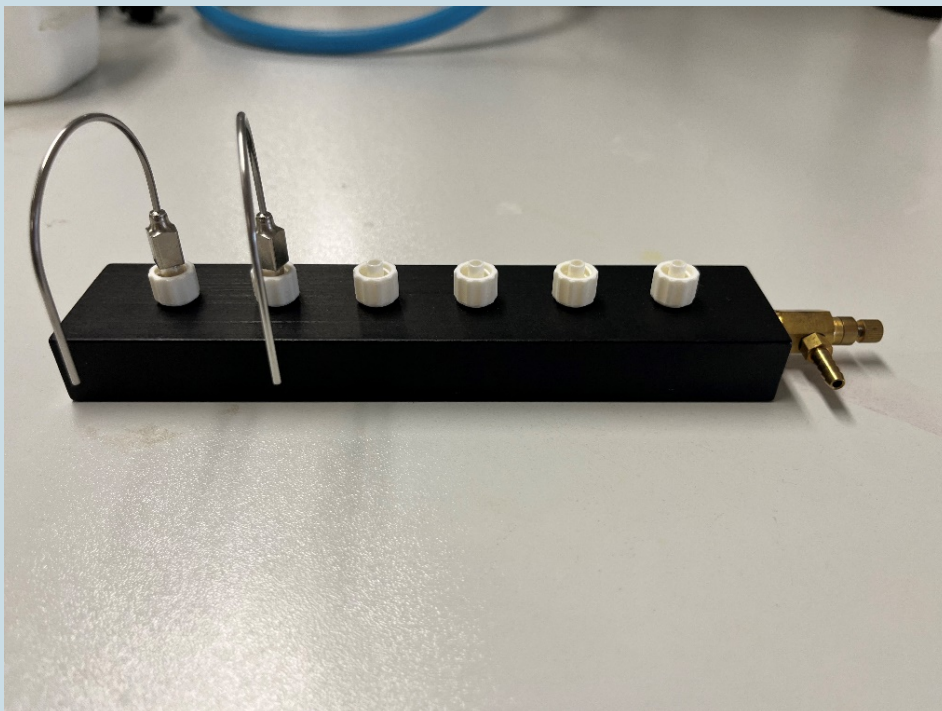
Protokol ekstrakcije na trdni fazi (povzeto po Topić in sod. 2017):

- Pripravimo 5-% (v/v) MeOH v ddH₂O.
- Kondicioniranje kartuš SPE-ja (HLB 6 mg, Waters) s 3 ml MeOH in 3 ml ddH₂O (pomembno je, da vse raztopine na kolonice SPE dodajamo počasi – pretok uravnavamo tako, da se tekočine izmenjujejo na koli s kapljicami). Pri tem si lahko pomagamo s pritiskanjem tekočine s pomočjo tlaka (ročno) ali podtlaka z uporabo t. i. manifolda, ki je prikazan na Sliki 5.
- Počasi dodajamo 2 mL vzorca vina (filtriranega).
- Speremo nečistoče iz vzorca na kartuši s 5-% (v/v) MeOH, eluent zavržemo.
- Osušimo kartušo z uporabo tlaka (ročno) ali podtlaka z uporabo t. i. manifolda, ki je prikazan na Sliki 5 (če to izvajamo ročno, enostavno z brizgo večkrat potisnemo zrak skozi kartušo).
- Izperemo/eluiramo fenolne spojine z 1 ml MeOH v vialo.
- Tako pripravljen ekstrakt v MeOH posušimo do suhega (v izparilniku ali s protitokom dušika) in suhi preostanek raztopimo ponovno v 1 mL mobilne faze A analize HPLC. Nastavek za sušenje, ki se poveže s tokom dušika, je prikazan na Sliki 6.

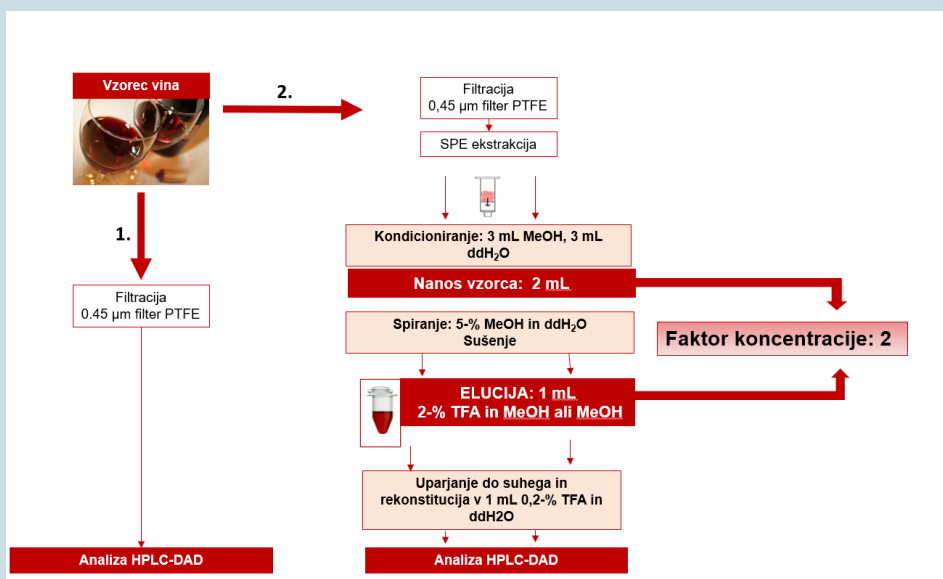
Shematski prikaz protokola ekstrakcije na trdnem nosilcu je prikazan na Sliki 7.



Slika 5. Manifold SPE s primerom kartuš SPE (vir: Topić Božič, 2025).



Slika 6. Izparilnik/
koncentrator
Mini-Vac (vir:
Topić Božič, 2025).



Slika 7. Shema
protokola za
pripravo vzorcev
za direktno analizo
na HPLC-DAD ali
pa s prečiščenjem/
koncentracijo na
koloni SPE.

Analiza HPLC-DAD

Za analizo HPLC-DAD se največkrat uporabljajo metode z ločbo na koloni C18. Kolone so različne, vse pa ločijo spojine po polarnosti. Ločba je odvisna tudi od drugih mehanizmov, ki so odvisni od tipa kolone. V tem poglavju opisujemo analizno metodo s kromatografsko kolono Kinetex EVO C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm id) z ujemajočo se predkolono (Phenomenex, Torrance, ZDA) (Božič in sod., 2020a).

Za izvedbo analize najprej pripravimo mobilno fazo A, in sicer tako, da raztopimo 2,2-% HPLC grade mravljične kisline (v/v) v dvakrat deionizirani vodi (ddH₂O). Mobilna faza B je sestavljena iz 2,2 % mravljične kisline, 85 % acetonitrila (ACN, HPLC stopnja čistoče), 12,8 % ddH₂O (v/v). Prenesemo 50 mL mobilne faze A v vialo za shranjevanje – da se pripravijo delovne raztopine. Osnovna standardna raztopina je zaradi stabilnosti pripravljena v MeOH.

Iz predhodno pripravljene osnovne raztopine malvidin-3-*O*-glikozida (100 mg/L) v MeOH pripravimo delovne raztopine umeritvene krivulje. Vse standardne raztopine antocianov pripravljamo v MeOH in shranjujemo tesno zaprte v zmrzovalniku. Tako ostanejo spojine dolgo nespremenjene. Če bi jih shranjevali v kislih raztopinah, se sčasoma razgradijo glikozidne vezi.

Delovne raztopine za umerjanje koncentracije antocianov v naših vzorcih pripravimo v območju 1–500 mg/L (1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L). Vse raztopine so pripravljene v MeOH in tako prenesene v vialo HPLC, ki so potem izpostavljene uparjanju do suhega, čemur sledi rekonstitucija suhega preostanka v mobilni fazi A. Rekonstrukcijo suhih preostankov naredimo v istem volumnu kot vzorce. Če je drugače, si zapomnimo, ker je pomembno pri preračunavanju koncentracij fenolnih spojin.

Potem ko pripravimo vzorce standardnih raztopin, prenesemo alikvot ekstrakta fenolov grozdnih kožic (500 µL) v vialo HPLC in odparimo do suhega, tako kot smo to naredili pri standardnih raztopinah (lahko uporabimo avtomatski izparilnik ali protitok dušika). Na Sliki 6 je primer nastavka za sušenje, ki se poveže s tokom dušika. Za sušenje se lahko uporabi tudi sistem MultiVac.

Suhi preostanek vzorca ponovno raztopimo v 500 µL mobilne faze A. Tako pripravljen vzorec analiziramo s HPLC-DAD.

Tabela 2. HPLC pogoji kromatografske analize.

Sistem HPLC	Agilent 1200/Agilent 1100 (lahko je tudi kromatografski sistem drugega proizvajalca)
Kromatografska kolona	Kinetex EVO (250 x 4,6 mm, 5 μ m)
Temperatura kolone	40 °C
Mobilna faza A	2,2-% mravljična kislina v ddH ₂ O
Mobilna faza B	2,2-% mravljična kislina, 85-% ACN, 12,8-% ddH ₂ O
Gradient	Gradient: 0 min 100 % A, 0–5 min 10 % B, 5–20 min 10–35 % B, 20–22 min 35 % B, 22–26 min 35–45 % B, 26–27 min 45–60 % B, 27–32 min 100 A
Pretok	1 ml/min
Detektor	520 nm
Volumen injiciranja	20 μ L

Iz standardnih raztopin pripravimo umeritveno krivuljo v programu za izračun premice. Površine spojin, ki smo jih prepoznali kot antocianine ali piranoantociane, preračunamo v koncentracije v mg/L, pri čemer upoštevamo morebitne redčitvene faktorje. Pri analizi vina podajamo rezultate v mg/L vina, medtem ko nas pri kožicah zanima mg/kg ali g suhih kožic. Za vinogradnika in vinarja je sicer najbolj praktičen rezultat na kg grozdnih jagod. Če bi želeli preračunati na svežo maso jagod, potem bi morali upoštevati natančno količino mase kožic na kg jagod, in tudi izgubo vode v procesu liofiliziranja. To določimo s tehtanjem vzorcev pred samimi koraki predpriprave biološkega vzorca grozdnih jagod.

Za natančne analize je treba vse postopke, ki so vir napake, ponavljati vsaj trikrat in določiti napako. Najmanjšo napako ima sama kromatografska analiza. Pri podajanju rezultatov je pomemben podatek, za kakšne ponovitve gre v samem rezultatu – ali gre za ponovitev injiciranja ali ekstrahiranja, ali pa že biološkega vzorca iz vinograda, ki naj ima najmanj 100 jagod.

Protokol za merjenje barve vin

Barva rdečega vina se lahko določi z UV-VIS spektrofotometrom. Uporabimo kiveto z dolžino

optične poti 1 mm. Vzorec filtriramo skozi 0,45- μ m filter in odpipetiramo 500 μ L. Izmerimo absorbanco pri treh različnih dolžinah (420, 520 in 620 nm) v skladu z metodologijo OIV (OIV, 2019).

Intenzivnost barve izračunamo kot vsoto absorbanc pri 420, 520 in 620 nm.

Odtenek vina izračunamo kot razmerje med absorbancama pri 420 in 520 nm.

Viri

Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. *Anal. Chim. Acta* 563, 238–254. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.028>

Aleixandre-Tudo, J. L., Buica, A., Nieuwoudt, H., Aleixandre, J. L., du Toit, W. (2017). Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds in Grapes and Wines. *J. Agric. Food Chem.* 65, 4009–4026. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01724>

Blanco-Vega, D., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I. (2014). Identification, content and distribution of anthocyanins and low molecular weight anthocyanin-derived pigments in Spanish commercial red wines. *Food Chem.* 158, 449–458. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.154>

Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. (2013). *Principles and Practices of Winemaking*. Springer Science & Business Media.

Božič, J. T., Butinar, L., Albrecht, A., Vovk, I., Korte, D., Vodopivec, B. M. (2020a). The impact of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts on wine colour: A laboratory study of vinylphenolic pyranoanthocyanin formation and anthocyanin cell wall adsorption. *LWT* 123, 109072. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109072>

Božič, J. T., Čurko, N., Ganić, K. K., Butinar, L., Albrecht, A., Vovk, I., Korte, D., Vodopivec, B. M. (2020b). Synthesis of pyranoanthocyanins from Pinot Noir grape skin extract using fermentation with high pyranoanthocyanin producing yeasts and model wine storage as potential approaches in the production of stable natural food colorants. *Eur. Food Res. Technol.* 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03467-2>

Champ, C. E., Kundu-Champ, A. (2019). Maximizing Polyphenol Content to Uncork the Relationship Between Wine and Cancer. *Front. Nutr.* 6.

CIE. (2007). Colorimetry-part 4: CIE 1976 $L^* a^* b^*$ colour space. *Int. Stand.* 2019–06.

Dipalmo, T., Crupi, P., Pati, S., Clodoveo, M.L., Di Luccia, A. (2016). Studying the evolution of anthocyanin-derived pigments in a typical red wine of Southern Italy to assess its resistance to aging. *LWT – Food Sci. Technol.* 71, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.012>

Freitas, V.A.P. de, Fernandes, A., Oliveira, J., Teixeira, N., Mateus, N. (2017). A review of the current knowledge of red wine colour. *OENO One* 51. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2017.51.1.1604>

Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-

Visible Spectroscopy. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* 00, F1.2.1-F1.2.13. <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>

He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.-Q. (2012a). Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. *Molecules* 17, 1571–1601. <https://doi.org/10.3390/molecules17021571>

He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.-Q. (2012b). Anthocyanins and Their Variation in Red Wines II. Anthocyanin Derived Pigments and Their Color Evolution. *Molecules* 17, 1483–1519. <https://doi.org/10.3390/molecules17021483>

He, F., Mu, L., Yan, G.-L., Liang, N.-N., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.-Q. (2010). Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes. *Molecules* 15, 9057–9091. <https://doi.org/10.3390/molecules15129057>

Hunter, R. S., Harold, R. W. (1987). *The Measurement of Appearance*. John Wiley & Sons.

Kalogiouri, N. P., Karadimou, C., Avgidou, M. S., Petsa, E., Papadakis, E.-N., Theocharis, S., Mourtzinou, I., Menkissoglu-Spirodi, U., Koundouras, S. (2022). An Optimized HPLC-DAD Methodology for the Determination of Anthocyanins in Grape Skins of Red Greek Winegrape Cultivars (*Vitis vinifera* L.). *Molecules* 27, 7107. <https://doi.org/10.3390/molecules27207107>

López-Fernández, O., Domínguez, R., Pateiro, M., Munekata, P. E. S., Rocchetti, G., Lorenzo, J. M. (2020). Determination of Polyphenols Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Technique (LC–MS/MS): A Review. *Antioxidants* 9, 479. <https://doi.org/10.3390/antiox9060479>

Lorrain, B., Ky, I., Pechamat, L., Teissedre, P.-L. (2013). Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines, and Extracts. *Molecules* 18, 1076–1100. <https://doi.org/10.3390/molecules18011076>

Macheix, J.-J. (2017). *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton. <https://doi.org/10.1201/9781351072175>

Merecz-Sadowska, A., Sitarek, P., Kowalczyk, T., Zajdel, K., Jęcek, M., Nowak, P., Zajdel, R. (2023). Food Anthocyanins: Malvidin and Its Glycosides as Promising Antioxidant and Anti-Inflammatory Agents with Potential Health Benefits. *Nutrients* 15, 3016. <https://doi.org/10.3390/nu15133016>

Minnaar, P., Nyobo, L., Jolly, N., Ntushelo, N., Meiring, S. (2018). Anthocyanins and polyphenols in Cabernet Franc wines produced with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* yeast strains: Spectrophotometric analysis and effect on selected sensory attributes. *Food Chem.* 268, 287–291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.074>

Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., Suárez, J. A. (2005). Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *Eur. Food Res. Technol.* 220, 341–346. <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1053-8>

Moreno, J., Peinado, R. (2012). *Enological Chemistry*. Academic Press.

Nikfardjam, M. S. P., Márk, L., Avar, P., Figler, M., Ohmacht, R. (2006). Polyphenols, anthocyanins, and trans-resveratrol in red wines from the Hungarian Villány region. *Food Chem.* 98, 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.014>

OIV. (2019). OIV – *Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts* (2 vol.). International Organisation of Vine and Wine.

Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* 5, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>

Sabra, A., Netticadan, T., Wijekoon, C. (2021). Grape bioactive molecules, and the potential health benefits in reducing the risk of heart diseases. *Food Chem.* X 12, 100149. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100149>

Suárez-Lepe, J. A., Morata, A. (2012). New trends in yeast selection for winemaking. *Trends Food Sci. Technol.* 23, 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.005>

Topić, J., Korte, D., Mozetič Vodopivec, B. (2017). *The comparison of anthocyanin and pyranoanthocyanin extraction efficiency in Pinot Noir wine using SPE*. V: Book of abstracts 24th young Investigators Seminar on Analytical Chemistry. Venice, Italy.

Topić Božič, J., Butinar, L., Antalick, G., Sternad Lemut, M., Martelanc, M., Albreht, A., Korte, D., Mozetič Vodopivec, B. (2022). The influence of selected indigenous yeasts on Pinot Noir wine colour properties. *J. Sci. Food Agric.* 102, 664–672. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11395>

Topić Božič, J., Korte, D., Butinar, L., Mozetič Vodopivec, B., (2019). Yeasts and wine colour. *Croat. J. Food Sci. Technol.* 11, 291–302. <https://doi.org/10.17508/CJFST.2019.11.2.17>

Valls, J., Millán, S., Martí, M.P., Borràs, E., Arola, L. (2009). Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *J. Chromatogr. A, Advanced Separation Methods in Food Analysis* 1216, 7143–7172. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.030>

Waterhouse, A. L. (2002). Wine Phenolics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957, 21–36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x>

Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., Jeffery, D. W. (2016). *Understanding Wine Chemistry, Understanding Wine Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118730720>

Welch, C. R., Wu, Q., Simon, J. E. (2008). Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Curr. Anal. Chem.* 4, 75–101.

Wrolstad, R. E. (2005). *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. John Wiley.

5.

POLIFENOLI BELEGA GROZDJA IN VINA

Branka Mozetič Vodopivec^{1,2} in Magdalina Mihajlovská¹

Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo,¹ Center za raziskave vina,² Univerza v Novi Gorici, Glavni trg 8,
Vipava
branka.mozetic@ung.si

Uvod

Polifenoli so kemijske spojine, ki jih najdemo v številnih živilih in pijačah, pa tudi v grozdju in vinu. Zaradi edinstvene kemične strukture pomembno vplivajo na senzorične lastnosti vina ter omogočajo staranje vina in koristi za zdravje ljudi. Belo grozdje ima manj polifenolov kot rdeče in po navadi nič antocianinov, če pa že, so to res zelo majhne koncentracije (Panagiotis in sod., 2015), ki v prvih fazah predelave grozdja večinoma oksidirajo ali se porazgubijo in jih je v vinih enostavno lahko premalo za zaznavo – tako instrumentalno kot tudi senzorično.

Tabela 1. Povprečne vsebnosti flavonoidnih fenolnih spojin v belem grozdju (povzeto po Clarke in sod., 2022).

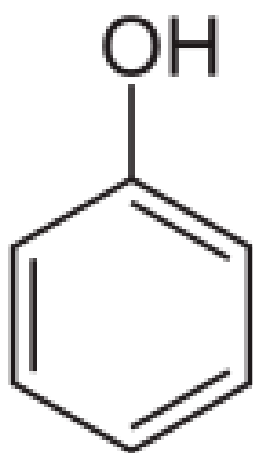
Vrsta flavonola	Vrsta	Vir	Koncentracija
flavan-3-oli	(+) katehin (-) epikatehin (-) epikatehin galat (-) epigalokatehin procianidini kondenzirani tanini	kožice peške	monomernih 15–25 mgL ⁻¹ polimernih 20–25 mgL ⁻¹
flavonoli	kvercetin kamferol mircetin (kot glukozidi najpogostejše)	kožice	majhne koncentracije
antocianini	cianidin-3-glukozid delfinidin-3-glikozid petunidin-3-glukozid peonidin-3-glukozid malvidin-3-glukozid	rdeča barvila v kožicah belega grozdja	sledovi

Polifenoli so znani po svojih močnih antioksidativnih lastnostih, ki so bistvene za nevtralizacijo prostih radikalov in blažitev oksidativnega stresa, pri človeku povezanega s staranjem in boleznimi. Izkazujejo močne protivnetne učinke, ki so ključni pri odpravljanju kroničnega vnetja, to pa je prevladujoč dejavnik številnih kroničnih bolezni. Polifenoli pripomorejo k zdravju srca in ožilja, saj izboljšujejo krvni obtok, znižujejo krvni tlak in podpirajo žilno delovanje (Lucarini in sod., 2021). Poleg tega njihove protimikrobne lastnosti pomagajo pri imunskem sistemu in potencialno ščitijo pred okužbami (Gutiérrez-Escobar in sod., 2021). Polifenoli imajo lahko tudi nevroprotektivne prednosti, saj spodbujajo zdravje in delovanje možganov, kar poudarja njihove celovite koristi za zdravje v rdečih in belih vinih, če jih uživamo zmerno (Lucarini in sod., 2021).

Če primerjamo celokupno vsebnost fenolnih spojin, imajo rdeča vina v povprečju 215 mg/100 mL skupnih fenolov (kot galna kislina), bela v povprečju 32 mg/100 mL in rosé vina 82 mg/100 mL (Rothwell in sod., 2013).

Kemijska struktura in opis skupin fenolov

Polifenoli so skupina spojin, ki jih najdemo v različnih rastlinah in veljajo za sekundarne metabolite. V kemiji vina in grozdja so polifenoli spojine, ki vsebujejo vsaj en fenolni obroč s hidroksilno skupino (Slika 1).



Slika 1. Osnovna kemijska struktura fenola.

V grozdju so polifenoli razporejeni po celotni jagodi, pri čemer prevladujejo predvsem v različnih delih grozdne jagode, kot so kožice, pečke in pulpa. Zgoščeni so predvsem v kožici in peškah grozdnih jagod, pri čemer so njihove vsebnosti običajno večje v rdečem grozdju in vinih v primerjavi z belim grozdom (Moreno in Peinado, 2012; Rothwell in sod., 2013; Waterhouse in sod., 2016).

Tabela 2. Razdelitev polifenolov v sadju z glavnimi predstavniki (Macheix in sod., 1990).

Število atomov C	Osnovni skelet	Razred	Primer spojine
7	C ₆ -C ₁	hidroksibenzojske kisline	<i>p</i> -hidroksibenzojska kislina
9	C ₆ -C ₃	hidroksicimetne kisline, kumarini	kavna kislina skopolin
10	C ₆ -C ₄	naftokinoni	juglon
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	ksantoni	mangiferin
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	stilbeni	resveratrol
15 n	C ₆ -C ₃ -C ₆	flavonoidi izoflavonoidi lignini tanini	kvercetin, cianidin daidzein

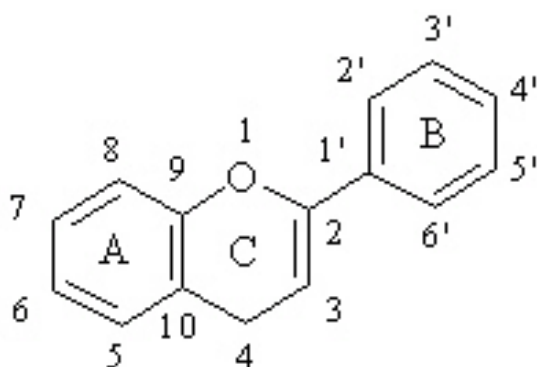
Ne glede na to, da jih je v belih vinih manj kot v rdečih, tudi tam pomembno pripomorejo k videzu vina, pa tudi k okusu. Koliko, je odvisno predvsem od metode pridelave vina, še posebej od podaljšanega stika s kožicami in pečkami, pred fermentacijo ali med fermentacijo, lahko pa tudi po fermentaciji.

Fenolne spojine so prisotne vsepovsod v naravi, obstaja več klasifikacij, najpogostejša pa je tista po številu ogljikovih atomov v strukturi (Tabela 2).

V belem grozdju seveda nimamo vseh skupin fenolov, ki so v Tabeli 1, le nekatere predstavnike. Glavna delitev fenolov v grozdju glede na njihovo kemijsko zgradbo je:

- flavonoidni (difenilpropanoidi) in
- neflavonoidni (fenilpropanoidi) polifenoli.

Flavonoidi imajo skelet iz 15 ogljikovih atomov, ki so organizirani v dva fenolna obroča (A in B), povezana z vmesnim heterociklom (C). Te spojine imajo v glavnem strukturo, ki jo na kratko opišemo z nizom C6-C3-C6 (Macheix in sod., 1990).



Slika 2. Osnovna strukturna formula flavonoidov: 2-fenilbenzopiran oz. difenil propanoid (povzeto po Macheix in sod., 1990).

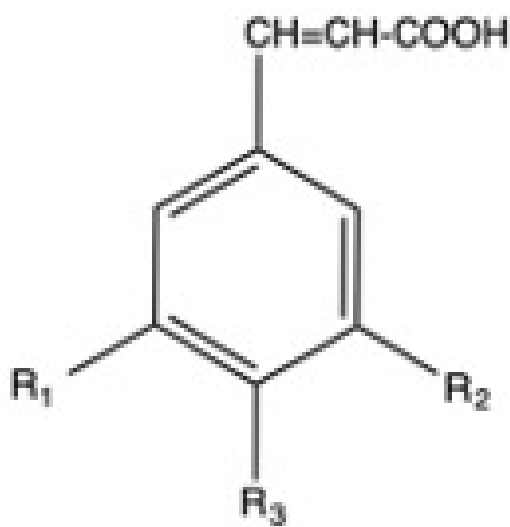
Flavonoidi se dalje delijo v šest podskupin, ki so poznani pod imenom flavan-3-oli, flavonoli, flavanoli, flavanoni, izoflavoni in antocianini (Moreno in Peinado, 2012). Flavan-3-oli ne obstajajo samo v monomerni obliki (katehin, epikatehin in njuni derivati), ampak tudi kot oligomeri (dimeri, trimeri, tetrameri idr.) in polimeri (od pet do sto in več podenot) teh monomerni flavan-3-oli, ki se imenujejo **kondenzirani tanini** ali tudi **procianidini** in **prodelfinidini**. Slednji so zelo pomembni za kakovost vina, predvsem rdečega (Macheix in sod., 1990; Moreno in Peinado, 2012; Waterhouse in sod., 2016). Flavonoidni fenoli predstavljajo približno 20 % vseh fenolov v belem vinu (Clarke in sod., 2022).

Neflavonoidni fenoli se nadalje delijo na fenolne kisline (struktura C6-C1), hidroksicimetne kisline (HCK) (C6-C3) in stilbene (C6-C2-C6) (Macheix in sod., 1990; Moreno in Peinado, 2012; Waterhouse in sod., 2016).

V belem grozdju so glavni fenoli **hidroksicimetne kisline (HCK) in predstavljajo v povprečju skoraj 50 % celokupne vsebnosti fenolov**, sledijo monomerni flavan-3-oli ter njihove dimerne in polimerne strukture (kondenzirani tanini) ter flavanoli, kot so kvercetin, miricetin in še stilbeni, med katerimi je najbolj znan resveratrol (Clarke in sod., 2023).

Na Sliki 3 so glavne vrste hidroksicimetnih kislin grozdja in vina, ki pa v grozdju in vinu obstajajo v zaestreni obliki – največkrat z vinsko kislino (Slika 4).

Spojina	R ₁	R ₂	R ₃
cimetna kislina	H	H	H
<i>p</i> -kumarna kislina	H	H	OH
kavna kislina	H	OH	OH
ferulna kislina	H	OCH ₃	OH
sinapinska kislina	OCH ₃	OCH ₃	OH



Slika 3. Glavne hidroksicimetne kisline grozdja.

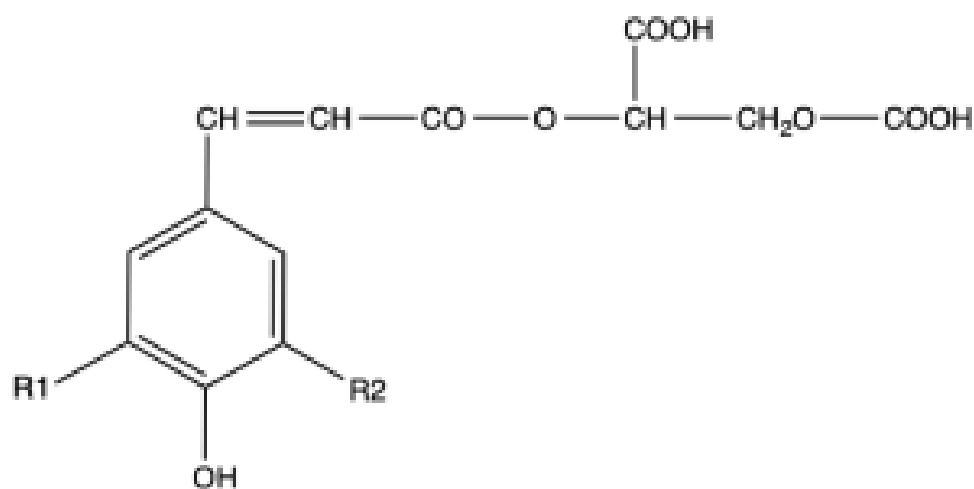
Hidroksicimetne kisline (tudi kratica HCK) v grozdju najpogosteje obstajajo kot estri vinske kisline, ki jih poznamo pod imenom *kutarna*, *kaftarna* in *fertarna kislina*. Ker imajo v svoji strukturi dvojno vez, je možna optična rotacija funkcionalnih skupin okrog dvojne vezi, zato lahko obstajajo v *trans* ali *cis* konfiguracijah. V naravi je največ *trans* oblik HCK. Konfiguracije *cis* in *trans* lahko tudi zaznamo s kemijsko analizo (kromatografsko te spojine lahko ločimo med seboj), ampak so največkrat prisotne zaradi kemijskih pretvorb v procesu priprave vzorca (Macheix in sod., 1990). Vedno jih je več v kožici kot v pulpi grozdja. V belem grozdju jih je skupaj okrog 130–150 mg/L (Clarke in sod., 2023), v belih vinih pa je vseh HCK v povprečju 28 mg/L (Rothwell in sod., 2013).

Na Sliki 4 je primer estrske spojine med hidroksicimetnimi kisljinami in vinsko kislino, zraven so poimenovanja glavnih hidroksicimetnih kislin grozdja in vina, to so kaftarna kislina, kutarna in fertarna kislina. Ko gre grozdje v predelavo, te fenolne spojine med drozganjem pridejo v stik z endogenimi encimi v medceličnini – to so razne hidrolaze (poleg polifenol oksidaz – PPO), ki tudi cepijo estrsko vez, zato je količina esterificiranih HCK v vinu manjša, kot je bila v grozdju. Potem najdemo v vinu tudi nezaestrene HCK, kot so kavna kislina, *p*-kumarna ali ferulna kislina (Vrhovšek, 1998), ki se pod vplivom encimov kvasovk lahko pretvorijo v hlapne fenole (Moreno in Peinado, 2012; Waterhouse in sod., 2016).

HCK so v začetnih fazah predelave grozdja oksidirane z encimi, kot sta lakaza in tirozinaza, kar vodi v porjavenje mošta. Aktivnost teh encimov sčasoma postane manj pomembna, ko oksidacija v vinu postane kemijska. Oksidacija vodi do nastanka temno rjavih odtenkov mošta in vina ter posledično vpliva tudi na

zmanjšanje nekaterih aromatičnih prekurzorjev hlapnih fenolov. Ti produkti reagirajo kot antioksidanti tudi naprej z drugimi spojinami vina, med njimi s hlapnimi spojinami, kot so sortni tioli (Waterhouse in sod., 2016).

Cimetna kislina	R1	R2	Spojina
<i>p</i> -kumarna kislina	H	H	kutarna kislina
kavna kislina	OH	H	kaftarna kislina
ferulna kislina	H	OCH ₃	fertarna kislina

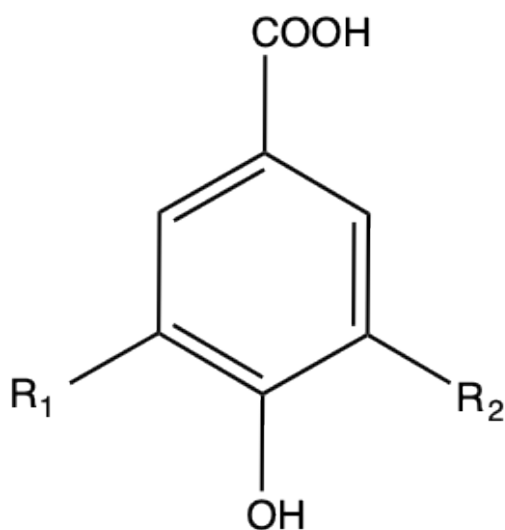


Slika 4. Kemijska struktura različnih hidroksicimetnih kislin grozdja in vina.

Ferulna in *p*-kumarna kislina se lahko pod vplivom delovanja encima kvasovk *S. cerevisiae* cinamat dekarboksilaza pretvorijo v 4-vinil gvajakol in 4-vinil fenol, ki imata strukturo C6-C2. Največkrat se ju povezuje z vonjem po klinčkih in zdravilih. Lahko pa ti hlapni fenoli povzročajo neželene vonje vin in slabšo kakovost vina. Cinamat dekarboksilaza je endocelularni encim, ki deluje le med alkoholno fermentacijo. Tovrstne encime zavirajo tudi druge fenolne spojine, kar pomeni, da je koncentracija vinil fenolov manjša v rdečih vinih (Moreno in Peinado, 2012; Waterhouse in sod., 2016). Več o teh spojinah si lahko preberete v drugem poglavju.

Druga pomembna skupina fenolov belega grozdja in vina so hidroksibenzojske ali fenolne kisline. Hidroksibenzojske kisline so sestavljene iz enega benzenovega obroča in s substitucijo karboksilne kisline (Slika 5) ter hidroksilnimi ali metoksi skupinami na fenolnem obroču. Nahajajo se v vakuolah celic pulpe grozdja in v vakuolah celic kože. V raztopini voda-etanol so brezbarvne, ko oksidirajo, pa lahko postanejo temnejše barve (Moreno in Peinado, 2012).

Spojina	R ₁	R ₂
<i>p</i> -hidroksibenzojska kislina	H	H
<i>p</i> -protokatehinska kislina	H	OH
galna kislina	OH	OH
vanilinska kislina	H	OCH ₃
sinirginska kislina	OCH ₃	OCH ₃

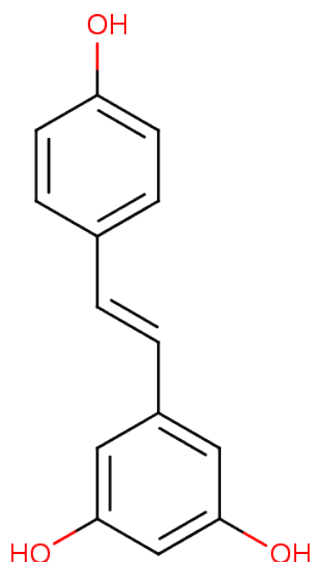


Slika 5. Glavne hidroksibenzojske kisline grozdja.

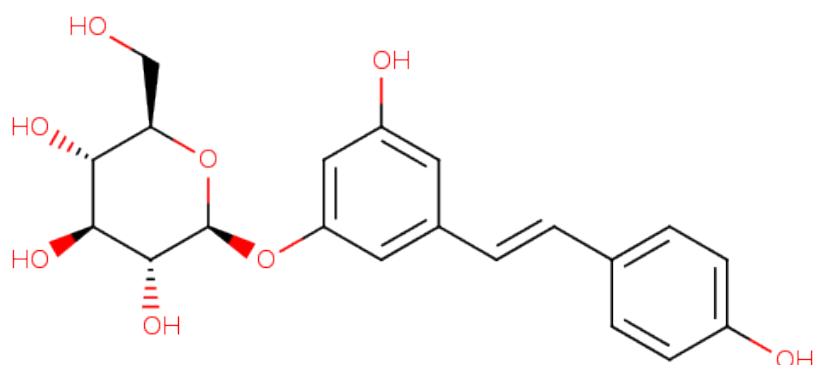
Najpogostejša hidroksibenzojska kislina v belem vinu je galna kislina (0,32–1,1 mg/100 mL vina), sledijo *p*-hidroksibenzojska kislina (0,03–0,1 mg/100 ml), *p*-protokatehinska kislina (0,4–1,2 mg/100 ml), vanilinska kislina (0,04–0,12 mg/100 mL) in sinirginska kislina (0,007–0,02 mg/100 mL) (Clarke in sod, 2023).

V raziskavi diplomske naloge polifenolov vin iz grozdja sorte rebula (*Vitis vinifera* L.) iz Vipavske doline in Goriških brd, pridelanih s podaljšano maceracijo drozge, smo ugotovili, da imajo tovrstna vina izmed posameznih fenolov največ prav galne kisline – od 0,14 pa do 9,2 mg/100 mL (Popova, 2023).

Med neflavonoidnimi fenoli so v belem vinu našli tudi fenolni alkohol tirozol (0,10–0,30 mg/100 mL). Tirozol v vinu nastane iz tirozina med fermentacijo, njegova koncentracija pa je odvisna od seva kvasovk (Gawell in sod., 2018).



Slika 6. Glavni stilbeni belega vina: resveratrol (0,03–0,17 mg/100 mL) in resveratrol-3-O-glukozid (0,12–0,61 mg/100 mL) (Rothwell in sod., 2013).

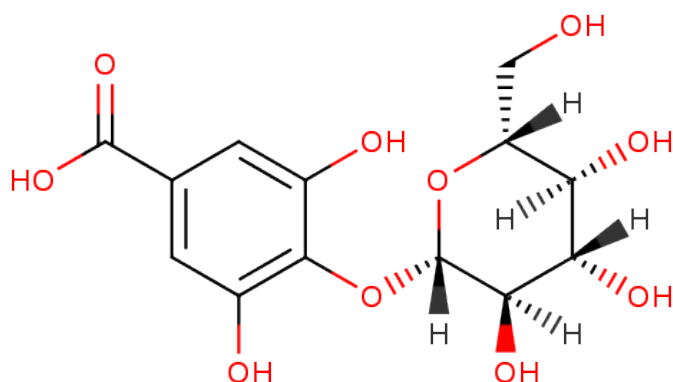


Druga skupina fenolov, ki jih je v vinih na splošno tudi manj, so stilbeni. Med njimi je najbolj znan predstavnik *trans*-resveratrol, ki nastane v grozdju kot odziv rastline na okužbe s patogeni. Derivate resveratrola najdemo le v jagodnih kožicah in v majhnih koncentracijah v belem vinu (~0,5 mg/L) (Waterhouse, 2002; Rothwell in sod., 2013), veliko več jih je na primer v vinih iz rdečih sort (~3 mg/L) (Rothwell in sod., 2013).

V kemijski strukturi stilbenov gre za dva fenolna obroč, ki ju povezuje veriga etanola ali etilena. Ne prispevajo ne k barvi ne k aromi vina, odlikuje jih močna bioaktivost, s katerimi povezujejo sposobnost pri zadrževanju razvoja bolezni srca in ožilja (Moreno in Peinado, 2012).

Če tehnologija pridelave vin vključuje tudi staranje vina v lesenih sodih, lahko poleg prej omenjenih fenolov vina vsebujejo tudi hidrolizabilne tanine lesnega izvora. Koncentracija teh spojin v vinih je različna glede na trajanje stika z lesom, poleg drugih dejavnikov, kot sta vrsta lesa ali starost lesa. Vinarji lahko stik z lesom nadomestijo tudi z enološkimi tanini in taki tanini so po navadi hidrolizabilni.

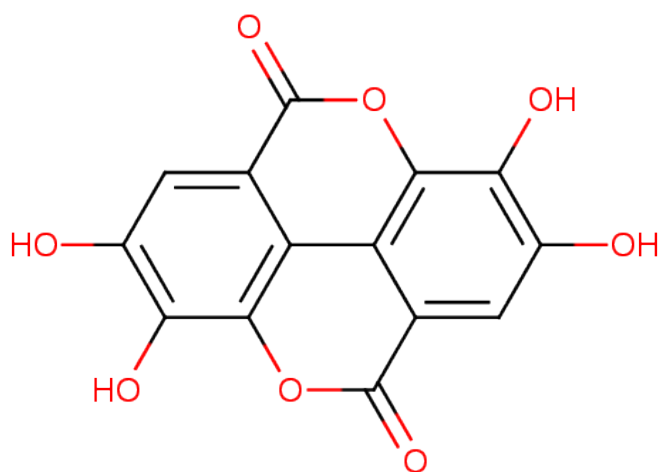
Hidrolizabilne tanine imenujemo galotanini ali elagotanini. Galotanini nastanejo s polimerizacijo estra galne kisline in D-glukoze. Na Sliki 7 je struktura estra galne kisline in D-glukoze (Gawell in sod., 2018).



Slika 7. Strukturna formula estra galne kisline in glukoze (Rothwell in sod., 2013).

Elagotanini so polimeri elago kisline (Slika 8), dimera galne ali heksahidroksidifenilne kisline, ki jih pridobivajo iz hrastovega lesa ali kostanja (Moreno in Peinado, 2012).

Enološki hidrolizabilni tanini lahko delujejo kot pomembni antioksidanti in antioksidacijska sredstva, ki zmanjšujejo aktivnost oksidacijskih encimov. To kaže na njihov potencialni vpliv na zmanjšanje potrebe po dodajanju SO_2 pri pridelavi vina. Poleg tega te spojine pomagajo pri obarvanju in bistrenju z bentonitom, vplivajo pa tudi na okus belih vin (Vignault in sod., 2018).



Slika 8. Strukturna formula elago kisline (Rothwell in sod., 2013).

V zadnjih letih nekateri vinarji v pridelavi belih vin uporabljajo tehnike podaljšane maceracije drozge s

kožicami, pulpo in peškami. Včasih ta vina zaradi temnejše barve imenujejo tudi jantarna/amber vina ali oranžna vina (Milat in sod., 2019). Ta tehnologija vina je za zdaj še manj raziskana (v primerjavi z rdečimi vini) – pretežno pa se s tem ukvarjajo raziskovalci v deželah, kjer tudi vinarji to tehnologijo malce več uporabljajo (npr. Italija, Španija, Hrvaška) (Machado in sod., 2024).

Maceracija drozge belega grozdja zagotovo vpliva tudi na druge kemijske lastnosti vina, kot so zvišanje vrednosti pH, znižanje celokupne titrabilne kislosti, večja hlapna kislost, drugačen aromatični profil vin in senzorične lastnosti vin (Darias-Martin in sod., 2020; Sancho-Galan in sod., 2021).

Pomemben vpliv maceracije v pridelavi belih vin se kaže v povečani koncentraciji izluženih polifenolov (tudi do 3-krat) in s tem večjo antioksidativno aktivnostjo, grenkobo in trpkostjo ter razvojem jantarnih/oranžnih odtenkov (Bestulič in sod., 2022). Podaljšana maceracija drozge je priznan postopek v tehnologiji pridelave belih vin, vpliva tega postopka na kakovost in lastnosti vin pa ne moremo posplošiti, ker je veliko dejavnikov, ki lahko vplivajo na kemijske parametre vina (sorta, zrelost, parametri vinifikacije, fermentacije ipd.).

Na prisotnost polifenolov v belem grozdju in vinu vplivajo različni dejavniki, med drugim sorta grozdja, podnebje, tla, izpostavljenost soncu, trta, grozd in jagoda. Poleg tega ima pri vinu tehnološki postopek ključno vlogo pri spreminjanju količinskega in kakovostnega polifenolnega profila mladega vina, ki se lahko dodatno spremeni z reakcijami med staranjem (Garrido in Borges, 2013; Moreno in Peinado, 2012; Waterhouse in sod., 2026; Clarke in sod., 2022).

S podaljšano maceracijo, predobdelavo z encimi (pektinaze, β -glukanaze), hladno pred- in medfermentativno maceracijo v matrico mošta vnašamo zagotovo več polifenolov kot pri tehnologiji pridelave belih vin brez predobdelave kožic z encimi ali podaljšanega stika mošta s kožicami ali drozgo. Ti fenoli so izpostavljeni različnim reakcijam, ki vplivajo na okus in videz vina, pa tudi na sortne in fermentacijske hlapne spojine (posredno) (Ružič in sod., 2011; Jagatić Korenika in sod., 2018; Garrido-Bañuelos in sod., 2019; Naviglio in sod., 2019; Tomašević in sod., 2019; Sancho-Galan in sod., 2021; Scuturasu in sod., 2021; Bestullič in sod., 2022).

Glavne kemijske reakcije polifenolov belega grozdja med vinifikacijo

Bela vina vsebujejo od polifenolov predvsem hidroksicimetne kisline, ki so v grozdju kot estri vinske kisline. Te spojine zelo rade vstopajo v začetne reakcije oksidacije in hidrolize takoj po pecljanju, drozganju in stiskanju. Takrat je prisotnega tudi več kisika, encimi, ki katalizirajo oksidacijo fenolov, pa so takrat v stiku tudi s spojinami, ki so v grozdju varno shranjene v vakuolah grozdja (npr. fenoli) (Moreno in Peinado, 2012; Vrhovšek, 1997).

V procesu pridelave vina sta možni dve vrsti oksidacije:

- encimska,
- neencimska.

Encimska oksidacija, ki jo katalizirata encima polifenol oksidaza (PPO) in peroksidaza (POD), temelji na

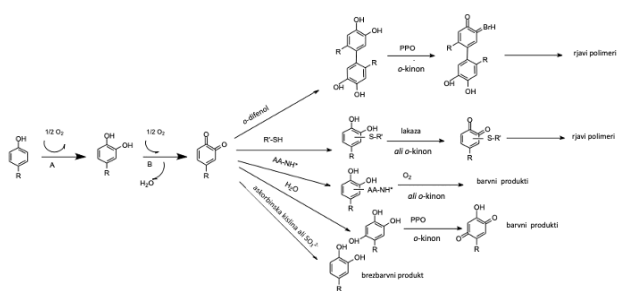
vodikovem peroksidu (H_2O_2) in lahko povzroči porjavlost grozdnega mošta, zlasti zaradi oksidacije HCK, kot je kaftarna kislina. Encim PPO začne proces z oksidacijo kaftarne kisline v *o*-kinone kaftarne kisline (CTAQ), ki s hidroksilacijo, polimerizacijo in kondenzacijskimi reakcijami nadalje reagirajo med seboj in z drugimi spojinami ter tvorijo rjave pigmente (Li in sod., 2008; Olivera in sod., 2011) (Slika 9).

Kinoni so zelo reaktivni kot oksidanti drugih sestavin mošta, kot so drugi fenoli, sortni tioli ali estri (Moreno in Peinado, 2012; Waterhouse in sod., 2016). Tako nastane tudi acetaldehid, in sicer s kemijsko oksidacijo etanola. Acetaldehid lahko nadalje reagira tudi s fenolnimi spojinami in sulfiti v vinu, kar nadalje vpliva na svežino in stabilnost vina, saj se tako manjša naravna in dodana antioksidativna zaščita vina (Jackson, 2020; Waterhouse in sod., 2016).

Če je encimska oksidacija značilna za začetne faze pridelave vina, je neencimska oksidacija značilna za procese staranja vina.

Neencimska oksidacija v vinu vključuje predvsem oksidacijo polifenolov, kot so (+)katehin, (-)-epikatehin, galokatehin, galna kislina in kavna kislina z *orto*-dihidroksibenzenom (katehol) ali 1,2,3-trihidroksibenzenom (galoil). Ti pri tem oksidirajo do polikinonskih radikalov in benzokinonov, kisik pa se v tem procesu reducira do vodikovega peroksida ob prisotnosti kovinskih ionov vina Fe^{3+} in Cu^{2+} , ki pri tem oksidirajo do Fe^{2+} oziroma do Cu^+ . Osrednji del te kemijske oksidacije s kovinskimi ioni je tako imenovana Fentonova reakcija. Med to reakcijo iz vodikovega peroksida in železovih ionov nastajajo hidroksilni radikali, ki nadalje oksidirajo organske molekule in spodbujajo njihovo polimerizacijo (Olivera in sod., 2011; Waterhouse in sod., 2016; Zhao in sod., 2023).

Čeprav belo vino ne vsebuje rdečih barvil, lahko tudi neencimska oksidacija povzroči spremembe v barvi vina med staranjem. Kinoni, ki nastajajo med oksidacijo, lahko reagirajo z drugimi spojinami in tvorijo rjavkaste pigmente. To povzroči temnejše odtenke belega vina, kar je pogosto znak oksidacije. Pri vinih, pridelanih s podaljšanim stikom z maceracijo drozge, ki poveča količino fenolov v moštu, ter ki rada in hitro oksidirajo (zlasti fenoli, kot je epikatehin), se ti odtenki razvijejo hitreje, ker je fenolov v takem vinu več kot pri vinih, ki niso bila pridelana s podaljšano maceracijo drozge (Li in sod., 2008; Zhao in sod., 2023).



Slika 9. Različne reakcije v procesih oksidacije fenolnih spojin.

Sulfiti se običajno dodajajo belemu vinu kot zaščita pred oksidacijo tudi že v začetnih fazah pridelave vina. Vendar pa lahko kinoni, ki nastanejo med intenzivno encimsko oksidacijo fenolov, reagirajo s sulfiti,

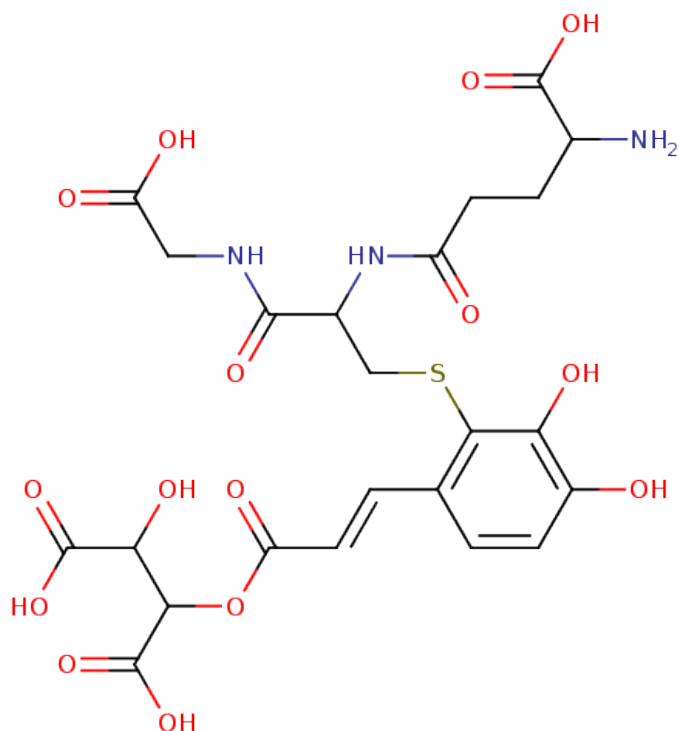
kar zmanjša njihovo nadaljnjo antioksidativno učinkovitost. To pomeni, da je to vino bolj izpostavljeno oksidativnim spremembam v steklenici (Jackson, 2020; Waterhouse in sod., 2016; Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Belo vino tudi nima taninov, ki imajo zaščitno vlogo, kar pomeni, da je za oksidacijo občutljivejše kot rdeče. Zato je zelo pomembno, da se pri postopkih pridelave belega vina preprečuje čezmeren stik vina s kisikom, da se ohranita njegova svežina in kvaliteta. K temu lahko pomembno pripomoremo tudi s primerno nizko temperaturo pri pridelavi belega vina vse od začetnih faz predelave grozdja (Jackson, 2020).

Hlajenje mošta – grozdnega soka pred fermentacijo in tudi med maceracijo je pomembna tehnika, ki vpliva na različne kemijske reakcije, vključno z oksidacijskimi reakcijami fenolnih spojin v belem vinu. Hlajenje mošta lahko znatno zmanjša hitrost oksidacije fenolov, kar je pomembno za ohranjanje svežine, barve in arome belega vina.

Hlajenje mošta upočasni tudi encimske reakcije, vključno z aktivnostjo PPO in lakaze. Nižje temperature zmanjšajo kinetično energijo molekul, zato se reakcije odvijajo počasneje. Posledično je hitrost oksidacije fenolov pri nižjih temperaturah manjša, kar pomaga ohraniti svetlejšo barvo vina (Jackson, 2020).

Poleg encimskih reakcij fenolne spojine lahko oksidirajo. Pri hlajenju mošta se topnost kisika v tekočini sicer poveča, vendar nižja temperatura hkrati zmanjša hitrost kemijskih reakcij. To pomeni, da se kljub večji količini raztopljenega kisika oksidacija fenolov upočasni, kar prispeva k ohranjanju polifenolne sestave mošta in preprečevanju neželenih barvnih sprememb in sprememb okusa (Ribéreau-Gayon in sod., 2006).

Pred oksidacijo vina pomembno ščiti tudi tripeptid glutation, ki je sestavljen iz aminokislin glicin, cistein in asparaginska kislina. V nekaterih kultivarjih grozdja je naravno prisoten v zelo velikih koncentracijah. Glutation reagira z *o*-kinoni kaftarne kisline, pri čemer nastane 2-S-glutationil kaftarna kislina, znana kot produkt grozdne reakcije (GRP) (Moreno in Peinado, 2012), in tako prepreči oksidacijske reakcije *o*-kinonov.



Slika 10. Struktura produkta grozdne reakcije (Rothwell in sod., 2013).

Produkt grozdne reakcije je brezbarven, ne vstopa v reakcije encimske oksidacije in tako onemogoča

nastanek rjavih produktov, saj inaktivira *o*-kinon kaftarne kisline in zato onemogoča nadaljnje reakcije oksidacije. GRP pa lahko oksidira v prisotnosti prevelike koncentracije kinonov kaftarnih ionov, ki so prisotni v moštu ali vinu takrat, ko se zaloge glutaciona izčrpajo, kar povzroči intenzivno porjavelost mošta ali vina. Porjavitev grozdnega mošta je odvisna od relativnega deleža glutaciona in hidroksicimetnih kislin (Moreno in Peinado, 2012).

Rjavenje mošta med predfermentacijsko obdelavo, kot sta maceracija in hiperoksidacija, lahko učinkovito ustavimo z dodajanjem žveplovega dioksida (SO₂). Dodajanje SO₂ med stiskanjem grozdja ali po njem zmanjša aktivnost PPO in tvorbo *o*-kinonov kaftarne kisline. Tudi če se kinoni tvorijo, SO₂ pomaga povrniti približno 50 % prvotno prisotne kaftarne kisline in s tem tudi prvotno barvo mošta (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Moreno in Peinado, 2012).

Bisulfiti (kemijsko aktivna oblika SO₂ v raztopini) lahko reducirajo di-kinone v di-fenole in z vezavo na kinone pobelijo njihovo barvo ter preprečijo nadaljnje oksidativne reakcije. SO₂ tudi reducira vodikov peroksid v vodo, omejuje oksidacijo etanola v acetaldehid ter oksidacijo askorbinske kisline in *o*-difenolov (Ribéreau-Gayon in sod., 2006; Moreno in Peinado, 2012; Jackson, 2020).

Če pa je vsebnost SO₂ v vinu osiromašena, odsotna ali nezadostna, lahko aktivnost PPO in tvorba kinonov povzročita porjavelost tudi brez dodatnega kisika (Vrhovšek, 1997; Moreno in Peinado, 2012). Dodajanje SO₂ med stiskanjem prepreči vezavo kaftarne kisline v GRP, zaradi česar so takšna vina med staranjem bolj nagnjena k porjavelosti (Jackson, 2020).

Grozdje in vina iz belih sort vsebujejo manj polifenolov kot rdeča vina, ki so tako kot vsi polifenoli izpostavljena oksidaciji tako v začetnih fazah pridelave vina kot tudi med staranjem. Bela vina vsebujejo celokupno precej manj skupnih fenolov kot rdeča, ker je v belem grozdju že izvirno manj polifenolov, pa tudi zato, ker v tehnologiji pridelave belih vin velikokrat ni postopka podaljšane maceracije drozge. Pri postopku podaljšane maceracije drozge je treba za obogatitev belih vin z večjo kompleksnostjo in antioksidativno zmogljivostjo maceracijo nadzorovati, tako z dolžino kot tudi s temperaturo, nikakor pa ne smemo pričakovati splošnega odziva pri vseh sortah, saj so razlike v sestavi, količini in ekstrahibilnosti fenolov iz trdnih delov drozge. Prisotni fenoli belega grozdja so zelo dovzetni za oksidacijo, zlasti v začetni fazi predelave grozdja, kar vodi v nastanek rjavih pigmentov in jantarno barvo takih vin, pa tudi v procesu staranja, če vino ni dovolj zaščiteno z drugimi antioksidanti. Spremembe fenolov med daljšo maceracijo ali staranjem tovrstnih vin še niso dobro poznane. Za pojasnitev kemijskih reakcij in pretvorb polifenolov belega vina med daljšim stikom s kožicami in staranjem so potrebne nadaljnje raziskave, da bi razvili ciljno usmerjene pristope za proizvodnjo visokokakovostnih belih vin s podaljšano maceracijo drozge z želenimi senzoričnimi in zdravju koristnimi lastnostmi.

Viri

Arapitsas, P., Oliveira, J., & Mattivi, F. (2015). Do white grapes really exist? *Food Research International*, 69, 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.12.002>

Bestulić, E., Rossi, S., Plavša, T., Horvat, I., Lukić, I., Bubola, M., Ilak Peršurić, A. S., Jeromel, A., & Radeka, S. (2022). Comparison of different maceration and non-maceration treatments for enhancement

of phenolic composition, colour intensity, and taste attributes of Malvazija istarska (*Vitis vinifera* L.) white wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 109. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.104472>

Clarke, S., Bosman, G., du Toit, W., & Aleixandre-Tudo, J. L. (2022). White wine phenolics: Current methods of analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 103(1), 7–25. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12120>

Darias-Martín, J. J., Rodríguez, O., Díaz, E., & Lamuela-Raventós, R. M. (2000). Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. *Food Chemistry*, 71(4), 483–487. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00177-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00177-1)

Dos Santos, J. R. M., & Kempka, A. P. (2025). White wine vinification and an expanded insight into pellicular macerations: Bibliometric and bibliographic review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 105(1), 19–41. <https://doi.org/10.1002/jsfa.13685>

Garrido-Bañuelos, G., Buica, A., Schückel, J., Zietsman, A. J. J., Willats, W. G. T., Moore, J. P., & Du Toit, W. J. (2019). Investigating the relationship between cell wall polysaccharide composition and the extractability of grape phenolic compounds into Shiraz wines. Part II: Extractability during fermentation into wines made from grapes of different ripeness levels. *Food Chemistry*, 278, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.136>

Gutiérrez-Escobar, R., Aliaño-González, M. J., & Cantos-Villar, E. (2021). Wine Polyphenol Content and Its Influence on Wine Quality and Properties: A Review. *Molecules*, 26(3), 718. <https://doi.org/10.3390/molecules26030718>

Jackson, R. S. (2020). *Wine science: Principles and applications* (Fifth Edition). Academic Press.

Jagatić Korenika, A. M., Maslov, L., Jakobović, S., Palčić, I., & Jeromel, A. (2018). Comparative study of aromatic and polyphenolic profiles of Croatian white wines produced by cold maceration. *Czech Journal of Food Sciences*, 36(6), 459–469. <https://doi.org/10.17221/448/2017-CJFS>

Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. *Food Chemistry*, 108(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.10.065>

Lucarini, M., Durazzo, A., Lombardi-Boccia, G., Souto, E. B., Cecchini, F., & Santini, A. (2021). Wine Polyphenols and Health: Quantitative Research Literature Analysis. *Applied Sciences*, 11(11), 4762. <https://doi.org/10.3390/app11114762>

Macheix, J.-J., Fleuriet, A., & Billot, J. (2018). *Fruit phenolics* (Reissued). CRC Press.

Moreno, J., & Peinado, R. (2012). *Enological chemistry* (1st ed). Academic Press.

Naviglio, D., Formato, A., Scaglione, G., Montesano, D., Pellegrino, A., Vilecco, F., & Gallo, M. (2018). Study of the grape cryo-maceration process at different temperatures. *Foods*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/foods7070107>

Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44(5), 1115–1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.050>

Pascual, O., Vignault, A., Gombau, J., Navarro, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J. M., Hermosín-Gutiérrez, I., Teissedre, P.-L., & Zamora, F. (2017). Oxygen consumption rates by different oenological tannins in a model wine solution. *Food Chemistry*, 234, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.148>

- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments* (1st ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/0470010398>
- Rothwell, J. A., Perez-Jimenez, J., Neveu, V., Medina-Remón, A., M'Hiri, N., García-Lobato, P., Manach, C., Knox, C., Eisner, R., Wishart, D. S., & Scalbert, A. (2013). Phenol-Explorer 3.0: A major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database*, 2013, bat070. <https://doi.org/10.1093/database/bat070>
- Ružić, I., Škerget, M., Knez, Ž., & Runje, M. (2011). Phenolic content and antioxidant potential of macerated white wines. *European Food Research and Technology*, 233(3), 465–472. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1535-4>
- Sancho-Galán, P., Amores-Arrocha, A., Jiménez-Cantizano, A., & Palacios, V. (2021). Influence of the Presence of Grape Skins during White Wine Alcoholic Fermentation. *Agronomy*, 11(3), 452. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030452>
- Scutarușu, E.-C., Luchian, C. E., Vlase, L., Colibaba, L. C., Gheldiu, A. M., & Cotea, V. V. (2021). Evolution of phenolic profile of white wines treated with enzymes. *Food Chemistry*, 340, 127910. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127910>
- Tomašević, M., Lisjak, K., Vanzo, A., Česnik, H. B., Gracin, L., Ćurko, N., & Ganić, K. K. (2019). Changes in the composition of aroma and phenolic compounds induced by different enological practices of Croatian white wine. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 69(4), 343–358. <https://doi.org/10.31883/pjfn/112328>
- Vignault, A., González-Centeno, M. R., Pascual, O., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Iturmendi, N., Canals, J. M., Zamora, F., & Teissedre, P.-L. (2018). Chemical characterization, antioxidant properties and oxygen consumption rate of 36 commercial oenological tannins in a model wine solution. *Food Chemistry*, 268, 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.031>
- Vrhovšek, U. (1998). Extraction of hydroxycinnamoyltartaric acids from berries of different grape varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(10), 4203–4208.
- Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). Understanding Wine Chemistry. In *Understanding Wine Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/9781118730720>
- Zhao, X., Duan, C.-Q., Li, S.-Y., Zhang, X.-K., Zhai, H.-Y., He, F., & Zhao, Y.-P. (2023). Non-enzymatic browning of wine induced by monomeric flavan-3-ols: A review. *Food Chemistry*, 425, 136420. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136420>

6.

ANALIZA BIOGENIH AMINOV V VINU IN DOLOČANJE SPOSOBNOSTI MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ ZA TVORBO BIOGENIH AMINOV

Jelena Topić Božič

Center za krožno gospodarstvo, Rudolfovo – Znanstveno in tehnološko središče, Novo mesto, Slovenija
Fakulteta za industrijski inženiring Novo mesto, Novo mesto, Slovenija
jelena.topic.bozic@rudolfovo.eu

Uvod

Biogeni amini, kot so histamin, kadaverin, putrescin in tiramin, so organske baze z nizko molekulsko maso, v človeškem metabolizmu pa regulatorji. Pogosto jih najdemo v fermentiranih živilih in pijačah, kot so sir, ribe in vino (Henríquez-Aedo in sod., 2016; Perestrelo in sod., 2020; Rivas in sod., 2005; Žurga in sod., 2019). Večina biogenih aminov v živilih izvira iz proteolitičnih procesov, s katerimi so na voljo aminokisline, ki so idealen substrat za encimske reakcije dekarboksilacije. Sinteza biogenih aminov je možna tudi z aminacijo in transaminacijo aldehydov in ketonov ob prisotnosti encimov transaminaz. Biogeni amini lahko nastanejo v sveži hrani, ki je izpostavljena mikroorganizmom z dekarboksilazno aktivnostjo, pa tudi v fermentirani in/ali predelani hrani (tj. vino, pivo idr.) kot posledica delovanja različnih procesov (npr. mlečnokislinska fermentacija) (Vinci in sod., 2021).

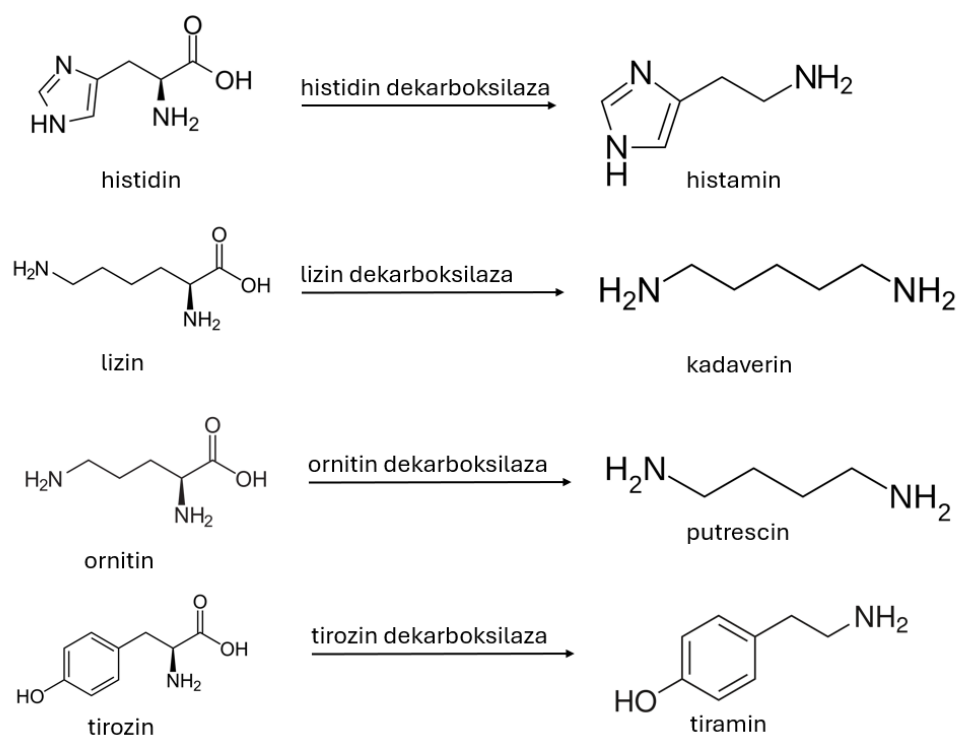
Uživanje živil in pijač, ki vsebujejo velike koncentracije biogenih aminov, lahko negativno vpliva na zdravje ljudi, saj povzročajo hipertenzijo, glavobol, drisko, zardevanje in slabost. Čeprav zakonske omejitve za biogene amine v vinih niso določene, so nekatere evropske države priporočile najvišje vrednosti za prisotnost histamina v vinih, vključno z Nemčijo (2 mg/L), Francijo (8 mg/L) in Belgijo (6 mg/L) (Konakovsky in sod., 2011; Martuscelli in sod., 2013; Martuscelli and Mastrocola, 2019; Vanda in sod., 2017). Najbolj znan toksični učinek, ki ga je mogoče pripisati zaužitju biogenih aminov, je t. i. skombroidni sindrom oz. histaminska zastrupitev, ki je posledica uživanja neustrezno shranjenih in nepravilno ohlajenih rib in nekaterih vrst sirov. Gre za bakterijsko kontaminacijo, pri kateri določene vrste mikroorganizmov pretvorijo aminokislino histidin v histamin z encimom histidin dekarboksilaza. Prisotnost drugih biogenih

aminov lahko sinergistično deluje na toksičnost histamina (Roškar in Roškar, 2020; Vinci in sod., 2021). Biogeni amini, prisotni v vinu, nastanejo v različnih stopnjah vinarskega procesa in skupaj prispevajo h koncentraciji v končnem vinu. Biogene amine lahko najdemo v grozdju (15–44 mg/kg), grozdnem soku (6–54 mg/l) in vinu (3–169 mg/l) (Martínez-Pinilla in sod., 2013; Moreira in sod., 2024; Prete in sod., 2009; Restuccia in sod., 2017), vendar se njihove količine precej razlikujejo v vsaki od teh matric, k čemur prispeva več dejavnikov. Najvplivnejši dejavniki vključujejo koncentracijo prostih aminokislin, pH, temperaturo, fenotipske značilnosti fermentacijskih mikroorganizmov in razširjenost teh mikroorganizmov v vinu med staranjem (Belda in sod., 2016; Martínez-Pinilla in sod., 2013). Medtem ko je količina aminokislin in intrinzičnih biogenih aminov v grozdju dovetnejša za vplive podnebja (Perestrelo in sod., 2020) in zdravja grozdov, je koncentracija biogenih aminov v moštu in vinu povezana s higiensko proizvodno prakso kleti, enološkimi praksami (Mir-Cerdà in sod., 2021), pa tudi s pridelavo vina, staranjem in pogoji shranjevanja (Landete in sod., 2005; Moreno-Arribas and Polo, 2008).

V Tabeli 1 so predstavljeni biogeni amini in njihovi fiziološki ter patološki vplivi. Na Sliki 1 pa so mehanizmi nastanka biogenih aminov iz prekuzorskih aminokislin z encimsko dekarboksilacijo.

Tabela 1. Fiziološke in patološke lastnosti izbranih biogenih aminov.

Biogeni amin	Prekurzorska aminokislina	Encim, odgovoren za dekarboksilacijo prekurzorske aminokisline	Fiziološki učinki	Patološki učinki	Vir
histamin	histidin	histidin dekarboksilaza	• sproščanje adrenalina in noradrenalina • alergijski procesi • nadzor izločanja želodca	Alergijske reakcije: • slabost • pekoč občutek v ustih • zardevanje obraza in telesa • trebušni krči • diareja • otekanje obraza in jezika	(Kim in sod., 2023; Stratta in Badino, 2012; Tofalo in sod., 2016; Vinci in sod., 2021)
tiramin	tirozin	tirozin dekarboksilaza	• periferna vaskularizacija • povečanje minutnega volumna srca • povečano solzenje in slinjenje	• visok krvni pritisk • hiter srčni utrip • tresavica	(del Rio in sod., 2019; Kim in sod., 2023; Stratta in Badino, 2012; Vinci in sod., 2021)
putrescin	ornitin	ornitin dekarboksilaza	• hipotenzija • bradikardija • paraliza okončin	• citotoksičnost • povečanje malignosti nekaterih vrst tumorjev • povečanje toksičnosti drugih biogenih aminov	(del Rio in sod., 2024, 2019; Kim in sod., 2023; Stratta in Badino, 2012; Vinci in sod., 2021)
kadaverin	lizin	lizin dekarboksilaza			

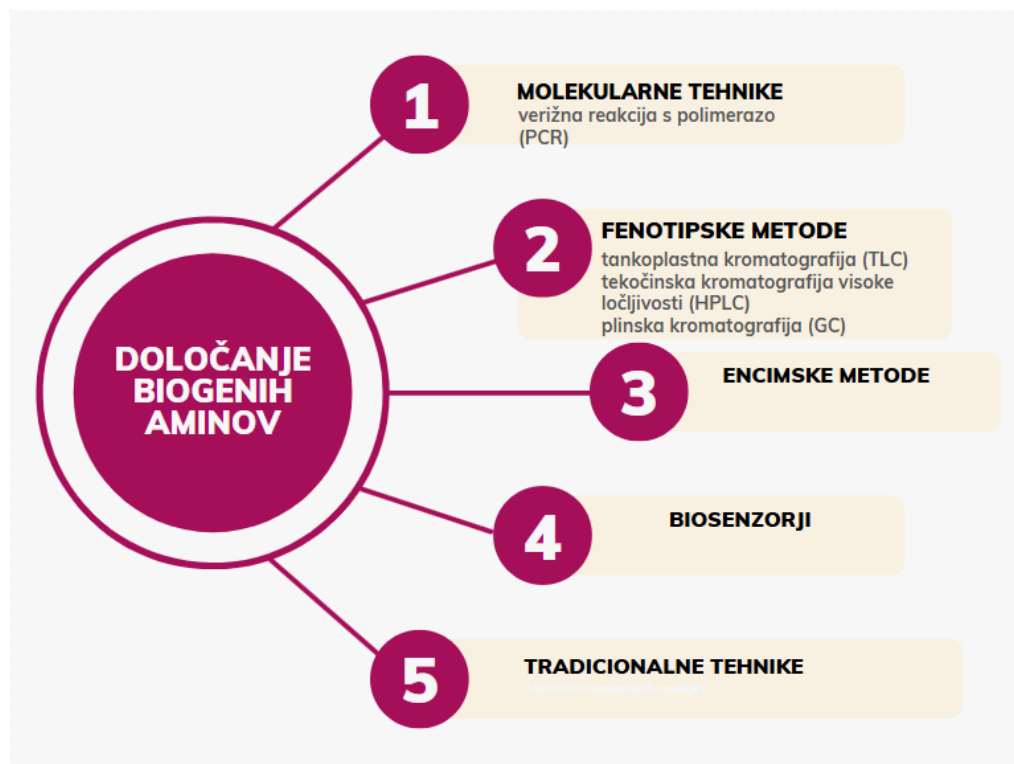


Slika 1. Nastanek biogenih aminov iz prekursorskih aminokislin z encimsko dekarboksilacijo.

Nekatere mlečnokislinske bakterije, ki so naravno prisotne v grozdju, moštu in vinu, proizvajajo histamin, tiramin in putrescin (Coton in sod., 2010; Henríquez-Aedo in sod., 2016; Moreno-Arribas in sod., 2003; Nannelli in sod., 2008; Soufleros in sod., 1998). Vsak novi izolat mlečnokislinskih bakterij je treba najprej testirati za proizvodnjo biogenih aminov. Mlečnokislinske bakterije so manjši del mikrobiote grozdja in odgovorne za jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo (Barata in sod., 2012). Pomembno vplivajo na proces biološkega razkisanja vina, okus in mikrobiološko stabilnost (Guo in sod., 2015; Henríquez-Aedo in sod., 2016) ter predstavljajo skupino potencialno koristnih starterjev v vinski industriji. Uporaba avtohtonih starterskih kultur bi lahko izboljšala tipične značilnosti vinskih sort, ki bi se lahko izgubile, če bi uporabili komercialne starterje (Battistelli in sod., 2020; Emer in sod., 2021).

Analizne metode za določanje sposobnosti mlečnokislinskih bakterij za tvorbo biogenih aminov in določanje biogenih aminov v vinih

Metode določanja biogenih aminov lahko na splošno razdelimo na metode, ki zagotavljajo kvalitativne, in metode, ki zagotavljajo kvantitativne informacije (Coton in sod., 2010). Tehnike in metode, ki se uporabljajo pri analizi biogenih aminov, so predstavljene na Sliki 2.



Slika 2. Tehnike in metode za določanje biogenih aminov.

Molekularne metode temeljijo predvsem na verižni reakciji s polimerazo (PCR) (Coton in Coton, 2005; Landete in sod., 2011; Nannelli in sod., 2008; Sebastian in sod., 2011) in se pojavljajo kot alternativa metodam tradicionalnih tehnik, kot je uporaba aminokislinsko-dekarboksilaznega medija (AADM) (Landete in sod., 2011). Fenotipske metode temeljijo predvsem na tankoplastni kromatografiji (TLC) in tekočinski kromatografiji visoke ločljivosti (metode HPLC) s korakom derivatizacije, z uporabo spojin, kot sta dansil klorid (Dns-Cl) ali *o*-ftalaldehid (Coton in sod., 2010; Prete in sod., 2009). Za določanje biogenih aminov v vinih se uporablja tudi plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS) (Papageorgiou in sod., 2018), čeprav so analizne metode s tekočinsko kromatografijo pogostejše. Pri rutinski analizi biogenih aminov pozornost pridobivajo encimske in imunoencimske metode (Landete in sod., 2004) ter uporaba biosenzorjev (Lange and Wittmann, 2002; Leonardo and Campàs, 2016), saj na splošno veljajo kot cenovno ugodnejše metode, ki ne zahtevajo specializiranih instrumentov in obsežne priprave vzorcev (Neofotistos in sod., 2019; Papageorgiou in sod., 2018). Metode za določanje biogenih aminov se med seboj zelo razlikujejo. V Tabeli 2 so predstavljene izbrane lastnosti treh metod, ki se dandanes najpogosteje uporabljajo za analizo biogenih aminov (Topić Božič in sod., 2022).

Tabela 2. Primerjava HPLC-DAD, TLC in encimske metode za določanje biogenih aminov (Topić Božič in sod., 2022).

METODA	HPLC-DAD	TLC	ENCIMSKA
Najnižja meja detekcije (LOD)	< 1 mg/L za putrescin, kadaverin, tiramin in histamin	5 mg/L putrescin, kadaverin 10 mg/L histamin 20 mg/L tiramin	25 mg/L histamin
Čas, potreben za pripravo vzorca	približno 2 uri	približno 1,5 ure	približno 15 min
Čas, potreben za analizo vzorca	Približen čas 37 min za vzorec (pribl. 2 uri za triplikat vzorca)	pribl. 90 min za vzorec pribl. 90 min za triplikat vzorca pribl. 90 min za 4 vzorce v triplikatu*	6 ur za vzorec 6 ur za triplikat vzorca 6 ur za 32 vzorcev v triplikatu (mikrotitrna plošča za 96 vzorcev)
Poraba topil	NAJVEČJA 37 mL na vzorec več kot 100 mL za triplikat vzorca	SREDNJA pribl. 10 mL na vzorec pribl. 10 mL za triplikat vzorca* (12 vzorcev na TLC ploščo)	NAJMANJŠA 0,16 mL na vzorec 0,48 mL za triplikat vzorca
Stabilnost pripravljenih vzorcev	DA Možna ponovna analiza vzorcev na HPLC po 14 dneh in shranjevanju vzorcev pri -20 °C Ni signifikantne spremembe velikosti in površine kromatografskih vrhov	DA Možna ponovna analiza vzorcev in nanos na TLC plošče po 14 dneh in shranjevanju vzorcev pri -20 °C Pojavnost kromatografskih lis podobnih velikost	NE
Analiza biogenih aminov	putrescin, kadaverin, tiramin in histamin	putrescin, kadaverin, tiramin in histamin	histamin

* Čas analize enega ali več vzorcev je pri TLC enak, ker se na isto TLC ploščo lahko nanese več vzorcev, nato pa se razvijejo v primernem topilu.

Vaje

Metode za določanje aktivnosti encimske dekarboksilaze in

biogenih aminov

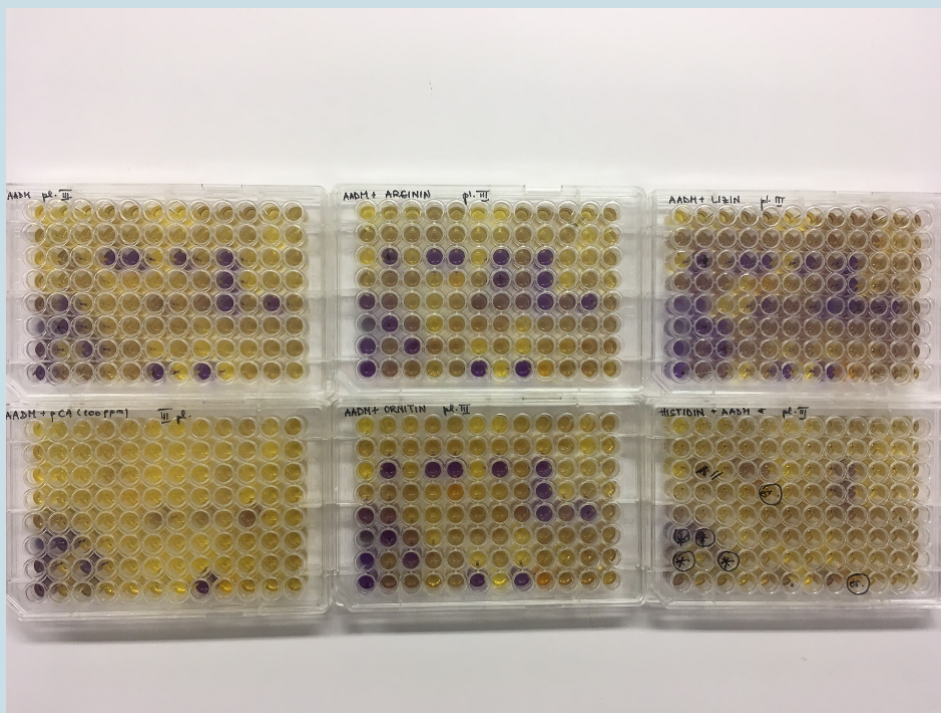
Kvalitativna metoda

Za kvalitativno določanje aktivnosti se uporablja tako imenovano gojišče AADM (medij, ki vsebuje prekursorske aminokisline). Sestava gojišča AADM je prikazana v Tabeli 3, pH medija je 5.3.

Tabela 3. Sestava gojišča AADM (Bover-Cid in Holzapfel, 1999).

Spojina	Koncentracija (v % <i>m/v</i>)
tripton	0,5
kvasni ekstrakt	0,5
mesni ekstrakt	0,5
natrijev klorid (NaCl)	0,25
glukoza	0,05
Tween 80®	0,1
magnezijev sulfat (MgSO₄)	0,02
manganov sulfat (MnSO₄)	0,005
železov sulfat (FeSO₄)	0,005
amonijev citrat	0,2
tiamin	0,001
kalijev fosfat (K₂PO₄)	0,2
CaCO₃	0,01
piridoksal-5-fosfat	0,005
aminokislina (histidin, tirozin, lizin, ornitin)	1,0
bromkrezol vijolično	0,006
agar	2

Za kvalitativno določanje aktivnosti aminokislinske dekarboksilaze 150 µL gojišča AADM brez agarja (tekoči medij) prenesemo v mikrotitrsko ploščo in inokuliramo s 50 µL predkulture mlečnokislinskih bakterij. Plošče inkubiramo 7 dni pri 28 °C brez stresanja. Pri sevih, ki tvorijo biogene amine, se barva gojišča spremeni v vijolično (Slika 3).



Slika 3. AADM medij s sevi mlečnokislinskih bakterij, ki tvorijo biogene amine, pri čemer nastane kolorimetrična reakcija (vijolična barva).

Kvantitativno določanje aktivnosti encimske dekarboksilaze in tvorbe biogenih aminov

Za kvantitativno določanje biogenih aminov, ki jih proizvajajo mlečnokislinske bakterije v mediju, 1,6 mL gojišča AADM (tekoče gojišče brez agarja) brez indikatorja pH nacepimo s 150 μ L predkulture mlečnokislinskih bakterij v mikrotitrski plošči. Plošče inkubiramo 7 dni pri 28 °C. Nato supernatant analiziramo z metodo TLC ali HPLC.

TLC – tankoplastna kromatografija

Metoda vključuje uporabo dansil klorida (0,5 % m/v v acetonu) kot derivatizacijsko sredstvo. Po tem protokolu k 200 μ L vzorca dodamo 200 μ L nasičenega natrijevega hidrogen karbonata (NaHCO_3) in 400 μ L raztopine dansil klorida. Reakcijsko zmes inkubiramo 1 uro pri 55 °C v termobloku v temi.

Po derivatizaciji vzorce pustimo nekaj minut pri sobni temperaturi. Nato dodamo 100 μ L nasičenega NaCl in tej mešanici 200 μ L izoheksana. Zmes stresamo 5 minut z namiznim stresalnikom (1000 vrt./min).

Na plošče s silikagelom 60 TLC brez fluorescentnega indikatorja nanesemo 20 μ L organske faze derivatiziranega vzorca. Vzorce nanesemo na ploščo, 15 mm od spodnjega roba plošč, med alikvoti vzorcev naj bo razdalja 12 mm. TLC ploščo razvijemo v nasičeni stekleni komori.

Uporabljeno topilo je zmes kloroforma in trietilamina v razmerju 4 : 1 (v/v). Skupna migracija je 17 cm. Razvoj plošče običajno traja 90 minut. Za vizualizacijo ločbe se TLC plošče osvetli s svetlobo

valovne dolžine 312 nm. Primer rezultata takšne analize je na Sliki 3 (slika je bila zajeta s presevníkom GeneBox proizvajalca Syngene).

Eksperimentalni protokol

Materiali:

- TLC steklena komora
- TLC plošče (silikagel 60 brez fluorescentnega indikatorja)
- 20- μ L mikrokapilare s kontrolnikom
- namizni stresalnik
- termoblok
- presevník za zajem slike
- pipete
- analizna tehnlca
- orbitalni stresalnik
- erlenmajerice
- merilne bučke
- merilni valj
- centrifugirke (50 mL)
- mikroepruvete (1,5 mL, 0,5 mL)
- danzil klorid
- natrijev hidrogen karbonat (NaHCO_3)
- natrijev klorid (NaCl)
- izoheksan
- aceton
- kloroform
- trimetilamin
- ddH₂O

Za izvedbo eksperimenta pripravimo naslednje raztopine:

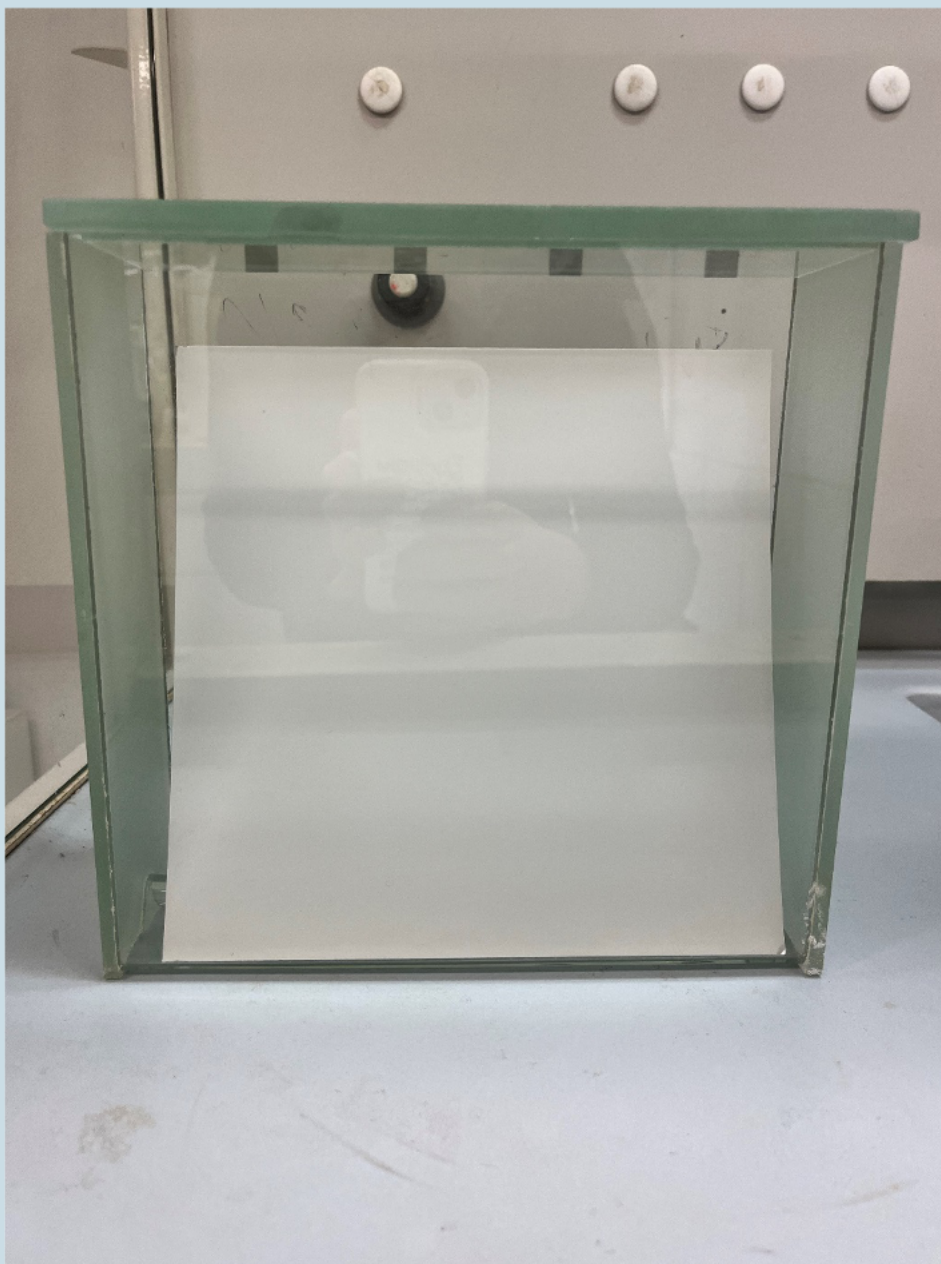
Priprava danzil klorida [0,5 % m/v v acetonu]: V 100 ml acetona odtehtamo 0,5 g danzil klorida in hranimo pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Priprava nasičenega NaHCO_3 : Odtehtamo 9,6 g NaHCO_3 v 100 ml ddH₂O.

Priprava nasičenega NaCl : Odtehtamo 36 g NaCl v 100 ml ddH₂O.

Priprava raztopine kloroforma in trietilamina v razmerju 4 : 1 (v/v): Prenesemo 80 mL kloroforma v 100-mL valj, ki ga nato dopolnimo do 100 mL s trietilaminom. Nastalo raztopino prenesemo v erlenmajerico in dobro premešamo. Raztopino vlijemo v TLC stekleno komoro – raztopine naj bo v višini 1 cm od dna posode (enakomerno, merjeno na ravni površini). V notranjost dodamo navaden filtrirni papir, da popolnoma nasičimo komoro s parami topila za razvijanje. Tako pustimo

vsaj eno uro. Pred prenosom TLC plošče v komoro odstranimo filtrirni papir. TLC steklena komora z vloženo TLC ploščo je prikazana na Sliki 4.



Slika 4. Primer TLC steklene komore s TLC ploščo.

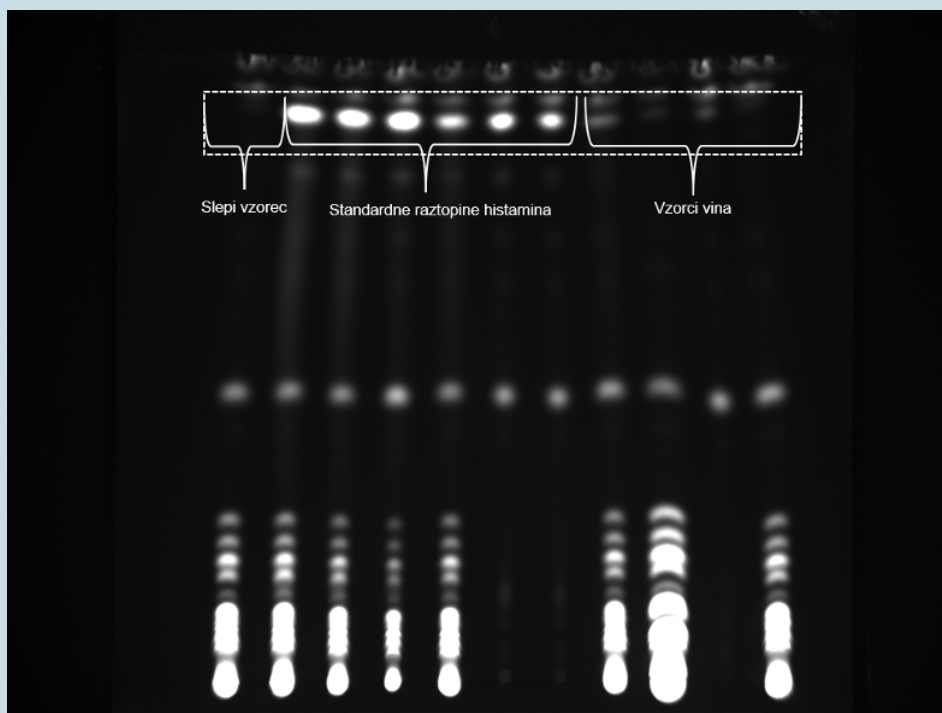
Protokol derivatizacije vzorcev

1. Prenesemo 200 μL vzorca v 1,5-mL mikroepruveto.
2. Dodamo 200 μL nasičene raztopine NaHCO_3 .
3. Dodamo 400 μL dansil klorida [0,5 % w/v v acetonu].
4. Premešamo z orbitalnim stresalnikom.

5. Inkubiramo 1 uro pri 55 °C v temi (pokrijemo z aluminijasto folijo).
6. Pustimo pri sobni temperaturi 10 minut.
7. Dodamo 100 µL nasičene raztopine NaCl.
8. Dodamo 200 µL izohexsana.
9. Stresamo 15 min z namiznim stresalnikom.
10. Zberemo 20 µL organske faze (bistra tekočina na vrhu v mikroepruveti) z mikrokapilaro in tako prenesemo alikvot vzorca na TLC ploščo.

Protokol TLC

1. Pripravimo TLC ploščo (20 x 20 cm). **Uporabimo grafitni svinčnik!** Vzorce nanesimo na črto, ki jo zarišemo 1,5 cm od začetka plošče (spodnjega roba). Z grafitnim svinčnikom označimo črto 1,5 cm na spodnjem in zgornjem delu TLC plošče. Razdalja med vzorčnimi točkami mora biti najmanj 1,2 cm.
2. Tako pripravljeno TLC ploščo postavimo v TLC komoro. Pri vstavljanju plošče moramo biti previdni, da se s ploščo ne dotaknemo sten komore in da je celotna plošča s spodnjim robom v tekočino vstavljena naenkrat (sicer eluent ne bo potoval enakomerno).
3. Ko eluent doseže zgornjo označeno črto (1,5 cm od zgornjega roba plošče – torej je celotna migracija 17 cm od začetka poti eluenta), previdno odstranimo TLC ploščo iz komore in pustimo, da se plošča posuši (na zraku?).
4. Ploščo dokumentiramo s presevnikom, tako da z enosekundno osvetlitvijo zajamemo pet slik. Uporabimo nastavitve kratkovalovne UV žarnice (primer dokumentirane plošče je prikazan na Sliki 5).



Slika 5: Primer razvite TLC plošče, na kateri so prikazani standardi biogenih aminov in vzorci vina.

Metoda HPLC-DAD za določanje biogenih aminov

Protokol za določanje biogenih aminov, ki jih proizvajajo mlečnokislinske bakterije v medijih AADM, je bil pripravljen po že objavljenih protokolih (Mitar in sod., 2018, Manetta in sod., 2016) z nekaj prilagoditvami (Topić Božič in sod., 2022). Isti protokol se uporablja za določanje biogenih aminov v vinih.

Reagent danzil klorid (0,5 % m/v v acetonu) uporabimo kot derivatizacijsko sredstvo. K 250 μL vzorca (vino, fermentacijska mešanica ipd.) dodamo 70 μL nasičenega NaHCO_3 in 65 μL 0,1-M kalijevega hidroksida (KOH). Tako pripravljen vzorec inkubiramo 45 minut pri 40 °C v termobloku v temi. Po inkubaciji mešanici dodamo 100 μL raztopine amonijaka (28–30 % v/v) in tako odstranimo odvečni danzil klorid (ki ni zreagiral). Nato vzorec dobro premešamo z orbitalnim stresalnikom (30 sekund) in nadalje inkubiramo (30 minut) pri sobni temperaturi v temi. Po drugi inkubaciji raztopini dodamo acetonitril do končnega volumna raztopine, ki je 5 mL. Pred analizo na HPLC-ju raztopino vzorca filtriramo skozi 0,22- μm filter PTFE. Za analizo tako pripravljenega vzorca uporabljamo kromatografski sistem HPLC z detektorjem na osnovi niza diod (DAD) ali UV-VIS detektorjem (254 nm) in gradientno elucijo mobilne faze A (voda) in mobilne faze B (acetonitril, čistoče HPLC). Ločbo izvajamo na reverznofazni kromatografski koloni (na primer Phenomenex Kinetex EVO C18 – 250 x 4,6 mm, 5 μm i.d.) z ujemajočo se predkolono. Kolono moramo med ločbo termostatirati na 25 °C.

Kvantificiranje izvajamo z zunanjimi standardi – s histaminom, putrescinom, kadaverinom in tiraminom. Volumen injiciranja je 20 μL . Pogoji gradientne elucije so naslednji (povzeti po Mitar in

sod., 2018): 0–0,5 min 40 % B, 0,5–25 min 40–80 % B, 25–30 min 80–95 % B, 30–34 min 95 % B, 34–35 min 95–40 % B, 35–37 min 40 % B.

Eksperimentalni protokol

Materiali:

- termoblok
- pipete
- orbitalni stresalnik
- analizna tehcnica
- merilne bučke
- epruvete za centrifugiranje (50 mL)
- mikroepruvete (1,5 ml, 0,5 mL)
- vial HPLC (1,5 mL)
- steklene vial (5 mL)
- plastične brizge za enkratno uporabo
- 0,22- μ m filter PTFE
- standardi biogenih aminov: kadaverin, histamin, putrescin, tiramin
- dansil klorid
- natrijev hidrogen karbonat (NaHCO_3)
- kalijev hidroksid (KOH)
- amonijak (28–30 %)
- klorovodikova kislina (HCl, 37 %)
- acetonitril
- ddH₂O

Priprava raztopin:

Priprava dansil klorida [0,5 % m/v v acetonu]: V 100 mL acetona odtehtamo 0,5 g dansil klorida. Hranimo pri –20 °C.

Priprava nasičenega NaHCO_3 : Odtehtamo 9,6 g NaHCO_3 v 100 mL ddH₂O.

Priprava 0,1 M KOH: Odtehtamo 0,561 g KOH v 100 mL ddH₂O.

Priprava 0,1 M HCl: V 100-mL merilno bučko nalijemo malo vode. Dodamo 860 μ L 37-% HCl in dopolnimo do oznake z ddH₂O. Raztopino kisline v vodi je treba delati po vseh protokolih priprave kislin iz koncentrirane kisline in pod dimno napo.

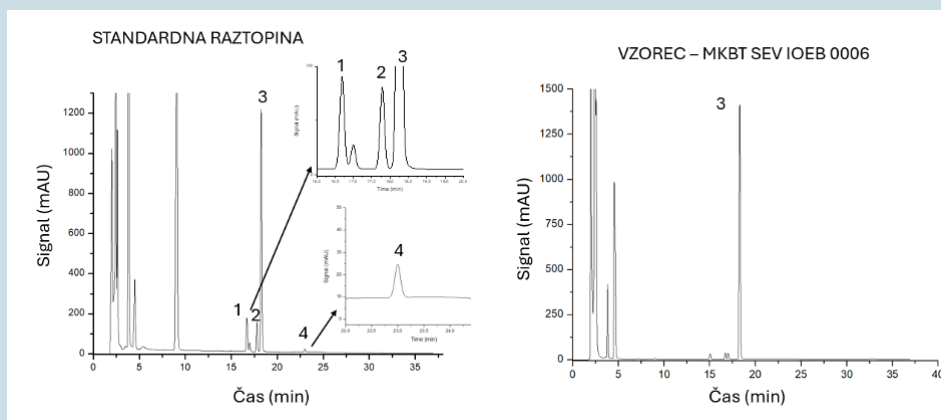
Priprava raztopin za umerjanje: Iz osnovne raztopine zmesi biogenih aminov s koncentracijo 1000 mg/L pripravimo raztopine za umerjanje v območju 1–100 mg/L (1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L). Iz osnovnih raztopin posameznih biogenih aminov (1000 mg/L) pripravimo raztopine posameznih biogenih aminov s koncentracijo 100 mg/L (kadaverin 100 mg/L, histamin 100 mg/L, putrescin 100 mg/L, tiramin 100 mg/L). Za določanje retenzijskih časov bomo uporabili

raztopine posameznih biogenih aminov. Na Sliki 5 je prikazan HPLC kromatogram standardne raztopine štirih biogenih aminov.

Protokol derivatizacije vzorcev

1. Prenesemo 250 µL vzorca v 1,5-mL mikroepruveto.
2. Dodamo 70 µL nasičene raztopine NaHCO₃.
3. Dodamo 65 µL 0,1-M KOH.
4. Dodamo 1 mL danzil klorida [0,5 % m/v v acetonu].
5. Premešamo z orbitalnim stresalnikom (30 sekund).
6. Inkubiramo vzorec 45 min pri 40 °C v temi (pokrijemo z aluminijasto folijo).
7. Dodamo 100 µL raztopine amonijaka (28–30 %).
8. Premešamo z orbitalnim stresalnikom (30 sekund).
9. Inkubiramo pri sobni temperaturi v temi za 30 min.
10. Prenesemo v vialo z večjim volumnom in dopolnimo do 5 mL z acetonitrilom.
11. Tako pripravljen vzorec filtriramo skozi 0,22-µm filter PTFE v vialo HPLC.
12. Alikvot vzorca injiciramo na HPLC ali shranimo pri –20 °C.

Na Sliki 6 sta predstavljena kromatograma standardne raztopine biogenih aminov in vzorca seva mlečnokislinskih bakterij, ki ima sposobnost tvorbe histamina. Iz podatkov kromatogramov standardnih raztopin pripravimo umeritvene krivulje, izračunamo enačbe premic in jih uporabimo za računanje koncentracij biogenih aminov v vzorcih vina ali fermentacijskih mešanic na podlagi površin vrhov v pripadajočih kromatogramih.



Slika 6. Primer HPLC kromatograma raztopine standardov biogenih aminov s koncentracijo 1000 mg/L (levo) in vzorec seva mlečnokislinskih bakterij IOEB0006, ki tvori histamin (desno). Številke 1–4 označujejo posamezne biogene amine (1 – putrescin, 2 – kadaverin, 3 – histamin, 4 – tiramin). Za lažji prikaz so posamezni deli kromatogram povečani, da se lažje razločijo posamezni vrhovi biogenih aminov.

Viri

Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 243–259.

Battistelli, N., Perpetuini, G., Perla, C., Arfelli, G., Zulli, C., Rossetti, A. P., Tofalo, R. (2020). Characterization of natural *Oenococcus oeni* strains for Montepulciano d'Abruzzo organic wine production. *Eur. Food Res. Technol.* 246, 1031–1039. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03466-3>

Belda, I., Ruiz, J., Alastruey-Izquierdo, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A. (2016). Unraveling the Enzymatic Basis of Wine "Flavorome": A Phylo-Functional Study of Wine Related Yeast Species. *Front. Microbiol.* 7, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00012>

Coton, E., Coton, M. (2005). Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *J. Microbiol. Methods* 63, 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.001>

Coton, M., Romano, A., Spano, G., Ziegler, K., Vetrana, C., Desmarais, C., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P., Coton, E. (2010). Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. *Food Microbiol.* 27, 1078–1085. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.07.012>

del Rio, B., Fernandez, M., Redruello, B., Ladero, V., Alvarez, M. A. (2024). New insights into the toxicological effects of dietary biogenic amines. *Food Chem.* 435, 137558. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137558>

del Rio, B., Redruello, B., Linares, D. M., Ladero, V., Ruas-Madiedo, P., Fernandez, M., Martin, M. C., Alvarez, M. A. (2019). The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Sci. Rep.* 9, 120. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36239-w>

Emer, C. d., Marques, S., Colla, L. m., Reinehr, C. o. (2021). Biogenic amines and the importance of starter cultures for malolactic fermentation. *Aust. J. Grape Wine Res.* 27, 26–33. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12462>

Guo, Y. Y., Yang, Y. P., Peng, Q., Han, Y. (2015). Biogenic amines in wine: A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50, 1523–1532. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12833>

Henríquez-Aedo, K., Durán, D., Garcia, A., Hengst, M. B., Aranda, M. (2016). Identification of biogenic amines-producing lactic acid bacteria isolated from spontaneous malolactic fermentation of chilean red wines. *LWT – Food Sci. Technol.* 68, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.003>

Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., Bolton, E. E. (2023). PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Res.* 51, D1373–D1380. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>

Konakovsky, V., Focke, M., Hoffmann-Sommergruber, K., Schmid, R., Scheiner, O., Moser, P., Jarisch, R., Hemmer, W. (2011). Levels of histamine and other biogenic amines in high-quality red wines. *Food Addit. Contam. – Part Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 28, 408–416. <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.551421>

Landete, J. M., Ferrer, S., Pardo, I. (2004). Improved enzymatic method for the rapid determination of histamine in wine. *Food Addit. Contam.* 21, 1149–1154. <https://doi.org/10.1080/02652030400019737>

Landete, J. M., Rivas, B. D. L., Marcobal, A., Muñoz, R. (2011). PCR methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on wine. *Ann. Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0068-6>

Landete, J. M., J. Ä. M., Ferrer, S., Polo, L., Pardo, I. (2005). Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1119–1124. <https://doi.org/10.1021/jf049340k>

Lange, J., Wittmann, C. (2002). Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 372, 276–283. <https://doi.org/10.1007/s00216-001-1130-9>

Leonardo, S., Campàs, M. (2016). Electrochemical enzyme sensor arrays for the detection of the biogenic amines histamine, putrescine and cadaverine using magnetic beads as immobilisation supports. *Microchim. Acta* 183, 1881–1890. <https://doi.org/10.1007/s00604-016-1821-8>

Martínez-Pinilla, O., Guadalupe, Z., Hernández, Z., Ayestarán, B. (2013). Amino acids and biogenic amines in red varietal wines: The role of grape variety, malolactic fermentation and vintage. *Eur. Food Res. Technol.* 237, 887–895. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2059-x>

Martuscelli, M., Arfelli, G., Manetta, A. C., Suzzi, G. (2013). Biogenic amines content as a measure of the quality of wines of Abruzzo (Italy). *Food Chem.* 140, 590–597. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.008>

Martuscelli, M., Mastrocola, D. (2019). Biogenic Amines: A Claim for Wines. V: *Biogenic Amines. IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80362>

Mir-Cerdà, A., Izquierdo-Llopart, A., Saurina, J., Sentellas, S. (2021). Oenological processes and product qualities in the elaboration of sparkling wines determine the biogenic amine content. *Fermentation* 7. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030144>

Mitar, I., Ljubenkov, I., Rohtek, N., Prkic, A., Andelic, I., Vuletic, N. (2018). The content of biogenic amines in croatian wines of different geographical origins. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23102570>

Moreira, L., Milheiro, J., Filipe-Ribeiro, L., Cosme, F., Nunes, F. M. (2024). Exploring factors influencing the levels of biogenic amines in wine and microbiological strategies for controlling their occurrence in winemaking. *Food Res. Int.* 190, 114558. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114558>

Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C. (2008). Occurrence of lactic acid bacteria and biogenic amines in biologically aged wines. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.05.004>

Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., Jorganes, F., Muñoz, R. (2003). Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 117–123. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00391-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00391-4)

Nannelli, F., Claisse, O., Gindreau, E., Revel, G. D., Lonvaud-Funel, A., Lucas, P. M. (2008). Determination of lactic acid bacteria producing biogenic amines in wine by quantitative PCR methods. *Lett. Appl. Microbiol.* 47, 594–599. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02472.x>

Neofotistos, A.-D. G., Tsagkaris, A. S., Danezis, G. P., Proestos, C. (2019). Emerging Trends in Biogenic Amines Analysis. V: *Biogenic Amines. IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81274>

Papageorgiou, M., Lambropoulou, D., Morrison, C., Kłodzińska, E., Namieśnik, J., Płotka-Wasyłka, J. (2018). Literature update of analytical methods for biogenic amines determination in food and beverages. *TrAC – Trends Anal. Chem.* 98, 128–142. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.001>

Perestrelo, R., Bordiga, M., Locatelli, M., Silva, C., Câmara, J. S. (2020). Polyphenols, biogenic amines and amino acids patterns in Verdelho wines according to vintage. *Microchem. J.* 153, 104383. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104383>

Prete, V. D., Costantini, A., Cecchini, F., Morassut, M., Garcia-Moruno, E. (2009). Occurrence of biogenic amines in wine: The role of grapes. *Food Chem.* 112, 474–481. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.102>

Restuccia, D., Sicari, V., Pellicanò, T. M., Spizzirri, U. G., Loizzo, M. R. (2017). The impact of cultivar on polyphenol and biogenic amine profiles in Calabrian red grapes during winemaking. *Food Res. Int.* 102, 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.012>

Rivas, B. D. L., Marcobal, Á., Muñoz, R. (2005). Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. *FEMS Microbiol. Lett.* 244, 367–372. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.02.012>

Roškar, N., Roškar, Z. (2020). Skombroidni sindrom – prikaz kliničnih primerov. *Slov. Pediatr. Rev. Pediatrov Slov. Spec. Šol. ter Visok. Med. Slov.* 27, 133–136. <https://doi.org/10.38031/slovpediatr-2020-3-05>

Sebastian, P., Herr, P., Fischer, U., König, H. (2011). Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria Occurring in Must and Wine. *South Afr. J. Enol. Vitic.* 32, 300–309. <https://doi.org/10.21548/32-2-1390>

Souffleros, E., Barrios, M. L., Bertrand, A. (1998). Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *Am. J. Enol. Vitic.* 49, 266–278.

Stratta, P., Badino, G. (2012). Scombroid poisoning. *Cmaj* 184, 674–674.

Tofalo, R., Perpetuini, G., Schirone, M., Suzzi, G., in sod. (2016). Biogenic amines: Toxicology and health effect. *Encycl. Food Health* 1, 424–429.

Topić Božič, J., Butinar, L., Bergant Marušič, M., Korte, D., Mozetič Vodopivec, B. (2022). Determination of biogenic amines formation by autochthonous lactic acid bacteria from 'Refošk' grapes using different analytical methods. *LWT* 156, 112908. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112908>

Vanda, P., Miranda, A., Leca, J. M., Marques, J. C. (2017). Analytical methodologies for the determination of biogenic amines in wines: an overview of the recent trends. *J. Anal. Bioanal. Sep. Tech.* 2, 52–57. <https://doi.org/10.15436/2476-1869.17.1296>

Vinci, G., Maddaloni, L., Prencipe, S. A., Ruggieri, R. (2021). Natural Contaminants in Wines: Determination of Biogenic Amines by Chromatographic Techniques. *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 18, 10159. <https://doi.org/10.3390/ijerph181910159>

Žurga, P., Vahčić, N., Pasković, I., Banović, M., Staver, M. M. (2019). Occurrence of ochratoxin A and biogenic amines in Croatian commercial red wines. *Foods* 8. <https://doi.org/10.3390/foods8080348>

7.

MACERACIJSKI PRISTOPI V PRIDELAVI VINA – KLASIČNE IN MODERNEJŠE TEHNIKE ZA IZBOLJŠANJE EKSTRAKCIJE ŽELENIH SPOJIN IZ TRDNIH DELCEV GROZDNE JAGODE

Melita Sternad Lemut

Center za raziskave vina, Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo, Univerza v Novi Gorici, Glavni trg 8,
Vipava
msternadlemut@ung.si

Uvod

Vino je rezultat pomembnih biokemijskih sprememb v grozdnem soku (moštu) med vinifikacijo: alkoholna fermentacija in jabolčno-mlečnokislinska fermentacija lahko prispevata številne zelene spojine, zanimive za vinarja, pričakuje in išče pa jih tudi potrošnik. Končna kakovost vina je odvisna predvsem od tega, v kolikšni meri dosežemo ekstrakcijo številnih tehnološko in senzorično pomembnih hlapnih in nehlapnih sestavin grozdja, prisotnih v različnih delih grozdne jagode (kožica, meso, pečke) (Razungles, 2022). Te spojine so za kakovost vina lahko pomembne že same po sebi, so pa tudi ključna surovina oz. prekursor za nadaljnje kemične in mikrobiološke pretvorbe med pridelavo vina, tako da na njih temeljita identiteta in kakovost vina.

Da bi podprli ekstrakcijo zelenih spojin ter hkrati zavrli ekstrakcijo manj in/ali neželenih sestavin grozda, se je najprej treba zavedati, kje v grozdni jagodi so.

Na splošno in nekoliko poenostavljeno so od pomembnejših sestavin grozdne jagode v jagodnem mesu sladkorji, organske kisline in nekatere fenolne spojine (hidroksicimetne kisline); v jagodni kožici so rdeča barvila (antocianini), flavonoli, flavan-3-oli in proantocianidini (tanini) ter aromatične spojine; medtem ko v pečkih najdemo flavan-3-ole in tanine (z nekoliko drugačno sestavo od tistih v kožicah), pa tudi nekatere druge manj zelene snovi (npr. olja, nekateri kompleksni tanini) (Busse-Valverde in sod., 2011; Kennedy, 2008).

Najpomembnejše informacije, potrebne za razumevanje tega poglavja, so o aromatičnih spojinah zbrane v drugem poglavju, o fenolnih spojinah pa v Tabeli 1.

Tabela 1. Tehnološko najpomembnejše skupine fenolnih spojin v grozdju (povzeto, prevedeno in prilagojeno po objavi na Enoviti).

TEHNOLOŠKO NAJPOMEMBNEJŠE FENOLNE SPOJINE GROZDJA	Osnovne informacije
Antociani/antocianini	• <i>Antocianini so pri večini rdečega grozdja (<i>Vitis vinifera</i> L.) izključno v kožici ali tik pod kožico.</i> • <i>Odgovorni so za barvo rdečih vin, med različnimi antocianini prevladuje malvidin 3-glukozid (pribl. 40 %).</i> • <i>V grozdju so antocianini v manj stabilnih monomerih oblikah (vezani s sladkorji), med vinifikacijo vstopajo v polimerizacijske/kopigmentacijske reakcije (tvorba stabilnejših rdečih barvil večjih molekulskih mas).</i>
Flavan-3-oli	• <i>Flavan-3-oli so predvsem v pečkah (v kožici zelo omejene količine katehina in epikatehina).</i> • <i>Katehin in epikatehin sta prevladujoča flavan-3-ola v grozdju.</i> • <i>Prosti katehin in epikatehin sta zunaj semenske ovojnice pečk, sestavljene iz lignina.</i> • <i>Katehin in epikatehin dokazano vplivata na občutek grenkobe v okusu vina.</i>
Kondenzirani tanini ali proantocianini (v nadaljnjem besedilu poenostavljeno kar tanini)	• <i>Tanini oz. kondenzirani tanini so polimerni flavan-3-oli, imenovani tudi proantocianidini.</i> • <i>Tanini so tako v kožicah kot pečkah in so lahko sestavljeni iz različnih podenot: katehin, epikatehin, epigalokatehin in epikatehin galat.</i> • <i>Tanini v kožici se razlikujejo od taninov v pečkah: v povprečni stopnji polimerizacije (so daljši), manjši vsebnosti galatov, ki vplivajo na trpkost, ter v vsebnosti prodelfinidinov (polimeri galokatehina in epigalokatehina).</i> • <i>Tanini so dokazano odgovorni za senzorično trpkost v vinih.</i>
Hidroksicimetne kisline	• <i>Hidroksicimetne kisline (natančneje njihovi estri z vinsko kislino) so prevladujoče fenolne spojine jagodnega soka.</i> • <i>Kaftarna kislina je najbolj zastopana (70–80 %), sledita ji kutarna in fertarna kislina.</i> • <i>V belem grozdju je kaftarna kislina tako v mesu kot v kožicah in je v belih vinih najbolj zastopana fenolna kislina.</i> • <i>Hidroksicimetne kisline so zelo podvržene oksidaciji.</i>
Flavonoli	• <i>Flavonoli so pretežno v kožici.</i> • <i>So barvila, med drugim odgovorna za barvo belih vin, prisotni pa so tudi v kožici rdečega grozdja.</i>

Sestavine grozdnih jagod, ki so v jagodnem mesu (npr. organske kisline, sladkorji), so praviloma lažje izlužljive (v nadaljevanju ekstraktabilne) in lahko preidejo v grozdni sok (mošt) praktično takoj, medtem ko tiste v trdnih delih jagode (kožice, pečke) običajno potrebujejo več časa (nekaj dni ali nekaj tednov)

in praviloma tudi dodatne ukrepe za uspešno in dovoljšno ekstrakcijo (Casassa in Harbertson, 2014; Unterkofler in sod., 2020).

Zato je med mnogimi pomembnimi tehnološkimi koraki v pridelavi vina eden najpomembnejših postopkov, zlasti za rdeča vina, **MACERACIJA, katerega namen je ekstrakcija težje ekstraktibilnih spojin iz grozdja v mošt, natančneje pridobitev topnih komponent iz trdnih delov grozdne jagode v tekočo fazo** (Unterkofer in sod., 2020; Morata in sod., 2019; Cosme in sod., 2018; dos Santos in sod., 2015).

Na splošno je maceracija izraz, ki se lahko uporablja za več faz v pridelavi vina (He in sod., 2012), opisuje pa lahko enega ali več različnih, zaporednih ali vzporednih vinifikacijskih korakov. Beseda macerirati izvira iz francoske besede *maceratus* v pomenu 'zmehčati z namakanjem v tekočini, s toploto ali brez nje'; gre torej za tehniko, ki se uporablja za ekstrakcijo zelenih komponent iz trdnih delov grozdne drozge, tako da jih pustimo v stiku z grozdnim sokom/moštom/vinom daljši čas pred in med fermentacijo ali po njej (Nel in sod., 2014).

Postopek maceracije ima pomembno vlogo pri oblikovanju lastnosti predvsem rdečega vina, saj olajša ekstrakcijo za rdeče vino tipičnih in za njihovo kakovost odločilnih sestavin iz grozdja v vino. Poenostavljeno bi lahko rekli, da je maceracija hkrati z alkoholno fermentacijo (pri kateri etanol pospešuje ekstrakcijo) primarni cilj v pridelavi rdečih vin (Razungles, 2022).

Pomembni metaboliti grozdnih jagod, ki potrebujejo pomoč pri ekstrakciji v mošt/vino

Med spojinami, ki jih želimo pridobiti v mošt s pomočjo vpeljave različnih dodatnih ekstrakcijskih (maceracijskih) korakov, so med najpomembnejšimi sekundarni metaboliti vinske trte/grozdja, in sicer aromatične spojine oz. njihovi prekursorji ter še posebej fenolne spojine. Bogatejša vsebnost slednjih namreč predstavlja bistveno razliko med klasično pridelanimi belimi vini ter rdečimi (ali maceriranimi belimi) vini. Kakovost rdečega vina je torej v veliki meri odvisna od vsebnosti in razmerja teh spojin (njihovega kvantitativnega in kvalitativnega profila), in sicer zaradi njihovega odločilnega vpliva na senzorične lastnosti vina: aromo, barvo, okus, pa tudi na stabilnost in potencial za staranje (Unterkofer in sod., 2020). Podobno je uspešna ekstrakcija teh spojin pomembna pri belih vinih, ki so načrtno pridelana po rdeči tehnologiji, to je z maceracijo med alkoholno fermentacijo (t. i. oranžna vina).

Strnemo lahko, da je bistvo pridelave t. i. maceriranih vin (bodisi rdečih bodisi belih) omogočanje stika jagodnih kožic in pečk z grozdnim sokom med pridelavo vina v izbranih vinifikacijskih posodah. Glavni namen maceracije pa je izboljšanje ekstrakcije zelenih sestavin vina iz trdnih delov grozdja.

Ekstrakcija teh ciljnih spojin seveda nikoli ni 100-odstotna, ampak le delna, pri čemer je njihov dejanski izplen oz. njihova ekstraktibilnost odvisna od stopnje zrelosti grozdja (Bindon in Kennedy, 2011) ter od številnih kemičnih (etanol, SO₂), bioloških (kvasovke, encimi) in fizikalnih parametrov (T, čas, pritisk, mehanska obdelava), ki različno *i)* prispevajo k raztapljanju teh spojin v moštu in *ii)* vplivajo na njihovo difuzijo v mošt iz trdnih delov grozdja (kožica, pečke, morebiti peclji, če so prisotni) (Razungles, 2022). Prav tako ekstrakcija ni omejena le na zelene komponente, zato se moramo zavedati tudi nevarnosti sočasne ekstrakcije manj zelenih sestavin grozdja.

Med mnogimi dejavniki, ki vplivajo na stopnjo ekstrakcije in s tem na izplen bolj ali manj zelenih metabolitov grozdja med maceracijskimi postopki, so vinarjeve odločitve, povezane s časom trgatve (**zrelost grozdja**), med predelavo pa s **temperaturo** in **časom trajanja maceracije**, tiste z največjim vplivom na končni rezultat (Casassa in Harbertson, 2014; Casassa in sod., 2013b; Busse-Valverde in sod., 2012; Zimman in sod., 2002).

Če je po eni strani načrtno upravljanje temperature lahko eden najučinkovitejših načinov pospeševanja oz. izboljšanja ekstrakcije fenolnih in primarnih aromatičnih spojin med vinifikacijo mošta, je po drugi strani izbira časa trajanja maceracije oz. skupni čas ohranjanja stika med kožicami, pečkami in moštom eden najodločilnejših dejavnikov pri določanju končne koncentracije in razmerja med ekstrahiranimi fenolnimi snovmi (fenolni profil) ter njihove nadaljnje kemijske usode, ki v končni fazi pomembno kroji senzorične lastnosti pridelanega vina (Sener, 2018; Casassa in sod., 2013b; Busse-Valverde in sod., 2012; Gonzalez-Neves in sod., 2012; Kelebek in sod., 2009; Vrhovšek in sod., 2002). Še eden od pomembnejših dejavnikov za uspešnost ekstrakcije je mehanska pomoč, tudi v smislu drozganja, mešanja drozge in potapljanja klobuka (pojasnjeno pozneje pri opisu pristopov). V praksi to pomeni, da lahko na končno koncentracijo in profil ciljnih metabolitov do neke mere vplivamo z upravljanjem navedenih dejavnikov, seveda ob ustreznem znanju in razumevanju teh dejavnikov ter njihovih vplivov.

V pomoč vinarjem pri ekstrakciji zelenih komponent grozdja iz trdnih delov grozdne jagode v mošt/vino je bilo razvitih (in se še razvijajo) veliko različnih ekstrakcijskih tehnik oziroma maceracijskih pristopov.

Maceracijski pristopi v vinarstvu se med seboj razlikujejo predvsem GLEDE NA ČAS TRAJANJA, UPORABLJENO TEMPERATURO in ČASOVNO TOČKO VKLJUČITVE MED VINIFIKACIJO.

Z vidika **časa trajanja maceracije** lahko stik trdnih delov grozdnih jagod in mošta traja le nekaj ur, kot je to običajno v pridelavi nekaterih belih vin (zlasti iz bolj aromatičnih sort grozdja), lahko pa tudi nekaj dni (predfermentacijska hladna maceracija), do nekaj tednov (klasična maceracija med alkoholno fermentacijo), ali celo mesec in več (podaljšana, pofermentacijska maceracija).

Z vidika **temperature maceracije** sta v vinski industriji poleg klasično vodene temperature fermentacije/maceracije v uporabi še dva bolj ali manj ekstremna pristopa: *i)* z izkoriščanjem nizkih temperatur (npr. hladna maceracija, kriomaceracija) in *ii)* z izkoriščanjem visokih temperatur (npr. termovinifikacija, *flash détente*).

Glede na to, **kdaj v procesu vinifikacije so vpeljani**, pa lahko maceracijske postopke delimo na predfermentacijske, fermentacijske in pofermentacijske (pred- in po- sta podaljšani maceraciji).

V praksi je večina maceracijskih pristopov kombinacija vodenja ciljne temperature in izbranega časa trajanja. Vinarjeve odločitve glede tega in glede točke vpeljave v vinifikacijski proces pa so odvisne predvsem od lastnosti surovine, tehničnih sposobnosti in zelenega stila vina.

V nadaljevanju so strnjeni in opisani posamezni maceracijski pristopi oziroma različne tehnike za izboljšanje ekstrakcije zelenih spojin iz trdnih delov grozdne jagode v mošt/vino.

Predfermentacijska hladna maceracija

Predfermentacijska hladna maceracija (PHM, angl. *cold soak*) je tehnika, ki izvira iz Burgundije, kjer so jo

vpeljali predvsem za vinifikacijo sorte modri pinot (*Vitis vinifera* L.) (Cai in sod., 2014; Gómez-Míguez in sod., 2007). Do danes ostaja sorta modri pinot ena najpogostejše tretiranih sort s PHM. Gre za predfermentacijsko ekstrakcijsko tehniko, pred katero se grozdje običajno razpeclja in zdrozga, pri čemer dobimo mešanico grozdnega soka in jagodnih kožic ter pečk (t. i. drozgo). V drozgi se nato še pred začetkom alkoholne fermentacije grozdni sok ohranja v stiku s kožicami (oz. z vsemi prisotnimi trdnimi delci grozdnih jagod) do nekaj dni (običajno od dva do šest, včasih tudi deset in več) (Aleixandre-Tudo in du Toit, 2018), in sicer pri precej nizkih temperaturah, običajno 10–15 °C (Sacchi in sod., 2005), pogosto tudi nižjih (3–10 °C) (Lasanta in sod., 2023; Razungles, 2022; Aleixandre-Tudo in du Toit, 2018). Pri tem lahko zelo nizke temperature v praksi pomenijo visoke stroške, povezane z energijskimi zahtevami za hlajenje industrijskih količin grozdja (Ortega-Heras in sod., 2012; Aleixandre-Tudo in du Toit, 2018).

Pri doseganju nizkih temperatur v drozgi si lahko pomagamo s toplotnimi izmenjevalci ali hladilnicami za predhodno hlajenje grozdja, najučinkovitejša pa je uporaba suhega ledu (CO₂ v trdni fazi), in sicer zaradi hitrega, skoraj takojšnjega znižanja temperature. Poleg tega uporaba suhega ledu ustvari atmosfero, nasičeno s CO₂, ki dodatno ščiti drozgo po hlajenju (Gil-Muñoz in sod., 2009). Pri večjih količinah suhega ledu lahko ta povzroči zamrzovanje znotrajcelične tekočine (nastanek ostrih kristalov) ter posledično razbitje celičnih sten, kar je pomembna dodatna (mehanska) pomoč k učinkovitejši ekstrakciji (Lasanta in sod., 2023). Pri doseganju tako nizkih temperatur pa praviloma govorimo že o kriomaceraciji (opisano v nadaljevanju).

Ohranjanje nizke temperature med PHM ni pomembno samo z vidika preprečevanja oz. zavlačevanja začetka fermentacije (nizka temperatura zadržuje prisotne kvasovke v lag fazi) (Aleixandre-Tudo in du Toit, 2018), kar je med drugim bistvo PHM, temveč je koristno tudi z vidika zmanjševanja nevarnosti oksidacije drozge. Pri nizkih temperaturah so namreč inhibirani tudi encimi, odgovorni za oksidacijo (Werner in Rauhut, 2009). V praksi so nizke temperature običajno podprte z uporabo zaščitnega žvepla.

Izbrana začetna nizka temperatura se lahko vzdržuje vse dni trajanja PHM ali pa, kot je v praksi tudi pogosto (in lažje izvedljivo), temperatura naravno rahlo narašča, vse dokler se ne začne alkoholna fermentacija, bodisi spontano bodisi načrtno, z dodatkom kvasnega nastavka komercialnih kvasovk (Razungles, 2022).

Zdaj že vemo, da je poleg izbrane temperature rezultat maceracijskih postopkov v veliki meri odvisen od njihovega trajanja. Eden glavnih namenov uvajanja PHM v vinifikacijske protokole je ravno podaljševanje maceracije (s tega vidika PHM spada med t. i. podaljšane maceracije). Z uvajanjem PHM pred alkoholno fermentacijo se namreč skupno gledano podaljša čas stika med moštom in trdnimi deli grozdja v primerjavi s klasično maceracijo, ki poteka samo med alkoholno fermentacijo. Teoretično gledano bo zaradi tega časa podaljšane stika v končnem vinu prisotna večja količina nekaterih fenolnih spojin (Aleixandre-Tudo in du Toit, 2018).

Konkretnjeje je med cilji PHM izboljšanje barvnih lastnosti vina s spodbujanjem ekstrakcije (vodotopnih) antocianinov, pa tudi ekstrakcija nekaterih v kožici prisotnih taninov s hkratnim omejevanjem pretirane ekstrakcije taninov iz pečk (Panprivech in sod., 2015; Cai in sod., 2014; Boulton in sod., 2013). Med maceracijskimi postopki se antocianini in tanini ekstrahirajo iz trdnih delov v tekočo fazo na podlagi kompleksne kinetike difuzije in raztapljanja (Casassa in sod., 2019) (od tu naprej poenostavljeno, brez ločevanja, govorimo kar o ekstrakciji). Ker PHM poteka pred alkoholno fermentacijo,

ekstrakcija poteka v okolju, ki je še brez alkohola (vodni medij) (Sacchi in sod., 2005), zaradi česar tovrstno ekstrakcijo lahko izkoriščamo za izboljšano pridobivanje nekaterih polarnejših spojin iz jagodnih kožic (Lasanta in sod., 2023). V takih razmerah, ko v mediju še ni alkohola etanola, se pričakuje predvsem povečano sproščanje vodotopnih snovi, kot so antocianini (Morata in sod., 2019; González-Neves in sod., 2014), poleg ekstrakcije nekaterih drugih fenolov z nizko molekulsko maso (Aleixandre-Tudo in du Toit, 2018; Favre in sod., 2014), medtem ko so kompleksnejši tanini manj vodotopni in posledično slabše ekstraktibilni (Morata in sod., 2018; Gonzalez-Manzano in sod., 2004). Pomembno je še, da je med PHM omogočeno nastajanje rdečih barvil z večjo molekulsko maso, kar bo vplivalo na stabilnost barve vina (Nel in sod., 2014; McMahon in sod., 1999). Dodatno je PHM namenjena ekstrakciji aromatičnih spojin tako pri rdečih kot tudi pri rosé in belih vinih, in sicer zaradi ekstrakcije prekursorjev arom iz jagodnih kožic v vodno okolje (mošt) (de Beer in sod., 2006; Salinas in sod., 2005).

V praksi vinarji vpeljujejo PHM predvsem zaradi želje in prepričanja, da bodo izboljšali barvni in/ali aromatični potencial vina, do neke mere pa tudi strukturo vina.

Znanstveno preverjeni rezultati ne potrjujejo vedno prepričanj, ki veljajo v praksi. Zato enologi občasno še vedno razpravljajo o dejanskih prednostih te tehnike, saj kljub široki uporabi ni nujno smiselna za vsako surovino. Čeprav znanstvene študije potrjujejo, da je uspešnost PHM med drugim zelo odvisna od sorte grozdja, se mnogo poročil o učinkovitosti PHM razhaja tako glede neposrednih, takojšnjih, kot tudi dolgoročajših učinkov PHM na kakovost vina. Nekatere študije tako poročajo o izboljšani ekstrakciji antocianinov in taninov ter višji vsebnosti skupnih fenolov in/ali izboljšani barvni karakteristiki v vinih s PHM v primerjavi s klasično pridelanimi vini (Gonzalez-Neves in sod., 2014; Moreno-Pérez in sod., 2013; Busse-Valverde in sod., 2011; de Santis in Frangipane, 2010; Gómez-Míguez in sod., 2007). Pri tem se lahko učinki, opaženi ob koncu PHM, včasih tudi zmanjšajo ali v nekaterih primerih celo izginejo med nadaljnjo pridelavo vina (Aleixandre-Tudo in du Toit, 2018). Po drugi strani so nekateri ob vpeljavi PHM zaznali le majhne ali nepomembne razlike v opazovani fenolni sestavi (Sacchi in sod., 2005; de Beer in sod., 2006; Casassa in Sari, 2015; Coletta in sod., 2013). Zaradi pogostejših težav z barvo vin v toplejših pridelovalnih območjih je zanimiva tudi študija Lasanta in sod. (2013), ki kaže na dober potencial PHM pri obdelavi grozdja sort tempranillo, merlot in syrah iz toplejših klimatskih razmer (izboljšanje fenolne in aromatske sestave, pa tudi barvnih lastnosti vin). Podobno so Cejudo-Bastante in sod. (2014) preučevali vpliv PHM na vino iz grozdja sorte syrah (tudi iz toplih pridelovalnih območij), pri čemer so bili njihovi rezultati obetavni po daljšem trajanju PHM, ne pa tudi ob krajšem trajanju PHM.

Večina raziskav predfermentacijske hladne maceracije se je osredotočila na njene vplive na barvo oziroma fenolne spojine, manj pa je znanega o vplivu tega pristopa na aromatične lastnosti končnih vin. Kot kaže, je večji ali manjši vpliv PHM na aromatični profil vin ponovno odvisen od sorte (in letnika) (Alti-Palacios in sod., 2023; Moreno-Pérez in sod., 2013). Dodatno so Álvarez in sod. (2006) poročali, da je uporaba PHM povečala vsebnost acetatov in estrov v vinih iz grozdja sorte monastrell, medtem ko sta De Santis in Frangipane (2010) zaznala povečane koncentracije nekaterih estrov, terpenov in 2-feniletanola v vinih iz grozdja sorte merlot.

S senzoričnega vidika so vina, pridelana s predfermentacijsko hladno maceracijo, pogosto opisana kot sadnejša, z razvitejšimi sadnimi notami (črni ribez in drobno rdeče sadje) ter večjo aromatično intenzivnostjo in kompleksnostjo v primerjavi z vini, pridelanimi s klasično maceracijo med alkoholno

fermentacijo. Poleg tega poročajo o temnejši in močnejši barvi ter mehkejših taninih (Lasanta in sod., 2023; Razungles, 2022; Petrozziello in sod., 2011; Parenti in sod., 2004).

Kljub nekaterim nasprotujočim si izsledkom raziskav obstaja prepričljivo število študij, ki podpirajo upravičenost predfermentacijske hladne maceracije, pri čemer se zdi, da lahko na splošno povzamemo, da je za boljšo učinkovitost PHM, vsaj z vidika fenolnih snovi, daljši čas (do deset dni) primernejši od krajšega in po drugi strani nižja temperatura (4–8 °C) učinkovitejša od nekoliko višjih (Aleixandre-Tudo in du Toit, 2019; Aleixandre-Tudo in du Toit, 2018).

Klasična maceracija s fermentacijo

Klasična maceracija s fermentacijo (KMF) je najpogostejše uporabljen maceracijski postopek v pridelavi rdečih vin (ali maceriranih belih vin), pri katerem maceracija in alkoholna fermentacija večino časa potekata hkrati (razen časa, ki je potreben za zagon alkoholne fermentacije). Običajno se po pecljanju in drozganju pridobljeno drozgo inokulira s komercialno kvasovko (ali ustvari ustrezne pogoje za delovanje naravno prisotnih kvasovk), da čim prej steče alkoholna fermentacija. Ta med drugim povzroči zviševanje temperature drozge in pretvorbo sladkorjev v alkohol. Oba omenjena dejavnika (višanje temperature in vedno večja koncentracija alkohola) imata v primerjavi s predfermentacijsko hladno maceracijo znaten dodaten vpliv na ekstrakcijo fenolnih snovi iz trdnih delov grozdnih jagod (Razungles, 2022; Setford in sod., 2017; Casassa in sod., 2013a), kar je bistvo in glavni cilj vpeljave tega postopka v pridelavo maceriranih vin. V cilju čim uspešnejšega izplena zelenih fenolnih spojin pa se moramo zavedati, kaj in kako vpliva na dinamiko ekstrakcije posameznih skupin fenolov med klasično maceracijo s fermentacijo. Najpomembnejše fenolne spojine v rdečih vinih, ki jih želimo pridobiti iz trdnih delov jagod s pomočjo klasične maceracije, so *i*) antocianini (odgovorni za barvo rdečih vin) ter *ii*) tanini, ki so na splošno pomembni za edinstvenost (razlika od klasično pridelanih belih vin), kakovost in stabilnost rdečih vin. Tanini so ustaljen posplošen pogovorni izraz v vinarstvu, ki se uporablja za opis proantocianidinskih spojin flavonoidne strukture, te so odgovorne za strukturo in antioksidativni potencial vina (Morata in sod., 2018), pa tudi za tipične organoleptične lastnosti, kot so trpkost in grenkoba (Monagas in sod., 2005; Gawel, 1998) ter barva v smislu njene stabilnosti (Monagas in sod., 2005). Vplivajo tudi na potencial staranja vina (Lorenzo in sod., 2005). Poleg tega imajo lahko protimikrobni učinek in pripomorejo k stabilnosti vrednosti pH rdečih vin (Morata in sod., 2018).

Čeprav tako eni kot drugi nedvomno odločilno vplivajo na stil in kakovost rdečega vina, se moramo zavedati, da je med klasično maceracijo s fermentacijo kinetika ekstrakcije rdečih barvil – antocianinov drugačna od kinetike ekstrakcije taninov, prav tako pa se kinetika ekstrakcije taninov iz kožic razlikuje od tiste, ki jo lahko pričakujemo za tanine iz pečk (Morata in sod., 2018; Joscelyne, 2009; Ford in Joscelyne, 2006; Mazza in Ford, 2005). Odgovor na vprašanje, zakaj, je med drugim v njihovem mestu v celici oz. trdnosti vezave na komponente celice, pa tudi v različni strukturi oz. kemijski naravi teh molekul (velikost molekul, relativna topnost) (Morata in sod., 2018; Casassa in Harbertson, 2014). Antocianini so manjše molekule in imajo zaradi svoje zgradbe polarnejši značaj, zaradi česar so topnejši v polarnih medijih, tanini pa so nekoliko večje molekule z nekoliko bolj nepolarnimi lastnostmi (Ribéreau-Gayon in sod. 2021; Morata in sod., 2018; Moreno-Arribas in Polo, 2009).

Kadar govorimo o mediju med klasično vinifikacijo, je znano, da se med alkoholno fermentacijo spreminja iz pretežno polarnega medija (mošt je v osnovi kislá voda s sladkorji), v katerem je topnost antocianinov zelo visoka in njihova ekstrakcija zelo hitra, do medija, vedno bogatejšega z alkoholom (proti koncu alkoholne fermentacije), ki postaja ugodnejši za ekstrakcijo taninov (Morata in sod., 2018; Moreno-Arribas in Polo, 2009). Odsotnost (v začetku fermentacije) in vedno večja prisotnost (med fermentacijo) etanola med maceracijo torej močno vpliva na spojine, ki se bodo ekstrahirale prednostno (González-Manzano in sod., 2004). Poleg tega velja, da je za ekstrakcijo taninov iz pečk potrebna prisotnost etanola tudi zato, da pomaga odstraniti zaščitne plasti pečk, preden ekstrakcija taninov zares lahko poteče (Busse-Valverde in sod., 2010).

Kaj to spreminjanje medija pomeni za vinarja pri odločanju o vodenju postopka (primerno ciljnemu stilu vina)? Zaradi postopnega pretvarjanja mošta v vino se ekstrakcijski vrh antocianinov običajno doseže že po treh ali štirih dneh alkoholne fermentacije (Casassa in sod., 2013b; Morata in sod., 2018) ali v nekaterih pogojih in pri nekaterih sortah po petih ali šestih dneh (Ribéreau-Gayon in sod. 2021; Budić-Leto in sod., 2006), zlasti če je temperatura fermentacije nekoliko nižja. Potem se ob postopnem zviševanju alkohola in povezanih spremembah v polarnosti medija ekstrakcija antocianinov zmanjšuje, prav tako koncentracija monomernih antocianinov, med drugim zaradi tvorbe stabilnejših oblik rdečih barvil, obarjanja ali fiksacije antocianinov na kvasovke (Casassa in Harberstson, 2014; Rentzsch in sod., 2007; Medina in sod., 2005). Nasprotno poteka ekstrakcija taninov ves čas maceracije, njihova vsebnost pa narašča v odvisnosti od večanja koncentracije etanola, tako da doseže najvišje vrednosti ob koncu fermentacije (Morata in sod., 2018). Tanini kožic lahko dosežejo ekstrakcijski vrh malo pred koncem fermentacije, medtem ko se tanini pečk izločajo, dokler traja stik pečk z vinom (Cerpa-Calderón in Kennedy, 2008).

Kadar se osredotočamo na barvo vina, se je treba zavedati še, da barvne lastnosti končnega vina niso zgolj ali neposredno odvisne le od uspešnosti ekstrakcije monomernih antocianov grozdja, temveč v veliki meri tudi od nadaljnjih polimerizacijskih in kopigmentacijskih procesov, v katere vstopajo (Casassa in Harberstson, 2014). Reakcije in interakcije med fenolnimi spojinami se namreč pojavijo takoj, ko soobstajajo v moštu (Aleixandre-Tudo in du Toit, 2018), in potekajo tudi med maceracijo s fermentacijo (Sternad Lemut in sod., 2013).

Kot že omenjeno, se med alkoholno fermentacijo postopoma zvišuje tudi **temperatura**, kar načeloma dodatno pozitivno vpliva na ekstrakcijo določenih zelenih spojin. Višja temperatura namreč izboljša razgradnjo v drozgi prisotnih grozdnih tkiv, vpliva na topnost in posledično pospeši maceracijo (Ribereau-Gayon in sod., 2021). Rezultati so tako lahko boljši pri nekoliko višjih temperaturah fermentacije (npr. 28–30 °C) kot nižjih (npr. 20 °C) (He in sod., 2012; Budić-Leto in sod., 2006).

Če se vrnemo k osnovnemu dogajanju med alkoholno fermentacijo, poleg zviševanja temperature in vsebnosti alkohola v procesu nastaja tudi **CO₂**. Že po prvih nekaj dneh fermentacije (dveh ali treh) CO₂, ki nastaja med alkoholno fermentacijo kot posledica delovanja kvasovk, povzroči, da se grozdne kožice kopičijo na površini fermentirajočega mošta ter tvorijo t. i. klobuk. Znotraj debele plasti precej zbitih kožic (klobuk) je velika koncentracija kvasovk, prisotna trdna tkiva pa pomenijo tudi prisotnost hranil za te kvasovke, zlasti dušikovih spojin. Večja koncentracija kvasovk povzroči intenzivnejšo fermentacijsko aktivnost in zviša temperaturo v klobuku hitreje kot v tekočini pod njo (Morata in sod., 2018). Če ni nadzorovana, se lahko temperatura znotraj klobuka zlahka zviša za več kot 12 °C višje, kot bi bila v tekočini,

razlike v temperaturi (do pribl. 8 °C) pa so zaznavne tudi med sredino in robovi klobuka (Schmid in sod., 2009). Dopusčanje višje temperature v klobuku v primerjavi s temperaturo tekočine pod njim spodbuja boljšo ekstrakcijo in se lahko uporablja kot strategija za zvišanje stopnje ekstrakcije. Vendarle moramo v tem primeru paziti, da temperatura ne postane previsoka (ohranjati jo moramo pod 35 °C), sicer negativno vpliva na delovanje kvasovk in pojavijo se težave s prepočasno ali zaustavljeno fermentacijo (Morata in sod., 2018).

Ker je preveč kompakten in preobsežen klobuk tudi težaven v smislu težje ekstrakcije, npr. iz njegove sredine (kjer kože niso v stiku z moštom, kamor bi se lahko ekstrahirale njihove sestavine), površina klobuka pa je hkrati tudi bolj izpostavljena oksidaciji, se v praksi vsakodnevno (vsaj enkrat ali dvakrat) uporablja postopek, ki ga imenujemo potapljanje klobuka.

Prevladujeta dve metodi mešanja/potapljanja klobuka. Prva metoda je mehansko rahljanje in potiskanje klobuka navzdol nazaj v tekočino (angl. *punch down of cap*; fr. *pigeage*) ob hkratnem zmernem mešanju celote. Cilj je med drugim povečati stik med trdno in tekočo fazo ter tako optimizirati raztapljanje in ekstrakcijo. Pri delu z manjšimi količinami lahko to izvajamo tudi ročno, na industrijski skali pa se za to uporabljajo razne avtomatizirane, ustrezno oblikovane lopute oz. specializirani maceratorji. Druga metoda je prečrpavanje fermentirajočega mošta od spodaj (z dna fermentacijske posode) prek klobuka na vrhu posode (angl. *pumping over*; fr. *remontage*). Če se prečrpavanje izvaja tudi bolj proti koncu fermentacije, se v vino ekstrahira več taninov iz pečk. Čeprav so tanini iz pečk v splošnem pogosto obravnavani kot manj zaželeni, v praksi velja, da so potrebni skupaj s tanini kože (v ustreznem razmerju), da pridobimo bolj uravnotežena in ustrezno strukturno podprta rdeča vina (Razungles, 2022; Baiano in sod., 2016; Ribéreau-Gayon in sod., 2021). Za razliko od opisanih precej grobih tradicionalnih metod potapljanja klobuka so Pettinelli in sod. (2022) vpeljali in preučevali dve inovativnejši (t. i. mehki) tehniki: prva je modulirano vbrizgavanje zraka, ki uporablja fizikalni zakon resonančnega valovanja za preprečevanje nastanka klobuka, druga pa temelji na ohranjanju rahlega nadtlaka CO₂ (sproščenega med alkoholno fermentacijo), ki ga uporablja skupaj z nenadnim znižanjem tlaka z odpiranjem ventila, da razrahlja klobuk (Pettinelli in sod., 2022).

Številne raziskave, ki se usmerjajo v razumevanje kinetike ekstrakcije različnih skupin fenolnih spojin pod različnimi pogoji (in v povezane potenciale senzoričnih izboljšav), kažejo odvisnost od sorte oz. lastnosti surovine, poleg tega pa potrjujejo številne pozitivne učinke na kakovost vin, pridelanih z maceracijo, ki poteka vzporedno z alkoholno fermentacijo (Lisjak in sod., 2020; Busse-Valverde in sod., 2012; Budić-Leto in sod., 2006; Romero-Cascales in sod., 2005; Sacchi in sod., 2005; Vrhovšek in sod., 2002; Gomez-Plaza in sod., 2001; Reynolds in sod., 2001). Vedno več znanja iz vedno novih študij, tudi zaradi vedno boljših analiznih zmogljivosti, omogočajo vinarjem natančnejše razumevanje poteka ekstrakcije in boljši nadzor nad maceracijo v skladu z zastavljenimi cilji.

Podaljšana (pofermentacijska) maceracija

Podaljšana (pofermentacijska) maceracija (PPM) je maceracijski postopek, ki traja še po končani alkoholni fermentaciji. Pri tem pristopu trdni deli grozdne jagode ostanejo v vinu še nekaj tednov po zaključeni alkoholni fermentaciji, kar pomeni, da odložimo stiskanje. Ob tem se moramo zavedati zmanjšane

samozaščite vina po alkoholni fermentaciji in ustrezno preventivno ukrepati. Trajanje pofermentacijske maceracije je v praksi zelo različno, večinoma traja od dva do štiri tedne (Joscelyne, 2009; Ford in Joscelyne, 2006; Zimman in sod., 2002; Casassa in sod., 2013b), lahko pa tudi dva meseca ali več. Kljub temu še ni razpoložljivih znanstvenih poročil o učinkih tako dolgega maceriranja (sklepamo pa lahko, da je z vidika kakovosti to precej tvegano).

Maceracija po fermentaciji omogoča nadaljevanje ekstrakcije v alkoholu topnih spojin, kot so tudi visokomolekularni tanini – astringenti in grenki tanini pečk (Cerpa-Calderon in Kennedy, 2008). Podaljšana maceracija bo praviloma prispevala v vino več taninov iz pečk, česar se je treba zavedati in ravnati skladno s proizvodnimi cilji in uporabljeno sorto/surovino ter njenimi lastnostmi (Nel in sod., 2014). Povečana ekstrakcija teh spojin namreč pomembno spremeni senzorične lastnosti in potencial staranja vina (Casassa in sod., 2014). Razlog za pofermentacijsko maceracijo je v osnovi podoben razlogu za predfermentacijsko hladno maceracijo – tj. da se čim bolj podaljša čas stika mošta/vina s trdnimi deli grozdne jagode. Vendar se bo običajno s podaljševanjem časa maceracije s predfermentacijsko hladno maceracijo iz grozdnih kožic pridobilo predvsem več barvnih komponent, s pofermentacijsko maceracijo pa se bo ekstrahiralo predvsem več taninov (tudi ali celo predvsem tistih iz pečk), kar bo izboljšalo strukturo vina (Joscelyne & Ford, 2008), hkrati pa povečalo grenkobo in astringenco vin. Pofermentacijska maceracija in njen taninski izplen imata pomembno vlogo tudi pri tvorbi stabilnejših oblik rdečih barvil in boljši stabilnosti barve vina (He in sod., 2012).

Rezultati raziskav PPM potrjujejo povečane vsebnosti taninov in skupnih fenolov, tudi zaradi taninov iz pečk (Lisjak in sod., 2020; Waterhouse in sod., 2016; Casassa in sod., 2013a,b; Cerpa-Calderón in Kennedy, 2008; Budić-Leto in sod., 2008; Sacchi in sod., 2005; Gómez-Plaza in sod., 2001). Lisjak in sod. (2020) so preučevali, kako se tanini in antocianini ekstrahirajo med alkoholno fermentacijo iz kožic in pečk v modelni raztopini vina in med industrijsko fermentacijo mošta iz grozdja sorte cabernet sauvignon, ter potrdili, da s podaljšano maceracijo po končani alkoholni fermentaciji začenjamo pridobivati visokomolekularne tanine iz pečk (monomeri in nizkomolekularni se izločijo prej). Če imamo zrelo grozdje (zrele pečke) lahko vino taninsko obogatimo tudi na ta način (Lisjak in sod., 2020). Zrelost grozdja vpliva tako na količino ekstraktabilnih proantocianidinov (Bindon in Kennedy, 2011) kot na kakovost (nezrele peške dajejo “nezrele” tanine, zato se v tem primeru izogibamo daljšim, predvsem pofermentacijskim maceracijam). Poročajo tudi o poslabšanju barvnih lastnosti vin (Casassa in sod., 2013a,b; Joscelyne in Ford, 2008). Kar se barve tiče, PPM po poročanjih povzroči zmanjšano intenzivnost barve in spremembe odtenka (bolj rjavkast) v rdečih vinih (Joscelyne in Ford, 2008). Frost in sod. (2018) ter Casassa in sod. (2013) so zaznali tudi zmanjšanje vsebnosti antocianinov. S senzoričnega vidika PPM v skladu s povečanimi vsebnostmi taninov iz pečk poveča občutek grenkobe in trpkosti v končnih vinih (Casassa in sod., 2013a, Casassa 2013b). O najpomembnejših vplivih PPM na lastnosti vina se večinoma poroča enotno, pri čemer je stopnja vpliva odvisna tudi od sorte (Gil in sod., 2012).

Kljub tveganju glede možnosti precej negativnih senzoričnih rezultatov v smislu prevelike grenkobe in astringence je podaljšana (pofermentacijska) maceracija zelo razširjena in priljubljena pri vinarjih v pridelavi vin visoke kakovosti, zlasti tistih, namenjenih daljšemu staranju.

Karbonska maceracija

Karbonska maceracija (KM), včasih imenovana tudi fermentacija celih jagod ali fermentacija celih grozdov, je vinifikacijski pristop, pri katerem cele nepoškodovane grozde (skupaj s peclji) nežno položimo in zapremo v posebno posodo (fermentorje, ki lahko zdržijo potreben pritisk), v njej pa jih izpostavimo umetno dodani ogljikovi atmosferi in sčasoma tudi naravno nastali ogljikovi atmosferi (Bianchi in sod., 2023; Baiano in sod., 2016; Tesniere in Flanzy, 2011). Karbonska maceracija izkorišča prilagoditev celih grozdnih jagod na medij brez kisika, obogaten z ogljikovim dioksidom (CO_2), ki se skoraj v trenutku odraža znotraj vsake jagode s prehodom iz respiratornega v fermentativni anaerobni metabolizem (Tesniere in Flanzy, 2011). Ta postopek, ki ga je leta 1934 izumil Michel Flanzy, lahko poteka tudi več tednov, običajno pa od šest do 15 dni, pri čemer je čas trajanja odvisen med drugim od uporabljene temperature in cilja končnega stila vina (Tesniere in Flanzy, 2011). Včasih pridelovalci celemu grozdju dodajo manjšo količino zmletega grozdja, tudi brez tega pa se zaradi lastne teže grozdja sprosti na dno posode nekaj grozdnega soka, ki med drugim omogoči začetek klasične alkoholne fermentacije (Tesniere in Flanzy, 2011). Vendarle je bistvo karbonske maceracije t. i. intracelularna (znotrajcelična) fermentacija, ki poteka v celih grozdih oziroma v celih grozdnih jagodah – anaerobno okolje v zaprti posodi, kjer se kisikova atmosfera nadomešča z ogljikovo, namreč spodbudi encime grozdnih jagod, da znotrajcelično fermentirajo sladkorje in proizvajajo manjše količine etanola (1,5–2 %) (Razungles, 2022; Tesniere in Flanzy, 2011). To pomeni, da se na ta način sproži anaerobna presnova (anaerobni metabolizem – fermentacija) brez vpletenosti mikroorganizmov (kvasovk) (Bianchi in sod., 2023; Tesniere in Flanzy, 2011). Po določenem času grozdje nato zmečkamo (oziroma ga lahko na tej stopnji kar stisnemo) in zaključimo alkoholno fermentacijo ob dodatku komercialnih kvasovk. Postopek bi tako lahko strnili v štiri korake: polnjenje posode s celimi grozdi; maceracija in fermentacija (znotrajcelična); stiskanje in druga faza fermentacije (klasična) (Tesniere in Flanzy, 2011).

Uspeh karbonske maceracije je v veliki meri odvisen od uspešnosti preprečevanja kakršnih koli poškodb grozdnih jagod. Zato vsi mehanski postopki, ki lahko poškodujejo grozde, vključno s strojnim obiranjem, za karbonsko maceracijo ne pridejo v poštev (Razungles, 2022). Ob previdnem nalaganju celega grozdja v posodo, ki je predhodno nasičena s CO_2 , je priporočljivo tudi zmerno žveplanje, da zavremo delovanje oacetnokislinskih bakterij. Za zmanjšanje tveganja delovanja neželenih mikroorganizmov vinarji včasih tudi korigirajo kislino grozdnega soka, ki se je zaradi lastne teže grozdov sprostil na dnu posode, ter ga inokulirajo s komercialnimi kvasovkami (Razungles, 2022).

Med karbonsko maceracijo se pod vplivom encimov dogajajo še druge transformacije (npr. tvorba nekaterih hlapnih aromatičnih spojin, razgradnja jabolčne kisline), hkrati pa etanol, ki nastaja, olajšuje ekstrakcijo fenolnih snovi (zlasti antocianinov) (Unterkofer in sod., 2020; Baiano in sod., 2016). Ti učinki so večji ob hkratnem zviševanju temperature zaradi fermentacije, na splošno pa je ekstrakcija fenolnih snovi v karbonski maceraciji vina odvisna od uporabljene sorte grozdja in drugih pogojev vinifikacije. Vina, pridelana s karbonsko maceracijo, so načeloma namenjena hitri porabi (zelo hiter prihod na trg in kratko obdobje prodaje), saj se praviloma ne starajo dobro. Običajno imajo manj intenzivno barvo (manj rdečih barvil) ter manj trpkosti (manj taninov) oziroma na splošno manjšo skupno vsebnost fenolnih spojin v primerjavi z vini, pridelanimi po klasični rdeči tehnologiji (Baiano in sod., 2016). Po drugi strani imajo vina

s karbonsko maceracijo več intenzivnejših sadnih aromatičnih značilnostih, in sicer so za tako pridelana vina značilne note mehkega rdečega sadja, rdečega jagodičevja in včasih bonbonov (Baiano in sod., 2016; Spranger in sod., 2004). Po poročilih imajo vina iz karbonske maceracije v primerjavi s klasično pridelanimi vini povišane skupne vsebnosti estrov in acetatov (Gonzalez-Arenzana in sod., 2020).

Karbonsko maceracijo so najprej uspešno vpeljali v francoski regiji Beaujolais (še vedno najbolj znano poreklo v pridelavi tovrstnih mladih rdečih vin), danes pa je ta tehnika razširjena že po vsem svetu. Uporabljamo jo ne le pri proizvodnji rdečih in mladih vin, temveč tudi v pridelavi rosé, alkoholiziranih in penečih vin (Tesniere in Flanzy, 2011).

Kriomaceracija

Druga ekstremnejša možnost (od predfermentacijske hladne maceracije) za povečanje ekstrakcije zelenih spojin s pomočjo nizkih temperatur je zamrzovanje grozdov ali drozge (t. i. kriomaceracija ali včasih tudi krioekstrakcija, nekateri jo obravnavajo zgolj kot modifikacijo predfermentacijske hladne maceracije). Podobno kot visoka temperatura (opisano v nadaljevanju) lahko tudi zelo nizka temperatura oziroma zamrzovanje grozdnih jagod povzroči pomembne poškodbe celic grozdnih jagod, kar olajša ekstrakcijo znotrajceličnih komponent (Sacchi in sod., 2005). Ko grozdje/drozgo zamrznemo, nastali ledeni kristali raztrgajo pektocelulozno steno, razcefrajo kožice in olajšajo proces ekstrakcije (Schmid in Jiranek, 2011).

Ta predfermentacijski postopek, ki se večinoma uporablja za izboljšanje izplena aromatičnih komponent grozdne jagode (Naviglio in sod., 2018), je mogoče izvesti na dva načina: z zamrzovanjem grozdja pred stiskanjem (krioekstrakcija) ali z zamrzovanjem grozdja, ki mu sledi zaporedno odmrzovanje in stiskanje (imenovano tudi supraekstrakcija) (Roldan in sod., 2021).

Pri kriomaceraciji za izboljšanje ekstrakcijskih učinkov načeloma uporabljamo temperaturo pod lediščem. To lahko dosežemo z različnimi tehnikami, kot je npr. dodajanje suhega ledu v drozgo ali zamrzovanje delov mošta ali grozdja s pomočjo zamrzovalnikov velikih prostornin, kar pa pomeni veliko porabo energije in visoke obratovalne stroške (Baiano in sod., 2016). Zato se za obetavnejši pristop šteje uporaba kriogenega plina (CO_2 ali N_2) (Naviglio in sod., 2018; Baiano in sod., 2016). Postopek vključuje vbrizgavanje tekočega CO_2 neposredno v linijo, med njegovim izhlapevanjem pa se toplota odvaja iz surovine, ki jo želimo ohladiti (Carillo in sod., 2011).

Pred interpretacijo rezultatov znanstvenih študij je smiselno omeniti, da se v literaturi podatki o uporabljeni temperaturi pri krioekstrakciji razhajajo, tako da nekateri navajajo temperaturo, podobno tisti na spodnji meji temperaturnega intervala, uveljavljenega za predfermentacijsko hladno maceracijo (Baiano in sod., 2015; Colleta in sod., 2013), drugi pa temperaturo pod lediščem, kar nakazuje, da je v praksi (in v raziskovalnem okolju) meja med kriomaceracijo in predfermentacijsko hladno maceracijo nejasna ter da je treba tudi rezultate teh raziskav ustrezno preveriti v smislu vinifikacijskih pogojev, v katerih so bila eksperimentalna vina dejansko pridelana.

Nedavna študija vplivov krioekstrakcije in supraekstrakcije je sicer pokazala, da obe tehniki zamrzovanja omogočata pridelavo vin z intenzivnejšo aromo in boljšimi senzoričnimi ocenami v primerjavi s tradicionalno pridelanimi vini (Ruiz-Rodríguez, 2020). O nekaterih (različnih, vendar tudi ob različnih pogojih) izboljšanjih aromatskih lastnosti in/ali splošne senzorične kakovosti preučevanih vin, podvrženih

zelo nizkim temperaturam, so poročali tudi drugi (Radeka in sod., 2023; Piombino in sod., 2010; Bavčar in sod., 2011, Girard in sod., 2001). Frett in sod. (2012) so v raziskavah učinkov kriomaceracije (s tekočim N₂) v primerjavi s tradicionalno pridelavo vina poročali tudi o vplivu na fenolne spojine, in sicer je kriomaceracija povečala vsebnost kvercetina za 6 %, vendar zmanjšala vsebnost antocianinov, katehina in resveratrola za 11, 9 in 60 % (v tem sosledju). Podobno kot karbonska maceracija tudi kriomaceracija z dodajanjem suhega ledu v manjši meri vpliva na proantocianidinski profil vina (Busse-Valverde in sod., 2010).

Termovinifikacija

Čeprav ne gre za klasično (dolgo) maceracijo, je tudi termovinifikacija postopek, namenjen izboljšani, načeloma pa predvsem hitrejši ekstrakciji nekaterih zelenih sestavin grozdja v mošt. Termovinifikacija temelji na krajšem (nekaj minut, lahko nekaj 10 minut; če gre za več ur, pa govorimo o vroči vinifikaciji) segrevanju mošta ali drozge na pribl. 60–70 °C (v praksi nekateri navajajo večji interval 50–80 °C), ob hkratnem vzdrževanju stika mošta s trdnimi deli jagod. Sledi stiskanje (pred fermentacijo – drugače kot pri klasičnih postopkih pridelave rdečih vin) in nujno tudi ohlajanje mošta, pri čemer s pomočjo hladilnega sistema temperaturo zelo hitro znižamo na 35–40 °C. Poleg tega da je temperaturno znižanje nujno potrebno pred inokulacijo s kvasovkami za uspešen začetek alkoholne fermentacije pri kvasovki ustreznih pogojih, to hitro ohlajanje še dodatno pripomore k razpadanju jagodnih kožic in posledično k še učinkovitejši ekstrakciji ciljnih spojin. Po ohlajanju/stiskanju po termovinifikaciji (še pred fermentacijo) vinarji običajno mošt tudi zbistrijo, sledi alkoholna fermentacija v tekoči fazi, za razliko od vroče vinifikacije, pri kateri lahko ta poteka tudi ob prisotnosti trdnih delcev (Nordesgaard, 2017; Baiano in sod., 2016; He in sod., 2012).

Najenostavnejši in najcenejši toplotni izmenjevalci, ki se uporabljajo za segrevanje grozdja pred fermentacijo, so cevni toplotni izmenjevalniki tipa *tube-in-tube* (dvojna cev, druga v drugi), slabost katerih so predvsem pogoste težave z zamašitvijo. Zaradi varčevanja z energijo je priporočljivo obdelovati trdne dele grozdja po predhodnem odcejanju dela tekočine, da se zmanjša količina materiala, ki ga je treba segreti (in nato ohladiti) (Maza in sod., 2019a). Zaradi varčevanja z energijo se še vedno razvijajo tudi drugi pristopi. Ena od drugih možnosti za opisano kontinuirano metodo z enim prehodom je segrevanje grozdne drozge s cevnim toplotnim izmenjevalnikom, medtem ko ta kroži v rezervoarju. Ta pristop, ki se običajno uporablja v manjših kletah, načeloma vodi v počasnejše, a bolj heterogeno segrevanje (Maza in sod., 2019a).

Osnovna ideja termovinifikacije je pospeševanje ekstrakcije fenolnih spojin, predvsem barvnih snovi iz kožic zaradi učinkovitejše razgradnje celičnih sten pod vplivom visoke temperature, in s tem izboljšana oz. hitrejša ekstrakcija antocianinov. Termovinifikacija lahko drastično skrajša potreben čas za ekstrakcijo, pri čemer migracija iz kožic v meso lahko steče že v nekaj minutah (Baiano in sod., 2016). Prihranek časa je lahko še posebej dragocen v industrijskih kletah s potrebo po hitrem obračanju velikih količin pridelka ali v letnikih s količinsko nadpovprečnimi pridelki, ki bistveno presegajo standardne kapacitete predelave.

Znanstveni izsledki sicer ne podpirajo vedno pozitivnega vpliva za ekstrakcijo barvil/fenolnih snovi oziroma uspešnost termovinifikacije je verjetno precej odvisna tudi od sorte grozdja in lastnosti surovine, ki je podvržena temu postopku. Nekateri poročajo o razlikah bolj na strukturni ravni rdečih barvil kot

kvantitativnem profilu antocianinov v primerjavi s klasično maceracijo (Chiaromonti in sod. 1999), drugi pa so zaznali pomembnejše razlike tudi v vsebnosti skupnih fenolov (Atanackovic in sod. 2012) ali vsebnosti antocianinov (in katehina ter stilbena resveratrola) (Fretté in sod. 2012).

Čeprav med vinarji pogosto velja, da lahko s tem postopkom izboljšajo tudi ekstrakcijo taninov, se je treba zavedati, da stiskanje pred fermentacijo (po čemer se ta postopek razlikuje od klasične rdeče vinifikacije) lahko pomeni tudi manj ekstrahiranih taninov v primerjavi s klasično maceracijo med alkoholno fermentacijo, kjer se zlasti proti koncu alkoholne fermentacije kot dodaten pomožni dejavnik pridruži tudi alkohol (Unterkofer in sod., 2020; Waterhouse in sod., 2016; Sacchi in sod. 2005).

Zato so kljub nekaterim obetavnim začetnim rezultatom (pri nekaterih sortah) v praksi vina, pridelana s termovinifikacijo, pogosto slabše in manj stabilne barve ter slabše strukture. Razlog je verjetno v tem, da čeprav se antocianini po tem postopku res zelo hitro ekstrahirajo, po drugi strani tanini potrebujejo več časa (in pomoč klasične alkoholne fermentacije), tako da se verjetno v tako kratkem času ne ekstrahirajo v dovoljšni količini, da bi lahko pomagali stabilizirati barvne snovi in okrepili strukturo (Nordesgaard, 2017).

Poleg ciljanih (bolj ali manj doseženih) pozitivnih vplivov na povečanje ekstrakcije antocianinov ima povišana temperatura lahko še druge pozitivne učinke, saj deaktivira oksidacijske encime, ki bi lahko povzročili porjavitev, prav tako pa zmanjša prisotnost oz. uniči neželene mikroorganizme (Unterkofer in sod., 2020).

Po drugi strani lahko termovinifikacija odločilno vpliva na kvalitativno in kvantitativno vsebnost aromatičnih spojin, in sicer tako negativno (tveganje hitre izgube nekaterih, predvsem lažje hlapnih aromatičnih spojin) kot v nekaterih primerih tudi pozitivno, saj lahko zmanjša vplive določenih napak (npr. vonja po plesni, po zatohlem), do neke mere pa lahko že pred fermentacijo omehča t. i. zeleni karakter (Unterkofer in sod., 2020). Termovinifikacija se kot sanitacijski ukrep pogosto uporablja tudi pri težavah s kvasovkami *Brettanomyces* (Baiano in sod., 2016). V pridelavi odprtega belega vina se termovinifikacija ponekod uporablja za povečanje izplena iz grozdja preobremenjenih trt (Baiano in sod., 2016).

Čeprav se je termovinifikacija razvila in začela uporabljati že v šestdesetih letih prejšnjega stoletja, do danes večinoma ni prodrla v protokole pridelave visokokakovostnih vin, ne glede na barvo (bela, rdeča). Posledično so sledili poskusi optimizacije nekaterih parametrov, kar pa je privedlo do novih pristopov, kot je *flash détente*.

Flash release ali flash détente

Flash détente (FD) je v bistvu modifikacija termovinifikacije, pri kateri se grozdje izpostavi še višji temperaturi kot pri termovinifikacijskem postopku ter hkrati še močnemu vakuumu, kar povzroči izhlapevanje vode in razgradnjo celičnih sten grozdja ter posledično izboljša ekstrakcijo fenolnih snovi. Konkretnije je FD tehnika ekstrakcije s hitrim segrevanjem grozdja na 85–95 °C (lahko z neposrednim injiciranjem pare) in nato bliskovitim ohlajanjem (v sekundi) na 30–35 °C v vakuumski/ekspanzijski komori pri 20–50 hPa (Maza in sod., 2019a; Watrelot, 2020). Temu sledi fermentacija z grozdnimi trdnimi delci ali brez njih (Unterkofer in sod., 2020; Nordesgaard, 2017).

Postopek FD so razvili in patentirali na Francoskem nacionalnem inštitutu za kmetijske raziskave (INRA). Namen je bil razviti učinkovito metodo za hitro povečanje vsebnosti fenolnih spojin v moštu

in končnih vinih (Doco in sod., 2007; Morel-Salmi in sod., 2006). Raziskave kažejo, da lahko FD poveča izločanje fenolnih spojin iz kožic in vakuol pod kožicami, in sicer bolj kot tistih (načeloma manj zelenih) iz pečk (Maza in sod., 2019a). V raziskavi kakovosti tako pridelanih vin iz grozdja sorte merlot in cabernet sauvignon (Vinsonneau in Escaffre, 2006) so grozdje mehansko pobrali, razpecljali in zdrozgali, nato pa segrevali pri različni temperaturi (75–85 °C) 30–60 minut, nakar je sledila obdelava pod pritiskom 94–97 mbar pri nižji temperaturi. Vsa tako pridobljena eksperimentalna vina so bila v primerjavi z vini, pridelanimi po klasičnem postopku, bogatejša s fenolnimi spojinami – barvili in tanini, hkrati pa so tudi po več mesecih staranja izkazovala manj zelenih in rastlinskih not (Watrelet, 2020; Vinsonneau in Escaffre, 2006). Tudi novejša študija potrjuje v FD vinih iz grozdja sorte cabernet sauvignon višjo vsebnost kondenziranih taninov za vsako stopnjo polimerizacije (Tong in sod., 2024). Študije na različnih sortah, grenache, mourvèdre in carignan (Morel-Salmi in sod., 2006), modri pinot (Samoticha in sod., 2017), merlot (Ntuli in sod., 2023), nakazujejo, da so lahko kvalitativni in kvantitativni izpleni tudi pri FD precej odvisni od uporabljene sorte/surovine. Dodatno študiji avtorja Ntuli in sod. (2022, 2023) poročata o potencialu izboljšanja telesa rdečih vin po FD, ne samo zaradi izboljšane fenolne strukture, temveč tudi zaradi povečane vsebnosti polisaharidov.

Senzorično gledano so Caillé in sod. (2010) poročali, da so imela FD vina iz grozdja sorte grenache poleg nižje intenzitete barve ob stekleničenju tudi več trpkosti in grenkobe, hkrati pa več not po rdečih sadežih in manj živalskih not v primerjavi z vini tradicionalne maceracije. Razlike so postale manj očitne po desetih mesecih staranja v steklenici, z izjemo trpkosti, ki je ostala izrazita (Caillé in sod., 2010). V raziskavi avtorja Ntuli in sod. (2023) je *flash détente* pri grozdju/vinu iz sorte merlot ublažil intenzivnost zelenih, začimbnih in prašnih senzoričnih lastnosti. Tudi nedavna študija na sortah cabernet sauvignon in marselan kaže obetavne rezultate glede aromatskih značilnosti FD vin, ki so razvila več (sveže) sadnosti (posledica višje vsebnosti estrov) in sladkih not (povečana vsebnost laktonov in furanonov); podobno kot v predhodnih študijah so vina FD izkazala tudi zmanjšane zelenih (in cvetličnih) not zaradi nižjih ravni C6-alkoholov in C13-norisoprenoidov (Tong in sod. 2024).

Če povzamemo, se zdi *flash détente* obetavna metoda za ekstrakcijo večjih količin antocianinov in taninov iz grozdnih kožic, pa tudi za zmanjšanje vsebnosti aromatičnih spojin, odgovornih za zelene arome v vinih, ob hkratni obogatitvi arome s sadnimi, slajšimi notami. Ker pa je to razmeroma nov pristop, še vedno manjkajo obširnejše, pomembnejše študije o celovitem in dolgoročnejšem vplivu na kakovost vin.

ACE

ACE (iz angl. *Accentuated Cut Edges*) je razmeroma nova ekstrakcijska tehnika, pri kateri grozdne kožice razrežemo/razceframo na manjše kose (npr. ~10 % originalne velikosti), ne da bi pri tem poškodovali grozdne pečke (Wang in sod., 2022; Unterkofler in sod., 2020). Cilj vpeljevanja te tehnike je olajšati ekstrakcijo fenolnih spojin iz kožic v mošt s pomočjo zmanjšanja velikosti delčkov jagodne kožice oziroma povečanja odprtih/dostopnih robov jagodnih kožic (Sparrow in sod., 2016). ACE se vključi v vinifikacijo po pecljanju in drozganju, kar pomeni, da spada med predfermentacijske tehnike. Primer opreme, ki jo lahko uporabimo za razrez kožic, je maceracijski pospeševalnik Della Toffola (Wang in sod., 2022). Po ACE je vino načeloma prej pripravljeno za stiskanje, s čimer se lahko prihrani nekaj dragocenega časa v kleti. ACE

namreč skrajša čas potrebnega trajanja stika s kožicami (maceracijski čas), s tem pa skrajša tudi potrebo po potapljanju klobuka in pripomore k boljši učinkovitosti uporabe fermentorja oziroma zmanjšanju stroškov obratovanja.

Raziskave so kmalu pokazale, da ACE pristop lahko izboljša barvne karakteristike (privlačnost in stabilnost barve) v vinih iz grozdja sorte modri pinot in shiraz ob hkratnem povečanju vsebnosti taninov, kar posledično vodi do večjega deleža stabilnejših rdečih barvil v ACE vinih. ACE namreč pospešuje/izboljšuje ekstrakcijo taninov iz grozdnih kožic, ti pa nato reagirajo z antocianini in tvorijo stabilnejša rdeča barvila (Kang in sod., 2020; Unterkofler in sod., 2020; Sparrow in sod., 2016).

Sparrow in sod. (2016) poročajo tudi o boljšem izplenu sadnih not v ACE vinih iz grozdja sorte modri pinot, vendar ob hkratnem povečanju grenkobe (Sparrow in sod., 2016). Na podlagi novejših študij Wang in sod. (2022) poročajo, da pri sorti shiraz ACE ni imel pomembnega vpliva na izplen tiolov oz. njihovih prekurzorjev v mošt, vendar je (kratek) postopek po drugi strani vplival na vsebnost acetatov (znižanje) in višjih alkoholov, maščobnih kislin in izoprenoidov (zvišanje) (Wang in sod., 2022).

V primerjavi z nekaterimi drugimi prodirajočimi novimi tehnikami vpeljava ACE načeloma ne zahteva bistvenih tehnoloških prilagoditev ali velikih investicij, zato ima ob zaznanem potencialu verjetno precej dobre možnosti za vpeljavo v vinarsko prakso.

PEF

Ena izmed novejših netermalnih tehnik, ki se za zdaj preizkuša v eksperimentalnem okolju, je obdelava pridelka s pulzirajočim električnim poljem. PEF temelji na uporabi zelo kratkih električnih impulzov (v območju od μs do ms) pri poljski jakosti več kot $0,5 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$, kar povzroči povečanje prepustnosti celičnih membran. To pojasnjuje potencial PEF za izboljšanje hitrosti maceracijskih procesov, katerih namen je iz grozdja ekstrahirati znotrajcelične komponente, vključno s fenolnimi spojinami (Cholet in sod., 2014; Delsart in sod., 2012). Namen vpeljave PEF je predvsem povečanje ekstrakcije antocianinov/fenolnih spojin pred maceracijo s fermentacijo, takoj po pecljanju in drozganju grozdja, kar pomeni, da gre v bistvu za predfermentacijsko tehniko.

Poleg obetavnih rezultatov glede ekstrakcije fenolnih spojin (Ricci in sod., 2020; Comuzzo in sod., 2020; Delsart in sod., 2014; Delsart in sod., 2012) so raziskave pokazale, da lahko PEF obdelava grozdja poveča koncentracijo aromatičnih prekurzorjev v moštu in vinu (Comuzzo in sod., 2018; Maza in sod., 2019b). Tehnika PEF se zdi zanimiva tudi kot alternativa za mikrobiološko stabilizacijo vin pred stekleničenjem, in to brez spreminjanja sestave vina (Delsart in sod., 2016). Nedavni tehnološki razvoj, zlasti v smislu možnosti uporabe neprekinjenih (kontinuiranih) obdelovalnih komor, obeta več možnosti za implementacijo uporabe tehnologije PEF v vinarski praksi (Feng in sod., 2022).

Druge tehnike v razvoju in preučevanju

V stalnem iskanju izboljšav in inovacij v vinarstvu so v tem trenutku predmet raziskav še nekatere druge tehnike, ki bi teoretično lahko pripomogle k boljšim ekstrakcijskim izidom v smislu uspešnejše in/ali

hitrejše ekstrakcije zelenih komponent grozdja, ne da bi pri tem preveč ogrozile kakovost z vzporednim naraščanjem vsebnosti manj zelenih ali neželenih sestavin pridelka. Nekatere izmed teh preučevanih tehnik so npr. tretiranje z ultrazvokom (sonikacija) (Martínez-Lapuente in sod., 2022), omsko segrevanje (ali tudi t. i. MEF – *Moderate Electric Fields*) (Junqua in sod., 2021) in uporaba mikrovalov (Pérez-Porras in sod., 2021). Za zdaj pridobljeni rezultati, tudi če so teoretično obetavni, pri večini od na novo preučevanih tehnik še ne upravičujejo potrebne reorganizacije zaradi tehnoloških omejitev kleti in/ali povezanih finančnih vložkov v potrebno novo opremo ali energijsko nadgradnjo.

Zato v praksi za zdaj ostajajo še vedno najbolj razširjene in najbolj priljubljene tehnike v pridelavi kakovostnih vin različne podaljšane izpeljanke klasične maceracije s fermentacijo. Seveda je za pridelavo visokokakovostnih maceriranih vin še vedno osnovni pogoj odlična zdravstveno neoporečna surovina primerne tehnološke zrelosti. Nesmiselno je vlagati v zahtevne in drage maceracijske postopke z grozdom, ki že v osnovi nima potrebnega potenciala.

Ne glede na izbrano maceracijsko tehniko je zaradi njenih potencialnih, ne samo kakovostnih, temveč tudi ekonomskih, organizacijskih in logističnih posledic, izredno pomembno zelo dobro poznati in razumeti vse dejavnike, ki vplivajo na učinkovitost izbrane tehnike, zlasti pri sortah, kjer ta praksa še ni utečena ali preizkušena vsaj na manjši skali.

Viri

Aleixandre-Tudo, J. L., & Du Toit, W. (2018). Cold maceration application in red wine production and its effects on phenolic compounds: A review. *LWT*, 95, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.096>

Aleixandre-Tudo, J. L., & Du Toit, W. (2019). Understanding cold maceration in red winemaking: A batch processing and multi-block data analysis approach. *LWT*, 111, 147–157. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.020>

Alti-Palacios, L., Martínez, J., Teixeira, J. A. C., Câmara, J. S., & Perestrelo, R. (2023). Influence of Cold Pre-Fermentation Maceration on the Volatilomic Pattern and Aroma of White Wines. *Foods*, 12(6), 1135. <https://doi.org/10.3390/foods12061135>

Álvarez, I., Aleixandre, J. L., García, M. J., & Lizama, V. (2006). Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 109-115.

Atanacković, M., Petrović, A., Jović, S., Gojković-Bukarica, L., Bursać, M., & Cvejić, J. (2012). Influence of winemaking techniques on the resveratrol content, total phenolic content and antioxidant potential of red wines. *Food Chemistry*, 131(2), 513-518.

Baiano, A., Scrocco, C., Sepielli, G., & Del Nobile, M. A. (2016). Wine Processing: A Critical Review of Physical, Chemical, and Sensory Implications of Innovative Vinification Procedures. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(14), 2391–2407. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.842886>

Bavčar, D., Baša Česnik, H., Čuš, F., & Košmerl, T. (2011). The influence of skin contact during alcoholic fermentation on the aroma composition of Ribolla Gialla and Malvasia Istriana Vitis vinifera (L.) grape wines. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(9), 1801-1808.

Bianchi, A., Santini, G., Piombino, P., Pittari, E., Sanmartin, C., Moio, L., Modesti, M., Bellincontro,

- A., & Mencarelli, F. (2023). Nitrogen maceration of wine grape: An alternative and sustainable technique to carbonic maceration. *Food Chemistry*, 404, 134138. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134138>
- Bindon, K.A.; Kennedy, J.A. Ripening-Induced Changes in Grape Skin Proanthocyanidins Modify Their Interaction with Cell Walls. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 2696–2707, doi:10.1021/jf1047207.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (2013). *Principles and practices of winemaking*. Springer Science & Business Media.
- Budic Leto, I., Gracin, L., Lovric, T., & Vrhovsek, U. (2008). Effects of maceration conditions on the polyphenolic composition of red wine Plavac mali. *Vitis*, 47(4), 245-250.
- Budić-Leto, I., Lovrić, T., Kljusurić, J. G., Pezo, I., & Vrhovšek, U. (2006). Anthocyanin composition of the red wine Babić affected by maceration treatment. *European Food Research and Technology*, 222(3–4), 397–402. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0067-1>
- Budić-Leto, I., Lovrić, T., Pezo, I., & Gajdoš Kljusurić, J. (2005). Study of dynamics of polyphenol extraction during traditional and advanced maceration processes of the Babić grape variety. *Food technology and biotechnology*, 43(1), 47-53.
- Busse-Valverde, N., Bautista-Ortín, A. B., Gómez-Plaza, E., Fernández-Fernández, J. I., & Gil-Muñoz, R. (2012). Influence of skin maceration time on the proanthocyanidin content of red wines. *European Food Research and Technology*, 235(6), 1117–1123. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1842-4>
- Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Gil-Muñoz, R., & Bautista-Ortín, A. B. (2011). The Extraction of Anthocyanins and Proanthocyanidins from Grapes to Wine during Fermentative Maceration Is Affected by the Enological Technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5450–5455. <https://doi.org/10.1021/jf2002188>
- Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Gil-Muñoz, R., Fernández-Fernández, J. I., & Bautista-Ortín, A. B. (2010). Effect of Different Enological Practices on Skin and Seed Proanthocyanidins in Three Varietal Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21), 11333–11339. <https://doi.org/10.1021/jf102265c>
- Cai, J., Zhu, B.-Q., Wang, Y.-H., Lu, L., Lan, Y.-B., Reeves, M. J., & Duan, C.-Q. (2014). Influence of pre-fermentation cold maceration treatment on aroma compounds of Cabernet Sauvignon wines fermented in different industrial scale fermenters. *Food Chemistry*, 154, 217–229. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.003>
- Caillé, S., Samson, A., Wirth, J., Diéval, J.-B., Vidal, S., & Cheynier, V. (2010). Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pre and post bottling. *Analytica Chimica Acta*, 660(1–2), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.049>
- Carillo, M., Formato, A., Fabiani, A., Scaglione, G., & Pucillo, G. P. (2011). An inertizing and cooling process for grapes cryomaceration. *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(6), 8-8.
- Casassa, L. F., & Harbertson, J. F. (2014). Extraction, Evolution, and Sensory Impact of Phenolic Compounds During Red Wine Maceration. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), 83–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092438>
- Casassa, L. F., Huff, R., & Steele, N. B. (2019). Chemical consequences of extended maceration and post-fermentation additions of grape pomace in Pinot noir and Zinfandel wines from the Central Coast of California (USA). *Food Chemistry*, 300, 125147. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125147>

Casassa, L. F., Larsen, R. C., Beaver, C. W., Mireles, M. S., Keller, M., Riley, W. R., ... & Harbertson, J. F. (2013a). Impact of extended maceration and regulated deficit irrigation (RDI) in Cabernet Sauvignon wines: characterization of proanthocyanidin distribution, anthocyanin extraction, and chromatic properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(26), 6446-6457.

Casassa, L.F., Beaver, C. W., Mireles, M. S., & Harbertson, J. F. (2013b). Effect of extended maceration and ethanol concentration on the extraction and evolution of phenolics, colour components and sensory attributes of Merlot wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19(1), 25-39.

Casassa, L. F., & Sari, S. E. (2015). Sensory and chemical effects of two alternatives of prefermentative cold soak in Malbec wines during winemaking and bottle ageing. *International Journal of Food Science & Technology*, 50(4), 1044–1055. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12572>

Cejudo-Bastante, M. J., Gordillo, B., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M. L., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2014). Effect of the time of cold maceration on the evolution of phenolic compounds and colour of Syrah wines elaborated in warm climate. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(8), 1886–1892. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12523>

Cerpa-Calderón, F. K., & Kennedy, J. A. (2008). Berry Integrity and Extraction of Skin and Seed Proanthocyanidins during Red Wine Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9006–9014. <https://doi.org/10.1021/jf801384v>

Chiaromonti, N., Balbi, N., & Khoumeri, B. (1999). Influence of the vinification mode on the phenolic content of red wines of Niellucciu [Corsica]. *Rivista di Scienza dell'Alimentazione (Italy)*, 28(4).

Cholet, C., Delsart, C., Petrel, M., Gontier, E., Grimi, N., L'Hyvernay, A., Ghidossi, R., Vorobiev, E., Mietton-Peuchot, M., & Géný, L. (2014). Structural and Biochemical Changes Induced by Pulsed Electric Field Treatments on Cabernet Sauvignon Grape Berry Skins: Impact on Cell Wall Total Tannins and Polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(13), 2925–2934. <https://doi.org/10.1021/jf404804d>

Coletta, A., Trani, A., Faccia, M., Punzi, R., Dipalmo, T., Crupi, P., Antonacci, D., & Gambacorta, G. (2013). Influence of viticultural practices and winemaking technologies on phenolic composition and sensory characteristics of Negroamaro red wines. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(11), 2215–2227. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12207>

Comuzzo, P., Marconi, M., Zanella, G., & Querez, M. (2018). Pulsed electric field processing of white grapes (cv. Garganega): Effects on wine composition and volatile compounds. *Food Chemistry*, 264, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.116>

Comuzzo, P., Voce, S., Grazioli, C., Tubaro, F., Marconi, M., Zanella, G., & Querez, M. (2020). Pulsed Electric Field Processing of Red Grapes (cv. Rondinella): Modifications of Phenolic Fraction and Effects on Wine Evolution. *Foods*, 9(4), 414. <https://doi.org/10.3390/foods9040414>

Cosme, F., Pinto, T., & Vilela, A. (2018). Phenolic Compounds and Antioxidant Activity in Grape Juices: A Chemical and Sensory View. *Beverages*, 4(1), 22. <https://doi.org/10.3390/beverages4010022>

De Beer, D., Joubert, E., Marais, J., & Manley, M. (2006). Maceration before and during fermentation: Effect on Pinotage wine phenolic composition, total antioxidant capacity and objective colour parameters. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(2), 137-150.

Delsart, C., Cholet, C., Ghidossi, R., Grimi, N., Gontier, E., Géný, L., Vorobiev, E., & Mietton-

Peuchot, M. (2014). Effects of Pulsed Electric Fields on Cabernet Sauvignon Grape Berries and on the Characteristics of Wines. *Food and Bioprocess Technology*, 7(2), 424–436. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-1039-7>

Delsart, C., Ghidossi, R., Poupot, C., Cholet, C., Grimi, N., Vorobiev, E., Milisic, V., & Mietton Peuchot, M. (2012). Enhanced Extraction of Phenolic Compounds from Merlot Grapes by Pulsed Electric Field Treatment. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(2), 205–211. <https://doi.org/10.5344/ajev.2012.11088>

Delsart, C., Grimi, N., Boussetta, N., Miot Sertier, C., Ghidossi, R., Vorobiev, E., & Mietton Peuchot, M. (2016). Impact of pulsed-electric field and high-voltage electrical discharges on red wine microbial stabilization and quality characteristics. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 152–164. <https://doi.org/10.1111/jam.12981>

De Santis, D., & Frangipane, M. T. (2010). Effect of prefermentative cold maceration on the aroma and phenolic profiles of a Merlot red wine. *Italian Journal of Food Science*, 22(1), 47.

Doco, T., Williams, P., & Cheynier, V. (2007). Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6643–6649.

Dos Santos Lima, M., Dutra, M. D. C. P., Toaldo, I. M., Corrêa, L. C., Pereira, G. E., de Oliveira, D., ... & Ninow, J. L. (2015). Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration. *Food Chemistry*, 188, 384–392.

Enoviti (2017). Pridobljeno s strani <https://enoviti-hanumangirl.blogspot.com/2017/01/phenolics-location-and-attributes-in.html>, 29.09.2024

Favre, G., Peña-Neira, Á., Baldi, C., Hernández, N., Traverso, S., Gil, G., & González-Neves, G. (2014). Low molecular-weight phenols in Tannat wines made by alternative winemaking procedures. *Food Chemistry*, 158, 504–512. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.173>

Feng, Y., Yang, T., Zhang, Y., Zhang, A., Gai, L., & Niu, D. (2022). Potential applications of pulsed electric field in the fermented wine industry. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1048632. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1048632>

Ford, C., & Joscelyne, V. (2006). The outcomes of extended maceration in red winemaking: winemakers' perspectives. *Australian and New Zealand grapegrower and winemaker*, (509), 50–54.

Fretté, X. C., Hansen, J. H., Raasthøj, J. C., Broe, J., & Christensen, L. P. (2012). Content of selected phenolic compounds in wine from rondo grapes grown in Denmark and effect of heat and cryomaceration. *Planta Medica*, 78(11), PJ150.

Frost, S. C., Blackman, J. W., Hjelmeland, A. K., Ebeler, S. E., & Heymann, H. (2018). Extended maceration and cap management impacts on the phenolic, volatile, and sensory profiles of Merlot wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 69(4), 360–370.

Gawel, R. (1998). Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4(2), 74–95.

Gil, M., Kontoudakis, N., González, E., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2012). Influence of grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7988–8001.

Gil-Muñoz, R., Moreno-Pérez, A., Vila-López, R., Fernández-Fernández, J. I., Martínez-Cutillas, A., & Gómez-Plaza, E. (2009). Influence of low temperature prefermentative techniques on chromatic and phenolic characteristics of Syrah and Cabernet Sauvignon wines. *European Food Research and Technology*, 228, 777-788.

Girard, B., in sod. "Vinification effects on the sensory, colour and GC profiles of Pinot noir wines from British Columbia." *Food Research International* 34.6 (2001): 483-499.

Gómez-Míguez, M., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2007). Evolution of colour and anthocyanin composition of Syrah wines elaborated with pre-fermentative cold maceration. *Journal of Food Engineering*, 79(1), 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.01.054>

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

González-Arenzana, L., Santamaría, R., Escribano-Viana, R., Portu, J., Garijo, P., López-Alfaro, I., López, R., Santamaría, P., & Gutiérrez, A. R. (2020). Influence of the carbonic maceration winemaking method on the physicochemical, colour, aromatic and microbiological features of tempranillo red wines. *Food Chemistry*, 319, 126569. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126569>

González-Neves, G., Favre, G., Gil, G., Ferrer, M., & Charamelo, D. (2014). Effect of cold pre-fermentative maceration on the color and composition of young red wines cv. Tannat. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1410-y>

González-Neves, G., Gil, G., Favre, G., & Ferrer, M. (2012). Influence of grape composition and winemaking on the anthocyanin composition of red wines of Tannat. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(5), 900–909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02920.x>

González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (2004). Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 283-289.

He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C.-Q. (2012). Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. *Molecules*, 17(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/molecules17021571>

Joscelyne, V. L. (2009). Consequences of extended maceration for red wine colour and phenolics (Doctoral dissertation).

Junqua, R., Carullo, D., Ferrari, G., Pataro, G., & Ghidossi, R. (2021). Ohmic heating for polyphenol extraction from grape berries: An innovative prefermentary process. *OENO One*, 55(3), 39–51. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.3.4647>

Kang, W., Bindon, K. A., Wang, X., Muhlack, R. A., Smith, P. A., Niimi, J., & Bastian, S. E. (2020). Chemical and sensory impacts of Accentuated Cut Edges (ACE) grape must polyphenol extraction technique on Shiraz wines. *Foods*, 9(8), 1027.

Kelebek, H., Canbas, A., & Selli, S. (2009). Effects of different maceration times and pectolytic enzyme addition on the anthocyanin composition of Vitis vinifera cv. Kalecik karasi wines. *Journal of food processing and preservation*, 33(3), 296-311.

Kennedy, J. A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(2). <https://doi.org/10.4067/S0718-16202008000200001>

Lasanta, C., Cejudo, C., Gómez, J., & Caro, I. (2023). Influence of Prefermentative Cold Maceration on the Chemical and Sensory Properties of Red Wines Produced in Warm Climates. *Processes*, 11(2), 374. <https://doi.org/10.3390/pr11020374>

Lisjak, K.; Lelova, Z.; Žigon, U.; Bolta, Š.V.; Teissedre, P.; Vanzo, A. Effect of Extraction Time on Content, Composition and Sensory Perception of Proanthocyanidins in Wine-like Medium and during Industrial Fermentation of Cabernet Sauvignon. *J Sci Food Agric* 2020, 100, 1887–1896, doi:10.1002/jsfa.10189.

Lorenzo, C., Pardo, 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. <https://doi.org/10.1021/jf050848c>

Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Pérez-Porras, P., Bautista-Ortín, A. B., & Gómez-Plaza, E. (2022). Effects of combining high power ultrasound and enological enzymes on the composition of polysaccharides in red wine. *LWT*, 170, 114060. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114060>

Maza, M., Álvarez, I., & Raso, J. (2019a). Thermal and Non-Thermal Physical Methods for Improving Polyphenol Extraction in Red Winemaking. *Beverages*, 5(3), 47. <https://doi.org/10.3390/beverages5030047>

Maza, M. A., Martínez, J. M., Hernández-Orte, P., Cebrián, G., Sánchez-Gimeno, A. C., Álvarez, I., & Raso, J. (2019b). Influence of pulsed electric fields on aroma and polyphenolic compounds of Garnacha wine. *Food and Bioprocess Processing*, 116, 249–257. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.06.005>

Mazza, M., & Ford, C. (2005). Unravelling the outcomes of extended maceration in red winemaking. *The Australian & New Zealand Grapegrower and Winemaker*, (497a), 56.

Mc Mahon, H. M., Zoecklein, B. W., & Jasinski, Y. W. (1999). The effects of prefermentation maceration temperature and percent alcohol (v/v) at press on the concentration of Cabernet Sauvignon grape glycosides and glycoside fractions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(4), 385–390.

Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., & Carrau, F. (2005). Yeast Interactions with Anthocyanins during Red Wine Fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(2), 104–109. <https://doi.org/10.5344/ajev.2005.56.2.104>

Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Updated Knowledge About the Presence of Phenolic Compounds in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(2), 85–118. <https://doi.org/10.1080/10408690490911710>

Morata, A. (Ed.). (2018). *Red wine technology*. Academic Press

Morata, A. (Ed.). (2019). *Red wine technology*. Academic press.

Morel-Salmi, C., Souquet, J.-M., Bes, M., & Cheynier, V. (2006). Effect of Flash Release Treatment on Phenolic Extraction and Wine Composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4270–4276. <https://doi.org/10.1021/jf053153k>

Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (Eds.). (2009). *Wine chemistry and biochemistry* (Vol. 735, p. 975). New York, NY, USA:: Springer.

Moreno-Pérez, A., Fernández-Fernández, J. I., Bautista-Ortín, A. B., Gómez-Plaza, E., Martínez-Cutillas, A., & Gil-Muñoz, R. (2013). Influence of winemaking techniques on proanthocyanidin

extraction in Monastrell wines from four different areas. *European Food Research and Technology*, 236(3), 473–481. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1899-0>

Naviglio, D., Formato, A., Scaglione, G., Montesano, D., Pellegrino, A., Villecco, F., & Gallo, M. (2018). Study of the grape cryo-maceration process at different temperatures. *Foods*, 7(7), 107.

Nel, A. P., van Rensburg, P., & Lambrechts, M. G. (2014). The influence of different winemaking techniques on the extraction of grape tannins and anthocyanins. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35(2), 304–320.

Nordestgaard, S. (2017). Fermentation: Pre-fermentation heating of red grapes: A useful tool to manage compressed vintages?. *Australian and New Zealand Grapegrower and Winemaker*, (637), 54–61.

Ntuli, R. G., Saltman, Y., Ponangi, R., Jeffery, D. W., Bindon, K., & Wilkinson, K. L. (2023). Impact of skin contact time, oak and tannin addition on the chemical composition, color stability and sensory profile of Merlot wines made from flash détente treatment. *Food Chemistry*, 405, 134849.

Ntuli, R. G., Saltman, Y., Ponangi, R., Jeffery, D. W., Bindon, K., & Wilkinson, K. L. (2022). Impact of fermentation temperature and grape solids content on the chemical composition and sensory profiles of Cabernet Sauvignon wines made from flash détente treated must fermented off-skins. *Food Chemistry*, 369, 130861.

Ortega-Heras, M., Pérez-Magariño, S., & González-Sanjosé, M. L. (2012). Comparative study of the use of maceration enzymes and cold pre-fermentative maceration on phenolic and anthocyanic composition and colour of a Mencía red wine. *LWT – Food Science and Technology*, 48(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.03.012>

Panprivech, S., Lerno, L. A., Brenneman, C. A., Block, D. E., & Oberholster, A. (2015). Investigating the Effect of Cold Soak Duration on Phenolic Extraction during Cabernet Sauvignon Fermentation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(5), 7974–7989. <https://doi.org/10.3390/molecules20057974>

Parenti, A., Spugnoli, P., Calamai, L., Ferrari, S., & Gori, C. (2004). Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *European Food Research and Technology*, 218(4), 360–366. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0866-1>

Pérez-Porras, P., Gómez-Plaza, E., Muñoz García, R., Díaz-Maroto, M. C., Moreno-Olivares, J. D., & Bautista-Ortín, A. B. (2022). Prefermentative Grape Microwave Treatment as a Tool for Increasing Red Wine Phenolic Content and Reduce Maceration Time. *Applied Sciences*, 12(16), 8164. <https://doi.org/10.3390/app12168164>

Petrozziello, M., Guaita, M., Motta, S., Panero, L., & Bosso, A. (2011). Analytical and Sensory Characterization of the Aroma of “Langhe D.O.C. Nebbiolo” Wines: Influence of the Prefermentative Cold Maceration with Dry Ice. *Journal of Food Science*, 76(4). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02145.x>

Pettinelli, S., Pardini, L., De Angeli, G., Bianchi, A., Najar, B., Cerreta, R., Bellincontro, A., Floridia, G., & Mencarelli, F. (2022). Innovative “Soft” Maceration Techniques in Red Grape Fermentation. *Beverages*, 8(4), 62. <https://doi.org/10.3390/beverages8040062>

Piombino, P., Genovese, A., Gambuti, A., Lamorte, S. A., Lisanti, M. T., & Moio, L. (2010). Effects of off-vine bunches shading and cryomaceration on free and glycosylated flavours of Malvasia delle Lipari wine. *International journal of food science & technology*, 45(2), 234–244.

Radeka, S., Eukic, I., & Peršuric, D. (2012). Influence of different maceration treatments on the aroma profile of rose and red wines from Croatian aromatic cv. Muškat Ruža Porečki (*Vitis vinifera* L.). *Food technology and biotechnology*, 50(4), 442.

Radeka, S., Bestulić, E., Rossi, S., Orbanić, F., Bubola, M., Plavša, T., ... & Jeromel, A. (2023). Effect of different vinification techniques on the concentration of volatile aroma compounds and sensory profile of Malvazija istarska wines. *Fermentation*, 9(7), 676.

Razungles, A. (2022). Extraction technologies and wine quality. In *Managing Wine Quality* (pp. 3-41). In Reynolds, A. G. (Ed.). (2022). *Oenology and wine quality* (Edition 2). Woodhead Publishing.

Rentzsch, M., Schwarz, M., & Winterhalter, P. (2007). Pyranoanthocyanins—an overview on structures, occurrence, and pathways of formation. *Trends in Food Science & Technology*, 18(10), 526-534.

Reynolds, A., Cliff, M., Girard, B., & Kopp, T. G. (2001). Influence of fermentation temperature on composition and sensory properties of Semillon and Shiraz wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(3), 235-240.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2021). Handbook of Enology, volume 2: The chemistry of wine stabilization and treatments. John Wiley & Sons.

Ricci, A., Parpinello, G., & Versari, A. (2018). Recent Advances and Applications of Pulsed Electric Fields (PEF) to Improve Polyphenol Extraction and Color Release during Red Winemaking. *Beverages*, 4(1), 18. <https://doi.org/10.3390/beverages4010018>

Roldán, A.M.; Sánchez-García, F.; Pérez-Rodríguez, L.; Palacios, V.M. Influence of Different Vinification Techniques on Volatile Compounds and the Aromatic Profile of Palomino Fino Wines. *Foods* **2021**, 10, 453, doi:10.3390/foods10020453.

Romero-Cascales, I., Fernández-Fernández, J. I., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2005). The maceration process during winemaking extraction of anthocyanins from grape skins into wine. *European Food Research and Technology*, 221(1–2), 163–167. <https://doi.org/10.1007/s00217-005-1144-1>

Ruiz-Rodríguez, A., Durán-Guerrero, E., Natera, R., Palma, M., & Barroso, C. G. (2020). Influence of Two Different Cryoextraction Procedures on the Quality of Wine Produced from Muscat Grapes. *Foods*, 9(11), 1529. <https://doi.org/10.3390/foods9111529>

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. <https://doi.org/10.5344/ajev.2005.56.3.197>

Salinas, M. R., Garijo, J., Pardo, F., Zalacain, A., & Alonso, G. L. (2003). Color, Polyphenol, and Aroma Compounds in Rosé Wines after Prefermentative Maceration and Enzymatic Treatments. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(3), 195–202. <https://doi.org/10.5344/ajev.2003.54.3.195>

Samoticha, J., Wojdyło, A., Chmielewska, J., & Oszmiański, J. (2017). The effects of flash release conditions on the phenolic compounds and antioxidant activity of Pinot noir red wine. *European Food Research and Technology*, 243, 999-1007.

Schmid, F., Schadt, J., Jiranek, V., & Block, D. E. (2009). Formation of temperature gradients in large- and small-scale red wine fermentations during cap management. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(3), 249–255. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00053.x>

Schmid, F., & Jiranek, V. (2011). Use of fresh versus frozen or blast-frozen grapes for small-scale fermentation. *International Journal of Wine Research*, 25-30. <https://doi.org/10.2147/IJWR.S23325>

Şener, H. (2018). Effect of Temperature and Duration of Maceration on Colour and Sensory Properties of Red Wine: A Review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 32(2). <https://doi.org/10.21548/39-2-3160>

Setford, P. C., Jeffery, D. W., Grbin, P. R., & Muhlack, R. A. (2017). Factors affecting extraction and evolution of phenolic compounds during red wine maceration and the role of process modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.005>

Sparrow, A. M., Holt, H. E., Pearson, W., Dambergs, R. G., & Close, D. C. (2016). Accentuated Cut Edges (ACE): Effects of Skin Fragmentation on the Composition and Sensory Attributes of Pinot noir Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67(2), 169–178. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.15094>

Spranger, IM., Cristina Clímaco, M., Sun, B., Eiriz, N., Fortunato, C., Nunes, A., Conceição Leandro, M., Luísa Avelar, M., & Pedro Belchior, A. (2004). Differentiation of red winemaking technologies by phenolic and volatile composition. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.01.023>

Sternad Lemut, M., Trost, K., Sivilotti, P., Arapitsas, P., & Vrhovsek, U. (2013). Early *versus* late leaf removal strategies for Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.): Effect on colour-related phenolics in young wines following alcoholic fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15), 3670–3681. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6193>

Tesniere, C., & Flanzy, C. (2011). Carbonic Maceration Wines. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 63, pp. 1–15). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384927-4.00001-4>

Tong, W., Zhai, H., Qi, M., Hua, Y., Shi, T., Shang, H., Shi, Y., Duan, C., & Lan, Y. (2024). Characterization of chemical and sensory properties of Cabernet Sauvignon and Marselan wines made by flash détente technique. *Food Research International*, 184, 114229. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114229>

Unterkofler, J., Muhlack, R. A., & Jeffery, D. W. (2020). Processes and purposes of extraction of grape components during winemaking: Current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4737–4755. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10558-3>

Vrhovsek, U., Vanzo, A., & Nemanic, J. (2002). Effect of red wine maceration techniques on oligomeric and polymeric proanthocyanidins in wine, cv. Blaufrankisch. *VITIS-GEILWEILERHOF*, 41(1), 47-52.

Wang, X., Capone, D. L., Kang, W., Roland, A., & Jeffery, D. W. (2022). Impact of accentuated cut edges (ACE) technique on volatile and sensory profiles of Shiraz wines. *Food Chemistry*, 372, 131222.

Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., & Jeffery, D. W. (2016). *Understanding Wine Chemistry* (1st ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118730720>

WatreLOT, A. A., & Norton, E. L. (2020). Chemistry and reactivity of tannins in *Vitis* spp.: A review. *Molecules*, 25(9), 2110.

Werner, M., Rauhut, D., & Cottureau, P. (2009). Yeasts and natural production of sulphites. *Int. J. Enol. Vitic*, 12, 1-5.

Vinsonneau, E., Escaffre, P., Crachereau, J. C., & Praud, S. (2006). Evaluation du Procédé de Vinification par “Flash Détente” Dans le Bordelais. *ITV France Bordeaux: Blanquefort, France*.

Zimman, A., Joslin, W. S., Lyon, M. L., Meier, J., & Waterhouse, A. L. (2002). Maceration Variables Affecting Phenolic Composition in Commercial-scale Cabernet Sauvignon Winemaking Trials. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53(2), 93–98. <https://doi.org/10.5344/ajev.2002.53.2.93>

8.

MODERNA ENOLOGIJA V PRIDELAVI BELIH IN RDEČIH VIN

Guillaume Antalick in Melita Sternad Lemut

Center za raziskave vina, Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo, Univerza v Novi Gorici, Glavni trg 8,
Vipava
guillaume.antalick@ung.si

Uvod

Vsak tip vina lahko pridelamo v skladu s številnimi protokoli, ki jih narekujeta ciljni stil vina in filozofija vinarja. Pri tem so zelo pomembni razlogi za vinarjeve odločitve o strategiji. Protokol pridelave vina mora biti seveda prilagojen cilju pridelave, pa tudi vinskemu trgu. Dandanes potrošniki zaužijejo manj vina, vendar iščejo bolj kakovostna, z manj posegi v pridelovalnem postopku in večjo transparentnostjo, zlasti v Evropski uniji z novo obveznostjo zagotavljanja seznama sestavin vina. Na splošno lahko s filozofskega vidika razlikujemo dva glavna tipa vin. Tehnološka vina, ki izražajo standardiziran okus na podlagi sorte in tehnologije, ter vina z geografskim poreklom (ali t. i. terroir vina), katerih cilj je prenašati specifičen okus okolja, iz katerega vino izvira. Prvi pristop je bolj interventen kot drugi, vendar je pri obeh zelo pomembno ustrezno znanje za obvladovanje glavnih korakov v pridelavi vina. Kako pomembno je poglobljeno znanje vinarstva ne glede na filozofijo vinarja, lepo povzema Jamie Goode v svoji knjigi (Goode, 2021). V tem poglavju opisujemo glavne korake pridelave belih in rdečih vin. Za lažje razumevanje teh vsebin posebej priporočamo branje podpoglavja o pravilni izbiri datuma trgatve in vplivu tega na stil vina.

Bela vina

Kakovost grozdja in trgatev

Pri določanju protokola pridelave vina, ki bo privedel do izbranega stila vina, je ključna kakovost grozdja. Grozdje višje kakovosti daje vinarju več možnosti za izbiro specifičnega stila vina, od svežih in enostavnih za pitje do kompleksnih stilov ter od tehnoloških vin do vin s posebnim značajem terroirja. Po drugi strani

bo grozdje nižje kakovosti na splošno primerno le za tehnološka vina, pridelana v svežem slogu z manj kompleksnosti. Prav tako ne smemo pozabiti, da bo slabša kakovost grozdja pogojevala več tehnoloških posegov in s tem več stroškov pridelave v kleti.

Mnogi slovenski vinarji razumejo kakovost grozdja predvsem v smislu zdravstvenega stanja grozdja ob trgatvi. Tako bo sortiranje v vinogradu in kleti pripomoglo k izboljšanju povprečne kakovosti pridelanega grozdja. Vendar je treba pred odločitvijo o protokolu pridelave vina upoštevati še druge pomembne parametre, ki vplivajo na kakovost grozdja. Pri odločanju so pomembni tudi izvor grozdja (lokacija, tla, mikroklima), razmere v vinogradu (vinogradniške prakse, pridelek, starost trt) in zrelost grozdja.

Še posebej pomembna je odločitev glede datuma trgatve, saj je to zadnji korak, na katerega lahko vinogradnik vpliva pri oblikovanju končne kakovosti grozdja. Bolj ko kakovost grozdja za izbrani stil vina odstopa od parametrov optimalne zrelosti, bolj so potrebni dodatni posegi v kleti.

Pri belih vinih je treba upoštevati predvsem tehnološko (sladkor/kislino) in aromatično zrelost. Pri belih vinih s podaljšano maceracijo drozge grozdja (v tem poglavju niso obravnavana) in rdečih vinih pa je pomembnejša fenolna zrelost.

Za določanje tehnološke zrelosti je treba spremljati parametre, kot so koncentracija sladkorja, pH in skupne kisline. Pri belih vinih je zanimivo tudi razmerje med vinsko in jabolčno kislino, ki daje informacijo o prevladujočem tipu kislin. Za sveža bela vina je bolje stremeti k zmerni stopnji alkohola (12–13 vol. % alkohola ali 78–88 °Oe sladkorja) in konkretno stopnjo kislosti (pH 3,1–3,4; skupne titrabilne kisline (TA) 5–7 g/L). Za kompleksna bela vina pa se pričakuje polnejše telo, kar ne pomeni nujno višje ravni alkohola, in uravnotežena, zaokrožena raven kislin. Pri tem je zelo pomembno poreklo grozdja, ki vpliva tudi na optimalno časovno okno trgatve. Da bi se izognili prenizki ali previsoki zrelosti, je treba odločitev prilagoditi podnebnim razmeram letnika (hladno ali toplo/vroče). Za doseganje tega ravnovesja je lahko koristno spremljanje sinteze oz. kopičenja sladkorja v grozdnih jagodah, kot je opisano v podpoglavju *Kako izberemo pravi datum trgatve*. Pravzaprav je bil ta koncept nedavno razvit ravno za ocenjevanje aromatične zrelosti grozdja (Antalick in sod., 2023).

Običajno vinogradniki ocenjujejo aromatično zrelost z okušanjem jagod, kar je lahko subjektivno, saj zahteva izkušnje in je zelo odvisno od okuševalca. Nasprotno pa je spremljanje kopičenja sladkorja v jagodah trenutno edino objektivno merilo, ki lahko pomaga oceniti aromatično zrelost grozdja. Čeprav je bilo razvito predvsem za rdeča vina, je uporabno tudi pri belih.

V Sloveniji se večina trgatav opravi ročno, tako zaradi velikosti vinskih kleti kot tudi zaradi topografije vinogradov, ki otežuje strojno obiranje. Z ročnim obiranjem v majhne zabožke se nekoliko zmanjša nevarnost poškodb grozdnih jagod pred predelavo, izboljša pa se tudi možnost sortiranja v vinogradu. Kljub temu je kakovost strojne trgatve danes primerljiva s tisto, ki jo je mogoče doseči z ročnim obiranjem grozdja za tehnološka bela vina.

Za bela vina je priporočljiva predelava hladnega grozdja, da se omeji oksidacija grozdnega mošta pred fermentacijo in ohrani sadni značaj. To lahko dosežemo s trganjem grozdja, ko je zunanja temperatura nizka (zgodaj zjutraj), ali z ohlajanjem grozdja pred predelavo.

Postopki obdelave grozdja pred fermentacijo

Sprejem grozdja in stiskanje

Ob sprejemu grozdja v klet se grozdje pred stiskanjem bodisi razpeclja in zdrozga bodisi se neposredno stisnejo celi grozdi. Pri pecljanju in drozganju lahko stiskalnico napolnimo z več drozge, in sicer celo 30 % več v primerjavi z neposrednim stiskanjem. To je velika prednost z logističnega vidika. Glavno tveganje te strategije pa je, da se s trenjem in mehanskim poseganjem spodbudita oksidacija mošta in ekstrakcija fenolov. Fenolne snovi so nezaželeni za sveža bela vina, ker lahko negativno vplivajo na svežo sadno aromo in povzročijo grenkobo. Mletje (pecljanje in drozganje) lahko povzroči tudi zviševanje vrednosti pH in zniževanje kislinske stopnje. Nasprotno pa pri pridelavi kompleksnejših belih vin vinarji včasih stremijo k nekaj več fenolnih snovi (predvsem taninov in hidroksicimetnih kislin iz kožic), ki lahko doprinesejo k teksturi, in sicer bolj pri nekaterih aromatičnih kot nevtralnih sortah. V takem primeru sta lahko primerna mletje in kratka hladna maceracija (od 4 do 12 ur pri 10–12 °C), nujno pa je uporabiti grozdje visoke kakovosti in predelavo kombinirati z daljšim zorenjem na drožeh po fermentaciji, da tako uravnovesimo ostrino izluženih fenolov.

Vinar mora biti zelo pozoren tudi na spremembe vrednosti pH, ki se med hladno maceracijo v nekaterih letnikih lahko hitro zvišajo. Za sorte, podvržene oksidaciji mošta, kot je sauvignon, se med tem postopkom priporoča tudi uporaba suhega ledu.

Po drugi strani je neposredno stiskanje grozdja s kakovostnega vidika najboljša izbira za pridelavo svežih belih vin, saj se tako bolje ohrani sveža sadna aroma. Glavne prednosti so omejitev mehanskega trenja in oksidacije, boljše ohranjanje kislosti, izboljšanje izplena stiskanja (boljša ekstrakcija mošta) ter izboljšanje lastnosti sesedanja ob bistrenju mošta in stabilizacije vina na beljakovine. Bela vina, pridelana z neposrednim stiskanjem, imajo pogosto bolj prefinjen aromatični profil in zahtevajo manj posegov v kleti. Zato se stiskanje celih grozdov priporoča tudi za kompleksnejša bela vina. Glavna težava je daljši postopek stiskanja zaradi manjše zmogljivosti glede obremenitve stiskalnice.

S stiskanjem se iz grozdja iztisne grozdni sok (mošt) za nadaljnjo fermentacijo brez prisotnosti jagodnih kožic. Ločimo dva tipa mošta: samotok, ki se sprosti iz grozdja pod vplivom lastne teže kupa grozdov, preden se mehansko stisnejo; in prešanec, ki je mošt, pridobljen po stiskanju. Za končno kakovost belih vin je zelo pomembno previdno, ne premočno stiskanje. Vinar se namreč načeloma želi izogniti zelenemu in zeliščnemu značaju ter preveliki količini fenolov, ki lahko pripomorejo k oksidaciji mošta in povzročajo grenkobo. Hkrati pa želi ohraniti kislost in svežino mošta.

Da bi dosegli te cilje, se priporočajo prakse, ki zmanjšujejo trenje tropin, npr. uporaba enakomernega gradienta tlaka in izogibanje prepogostim prevelikim nihanjem tlaka med stiskanjem. Pogosto se priporoča uporaba plinov ali suhega ledu, da zaščitimo stiskalnico oz. mošt v njej pred oksidacijo (hiperreduktivna tehnika pridelave). Takšna vina imajo praviloma bolj izražene sortne note, lahko so manj polna, bolj sveža, včasih se lahko zaznajo reduktivni vonji. Potreba po omejevanju oksidacije mošta je odvisna od sorte. Med tehnikami za odstranjevanje nekaterih pomembnih fenolov pred fermentacijo je tudi hiperoksidacija mošta. Vpliv te tehnike na senzorični profil belih vin je pomemben (Gawel in sod., 2014). Hiperoksidacija povzroči oksidacijo fenolnih spojin. Pomembno je, da se med tem postopkom ne uporablja SO₂, saj bi

zaviral delovanje encima polifenoloksidaze (PPO). Vina, pridobljena na ta način, so manj trpka, vendar se izgubi sortna cvetlična aroma. Hiperoksidacija se najpogosteje uporablja v predfermentacijski fazi pri pridelavi vin iz nevtrálnih sort, kot je npr. chardonnay.

Dodajanje žvepla med stiskanjem zaščiti sveže stisnjeni mošt pred oksidacijo. Odmerek je odvisen od zdravstvenega stanja grozdja in strategije fermentacije. Pri zdravem grozdju zadostuje dodatek 5 g/hL za zaviranje delovanja encima polifenoloksidaze (ki je odgovoren za oksidacijo mošta), hkrati pa ne zavira razvoja kakovostnih avtohtonih kvasovk, če želimo doseči spontano fermentacijo. Pri manj zdravem pridelku lahko odmerek povečamo na 8–10 g/hL. Za žveplanje v vinarstvu najpogosteje uporabljamo raztopino bisulfitá in metabisulfitá.

Ne nazadnje lahko uporabimo tudi pektolitične encime za povečanje frakcije samotoka in frakcije mošta prvega stiskanja (prvi prešanec) ob hkratni omejitvi neželenih mehanskih poškodb drozge. To nam lahko pomaga skrajšati trajanje stiskanja in zmanjšati število ciklov stiskanja. Pektolitični encimi so koristni tudi za bistrenje mošta pred fermentacijo.

Bistrenje mošta

Bistrenje je namenjeno odstranjevanju najgostejših usedlin mošta po stiskanju in pred fermentacijo. Ta korak bi moral biti v pridelavo belih vin vedno vključen, saj z njim optimiziramo učinkovitost fermentacije in aromatični profil ter preprečujemo nastanek neželenih arom, zlasti reduktivnih. Za ustvarjanje svežega in sadnega stila belega vina je priporočljivo, da se bistri do zmerne ali nizke stopnje motnosti (50–100 NTU) (NTU, enota za merjenje motnosti – iz angl. *Nephelometric Turbidity Unit*). Pri kompleksnejših vinih stremimo k zmerni motnosti (150–250 NTU). Mošti z visoko motnostjo (>300 NTU) se lahko nagibajo k tvorbi težkih, zelenih in reduktivnih vonjev vina. Dobro si je zapomniti, da nizka motnost pomeni tudi manj hranil za kvasovke in da je v takem primeru dodajanje hranil pogosto obvezno, da se izognemo prepočasni ali zaustavljeni fermentaciji in pridobimo čiste sveže sadne arome. Delo pri zelo nizki motnosti je tvegano tudi z vidika tvorbe hlapnih kislin.

Dve glavni tehniki čiščenja belega mošta sta statično hladno usedanje (sedimentacija) in flotacija. Statično hladno usedanje je najpogostejši način čiščenja mošta s sesedanjem pri nizki temperaturi (10–12 °C). Postopek lahko traja od nekaj ur do nekaj dni, odvisno od temperature in motnosti mošta. Sedimentacijo lahko pospešimo s pektolitičnim encimom. Flotacija je obraten postopek, pri katerem se mošt očisti s potiskanjem delcev navzgor, ki se tako odstranijo ob uporabi plina in čistilnega sredstva. Flotiranje je hitrejše od hladnega usedanja in zelo priročno za hitro obračanje v kleti. Po drugi strani pa lahko s tem postopkom dosežemo le nizko motnost, zato je primernejši za sveža kot za kompleksna bela vina. Hladno usedanje zahteva več časa in opreme, vendar je primerno za vse stile. Pred hladnim usedanjem je možno mošt tudi inokulirati z nekaterimi posebnimi kvasovkami ne-*Saccharomyces*, ki ne bodo sprožile fermentacije, bodo pa omejele oksidacijo mošta ali razvoj neželenih mikroorganizmov. Ta novejši pristop, t. i. biološka zaščita, se je izkazal kot precej uspešen, saj omogoča znatno zmanjšanje potrebnega odmerka SO₂ pred fermentacijo (Windholtz in sod., 2023).

Alkoholna fermentacija

Alkoholna fermentacija je glavni korak v procesu pridelave vina, ki omogoča pretvorbo mošta v vino. V anaerobiozi ali semianaerobiozi (v atmosferi brez ali z malo kisika) kvasovke fermentirajo sladkor (glukozo/fruktozo) v alkohol (etanol) in CO₂. Med alkoholno fermentacijo kvasovke tvorijo tudi aromatične snovi, ki dajejo vinu poseben senzorični profil. Zato so razmere, v katerih poteka alkoholna fermentacija, ključne za končni stil vina.

Pri fermentaciji lahko vinarji izberejo, ali bodo uporabili komercialni starter ali pa bodo fermentacijo prepustili avtohtoni mikroflori. Komercialni starterji so kvasovke, izolirane v naravi ter nato izbrane na podlagi fermentacijskih lastnosti. Te selekcionirane kvasovke potem pripravijo na industrijski skali za uporabo kot starter za alkoholno fermentacijo. Na trgu je na voljo več kot 250 starterjev, trenutno pa se, odvisno od pridelovalnega območja, s komercialnimi starterji prideluje od 60 do 90 % vin. Uporaba komercialnega starterja omogoča boljši nadzor nad alkoholno fermentacijo in omejuje tveganje počasne ali zaustavljene fermentacije ter nastajanja neprijetnih vonjev. Priporoča se za sveža bela vina, uporablja pa se lahko tudi za kompleksna bela vina. Kljub temu komercialni starter sam po sebi ne pomeni samodejnega uspeha. Alkoholno fermentacijo je treba voditi tudi v skladu z lastnostmi starterja (priporočili proizvajalca). Izbira kvasovk mora temeljiti na pridelovalnem cilju (kinetika fermentacije, senzorični profil ...). Nasprotno pa se vinarji lahko odločijo, da pustijo, da se alkoholna fermentacija zgodi spontano s kvasovkami, ki so prvotno prisotne na površini grozdja ali v kleti. Spontana fermentacija poveča tveganje za počasno ali ustavljeno fermentacijo in s tem nastanek neželenih arom, vendar to ne pomeni, da se bo to tudi zgodilo. Mnoga najbolj kompleksna in iskana bela vina so pridelana ravno na ta način. Vina, pridelana s spontano fermentacijo, so namreč pogosto kompleksnejša kot vina, pridelana s komercialnim starterjem. Zato bi morali to strategijo vpeljevati v pridelavo kompleksnejših belih vin.

Na stil belih vin, zlasti na njihov aromatični profil, prav tako močno vpliva temperatura fermentacije. Uravnavati jo je treba glede na ciljni stil, stopnjo bistrjenja (motnost) in lastnosti kvasovk, saj so nekatere kvasovke odpornejše na nizko temperaturo kot druge. Sveža sadna bela vina običajno fermentiramo pri precej nizki temperaturi (14–17 °C) in z zmerno do nizko stopnjo motnosti. Ti pogoji so za kvasovke precej težavni, zato je treba posebno pozornost nameniti hranilom za kvasovke (glejte tretje poglavje). Nižja temperatura poveča tveganje za počasno/zaustavljeno vrenje, medtem ko lahko višja temperatura spremeni senzorični profil k nekoliko kompleksnejšemu in hkrati manj sadnemu. Izjema so lahko nekatere aromatične sorte grozdja (sauvignon, renski rizling), pri katerih nekoliko višja temperatura fermentacije lahko izboljša sortni značaj vina.

Zato kompleksna bela vina na splošno fermentiramo pri temperaturi, ki je nekoliko višja od temperature, uporabljene v pridelavi svežih belih vin (18–22 °C). Običajno se priporoča začetek fermentacije pri nekoliko nižji temperaturi, ko so kvasovke še v fazi rasti. To se običajno zgodi precej naravno, medtem ko inokuliramo kvasovke med segrevanjem mošta po hladnem bistranju. Po padcu prvih 10–20 % koncentracije sladkorja (m/m) se temperatura lahko zviša ob omejevanju hlajenja s hladilnim sistemom, vendar jo je treba še vedno nadzorovati tako, da ne preseže 23–24 °C. Prav tako se je treba izogibati prevelikemu padcu temperature (6–7 °C v nekaj urah).

Za uspeh alkoholne fermentacije je ključen prehranski vidik. Kvasovke še posebej potrebujejo anorganski

in organski dušik, maščobe in vitamine, da poteče fermentacija do suhega, pa tudi da se med fermentacijo oblikuje želen senzorični profil vina. Več informacij o tem je v dani literaturi (O’Kennedy in Reid, 2008; Jullien in sod., n. d.).

Vrsta fermentacijske posode, ki se uporablja za vrenje (alkoholna fermentacija) in zorenje belega vina, je odvisna od ciljnega stila vina. Pri svežem belem vinu se je treba na splošno izogibati novemu ali rabljenemu hrastu, saj ta doda nekaj hrastovih not, ki lahko prikrijejo sveže sadne zaznave. Za tovrstna vina se najpogosteje uporabljajo inoks (nerjavne) ali betonske cisterne. Načeloma je najboljša inoks posoda, saj je najbolj vsestranska z vidika možnosti uravnavanja temperature, kar je precej cenjeno pri pridelavi svežega belega vina. Nekatere betonske posode, zlasti brez epoksidne barve/zaščite, so lahko precej prepustne za zrak/kisik, kar za sveža bela vina ni zaželeno. Za kompleksna bela vina pa se običajno uporabljajo hrast (barrique sodi ali sodi večje prostornine), beton (cisterne in jajca) ali kombinacija različnih posod, kot so inoks-hrast ali beton-hrast. Pri fermentaciji v hrastovem sodu je zelo priporočljivo, da se celotno vrenje opravi v sodu ali da se za boljši nadzor fermentacija začne v nerjavni ali betonski posodi, nato pa se vino po padcu tretjine sladkorja pretoči v hrastove sode. To je tudi boljše za integracijo hrastove arome in za zaščito pred oksidacijo vina.

Zorenje in nega belega vina

Prva odločitev, ki jo mora vinar sprejeti glede korakov po fermentaciji, je, ali bo izvedel jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo ali ne. Mlečnokislinska fermentacija je proces, ki ga vodijo mlečnokislinske bakterije in omogoča pretvorbo jabolčne kisline v mlečno kislino ter CO₂. Cilj tega postopka je ublažiti kislost vina, saj je jabolčna kislina senzorično ostrejša od mlečne. Prisotnost jabolčne kisline je na splošno cenjena pri svežih belih vinih in vinih, ki izhajajo iz toplejšega podnebja ali letnika. Vendar pa je pri prenizki vsebnosti vinske kisline mogoče zaznati ostrino jabolčne kisline, zato mlečnokislinska fermentacija lahko pripomore k bolj uravnoteženemu vinu. Mlečnokislinska fermentacija lahko v mladih vinih, ki s staranjem postajajo kompleksnejša, doprinese tudi nekaj maslenih not. Zaznava teh not je odvisna od sorte in pogojev mlečnokislinske fermentacije. Ko postanejo zaznavne v svežih belih vinih, lahko prikrijejo sadne vonje. Zato mlečnokislinske fermentacije ne spodbujamo preveč pri pridelavi svežih in sadnih belih vin. Po drugi strani mlečnokislinska fermentacija pri nekaterih kompleksnih belih vinih doprinaša k ravnovesju in kompleksnosti. Vina so po mlečnokislinski fermentaciji tudi mikrobiološko stabilnejša (Goode, 2021).

Druga pomembna odločitev je, kako dolgo bo vino v stiku z drožmi. Ob koncu alkoholnega vrenja se trdni delci sesedejo na dno posode in tvorijo goščo. To usedlino imenujemo droži, sestavljajo pa jo predvsem odmrle kvasovke in preostali trdni deli mošta. Ohranjanje droži v vinu izboljša stabilnost glede kisika, beljakovin in vinske kisline ter poveča zaokroženost in volumen okusa ter določeno stopnjo kompleksnosti. Po drugi strani pa ta postopek nekoliko zmanjša sadne zaznave in svežino. Zato je zorenje na drožeh priporočljivo za kompleksna bela vina, izogibati pa se mu je treba v pridelavi svežih in sadnih belih vinih.

Zorenje na drožeh je treba izvajati previdno, saj lahko z njim hitro pridobimo nekaj reduktivnih not, ki lahko ostanejo v vinu tudi po stekleničenju in škodijo njegovi kakovosti. Razumno ravnanje z žveplom, dobro nadzorovana stopnja motnosti mošta pred vrenjem ter mešanje usedlin droži (*batonnage*) v prvih nekaj mesecih po vrenju lahko preprečijo razvoj reduktivnih vonjev.

Stabilizacija belega vina

Uporaba žvepla in mikrobiološka stabilnost

Zelo pomembno je, da vino ostane stabilno mikrobiološko. Glavno sredstvo, ki se uporablja za to, je žveplo oziroma žveplov dioksid (SO_2). Glavne vloge SO_2 v vinarstvu so zaščita pred encimsko oksidacijo v moštu, pred kemijsko oksidacijo v vinu ter pred delovanjem neželenih mikroorganizmov (kvasovk in bakterij) v moštu in vinu. V vinu je SO_2 v različnih oblikah: molekularni SO_2 (najbolj aktiven), bisulfit (H_2SO_3), reverzibilni kombinirani sulfit – ni aktiven, vendar je lahko kot bazen prostega sulfita ($\text{SO}_2 + \text{H}_2\text{SO}_3$) – in ireverzibilni kombinirani sulfit (ne prispeva k zaščiti, vendar je pomemben z vidika zdravja potrošnikov). Cilj je doseči ustrezno raven prostega SO_2 za najmanjšo možno količino skupnega SO_2 , s čimer se omeji njegova skupna vsebnost v vinu od mošta do steklenice.

Pri belem vinu se med zorenjem na splošno priporoča odmerek 30 mg/L prostega SO_2 . Končna raven v takem vinu tik po stekleničenju mora biti med 30 in 40 mg/L prostega SO_2 , odvisno od vrednosti pH. Nižji pH vina pomeni manjšo potrebo po prostem SO_2 , vendar tudi lažje zaznavanje vonja SO_2 . Kompleksna vina, podvržena jabolčno-mlečnokislinski fermentaciji in zorena na drožeh, so stabilnejša in pogosto potrebujejo manj SO_2 za zaščito.

Odmerek in čas, kdaj dodati SO_2 , je treba skrbno preučiti, da se ohranita kakovost vina in zdravje potrošnikov. Kar zadeva čas, se za sveža bela vina svetuje, da se SO_2 doda takoj po pretoku vina, nekaj dni po končani alkoholni fermentaciji, saj mlečnokislinska fermentacija pri tem stilu vina na splošno ni zaželeno. V tej fazi se običajno uporabi začetni odmerek 50–60 mg/L SO_2 . Pri kompleksnih belih vinih je čas dodajanja SO_2 odvisen od tega, ali se droži ohranijo ali ne. Pri zorenju na drožeh je treba SO_2 dodati vsaj dva tedna po koncu fermentacije, da se prepreči tveganje reduktivnih not. Če pa želimo začeti z mlečnokislinsko fermentacijo, dodajanje SO_2 prestavimo na konec mlečnokislinske fermentacije. V tej fazi se običajno uporabi začetni odmerek 50–60 mg/L SO_2 . Med zorenjem vina so nujne redne meritve SO_2 in senzorične analize, da se prepričamo o ustrezni zaščiti vina. Dodajanje naj se opravi le, kadar je to potrebno.

V vsakem primeru mora biti skupni SO_2 v suhem belem vinu pod 200 mg/L (za EU oz. v Sloveniji za belo in rosé vino ter barrique pod 210 mg/L). Dobre prakse v enologiji priporočajo tehnologijo do 100 mg/L skupnega SO_2 . Pri ekološkem certificiranju je v Evropi mejna vrednost celokupnega SO_2 150 mg/L. Dobre prakse, ki omejujejo oksidacijo vina, kot sta vzdrževanje in zaplinjanje polne cisterne, pomagajo ohranjati vina z minimalnim dodajanjem sulfitov, tako da danes veliko vin na trgu vsebuje veliko nižjo raven skupnega SO_2 , kot je zakonska meja, in z ustrezno količino prostega SO_2 za ohranjanje vina.

Ker se vsebnost prostega SO_2 v steklenici počasi zmanjšuje, nekateri vinarji raje ostajajo na varnem z dodajanjem konzervansa – kalijevega sorbata, ki preprečuje fermentacijo v steklenici, in sterilnim filtriranjem pred stekleničenjem. Uporaba sorbata je zlasti priporočljiva za vina z nekaj več preostalega sladkorja, zahteva pa minimalno raven prostega SO_2 , da se prepreči razvoj nekaterih mlečnokislinskih bakterij, ki bi zaradi razgradnje sorbata vinu lahko dodale note listov pelargonije. Ta strategija je manj pogosta pri kompleksnih belih vinih, ki so na splošno stabilnejša.

Stabilnost na beljakovine

Vino vsebuje nekaj nestabilnih beljakovin, ki izvirajo iz grozdja in se ob segrevanju vina, na primer med njegovim prevozom poleti, lahko oborijo in tvorijo meglico. Ko se enkrat tvorijo meglice, postanejo pri nižji temperaturi netopne, zato vina ni mogoče prodati, saj potrošniki takšno vizualno napako na splošno zavračajo. Dejavniki, ki lahko vplivajo na nastanek meglice, so: koncentracija beljakovin (večja pomeni večje tveganje), sorta (na primer malvazija in sauvignon blanc predstavljata večje tveganje), zrelost grozdja (poznejša zrelost pomeni več beljakovin) in protokol pridelave vina, saj se pri pecljanju in drozganju sprosti več beljakovin kot pri stiskanju celih grozdov. Zorenje na drožeh in v hrastovih sodih prav tako lahko izboljšata stabilnost beljakovin v vinu, zato so kompleksna bela vina naravno stabilnejša kot sveža bela vina, kar zadeva meglic beljakovinskega izvora.

V praksi je treba vina najprej testirati na stabilnost beljakovin. Najpogostejši test je **toplotni test**. Pri njem se izmeri razlika v motnosti vina pred 30-minutnim segrevanjem na 80 °C in po njem. Če je razlika v motnosti pred segrevanjem in po njem (Δ NTU) manjša od 2, je vino stabilno; če je $2 < \Delta$ NTU < 5 , je vino rahlo nestabilno; če je Δ NTU večja od 5, pa je vino očitno nestabilno. Nestabilnost se v vinu najpogosteje stabilizira z bentonitom (glim). Za določitev pravega odmerka bentonita za stabilizacijo je potreben laboratorijski preizkus. Prevelika količina lahko povzroči izgubo nekaterih kakovostnih aromatičnih spojin. Tveganje dearomatizacije vina se znatno poveča pri dodatku več kot 70 g/hL bentonita. To je precej običajen odmerek za sveže belo vino in tudi razlog, zakaj je finalizacija vina z bentonitom v moštu ali med alkoholno fermentacijo, ko končni bazen vinske arome še ni oblikovan, lahko zanimiva strategija za tovrstna vina. Nasprotno pri kompleksnih belih vinih, staranih na drožeh, to ni mogoče, pogosto pa tudi ni potrebno, saj je v tem primeru tveganje čezmerne dodajanja manjše.

Stabilizacija na vinski kamen

V svežem belem vinu se je treba izogibati tvorbi vinskega kamna, saj gre za vizualno težavo, ki je potrošniki ne sprejemajo. Nastane zaradi kristalizacije kalijevega tartrata in kalcijevega tartrata, ko vsebnost teh soli v vinu doseže stopnjo nasičenosti. Kristalizacija je odvisna predvsem od temperature, vsebnosti alkohola, koncentracije vinske kisline, kalija in kalcija, vrednosti pH in prisotnosti zaviralcev tvorbe kristalov, kot so fenoli in manoproteini.

Kompleksna bela vina, zorena na drožeh v hrastovem sodu, bodo naravno stabilnejša kot sveža bela vina.

Vina moramo najprej testirati glede stabilnosti na vinski kamen (**hladni test**). Vendar se v praksi tovrstna vina pogosto stabilizira na vinski kamen brez predhodnih testov, saj so večinoma nestabilna. Stabilizacijo na vinski kamen je treba opraviti tik pred stekleničenjem končnega vina, po tipizaciji, če je ta potrebna, in po stabilizaciji beljakovin. Vino se lahko hladno stabilizira ali pa se stabilizira z elektrodializo.

Vendarle je danes najpogostejša hitra in poceni stabilizacija z zaviralci tvorbe kristalov, kot so karboksimetilceluloza ali manoproteini. Pri negi vina s karboksimetilcelulozo mora biti vino beljakovinsko stabilno, da se prepreči nastanek meglice zaradi reakcije med karboksimetilcelulozo in nestabilnimi beljakovinami.

Zadnji koraki pred stekleničenjem

Finalizacija

Svežemu belemu vinu pogosto koristi tudi končno »poliranje« organoleptičnih lastnosti. Ta finalizacija ni tako pomembna kot stabilizacija na vinski kamen in beljakovine, vendar pa je pogosta želja vinarja, zlasti pri svežem belem vinu, pri katerem potrošniki običajno iščejo čisto, bistro in sadno vino. Obstajajo različne vrste sredstev za finalizacijo vina, namenjenih različnim ciljem: stabilizaciji barve in arome, odstranjevanju spojin, ki lahko pospešujejo oksidacijo vina, povzročajo grenkobo ali trpkost, ter izboljšanju vizualnih lastnosti, kot je bistrost. Sredstva, ki se lahko uporabljajo za to, so želatina, ribji mehur, albumin in jajčni beljak, kazein, rastlinske beljakovine in alginati. Dodajanje teh sredstev se lahko izvaja tudi pri kompleksnih belih vinih, vendar je pri teh finalizacija pogosto manj potrebna, saj mlečnokislinska fermentacija in zorenje na drožeh pripomoreta k zaokroženosti, ki naravno uravnoteži ostro kislost in fenolno strukturo. Na potrebo po končnem finaliziranju vina vpliva tudi kakovost grozdja in stiskanja.

Stekleničenje

Odvisno od polnilne linije se prosti SO_2 po polnjenju v povprečju zmanjša za od 3 do 10 mg/L. Zato je treba raven SO_2 pred polnjenjem ustrezno prilagoditi glede na ciljno vsebnost: 1 mg kisika (O_2) zmanjša SO_2 za 2,5 mg/L (Pascal in sod., 2021), kar pomeni, da če dobimo pri polnjenju 1–4 mg/L O_2 , se bo vsebnost SO_2 zmanjšala za 2,5–10 mg/L. To je odvisno tudi od skupne količine kisika (raztopljenega in v zračnem žepu), ki vstopi v vino med polnjenjem. Upoštevati je treba še kisik v zamašku, ki se med staranjem vina v steklenici prenese v vino, poleg prepustnosti zamaška za kisik na letni ravni.

Da bi bili na varnem glede kemične oksidacije, nekateri vinarji poleg SO_2 dodajo askorbinsko kislino, ki je močan antioksidant. Pri tej praksi pa mora vsebnost prostega SO_2 vedno ostati na ustrezni ravni, da ne poteče oksidacija askorbinske kisline, zaradi česar vino lahko pridobi neželene arome. Zato se o uporabi askorbinske kisline v vinarstvu pogosto razpravlja, zlasti danes, ko vinski trg zahteva nižjo raven sulfitov in večjo transparentnost.

Na splošno je priporočljivo vino pred stekleničenjem filtrirati, zlasti če so vinarji uporabili kakšen izdelek za čiščenje oz. finalizacijo vina. Vrsta in stopnja filtriranja sta odvisni od filozofije vinarja in stila vina.

Ob stekleničenju morajo vinarji zagotoviti inertizacijo (uporaba zaščitnih plinov) polnilnega stroja in steklenic, da bi čim bolj preprečili stres pri polnjenju. Za inertizacijo steklenic pred polnjenjem vina se običajno uporablja dušik (ki se v vinu ne raztaplja). Uporaba polavtomatskih in avtomatskih polnilnih strojev, ki polnijo s tehnologijo inertnega plina z nizkim tlakom ali nizkim vakuumom, na splošno daje najboljše rezultate pri najmanjši količini raztopljenega kisika v steklenicah.

Na trgu so na voljo različne vrste/materiali zamaškov (naravna pluta, Diam, zamaški iz mlete plute, PVC zamaški, navojni zamaški, steklo). Izbira mora temeljiti na naslednjih merilih: ohranjanje aromatične svežine, potreba po počasni mikrooksigenaciji ali ne, trg, cena, dizajn. Za daljše ohranjanje aromatične svežine in tudi z vidika cene je za sveže belo vino zagotovo najboljša izbira navojni zamašek. Kljub temu so nekateri tradicionalni trgi, zlasti v Evropi, še vedno nenaklonjeni tej vrsti zapiranja. V takem primeru dajemo prednost naravnim ali PVC zamaškom. Pri kompleksnih belih vinih je naravni plutovinasti zamašek

(dianski tip) običajno najboljša izbira pri daljšem staranju vina. Pri nekaterih tovrstnih vinih pa lahko zanimive rezultate daje tudi navojni zamašek.

Rdeča vina

Kakovost grozdja in trgatev

Ker so rdeča vina pridelana z maceracijo drozge (kombinacija grozdnih kožic, pečk in mošta), je kakovost grozdja za kakovost rdečega vina še pomembnejša kot pri belih. Medtem ko je iz grozdja povprečne kakovosti možno pridelati preprosta, a tehnološko spodobna in prijetna bela vina, je treba tudi preprosta tehnološka rdeča vina pridelati iz grozdja dobre kakovosti. Tako kot pri belih vinih bo kakovostnejše grozdje vinarju omogočilo večjo izbiro med specifičnimi stili vina in manjše stroške predelave v kleti. Za doseganje takšne ravni kakovosti je ključno sortiranje v vinogradu in v kleti. Vsako lego ali vinograd je treba dobro opredeliti glede kakovosti grozdja in tega vinificirati ločeno, kolikor je to le mogoče glede na logistiko v kleti.

Na senzorični profil rdečih vin močno vpliva izbira datuma trgatve. Čeprav je tudi pri tem pomembna tehnološka zrelost, je izbira datuma trgatve pri rdečih vinih bolj odvisna od aromatične in fenolne zrelosti. Tehnološko zrelost lahko po potrebi nekoliko prilagodimo oziroma nadomestimo v kleti, fenolna in aromatična zrelost pa sta precej manj prilagodljivi. Glede na podnebne spremembe je glavni izziv ohraniti vse tri vrste zrelosti v optimalnem razponu glede na ciljni stil vina.

V Sloveniji se večina rdečega grozdja obira v razponu od 85 do 100 °Oe. Pri enaki vrednosti celokupne topne suhe snovi (TSS), izmerjene z refraktometrom (°Brix), je koncentracija sladkorja pri rdečem grozdju nekoliko manjša kot pri belem, saj lahko nekatere fenolne spojine prispevajo k vrednosti TSS. Poleg tega je stopnja pretvorbe sladkorja v etanol višja pri rdečih vinih, kar pomeni, da bo pri dani vrednosti sladkorja vsebnost alkohola nižja pri rdečih kot pri belih vinih. To je v glavnem povezano z višjo stopnjo izhlapevanja etanola med vinifikacijo rdeče drozge zaradi višje temperature in več zračenja med vrenjem. Kislinska stopnja se zelo razlikuje glede na sorto in regijo, čeprav ima na splošno večina slovenskih rdečih vin od 4,5 do 6 g/L skupnih titrabilnih kislin (kot vinska kislina) in vrednosti pH med 3,4 in 3,8. Smiselno je izvesti tudi meritve vsebnosti jabolčne kisline, čeprav je to manj pomembno kot pri belih vinih, saj pri rdečih večinoma poteka jabolčno-mlečnokislinska fermentacija.

Fenolna zrelost je verjetno najpomembnejši parameter za kakovost rdečega vina, saj močno vpliva na ravnovesje, harmonijo in strukturo, pa tudi na aromatični izraz vina (Sáenz-Navajas in sod., 2010). Parametri, ki se običajno merijo za spremljanje fenolne zrelosti, so vsebnost antocianinov in taninov ter njihova stopnja izluževanja (ekstraktabilnost).

Najpogostejša metoda za izvajanje teh meritev je t. i. Glorijeva (izvorno Glories) metoda (Ribéreau-Gayon in sod., 2006). Številni vinarji po svetu se pri ocenjevanju fenolne zrelosti zanašajo na lastne izkušnje, ki temeljijo na vizualnem opazovanju in okušanju jagod. Tudi pri ocenjevanju fenolne zrelosti pri rdečih sortah pogosto uporabljajo senzorične metode, kot so preverjanje čvrstosti kože, opazovanje barvnega odtisa na prstih po žvečenju grozdnih jagod ter ocena barve in zrelosti pečk. Čeprav se tak pristop v praksi dobro obnese, zahteva izkušnost in ostaja deloma subjektiven. Potencialno bi lahko tudi za ocenjevanje

fenolne zrelosti uporabili metodo nalaganja sladkorja, opisano v podpoglavju *Kako izberemo pravi datum trgatve*. Čeprav je bila metoda razvita za ocenjevanje aromatične zrelosti, se zdi, da sta aromatična in fenolna zrelost med seboj lahko povezani z vidika senzorične zaznave (Antalick et al., 2021).

Aromatična zrelost se na splošno ocenjuje z okušanjem jagod. Čeprav je ta metoda še vedno subjektivna in težko ponovljiva, je lahko pri izkušenih vinogradnikih uspešna. Metoda kopičenja sladkorja prinaša večjo objektivnost pri ocenjevanju aromatične zrelosti. Tako kot pri belih vinih je treba tudi pri rdečih odločitve o času trgatve prilagoditi podnebnim razmeram letnika (hladno oz. toplo/vroče), da bi se izognili premajhni ali preveliki zrelosti. Zaradi premajhne zrelosti bo vino tanko, kislo in trpko, zaradi prevelike zrelosti pa alkoholno z marmeladno-sadnim profilom in omejenimi možnostmi staranja. Prezrele jagode so zaradi dehidracije pogosto stisnjene/skrčene. Vendar se jagode skrčijo tudi zaradi hudega sušnega stresa in/ali vročinskih valov še pred optimalno zrelostjo, kar se vse pogosteje dogaja v številnih tradicionalnih vinskih regijah. V tem primeru lahko vina hkrati kažejo nezrele in prezrele senzorične lastnosti. Rešitve za ublažitev teh težav je treba iskati pri upravljanju vinograda (tla, listna stena, združljivost sorte in lege, namakanje ...).

Obdelava grozdja pred fermentacijo

V nasprotju z belimi vini grozdja za pridelavo rdečih vin pred predelavo ni treba hladiti. Najpogostejša praksa je, da se grozdje ob sprejemu v klet razpeclja in zdrožga. Najnaprednejše kleti so za fazo pred drozganjem običajno opremljene s sortirno linijo, da se čim bolj odstrani jagode slabše kakovosti (ki niso bile sortirane v vinogradu) ter premalo razvite majhne zelene jagode, ki med maceracijo lahko prispevajo zelene nezrele in trpke tanine. Za ta postopek pa je potrebna delovna sila in/ali dragi stroji, ki jih številne kleti v Sloveniji nimajo oz. si jih ne morejo privoščiti. Kljub temu je splošna ideja pri rdečih vinih čim boljše sortiranje grozdja v skladu z logistiko in razpoložljivimi finančnimi sredstvi, da se v končni fazi predeluje le surovina najboljše kakovosti.

Po pecljanju in drozganju se mošt prečrpa v vinifikator ali odprto posodo, kjer pozneje poteka fermentacija. V nekaterih primerih vinarji po pecljanju grozdja ne drozgajo, da s tem spodbudijo mehko ekstrakcijo in posnemajo semikarbonsko maceracijo med vrenjem ([Wineanorak, n.d.](#)). V nekaterih vinorodnih deželah in pri nekaterih sortah grozdja, kot so na primer modri pinot, syrah ali modra frankinja, nekateri vinarji radi dodajajo cele grozdne jagode med fermentacijo ali včasih celo izvajajo fermentacijo 100-odstotno celih grozdov ([Wineanorak, n. d.](#)). V tem primeru se grozde prenese neposredno v vinifikator, ne da bi jih predhodno razpecljali in zdrožgali.

Ko je drozga v fermentacijski posodi, vinarji običajno dodajo žveplo in inokulirajo kvasovke, da se začne alkoholna fermentacija. Včasih se pred začetkom fermentacije drozga štiri ali pet dni vzdržuje pri nizki temperaturi (10 °C). Namen tega postopka, imenovanega hladna maceracija, je še pred fermentacijo izlužiti antocianine in aromatične prekurzorje za stabilizacijo barve in boljši izplen sadnih vonjev. Ta postopek je še posebej priljubljen pri predelavi grozdja sorte modri pinot ([The Australian Wine Research Institute, n. d.](#), glej tudi [sedmo poglavje](#)).

Obdelava drozge pred fermentacijo s segrevanjem, ki je bila sprva razvita za izboljšanje kakovosti rdečih vin iz nezdravega grozdja, je postala priljubljena za množično proizvodnjo rdečega vina, zlasti s toplejših območij, kjer se vse pogosteje pojavljajo časovno zgoščene trgatve, ki povzročajo logistične težave zaradi

hitrejšega dozorevanja grozdja v krajšem časovnem obdobju (hitreje kot običajno). Splošen namen je ekstrakcija fenolov s segrevanjem grozdnega mošta/drozge pred fermentacijo, ki poteka pozneje v tekoči fazi (moštu brez trdnih delov grozdja). Tehnike je lepo povzel Nordegstaard (Nordegstaard, 2017, glej tudi [sedmo poglavje](#)).

Na koncu je odmerek dodanega žvepla odvisen od zdravstvenega stanja in zrelostne stopnje grozdja ter strategije pridelave vina. Priporočeni odmerki so podobni kot pri belih vinih, najpogostejši odmerek je 5 g/hL. Pri zdravem grozdju z nizkim pH (< 3,4) in visoko vsebnostjo TA (titracijske kisline) (> 6 g/L) se odmerek lahko zmanjša na 3 g/hL, saj rdeči mošt ne oksidira tako hitro kot beli. Pri povprečnem zdravstvenem stanju grozdja, visoki vrednosti pH (> 3,7) in nizki vsebnosti titracijske kisline (< 4 g/L) je priporočljivo povečati odmerek na največ 8 g/hL. V vsakem primeru pa moramo odmerek žvepla v posodo z vinom dobro vmešati. To je pri fermentaciji celega grozdja ali jagod lahko izziv, ker je manj soka na začetku in je enakomerna porazdelitev težja. Zato je dobro, da žveplamo z manjšimi alikvoti razredčene raztopine žvepla ob različnih časih med polnjenjem fermentacijske posode.

Fermentacija in maceracija

Splošna načela za ravnanje s kvasovkami so podobna za rdeča in bela vina. Vendar pa fermentacija rdečih vin poteka v prisotnosti drozge in pri višji temperaturi ter z več zračenja v primerjavi z belimi vini.

Z vidika vodenja fermentacije te razlike pomenijo, da bodo kvasovke pri fermentaciji rdečega vina manj izpostavljene pomanjkanju lipidov kot kvasovke pri fermentaciji belega vina. Vendar je treba pri upravljanju dušika (hranil za kvasovke) ravnati enako skrbno kot pri belih vinih, da bi se izognili težavam z upočasnjeno ali zaustavljeno fermentacijo ter posledično reduktivnostjo.

Tabela 1. Strategije ekstrakcije pri oblikovanju različnih stilov vina.

	Lahkotno in sadno vino	Elegantno in kompleksno vino	Drzno in močno vino
Kakovost grozdja	vse zrelosti: od premalo zrelega do zrelega grozdja	zrelo grozdje	zelo zrelo grozdje
Čas maceracije	od 5 do 8 dni	od 15 do 20 dni	4 tedne
Temperatura maceracije	od 20 do 25 °C	25 °C med fermentacijo, od 27 do 28 °C po fermentaciji	od 28 do 30 °C
Tip ekstrakcije (pogostost potapljanja klobuka)	mehka in kratka, enkrat na dan od 5 do 7 dni	mehka in dolga 1- ali 2-krat dnevno med fermentacijo in nič po fermentaciji	aktivna in dolga 3- ali 4-krat dnevno z zmanjšanjem frekvence po fermentaciji

Odločitev vinarja o tem, ali bo delal s selekcioniranimi ali avtohtonimi kvasovkami, temelji na enakih načelih kot pri belih vinih. Teoretično so fermentacije rdečih vin zaradi višje temperature in vsebnosti lipidov manj zahtevne za kvasovke kot fermentacije belih vin. Spontana fermentacija bi bila lahko uspešnejša, vendar so pogoji pred fermentacijo ugodnejši za razvoj neželenih kvasovk (zaradi prisotnosti tropin, višje temperature mošta in pogosto bolj odprte posode kot pri beli fermentaciji). Znano je na primer tudi, da nekateri sevi kvasovke *Hanseniaspora uvarum* (ena izmed najpogostejše prisotnih v grozdnem moštu pred fermentacijo) proizvajajo hlapne kisline (Mančič in sod., 2022). Po drugi strani pa je ena od glavnih prednosti spontane fermentacije doseganje večje aromatične kompleksnosti. V pridelavi rdečih vin na aromatično zaznavanje bistveno vpliva nehlapna matrika (Sáenz-Navajas in sod., 2010) in izziv izvedbe spontane fermentacije je včasih manj vreden tveganja kot pri belih vinih. Kljub temu lahko uspešna spontana fermentacija, tako kot tudi pri belih vinih, poveča aromatično kompleksnost rdečih vin.

Pri rdečih vinih je vsaj 80 % kakovosti končnega vina odvisno od ekstrakcije iz drozge med fermentacijo. Poleg stopnje kakovosti grozdja ima osrednjo vlogo pri določanju stila končnega vina strategija maceracije drozge grozdja med vrenjem. Vinarji se lahko poigravajo s časom in temperaturo maceracije ter vrsto ekstrakcije (material in pogostost). Vse te parametre je treba prilagoditi glede na kakovost grozdja (zrelost, heterogenost, zdravstveno stanje) in ciljni stil vina.

V Tabeli 1 je nekaj primerov strategije ekstrakcije glede na tri različne vinske stile.

Fermentacija običajno poteka v zaprtih posodah, imenovanih vinifikatorji, narejenih iz inoksa ali hrasta, ali v odprti posodi, ki jo je mogoče zapreti s pokrovom ali ponjavo. V prvem primeru je mogoče bolje nadzorovati temperaturo in uporabiti več različnih postopkov ekstrakcije. V drugem primeru je prostornina posode manjša, ekstrakcija pa se pogosto izvaja ročno, kar omogoča mehkejšo ekstrakcijo. Ekstrakcija se običajno izvaja s prečrpavanjem ali potapljanjem klobuka (potiskanjem tropin navzdol, nazaj v mošt). Pri prečrpavanju se klobuk iz tropin obliva s fermentirajočim moštom, ki se ga črpa z dna posode. Intenzivnost ekstrakcije se povečuje s pogostostjo prečrpavanja in količino mošta/vina, ki se pri tem uporabi. S potapljanjem klobuka se pokrov na vrhu tekočine nabranih tropin z mehanskim delovanjem potopi nazaj v mošt. V velikem vinifikatorju je ta tehnika bolj groba od tehnike prečrpavanja, medtem ko se v manjši posodi mehkejša ekstrakcija lahko izvaja ročno.

Med maceracijo se antocianini v prvih dneh fermentacije običajno precej hitro izlužijo z difuzijo (mehko ekstrakcijo), medtem ko bodo bolj hidrofobni tanini potrebovali več časa in večjo vsebnost etanola, da se izlužijo iz kožic in pečk. Zato daljša ekstrakcija prispeva k strukturnejšim rdečim vinom, saj se vsebnost taninov povečuje s trajanjem in temperaturo maceracije. Vendar ni vse, kar lahko pridobimo iz grozdnih kožic in pečk, tudi koristno za kakovost vina. Posledično so preveč ekstrahirana rdeča vina neuravnotežena in jih je težko piti tudi po več letih staranja. Cilj strategije ekstrakcije mora biti pridelava uravnoteženega vina ne glede na kakovost grozdja in ciljni stil, zato je strategijo treba posebej prilagoditi vsaki seriji grozdja, ki pride v klet. Na splošno velja, da se je treba izogibati intenzivni ekstrakciji pri premalo zrelem grozdu, da ne bi pridobili zelenih in grobih taninov. Medtem ko so na nekaterih trgih še vedno priljubljena velika in ekstrahirana rdeča vina, pridelana z intenzivno ekstrakcijo zelo zrelega grozdja, gre po drugi strani splošni mednarodni trend bolj k elegantnejšemu in lahko pitnemu rdečemu vinu, pogosto pridelanemu s srednje dolgo ali dolgo mehko ekstrakcijo. Poleg tega so v svetu naravnih vin v modi tudi lahka rdeča vina, pridelana z zelo mehko ekstrakcijo, imenovano tudi difuzija.

Pri dolgi ekstrakciji se alkoholna fermentacija pogosto konča pred koncem maceracije. V tem primeru je priporočljivo občasno zelo mehko potopiti klobuk, da se prepreči razvoj hlapnih kislin v vinu. Poleg tega je ohranjanje mladega vina pri višji temperaturi (26–27 °C) med maceracijo, ki poteka še po fermentaciji, dobra praksa za mehčanje taninov in povečanje telesa vina. Mehansko delovanje na klobuk je v tem primeru treba ustaviti ali zmanjšati, da se prepreči čezmerna ekstrakcija.

Ob koncu maceracije se drozga prečrpa v stiskalnico za stiskanje. Prvo vino, ki samo steče še pred začetkom cikla stiskanja, se imenuje samotok. Nato sledita prvi in drugi prešanec, ki sta bogatejša s tanini. Stiskanje mora biti nežno, da se omeji ekstrakcija trdih taninov, ki se niso izlužili med maceracijo. Kakovost vina, ki priteka iz stiskalnice, je treba skrbno preverjati, prešance pa hraniti ločeno ali jih kasneje glede na kakovost združiti s samotokom. Cilj je pridobiti čim večjo količino vina, ne da bi pri tem ogrozili končno kakovost. Premočno stiskanje je pogosto vzrok za nastanek grobih vin z ostrimi tanini, ki se s staranjem težko zmehčajo. Ne nazadnje lahko vinar še vedno prilagodi strukturo vina tako, da pozneje doda del prešancev v samotok. Dodatne informacije o postopku stiskanja v vinski kleti v ZDA so na voljo na njihovi spletni strani ([Ridge Vineyards, n. d.](#)).

Zorenje rdečega vina

Za razliko od belega vina se pri večini rdečih vin izvaja jabolčno-mlečnokislinska fermentacija. Razlog za to so dejstva, da jabolčna kislina poveča senzorično ostrino taninov in da so rdeča vina brez jabolčno-mlečnokislinske fermentacije večinoma neuravnotežena. Pri zeleni jabolčno-mlečnokislinski fermentaciji se žvepla ne sme dodajati takoj po fermentaciji, saj bi zaviral jabolčno-mlečnokislinsko fermentacijo, ki običajno steče po alkoholni fermentaciji. Mnogi vinarji pustijo, da jabolčno-mlečnokislinska fermentacija v rdečem vinu poteka spontano, drugi pa raje uporabljajo komercialno dostopne mlečnokislinske bakterije. Zanimivo je, da je uspešnost komercialnih bakterij pri izvajanju jabolčno-mlečnokislinske fermentacije na splošno manjša kot pri kvasovkah, ki izvajajo alkoholno fermentacijo. Komercialne bakterije se lahko dodajo po koncu alkoholne fermentacije ali na začetku alkoholne fermentacije (koinokulacija).

Komercialne bakterije je treba izbrati previdno, saj vse tovrstne bakterije ne delujejo dobro v kombinaciji z vsemi kvasovkami. Pri zaustavljeni alkoholni fermentaciji lahko bakterije porabijo sladkor in sprostijo očetno kislino. Splošno velja, da dokler so kvasovke aktivne, mlečnokislinske bakterije ne bodo porabljale sladkorja. Vseeno se lahko zgodi ob slabem žveplanju ob trgatvi in spontani fermentaciji, da nekateri lastni heterofermentativi sevi kvasovk presnovijo glukozo v očetno kislino. Ne glede na to tveganje je koinokulacija kvasovk oziroma mlečnokislinske bakterij praksa, ki je v zadnjem času pridobila pozornost v toplih regijah, kjer je zaradi visoke ravni alkohola po alkoholni fermentaciji mlečnokislinska fermentacija lahko zahtevnejša. Inokulacija z mlečnokislinskimi bakterijami na začetku alkoholne fermentacije ne pomeni nujno, da se mlečnokislinska fermentacija tudi zgodi hkrati z alkoholno fermentacijo, temveč pogosto steče po njej. Vendar pa se bo časovni zamik med alkoholno in mlečnokislinsko fermentacijo skrajšal in povečala se bo možnost uspeha mlečnokislinske fermentacije pri visoki vsebnosti etanola.

Ker ta praksa lahko zniža raven vsebnosti acetaldehida in s tem stabilnosti barve po fermentaciji, je treba dodajanje SO₂ odložiti, zlasti pri manj obarvanem rdečem vinu. Na splošno odlog dodajanja SO₂ po fermentaciji spodbuja stabilizacijo barve rdečega vina, saj prisotnost relativno visoke ravni prostega

žveplovega dioksida zmanjša tvorbo in razpoložljivost acetaldehida, ki sodeluje pri fenolnih reakcijah, odgovornih za stabilizacijo barve (Schmidtke in sod., 2011; Catania in sod. 2021). Poleg tega so vina še nekaj tednov po fermentaciji bogata s CO₂, zato odlog dodajanja SO₂ v tem času ni tvegan glede oksidacije, dokler je posoda polna. Po drugi strani pa je treba raven acetaldehida, ki nastane v tem času, natančno spremljati, da bi se izognili oksidativnemu vinu, ki bi pozneje potrebovalo visoko raven žveplovega dioksida za mikrobiološko stabilnost.

Čeprav so rdeča vina podvržena mlečnokislinski fermentaciji, je njihov pH pogosto višji kot pri belih vinih, zaradi česar so med staranjem lahko bolj podvržena mikrobiološkemu kvaru. Dolgo zorenje na grobih drožeh (ki so gojišče za mikroorganizme) brez žveplanja je torej za rdeča vina tvegana praksa glede razvoja bakterij *Brettanomyces* in oetnokislinskih bakterij. Pomembno je tudi, da je med zorenjem vina posoda vedno polna, da se tako vino bolje zaščiti pred oksidacijo in mikrobiološkim kvarom. Med zorenjem rdečega vina je treba redno preverjati vsebnost prostega SO₂ in raven vzdrževati na približno 20–25 ppm. Nad vsebnostmi 20 ppm prostega SO₂ je tveganje za razvoj bakterij *Brettanomyces* in acetobakterij namreč omejeno. Zato je cilj vzdrževati to vrednost prostega SO₂ z minimalnim dodajanjem SO₂. To je mogoče doseči z rednim preverjanjem količine vina v posodah in dopolnjevanjem posode, kadar je to potrebno.

Vinarji lahko za zorjenje/staranje rdečih vin uporabljajo mnogo različnih vrst posode. Najpogostejši so hrastovi sodi ter inoks in betonske cisterne različnih velikosti in oblik. Nekatere kleti se ukvarjajo tudi s staranjem rdečih vin v amforah iz različnih vrst gline. Izbira je odvisna od ciljnega stila vina. Inoks je najbolj hermetično zaprta posoda, dokler je polna, in se pogosto uporablja za lahko pitna mlada rdeča vina z mehкими tanini. Posode iz inoksa niso najprimernejše za mehčanje taninov, saj ne omogočajo mikrooksigenacije. Rdeča vina z minimalno strukturo ali grobimi tanini je treba zato vsaj začasno starati v poroznejši posodi. Če vinarji ne želijo uporabiti soda, se lahko odločijo za mikrooksigenacijo, ki so jo razvili konec devetdesetih let prejšnjega stoletja v Franciji za mehčanje taninov v sadnih rdečih vinih, pridelanih iz taninsko bogatih sort. Več informacij je na [tej spletni strani](#) (Ting, 2021).

Čeprav jih v Sloveniji ne uporabljamo več pogosto, so v drugih državah betonske cisterne še vedno priljubljena posoda za staranje rdečega vina.

Betonske cisterne so nekoliko poroznejše in toplotno nevtralnije kot inoks ter ne doprinašajo hrastovega okusa. Povečanje zanimanja za amfore izhaja iz materiala, ki je še poroznejši od betona, in sicer v želji, da se tanini hitreje zmehčajo. Kljub temu najbolj priljubljena vrsta posode za staranje rdečega vina ostajajo sodi različnih velikosti. Omogočajo mikrooksigenacijo in vinu lahko doprinesejo več (večplastne) kompleksnosti in strukture. Velikost in starost uporabljenih sodov se lahko zelo razlikujeta glede na ciljni stil vina, filozofijo vinarja in regionalno tradicijo. V vsakem primeru je treba hrastovo posodo med dvema uporabama zelo dobro očistiti in ustrezno shraniti, saj se v hrastovih porah zlahka razvijejo mikroorganizmi, ki povzročajo kvarjenje. Več informacij je na spletni strani Avstralskega inštituta za raziskave vina – AWRI ([The Australian Wine Research Institute, n. d.](#)).

Stabilizacija in finalizacija rdečega vina

Rdeča vina so beljakovinsko stabilnejša zaradi prisotnosti fenolnih spojin, ki reagirajo z nestabilnimi beljakovinami grozdja in preprečujejo nastanek meglic. Po drugi strani pa je treba rdeča vina stabilizirati na

vinski kamen, čeprav je tudi ta manj problematičen kot pri belih vinih, saj ga potrošniki pri rdečih vinih bolje sprejemajo kot pri belih. Možni postopki so enaki kot pri belih vinih z izjemo uporabe CMC-ja, ki je v tem primeru neučinkovit in lahko povzroči obarjanje barvnih spojin. Ne nazadnje rdeča vina pogosto ostanejo dlje časa v kleti, vsaj dve zimi, kar pripomore k naravni stabilizaciji vina tudi glede obarjanja vinske kisline.

Pojavijo se lahko še druge koloidne oborine, ki vključujejo barvila večje molekulske mase in tanine. Da bi se temu izognili, lahko uporabimo arabski gumi, želatino in manoproteine. Za izboljšanje strukture rdečega vina ali stabilizacijo barve se lahko dodajo (komercialni) tanini. Grobe tanine je mogoče zmehčati z različnimi sredstvi za finalizacijo. Na splošno so najpogostejši izdelki jajčnih in rastlinskih beljakovin, celičnih sten kvasovk, želatina in arabski gumi. Rdečih vin ni treba zaščititi pred mlečnokislinskimi bakterijami, saj jih običajno načrtno podvržemo mlečnokislinski fermentaciji, vinarji pa za preprečevanje razvoja *Brettanomyces* lahko uporabijo hitozan.

Vinarji lahko za stabilizacijo in izboljšanje organoleptičnih lastnosti svojih vin uporabijo številne dodatke oziroma enološka sredstva. Uporaba teh proizvodov je odvisna od filozofije vinarja, kakovosti grozdja in vina, ciljnega stila vina in trga. Kljub temu preventivna enologija vedno daje boljše rezultate in je cenejša od korektivne enologije. Najboljša rešitev za pridobitev harmoničnih vin z minimalnimi posegi v kleti ostajajo dobro delo v vinogradu, pri prebiranju in predelavi grozdja ter med vinifikacijo. Tako so pridelana vina najvišje kakovosti.

Stekleničenje

Tako kot pri belih je treba tudi pri rdečih vinih raven SO_2 pred stekleničenjem prilagoditi glede na ciljno vrednost in izgubo med stekleničenjem. Ker so trdni delci v rdečih vinih pogosto nekoliko bolj sprejemljivi kot v belih, rdečih vin pred stekleničenjem pogosto ne filtriramo. Vinarji, ki ne filtrirajo, svojih rdečih vin pogosto tudi ne finalizirajo, saj se bojijo, da takšni postopki odstranijo kakovostne sestavine, ki prispevajo h kompleksnosti vina. Nasprotno pa nekateri vinarji raje delajo varneje in svoja vina pred stekleničenjem filtrirajo. Za nekatere trge je rdeče vino zelo priporočljivo filtrirati, saj je sprejemljivost za vidne trdne delce lahko nizka. Na splošno varnejši način raje izberejo velike kleti, medtem ko je pri majhnih kletih to odvisno od filozofije vinarja.

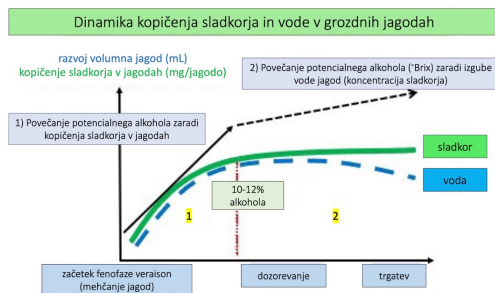
Izbira vrste zamaškov temelji na enakih merilih kot pri belem vinu. Vendar pa veliko rdečih vin med staranjem potrebuje mikrooksigenacijo, zaradi česar sta naravni plutovinasti zamašek in zamašek tipa Diam najbolj priljubljena zamaška za rdeča vina.

Kako izberemo pravi datum trgatve?

Ključni vidik vloge vinogradnika ali vinarja je napovedovanje datuma trgatve, s katerim bi najbolj pomagali pri pridelavi zelenega sloga vina. Zaradi globalnega segrevanja vinogradniki sedaj bolj kot kdaj koli potrebujejo objektivne kazalnike zrelosti grozdja, ki jim pomagajo pri odločitvi o času trgatve. Zato so raziskovalci namenili že kar nekaj truda za razumevanje in odkrivanje postopnega razvoja prekursorjev

arome iz grozdja med zorenjem jagod (Kontoudakis in sod., 2010; Bindon in sod., 2013; Allamy in sod., 2018).

Koncentracija sladkorja v grozdnem soku je dandanes lahko edino merilo, na podlagi katerega se vinogradnik in vinar odločata o trgatvi. Lahko se upošteva tudi skupaj z osnovnimi kemijskimi parametri grozdja, s katerimi ocenjujemo kislost grozdnih jagod, kot so vrednost pH in vsebnost celokupnih titrabilnih kislin ter barva pri rdečih sortah grozdja. Analiza barve grozdja je pokazatelj fenolne zrelosti in se ocenjuje z merjenjem vsebnosti antocianinov in taninov v grozdnih kožicah in peckah grozdja.



Slika 1: Dinamika kopičenja sladkorja in vode v grozdnih jagodah (povzeto po Antalick in sod., 2023).

Druga pogosta metoda, zlasti pri oceni zrelosti okusa, je ocenjevanje zrelosti jagod z okušanjem. Čeprav je okušanje jagod pomembno, je lahko zelo subjektivno, saj na zaznavanje okusov vplivajo degustatorjeve osebne izkušnje in usposabljanje (Rabot in sod., 2016). Čeprav je vonj/aroma ena od najpomembnejših sestavin kakovosti vina, navedene metode zagotavljajo le malo objektivnih informacij glede aromatičnosti grozdnega soka ali iz njega izhajajočega aromatičnega profila vina.

Nedavno je bila za pridelovalce in vinarje za objektivno napovedovanje razvoja aromatičnega profila vina med zorenjem predlagana metoda z merjenjem preprostih fizioloških parametrov grozdja, povezanih z razmerami pridelave v vinogradu. Čeprav je bila ta metoda prvotno namenjena pridelavi rdečih vin, jo je mogoče uporabiti tudi za bela vina, vendar so nujno potrebne nadaljnje raziskave za njeno optimizacijo pri belih sortah. Metoda se imenuje metoda kopičenja sladkorja v grozdnih jagodah.

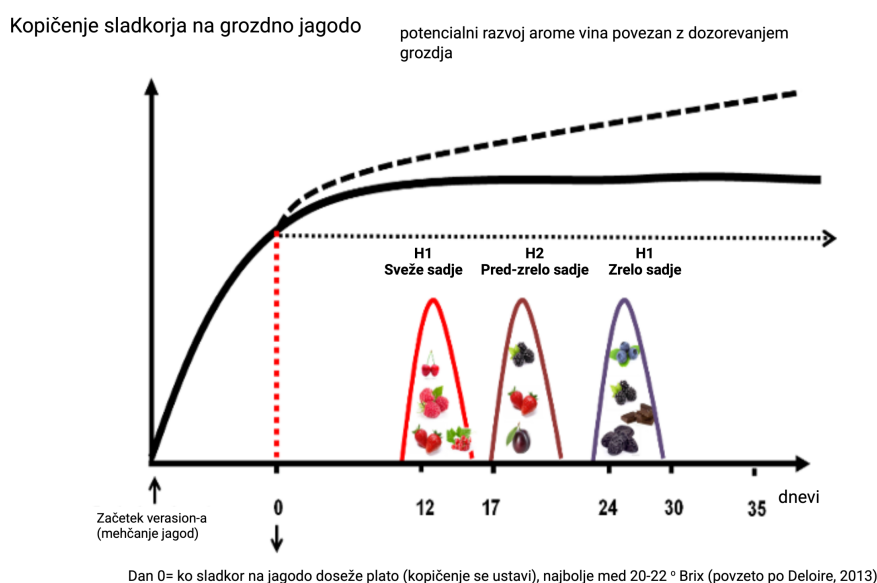
Metoda kopičenja sladkorja v grozdnih jagodah

Hitrost kopičenja sladkorja v grozdnih jagodah (Slika 2) uporabimo kot fiziološki kazalnik delovanja vinske trte v napovedovanju datumov trgatve od 12 do 40 dni vnaprej na podlagi možnega aromatičnega profila vina (Deloire, 2013; Antalick in sod., 2021).

Kot je razvidno s Slike 1, se kopičenje grozdnega sladkorja v grozdni jagodi zaradi fotosinteze konča v prvi fazi. Dan oziroma točka, ko se kopičenje sladkorja v jagodah ustavi, t. i. *plateau* (plato), se uporabi kot izhodišče za oceno in napoved razvoja aromatične zrelosti grozdja. Od te točke naprej je vsako povečanje koncentracije grozdnega sladkorja posledica izhlapevanja vode, medtem ko razvoj grozdnih arom in fenolov ni povezan s tehnološko zrelostjo grozdja (sladkor/kislina). Na tej stopnji je aromatični razvoj grozdja odvisen predvsem od sorte in ne od okoljskih dejavnikov. Eden od razlogov bi lahko bil, da je konec kopičenja sladkorja v jagodah potencialno povezan z začetkom odmiranja celic jagod, ki je genetsko programirano in odvisno predvsem od sorte grozdja (Tilbrook in Tyreman, 2008).

Antalick in sodelavci (2021) so pri sortah shiraz in cabernet sauvignon v Avstraliji dokazali obstoj

posebnih senzoričnih prostorov (lahko tudi oken – na Sliki 2 označeno s H1, H2, H3), povezanih z dvema stopnjama zrelosti, t. i. sveže sadje in zrelo sadje, ne glede na letnik, vinsko regijo in podnebje. Pri teh sortah se okna svežega sadja pojavijo 12 in 20 dni po dnevu, ko se kopičenje sladkorja ustavi (plato), okna zrelega sadja pa 24 oziroma 40 dni po platoju za sorti grozdja shiraz in cabernet sauvignon. Empirična opazovanja so potrdila tak aromatični razvoj vina v drugih vinorodnih regijah in pri drugih rdečih sortah, ki imajo svoj tempo zorenja. Antalick in sodelavci (2021) so opazili določeno stopnjo povezave med razvojem aromatike in fenolne zrelosti po dnevu, ko se kopičenje sladkorja ustavi (plato). Čeprav mora končna izbira datuma trgatve temeljiti na različnih parametrih, se zdi, da je metoda kopičenja sladkorja v grozdnih jagodah najbolj povezana s presnovnimi spremembami v grozdnih jagodah med zorenjem.



Slika 2. Potencialni razvoj arome vina, povezan z dozorevanjem grozdja (povzeto po Deloire, 2013; Antalick in sod., 2023).

Kako pa deluje ta metoda v praksi?

Metoda kopičenja sladkorja temelji na preprostih kazalnikih, ki jih lahko izmeri vsak vinogradnik. Osredotoča se na dinamiko kopičenja sladkorja v jagodah in ne na točno vrednost količine sladkorja, ki se naloži na jagodo. Zato se lahko približamo temu, da sta prostornina jagod in sveža masa jagod enaki, saj oba parametra med zorenjem jagod sledita isti dinamiki. Z merjenjem koncentracije sladkorja z refraktometrom in sveže mase jagod s tehtnico je mogoče določiti, kdaj bo dosežen plato kopičenja sladkorja v jagodah. Te meritve opravimo na 100 naključno izbranih jagodah, ki smo jih vzorčili na terenu, v vinogradu (Antalick in sod., 2021). Ob upoštevanju dejstva,

da 1 °Brix ustreza koncentraciji 10 g sladkorja/L, se povprečna količina sladkorja na jagodo (mg) izračuna takole:

$$\text{masa sladkorja (mg) na jagodo} = \text{koncentracija sladkorja (°Brix)} \times 10 \times \text{povprečna masa jagode (g)}$$

Na primer, za vzorec 100 jagod sorte merlot, ki tehta 120 g in ima stopnjo sladkorja 18 °Brix, je rezultat mase sladkorja na jagodo $18 \times 10 \times (120/100) = 216$ mg.

S tem izračunom je za vsak datum vzorčenja mogoče prikazati povprečno kinetiko kopičenja sladkorja v jagode in določiti datum, ko se kopičenje sladkorja ustavi ali znatno upočasni (datum, ko je dosežen plato).

Vendar lahko te meritve v vinskih kletih hitro postanejo težavne, saj je vzorčenje lahko dolgotrajno, merjenje sveže mase jagode pa je lahko nenatančno, če grozdje ni vzorčeno in ohranjeno nepoškodovano s peclji. Poleg tega lahko nekaj pristranskosti v to metodo vnese tudi velika heterogenost zrelosti.

Kljub temu je ta model kopičenja sladkorja v grozdnih jagodah, raziskan na podlagi posamezne jagode (Shahood in sod., 2020), pokazal, da se plato kopičenja sladkorja v jagodah doseže pri 1 M (18 °Brix). Model, ki ga je predlagal Shahood (2020) na posameznih jagodah, je zagotovo najprimernejši za obravnavo molekularnih, presnovnih in kompartmentacijskih dogodkov (procesi, v katerih se molekule razporedijo ali skoncentrirajo v specifične celične predele, kot so vakuole, citoplazma in celične stene ali plastidi), ki uravnavajo razvoj plodov vinske trte na ravni posameznega ploda.

Po drugi strani je kopičenje sladkorja na jagodo v populaciji jagod ustrežnejši fiziološki kazalnik za določitev platoja dneva kopičenja sladkorja in datuma trgatve za določene vinske stile (Deloire, 2013; Šuklje in sod., 2019). Antalick in sodelavci (2021) so za populacijo jagod dosledno ugotovili, da se plato doseže pri okoli 20 ± 1 °Brix. Podobne rezultate so dobili tudi pri spremljanju dozorevanja grozdja sorta modra frankinja v Sloveniji (Švajger, 2023). Zato se zdi, da se za določitev datuma platoja lahko uporabi vrednost 20 °Brix. Vendar je pomembno natančno vedeti, kdaj je dosežena koncentracija sladkorja 20 °Brix, saj lahko 4- ali 5-dnevna razlika pri datumu trgatve močno vpliva na stil vina. Da bi omejili takšno pristranskost v oceni, je priporočljivo dvakrat na teden izmeriti koncentracijo sladkorja med 18 in 21 °Brix.

Uporaba metode v pridelavi belih vin

Podjetje Vivelys, ki je s profesorjem vinogradništva Alainom Deloirjem prvo razvilo metodo kopičenja sladkorja v grozdni jagodi, uporablja tudi razvoj barve grozdnih jagod za oceno aromatične zrelosti grozdja. Vendar pa so podnebne spremembe v številnih vinorodnih regijah razdvojile barvo jagode in aromatični razvoj, zato ta metoda ni več natančna. Poleg tega je treba metodo kopičenja sladkorja za bele sorte še znanstveno raziskati, empirično opazovanje pa je pokazalo, da bi morala delovati tudi pri belih sortah. Tempo zorenja po platoju kopičenja sladkorja je za večino sort še vedno nejasen, vendar je vrednost 20 °Brix grozdja zaradi fiziološkega pomena še vedno zelo dober pokazatelj. Po empiričnih podatkih se pri belih sortah trgateg pogosto opravi v prvih dveh tednih po doseganju datuma platoja, čeprav je ta čas v hladnejšem podnebnem območju lahko daljši. Pri tem je zagotovo potrebno dodatno raziskovalno delo, tako da nas na tem področju še čakajo nova dognanja.

Viri

Allamy, L., Darriet, P., & Pons, A. (2018). Molecular interpretation of dried-fruit aromas in Merlot and Cabernet Sauvignon musts and young wines: Impact of over-ripening. *Food Chemistry*, 266, 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.022>

Antalick, G., Šuklje, K., Blackman, J. W., Schmidtke, L. M., & Deloire, A. (2021). Performing sequential harvests based on berry sugar accumulation (mg/berry) to obtain specific wine sensory profiles. *OENO One*, 55(2). <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2021.55.2.4527>

Antalick, G., Šuklje, K., Blackman, J. W., Schmidtke, L. M., & Deloire, A. (2023). Plasticity of red wine sensory profiles: Improved understanding through grape berry sugar loading profiles. *IVES Technical Reviews*. <https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2023.7797>

Bindon, K., Varela, C., Kennedy, J., Holt, H., & Herderich, M. (2013). Relationships between harvest time and wine composition in Cabernet Sauvignon: 1. Grape and wine chemistry. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1696–1705. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.146>

Carbonic maceration: A closer look at this winemaking technique. (n. d.). Wineanorak. Pridobljeno 26. novembra 2024 na spletnem mestu https://www.wineanorak.com/winescience/carbonic_maceration.htm

Catania, A., Lerno, L., Sari, S., Fanzone, M., Casassa, F., & Oberholster, A. (2021). Impact of micro-oxygenation timing and rate of addition on color stabilization and chromatic characteristics of Cabernet Sauvignon wines. *LWT – Food Science and Technology*, 149, Article 111776. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111776>

Cleaning, storage and maintenance of barrels. (n. d.). The Australian Wine Research Institute. Pridobljeno 26. novembra 2024 na spletnem mestu https://www.awri.com.au/industry_support/

winemaking_resources/storage-and-packaging/packaging-operations/barrel-cleaning-storage-and-maintenance/

Deloire, A. (2013). Physiological indicators to predict harvest date and wine style. 15th Australian Wine Industry Technical Conference, Sydney, 47–50.

Gawel, R., Day, M., Van Sluyter, S. C., Holt, H., Waters, E. J., & Smith, P. A. (2014). White wine taste and mouthfeel as affected by juice extraction and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(41), 10008–10014. <https://doi.org/10.1021/jf503082v>

Goode, J. (2021). The science of wine: From vine to glass (3rd ed.). University of California Press.

Jullien, A., Didier, T., Specht, G., Dumont, A., & Brung, C. (n. d.). The state of the art: Yeast nutrition and protection for reliable alcoholic fermentation. Lallemand. Pridobljeno 26. novembra 2024 na spletnem mestu https://admin.lallemmandwine.com/wp-content/uploads/2014/11/NUTRITION-State-of-the-Art_Yeast-nutrition-and-protection.pdf

Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2010). Comparison of methods for estimating phenolic maturity in grapes. *Analytica Chimica Acta*, 660(1), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.067>

Mančić, S., Stamenković Stojanović, S., Danilović, B., Djordjević, N., Malićanin, M., Lazić, M., & Karabegović, I. (2022). Oenological characterization of native *Hanseniaspora uvarum* strains. *Fermentation*, 8(3), 92. <https://doi.org/10.3390/fermentation8030092>

Nordestgaard, S. (2017). Pre-fermentation heating of red grapes. *Grapegrower & Winemaker*, 673, 54–61. Pridobljeno 26. novembra 2024 na spletnem mestu <https://www.awri.com.au/wp-content/uploads/2017/03/1897-nordestgaard-ANZGW-637-2017.pdf>

O’Kennedy, K., & Reid, G. (2008). Yeast nutrient management in winemaking. *Australian & New Zealand Grapegrower and Winemaker*, 50–56. http://vinosuperiore.com/wp-content/uploads/2014/05/Yeast_nutrient_in_winemaking_starting.pdf

Pascal, C., Diéval, J.-B., & Vidal, S. (2021). Predicting post-bottling sulfite concentration and wine shelf life. *Infowine*. Pridobljeno 26. novembra 2024 na spletnem mestu <https://www.infowine.com/en/predicting-the-post-bottling-sulfite-concentration-evolution-and-wine-shelf-life/>

Press operation & press fractions. (n. d.). Ridge Vineyards. Pridobljeno 26. novembra 2024 na spletnem mestu <https://www.ridgevine.com/about/news/press-operation-press-fractions/>

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). Handbook of enology: Vol. 2. The chemistry of wine – stabilization and treatments. Wiley. <https://doi.org/10.1002/0470010398>

Sáenz-Navajas, M.-P., Campo, E., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010).

Effects of nonvolatile matrix on aroma perception of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5574–5585. <https://doi.org/10.1021/jf904377p>

Schmidtke, L. M., Clark, A. C., & Scollary, G. R. (2011). Micro-oxygenation of red wine: Techniques, applications and outcomes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(2), 115–131. <https://doi.org/10.1080/10408390903434548>

Shahood, R., Torregrosa, L., Savoi, S., & Romieu, C. (2020). First quantitative assessment of growth, sugar accumulation and malate breakdown in a single ripening berry. *OENO One*, 54(4). <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2020.54.4.3787>

Šuklje, K., Carlin, S., Stanstrup, J., Antalick, G., Blackman, J. W., Meeks, C., Schmidtke, L. M., & Vrhovsek, U. (2019). Unravelling wine volatile evolution during Shiraz grape ripening. *Food Chemistry*, 277, 753–765. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.135>

Švajger, A. (2023). Vpliv tehnološke zrelosti ... Modra frankinja [Magistrsko delo]. Univerza v Ljubljani. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=146847>

Tilbrook, J., & Tyerman, S. D. (2008). Cell death in grape berries: Varietal differences. *Functional Plant Biology*, 35(3), 173–182. <https://doi.org/10.1071/FP07278>

Ting, J. (2021). Micro-oxygenation. Winemakers Research Exchange. Pridobljeno 26. novembra 2024 na spletnem mestu <https://winemakersresearchexchange.com/learn/micro-oxygenation>

Whole bunch fermentations and use of stems in red winemaking. (n. d.). Wineanorak. Pridobljeno 26. novembra 2024 na spletnem mestu <https://www.wineanorak.com/wholebunch.htm>

Windholtz, S., Nioi, C., Thibon, C., Bécquet, S., Vinsonneau, E., Coulon, J., & Masneuf-Pomarède, I. (2023). Bioprotection as an alternative to SO₂ in pre-fermentation. IVES Technical Reviews. <https://doi.org/10.20870/IVES-TR.2023.7763>

Winemaking treatment – cold soak. (n. d.). The Australian Wine Research Institute. Pridobljeno 26. novembra 2024 na spletnem mestu https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/winemaking-practices/winemaking-treatment-cold-soak/

9.

TRENDI V VINARSKI OPREMI

Marko Lesica

Center za raziskave vina, Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo, Univerza v Novi Gorici, Glavni trg 8,
Vipava
marko.lesica@ung.si

Uvod

Trgatev je za vinarje ključno opravilo celoletnega dela v vinogradu. Vinarji oziroma vinogradniki se zadnja leta spoprijemajo z vse večjimi izzivi pri pridelavi grozdja ter kljubujejo čedalje zahtevnejšim vremenskim pojavom, kot so suše, toča, vročinski valovi, poplave ipd., ter posledično raznim škodljivcem in boleznim vinske trte.

Trgatev in kasnejša predelava grozdja predstavljata v pridelavi vina prelomnico. Način trgatve, prevoz in prevzem grozdja, pa vse do stiskanja grozdja so ključni koraki, ki se odražajo na končni kakovosti vina. Vinarji odgovarjajo za to, da s pravilnim pristopom in najboljšo tehnologijo to kakovost ohranijo.

Trgatev

Uspešno izvedena trgatev temelji na zdravem grozdju, pa tudi na izpolnjenih naslednjih pogojih:

- grozdje naj bo pobrano kar se da hitro;
- trgatev naj bo izvedena pri kar se da nizkih temperaturah (v zgodnjih jutranjih urah, ponoči), ker s tem preprečimo/omilimo neželene kemijske in mikrobiološke procese v začetnih postopkih pridelave vina;
- pri trgatvi naj bo grozdje čim manj poškodovano (manjše gajbice);
- kratka prevozna pot od vinograda do kleti;
- dodatno hlajenje grozdja v hladilnicah ali hitra predelava;
- ročna ali strojna trgatev; ročna trgatev ima ključno prednost, da omogoča selekcijo grozdja že v vinogradu.



Slika 1. Trgatev v gajbice (vir: Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo UNG).

Strojna trgatev postaja vse pomembnejša zaradi naraščajočih proizvodnih stroškov in pomanjkanja delovne sile, s čimer se srečuje večina vinogradnikov v zadnjih letih (Hendrickson in sod., 2016). Pri strojni trgatvi se srečujemo z mehanskimi poškodbami jagod zaradi stresanja in ločevanja jagod od pecljevine, zanemarljive pa niso niti poškodbe infrastrukture v vinogradu, predvsem pri starejših vinogradih. Strojna trgatev v primerjavi z ročno ni tako selektivna, saj je pri njej v grozdje in s tem drozgo možen vnos nedozorelih ali plesnivih jagod ter drugih snovi, ki niso grozdje (Arfelli in sod., 2010; Hendrickson in sod., 2016; Uzquiza in sod., 2015). Problematika oksidacije zaradi poškodb jagod ter encimskih procesov in razvoja neželenih mikroorganizmov je lahko veliko tveganje za kakovost (skupaj z visokimi temperaturami grozdne mase in dolgo prevozno potjo).



Slika 2. Ostanek pecljevine na vinski trti po strojni trgatvi (vir: Fakulteta za vinogradništvo in vinarstvo UNG).

Za prevoz strojno trganega grozdja iz vinograda do kleti obstajajo posebne inertizirane cisterne, ki omogočajo zaščito drozge z inertnimi plini in neposredno ločevanje tekočega dela od grozdnih jagod. S [klikom na to povezavo](#) si lahko na YouTube kanalu ogledate primer predelave grozdja v kleti, ki je bilo obrano s strojno trgatvijo.

Uporaba najsodobnejših tehnologij strojne trgatve skupaj z optimalnim časom izvedbe trgatve in hitro predelavo lahko z vidika kakovosti konkurira tudi ročni trgatvi.

Prevzem grozdja

Prevzem grozdja je prvi korak v kleti. Prevzemna linija mora biti prilagojena načinu trgatve in prevoznim posodam. Dober prevzem pomeni, da ne poškodujemo grozdnih jagod, pečk in pecljev, tako da bi bila pozneje možna neželena ekstrakcija snovi iz teh delov. Poznamo več načinov prevzema.

Pri ročni trgatvi grozdje prispe v klet v manjših (do 20 kg) ali večjih zabojih (do pribl. 300 kg) ali v posebnih traktorskih prikolicah.

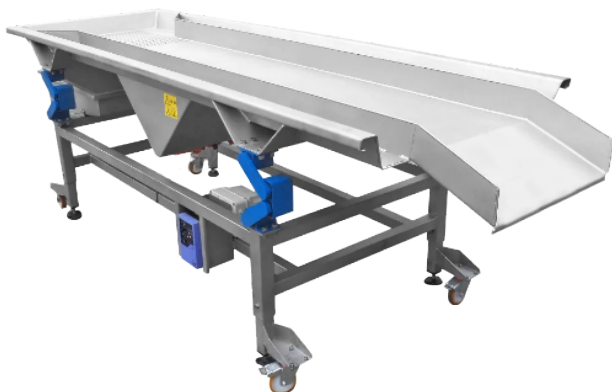
Grozdje se v tej fazi lahko strese v zbirno korito, ki s tehniko tresenja prestavlja grozdje naprej, ne da bi ga pri tem poškodovalo (kot se to zgodi pri prenosu s polžem), do naslednje faze.



Slika 3. Praznjenje prikolice v kleti (vir: Klet Brda).

Sortirne mize

Grozdje iz manjših ali večjih zabojev ročno ali s posebnimi dvigali pretresemo na selekcionirno ali sortirno mizo, na kateri poteka ročno sortiranje.



Slika 4. Selekcionirna miza (vir: Podjetje Šraml).

Pecjalniki

Rotirajoči pecjalniki

Grozdje gre neposredno ali prek zbirnega korita na pecjalnik, ki z lastnim polžem enakomerno dovaja grozdje. Pecjalnik je sestavljen iz vrtečega se koša (npr. iz polietilena, različne dimenzije lukenj) in vrteče se gredi z gumijastimi konicami.

Dobri pecjalniki:

- imajo možnost nastavitve hitrosti vrtenja posameznih delov (polž, koš, gred), s čimer optimiziramo delovanje pecjalnika in znižamo stopnjo poškodovanosti grozdnih jagod in pecljev;
- dober pecjalnik mora ločiti grozdne jagode od peclja tako, da so čim manj poškodovane ter da peclji ostanejo nepoškodovani in suhi – ni izločanja trpkih snovi;
- razmerje hitrosti vrtenja med gredjo in košaro je običajno med 1 : 8 in 1 : 10, hitrost vrtenja gredi pa je načeloma od 350 do 500 RPM, odvisno od proizvajalca (Christmann in Freund, 2022);
- najboljši pecjalniki imajo tudi nižje število obratov (manj kot 170 obratov na minuto) ter se štejejo za prizanesljive do grozdja;
- dobri pecjalniki so zasnovani tako, da med delovanjem odstranijo čim več nečistoč (listje, koščke pecljev, suhe jagode ipd.);
- omogočeno imajo hitro in enostavno čiščenje.



Slika 5. Pecljalnik
(vir: Podjetje
Šraml).

Vibrirajoči pecljalniki

Visokoamplitudna vibracijska kletka, vibrirajoče ročice ali vibracijski bobni, v katere prehaja grozdje, omogočajo ločevanje jagod od pecljev z minimalno poškodbo grozdnih pecljev. Taki pecljalniki nimajo vrteče se gredi in metlic ali rotirajočega koša. Zagotavljajo učinkovito in kakovostno ločevanje pecljev ob zmanjševanju količine izcedka soka in ohranjajo cele peclje.

Stopnja ostankov rastlinskih delov se v primerjavi s klasičnimi pecljalniki znatno zmanjša. Te pecljalnike ponujajo proizvajalci, kot sta Bucher Vaslin in Pellenc USA (njihove fotografije najdemo na njihovih spletnih straneh – [Bucher Vaslin](#), [Pellenc USA](#)). Seveda jih ponujajo tudi drugi proizvajalci.

Pecljalnik Scharfenberger EuroSelect

Leta 1999 je podjetje Socma ustvarilo patent za pecljalnik, ki je učinkovitejši od rotacijskega. Ta naj bi zmanjšal količino ostankov pecljev, ki končajo med grozdom z 1,5 % na 0,9 % (m/m). Med pecljanjem dobimo tudi manjše količina soka poškodovanih jagod. Pecljalnik je sestavljen iz mrežnega tekočega traka, po katerem gre grozdje čez štiri posebne krtače, ki se vrtijo v isti smeri kot transportni trak in odstranijo jagode iz peclja (Nordestgaard, 2015).

Pecljalnik Milani Estasi

Leta 2006 je podjetje Milani s.r.l. izdelalo pecljalnik, pri katerem se grozdje nalaga na tekoči trak z bodicami, ta pa grozdje odloži na posebno rešetko, ki se pomika od leve proti desni. Bodice premikajo grozdje po rešetki naprej, medtem pa se jagode odstranijo s pecljev (Nordestgaard, 2015).

Pecljalnik Armbruster Rotovib

Leta 2006 je podjetje Armbruster GmbH izdelalo pecljalnik, pri katerem ima rotirajoča os s palicami zraven

še rahle vibracije, kar omogoča, da deluje pri manjših obratih. Tovrstna tehnična rešitev pripomore k manjši poškodbi jagod in vsebnosti ostankov preostalih rastlinskih delcev (Nordestgaard, 2015).

Sortirni stroji

Grozdje gre najprej na pecljalnik, nato pa grozdne jagode po tekočem traku potujejo skozi sortirni stroj. Že sam pecljalnik ima lahko posebne valjčne mize, ki omogočajo odstranjevanje pecljev, listov, poškodovanih in suhih jagod ter tekočine, tako da lahko odstranimo številne nečistoče in neželene dele.

Grozdne jagode nato potujejo po traku do sortirnega stroja, ki s pomočjo različnih kamer in zračnih šob izločijo posamezne delce, pri čemer:

- kamere na podlagi fluorescence določijo jagode, ki vsebujejo klorofil (nezrelo grozdje);
- kamere na podlagi infrardeče svetlobe določijo druge neželene delce, kot so na primer žuželke, anorganski in drugi organski delci (kamenje, les, plastika ipd.);
- nekateri kompleksnejši stroji lahko uporabljajo še tretjo vizualno kamero, ki loči delno zrelo grozdje (največkrat za najkakovostnejša rdeča vina).

Sortirne stroje ponujajo različni proizvajalci – na spletu najdemo tudi ocene teh naprav (Starr, 2019).

Prenos grozdja/drozge od prevzema do stiskalnice/maceratorja

Najboljše vinske kleti so zgrajene tako, da za prenos grozdja iz prevoznih posod do stiskalnice uporabljajo gravitacijo. V praksi to pomeni, da takšna predelava ne pozna pretočnih črpalk.

Prevzem in predelava grozdja se izvaja na več ravneh:

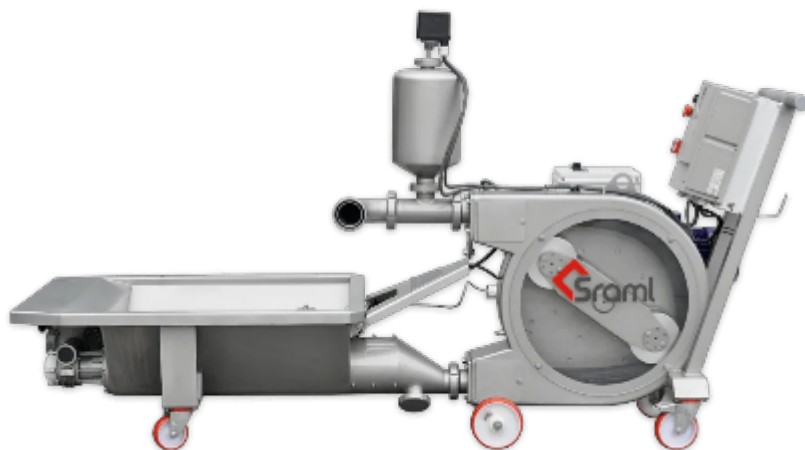
- Grozdje se pripelje na najvišjo točko in se nato prestavlja do različnih strojev (pecljalnik, sortirni stroj, drozgalnik, stiskalnica ...) s prostim padom.
- Za prenos grozdja oziroma grozdnih jagod uporabljamo prenosne dvizne trakove ali črpalke. Uporaba teh strojev lahko vpliva na povečanje motnih delcev kasneje v moštu.



Slika 6.: Dvižni trak Šraml (vir: Podjetje Šraml).

Peristaltične črpalke

Peristaltične črpalke zagotavljajo minimalne poškodbe pri prenosu drozge. Nežen in stalen tok omogoča prečrpavanje tako drozge kot vina brez stika z mehanskimi komponentami. Črpalka je sestavljena iz gumijaste cevi, ki se s pomočjo kolesc stiska in potiska medij naprej.



Slika 7.
Peristaltična črpalka Šraml (vir: Podjetje Šraml).

Vijačne črpalke

Pri vijačnih ali monočrpalkah elektromotor poganja ekscentrični polž. Rotorji so običajno izdelani iz nerjavnega jekla v kombinaciji s statorjem iz gume. Črpalka ustvarja konstanten pretok brez pulziranja, tresljajev in emulgiranja črpanega medija.



Slika 8. Vijačna črpalka Šraml (vir: Podjetje Šraml).

Rotacijske črpalke z gumijastim

impelerjem

Obstajajo različne izvedbe črpalk, sestavljene iz statorja in gumijastega rotorja, ki so iz materialov, primernih za uporabo v živilski industriji (običajno nitrilna guma). Namenjene so prečrpavanju tekočin različne viskoznosti in tekočin, ki vsebujejo manjše organske delce, do premera 50 mm (drozga). Delujejo brez tresljajev, emulgiranja ali poškodovanja delcev. Samosesalna črpalka lahko doseže tudi do 8 metrov suhe globine. Načeloma je zelo odporna na temperaturo (od -10°C do 90°C) in tlak (od 4 do 10 barov, odvisno od modela).

Vinifikacija

Maceratorji in vinifikatorji

Osnovni namen maceracije je izluževanje snovi iz jagodne kožice grozdja, kot so arome, minerali, fenolne snovi, ki bistveno vplivajo na organoleptične lastnosti končnega vina. S tehnološkega vidika nam maceracija omogoča tudi lažje in hitrejše stiskanje drozge ter povečanje kapacitete prevzema grozdja med trgatvijo.

V osnovi delimo maceratorje na posode za:

- krajše hladne maceracije brez fermentacije – za bela in rosé vina;
- daljše maceracije in fermentacije – rdeča vina.

Pri krajši maceraciji je pomembno, da je taka posoda opremljena s hlajenjem. Po navadi so to inoks cisterne oziroma posode. Tovrstne posode imajo lahko vgrajeno tudi sito, ki omogoča, da pri praznjenju takoj odstranimo samotok in v stiskalnico prenesemo že odcejeno drozgo.

Pri maceratorjih oziroma vinifikatorjih za rdeča vina so zahteve drugačne, saj v teh primerih poteka fermentacija in potapljanje klobuka. To predstavlja ključni proces za uspešno izluževanje snovi iz jagodnih kožic.

Od vinifikatorja pričakujemo, da:

- pripomore k čim boljši selektivni ekstrakciji;
- intenzivira in stabilizira barvne substance;
- omogoča tehnološko ločitev faz maceracije;
- omogoča nastavitve temperature;
- ima dobro sposobnost homogenizacije – razbijanja klobuka;
- omogoča prelivanje;
- omogoča kontrolirano aeracijo;
- se enostavno in hitro prazni;
- je računalniško voden.

Proizvajalci ponujajo različne rešitve:

- PRELIVNI vinifikatorji – prečrpavanje mošta in konstantno prelivanje klobuka;
- vinifikator VOLVOTANK – mešanje klobuka s pomočjo vertikalne vrteče se lopute;
- vinifikator GANIMEDE – mešanje klobuka s pomočjo lastnega CO₂;
- POTOPNI vinifikatorji – klobuk potapljajo s pomočjo loput, ki so montirane na pnevmatskih cilindrih ali na vijačnih oseh;
- vinifikator ONDA – potapljanje in prelivanje klobuka s pomočjo inertnih plinov;
- ROTIRAJOČI HORIZONTALNI vinifikatorji;
- MEŠALNI VINIFIKATORJI – z vgrajenimi mešali na več ravneh v posodi;
- vinifikatorji SELECTOR SYSTEM – sestavljeni si iz dveh cistern, tako da iz zgornje cisterne spusti mošt v spodnjo in s tem premeša nastali klobuk;
- idr.

Stiskalnice

V procesu stiskanja imamo grozdje v različnih oblikah – kot cel grozd, razpecljane jagode, drozgane jagode, macerirano drozgo in fermentirano drozgo. Princip stiskanja je ločevanje grozdnega soka od trdnih delcev jagod, pri čemer ločujemo različne frakcije grozdnega soka.

Parametri stiskanja so lahko različni glede na sorto, zdravstveno stanje, letnik, tehnologijo itd. Spreminjamo lahko čas stiskanja, tlak stiskanja, število vrtenja in rahljanja tropin, pri tem pa ločujemo lahko različne frakcije mošta, kot so samotok, prvi prešanec, drugi prešanec itd.

Cilj spreminjanje parametrov stiskanja je lahko doseganje višje kakovosti produkta (manj trdnih delcev v grozdnem soku, manj fenolov ipd.) ali povečanje ekonomičnosti procesa, načeloma zaradi slabše kakovosti (krajši časi stiskanja, izplen ...).

Stiskalnice lahko ločimo na več načinov:

- kontinuirne ali šaržne;
- hidravlične, pnevmatske, mehanske;
- horizontalne ali vertikalne.

Odpri ali zaprti sistemi ter vmesne različice

Najbolj razširjen tip stiskalnice je pnevmatska horizontalna stiskalnica. Ta se je uveljavila kot najbolj ekonomična in nežna stiskalnica za grozdje, ki omogoča najhitrejše stiskanje, hitro praznjenje in veliko delovno zmogljivost glede na dimenzijo.

Proizvajalci ponujajo različne izvedbe pnevmatskih stiskalnic:

- stiskalnice zaprtega sistema,
- stiskalnice odprtega sistema.

Stiskalnice imajo v notranjosti vgrajeno napihljivo membrano oziroma platno, ki je načeloma nameščeno na eni polovici bobna, lahko pa se razprostira tudi po skoraj celotnem obodu. V različnih izvedbah imamo različne odtočne možnosti za tekočino. Pri odprtih sistemih so lahko odtočne rešete na površini bobna in na vratcih. Lahko pa imamo odtočne zbirne kanale.



Slika 9. Boben stiskalnice (vir: Podjetje Šraml).

Polnjenje stiskalnice poteka na dva načina – skozi vrata ali prek centralnega polnjenja. Centralno polnjenje omogoča večjo kapaciteto stiskalnice ob sočasnem vrtenju bobna in izcejanju soka. Slabost tovrstnega polnjenja je, da dobimo mošt z večjo obremenjenostjo z motnimi delci.

Pri stiskanju se platno s pomočjo kompresorja napihuje in stiska drozgo ob steno. Tekočina izteka po odtočnih kanalih v zunanje zbirno korito. Za hitrejše stiskanje in boljši izkoristek se v posameznem ciklu

tropine razrahljajo, tako da se platno najprej prisesa s pomočjo vakuumu nazaj v prvotni položaj in boben zavrti. Cikel stiskanja se ponovi. Pri nadaljnjih ciklih se zvišuje tudi tlak. Začetni tlak stiskanja v prvih ciklih je običajno 0,2 bar, nato pa se tlak s cikli zvišuje do maksimalno 2,0 bar.

Stiskalnice zaprtega sistema

Pri teh izvedbah lahko stiskalnico hermetično zapremo in jo koristimo kot posodo za maceracijo. Odtočne kanale zapremo z ventilom ali čepi, stiskalnico lahko inertiziramo s plini (npr. z N₂, CO₂) in drozgo po želji tudi hladimo. Stiskalnica je lahko opremljena z dvojnimi plaščem, ki omogoča hlajenje/segrevanje drozge. Tovrstne stiskalnice imajo eno ključno slabost, kar predstavlja čiščenje, ki je zelo oteženo, zato se priporoča nadgradnja s sistemom CIP in protitočnim razpihovanjem drenažnih kanalov (Christmann in Freund, 2022).

Poznamo tudi stiskalnice, ki delujejo pod vakuumom. Tovrstne izvedbe stiskalnic temeljijo na tem, da se stiskanje izvede s podtlakom in skupaj z inertnimi plini.

Stiskalnice odprtega sistema

To so stiskalnice, ki jih ne moremo hermetično zapreti. Pri takih stiskalnicah priporočamo le krajšo maceracijo drozge. V primerjavi z zaprtim sistemom ni večjih razlik pri samem procesu stiskanja. Lahko govorimo o nekoliko hitrejšem iztekanju soka zaradi načeloma večje drenažne površine in o lažjem čiščenju stiskalnice po končanem delu.

Druge stiskalnice

Poznamo dve kategoriji, in sicer vertikalne stiskalnice, ki se uporabljajo predvsem z vidika tradicije (na primer za osnovno vino za penine in rdeča vina) oziroma pri manjših proizvajalcih, ter kontinuirane stiskalnice, pomembne za velike proizvajalce, ki potrebujejo velike kapacitete predelave v času trgatve.

Uporaba teh stiskalnic privede do mošta, ki je bolj obremenjen s trdnimi delci in vsebuje več skupnih fenolov.

Vinska posoda

Vinska posoda je osnovni pripomoček v kleti za fermentacijo, zorenje in stabilizacijo vina. Poznamo različne vinske posode, med katerimi so najbolj razširjene vinske posode, narejene iz:

- nerjavnega jekla – inoksa,
- lesa,
- betona,
- plastike,
- gline,
- stekla,

- emailiranega železa.

Tradicionalno so se vina pridelovala in shranjevala predvsem v sodih iz nerjavnega jekla in v hrastovih sodih. V zadnjem desetletju se pojavljajo nove posode iz različnih materialov, kot so beton, glina, granit, polietilen itd., ter različnih oblik (jajčaste, kroglaste, tulipanaste itd.), ki spreminjajo tudi podobo vinske kleti (Ubeda in sod., 2022).

Pri izdelavi vinske posode je zelo pomembna kakovost materiala, obdelava materiala, kakovost izdelave in dizajn. Omenjene lastnosti vplivajo na končno ceno izdelka, ki je med posameznimi proizvajalci vinske posode zelo različna.

Vinske posode se opremlja z raznimi senzorji (npr. za temperaturo, vsebnost raztopljenega kisika), z računalniško vodenimi hladilnimi sistemi (plaščno hlajenje, rebrasto hlajenje), z izolacijo, s sistemi za čiščenje (CIP, šobe za izpiranje), sistemi za inertizacijo (inertni plini), z mešali itd.

Posode so lahko iz različnih materialov z vidika funkcionalnosti – predvsem kombinacija inoksa in lesa (tudi drugi materiali).

Vinske posode (predvsem inoksirane) so zaradi optimizacije izrabe prostora lahko narejene oziroma zložene v več ravneh (večnadstropne).

Poznamo posebno oblikovane transportne posode, ki jih lahko prekladamo z viličarji za potrebe prevoza vina oziroma potrebe predelave grozdja/mošta.

Ena glavnih značilnosti vinskih posod je zmožnost prepuščanja kisika, ki ima velik učinek na zorenje vin. Pri posodah iz nerjavnega jekla prepuščanja kisika ni. Materiali, kot so beton, glina in polietilen, pa prepuščajo kisik skozi stene, kot se to dogaja pri leseni posodi. Ključna razlika med temi materiali in lesom je, da je pri lesu značilen še prenos snovi iz njega (hlapne spojine, tanini) (Ubeda in sod., 2022).

Pri leseni posodi je prenos kisika ocenjen na od 12 do 45 mg/L/leto (Del Alamo-Sanza in sod., 2017; Nevares in sod., 2014; Singleton, 1995; Vivas and Glories, 1997).

Pri betonskih posodah pa je prenos kisika ocenjen na od 5 do 36 mg/L/leto, pri glinenih posodah od 10 do 25 mg/L/leto (Nevares in Alamo-Sanza, 2021).

Druga oprema

Mikrooksigenacija

Mikrooksigenacijske sonde za volumetrično dodajanje kisika omogočajo raztapljanje kisika v vinu. Z računalniško vodenimi dozirnimi bati lahko uravnavamo količino dodanega kisika za vsako cisterno posebej. Poznamo manjše prenosne sisteme ali fiksne centralno vodene izvedbe. Tehnologija je zanimiva skupaj s spremljanjem redoksi potenciala vina.

Ionski izmenjevalci

Odstranjevanje K^+ in Ca^{2+} omogoča tartratno stabilizacijo vina in nižanje vrednosti pH.

Ultrazvočna tehnologija

Uporaba ultrazvoka visoke moči in nizke frekvence pri pridelavi vina poveča ekstrakcijo spojin iz grozdja. Tehnologija deluje po načelu fragmentacije citoplazemske celične membrane in hitrejšega izluževanja snovi (Agrovin, 2022).

Kontrolni paneli, dozatorji, senzorji

Razvoj opreme v kleti gre vse bolj v popolno avtomatiziranje proizvodnega procesa. Zato so posamezne cisterne opremljene s številnimi senzorji in aparaturami, ki omogočajo merjenje vsebnosti kisika, redoks potenciala, temperature, fermentacijske kinetike, mešanje in homogenizacijo drozge, mikro/makrooksidacije, dozatorjev za enološka sredstva in inertnih plinov ipd.

Viri

Agrovin. (10. junij 2022). *Ultrawine Perseo*. Pridobljeno 25. novembra 2024 na spletnem mestu <https://agrovin.com/en/technology/ultrawine-perseo/>

Arfelli, G., Sartini, E., Bordini, F., Caprara, C., & Pezzi, F. (2010). Mechanical harvesting optimization and postharvest treatments to improve wine quality. *OENO One*, 44(2), Article 2. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2010.44.2.1461>

Bucher Vaslin. (b. l.). *Sorting equipment*. Pridobljeno 25. novembra 2024 na spletnem mestu <https://www.buchervaslin.com/en/sorting/>

Starr A. (2019) *Product Review: Optical Grape Sorters for 2019 Harvest*. (n. d.). Pridobljeno 25. novembra 2024 na spletnem mestu <https://www.winebusiness.com/wbm/article/215936>

Christmann, M., & Freund, M. (2022). 15—Advances in grape processing equipment. In A. G. Reynolds (Ed.), *Managing Wine Quality (Second Edition)* (pp. 661–704). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102067-8.00007-5>

Hendrickson, D. A., Lerno, L. A., Hjelmeland, A. K., Ebeler, S. E., Heymann, H., Hopfer, H., Block, K. L., Breneman, C. A., & Oberholster, A. (2016). Impact of Mechanical Harvesting and Optical Berry Sorting on Grape and Wine Composition. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67(4), 385–397. <https://doi.org/10.5344/ajev.2016.14132>

Nordestgaard, S. (2015). Developments in destemming and sorting technology. *Grapegrower and Winemaker*, 617: 96-102 ; 618: 27-29. <https://www.awri.com.au/wp-content/uploads/2019/01/Nordestgaard2015-DestemmingSortingPart1and2.pdf>

Pellenc USA. (b. l.). *High capacity de-stemming/sorting*. Retrieved November 25, 2024, from <https://pellencus.com/products/winery/high-cap-destem/>

Singleton, V.L., 1995. Maturation of wines and spirits – comparisons, facts, and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46(1), 98–115.

Ubeda, C., Peña-Neira, Á., & Gil i Cortiella, M. (2022). Combined effects of the vessel type and bottle

closure during Chilean Sauvignon Blanc wine storage over its volatile profile. *Food Research International*, 156, 111178. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111178>

Uzquiza, L., González, R., González, M. R., Fidelibus, M. W., Martín, P. (2015). A preharvest treatment of ethephon and methyl jasmonate affects mechanical harvesting performance and composition of “Verdejo” grapes and wines. *European Journal of Horticultural Science*, 80(3), 97–102. <https://doi.org/10.17660/eJHS.2015/80.3.1>

Vivas, N., Glories, Y., 1997. Modelisation et calcul du bilan des apports d'oxygene au cours de l'elevage des vins rouges. II. Les apports lies au passage d'oxygene au travers de la barrique. *Progr es Agricole et Viticole*, 114(13–14), 315–316.

This is where you can add appendices or other back matter.



 To delo je objavljeno pod licenco Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno-Deljenje pod enakimi pogoji 4.0 Mednarodna licenca (CC BY-NC-SA 4.0). Celotno besedilo licence je na voljo na spletu, na naslovu: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.sl>