

Utjecaj dodatka hidrokoloida i skladištenja na polifenolne i aromatične spojeve u kremi od vina

Marić, Maja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:845170>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Maja Marić

**UTJECAJ DODATKA HIDROKOLOIDA I SKLADIŠTENJA NA
POLIFENOLNE I AROMATIČNE SPOJEVE U KREMI OD VINA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij prehrambenog inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Tehnologija vina

Tema rada je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 30.05.2019.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Anita Pichler

Pomoć pri izradi: Ivana Ivić, mag. ing., asistent

Utjecaj dodatka hidrokoloida i skladištenja na polifenolne i aromatične spojeve u kremi od vina

Maja Marić, 0113136445

Sažetak: Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj dodatka hidrokoloida na aromatične i fenolne spojeve u kremi od vina. U tu svrhu pripravljena je krema od crnog vina Cabernet Sauvignon s dodatkom hidrokoloida guarana, karboksimetilceluloze ili ksantana. U uzorcima je određen sadržaj fenolnih i aromatičnih spojeva, a dobiveni rezultati su uspoređeni međusobno i s netretiranim vinom te s vinom kuhanim bez dodataka. Uzorci su skladišteni na temperaturi od 25 °C kroz tri mjeseca te se u istima također odredio sadržaj fenolnih i aromatičnih spojeva. Polifenoli, antocijani i antioksidacijska aktivnost određeni su spektrofotometrijski, a određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka provedeno je na plinskom kromatografu tvrtke Agilent 5890B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5971A. Za uzorkovanje korištena je metoda mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME).

Ključne riječi: krema od vina, hidrokoloidi, polifenoli, aroma

Rad sadrži: 44 stranica
17 slika
4 tablice
35 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|-------------------------------------|---------------|
| 1. prof. dr. sc. Mirela Kopjar | predsjednik |
| 2. izv. prof. dr. sc. Anita Pichler | član-mentor |
| 3. prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban | član |
| 4. doc. dr. sc. Ante Lončarić | zamjena člana |

Datum obrane: 30.9.2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technologies
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program: Food Engineering
Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Wine technology
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VIII. held on May 30, 2019.
Mentor: Anita Pichler, PhD, associate prof.
Technical assistance: Ivana Ivić, Master of Science

The influence of hydrocolloids addition and storage on phenolic and aroma compounds in wine cream filling
Maja Marić, 0113136445

Summary: The aim of this paper was to examine the effect of hydrocolloid addition on aroma and phenolic compounds in wine cream filling. For this purpose, Cabernet Sauvignon red wine cream filling was prepared with the addition of hydrocolloids guar, carboxymethylcellulose or xanthan. Phenolic and aroma compounds in samples were determined and compared mutually, to the untreated wine and to the wine cooked without additives. The samples were stored at 25 °C for three months and phenolic and aroma compounds were determined again. Polyphenols, anthocyanins and antioxidant activity have been determined spectrophotometrically and the quantitative determination of aroma compounds was carried out on Agilent 5890B gas chromatograph with an Agilent 5971A mass-selective detector. For sampling, solid phase microextraction (SPME) method was used.

Key words: wine cream filling, hydrocolloids, polyphenols, aroma

Thesis contains: 44 pages
17 figures
4 tables
35 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|----------------------------------------|--------------|
| 1. Mirela Kopjar, PhD, full prof. | chair person |
| 2. Anita Pichler, PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. Nela Nedić Tiban, PhD, full prof. | member |
| 4. Ante Lončarić, PhD, assistant prof. | stand-in |

Defense date: September 30, 2019

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Veliko hvala mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Pichler koja mi je pružila priliku izrade diplomskog rada. Hvala na posvećenom vremenu, prenesenom znanju i pomoći pri izradi diplomskog rada.

Hvala i asistentici Ivani Ivić na korisnim savjetima i vremenu koje je izdvojila za pomoć pri izvedbi eksperimentalnog dijela.

Posebna zahvala mojoj mami, baki, djedi i bratu koji su mi pružali podršku tijekom cijelog studija.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. GROŽĐE.....	4
2.1.1. Podrijetlo i botanička svojstva vinove loze	4
2.1.2. Mehanička i kemijska svojstva	4
2.2. VINO.....	6
2.2.1. Kemijski sastav vina	6
2.2.2. Tvari arome	11
2.2.3. Tvari boje	12
2.3. HIDROKOLOIDI	14
2.4. ODREĐIVANJE SASTOJAKA AROME PLINSKIM KROMATOGRAMOM	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	19
3.1. ZADATAK.....	20
3.2. MATERIJALI I METODE	20
4. REZULTATI.....	28
5. RASPRAVA.....	35
6. ZAKLJUČCI	39
7. LITERATURA	41

Popis oznaka, kratica i simbola

SPME	Solid Phase Microextraction (mikroekstrakcija na čvrstoj fazi)
GC/MS	Plinska kromatografija s maseno-selektivnim detektorom
HG	hidrokolid guar
HC	hidrokolid karboksimetilceluloza
HX	hidrokolid ksantan

1. UVOD

Prehrambeni proizvod dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od grožđa pogodnog za preradu naziva se vino (Zakon o vinu, NN 32/19). Na kompleksan sastav samog vina značajno utječu karakteristike sorte, geografski položaj, uvjeti odvijanja procesa fermentacije i skladištenje. Tijekom pravilnog skladištenja vina nema značajnih promjena u kemijskom sastavu, dok se tvari arome i tvari boje uvelike mijenjaju. Vina se najčešće razvrstavaju po kvalitetnim kategorijama ovisno o kakvoći grožđa, stupnju zrelosti, količini alkohola i organoleptičkim svojstvima.

Jedna od najpoznatijih vinskih sorti crnog grožđa nastala križanjem Cabernet Franca i Sauvignona bijelog je Cabernet Sauvignon. Bobica Cabernet Sauvignona je mala, debele pokožice, tamno crne boje, a u dobrim uvjetima dozrijevanja vrlo aromatična.

Reološko svojstvo tekućih namirnica je viskoznost na koje osim sastava namirnice utječu čimbenici poput temperature, pH, udjela suhe tvari, brzine smicanja, vrijeme smicanja, uvjeti pripreme i samo skladištenje uzoraka.

Za pravilno vođenje procesa proizvodnje i kontrolu kvalitete potrebno je poznavanje reoloških svojstava hrane te utjecaj različitih aditiva (hidrokoloida). Hidrokoloidi su dugolančani polimeri koji se upotrebljavaju najčešće u prehrambenoj industriji zbog sposobnosti ugušćivanja, želiranja, stabilizacije kao i za kontrolu rasta kristala leda.

Cilj ovog istraživanja je ispitati utjecaj dodatka hidrokoloida i skladištenja na aromatične i fenolne spojeve u kremi od vina. U tu svrhu priredila se krema od crnog vina Cabernet Sauvignona s dodatkom hidrokoloida (guar, karboksimetilceluloza, ksantan) te su se uzorci skladištili na temperaturi 25 °C kroz tri mjeseca. Dobiveni rezultati uspoređeni su s netretiranim vino te vinom kuhanim bez dodatka hidrokoloida.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. GROŽĐE

2.1.1. Podrijetlo i botanička svojstva vinove loze

Vinova loza (lat. *Vitis vinifera*) je jedna od najranije kultiviranih biljnih vrsta. Prema kodeksu botaničke kulture pripada porodici *Ampelideae* ili *Vitaceae*. Porodica je karakteristična po povijušama vitkog stabla, koje se sa svojim viticama oslanjaju, penju ili pužu po zemlji. Cvjetovi mogu biti jednospolni ili dvospolni i skupljeni su u svat ili grozd. Za vinogradarsku proizvodnju najvažniji rod je rod *Vitis* kojeg čine dva podroda *Euvitis* i *Muscadinia*.

Rod *Euvitis* može se podijeliti na 40 azijskih, 30 američkih i 1 euroazijsku vrstu. Euroazijska vrsta (*Vitis vinifera*) djeli se na *Vitis vinifera* var. *silvestris* (europska divlja loza) i *Vitis vinifera* var. *sativa* (europska kultivirana loza). Sorte vinove loze za proizvodnju vina moraju pripadati vrsti *Vitis vinifera* ili križancima *Vitis vinifera* s drugim vrstama roda *Vitis*. Od 16 američkih vrsta loze najvažnije podloge su: *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, *Vitis berlandieri*. Američka loza koristi se kao podloge za europske vinske loze. Pri odabiru bitno je odabrati odgovarajuću podlogu prema vrsti tla i bujnosti jer bujnost podloge određuje bujnost i rodnost plemke.

Osim vinove loze roda *Vitis*, postoje i hibridi vinove loze, kao što su: američko-američki hibridi, europsko-američki hibridi i kompleksni hibridi. Dobivaju se namjerno ili su nastali slučajnim oprašivanjem te su prilagodljiviji različitim klimatskim uvjetima i otporniji na bolesti, kao što su: filoksera, peronospora, pepelnica (Zoričić, 1996.; Prce, 2014.).

2.1.2. Mehanička i kemijska svojstva

Udio pojedinih dijelova grozda ovisi o nizu čimbenika, kao što su: sorta, klimatski uvjeti, podneblje, zdravstveno stanje te sam stupanj zrelosti grožđa, i iz toga razloga se ne može standardizirati. Postotni odnos pojedinih dijelova je bitan za količinu i kvalitetu samog vina.

Grozd se sastoji od bobica u kojem svaka zasebno čini plod koji se nalazi na peteljkovini. Prema tome, grožđe je zdrav, zreo, prezreo, prosušen ili prirodno smrznut plod vinove loze koji služi za preradu i proizvodnju vina.

Peteljka predstavlja skelet grozda. Osnovni dio peteljke sadrži više ili manje grana, a završava s peteljčicama koje nose cvjetove koji nakon oplodnje dozrijevaju u bobice. Sam tip grozda ovisi o duljini peteljčica. Ako su peteljčice duge, bobice su razmaknute jedna od druge, a grozdovi su rastresiti, a ako su peteljčice kratke, grozdovi su zbijeni. Rastresiti grozdovi su karakteristični za stolno grožđe, dok vinski kultivari imaju više zbijene grozdove. Peteljkovina služi za provođenje hranjiva do bobica. Što je manje peteljkovine, to je veće iskorištenje grozda. Čini tek oko 2-5% ukupnog udjela, ali ima znatan utjecaj na kvalitetu mošta i vina. U moštu s peteljkovinom, zabilježeno je povećanje polifenola (posebno tanina) čak do 25%. Peteljkovina je siromašna šećerom, ima nisku realnu kiselost (pH iznad 4), a na mineralni dio otpada 5-6% (kalij čini polovinu postotka).

Bobica, glavni dio grozda, većinskim dijelom sastoji se od mesa (75 - 85%), sjemenke (3 -5%) i kožice (7 - 10%). Kožica ima 6 do 10 slojeva. U kožici iza vode (60-80%), celuloze (3-4%), minerala (2-4%), ima najviše bojila (od 1 pa čak i do 15% izraženo kao ukupni polifenoli) i tvari arome. Također, ima i 3 - 7% kiselina, 1 - 3% šećera i 1,5 - 5,2% dušičnih tvari. Kemijski sastav kožice ima veliki utjecaj na kvalitetu vina jer sadrži tvari arome i boje, te daje vinima karakterističan okus.

Bobica ovisi o sorti, može biti besjemena ili može sadržati od 1 do 4 sjemenke. Sjemenka se sastoji od masne jezgre koju okružuje drvena ljuska odjevena taninskom kutikulom. Kao i kod kožice, tako i kod sjemenke, najveći udio otpada na vodu (25 - 50%), 30 - 36% na šećere, 12 - 20% na ulje koje biljka sprema kao rezervnu hranu u klici. Tanina (oko 5%) i minerala (oko 3%) ima znatno manje, a tehnologa zanima upravo njihova nazočnost.

Meso bobice, zbog velikih stanica s finom celulozno pektinskom membranom, pretežno sačinjava tekuća faza ili mošt. Na membrane otpada 0,5% mase, a ostalo je čisti mošt. Gustoća ovisi o sadržaju šećera te je najveća kod prezrelog grožđa. Meso bobice razlikuje se po sastavu i strukturi pa tako imamo tri zone: središnju koja je najbliža sjemenki, međuzonu (najbogatiju šećerima i vinskom kiselinom), te perifernu. Po kemijskom sastavu sadrži 75 - 80% vode, 10 - 27% šećera, 0,1 - 0,4% tanina, 0,5 - 1% kiselina, 0,02 - 0,15% dušične tvari, 0,3 - 0,65% celuloze i 0,3 - 1% mineralnih tvari (Zoričić, 1996.; Prce, 2014.). Sjemenka, prema kemijskom sastavu, sadrži najviše vode (25-50%), ugljikohidrat (30-35%), ulja (12-20%), zatim mineralnih tvari (2-5%) te tanina (3-6%) (Zoričić, 1996.).

2.2. VINO

Prema Zakonu o vinu (NN 32/19), vino podrazumijeva sljedeće kategorije: vino, mlado vino u fermentaciji, likersko vino, pjenušavo vino, kvalitetno pjenušavo vino, kvalitetno aromatično pjenušavo vino, gazirano pjenušavo vino, biser vino, gazirano biser vino, vino od prosušenog grožđa, vino od prezrelog grožđa.

Prema Zakonu o vinu (NN 32/19), mošt podrazumijeva sljedeće kategorije proizvoda: mošt, djelomično fermentirani mošt, djelomično fermentirani mošt ekstrahiran iz prosušenog grožđa, koncentrirani mošt, rektificirani koncentrirani mošt.

Prema Zakonu o vinu (NN 32/19), vina u odnosu na organoleptička svojstva moraju zadovoljavati uvjete u pogledu izgleda (boje i bistroće), mirisa i okusa.

Prema Zakonu o vinu (NN 32/19), na tržište se mogu staviti sljedeće kategorije proizvoda od grožđa, mošta i vina: vino, mlado vino u fermentaciji, likersko vino, pjenušavo vino, kvalitetno pjenušavo vino, kvalitetno aromatično pjenušavo vino, gazirano pjenušavo vino, biser vino, gazirano biser vino, mošt, djelomično fermentirani mošt, djelomično fermentirani mošt ekstrahiran iz prosušenog grožđa, koncentrirani mošt, rektificirani koncentrirani mošt, vino od prosušenog grožđa, vino od prezrelog grožđa i vinski ocat.

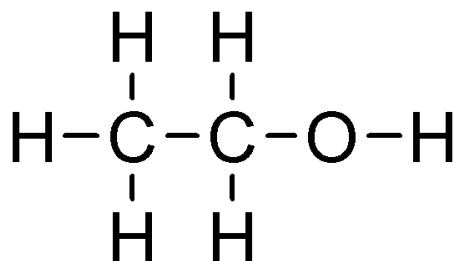
2.2.1. Kemijski sastav vina

Kemijski sastav vina raznovrstan je s obzirom na velik broj kemijskih komponenti koje prema kemijskoj građi pripadaju različitim grupama spojeva. Zakon o vinu određuje granične vrijednosti pojedinih sastojaka i njihove odnose, a rezultati dobiveni kemijskim analizama moraju biti u skladu s istima (Zoričić, 1996.).

Alkoholi

Udio alkohola u vinu kreće se od minimalno 8,5% vol., što je karakteristično za stolna vina pa sve do 15% vol. kod vrhunskih i kvalitetnih vina. Vino sadrži velik broj različitih alkohola. Etilni alkohol (etanol, **Slika 1**) nastaje alkoholnom fermentacijom prirodnih šećera, a koliko će

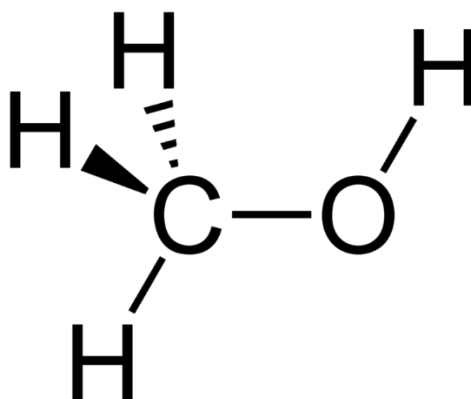
nastati etilnog alkohola ovisi o udjelu šećera u grožđu i moštu. U iznimnim slučajevima, prilikom popravljivanja mošta, može se dodavati i saharoza (Vrdoljak, 2009).



Slika 1 Strukturni prikaz alkohola etanola (web 1)

U vinu se nalazi još i metilni alkohol (metanol, **Slika 2**) i viši alkoholi (propilni, butilni, amilni, heksilni, heptilni) koji se javljaju u minimalnim količinama, a daju posebnu aromu.

Metanol se u vinu javlja kao nusprodukt, a nastaje hidrolizom pektinskih tvari. Sorte koje su bogatije pektinom u konačnici imaju u vinu više udjele metanola. Crna vina sadrže 2-3 puta više metanola od bijelih vina. Metanol je toksičan i oksidacijom prelazi u mravlju kiselinu i formaldehid koji su zapravo toksični za živčani sustav. Vino proizvedeno od plemenitih sorti grožđa nema metanola preko kritičnog sadržaja od 350 mg/kg, ali u vinima proizvedenim od hibridnih sorti grožđa može se pronaći visoki udio metanola. Stoga, nije dopušteno proizvoditi vino od hibridnih sorti grožđa (Horvat, 2010.).



Slika 2 Strukturni prikaz alkohola metanola (web 2)

Pod nazivom viši alkoholi podrazumjevamo alkohole s dva i više C atoma. Viši alkoholi nastaju kao sekundarni produkti fermentacije, a rezultat su rada kvasaca (bilo razgradnjom šećera ili aminokiselina u grožđu i moštu). Viši alkoholi u koncentraciji do 300 mg/L doprinose razvoju željene arome vina, dok koncentracije veće od 400 mg/L negativno utječu na aromatske karakteristike vina (Prce, 2014.).

U aromatske alkohole spadaju feniletanol, benzil alkohol i tirozol, a nastaju fermentacijom fenilalanina. Feniletanol je najzastupljeniji aromatski alkohol, koji ima miris meda. Iako je prisutan u malim količinama, jako je važan za bouquet vina (Planinić, 1998.).

Ugljikohidrati

Ugljikohidrati su spojevi od ugljika, kisika i vodika, a njihova opća formula je $C_n(H_2O)_m$. Udio šećera u grožđu i moštu ovisi o sorti, okolinskim i vremenskim uvjetima. Visokokvalitetne sorte mogu imati od 22 do 28% šećera, dok se kod kvalitetnih sorti količina šećera kreće od 18 do 22%. Kvasci brže i lakše previru glukozu nego fruktozu do etanola, CO_2 i drugih spojeva (Vrdoljak, 2009.).

Ugljikohidrati nastaju fotosintezom u svim zelenim dijelovima vinove loze, a ponajviše u listu i bobicama dok su zelene, tj. dok sadrže klorofil. Prema složenosti građe molekule, ugljikohidrate možemo podijeliti na:

- monosaharide (glukoza, fruktoza),
- disaharide (saharoza, maltoza, laktoza) i
- polisaharide (škrob, celuloza i dr.).

U grožđu, moštu i vinu, od monosaharida najzastupljenije su heksoze, D-glukoza i D-fruktoza, te manjim dijelom pentoze, L-arabinoza i D-ksiloza. Zrenjem voća dolazi do rasta udjela fruktoze u odnosu na glukozu. U zelenoj bobici ima svega $\frac{1}{2}$ fruktoze i $\frac{3}{4}$ glukoze. Zrenjem se ova razlika smanjuje tako da je pri tehnološkoj zrelosti odnos fruktoze i glukoze 1 : 1. Od oligosaharida u grožđu prisutni su saharoza, maltoza, laktoza, rafinoza i trehaloza, ali je samo saharoza bitan sastojak, dok ostali nemaju utjecaj na kakvoću vina. Od visokomolekularnih polisaharida u grožđu su prisutni pektini, škrob, glikogen, smole i sluzave tvari. Većina ovih tvari otežava taloženje i bistrenje vina. Određivanje šećera u grožđu i moštu provodi se

moštnim vagama (Oechslova i Baboova ili Klosterneuburška) te refraktometrom (Horvat, 2010.).

Kiseline

Prema Pravilniku o vinu (NN 02/05), vino mora sadržavati najmanje 4,5 g/L, a najviše 14 g/L ukupnih kiselina izraženih kao vinska kiselina.

Kiseline u vinu mogu biti prisutne kao normalni sastojci vina, ali i kao produkti kvarenja. Mogu biti organske (hlapive i nehlapive), anorganske kiseline i soli različitih kiselina. Neke od organskih kiselina iz grožđa su : vinska, jabučna, limunska, askorbinska, oksalna, glikolna. Neke od organskih kiselina nastaju alkoholnom fermentacijom poput mliječne, octene, sukcinse, oksalne. Od nehlapivih kiselina mogu se pronaći: jabučna, maslačna, vinska, jantarna, limunska i pirogroždana. Premalo kiseline vinu daje tupi okus. Najveći udio ima vinska i jabučna kiselina. Jabučne kiseline ima najviše u početku zrenja, a zrenjem se smanjuje u procesu respiracije što ovisi o temperaturi. Tako se visoka kiselost bilježi u hladnijim područjima i godinama, dok je, nasuprot tome, u toplijim krajevima te vrućim ljetima ukupna kiselost grožđa niska (Prce, 2014.).

Hlapive organske kiseline predstavljaju grupu masnih kiselina koje se nalaze u vinu, a koje pod određenim uvjetima mogu ispariti. Glavni predstavnik je octena kiselina. Nastaje kao sekundarni proizvod alkoholnog vrenja iz acetaldehida ili pak nakon alkoholnog vrenja, tijekom čuvanja vina, oksidacijom etanola, a veće količine octene kiseline nastaju i kao rezultat nekog kvarenja, čiji su izazivači bakterije (octikavost, zavrelica, vinski cvijet i dr.). Normalna koncentracija octene kiseline u vinu iznosi 0,3 – 0,6 g/L (Pichler, 2017.).

Od anorganskih kiselina najvažnije su sumporna i fosforna, a najčešće se u vinu i moštu pojavljuju u obliku kalcijevih i kalijevih soli.

Ekstrakt vina

Klimatski uvjeti tijekom vegetacije utječu na sadržaj ekstrakta, tako u sunčanim i toplijim godinama ima više ekstrakta. Također, vrsta tla, položaj vinograda, tehnologija prerade,

duljina maceracije prije fermentacije, jačina prešanja, vrsta kvasca i mnogi drugi čimbenici utječu na količinu ekstrakta (Prce, 2014.).

Ukupni suhi ekstrakt ili ukupna suha tvar vina je skup svih organskih i mineralnih tvari sadržanih u vinu koje nisu hlapive pod specifičnim fizikalnim uvjetima. U ekstrakt spadaju ugljikohidrati, nehlapive kiseline (vinska, mliječna, jabučna), mineralne tvari, glicerol, butilen, glikol, tanini i tvari boje (Vrdoljak, 2009.).

Ekstrakt u vinu može biti:

- ukupni suhi ekstrakt kojeg čine svi sastojci vina koji nisu hlapivi pod specifičnim fizikalnim uvjetima,
- nereducirani ekstrakt bez šećera - dobije se kada se od ukupnog suhog ekstrakta oduzme sadržaj ukupnih šećera u vinu i
- reducirajući ekstrakt - dobije se kada se od ukupnog suhog ekstrakta oduzme sadržaj ukupnih šećera umanjen za 1 g ako je sadržaj šećera preko 1 g/L.

Crna vina bogatija su ekstraktom zbog većeg sadržaja tanina. Sukladno tome, više ekstrakta sadržavaju kvalitetna i vrhunska vina (Vrdoljak, 2009.).

Dušične tvari

Dušični spojevi u vino prelaze iz grožđa. Količina u prvom redu ovisi o bogatstvu tla dušičnim spojevima, zatim o zdravstvenom stanju grožđa (što je grožđe zdravije, sadrži više dušičnih spojeva) te o načinu prešanja (samotok sadrži manje dušičnih tvari od preševine). Dušične tvari su po prirodi pozitivno nabijeni koloidi, stoga utječu na stabilnost mošta i vina jer uzrokuju замуćenje. Dodatkom negativnih bistrila, poput tanina, talože se na dno (Zoričić, 1996.). Također, mogu utjecati na aromu, boju i postojanost vina, a k tome su i dobar izvor dušika bakterijama uzročnicima kvarenja vina (Vrdoljak, 2009.).

2.2.2. Tvari arome

Aromu vina čine različiti hlapivi sastojci koji se u istima nalaze u malim koncentracijama reda veličine od nekoliko mg/L do nekoliko ng/L. Aroma vina je kompleksna i formira se tijekom zrenja, složenim kemijskim, biokemijskim i mikrobiološkim procesima (Vrdoljak, 2009.).

Sadržaj tvari aroma isključivo ovisi o sorti vinove loze, zrelosti grožđa, načinu uzgoja, klimatskim uvjetima prilikom sazrijevanja ploda, sastavu tla, primjeni agrotehničkih mjera uzgoja sirovina te o tehnologiji prerade grožđa u vinu.

Aroma vina naziva se bouquet. Tvari arome uglavnom se nalaze u pokožici, a znatno manje u mesu i sjemenkama grožđa. To su različite tvari arome koje pripadaju velikom broju različitih kemijskih spojeva: hlapive karboksilne kiseline, alkoholi, esteri, aldehidi, ketoni, eterična ulja, više masne kiseline, terpeni te tvari slične smolama i voskovima.

Aroma vina (Vrdoljak, 2009.):

- potječe iz grožđa, ovisno o sorti grožđa, klimatskim uvjetima i agrotehničkim mjerama uzgoja,
- nastaje biokemijskim reakcijama (oksidacija, hidroliza) tijekom separacije mošta i maceracije,
- nastaje alkoholnom fermentacijom, radom kvasaca nastaje karakteristična aroma; malolaktičkom fermentacijom,
- nastaje kemijskim i enzimskim reakcijama poslije fermentacije tijekom dozrijevanja i starenja vina u bačvama, cisternama i bocama nakon punjenja.

Najvažniji hlapivi spojevi primarne arome grožđa su monoterpeni: geraniol, linalol, nerol, α -terpineol, citronelol i hotrineol. Ovi spojevi su odgovorni za voćne i cvjetne mirise pojedinih sorti grožđa. Terpeni mogu biti slobodni u hlapivom obliku ili vezani za šećere – glikozidi. Sve tvari arome se određuju instrumentalnim metodama: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), plinska kromatografija (GC), analitičkim metodama i senzorskim ocjenjivanjem (Vrdoljak, 2009.)

Aldehidi i ketoni

Zbog svoje reaktivnosti, aldehidi i ketoni imaju značajnu ulogu za organoleptička svojstva vina jer utječu na tvorbu karakteristične arome i bouquet-a. Najznačajnija reakcija aldehida je vezivanje sa sumporastom kiselinom i njezinim solima, pri čemu nastaju lako topljive kiseline. U čistom obliku daju oštar miris koji asocira na voće. Najintenzivniji miris daje heptanal. Alifatski aldehidi daju ugodan voćni miris, iako ih nema puno. Najzastupljeniji alifatski aldehid je acetaldehid (90%). Ketoni su znatno manje zastupljeni u moštu i vinu, u odnosu na aldehide. Najzastupljeniji je aceton, zatim acetoin i diacetil. Većina ketona ima miris svježeg maslaca, što u količinama većim od 1 mg/L može dati neugodnu užeglu aromu (Vrdoljak, 2009.).

2.2.3. Tvari boje

Pigmenti su prirodne tvari koje se nalaze u stanicama i tkivima biljaka i životinja (Potter, 1978.; Pichler 2011.). Obojenje može biti rezultat prisustva organskih pigmenata u tkivima ili optičkih efekata zraka svijetlosti (Peterson i Johnson, 1978.; Pichler 2011.). Prirodni pigmenti su vrlo podložni kemijskim promjenama, kao npr. pri zrenju voća i starenju mesa. Također su osjetljivi na kemijske i fizikalne utjecaje tijekom procesiranja hrane. Biljni i životinjski pigmenti su organizirani u tkivnim stanicama i organelama (npr. kloroplasti koji sadrže klorofil). Kada se te stanice sjeckanjem i mljevenjem razore, pigmenti izlaze van te pod djelovanjem zraka dolazi do njihove degradacije. Funkcionalna uloga pigmenata je različita. Npr. klorofil pod djelovanjem svjetla sudjeluje u fotosintezi. Drugi su pak pigmenti nosioci kisika (mioglobin) ili elektrona (antocijani) te na taj način utječu na oksido-redukcijsko stanje stanice (Peterson i Johnson, 1978.; Pichler, 2011.). Mnogi su pigmenti nestabilni tijekom procesiranja i skladištenja. Prevencija nepoželjnih promjena je vrlo teška, a u nekim slučajevima i nemoguća. Na stabilnost pigmenata utječu mnogi faktori kao što su: svijetlost, kisik, teški metali, oksidansi, reducensi, temperatura, aktivitet vode, pH. Zbog nestabilnosti pigmenata, u hranu se ponekad dodaju bojila (Von Elbe i Schwartz, 1996.; Pichler 2011.).

Fenolni spojevi

Fenoli su organski spojevi koji sadrže benzenski prsten i jednu ili više hidroksilnih skupina (-OH) neposredno vezanih na benzenski prsten. S obzirom na broj hidroksilnih skupina fenoli se dijele na monofenole, difenole, trifenole i polifenole (Osrečak i sur., 2011.). Fenolni spojevi se ekstrahiraju alkoholnom fermentacijom iz masulja te prelaze u mošt, a zatim u vino (Mihovilović, 2016.).

Fenolni spojevi su važni zbog antioksidativne aktivnosti koju posjeduju te zbog velikog utjecaja na organoleptička svojstva vina (boja, gorčina, trpkost). Udio fenolnih spojeva u bijelim vinima je znatno manji nego u crnim. Razlog tomu je tehnologija proizvodnje bijelih vina, gdje je kožica koja sadrži najveću količinu ukupnih fenola vrlo kratko u doticaju sa sokom grožđa. Problem bijelih sorti je što uopće ne sadrže određene pigmente kao što su antocijani koji su vrlo značajni za ukupni sastav polifenola (Osrečak i sur., 2011.). Najznačajniji fenolni spojevi u vinu su fenolne kiseline i njihovi derivati, flavonoidi, tanini i antocijani.

Antocijani

Antocijani su stabilniji u kiselom mediju nego u alkalnom mediju. Pokazuju široki raspon boja ovisno o pH vrijednosti. Ionska priroda antocijana omogućava promjenu strukture molekula obzirom na pH, što rezultira različitim bojama i nijansama boja pri različitim pH vrijednostima (Von Elbe i sur., 1996; Brouillard, 1982.; Pichler 2011.). Na stabilnost antocijana utječe i temperatura. Brzina degradacije antocijana se povećava tijekom procesiranja i skladištenja kako se temperatura povećava (Broennum-Hansen i Flink, 1985.; Giusti i sur., 1999.; Pichler 2011.).

Antioksidacijska aktivnost

Antioksidansi su skupina prirodnih spojeva koji u kratkom vremenu i pri maloj količini neutraliziraju djelovanje slobodnih radikala i drugih oksidansa (Bradamante, 2002.). Slobodni radikali su komponente koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci te imaju izrazito visok stupanj reaktivnosti, odnosno brzo se spajaju s proteinima, lipidima, nukleinskim kiselinama i ugljikohidratima (Puljak i sur., 2004.; Bradamante, 2002.). Zbog toga može doći

do oštećenja tkiva, a mogu nastati i novi spojevi, također, sa svojstvima radikala, a i mogućnosti pokretanja novog niza neenzimskih lančanih reakcija. Reaktivni kisikovi i dušikovi spojevi su zajednički nazivi za slobodne radikale kisika, slobodne radikale dušika te spojeve ili molekule kao što su vodikov peroksid, reaktivni kisik, hidrokloridna kiselina i drugi (Bradamante, 2002.). Djelovanje antioksidansa može se opisati sljedećim mehanizmima (Štefan i sur., 2007):

- uklanjanje kisika ili utjecanje na smanjivanje lokalnih koncentracija kisika,
- uklanjanje metalnih iona,
- uklanjanje ciljnih reaktivnih kisikovih vrsta kao superoksida ili vodikova peroksida,
- uklanjanje slobodnih radikala te
- uklanjanje singletnog kisika.

Antioksidacijska aktivnost ovisi o mnogo čimbenika kao što su sastav lipida, koncentracija antioksidansa, temperatura, prisutnost drugih antioksidansa i drugih sastojaka hrane kao što su proteini i voda (Pichler, 2011.). Učinkovitost antioksidansa ovisi o energiji aktivacije, oksidacijsko-redukcijskom potencijalu, lakoći njegovog gubitka ili razaranja (hlapivosti i osjetljivosti na toplinu) i topljivosti. Najučinkovitiji antioksidansi su oni koji prekidaju lančanu reakciju slobodnih radikala. Većinom sadrže aromatski ili fenolni prsten i doniraju vodik slobodnim radikalima koji su nastali tijekom oksidacije (Brewer, 2011.). Do značajnog gubitka antioksidansa dolazi tijekom procesiranja hrane (dehidratacija, sterilizacija, pasterizacija), ali i tijekom skladištenja (utjecaj kisika) i rukovanja hranom. Jedno od nepoželjnih svojstava prirodnih antioksidansa jest njihova osjetljivost na kisik, a posebno prilikom izlaganja svjetlu, visokoj temperaturi i sušenju (Pichler, 2011.).

2.3. HIDROKOLOIDI

Hidrokoloidi su dugolančani, visokomolekularni polimeri koji se koriste za ugušćivanje i želiranje, kao sredstva za stabiliziranje pjena, emulzija i disperzija, za sprječavanje rasta kristala šećera i leda te vezanje arome. Uglavnom su polisaharidi, ali mogu biti i proteini biljnog i životinjskog porijekla. Neki od najvažnijih komercijalnih hidrokoloida su pektin, škrob i ksantan, a njihovo podrijetlo navedeno je u **Tablici 1**, a značajna svojstva ugušćivanja, stabiliziranja i želiranja u **Tablici 2**.

Tablica 1 Izvor komercijalno najvažnijih hidrokoloida (Phillips, 2000.)

Izvor	Hidrokoloidi
Biljke	Pektin, guar, celuloza, škrob, gumiarabika, brašno sjemenki rogača
Mikroorganizimi	Ksantan, gellan, dekstran
Morske alge	Agar, karagen, alginati
Animalni	Želatina, kazeinat, citozan, proteini sirutke

Tablica 2 Značajna svojstva nekih hidrokoloida (Phillips, 2000.)

Hidrokoloid	Ugušćivanje	Želiranje	Stabiliziranje
Pektin	-	+	+
Guar	+	-	+
Želatina	-	+	+
Ksantan	+	-	+

Svojstva hidrokoloida (ugušćivanje, stabiliziranje, emulgiranje, i dr.) te interakcije s drugim sastojcima hrane su glavni čimbenici koji određuju primjenu određenog hidrokoloida u prehrambenoj industriji.

Zahvaljujući svojim funkcionalnim svojstvima hidrokoloidi imaju široku primjenu u proizvodnji hrane gdje se koriste u malim količinama (0,05 do 5%). U prehrambenim proizvodima može doći do interakcije hidrokoloida s različitim sastojcima hrane: škrobovima, mastima, emulgatorima i dr., ali i s drugim hidrokoloidima, pri čemu može doći do promjene njihovih svojstava. Spomenute interakcije se koriste u svrhu poboljšavanja funkcionalnih svojstava.

Interakcije škroba i hidrokoloida se često koriste radi modificiranja i kontrole teksture prehrambenih proizvoda, radi poboljšanja opće kvalitete proizvoda i stabilnosti, smanjenja troškova i olakšanje proizvodnje. Poznato je da dodatak hidrokoloida (npr. guar, brašno sjemenki rogača, ksantan, karagen i karboksimetilceluloza) jako utječe na želatinizaciju i retrogradaciju škroba te viskoznost i konzistenciju škrobnih pasti i gelova. Općenito se može reći da svaki hidrokoloid drugačije utječe na svojstva želatinizacije škroba (Rojas i sur., 1999.; Shi i BeMiller, 2002.; Pichler 2011.).

Porast viskoznosti dodatkom hidrokoloida (karboksimetilceluloza, ksantan i guar) primjećen je kod normalnog kukuruznog škroba, dok su istraživanja kod škroba voštanog kukuruza, voštane riže, tapioke, normalne riže, krumpira i pšenice dala različite rezultate (Tattiyakul i Rao, 2000.; Pichler 2011).

2.4. ODREĐIVANJE SASTOJAKA AROME PLINSKIM KROMATOGRAMOM

Plinska kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci razdjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, odnosno stacionarna, dok je druga pokretna, odnosno mobilna, i giba se u određenom smjeru. Mobilna faza može biti plin, tekućina ili fluid pri superkritičnim uvjetima. Kromatografija se u analitici koristi za kvalitativno i kvantitativno određivanje spojeva u uzorku (Skoog i sur., 2007.).

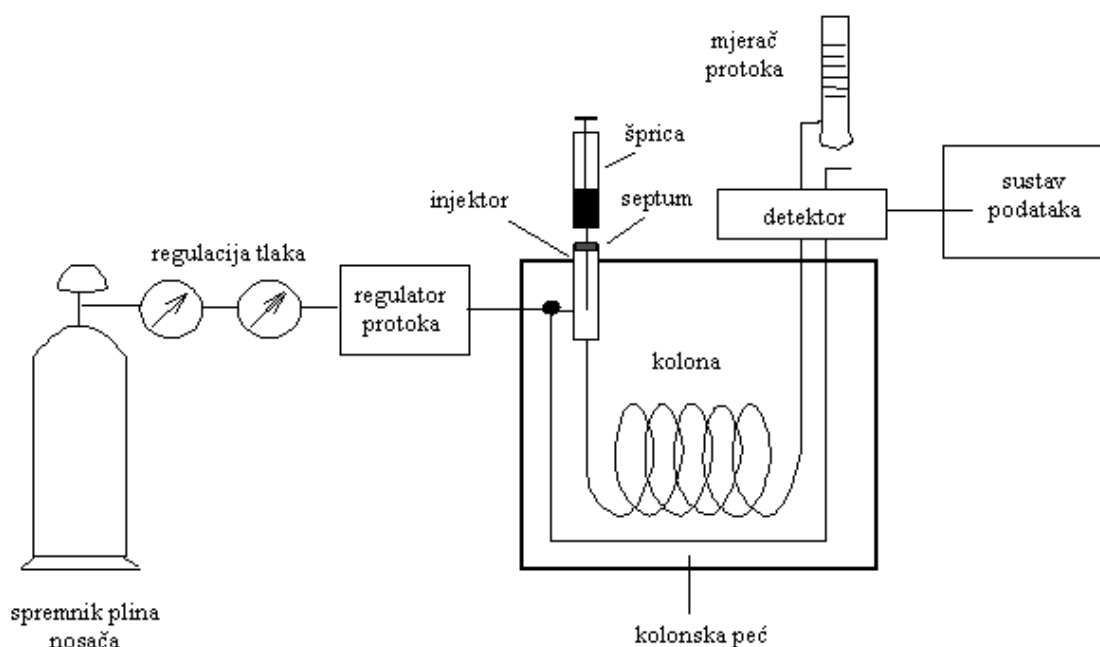
Plinsku kromatografiju su prvi put predstavili Archer J. P. Martin i Anthony T. James 1950-ih godina u Londonu. Martin je zapravo plinsku kromatografiju osmislio 10 godina prije kada je, zajedno sa Synge-om, predložio da se razdvajanje hlapivih komponenata može postići korištenjem pare kao mobilne faze umjesto tekućine (Piantanida i Barron, 2014). Plinska kromatografija je brzo prihvaćena jer je bila predstavljena u vrijeme kada je petrokemijska industrija zahtijevala bolje i preciznije analitičke metode. Danas je plinska kromatografija tehnika koja se koristi širom svijeta za analize gotovo svih vrsta organskih komponenti, čak i onih koje nisu hlapive u prvobitnom stanju, a mogu se prevesti u hlapive derivate (Piantanida i Barron, 2014).

Plinska kromatografija je metoda separacije u kojoj se komponente uzorka razdjeljuju između stacionarne faze i mobilne plinske faze. Kao pokretna faza se koristi inertni plin dok je nepokretna faza selektivna tekućina velike viskoznosti ili selektivna krutina. Stoga, plinsku kromatografiju možemo podijeliti na:

- plinsko-čvrstu kromatografiju (GSC) u kojoj je stacionarna faza u krutom stanju i
- plinsko-tekućinsku kromatografiju (GLC) u kojoj je stacionarna faza tekućina (Piantanida i Barron, 2014).

Uređaj u kojemu se vrši ovaj proces naziva se plinski kromatograf (**Slika 3**) i izgrađen je od nekoliko osnovnih dijelova:

- izvor stalne struje plina nosioca (boca ili generator),
- uređaj za unošenje uzorka (injektor),
- kromatografska kolona smještena u termostatiranom prostoru (peć),
- uređaj za registriranje izeluiranog sastojka u struji plina nosioca kao funkcije vremena (detektor) i
- pisac – integrator – računalo (Primorac, 2007.).



Slika 3 Prikaz plinskog kromatografa (Primorac, 2007.)

SPME analiza

SPME (engl. solid phase microextraction) ili mikroekstrakcija na čvrstoj fazi je metoda koja se sastoji od dvije faze, a to su adsorpcija prilikom koje analit zaostaje na stacionarnoj fazi te desorpcija. Obje faze moraju biti optimizirane ukoliko se postupak želi uspješno provesti.

Desorpcija ovisi o temperaturi i vremenu iste, a na ekstrakciju utječe tip uzorka, vrijeme ekstrakcije, ionska jakost, pH uzorka, temperatura ekstrakcije i mućkanje uzorka.

SPME se koristi za analizu širokog spektra hrane jer zahtijeva manju manipulaciju i ekonomski je prihvatljiva. Sve više nalazi primjenu u pripremi čvrstih i tekućih uzoraka poput vina, piva, voća, meda i ulja (Vrdoljak, 2009.; Zhang i sur., 1993.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada je bio ispitati utjecaj dodatka hidrokoloida na aromatične i fenolne spojeve u kremi od vina. Za pripremu uzoraka korišteno je crno vino Cabernet Sauvignon te hidrokoloidi guar, karboksimetilceluloza ili ksantan. U uzorcima je određen sadržaj polifenolnih i aromatičnih spojeva, nakon čega su oni skladišteni na temperaturi 25°C kroz tri mjeseca te su analize ponovljene. Polifenoli, antocijani i antioksidacijska aktivnost određeni su spektrofotometrijski, a određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka provedeno je primjenom instrumentalne plinske kromatografije i mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME). U radu će biti korišten plinski kromatograf tvrtke Agilent 5890 B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5971A.

3.2. MATERIJALI I METODE

Sorta vinove loze Cabernet Sauvignon

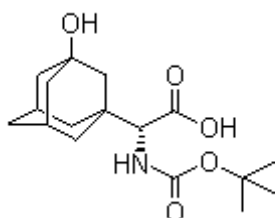
Cabernet Sauvignon pustio je korijenje gotovo u svakoj vinogradarskoj zemlji. Njegova domovina je Bordeaux iz koje se proširio po cijelom svijetu. Cabernet Sauvignon je prilagodljiva sorta, ali zbog kasnog sazrijevanja ne uspije potpuno dozreti u suviše hladnim podnebljima pa tamo daje slaba „zelena“ vina s mirisom zelene trave, dok u suviše toplim podnebljima može dati stiješnjene, jednostavne okuse. Grozdovi Cabernet Sauvignona (**Slika 4**) su mali, tanke kožice, tamni i plavkasti. Daju vina dubokih boja i zbog visokog omjera pupova i kožice prema soku, prirodno taninska i potencijalno dugotrajna vina. Ova vina su pogodna za starenje u hrastovim bačvama tako da su okusi mlade hrastovine (vanilija, začini, čokolada, kokos) često dio profila ovog vina.



Slika 4 Sorta vinove loze Cabernet Sauvignon (web 3)

Ksantan

Ksantan je prirodni polisaharid koji je važan industrijski biopolimer, otkriven 50-tih godina prošlog stoljeća. Ksantan (**Slika 5**) čine dvije glukoze, dvije manoze i glukuronska kiselina. Glavni lanac mu je sastavljen od β -D-glukozne jedinice povezane α -1,4 vezama. Struktura celuloze odgovara kemijskoj strukturi glavnog lanca ksantana. Otopina ksantana koja se dobije otapanjem na umjerenj temperaturi je vrlo viskozna. Na viskoznost uvelike utječe temperatura koja rezultira konformacijskim promjenama i izgledu strukture. Molekula ksantana ima dvije konformacije, a to su spiralna i slučajna. One ovise o temperaturi otapanja. Vrlo važno svojstvo ksantana je interakcija s biljnim galaktomanamom kao što je guar guma ili guma od rogača. Ako se bilo koji od njih doda u otopinu ksantana, dolazi do povećanja viskoznosti. Svojstva ksantanske gume za uporabu u hrani i lijekovima su detaljno ispitane. Ksantan nije toksičan i ne izaziva iritaciju kože i očiju. Temeljem toga odobren je od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA) za uporabu kao aditiv u hrani bez posebnog ograničenja količine. Koristi se u širokom izboru hrane iz nekoliko važnih razloga: kako bi se dobila određena svojstva prehrambenog proizvoda, u svrhu ugušćivanja i stabiliziranja emulzije te za proizvodnju poljoprivrednih proizvoda (Garcı-Ochoa i sur., 2000.).

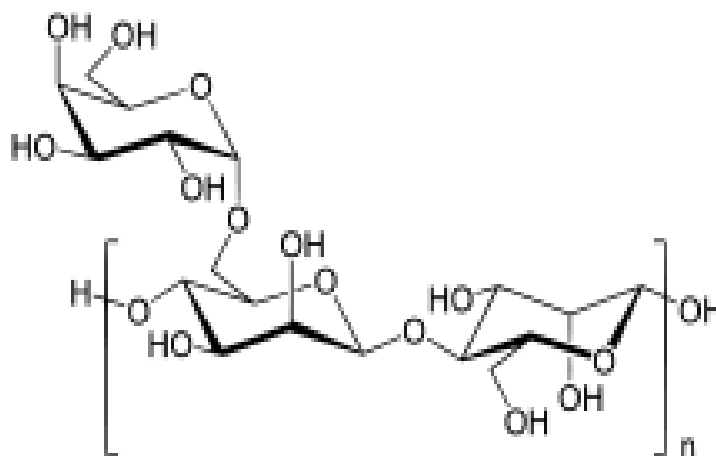


Slika 5 Strukturni prikaz molekule ksantana (web 4)

Guar

Guar je hidrokolid iz skupine galaktomananskih hidrokoloida. Dobiva se iz sjemenki biljke *Cyamopsis tetragonolobus* koja pripada porodici leguminoza, a u sjemenkama ima ulogu rezervne tvari. Guar (**Slika 6**) je polisaharid izgrađen od galaktoze i manoze u omjeru 1:2 s prosječnom molekulskom masom 1 do 2 milijuna. Otapa se u hladnoj vodi te pri vrlo malim koncentracijama daje vrlo viskoznu otopinu zbog čega ima značajnu primjenu kao aditiv u

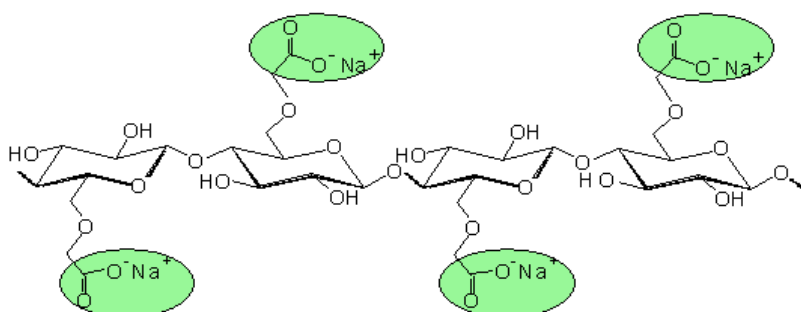
prehrambenoj industriji. Viskoznost otopine ovisi o koncentraciji i veličini čestica guara te pH i temperaturi otopine (Miyazawa i Funazukuri, 2006.).



Slika 6 Strukturni prikaz molekule guara (web 5)

Karboksimetilceluloza (CMC)

CMC je ionski polimer i stvara komplekse s topljivim proteinima. Utjecaj CMC ovisi o pH vrijednosti, a također i o sastavu i koncentraciji proteina, temperaturi te o koncentraciji i tipu CMC. CMC je topljiva u toploj i hladnoj vodi, daje bistru i bezbojnu otopinu. CMC se upotrebljava u različitim granama industrije umjesto škroba, dekstrina, želatine ili biljnih guma. Osnovna prednost CMC u odnosu na prirodne hidrokoloide je manja osjetljivost prema mikroorganizmima. U prehrambenoj industriji CMC se koristi u proizvodnji instant proizvoda, smrznutih proizvoda, umaka i preljeva, bezalkoholnih pića, pekarskih proizvoda, mliječnih proizvoda niskog pH (Phillips, 2000.).



Slika 7 Strukturni prikaz molekule karboksimetilceluloze (web 6)

Priprema kreme od vina

Za pripremu kreme od vina upotrijebljeno je crno vino Cabernet Sauvignon. Odvagano je 200 g vina i dodano 1% hidrokoloida (guar - HG, karboksimetilceluloze - HC ili ksantana - HX). Smjesa je zagrijavana 10 minuta na 80 °C uz konstanto miješanje. Nakon toga još vruća smjesa punjena je u sterilne bočice. Radi usporedbe s pripremljenim uzorcima, sadržaj polifenolnih i aromatičnih spojeva je ispitivan i u netretiranom vinu i u vinu kuhanom bez dodataka. Uzorci su nakon toga skladišteni na 25 °C kroz tri mjeseca te su analize ponovljene.

Određivanje tvari boje

Za potrebe određivanja polifenolnih spojeva, antocijana i antioksidacijske aktivnosti uzorci su ekstrahirani s metanolom zakiseljenim s klorovodičnom kiselinom (1%). Ekstrakt je izdvojen u centrifugi na 4000 okretaja kroz 15 min.

Određivanje sadržaja polifenolnih spojeva

Koncentracija ukupnih fenola određena je Folin-Ciocalteu metodom, mjerenjem absorbance pri valnoj duljini od 765 nm. Sadržaj je polifenolnih spojeva interpoliran pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline te je izražen u mg galne kiseline/L uzorka. Mjerenja su provedena u tri paralele.

Određivanje sadržaja antocijana

Za određivanje antocijana primijenjena je pH-diferencijalna metoda koja se zasniva na strukturnoj transformaciji kromofora antocijana u ovisnosti o promjeni pH. Antocijani podliježu reverzibilnoj strukturnoj transformaciji s promjenom pH koja se manifestira promjenom spektra absorbancije. Ova metoda za određivanje antocijana omogućava brzo i točno mjerenje ukupnih antocijana, bez obzira na prisutnost polimeriziranih, degradiranih pigmenta i drugih tvari koje bi mogle smetati.

Antocijani su određeni metodom prema Giusti i Wrolstadu (2001.) s malom modifikacijom.

Otpipetirano je 0,2 mL ekstrakta uzorka u dvije kivete, u jednu je dodano 2,8 mL pufera pH 1, a u drugu 2,8 mL pufera pH 4,5. Nakon stajanja od 15 min uzorcima je pomoću spektrofotometra mjerena absorbanca pri valnim duljinama od 512 nm i 700 nm. Sadržaj antocijana je izračunat prema slijedećoj formuli:

$$c \text{ (antocijana) (mg/L)} = (A \times M \times FR \times 1000) / \epsilon \times l$$

gdje je:

A - absorbancija uzorka, a izračunava se prema izrazu:

$$A = (A_{512} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{512} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

M - 449,2

FR - faktor razrjeđenja

ϵ – molarna absorptivnost; 26 900

l - duljina kivete; 1 cm

(M i ϵ su uzeti za dominantnu vrstu antocijana, odnosno za cijanidin-3-glukozida).

Mjerenja su provedena u tri paralele.

Određivanje antioksidacijske aktivnosti

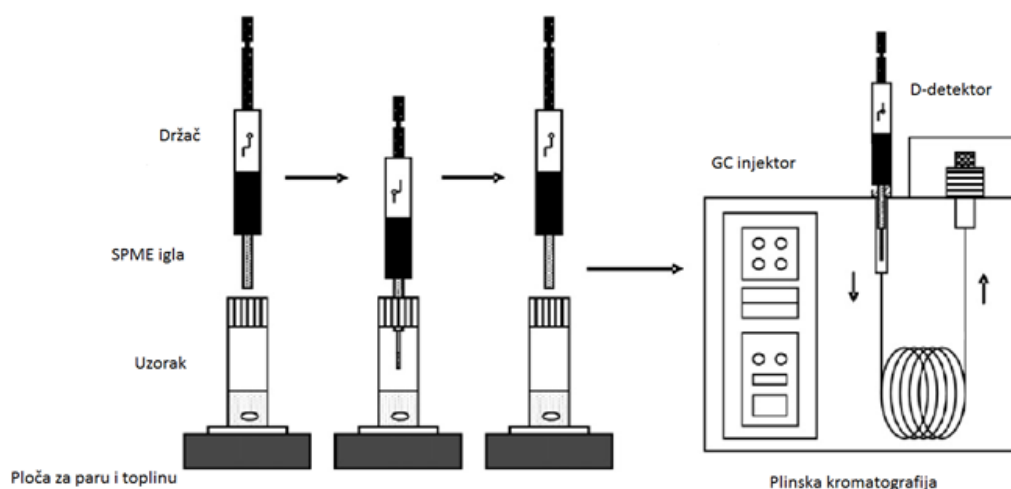
DPPH metoda mjeri sposobnost nekog antioksidansa da neutralizira stabilni DPPH radikal. Uklanjanje DPPH radikala praćeno je smanjenjem absorbancije pri 517 nm, do koje dolazi zbog smanjene količine antioksidansa ili reakcije s radikalima (Brand-Williams i sur., 1995.). Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka i 3 mL otopine DPPH, dobro promiješa i reakcijska smjesa se ostavi stajati 15 minuta. Nakon toga mjeri se absorbancija pri 517 nm. Za slijepu probu koristi se samo otopina DPPH-a i voda. Antioksidacijska aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz trolox kao standard. Mjerenja su provedena u tri paralele.

Analiza arome kreme od vina plinskom kromatografijom primjenom SPME

Priprema uzorka

Za ekstrakciju hlapivih sastojaka korištena je tehnika mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME, **Slika 8**). U bočicu od 10 mL odvagano je 5 g uzorka vina. Radi bolje ekstrakcije aromatičnih sastojaka dodalo se i 1 g NaCl. Zatvorena se bočica postavila u vodenu kupelj te se uz stalno miješanje uzorka magnetskom miješalicom vršila ekstrakcija aromatičnih sastojaka na polimernu stacionarnu fazu (punilo od polidimetilsiloksana-divinilbenzena) debljine 65 μm . Prije samog ispuštanja igle u nadprostor uzorka, uzorak se 10 minuta miješao na vodenoj kupelji (40 °C) radi zasićenja nadprostora sa svrhom što bolje adsorpcije aromatičnih sastojaka.

Po završetku adsorpcije igla se s adsorbiranim sastojcima odmah stavljala u injektor plinskog kromatografa te slijedi njihova toplinska desorpcija. Određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka je provedeno primjenom instrumentalne plinske kromatografije. U radu je korišten plinski kromatograf tvrtke Agilent 5890B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5971A.



Slika 8 SPME tehnika za uzorkovanje i analizu (web 7)

Uvjeti rada plinskog kromatografa

Parametri ekstrakcije:

- temperatura ekstrakcije: 40 °C
- vrijeme ekstrakcije: 45 min
- tip mikroekstrakcijske igle: 65 µm PDMS/DVB (Supelco)

GC-MS analitički uvjeti:

Kolona: HP-5MS; 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent)

- početna temperatura: 40 °C (10 min)
- temperaturni gradijent: 3 °C/min do 120 °C
- temperaturni gradijent: 10 °C/min do 250 °C

Plin nosač: helij (čistoće 5,0) s protokom 1 mL/min pri 40 °C.

- temperatura injektora: 250 °C
- temperatura detektora: 280 °C
- desorpcija uzorka u injektor: 7 min.

Identifikacija sastojaka arome

Komponente arome grožđa identificirane su na osnovu njihovih spektara masa i na osnovi njihovih vremena zadržavanja, odnosno retencijskih indeksa. Svaka točka na kromatogramu, osim vremena zadržavanja i intenziteta, sadrži i spektar masa. Dobiveni spektri masa na vrhovima kromatografskih pikova uspoređeni su s bazom podataka NIST 2.0 i s bazom koja je kreirana na instrumentu tijekom prijašnjih analiza. Obzirom da su spektri masa pojedinih komponenata jako slični i ovise o instrumentu i uvjetima snimanja, dodatni kriterij za identifikaciju su retencijski indeksi komponenata koji se izračunavaju usporedbom vremena zadržavanja komponenata s vremenom zadržavanja ravnolančanih ugljikovodika. Iz tog razloga je analizirana smjesa ravnolančanih ugljikovodika C7 – C20 priređena u laboratoriju prema istim uvjetima analize. Određena su vremena zadržavanja pojedinih ravnolančanih ugljikovodika te su izračunati retencijski indeksi komponenata prema jednadžbi:

$$I = 100 \times \left[n + \frac{\log(t'_{r(x)}) - \log(t'_{r(n)})}{\log(t'_{r(N)}) - \log(t'_{r(n)})} \right]$$

gdje je:

I retencijski indeks zadržavanja,

x nepoznati spoj,

n broj ugljikovih atoma u manjem n-alkanu,

N broj ugljikovih atoma u većem n-alkanu,

t_r prilagođeno vrijeme zadržavanja.

Dobiveni retencijski indeksi uspoređeni su s literaturom kako bi se potvrdila identifikacija komponenata.

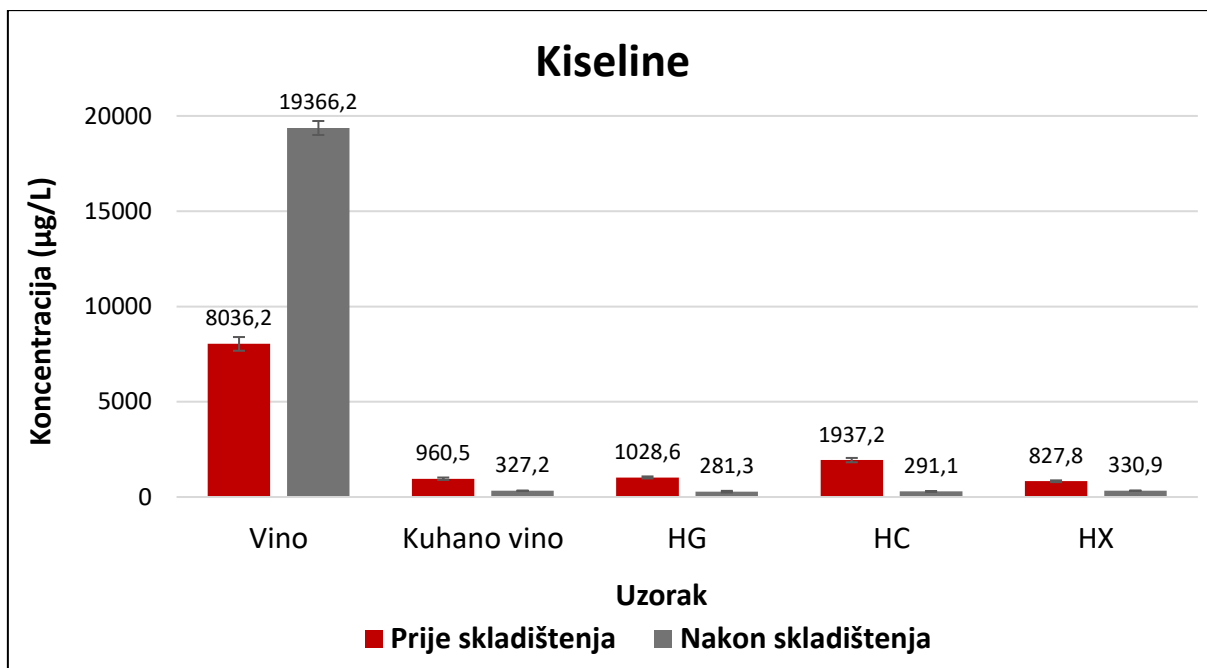
Kao interni standard za izračun koncentracija pojedinih spojeva arome korišten je mirtenol.

4. REZULTATI

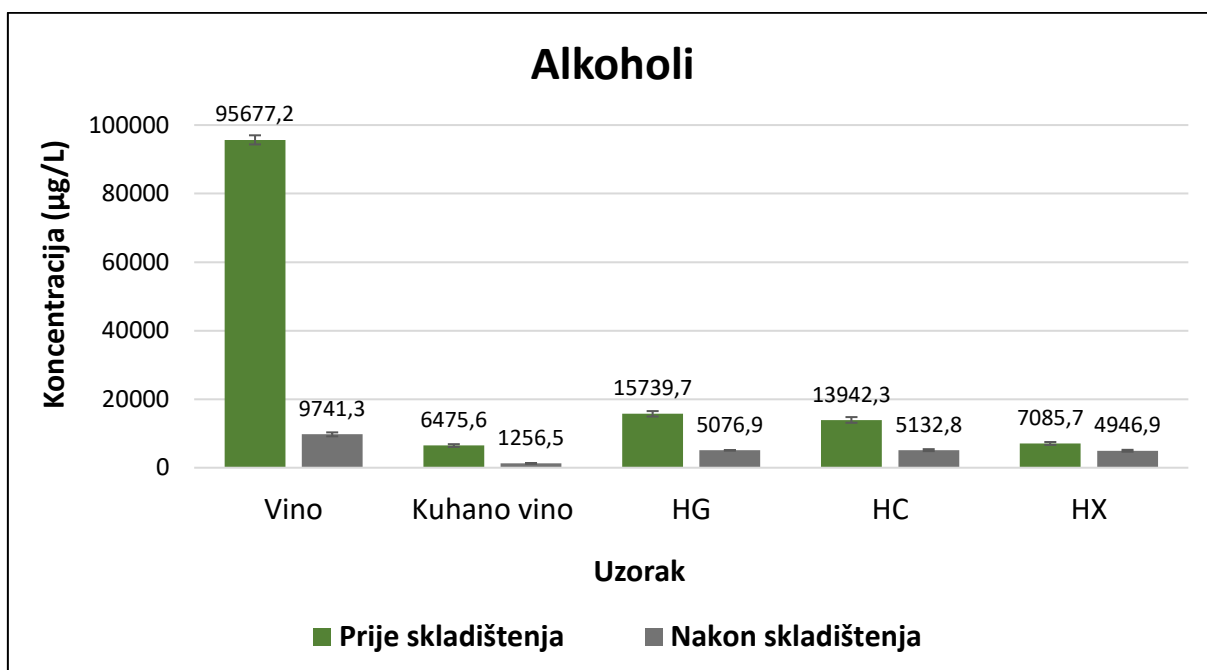
Tablični i grafički prikazi rezultata

Tablica 3 Aromatični sastojci identificirani u analiziranom vinu i kremama od vina

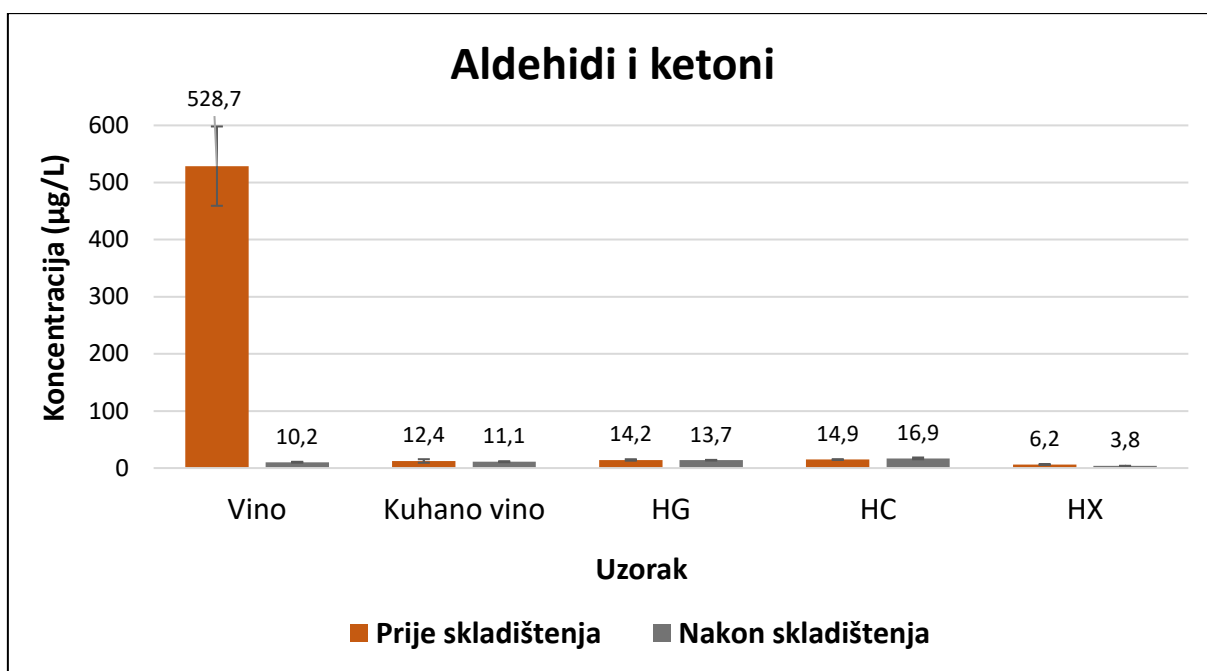
Komponenta	RT (retencijsko vrijeme)	RI (retencijski indeks)	Komponenta	RT (retencijsko vrijeme)	RI (retencijski indeks)
Kiseline			Esteri		
Octena kiselina	2,5326	622	Etil heksanoat	17,9828	997
Dekanska kiselina	37,4621	1376	Etil 4-hidroksibutanoat	21,6301	1059
Laurinska kiselina	41,8000	1558	Etil heptanoat	23,9208	1094
Miristanska kiselina	44,5048	1749	Dietil sukcinat	28,4535	1179
Palmitinska kiselina	47,3562	2008	Etil octanoat	29,1684	1192
Alkoholi			Fenetil acetat		
Izoamilni alkohol	3,5886	734	Etil nonanoat	33,9204	1290
1-butanol	3,9787	752	Etil dekanat	38,1038	1391
2,3-butandiol	5,3838	804	Benzil izovalerat	38,5670	1404
1-heksanol	8,7062	868	Etil izopentil sukinat	39,0542	1425
1-oktanol	9,1450	875	Etil vanilat	42,1818	1580
Metionol	16,5856	981	Etil laureat	42,2547	1584
Benzil alkohol	20,2818	1037	Metil dihidrojasmonat	43,1320	1644
Fenetil alkohol	24,5300	1105	Heksil salicilat	43,4326	1667
Dodekanol	40,0890	1469	Etil miristat	44,9029	1782
Aldehidi i ketoni			Izopropil miristat		
Geranil aceton	39,5903	1448	Diizobutil ftalat	45,7964	1859
Heksil cinamal	44,3667	1737	Dibutil ftalat	46,7955	1953
Terpeni			Etil palmitat		
β -citronelol	30,6793	1223	Etil linoleat	48,6802	2146
β -damascenon	37,6182	1377	Etil oleat	48,7290	2152
α -farnesen	40,5166	1487	Etil stearat	48,9565	2176
α -kalakoren	41,4180	1535	Drugo		
Nerolidol	41,7756	1556	2,4-di-T-butilfenol	40,8900	1504
Fluoren	42,0110	1570			



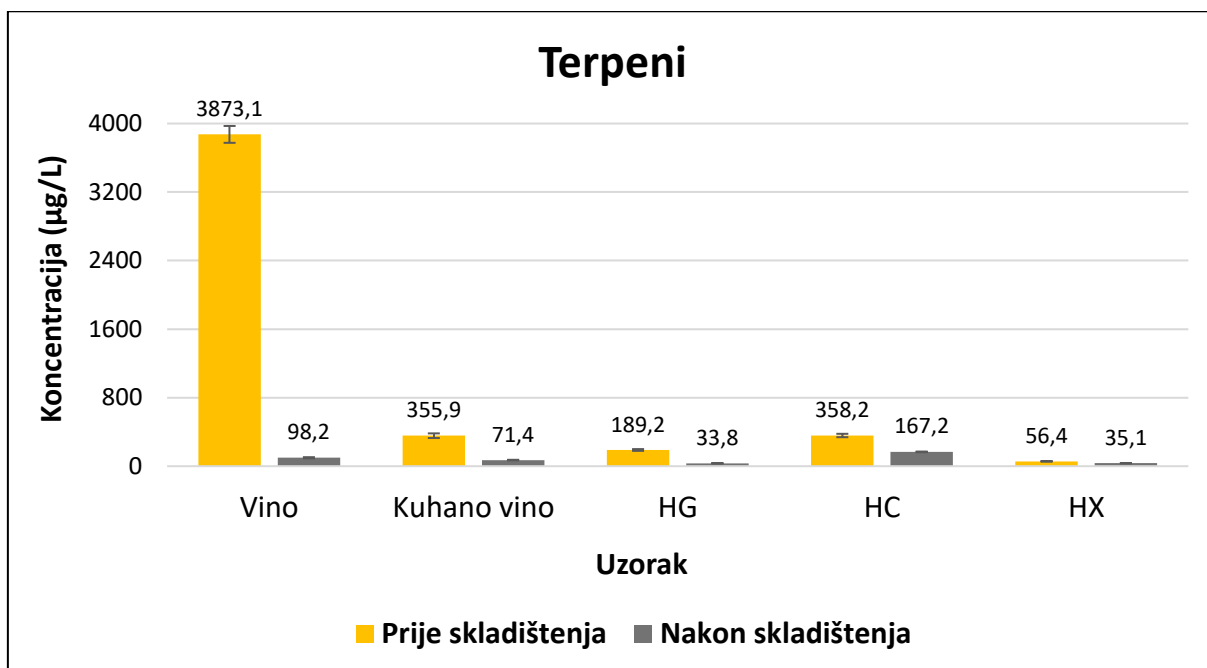
Slika 9 Sadržaj kiselina u netretiranom vinu, kuhanom vinu i kremama od vina s dodatkom hidrokoloida guara (HG), karboksimetilceluloze (HC) i ksantana (HX) prije i nakon tromjesečnog skladištenja na 25 °C



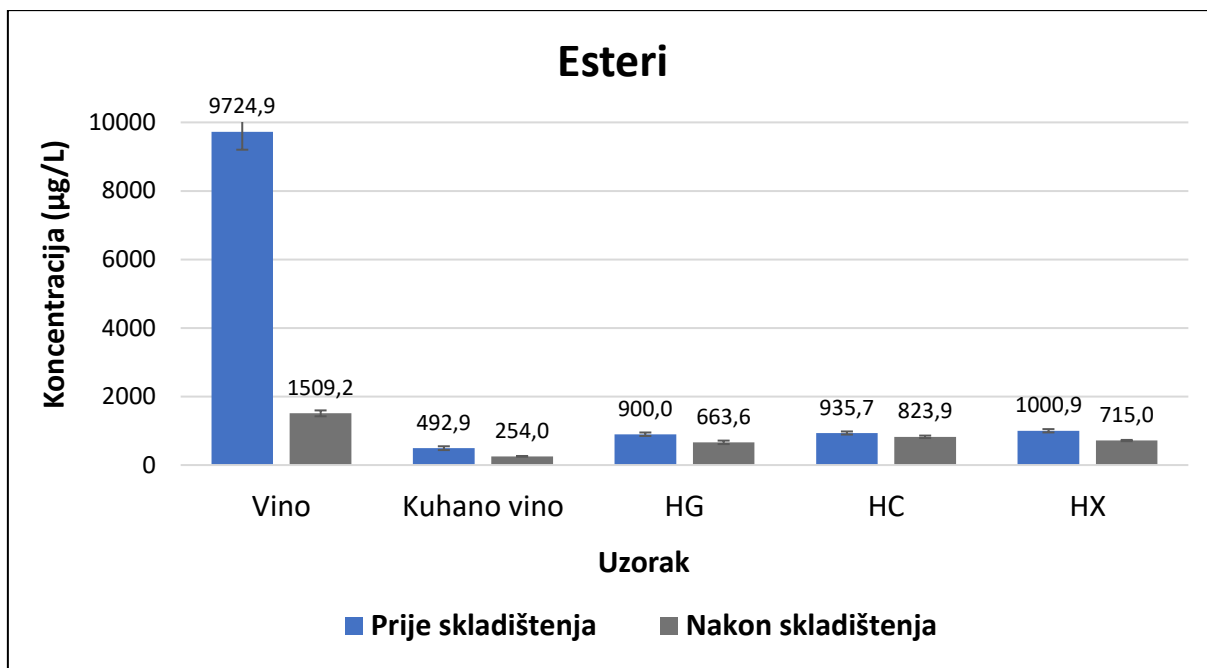
Slika 10 Sadržaj viših alkohola u netretiranom vinu, kuhanom vinu i kremama od vina s dodatkom hidrokoloida guara (HG), karboksimetilceluloze (HC) i ksantana (HX) prije i nakon tromjesečnog skladištenja na 25 °C



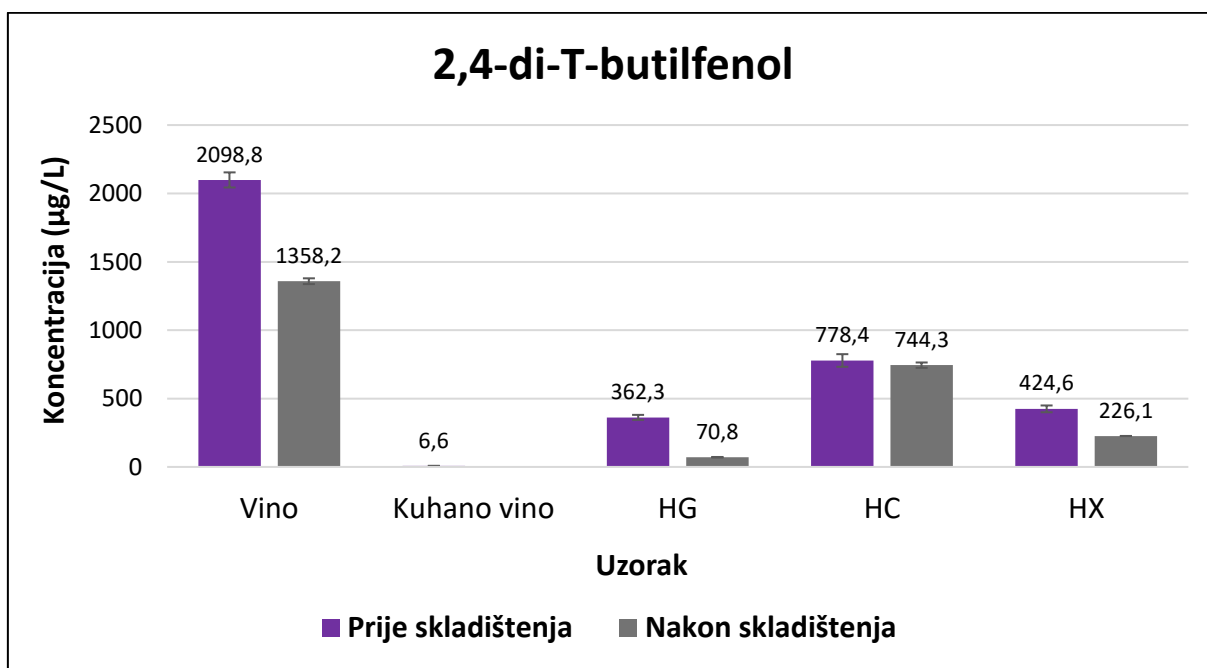
Slika 11 Sadržaj aldehida i ketona u netretiranom vinu, kuhanom vinu i kremama od vina s dodatkom hidrokoloida guara (HG), karboksimetilceluloze (HC) i ksantana (HX) prije i nakon tromjesečnog skladištenja na 25 °C



Slika 12 Sadržaj terpena u netretiranom vinu, kuhanom vinu i kremama od vina s dodatkom hidrokoloida guara (HG), karboksimetilceluloze (HC) i ksantana (HX) prije i nakon tromjesečnog skladištenja na 25 °C



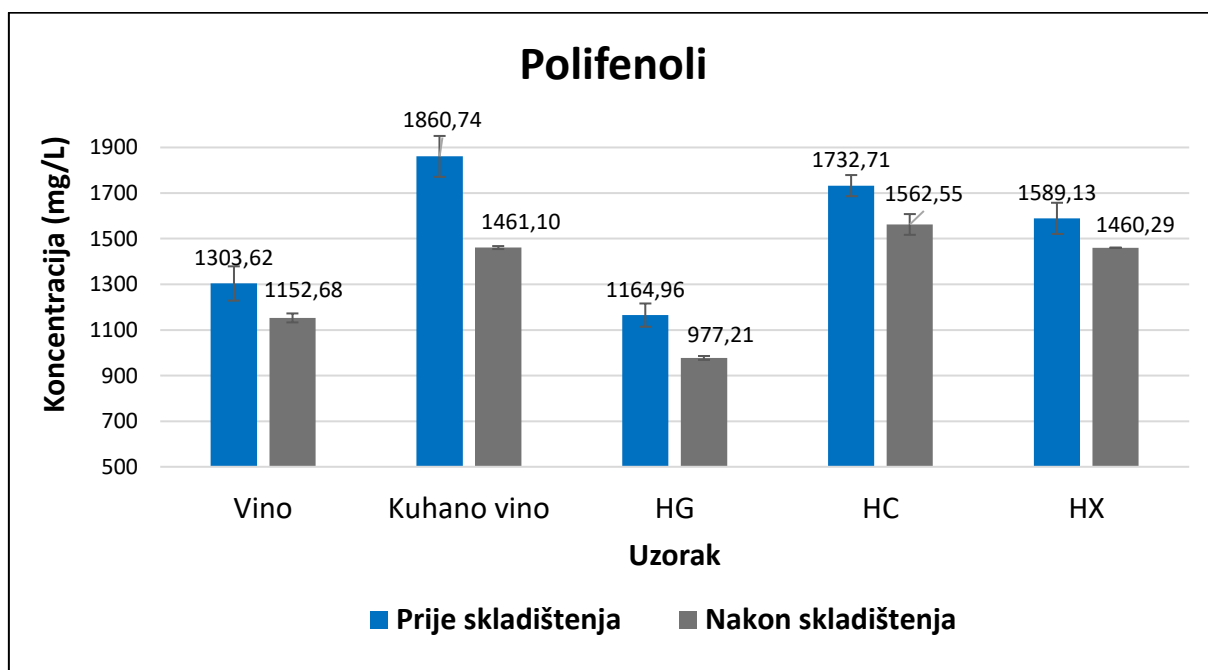
Slika 13 Sadržaj estera u netretiranom vinu, kuhanom vinu i kremama od vina s dodatkom hidrokoloida guara (HG), karboksimetilceluloze (HC) i ksantana (HX) prije i nakon tromjesečnog skladištenja na 25 °C



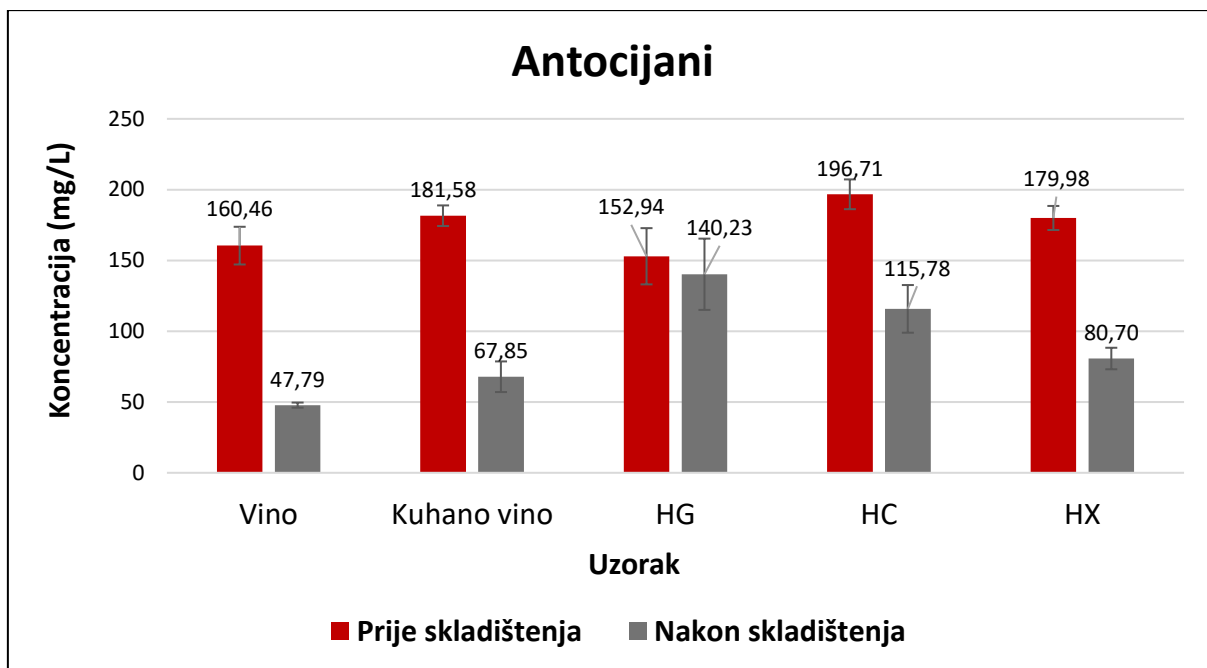
Slika 14 Sadržaj 2,4-di-T-butilfenola u netretiranom vinu, kuhanom vinu i kremama od vina s dodatkom hidrokoloida guara (HG), karboksimetilceluloze (HC) i ksantana (HX) prije i nakon tromjesečnog skladištenja na 25 °C

Tablica 4 Suha tvar u netretiranom vinu, kuhanom vinu i kremama od vina s dodatkom hidrokoloida guara (HG), karboksimetilceluloze (HC) i ksantana (HX) prije i nakon tromjesečnog skladištenja na 25 °C

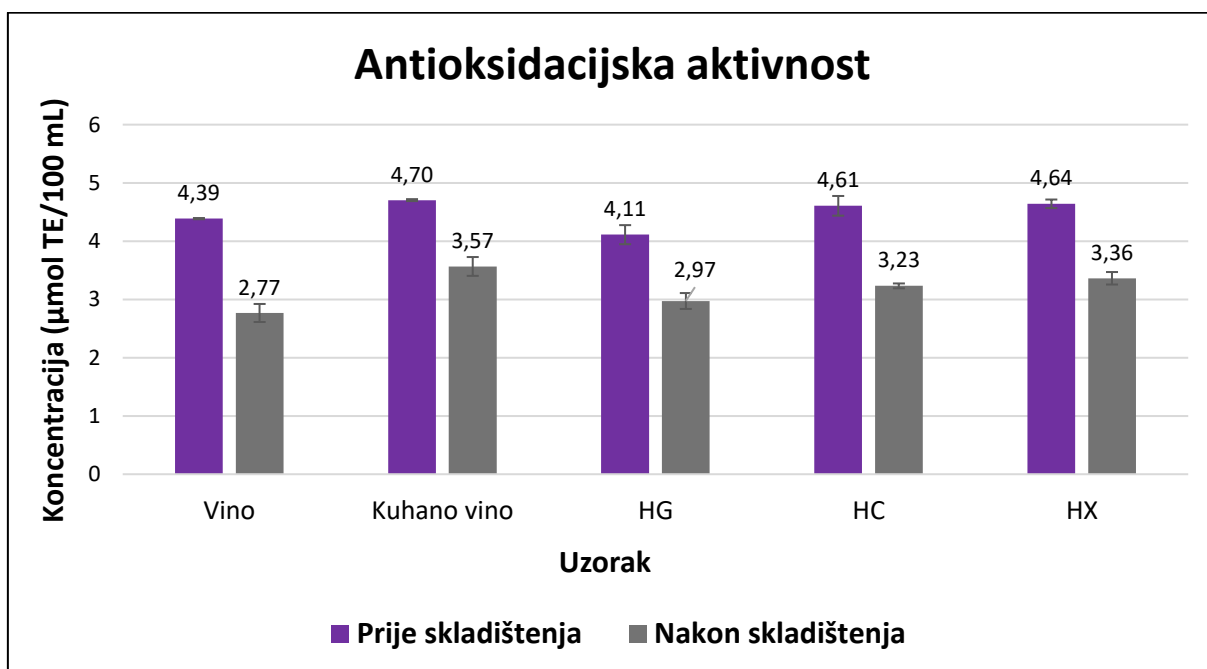
	Suha tvar prije skladištenja (%)	Suha tvar nakon skladištenja (%)
Vino	9,9	9,9
Kuhano vino	8,5	8,5
HG	9,4	9,4
HC	9,4	9,4
HX	9,5	9,5



Slika 15 Sadržaj ukupnih polifenola u netretiranom vinu, kuhanom vinu i kremama od vina s dodatkom hidrokoloida guara (HG), karboksimetilceluloze (HC) i ksantana (HX) prije i nakon tromjesečnog skladištenja na 25 °C



Slika 16 Sadržaj antocijana u netretiranom vinu, kuhanom vinu i kremama od vina s dodatkom hidrokoloida guara (HG), karboksimetilceluloze (HC) i ksantana (HX) prije i nakon tromjesečnog skladištenja na 25 °C



Slika 17 Antioksidacijska aktivnost u netretiranom vinu, kuhanom vinu i kremama od vina s dodatkom hidrokoloida guara (HG), karboksimetilceluloze (HC) i ksantana (HX) prije i nakon tromjesečnog skladištenja na 25 °C

5. RASPRAVA

Rezultati istraživanja dodatka hidrokoloida (guar, karboksimetilceluloza i ksantan) na zadržavanje fenolnih i pojedinih aromatičnih sastojaka u kremi od vina prije i nakon skladištenja prikazani su u **Tablicama 3 i 4** te na **Slikama 9 - 17**.

Aroma

Ukupna aroma vina predstavlja kombinaciju sortne arome (primarna aroma), arome koja nastaje alkoholnom fermentacijom (sekundarna aroma) te tercijane arome ili „bouqueta“, nastale tijekom odležavanja i skladištenja vina. U **Tablici 3** prikazano je 45 identificiranih aromatičnih sastojaka u kremi od vina. Identificirani sastojci su radi boljeg prikaza podijeljeni u 6 skupina. To su kiseline, alkoholi, aldehidi i ketoni, terpeni, esteri i drugi (2,4-di-T-butilfenol).

Kiseline potječu ili iz sirovine ili nastaju tijekom alkoholne fermentacije. U **Tablici 3** vidljivo je da su u kremama od vina identificirane octena, dekanska, laurinska, miristanska i pamitinska kiselina. Sadržaj kiselina u kremama od vina s dodatkom hidrokoloida manji je nego u netretiranom i kuhanom vinu. Usporedbom rezultata prije i nakon skladištenja, uočeno je kako se količina kiselina u netretiranom vinu povećala, dok se u kuhanom vinu i kremama od vina smanjila (**Slika 9**).

Viši alkoholi nastaju kao sekundarni produkti metabolizma kvasca. Jedan od najvažnijih je fenetil alkohol koji doprinosi slatkastoj aromi ruže. Pored njega, u analiziranom vinu i kremi od vina identificirani su izoamilni alkohol, 1-butanol, 2,3-butandiol, 1-heksanol, 1-oktanol, metionol, benzil alkohol i dodekanol (**Tablica 3**). Početni uzorak vina imao je najveću koncentraciju viših alkohola u odnosu na kuhano vino te vino s dodatkom bilo kojeg hidrokoloida. Krema od vina s dodatkom hidrokoloida guara (HG) imala je najveću koncentraciju viših alkohola u ukupnoj aromi kreme od vina. Najmanji utjecaj na koncentraciju viših alkohola u kremi od vina ima dodatak hidrokoloida ksantana (HX). Skladištenjem se koncentracija viših alkohola u svim uzorcima smanjila. Najveću koncentraciju zadržanih alkohola nakon tromjesečnog skladištenja na 25°C imao je uzorak s dodatkom hidrokoloida ksantana (**Slika 10**).

Aldehidi i ketoni u vinima se nalaze u vrlo malim količinama, ali su esencijalni za sintezu aminokiselina. **Tablica 3** pokazuje da su od aldehida i ketona u kremi od vina pronađeni geranil

aceton i heksil cinamal koji vinu daju cvjetne i voćne arome. Najveću koncentraciju ima netretirano vino prije kuhanja, dok se u kuhanom vinu s i bez dodatka hidrokoloida koncentracija aldehida i ketona smanjila. Nakon skladištenja, koncentracija aldehida i ketona u netretiranom vinu se značajno smanjila. Niti jedan dodatak hidrokoloida nije uspio umanjiti gubitak aldehida i ketona u kremi od vina (**Slika 11**).

Terpeni su skupina spojeva koja je karakteristična za svaku sortu grožđa. Dijele se na slobodne terpene (odgovorni za aromu grožđa i mošta) i vezane terpene (vezani su najčešće za šećere te se oslobađaju tijekom procesa proizvodnje vina). Terpeni identificirani u uzorcima su β -citronelol, β -damascenon, α -farnesen, α -kalakoren, nerolidol i fluoren. Vinu najčešće daju citrusnu, svježju, slatku i cvjetnu aromu. Netretirano vino sadrži najveću koncentraciju terpena, dok je najmanja zabilježena u kremi od vina s dodatkom hidrokoloida ksantana. Tijekom skladištenja uzoraka došlo je do velikog gubitka u koncentraciji terpena (**Slika 12**).

Tablica 3 pokazuje da su u kremi od vina nađena 22 različita estera. Oni predstavljaju najveću skupinu hlapivih spojeva arome i doprinose voćnoj aromi vina. Nastaju reakcijom acetil-CoA s višim alkoholima. Netretirano vino prije skladištenja sadrži najveću koncentraciju estera. Dodatak hidrokoloida ksantana imao je najveći utjecaj na očuvanje estera u kremi od vina u odnosu na ostale hidrokoloida. Netretirano vino je i nakon skladištenja imalo najveću koncentraciju estera, a dodatak hidrokoloida nije uspio očuvati estere u većoj koncentraciji u kremi od vina (**Slika 13**).

Od ostalih spojeva, u kremama od vina zadržan je 2,4-di-T-butilfenol koji djeluje kao antioksidans. U najvećoj koncentraciji prije skladištenja bio je u netretiranom vinu i kremi od vina s dodatkom hidrokoloida karboksimetilceluloze. Nakon skladištenja očuvao se navedeni spoj u kremama od vina u odnosu na kuhano vino, ali je došlo do velikog gubitka 2,4-di-T-butilfenola u odnosu na početni uzorak (**Slika 14**).

Tvari boje

Fenolne tvari dospijevaju u vino iz tvrdih dijelova grozda tijekom maceracije kod proizvodnje crnih vina. Daju vinu karakterističnu boju, okus i trpkost, te imaju povoljne učinke na ljudsko zdravlje jer blokiraju rad slobodnih radikala. Iz rezultata prikazanih na **Slici 15** vidljivo je da najveću koncentraciju polifenola ima kuhano vino, a najmanju krema od vina s dodatkom

hidrokoloida guara. Nakon skladištenja koncentracija polifenola se najviše očuvala u kremi od vina s dodatkom hidrokoloida karboksimetilceluloze i ksantana.

Na **Slici 16** prikazane su i koncentracije antocijana u kremi od vina. Najveću koncentraciju antocijana prije skladištenja imala je krema od vina s hidrokloidom karboksimetilceluloza, a najmanju krema od vina s dodatkom hidrokoloida guara. Nakon skladištenja koncentracija polifenola se najviše očuvala u kremi od vina s dodatkom guara.

Antioksidacijska aktivnost u analiziranim uzorcima prikazana je na **Slici 17**, gdje je vidljivo da najveću vrijednost antioksidacijske aktivnosti prije i nakon skladištenja ima kuhano vino, ali se antioksidacijska aktivnost očuvala u svim kremama s dodatkom hidrokoloida. Tijekom skladištenja došlo je do očuvanja antioksidacijske aktivnosti u svim uzorcima kreme od vina (**Slika 17**).

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobivenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Dodatak hidrokoloida nije imao utjecaj na zadržavanje kiselina, terpena te aldehida i ketona u kremi od vina.
- Na očuvanje viših alkohola u kremi od vina najviše je utjecao dodatak hidrokoloida guara prije skladištenja, a nakon skladištenja ksantan.
- Dodatak hidrokoloida ksantana najviše je utjecao i na zadržavanje estera u kremi od vina.
- Hidrokoloidi puno bolje zadržavaju estere i više alkohole koji su nositelji sekundarne arome vina, u odnosu na terpene koji su nositelji primarne arome vina.
- Na zadržavanje tvari boje utječu podjednako sva tri dodana hidrokoloida.
- Bilo koji dodatak hidrokoloida očuvao je antioksidacijsku aktivnost u kremi od vina.
- Na temelju rezultata istraživanja dobiven je dublji uvid u mehanizam djelovanja različitih hidrokoloida kao dodataka koji omogućavaju zadržavanje i očuvanje aromatičnih spojeva i tvari boje tijekom pripreve kreme od vina.

7. LITERATURA

- Bradamante V: Mjesto i uloga vitamina u životu suvremenog čovjeka. *Medicus* 11:101-111, 2002.
- Brewer MS: Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of actions, and potential applications. *Food Science and Food Safety* 10:221-247, 2011.
- Broenum-Hansen K i Flink JM: Anthocyanin colorants from elderberry (*Sambucus nigra* L.). Storage stability of the freeze dried product. *Journal of Food Technology* 20: 725-733, 1985.
- Garci-Ochoa F, Santos VE, Casas JA i Gomez E: Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology advances* 18:549-579, 2000.
- Giusti MM, Rodriguez-Saona LE i Wrolstad RE: Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:4631-4637, 1999.
- Horvat B: *Od berbe do mladog vina*. Gospodarski list; prilog prema knjizi Zoričić M: Domaće vino. Novinarsko nakladničko i trgovačko d.d., Zagreb, 15. rujan 2010.
- Mihovilović M: Utjecaj procesnih parametara na zadržavanje tvari boje i arome vina od jabuke. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2016.
- Miyazawa T i Funazukuri T: Noncatalytic hydrolysis of guar gum under hydrothermal conditions. *Carbohydrate Research* 7:870-877, 2006.
- MPS, Ministarstvo poljoprivrede RH: *Pravilnik o proizvodnji vina*. Narodne novine 2/05, 2005.
- MPS, Ministarstvo poljoprivrede RH: *Zakon o vinu*. Narodne novine 32/2019.
- Osrečak M, Kozina B, Maslov L i Karoglan M: Utjecaj djelomične defolijacije na koncentraciju polifenola u vinima Graševine, Traminca i Manzonija bijelog (*Vitis vinifera* L.). *Proceedings* 46:972-975, 2011.
- Peterson MS i Johnson AH: *Encyclopedia of Food Science*. The Avi publishing company, Inc., Westport, Connecticut, 1978.
- Phillips GO i Williams PA: *Handbook of hydrocolloids*. Woodhead Publishing, USA, 2000.
- Piantida AG i Barron AR: *Principles of Gas Chromatography*. OpenStax-CNX, 2014. <https://www.scribd.com/document/374660970/Principles-of-Gas-Chromatography-2> [21.08.2019.]
- Pichler A: Utjecaj dodataka i skladištenja na kvalitetu, reološka i termofizikalna svojstva paste od maline. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2011.
- Pichler A: Tehnologija vina – Vinova loza. *Nastavni materijali*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2017.

- Planinić M: Utjecaj procesnih parametara na kvalitetu vina Erdutska graševina kod ultrafiltracije pločastim modulom. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 1998.
- Prce V: Sadržaj antocijana, polifenola, flavonoida i antioksidacijska aktivnosti u crnim vinima slovačkih vinogorja. *Diplomski rad*. Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, 2014.
- Potter NN: *Food Science*. The Avi publishing company, Inc., Vestport, Conneticut, 1978.
- Primorac Lj: Kontrola kakvoće hrane. *Interna skripta*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2007.
- Rojas JA, Rosell CM i De Barber CB: Pasting properties of different flour-hydrocolloid system. *Food Hydrocolloids* 13:27-33, 1999.
- Shi X i BeMiller JN: Effects of food gums on viscosities of starch suspensions during pasting. *Carbohydrate Polymers* 50:7-18, 2002.
- Skoog DA, Holler FJ i Crouch SR: *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*. Thomson Brooks/Cole, Thomson Higher Education, USA, 2007.
- Štefan L, Tepšić T, Zavidović T, Urukalo M, Tota D i Domitrović R: Lipidna peroksidacija,uzroci i posljedice. *Medicina* 43:84-93, 2007.
- Tattiyakul J i Rao MA: Rheological behavior of cross-linked waxy maize starch dispersions during and after heating. *Carbohydrate Polymers* 43:215 – 222, 2000.
- Von Elbe JH i Schwartz SJ: Colorants. U *Food Chemistry*, Fennema OR (ur.), Marcel Dekker, Inc., New York, 1996.
- Vrdoljak I: Utjecaj membranske filtracije na aromu i kemijski sastav vina sorte Graševina. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2009.
- Zoričić M: *Podrumarstvo*. Globus, Zagreb, 1996.
- Web 1
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/de/Ethanol-structure.png> [19.8.2019.]
- Web 2
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a2/Methanol-2D.png> [20.8.2019.]
- Web 3
http://vinopedia.hr/wiki/images/thumb/6/69/Cabernet_sauvignon.jpg/200pxCabernet_sauvignon.jpg [25.9.2019.]

Web 4

<https://rozanski.li/166/ksantan-xanthan-guma-ksantanowa/> [15.9.2019.]

Web 5

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f6/Guaran.svg/1200px-Guaran.svg.png> [15.9.2019.]

Web 6

https://ar.thpanorama.com/img/images_2/carboximetilcelulosa-caractersticas-estructura-sntesis-usos.png [15.9.2019.]

Web 7

<https://www.semanticscholar.org/paper/Solid-phase-microextraction%3A-a-powerful-sample-tool-vas-V%C3%A9key/5a660c44ad24070c97c4cdebfcfd069182d10e0/figure/3> [15.9.2019.]