

Utjecaj procesa fermentacije na tvari boje i arome vina Cabernet Sauvignon kutjevačkog vinogorja

Deže, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:109:514483>

Rights / Prava: [Attribution-ShareAlike 4.0 International / Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

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

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**

Martina Deže

**UTJECAJ PROCESA FERMENTACIJE NA TVARI BOJE I
AROME VINA CABERNET SAUVIGNON KUTJEVAČKOG
VINOGORJA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Sveučilišni diplomski studij Prehrambeno inženjerstvo

Zavod za prehrambenu tehnologiju
Katedra za prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Tema rada prihvaćena je na X. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta
Osijek održanoj dana 24. srpnja 2024.

Mentor: dr. sc. Ivana Ivić

Pomoć pri izradi: prof. dr. sc. Anita Pichler

Utjecaj procesa fermentacije na tvari boje i arome vina Cabernet Sauvignon kutjevačkog vinogorja
Martina Deže, 0113144571

Sažetak: Vino je alkoholno piće proizvedeno od grožđa procesom fermentacije čiju kakvoću i karakter određuju tvari arome i tvari boje. Na tvari boje i arome vina mogu utjecati brojni čimbenici, a ključnu ulogu ima proces fermentacije gdje se najveće promjene događaju. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj procesa fermentacije na tvari boje i arome vina Cabernet Sauvignon kutjevačkog vinogorja, berbe 2023. U tu svrhu, uzeti su uzorci mošta odmah nakon berbe i prešanja, na početku fermentacije (nakon 24 i 48 h od dodatka kvasca), tijekom burne fermentacije (nakon 96 h od dodatka kvasca) te po završetku fermentacije. U svim uzorcima određen je polifenolni sastav, aromatski profil i antioksidacijska aktivnost kako bi se mogle pratiti promjene u njihovom sastavu od mošta do konačnog proizvoda, vina. Polifenoli i antioksidacijska aktivnost određeni su spektrofotometrijski, dok je aromatski profil određen primjenom instrumentalne plinske kromatografije i masene spektrometrije. Uzorkovanje aromatskih spojeva provedeno je pomoću mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME). Utvrđeno je da tijekom procesa fermentacije nastaju značajne promjene aromatskog profila, sastava polifenola i antioksidacijske aktivnosti prilikom pretvorbe mošta u vino.

Ključne riječi: fermentacija, Cabernet Sauvignon, aroma, polifenoli, antioksidacijska aktivnost

Rad sadrži: 67 stranica
12 slika
6 tablica
0 priloga
75 literaturnih reference

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu rada:

1. prof. dr. sc. Anita Pichler
2. dr. sc. Ivana Ivić
3. prof. dr. sc. Mirela Kopjar
4. prof. dr. sc. Nela Nedić Tiban

predsjednik
član-mentor
član
zamjena člana

Datum obrane: 24. rujna 2024.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
University Graduate Study Food Engineering

Department of Food Technology
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food Technology

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. X. held on July 24, 2024.

Mentor: Ivana Ivić, PhD

Technical assistance: Anita Pichler, PhD, prof.

The Influence of the Fermentation Process on the Color and Aroma Compounds of Cabernet Sauvignon Wine from Kutjevo Vineyards
Martina Deže, 0113144571

Summary: Wine is an alcoholic beverage produced from grapes during alcoholic fermentation with characteristic aroma and color compounds, which determine the quality and character of wine. Many factors influence the wine color and aroma, and the key role has the fermentation process where the greatest changes occur. The aim of this thesis was to investigate the influence of the fermentation process on the color and aroma compounds of Cabernet Sauvignon wine from Kutjevo Vineyards, harvest 2023. For this purpose, samples of grape must were taken immediately after the grape harvesting and pressing, at the beginning of fermentation process (24 and 48 hours after adding the yeast), during the violent fermentation process (96 hours after adding the yeast) and after the fermentation process. In all samples, polyphenols, aromatic profile and antioxidant activity were determined in order to monitor their changes from must to the final product, wine. Polyphenols and antioxidant activity were determined spectrophotometrically and aroma profile was obtained on a gas chromatograph equipped with a mass detector. Sampling was conducted by solid-phase microextraction (SPME). It has been established that during the fermentation process and conversion of must into wine, the content of aroma compounds, polyphenols and antioxidant activity changed significantly.

Key words: fermentation, Cabernet Sauvignon, aroma, polyphenols, antioxidant activity

Thesis contains: 67 pages
12 figures
6 tables
0 supplementary material
75 references

Original in: Croatian

Review and defence committee:

1. *Anita Pichler*, PhD, prof.
2. *Ivana Ivić*, PhD
3. *Mirela Kopjar*, PhD, prof.
4. *Nela Nedić Tiban*, PhD, prof.

chair person
member
member
stand-in

Defence date: September 24, 2024

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

DIPLOMSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

24. rujna, 2024.

TE OCIJENJEN USPJEHOM

izvrstan (5)

Pred Povjerenstvom za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Anita Pichler

predsjednik

Pichler

(potpis)

2. dr. sc. Ivana Ivić

član

Ivić

(potpis)

3. prof. dr. sc. Mirela Kopjar

član

Kopjar

(potpis)

Neizmjerno hvala mojoj mami koja mi je svojom požrtvovnošću omogućila školovanje i koja je u svim lijepim i teškim trenucima bila moja najveća podrška i oslonac. Hvala ti na bezuvjetnoj ljubavi i što si uvijek vjerovala u mene i nisi dala da odustanem. Ova diploma je naš zajednički uspjeh.

Veliko hvala i mojoj sestri na svakoj riječi ohrabrenja i podrške, na svakoj kavi utjehe, na svakom sestrinskom savjetu koji me gurao dalje...hvala što si uvijek tu za mene.

Hvala mome zaručniku na razumijevanju i strpljenju kojega je zaista trebalo. Hvala ti što si bio uz mene, što si mi uljepšavao teške dane, ispitivao me, podnosio i stalno slušao o mojim slatkim mukama studiranja.

I naravno ništa bez mog Bonija koji je za svako moje učenje bio satima zatvoren sa mnom u sobi, upijao znanje i naravno tješio šapicama i maženjem.

Također hvala i mojim prijateljima i kolegama koji su mi uljepšali i olakšali studentske dane, uspomene ostaju zauvijek.

Veliko hvala profesorima na prenesenom znanju i vještinama. Posebno hvala mojoj mentorici dr. sc. Ivani Ivić i prof. dr. sc. Aniti Pichler na strpljenju, pristupačnosti, uloženom trudu i vremenu, ukazanom povjerenju te na nesebičnoj pomoći i savjetima pri izradi diplomskog rada. Hvala još jednom svima što ste bili uz mene tijekom ovog putovanja, bez Vas ne bih uspjela!

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. VINOVA LOZA	4
2.1.1. Morfologija vinove loze.....	4
2.1.2. Sorte grožđa za proizvodnju vina	7
2.1.3. Cabernet Sauvignon.....	9
2.2. PROIZVODNJA CRNIH VINA.....	10
2.2.1. Prerada grožđa	11
2.2.2. Fermentacija	12
2.2.3. Odležavanje i dozrijevanje.....	15
2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA	16
2.3.1. Alkoholi	16
2.3.2. Kiseline.....	18
2.3.3. Ugljikohidrati.....	20
2.3.4. Aldehidi i ketoni	21
2.3.5. Esteri.....	22
2.3.6. Terpeni.....	22
2.3.7. Tvari arome.....	23
2.3.8. Fenolni spojevi.....	25
2.3.9. Superoksid dismutaza	28
2.4. KROMATOGRFSKE METODE.....	29
2.4.1. Plinska kromatografija (GC).....	29
2.4.2. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME).....	30
3. EKSPERIMENTALNI DIO	32
3.1. ZADATAK	33
3.2. MATERIJALI	33
3.3. METODE.....	33
3.3.1. Određivanje aromatskog profila	33
3.3.2. Određivanje ukupnih polifenola	36
3.3.3. Određivanje ukupnih flavonoida.....	36
3.3.4. Određivanje ukupnih antocijana	37
3.3.5. Određivanje polimerne boje.....	37
3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	38
4. REZULTATI	41
5. RASPRAVA	53
6. ZAKLJUČCI	59
7. LITERATURA	62

Popis oznaka, kratica i simbola

ABTS	2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin sulfonska kiselina)
CUPRAC	eng. cupric-reducing antioxidant capacity
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FRAP	eng. ferric-reducing/antioxidant power assay
GC	plinska kromatografija
GC/MS	plinska kromatografija s masenom spektrometrijom
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
RI	retencijski indeks
ROS	reaktivne kisikove vrste
RV	retencijsko vrijeme
SOD	superoksid dismutaza
SPME	mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (eng. <i>solid-phase microextraction</i>)
TE	ekvivalent troloxa

1. UVOD

Alkoholno piće daleke i duge povijesti čiji dokazi o konzumaciji sežu još od davnina naziva se vino. Prema Zakonu o vinu (NN 32/19), vino je definirano kao poljoprivredno prehrambeni proizvod koji se dobiva potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta od svježeg grožđa i od grožđa pogodnog za preradu u vino. Proizvodnja bijelih vina razlikuje se od proizvodnje crnih vina, a glavna razlika je u procesu vrenja gdje se kod crnih vina provodi vrenje masulja, a kod bijelih vrenje mošta. Voda, etanol kao najzastupljeniji alkohol, bioaktivne komponentne, šećeri, viši alkoholi, kiseline, hlapljivi aromatski spojevi i mineralne tvari čine kompleksan sastav vina (Ivić, 2022).

Cabernet sauvignon predstavlja najpoznatiju vinsku sortu crnog grožđa, a nastala je križanjem cabernet franca i sauvignona bijelog. Ova sorta prilagođava se različitim tlima, otporna je na štetočine i bolesti te se uzgaja u cijelome svijetu. Vino Cabernet Sauvignon karakterizira crvena boja, a po sastavu ovo crno vino bogato je alkoholima, kiselinama, aromama te bioaktivnim komponentama.

Aroma predstavlja jednu od najvažnijih senzorskih karakteristika koja je odgovorna za karakter i kakvoću vina te koja ima vrlo važnu ulogu pri odabiru vina od strane potrošača (Pretorius i sur., 2003). Uz aromu, boja je također važna karakteristika i ostavlja snažan vizualan dojam svojstven određenom vinu. Proizvedeno vino je upravo zbog gore navedenog potrebno ispravno skladištiti kako bi se očuvali pigmenti i aromatski spojevi te kako ne bi došlo do utjecaja na tvari arome i boje. Fenolni spojevi su glavne bioaktivne komponente vina koje zbog antioksidativnih svojstava imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje. Antocijani, flavonoidi i fenolne kiseline kao jedni od predstavnika fenolnih spojeva odgovorni su za boju i okus vina.

Fermentacija je najvažniji korak u proizvodnji vina. Odvija se uz prisustvo kvasaca, uključuje anaerobnu pretvorbu šećera u alkohol i ugljikov dioksid, a cijeli proces kataliziran je enzimima. Tijekom maceracije masulja i vrenja, neizostavnih koraka u proizvodnji crnih vina, dolazi do obogaćivanja mošta tvarima arome i polifenolnim spojevima, te u konačnici do nastanka vina.

Cilj ovoga rada bio je ispitati utjecaj procesa fermentacije na tvari boje i arome vina Cabernet Sauvignon kutjevačkog vinogorja, berbe 2023. godine. U tu svrhu, analizirani su uzorci vina Cabernet Sauvignon na početku fermentacije, tijekom burne fermentacije i po završetku fermentacije, određen im je polifenolni sastav i aroma te je provedena usporedba rezultata.

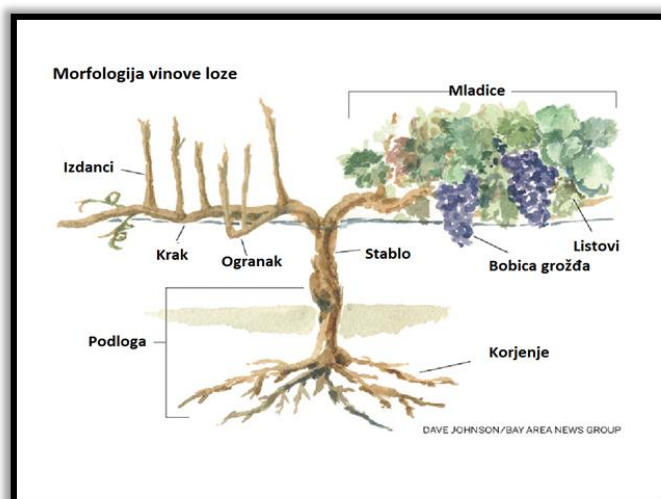
2. TEORIJSKI DIO

2.1. VINOVA LOZA

Vinova loza (lat. *Vitis vinifera*) spada u jednu od najstarijih kultiviranih biljnih vrsta iz porodice *Vitaceae* ili *Ampelidea* (Olmo, 1995). Ovu porodicu čine biljke povijuše vitkog stabla koje su karakteristične po viticama kojima se oslanjaju, učvršćuju te koje im služe za penjanje ili puzanje po zemlji. Prema Zakonu o vinu (NN 32/19), sorte vinove loze u koju spadaju vrste *Vitis vinifera* ili križanci vrste *Vitis vinifera* s drugim vrstama roda *Vitis* su jedine sorte vinove loze korištene za proizvodnju vina. Rod *Vitis* dijeli se na dva podroda u koja spadaju podrod *Muscadinia* i podrod *Euvitis*, jedini važni za vinogradarsku proizvodnju (Pichler, 2022). Podrod *Euvitis* dijeli se na 30 sjevernoameričkih, 40 istočnoazijskih te na jednu euroazijsku vrstu u koju spada *Vitis vinifera*. Zbog svoje otpornosti na niske temperature i bolesti poput filoksere američke vrste koriste se same, a moguća je i primjena u obliku hibrida tj. podloga za europske vinske loze. U najpoznatije američke vrste spadaju *Vitis riparia*, *Vitis berlandieri* i *Vitis rupestris*. Hibridi mogu nastati slučajnim oprašivanjem ili se dobivaju namjerno zbog otpornosti na bolesti i klimatske uvjete (Zoričić, 1996). Euroazijska *Vitis vinifera* ima dvije podvrste: *Vitis vinifera* var. *silvestris* tj. podvrsta europske divlje loze i *Vitis vinifera* var. *sativa* odnosno podvrsta europske kulturne loze. Divlja euroazijska loza *Vitis sylvestris* predstavlja predak vinove loze (Maletić i sur., 2008).

2.1.1. Morfologija vinove loze

Čokot ili trs naziva se svaka pojedina biljka vinove loze koja spada u drvenastu, listopadnu i grmoliku penjačicu (Hulina, 2011). Kako je prikazano na **Slici 1**, glavni dijelovi vinove loze su nadzemni dio kojeg čini stablo (krakovi i ogranci), pupovi, vitice, rozgva, zaperci, listovi, grozdovi, cvjetovi, cvatovi i bobice te podzemni dio tj. korijen. Na trsu se razlikuju generativni i vegetativni organi. U vegetativne organe spadaju korijen, pupovi, stablo s krakovima i ograncima, mladice, lišće i rozgva, a njihova uloga je opskrba biljke vodom i hranjivim tvarima. Generativnim organima glavna uloga je razmnožavanje i u ovu skupinu spadaju cvijet, cvat, vitica, grozd, bobica i sjemenka (Mirošević, 1996; Blesić i sur., 2013).



Slika 1 Morfološki prikaz vinove loze (Pichler, 2022)

Korijen kao vegetativni organ osigurava stabilnost i čvrstoću stablu, nadzemnim dijelovima vinove loze dovodi vodu i hranjive tvari te služi i kao skladište ugljikohidrata i bjelančevina. Razlikujemo površinsko korijenje (brandusi) koje se nalazi 5 do 10 cm ispod razine tla, zatim srednje korijenje na 15 do 20 cm ispod razine tla te glavno korijenje koje prodire duboko u tlo i koje predstavlja najvažniji dio (Keller, 2015; Mirošević, 1996).

Stablo predstavlja nadzemni dio trsa koji nastaje iz zimskih pupova vegetativnim putem (Licul i Premužić, 1993). Stablo je prekriveno korom, početak stabla nalazi se odmah iznad tla, mjesto grananja predstavlja završetak stabla, a na stablu se nalaze još i krakovi, ogranci te mladice i lišće. Provodni snopovi koji prolaze kroz stablo služe za prijenos hranjivih tvari i vode od korijena kao podzemnog organa do lista kao nadzemnog i obrnuto. Na visinu i debljinu stabla utječu sorte vinove loze te načini uzgoja vinove loze.

Mladice (rozgva) su organ koji se razvija iz pupova, a s obzirom na dio trsa iz kojeg se razvijaju postoje rodne mladice i nerodne mladice. Rodne mladice su mladice koje na sebi nose cvatove tj. grozdove, dok su nerodne mladice bez grozdova. Mladice su na početku vegetacije zelene, a tijekom vegetacije mijenjaju boju u narančastu, crvenu, smeđu. Zrele mladice postaju jednogodišnje drvo kada s njih u jesen otpadne lišće. Mladice razvijene iz jednogodišnjeg drveta su najvažnije mladice u vinogradarskoj proizvodnji (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008).

Razlikujemo tri vrste pupova: ljetni (zaperci), zimski (pravi) i spavajući (pričuvni) pup. Zimski i ljetni pupovi razvijaju se iste godine. Zaperci su za razliku od glavne mladice kraći, tanji, svjetliji, nerodni te ih se uglavnom odstranjuje. Zimski pupovi su stožastog oblika i sadrže dva

lista prekrivena smolom. Pričuvni pupovi su prekriveni korom i ova vrsta pupa miruje sve do nastanka povoljnih uvjeta poput dovoda hranjiva pri oštrijem rezu (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008). Pri vrhu se rodnoš pupova smanjuje, a od osnove do sredine trsa rodnoš pupova se povećava (Licul i Premužić, 1993).

Listovi su smješteni na koljencu mladice, a sadržavaju peteljke i plojke s licem i naličjem. Prema veličini razlikuju se mali listovi (10 – 12 cm), srednje dugi listovi (17 – 20 cm) te veliki listovi (više od 20 cm). Ovisno o sorti i vrsti, naličje lista prekriveno je dlačicama koje karakteriziraju različite veličine i različita gustoća. Svaka sorta vinove loze ima svoj specifičan oblik lista i stoga se na temelju oblika lista može odrediti sorta vinove loze. Listovi imaju važnu ulogu u procesu fotosinteze, transpiracije i disanja (Maletić i sur., 2008).

Cvat je generativni organ sa skupom cvjetova sastavljenih u grozd. Ovisno o sorti, svaka mladica uglavnom ima dva cvata, a svaki cvat sadrži od 100 do 1500 cvjetova. Građu cvijeta čine: čaška, prašnici, vjenčić, tučak i žlijezde nektarije (Maletić i sur., 2008). Cvjetovi su sitni, pravilni, većina sorti ima dvospolan cvijet, a moguća je i samooplodnja (Hulina, 2011).

Vitice su zakrčljali grozdovi koji su potrebni vinovoj lozi za penjanje i učvršćivanje uz žicu oko koje se spiralno uvijaju.

Grozd se sastoji od bobica i peteljki koje drže bobice, a nastaje iz cvata nakon oplodnje te su oboje iste građe. Prema obliku grozdovi mogu biti: nepravilni, stožasti, valjkasti i valjkasto-stožasti. S obzirom na veličinu razlikuju se mali (50 do 120 g), srednje veliki (120 do 250 g), veliki (250 do 500 g) i vrlo veliki (> 500 g) grozdovi. Grozdovi se prema zbijenosti dijele na zbijene, vrlo zbijene, rastresite i vrlo rastresite grozdove (Pichler, 2022). Peteljka predstavlja kostur grožđa čiji udio u grozdu varira od 2 do 8%. Duljina peteljčice ima važnu ulogu pri određivanju tipa grozda. Peteljka sadrži polifenole (osobito tanine), mineralne tvari (kalij) i malu količinu šećera (Sokolić, 1976).

Bobica čini glavni i najvažniji dio grozda. Ovaj generativni organ razvija se nakon oplodnje, a čini 92 do 97% grozda. Tri glavna dijela bobice su kožica (7 do 10%), meso (75 do 85%) i sjemenke u sredini (3 do 5%). Udio pojedinih dijelova bobica, oblik, veličina i boja bobice razlikuju se ovisno o sorti (Paunović i Daničić, 1976). Kožica (epikarp) bobice građena je od šest do deset slojeva, odgovorna je za tvari boje i tvari arome u vinu, a kožica crnih sorti bogatija je polifenolima. Voštani sloj na površini kožice služi kao zaštita od isušivanja i odgovoran je za baršunasti izgled bobice. Kemijski sastav bobica čine: voda, šećeri, organske kiseline, mineralne tvari i celuloza (Zoričić, 1996). Sjemenka se sastoji od masne jezgre okružene

drvenom ljuskom. Sjemenka nastaje iz zametaka u tučku, a broj sjemenki ovisi o broju zametaka koji se oplode. Razlikuju se i sorte koje nemaju sjemenke i koriste se za sušenje tj. proizvodnju groždica. Meso (mezokarp) bobice čini groždani sok, a predstavlja glavni dio bobice na koji otpada veliki postotak mase bobice, čak 75 do 85% (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008).

2.1.2. Sorte grožđa za proizvodnju vina

Klasifikacija sorti vinove loze temelji se na sljedećim obilježjima:

- morfološka: boja, veličina i oblik bobice, oblik grozda i oblik lista,
- fiziološka: vrijeme dozrijevanja,
- gospodarska obilježja i
- geografsko podrijetlo: sorte iz zapadne Europe, iz crnomorskog bazena i sorte iz Azije i istočnih zemalja.

Prema fiziološkim obilježjima sorte vinove loze dijele se na :

- vrlo rane sorte,
- rane sorte,
- srednje kasne sorte,
- kasne sorte te na
- vrlo kasne sorte.

Prema gospodarskim obilježjima i s obzirom na namjenu dijele se na:

- vinske sorte,
- stolne sorte,
- sorte za sušenje i
- sorte za ostale namjene poput proizvodnje destilata i soka.

Odabir sorte vinove loze važan je za uzgoj grožđa i za proizvodnju vina.

Vinske sorte i njihova primjena:

- za proizvodnju vrhunskih vina koriste se visoko kvalitetne vinske sorte,
- kvalitetne sorte koriste se za proizvodnju kvalitetnih vina na izuzetnim položajima te za proizvodnju vrhunskih vina,
- sorte niske kakvoće imaju primjenu u proizvodnji stolnih vina.

U Hrvatskoj na izbor i kakvoću sorti najveći utjecaj ima klima. Područje Republike Hrvatske dijela se na dvije velike vinogradarske regije koje se dalje raščlanjuju na podregije.

Najvažnije vinske sorte u RH:

Kontinentalna Hrvatska

Za proizvodnju bijelih vina:

- Graševina bijela,
- Rajnski rizling bijeli,
- Chardonnay bijeli,
- Traminac crveni,
- Traminac mirisavi,
- Pinot bijeli,
- Pinot sivi,
- Sauvignon bijeli i
- Plemenka bijela.

Za proizvodnju crnih vina:

- Frankovka crna,
- Cabernet Sauvignon crni,
- Pinot crni,
- Portugizac crni,
- Zweigelt i
- Merlot crni.

Primorska Hrvatska

Za proizvodnju bijelih vina:

- Malvazija Istarska bijela,
- Pošip bijeli,
- Maraština bijela,
- Grk bijeli,
- Žilavka bijela,
- Kujundūša bijela te
- Žlahtina bijela.

Za proizvodnju crnih vina:

- Plavac mali,
- Babić crni,
- Teran crni,
- Cabernet Sauvignon crni,
- Merlot crni,
- Plavina crna i
- Crljenak (Pichler, 2022).

2.1.3. Cabernet Sauvignon

Cabernet sauvignon (**Slika 2**) najpoznatija je i najuspješnija vinska sorta grožđa koja ima primjenu u proizvodnji crnih vina. Nastala je u 17. stoljeću u Francuskoj (pokrajina Bordeaux), a danas se uspješno uzgaja u cijelom svijetu (Herjavec, 2019). Ova vrhunska vinska sorta nastala je slučajnim križanjem cabernet franca i sauvignona bijelog (Bowers i Meredith, 1997). Podregije Republike Hrvatske za koje je karakterističan uzgoj cabernet sauvignon sorte su Prigorje, Slavonija, Moslavina, Plešivica, Podunavlje te Primorska Hrvatska. Uzgoju najviše odgovaraju viši brežuljkasti krajevi, a uspješnost uzgoja je slična na dubokim, ali i na plitkim tlima te suhim tlima. Sorta je srednje otporna na pepelnicu, a prema botritisu ima vrlo dobru otpornost. Sorta cabernet sauvignon dozrijeva kasno, a karakterizira ju: snažan rast, umjerena otpornost na bolesti, peronosporu, truljenje i smrzavice, dobro podnošenje suša i kišnih razdoblja (ukoliko ne traju predugo) te dobar urod (Robinson i sur., 2012). Sorta razvija čokot velike vegetativne snage. Grozdovi su mali, zbijeni, stožastog oblika, dužine 15 cm i širine od 8 cm. Cvjetovi su dvospolni, a tamnozeleni listovi (peterodijelni) su srednje veličine i okruglog oblika. Bobice su okrugle, mogu biti male ili srednje, a karakterizira ih crnomodra (tamnoplava) boja. Meso bobice ima sočan i slatkast okus te specifičan miris. Bobice imaju i debelu čvrstu pokožicu što ovu sortu čini otpornijom i lakšom za uzgoj. Sok je bezbojan sa specifičnim okusom na zelenu travu. Ovu sortu karakterizira još i srednje bujan trs, vitke mladice te crvenkasta srednje duga i srednje debela peteljka (Mirošević i sur., 2009). Crno vino Cabernet Sauvignon je visokokvalitetno vino bogato kiselinama, aromama, bioaktivnim komponentama i alkoholima sa specifičnim okusom i mirisom. Vino karakteriziraju note crnog ribiza, borovnice, višnje, tamne čokolade i džema od šljiva. Cabernet Sauvignon je vino tamnocrvene boje s blagim prijelazom na ljubičastu, blage trpkosti, jakog okusa i male kiselosti. Intenzitet boje Cabernet Sauvignon vina varira ovisno o tehnikama proizvodnje vina i o regiji u kojoj je

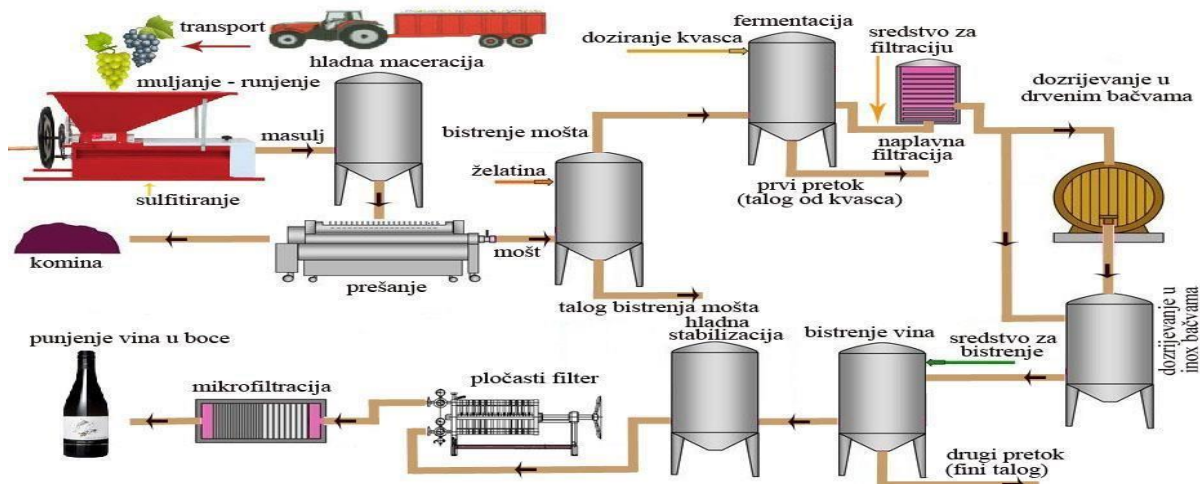
grožđe uzgajano. Sadržaj alkohola je između 12 i 13 vol.%, ukupnih kiselina ima između 5 i 7 g/L, a glicerola između 7,5 i 9,5 g/L (Ivić, 2022; Krstulović, 2008).



Slika 2 Grozd cabernet sauvignon (Web 1)

2.2. PROIZVODNJA CRNIH VINA

Proizvodnja crnih vina (**Slika 3**) je vrlo složen i dugotrajan postupak kojeg čini više različitih procesa. Kod crnih vina, za razliku od bijelih, maceracija se odvija usporedno s alkoholnom fermentacijom (Morata i sur., 2019) Za dobivanje kvalitetnog vina bez nepravilnosti i mana potrebno je osigurati branje tehnološki zdravog i zrelog grožđa, pravilno vrenje mošta, čistoću posuđa i pribora korištenih za skladištenje i fermentaciju te odgovarajuće prostorije i uvjete. Proizvodnju crnih vina karakterizira paralelni postupak maceracije (krutih dijelova grozda) i alkoholne fermentacije mošta.



Slika 3 Shematski prikaz proizvodnje crnih vina (Pichler 2022)

Klasična vinifikacija crnih vina sastoji se od sljedećih faza:

- muljanje-runjanje grožđa i punjenje posuda,
- sumporenje (sulfitiranje) masulja,
- maceracija i alkoholna fermentacija,
- odvajanje mošta od taloga (ocjeđivanje i prešanje) te
- završna alkoholna i malolaktična fermentacija (ako je potrebna) (Pichler, 2022).

Proizvodnja vina započinje berbom grožđa u vinogradu pri čemu je posebno važno voditi računa o tehnološkoj zrelosti grožđa. Ova početna faza je ključna za kvalitetu vina i svojstva vina. Provjerava se sadržaj šećera i kiselina u bobicama, a grožđe je dostiglo svoju tehnološku zrelost kada se sadržaj šećera u bobicama ne mijenja (koncentracija šećera u bobicama je dostigla maksimum). Berba grožđa provodi se ručno ili pomoću strojeva. Prijevoz ubranog grožđa do vinarije (u kašetama ili u rinfuzi) i preradu grožđa potrebno je obaviti u što kraćem vremenskom roku kako bi se spriječilo pucanje i gnječenje bobica, istjecanje soka grožđa, prijevremena fermentacija, oksidativne promjene te razvoj i širenje mikroorganizama.

2.2.1. Prerada grožđa

Početak prerade grožđe započinje procesima muljanja i runjanja koje je potrebno provesti što prije. Runjanje je tehnološka operacija odvajanja bobica od peteljki koje zbog visokog sadržaja tanina vinu daju gorak i trpki okus te potencijalno narušavaju kvalitetu mošta. Tijekom muljanja i runjanja važno je paziti da ne dođe do drobljenja sjemenki, peteljki i pokožica zbog prisutnih

tanina (Law, 2006). Muljanje uključuje gnječenje grožđa s ciljem izdvajanja groždanog soka iz bobice (razdvajanje čvrste od tekuće faze). Ova faza prerade obavlja se na strojevima koji se nazivaju runjače-muljače. Grožđe ulazi u rotirajući cilindar, u perforiranom bubnju odvajaju se bobice od peteljki nakon čega se odvojene bobice gnječe valjcima (Grainger i Tattersall, 2005). Na ovaj način kao konačni proizvod nastaje smjesa koju čini grožđani sok i čvrsti dijelovi bobica (meso, sjemenke i pokožica) koja se naziva masulj. Dobiveni masulj potrebno je sumporiti nakon muljanja i runjanja ili tijekom tih operacija (Licul, Premužić, 1977). Sumpor ima primjenu u vinarstvu kao dozvoljeno enološko-vinarsko sredstvo koje sprječava nepoželjne i štetne procese u moštu i vinu. Sumporenje se provodi sa 10 do 15 g/hL kalijeveg metabisulfita s ciljem sprječavanja kvarenja, oksidacijskih reakcija, razmnožavanja divljih kvasaca i bakterija te s ciljem ubrzavanja taloženja mošta (nečistoća). Količina sumpora koju je potrebno dodati i vrijeme sumporenja ovise o zdravstvenom stanju tj. ispravnosti grožđa (grožđe koje je trulo potrebno je više sumporiti), zrelosti grožđa (nedovoljno zrelo grožđe zahtjeva više sumpora), vremenu u trenutku kada je grožđe brano (više se sumpori ako je bilo toplo vrijeme), temperaturi i sastavu mošta (Tomas i Kolovrat, 2011). Nakon muljanja i runjanja slijede maceracija i fermentacija.

Postupak maceracije ima poseban značaj u proizvodnji crnih vina jer se tijekom ovog postupka postupno ekstrahiraju polifenolni spojevi, tvari arome i tvari boje te mineralne tvari sadržane u čvrstim dijelovima grožđa (pokožica i sjemenke) u mošt. Ovaj korak je ključan jer se maceracijom ekstrahiraju antocijani iz pokožice odgovorni za boju crnog vina i tanini, antioksidansi zaslužni za gorak i trpki okus budućeg vina. Uvjeti maceracije poput temperature, vremena, učestalosti miješanja, koncentracije sumpora utječu na intenzitet boje i arome. Temperatura između 20 i 25 °C predstavlja temperaturu koja je idealna za uspješnu provedbu maceracije (Ivić, 2022; Claus, 2019). Mogući je i dodatak pektolitičkih enzima koji razgrađuju pektin u kožici bobica i koji su zaslužni za postizanje bolje ekstrakcije tvari boje iz kože. Duljina trajanja maceracije je od velikog značaja u proizvodnji crnih vina tj. dulja maceracija rezultira boljom kakvoćom i intenzitetom boje (Gómez-Plaza i sur., 2002).

2.2.2. Fermentacija

Fermentacija je najvažniji proces u vinarstvu koji se odvija uz prisustvo kvasaca. Glavni spojevi arome nastaju tijekom alkoholne fermentacije djelovanjem kvasaca (Antonelli i sur., 1999). Fermentacija može biti spontana (provode ju kvasci iz mošta; nativni ili prirodni kvasci) i pomoću selekcioniranih kvasaca (dodaju se; dobiveni umjetnim putem). Na površini bobica

grožđa ili opremi za vinifikaciju nalaze se kvasci dospjeli iz tla zrakom, česticama prašine, insektima, ali njihova koncentracija nije dovoljna za alkoholnu fermentaciju i zbog toga se masulju u suvremenom vinarstvu dodaju selekcionirani kvasci za dobivanje kvalitetnih proizvoda sa zadovoljavajućim karakteristikama. Vinski kvasci proizvode i spojeve arome te na taj način sudjeluju u formiranju senzorskih karakteristika vina. Brojna istraživanja pokazala su da vinski kvasci imaju veliki utjecaj i na sastav hlapljivih komponenata arome vina (Ramon-Portugal i sur., 1990). Nakon sumporenja slijedi dodatak selekcioniranih kvasaca uslijed čega dolazi do vrenja mošta tj. alkoholne fermentacije. Korišteni selekcionirani kvasci najčešće pripadaju rodu *Saccharomyces cerevisiae* jer najbolje podnose visoke koncentracije alkohola i brzo se talože, ali moguća je i primjena kvasaca drugih rodova (*Candida*, *Hanseniaspora*, *Pichia*) (Padilla i sur., 2016). Uloga selekcioniranih kvasaca je fermentacija glukoze tj. pospješivanje i bolja kontrola fermentacije (Banović, 2020). Važno je da se kvasci po završetku fermentacije dobro i brzo istalože na dno posude (Divol i Bauer, 2010).

Alkoholna fermentacija (alkoholno vrenje) je anaerobni proces prevođenja šećera u alkohol (glukoze u etanol) i ugljikov dioksid. Cijeli proces kataliziran je enzimima koje metaboliziraju kvasci. U procesu fermentacije koja je dinamična u samome početku nastaje i energija koju kvasci najviše koriste za rast i razvoj, a dio energije oslobađa se i u obliku topline. Osim spomenutih glavnih produkata alkoholne fermentacije (etanol i ugljikov dioksid), nastaju još i sekundarni produkti poput estera, viših alkohola i masnih kiselina. Metabolizam kvasaca dovodi i do nastanka spojeva arome. Prva faza fermentacije je aerobna i u njoj kvasci kisikom iz zraka razlažu šećer do ugljikovog dioksida, a druga faza je anaerobna i u njoj se šećeri razlažu do etanola i ugljikovog dioksida. Alkoholna fermentacija provodi se u drvenim, betonskim ili metalnim vrionicama. Dvije faze alkoholne fermentacije su odvojene, a to su glavno (burno) vrenje i naknadno (tiho) vrenje. Glavno vrijeme može biti toplo i provodi se na temperaturama od 15 do 18 °C u trajanju od 5 do 10 dana te hladno koje traje 7 do 14 dana i provodi se na 10 do 15 °C. Suvremene tehnologije preporučuju hladno vrenje. Naknadno (tiho vrenje) odvija se na temperaturi od 15 °C i traje 3 do 6 tjedana. Proces fermentacije je na početku buran (traje tri do 5 dana), dolazi do stvaranja pjene na površini te je u početku brže razmnožavanje kvasaca, trošenje šećera i nastanak ugljikovog dioksida. Nakon burne faze slijedi otakanje mošta u posude koje moraju biti pune i zatvorene. Započinje faza smirivanja (tiho vrenje) u kojoj je smanjena aktivnost kvasaca, raste količina alkohola, smanjuje se količina šećera te se u ovoj fazi formiraju karakteristike budućeg vina. Slijedi eventualna malolaktička fermentacija koju provode bakterije mliječne kiseline rodova *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus*. Ove

bakterije vinu daju kompleksnost i blagu maslačnu aromu. Jabučno-mliječna fermentacija provodi se s ciljem transformiranja jake jabučne kiseline u blažu mliječnu kiselinu. Kraj fermentacije označava smirivanje vina i stvaranje nepoželjnog taloga na dnu posude. Temperatura, kemijski sastav mošta, kultura selekcioniranih kvasaca, izvori dušika imaju ključnu ulogu jer o njima ovisi sami tijek i intenzitet fermentacije.

Temperatura ima veliki utjecaj na sami tijek i dinamiku fermentacije. O temperaturi ovisi vrijeme početka (odmah ili nakon nekoliko dana) i trajanje fermentacije te količina nastalog alkohola. Temperatura od 28 do 25 °C predstavlja najpogodniju temperaturu i kod ove temperature svaki dan provrije ista količina šećera. Temperatura fermentacije može porasti sa 20 °C na oko 30 °C do 32 °C (može se povisiti za 10 °C ili više). Potrebna je kontrola temperature tijekom fermentacije budući da kvasci prestaju djelovati na temperaturama koje su više od 35 °C (kvasci ne smiju prestati fermentirati prije nego što potroše sav šećer). Provođenje fermentacije na nižim temperaturama rezultira boljim rastom kvasaca, stvaraju se aromatske karakteristike i u konačnici nastaje vino s većom koncentracijom alkohola. Na višim temperaturama fermentacija je burna, ugljikov dioksid i hlapljivi aromatični sastojci naglo izlaze, a sama fermentacija brže završava (Muštović, 1985). Temperature od 15 °C do 20 °C pogoduju razvoju intenzivnije arome, povećava se udio alkohola i smanjuje se udio octene kiseline. Na temperaturi od 25 °C fermentacija započinje nakon 12 sati, kod 17 do 18 °C fermentacija započinje nakon 24 sata, na 15 °C fermentacija će započeti tek nakon 5 do 6 dana, dok fermentacija kod 10 °C započinje teško (Grainger i Tattersall, 2005; Claus, 2019).

Mošt je groždani šećer koji sadrži 70 do 80% vode (ranije sorte sadrže više, a kasnije manje vode). Šećeri najviše utječu na kvalitetu mošta i vina, a sadržaj šećera ovisit će o zrelosti i ekološkim čimbenicima. Sazrijevanjem se sadržaj šećera povećava, a sadržaj kiselina smanjuje. Na proces fermentacije najveći utjecaj imaju vinska (daje okus kiselosti), jabučna (najnestabilnija; razgrađuje se na etilni alkohol i ugljikov dioksid), limunska i jantarna kiselina. Kiseline inhibiraju rad štetnih bakterija i omogućavaju pravilno vrenje mošta (Zoričić, 1996).

U procesu fermentacije kvasci imaju ključnu ulogu zbog sposobnosti pretvorbe šećera u etanol i ugljikov dioksid. Kvasci zbog svoje otpornosti mogu nadvladati prisutne mikroorganizme, a ključna je i činjenica da kvasci značajno utječu na aromu budućeg vina. Pravilan odabir kvasaca može dovesti do stvaranja željenih spojeva arome i okusa. Kvasci koji ne pripadaju rodu *Saccharomyces* imaju ograničenu sposobnost fermentacije te stvaraju visoke koncentracije spojeva koji nepoželjno utječu na senzorske karakteristike (octena kiselina, acetaldehid, etil acetat) (Ciani i Comitini, 2019).

Dušik (iz aminokiselina) je hrana kvascima i ima veliki utjecaj na brzinu alkoholne fermentacije. Nedostatak dušika u moštu ograničava razmnožavanje kvasaca, a time se povećava rizik od usporene fermentacije (Zoričić, 1996). Kisik je potreban kvascima za pravilan razvoj i važan je za uspješno provođenje fermentacije.

2.2.3. Odležavanje i dozrijevanje

Po završetku fermentacije vino se smiri, a na dnu posude zaostaje nepoželjni talog koji se uklanja kako ne bi nastale neugodne arome i nepoželjni spojevi. Hladna stabilizacija (od $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$) pospješuje taloženje i dolazi do ubrzanog izdvajanja soli vinske kiseline. Poslije hladne sterilizacije vino je potrebno filtrirati. Koriste se razne metode filtracije: naplavni filtri, membranska filtracija, mikrofiltracija. Nepoželjni talog potrebno je ukloniti i to pretakanjem mladog vina i korakom sumporenja vina. Prvi pretok vina je otvoreni i odvija se uz prisustvo zraka prilikom kojeg se uklanjaju neugodni mirisi. Drugi pretok je obično zatvoreni i provodi se kod vina podložnijih posmeđivanju i kod kojih je moguća oksidacija aromatskih spojeva (Tomas i Kolovrat, 2011; Ivić, 2022). Mlado vino potrebno je dodatno bistrirati sredstvima za bistrenje s ciljem uklanjanja koloidnih čestica koje uzrokuju mutnoću. Od organskih sredstava za bistrenje najveću primjenu imaju želatina i tanini, a od mineralnih bentonit. Aciditet (pH vina), temperatura, priprema i unos sredstava za bistrenje imaju veliki utjecaj na efikasnost bistrjenja.

Po završetku fermentacije vino je bez formiranog okusa te ima oštar i neugodan miris (na kvasce). Odležavanjem dolazi do razvoja arome, okusa i mirisa u mladom vinu. Za odležavanje vina koriste se drvene bačve ili tankovi od betona ili nehrđajućeg čelika gdje se tijekom sazrijevanja omekšavaju tanini i dolazi do razvoja poželjnih spojeva arome. Hrast je zbog svoje porozne strukture najbolja sirovina za izradu bačve. Primarna aroma je aroma grožđa, sekundarna je aroma vrenja, a tercijarna aroma i mirisi nastaje pri pretoku i odležavanjem vina (*bouquet*). Kisik je od velikog značaja u procesu dozrijevanja vina. Prodiranje kisika odvija se kroz pore hrastovih bačvi što bitno utječe na formiranje mirisa i okusa (Zoričić, 2013). Starenje u bačvama naglašava karakter vina nastalih od crnih sorti. Vina prije punjenja u ambalažu dozrijevaju. U vinu se odvijaju fizikalne, biološke i kemijske promjene koje održavaju i poboljšavaju organoleptička svojstva vina. Proces dozrijevanja sastoji se od dvije faze: prije punjenja i nakon punjenja vina u boce. Nakon odležavanja vino se puni u ambalažu koja može biti staklena boca, tetrapak, plastična boca. Danas postoje i nove tehnologije poput mikrooksigenacije, odležavanje u barique bačvama, odležavanje na talogu (*sur lie*), ubacivanje

dijelova bačve u vino (u obliku praha, piljevina), a sve s ciljem smanjenja vremena potrebnog za odležavanje (Banović, 2008; Tao i sur., 2014). Optimalna temperatura skladištenja vina koje treba odležati da bi sazrilo je 12 °C (prihvatljivo je od 10 do 14 °C). Zbog neodgovarajuće temperature ubrzava se proces starenja i vino gubi na kvaliteti. Optimalna vlažnost iznosi 65 do 70%, a podrumi za skladištenje i dozrijevanje vina moraju biti tamni.

2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA

Kemijski sastav vina zavisi o sorti vinove loze, sastavu grožđa, zdravstvenom stanju bobica, stupnju zrelosti grožđa, klimatskim uvjetima, načinima prerade i proizvodnje vina. Zakonom o vinu određene su granične vrijednosti pojedinih sastojaka i njihovi odnosi. Voda, etanol, kiseline, šećeri, viši alkoholi, mineralne tvari, hlapljivi aromatski spojevi i bioaktivne komponente glavne su komponente vina. Udio vode, kao glavnog sastojka vina, mijenja se s obzirom na količinu alkohola.

2.3.1. Alkoholi

Alkoholi kao skupina organskih spojeva s jednom ili više hidroksilnih skupina u molekuli su uz vodu najzastupljenija komponenta u vinu. U vinu je prisutan veliki broj različitih alkohola, a u dvije skupine koje su ujedno i osnovne spadaju alifatski i aromatski alkoholi. Alifatski alkoholi dijele se na monovalentne (metanol i etanol) i viševalentne alkohole (glicerol, manitol, 2,3-butandiol). Volumni udjeli su način izražavanja količine alkohola u vinima. Potrebno je otprilike 16 g/L šećera za proizvodnju 1 volumnog postotka alkohola. Prema Pravilniku o vinu dopušteni udio alkohola u vinu kreće se od minimalnih 8,5 vol.% (stolna vina) do maksimalnih 15 vol% (kvalitetna vina i vrhunska vina). Najzastupljeniji alkoholi prisutni u vinu su metanol i etanol.

2.3.1.1. Etanol (etilni alkohol; C₂H₅OH)

Etanol je poslije vode količinski najzastupljeniji sastojak vina, a predstavlja glavni produkt alkoholne fermentacije. U vinu nastaje alkoholnom fermentacijom šećera pomoću kvasaca te ima veliki utjecaj na kakvoću vina. Nastanak etanola proporcionalan je količini prirodno prisutnih šećera u grožđu i moštu. Alkohol dehidrogenaza je enzim koji katalizira ovu reakciju. Etilni alkohol ima veliki utjecaj na organoleptička svojstva vina, na trpkost, na viskoznost, a

još daje i punoću okusa te doprinosi slatkastoj aromi i voćnoj aromi koja se može pronaći u vinu. Također ima antimikrobno djelovanje, u reakciji s kiselinama utječe na stabilnost, a koristi se i kao otapalo nepoželjnih aromatskih tvari. Količina etilnog alkohola (etanola) u vinima kreće se između 10 i 12 vol.%, dok su visoke koncentracije (iznad 14 vol.%) zaslužne za neugodan osjećaj peckanja (Alpeza, 2008; Ivić, 2022; Jordão i sur., 2015).

2.3.1.2. Metanol (metilni alkohol; CH₃OH)

Metanol je nusprodukt nastao hidrolizom pektinskih spojeva uz posredstvo enzima pektinesteraze koji nema utjecaj na senzorska svojstva vina. Metilnog alkohola u vinima ima vrlo malo (oko 30 do 35 mg/L). Zbog prisustva pektinskih spojeva u bobicama grožđa, najviše u kožici, metanola će više biti u vinima čija proizvodnja obuhvaća postupke maceracije i fermentacije masulja. Crna vina sadrže najviše metanola (150 mg/L), slijede ružičasta sa oko 90 mg/L, a bijela vina imaju najmanje metanola (60 mg/L). Crna vina zbog različitog načina proizvodnje i vremena kontakta tekuće faze s krutom fazom za vrijeme maceracije masulja sadržavaju veću količinu metanola (Herjavec, 1990). Veći udio metanola imaju i hibridne sorte te sorte grožđa koje su bogatije pektinom. Metanol je vrlo otrovan alkohol zbog svoje transformacije (oksidacije) do mravlje kiseline ili do formaldehida. Oba navedena spoja su toksična za centralni živčani sustav, a više doze su i smrtonosne te je stoga potrebna kontrola koncentracije metanola u vinima (Moreno i Peinado, 2012; Zoričić, 1996).

2.3.1.3. Glicerol (C₃H₈O₃)

Nakon vode i etanola, glicerol je treća količinski najzastupljenija komponenta vina sa minimalnim sadržajem od oko 5 g/L. Viševalentni alkoholi (polioli) su alkoholi sa više hidroksilnih skupina, a upravo je glicerol najvažniji predstavnik ove skupine. Trovalentni alkohol glicerol proizvode kvasci tijekom alkoholne fermentacije. Koncentracija šećera u moštu, soj vinskog kvasca, alkoholna fermentacija, koncentracija alkohola, prisutnost plemenitih plijesni i sorta grožđa predstavljaju čimbenike o kojima ovisi količina glicerola u vinu. Odležavanjem vina smanjuje se koncentracija glicerola. Koncentracija glicerola kod grožđa koje je zahvaćeno plemenitom plijesni doseže i do 20 g/L. Glicerol je komponenta vina sa velikim utjecajem na postizanje kvalitete vina, odgovoran je za harmoničnost vina, slatkoću, blagost i punoću okusa, a također doprinosi i viskoznosti vina. Zbog svog slatkog okusa pojačava slatkoću etanola kod suhih vina. U procesu proizvodnje kod specijalnih vina (Sherry)

glicerol može poslužiti i kao hrana za različite mikroorganizme (Ribéreau-Gayon i sur, 2006; Moreno i Peinado, 2012).

2.3.1.4. Viši alkoholi

Alkoholi sa više od dva C atoma u svojoj strukturi nazivaju se viši alkoholi. Većina ih nastaje kao sekundarni produkti alkoholne fermentacije (razgradnjom šećera ili aminokiselina), iako neki viši alkoholi mogu dospjeti i iz kože bobica. Viši alkoholi u reakcijama s kiselinama stvaraju estere. U vinu, male količine viših alkohola (do 300 mg/L) doprinose posebnoj (fermentacijskoj) aromi vina, dok koncentracije iznad 400 mg/L imaju negativan učinak na aromatska svojstva vina (Pichler, 2022). Sorta grožđa, vrsta kvasca te uvjeti prerade značajno utječu na koncentraciju ovih alkohola. Veliku ulogu imaju i hlapljivi esteri koji također sudjeluju u stvaranju poželjne arome. Najzastupljeniji predstavnici ove skupine su: izoamilni alkohol, propan-1-ol i izobutilni alkohol (Moreno i Peinado, 2012; Sokolić, 1993).

2.3.2. Kiseline

Kiseline u vinu mogu predstavljati normalne sastojke koji doprinosi mirisu i okusu vina ili mogu biti prisutne kao indikatori kvarenja. Vino sadrži organske kiseline koje mogu biti nehlapljive i hlapljive, zatim anorganske kiseline, a sadržava i soli različitih kiselina. Prema Pravilniku o proizvodnji vinu (NN 2/2005) i Pravilniku o vinarstvu (NN 81/2022) ukupna kiselost u vinu (izražena kao vinska kiselina) kreće se u rasponu od najmanje 4 g/L do najviše 14 g/L. Premali udio kiselina u vinu stvara tupi okus. Organske kiseline imaju utjecaj na organoleptička svojstva vina i na mikrobiološku ispravnost. Na koncentraciju kiselina značajno utječe sorta grožđa, klimatski uvjeti, stupanj zrelosti, položaj, kvaliteta i vrsta tla.

Organske kiseline najvećim dijelom nastaju:

- iz grožđa (preko mošta prelaze u vino),
- razvojem sive plijesni (glukonska kiselina),
- manji dio alkoholnom fermentacijom ili malolaktičkom fermentacijom,
- za vrijeme čuvanja vina.

Malolaktičkom fermentacijom jabučna kiselina prelazi u mliječnu kiselinu koja je puno blaža. U organske kiseline iz grožđa spadaju: jabučna, limunska, vinska, askorbinska, glikolna,

oksalna i glukonska kiselina. Piruvična, octena, mliječna, sukcinna, fumarna i oksalna kiselina su organske kiseline nastale alkoholnom fermentacijom.

Najvažnije nehlapljive organske kiseline su vinska, limunska, jabučna, jantarna i mliječna. Od gore navedenih nehlapljivih kiselina jabučna i vinska su najzastupljenije kiseline (Zoričić, 1996). Sazrijevanje grožđa i povišenje temperature dovodi do pada koncentracije kiselina (naročito jabučne). Do djelomičnog gubitka kiselina dolazi i tijekom proizvodnje vina. Vinska se kiselina (0,5 do 2 g/L) kao najjača kiselina nakon fermentacije nalazi u slobodnom obliku, a vezanjem s mineralima kalija i kalcija prelazi u soli vinske kiseline, tartarate, koji se na niskim temperaturama talože u obliku sitnih kristala. Vinska kiselina znatno utječe i na pH vina (Radovanović, 1986). Jabučna kiselina u vino dopijeva iz grožđa i mošta, a u grožđu se zrenjem smanjuje sadržaj ove kiseline. Vrlo je agresivna kiselina, vinu daje kiselkast, zeljasti okus i potrebno ju je malolaktičkom fermentacijom prevesti u blaži oblik. Jantarna kiselina je odgovorna za gorčinu vina, nastaje alkoholnom fermentacijom i u vinu je prisutna u malim količinama (oko 2 g/L) (Mirošević i sur., 2009). Limunske kiseline u vinu ima oko 0,7 g/L, odgovorna je za svježinu vina i citrusni dojam, potječe iz grožđa i mošta, a može nastati na više načina (Alpeza, 2008).

Hlapljive organske kiseline su grupa masnih kiselina koje isparavaju pri određenim uvjetima. Uglavnom predstavljaju sekundarne produkte alkoholne fermentacije, ali mogu nastati i kao produkti kvarenja. Količina ovih kiselina nastalih alkoholnom fermentacijom ovisi o soju kvasca i uvjetima fermentacije. Stoga upotreba selekcioniranih kvasaca i primjena nižih temperatura doprinose manjem nastanku hlapljivih kiselina. Ukupni sadržaj hlapljivih kiselina u vinu izražava se u octenoj kiselini koja je ujedno i najzastupljeniji predstavnik u vinu. Koncentracija octene kiseline u vinu koja doprinosi aromi vina iznosi od 0,3 do 0,6 g/L. Koncentracije iznad 0,9 g/L odgovorne su za kvarenje vina, octikavost. Vino se smatra octikavim ako su u njemu prisutne hlapljive kiseline.

Octena kiselina nastaje :

- kao sekundarni produkt alkoholnog vrenja iz acetaldehida,
- tijekom čuvanja vina tj. poslije alkoholnog vrenja: oksidacijom etanola,
- kao rezultat kvarenja zbog bakterija (octikavost, vinski cvijet, zavrela).

Ostale hlapljive kiseline kao što su propionska, maslačna, karboksilne kiseline doprinose ukupnoj aromi vina, prisutne su u tragovima, a visoke koncentracije ovih kiselina prisutne su u vinima u kojima je došlo do neke vrste kvarenja (Jackson, 2008; Pichler, 2022).

Najvažnije anorganske kiseline su fosforna i sumporna, a u vinu i moštu pojavljuju se u obliku kalijevih i kalcijevih soli.

2.3.3. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati, organski spojevi od ugljika, kisika i vodika, su osnovni sastojak grožđa na temelju kojeg se određuje tehnološka vrijednost i zrelost grožđa. Prema složenosti ugljikohidrati su podijeljeni na monosaharide, disaharide i polisaharide. Monosaharidi, oligosaharidi, pektini, sluzave tvari i polisaharidi su ugljikohidrati koji se nalaze u sastavu vina i mošta. Šećeri nastaju procesom fotosinteze najvećim postotkom u zelenim dijelovima vinove loze (listu) te nešto manje u bobicama koje dok su još zelene sadrže klorofil (Roger, 2008). Čimbenici koji imaju utjecaj na udio šećera su: sorta grožđa, zdravlje i zrelost bobica, klimatski uvjeti. Količina šećera kod visokokvalitetnih sorti kreće se od 22 do 28%, dok kvalitetne sorte imaju od 18 do 22% šećera (Zoričić, 1996). Moštne vage (Oechslova i Baboova ili Klosterneuburška) i refraktometri koriste se za određivanje količine ugljikohidrata u grožđu i moštu.

Najprisutniji šećeri u vinu i moštu su monosaharidi tj. heksoze (fruktoza i glukoza) čiji se omjer mijenja tijekom dozrijevanja grožđa (Belitz i sur., 2009b). Na početku razvoja bobica sadržava veću količinu glukoze, zrenjem raste udio fruktoze, a omjer glukoze i fruktoze se izjednačava postizanjem tehnološke zrelosti bobice. Iznimku predstavlja prezrelo grožđe kod kojeg je udio fruktoze u odnosu na glukozu veći. Kvasci puno lakše i brže previru glukozu od fruktoze. Manjim dijelom (0,3 do 2 g/L) u crnim vinima prisutne su i pentoze (arabinoza i ksiloza) koje ne previru tijekom fermentacije i ne utječu na slatkoću vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Oligosaharidi koji se mogu pronaći u vinu su saharoza, laktoza, maltoza, trehaloza i rafinoza. Saharoza jedina ima ulogu koja se veže uz kakvoću vina, dok se ostali predstavnici nalaze u tragovima i ne utječu na kakvoću. Fermentirajući šećeri (glukoza i fruktoza) se djelovanjem vinskog kvasca tijekom procesa alkoholne fermentacije prevode u alkohol, ugljikov dioksid i sekundarne metabolite. Šećeri u vinu reduciraju kiselost, trpkost i gorčinu, a svako dodavanje šećera tijekom proizvodnje se zabranjuje, osim u proizvodnji specijalnih vina (Alpeza, 2008). Slatkoću vinu daju nefermentirani (neprevreli) šećeri zaostali nakon fermentacije.

Vina se prema sadržaju neprevrelog šećera dijele na:

- suha vina (< od 4 g/L neprevrelog šećera),
- polusuha (4 – 12 g/L neprevrelog šećera),

- poluslatka (12 – 50 g/L neprevrelog šećera) i
- slatka vina (> od 50 g/L neprevrelog šećera).

Važno je istaknuti i polisaharide (glikogen, pektin, škrob, smole i sluzave tvari) koji otežavaju bistrenje i taloženje vina. Pektini su kao građevne tvari najviše zastupljeni u kožici bobica, a tijekom prerade grožđa mogu prijeći u mošt i vino. Pektini stvaraju komplekse s koloidima zbog čega dolazi do zamućenja vina, otežana je filtracija i bistrenje te se s ciljem njihove razgradnje dodaju pektolitički enzimi (Jackson, 2008).

2.3.4. Aldehidi i ketoni

Aldehidi i ketoni su skupina karbonilnih spojeva značajna za organoleptička svojstva vina. Najzastupljeniji predstavnici su acetaldehid i diacetil. U vinu se javljaju u različitim količinama te znatno utječu na senzorske karakteristike vina jer stvaraju karakteristične arome i bouquet vina. Lako topljive kiseline nastaju reakcijom (vezivanjem) aldehida sa sumporastom kiselinom i njenim solima. Aldehidi u čistom obliku posjeduju oštar miris sa voćnom notom, a heptanal ima najintenzivniji miris. Najvažniji predstavnik, acetaldehid, nastaje tijekom procesa alkoholne fermentacije kao međuprodukt razgradnje šećera. Veliki dio nastalog acetaldehida prevodi se u etanol, a samo manji dio ima doprinos u nastanku arome. Navedeni acetaldehid najzastupljeniji je pripadnik skupine alifatskih aldehida (90%) koji daju ugodan voćni miris. Količina sumpora utječe na količinu acetaldehida u vinu i stoga u manje sumporenom vinu zaostaju veće količine acetaldehida koji je odgovoran za neugodan miris na starost i oksidiranost. Količina acetaldehida u nesumporenom vinu iznosi od 15 do 390 mg/L, a u sumporenom iznosi od 100 do 150 mg/L (Zoričić, 1996). Veće količine ovog spoja imaju Sherry vina zbog svoje proizvodnje koja stimulira oksidacijske reakcije i kod koje je omogućen veliki kontakt vina sa zrakom. Acetaldehida u crnim vinima ima znatno manje nego u bijelim vinima. Dugim odležavanjem vina viši alkoholi mogu oksidirati u aldehide koji doprinose slatkastoj aromi koja podsjeća na sušeno voće i drvo. Aldehidi sa većim broj C-atoma doprinose cvjetnoj ili voćnoj aroma vina (Waterhouse i sur., 2016). Heksanal je aldehyd kojeg se može pronaći u crnim vinima te ima aromu voćnih nota. Metional je također aldehyd crnih vina koji posjeduje aromu kuhanog krumpira. Ketoni (acetone, acetoin i diacetyl) su za razliku od aldehida manje zastupljeni u moštu i vinu. Većina ima miris po svježem maslacu, a veće količine mogu stvoriti neugodnu užeglu aromu (Jackson, 2008; Moreno i Peinado, 2012).

2.3.5. Esteri

Esteri su spojevi alkohola i kiselina koji nastaju esterifikacijom. Ova skupina spojeva ima veliki utjecaj na aromu i okus vina. Esteri su manje prisutni u grožđu jer se njihov udio povećava tijekom fermentacije i za vrijeme odležavanja vina, što znači da ih u vinu ima puno više. S obzirom na podrijetlo esteri se dijele na estere nastale tijekom alkoholne fermentacije (hlapljivi) i estere nastale dozrijevanjem vina (nehlapljivi). Prema podrijetlu nastanka hlapljivi esteri mogu biti acetatni esteri te etil esteri masnih kiselina. Obje vrste doprinose voćnoj, svježoj i privlačnoj aromi mladih vina. Zbog svojstva hlapljivosti, neodgovarajućeg skladištenja i utjecajem temperature i zraka moguće je smanjenje njihove koncentracije tijekom odležavanja. Koncentracije hlapljivih estera u vinima su relativno niske, jedino su etil acetat i etil-laktat prisutni u nešto većim koncentracijama. Octena, mliječna i jantarna kiselina su kiseline koje se najviše esterificiraju. Esteri octene kiseline (etil-acetat, izipropil-acetat, izoamil-acetat, propil-acetat, izobutil-acetat) su ugodnog mirisa i daju vinu svježinu. Esteri kiselina i viših alkohola stvaraju bouquet vina. Esteri masnih kiselina (etil- propionat, etil-dekanoat etil-valerijat, etil-oktanoat i etil heksanoat) imaju parni broj C-atoma te daju ugodan i voćni miris (Alpeza, 2008; Zoričić, 1996; Pichler, 2022).

2.3.6. Terpeni

Terpeni su skupina spojeva karakteristična za svaku pojedinu sortu grožđa. Terpeni se u vinu nalaze u relativno malim količinama (koncentracija je niža od 1 mg/L), a glavni su i važni su nositelji primarnih/sortnih aroma. Također doprinose cvjetnoj i voćnoj aromi, a crnim vinima daju trpki okus (Moreno i Peinado, 2012). Dijele se na slobodne (nevezane) terpene koji su zaslužni za aromu grožđa i mošta te se nalaze u čvrstim dijelovima bobica (kožica i sjemenke) i na vezane (glikozidne) terpene koji se od šećera djelovanjem enzima glikozidaze oslobađaju u procesu proizvodnje vina. Oslobodeni terpeni i terpeni alkoholi (nerol, linalool, geraniol) su aromatičniji i doprinose ukupnoj aromi vina (Michlmayr i sur., 2012). Terpeni najviše postoje u vezanom obliku koji nema utjecaj na miris vina, ali starenjem vina veze se kidaju, terpeni se oslobađaju i stvara se aroma (Alpeza, 2008). Terpeni su sastavljeni od izoprenskih jedinica (C_5H_8) na temelju kojih se dijele na monoterpeni koji sadrže dvije izoprenske jedinice, seskviterpeni sa tri izoprenske jedinice te diterpeni sa četiri izoprenske jedinice. Monoterpeni čine primarnu aromu vina, karakterističnog su mirisa, a u biljci se nalaze u obliku aldehida, ugljikovodika, alkohola, kiselina i estera. Udio i vrsta monoterpena ovise o sorti i zrelosti grožđa, starenju vina, korištenju glikozida (Wedler i sur., 2015; Maicas i Mateo, 2016).

2.3.7. Tvari arome

Tvari arome važan su čimbenik u određivanju kvalitete i karaktera vina, a također su ključne i pri odabiru vina od strane potrošača. Vino čine prepoznatljivim te mu daju određeni sortni karakter. Tvari arome potječu, velikim dijelom, iz kemijskih spojeva prisutnih u grožđu koji se procesom vinifikacije mijenjaju, prelaze u vino i stvaraju specifičnu aromu. Tvari arome određuju se primjenom instrumentalnih metoda poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i plinske kromatografije (GC), primjenom analitičkih metoda te primjenom senzorskog ocjenjivanja. Aroma kao karakteristika prehrambenih proizvoda može biti i indikator zrelosti, zdravstvene ispravnosti te kvarenja. Grožđe, kao i ostalo voće ima svoju karakterističnu aromu, kombinaciju kemijskih spojeva poput aldehida, ketona, kiselina, estera, alkohola, koju je važno što više sačuvati tijekom prerade. Aromatske tvari su najbrojnije u pokožici, ali manji dio nalazi se i u sjemenci te u mesu grožđa. Na stvaranje arome grožđa te na koncentraciju spojeva veliki utjecaj ima sorta grožđa, uvjeti uzgoja, vrsta tla, klimatski uvjeti, stupanj zrelosti i zdravstveno stanje grožđa (Ugliano i sur., 2006). Do formiranja arome vina (bouqueta) dolazi tijekom prerade grožđa, mehaničkim djelovanjem, skladištenjem, a najveći dio spojeva arome nastaje djelovanjem kvasaca tijekom alkoholne fermentacije (Moreno i Peinado, 2012; Nyakanen, 1986). Aromu vina čini veliki broj lako hlapljivih komponenata (više masne kiseline, alkoholi, kiseline, esteri, terpeni) koji su u vinu prisutni u malim koncentracijama.

Aroma vina se s obzirom na podrijetlo spojeva dijeli na:

- primarnu ili sortnu aromu,
- sekundarnu ili fermentacijsku te
- tercijarnu ili aromu dozrijevanja.

2.3.7.1. Primarna aroma

Primarna ili sortna aroma je aroma koja potječe iz grožđa i koja prelazi u vino. Aromatski spojevi prisutni u grožđu mogu biti u slobodnom stanju, mogu se preradom grožđa formirati iz nehlapljivih prekursora koji prelaze u mošt ili se formiraju iz prekursora tijekom fermentacije (Álvarez-Pérez i sur., 2012). Koncentracija spojeva sortne arome ovisi o sorti grožđa, klimatskim uvjetima, sastavu tla, svjetlu, temperaturi, zrelosti grožđa. Proces prerade i njega vina utječu na koncentraciju spojeva sortne arome u vinu (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Maceracija kod crnih vina omogućuje ekstrakciju gore navedenih spojeva u što većoj količini.

Ovoj skupini pripadaju alkoholi sa 6 C-atoma i terpeni alkoholi. Najvažniji nositelji sortnih aroma su terpeni (cvjetna i voćna aroma). Monoterpeni su najjednostavniji terpeni s 10 ugljikovih atoma, prisutni u pokožici i mesu grožđa, a postoje u slobodnom i glikozidnom obliku (Pine, 1994). Slobodni monoterpeni (geraniol, nerol, citronelol, linalol, hotrineol, α -terpineol,) su lako hlapljive komponente koje najviše doprinose formiranju sorte arome.

2.3.7.2. Sekundarna aroma

Sekundarna aroma ili fermentacijska aroma formira se tijekom alkoholne fermentacije i tijekom malolaktičke fermentacije. Metabolizmom bakterija i kvasaca nastaju spojevi zaslužni za ovu aromu. U sekundarne arome vina spadaju esteri, viši alkoholi, hlapljive kiseline, etanol, aldehidi i ketoni. Aromi značajno doprinose i esteri koji se prema podrijetlu dijele na acetatne i na etil estere masnih kiselina. Gore navedeni spojevi nositelji su cvjetno-voćne arome. Na formiranje fermentacijske arome utječu: temperatura fermentacije, soj kvasca, pH mošta, uvjeti maceracije, udio dušika u moštu, koncentracija kisika (Swiegers i sur., 2005).

2.3.7.3. Tercijarna aroma

Tercijarna aroma ili aroma starenja formira se nakon fermentacije, a nastaje za vrijeme odležavanja (dozrijevanje i starenje) vina kao posljedica biokemijskih i kemijskih transformacija. Često se primjenjuje odležavanje vina u hrastovim bačvama zbog formiranja arome drveta (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Odležavanje u hrastovim bačvama rezultira i razvojem arome starenja. Vrlo je važno provoditi kontrolu temperature, relativne vlažnosti i kisika kako bi se izbjegle negativne oksidacijske promjene. Oksidacija postojećih aromatskih spojeva (komponente primarne ili sekundarne arome) i ekstrakcija sastojaka iz drveta bačve su reakcije odgovorne za nastanak bouqueta starenja. Oksidacija povećava sadržaj aldehidnih spojeva koji su odgovorni za voćne arome od kojih su najviše prisutne: miris na dunju, jabuku, orašasto voće te maslačne i medne note. Ekstrakcijom spojeva iz drveta bačve u vino dospijevaju aromatski spojevi poput aldehida, ketona, laktona i hlapljivih fenola čije koncentracije ovise o vrsti drveta, starosti drveta i načinu proizvodnje. Vrijeme odležavanja vina u bačvi također utječe na razvoj arome (Moreno Arribas i Polo, 2008).

2.3.8. Fenolni spojevi

Predstavljaju skupinu molekula biljnog podrijetla te su u različitim koncentracijama prisutni u voću, povrću, čaju, kavi i vinu. Fenolni spojevi su spojevi s cikličkim benzenovim prstenom na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Odgovorni su za senzorske karakteristike vina (boja, okus, gorčina, trpkost), a također su vrlo važni i za kvalitetu vina. Fenolne komponente karakterizira topljivost, obojenost, polimerizacija, vezanje bjelančevina. Pozitivni učinci vidljivi su kroz punoću i zaokruženost okusa, a negativni kroz gorčinu i oštrinu. Najvažnija uloga polifenola je njihov doprinos u obojenosti hrane. Ovi spojevi poznati su i po svom antioksidacijskom djelovanju, baktericidnim i vitaminskim svojstvima te pozitivnom učinku na zdravlje (Carrieri i sur., 2013; Kesić i sur., 2015). Na sastav polifenolnih spojeva u vinu utječe sorta, sastav i zrelost grožđa, tehnologija proizvodnje, kemijske reakcije tijekom dozrijevanja i starenja (Paixão i sur., 2007). Crna vina i crne sorte grožđa su za razliku od bijelih bogatije ovim spojevima na što najviše utječe proces proizvodnje tj. provedba maceracije prije fermentacije. Postupak vinifikacije i maceracija određuju koliko će se fenolnih spojeva ekstrahirati. Najveći udio fenolnih spojeva u vinu potječe iz kožice grožđa odakle ekstrakcijom prelaze u vino. Manji dio može nastati i radom mikroorganizama ili tijekom dozrijevanja, te ekstrakcijom iz drvenih bačvi (Ribéreau-Gayon i sur., 2000b; Kennedy, 2008). U dodiru sa zrakom fenolne tvari mogu lako oksidirati, a djelovanjem enzima polifenoloksidaze reakcija je intenzivnija i dolazi do posmeđivanja vina

Fenolni spojevi u vinu mogu se podijeliti na:

- flavonoide (flavan-3-oli, proantocijanidini, antocijani, flavonoli) i
- neflavonoide (hidroksicimetna kiselina, hidroksi benzojeva, stilbene) (Ribéreau-Gayon i sur., 2000).

Orijentacija i broj fenolnih podjedinica predstavljaju glavnu razliku između flavonoida i neflavonoida.

2.3.8.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najvažnija, najveća i najraširenija skupina spojeva flavanske strukture koji primarno potječu iz sjemenke, kožice i peteljke grožđa. Aglikon predstavlja osnovnu strukturu flavonoida, a većina flavonoida se u biljkama nalazi vezana sa šećerima u obliku glikozida. Flavonoidi imaju složeniju građu koju čine dva fenolna prstena međusobno povezana lancem s tri ugljikova atoma (Ribéreau-Gayon i sur., 2000b; Jackson, 2008). Najčešće su prisutni u crnim

vinima (čine 85% ukupnih fenola) te mogu biti u slobodnom obliku (aglikon) i vezani za druge flavonoide ili neflavonoide. Struktura i stupanj glikolizacije određuju biološku dostupnost i antioksidacijsku aktivnost flavonoida. Ovoj skupini pripadaju flavan-3-oli, proantocijanidini, antocijani i flavonoli odgovorni za boju, okus i trpkost crnih vina (Waterhouse i sur., 2006).

Flavonoli

Flavonoli su pigmenti svijetlo žute boje prisutni u crnim vinima gdje su maskirani antocijanima i u bijelim gdje su nositelji boje. Najviše flavonola nalazi se u kožici grožđa u obliku glikozida. U crnim vinima najzastupljeniji predstavnici flavonola su kvercetin, izoramnetin, kempferol, miricetin (Ivić, 2022). Flavonoli djeluju kao antioksidansi i kao hvatači slobodnih radikala.

Flavanoli i proantocijanidini

Flavanoli sa flavan-3-olom kao predstavnikom su tvari koje doprinose aromatičnosti i boji vina. Flavan-3-ol nalazi se u vinu, čaju, voću (grožđe, jabuke i borovnice) i čokoladi. Ova skupina se razlikuje od drugih flavonoida po tome što ima jednostruku vezu između C2 i C3 atoma umjesto dvostruke veze i jer se ne pojavljuje u obliku glikozida. Najvećim dijelom nalaze se u kožici i sjemenkama i stoga je puno veća koncentracija flavan-3-ola u crnim vinima za čiju su postojanost boje i odgovorni (González-Manzano, 2009). Najzastupljeniji predstavnici ove skupine su katehin i epikatehin, nositelji trpkosti i gorčine koji utječu na obojenost vina.

Polimeri flavan-3-ola nazivaju se kondenziranim taninima, proantocijanidinima, čija količina u vinima ovisi o sorti (Minussi i sur., 2003). Proantocijanidini predstavljaju skupinu monomera, dimera i polimera katehina i epikatehina. Proantocijanidini tipa B su jedini proantocijanidini karakteristični za grožđe i vino. Najviše ih se nalazi u kožici i sjemenkama grožđa, a ekstrahiraju se u fazi maceracije.

Antocijani

Boja je jedna od najvažnijih senzorskih karakteristika, a za intenzivnu boju crnih vina zaslužni su upravo antocijani. Ovi pigmenti odgovorni su za plavu, ljubičastu i crvenu boju, a najviše su zastupljeni u kožici bobice (50% fenolnih spojeva). Nastaju glikozilacijom (vezanjem aglikona s nekim šećerom na C3 mjestu) antocijanidina. Najčešće vezani šećeri su glukoza, ramnoza, ksiloza, galaktoza, arabinoza, rutinoza. Pripadaju skupini flavonoida sa aglikonom, kao glavnim dijelom, i flavilijum kationom sa konjugiranim dvostrukim vezama koje apsorbiraju svjetlo pri valnim duljinama od oko 500 nm (Pichler i sur., 2015). Sadržaj antocijana u vinu najvećim dijelom ovisi o sorti grožđa, zrelosti grožđa, klimatskim uvjetima, vrsti tla, uvjetima uzgoja, uvjetima proizvodnje i slično. Postupkom maceracije antocijani iz bobice grožđa

prelaze u vino. Na boju i stabilnost antocijana u vinu utječu čimbenici kao što su struktura, pH vina, temperatura, šećeri, kisik, svjetlo (Ribéreau-Gayon i sur., 2006b). Antocijani imaju veću stabilnost u kiselom mediju i pri niskim pH vrijednostima. Zahvaljujući antioksidacijskim svojstvima antocijani imaju pozitivan učinak na zdravlje ljudi. Imaju također i antimikrobno, antivirusno i antikarcinogeno djelovanje, skupljaju slobodne radikale i sudjeluju u prevenciji od kardiovaskularnih bolesti (Jing i sur., 2008; Maletić i sur., 2009). Hidrolizom šećernog dijela antocijana nastaju antocijanidini (aglikoni) čiji su najvažniji predstavnici u grožđu: cijanidin, delfinidin, petunidin, peonidin, malvidin i pelargonidin. Malvidin je najzastupljeniji u crnim vinima i ima važnu ulogu u stvaranju boje istih. Slobodni antocijani su nestabilni i nastoje se povezati s drugim komponentama vina kako bi nastao stabilniji polimer te kako bi se povećala stabilnost boje i kvaliteta vina. Drugim riječima, polimerizacija ima vrlo važnu ulogu u stabilizaciji boje vina štiteći antocijanidine od oksidacije. Antocijani se još mogu klasificirati prema broju molekula šećera koji je vezan za antocijanid na monoglikozide i diglikozide (Ivić, 2022; Jackson, 2008).

2.3.8.2. Neflavonoidi

Neflavonoidi, sastavni dio tkiva biljaka i lignina, su spojevi kojima pripadaju fenolne kiseline (derivati hidroksicimetne kiseline i hidroksi benzojeve kiseline) i stilbeni. Imaju jednostavniju građu od flavonoida, a karakterizira ih jedan fenolni prsten. Neflavonoidi su u vinima zastupljeni u malim koncentracijama te su više prisutni kod bijelih vina. Potječu iz mesa bobice grožđa te se njihova koncentracija dozrijevanjem smanjuje, a u vino mogu dospjeti i iz drvenih bačvi tijekom odležavanja (Joscelyne Louise i sur., 2009). Neflavonoidi su nebojeni spojevi koji povezani s obojenim flavonoidima doprinose boji vina, stabilnosti vina, aromi vina i antioksidacijskoj aktivnosti (Minussi i sur., 2003; Ivić, 2022). Neflavonoidi (fenolne kiseline) su najčešće vezani u obliku glikozida i etera, a rijetko se nalaze u slobodnom obliku.

Hidroksibenzojeve kiseline (C6-C1)

Hidroksibenzojeva kiselina je u odnosu na drugu fenolnu kiselinu u vinu prisutna u manjim koncentracijama. U vinu se nalazi u slobodnom obliku, a nastala je iz benzojeve kiseline. U grožđu se pronalazi u obliku estera i glukozida (Castaldo i sur., 2019). Najzastupljenije kiseline iz ove skupine su galna, protokatehinska, p-hidroksibenzojeva, salicilna, vanilinska i siringinska kiselina. Odležavanjem vina u drvenim bačvama povećava se koncentracija ovih spojeva. Galna kiselina je glavna hidroksibenzojeva kiselina nastala hidrolizom kondenziranih

tanina (galata) čija koncentracija u crnim vinima iznosi 95 ng/L. Sorta grožđa, način uzgoja i proizvodnja vina glavni su čimbenici koji određuju udio određene hidrksibenzojeve kiseline (Moreno i Peinado, 2012; Ribéreau-Gayon i sur., 2000b).

Hidroksicimetne kiseline (C6-C3)

Uglavnom su vezane u estere vinske kiseline, ali postoje i glikolizirani oblici. Koncentracija im je veća u kožici i zbog toga su prisutnije u crnim nego u bijelim vinima. Hidroksicimetne kiseline dovode do oksidacije i posmeđivanja vina. Ferulinska, kafeinska, p-kumarna, kaftarna, p-kutarna, sinapinska kiselina, ferulinska spadaju u najzastupljenije hidroksicimetne kiseline u vinu na čiji sadržaj utječu uvjeti uzgoja, klimatske promjene i sama sorta grožđa (Jackson, 2008). Kafeinska je najzastupljenija kiselina u vinu, čini oko 50% ukupne koncentracije.

Stilbeni

Stilbeni nastaju kao posljedica izloženosti biljke infekcijama, UV zračenju, stresu općenito i predstavljaju obrambeni odgovor. Koncentracije stilbena su u bobici grožđa vrlo male, ali ih se ipak u određenom postotku pronalazi u kožici bobica (Ribereau-Gayon i sur., 2006). Procesom vinifikacije prelaze u mošt i vino. Imaju velik broj pozitivnih učinaka kao što su antioksidativno i antikarcinogeno djelovanje. Trans-reservatol je najistraživaniji stilben u vinima zbog gore navedenih pozitivnih učinaka (Buiarelli i sur., 2007). Sintetizira se u kožici, nastaje kao odgovor vinove loze na gljivičnu infekciju i zastupljeniji je u crnim vinima.

2.3.9. Superoksid dismutaza

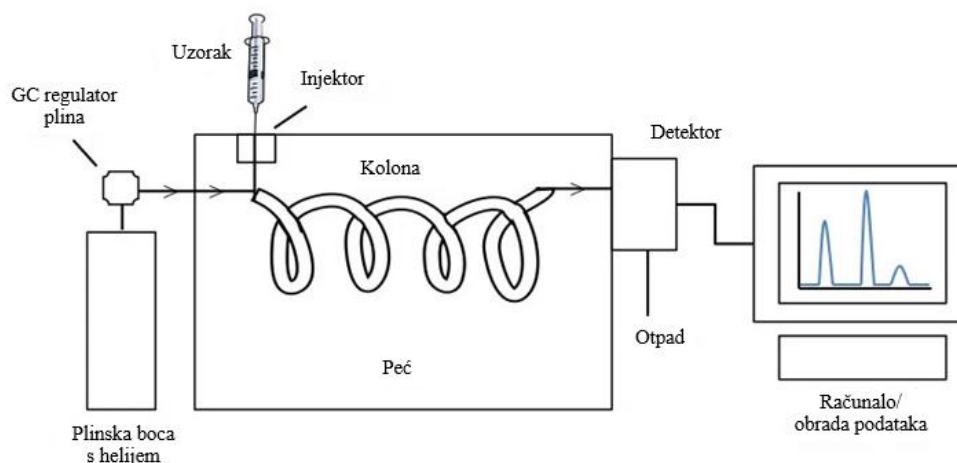
Superoksid dismutaza (SOD) je enzim poznat po svojim antioksidacijskim svojstvima. Ovaj enzimatski antioksidans prisutan je u citosolu, mitohondrijima, peroksisomima, kloroplastima, a uloga mu je razbijanje i uklanjanje slobodnih radikala. Također SOD ima važno ulogu i u obrani od oksidativnog stresa. Redukcija kisika odvija se u 4 koraka pri čemu nastaju reaktivne kisikove vrste (*engl. Reactive Oxygen Species, ROS*) u koje spadaju superoksidni anion (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2), i hidroksilni radikal (HO^-). Smatra se da je starenje kao i niz bolesti uzrokovano oksidacijskim djelovanjem gore navedenih ROS vrsta. Superoksidni anion O_2^- je anion koji nastaje staničnim disanjem, a predstavlja imunološki odgovor na patogene organizme. Superoksid dismutaze su metaloenzimi koji kataliziraju dismutaciju (oksidaciju jedne molekule redukcijom druge) O_2^- u vodikov peroksid H_2O_2 . Superoksid dismutaza može sadržavati kofaktore željezo, mangan, nikal, bakar i cink. Dokazano je da je ovaj enzim kvascu potreban u uvjetima visoke koncentracije kisika (McCord, 1988; Miller, 2012).

2.4. KROMATOGRFSKE METODE

Kromatografske metode su analitičke metode koje se koriste za utvrđivanje sastava neke smjese te za razdvajanje i kvantitativno određivanje komponenata prisutnih u smjesi. Ove metode karakterizira mobilna odnosno pokretna faza i stacionarna odnosno nepokretna faza. Stacionarna faza može biti tekućina ili čvrsta tvar, a mobilna faza je najčešće tekućina ili plin (Skoog i sur., 1999). Do razdvajanja komponenata smjesa dolazi na temelju fizikalnih (hlapljivost) i kemijskih karakteristika, adsorpcije te ionske izmjene. Temelj kromatografskih metoda je propuštanje analizirane smjese (tekućina ili plin; mobilna faza) kroz kolonu ili propuštanje preko ploha u kojima je stacionarna faza. S obzirom na fizikalno stanje pokretne faze kromatografija se dijeli na plinsku kromatografiju (GC) i tekućinsku kromatografiju (HPLC, LC) kao najčešće korištene u prehrambenoj industriji te na fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima.

2.4.1. Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija je brza separacijska tehnika koja se koristi za određivanje tvari arome u namirnicama. Za provedbu plinske kromatografije koristi se posebno dizajniran instrument plinski kromatograf. Osnovni dijelovi plinskog kromatografa (**Slika 4**) su izvor plina nositelja, kolona, injektor, detektor i pisac.



Slika 4 Plinska kromatografija (Web 2)

Mobilnu fazu predstavlja inertni plin koji prolazeći kroz kolonu ispunjenu stacionarnom fazom eluira komponente uzorka. Stacionarnu fazu čine silikonska ulja, esteri na krutom nosaču i ugljikovodici velike molekulske mase. Ulaskom u kolonu, uzorak se raspodjeljuje između

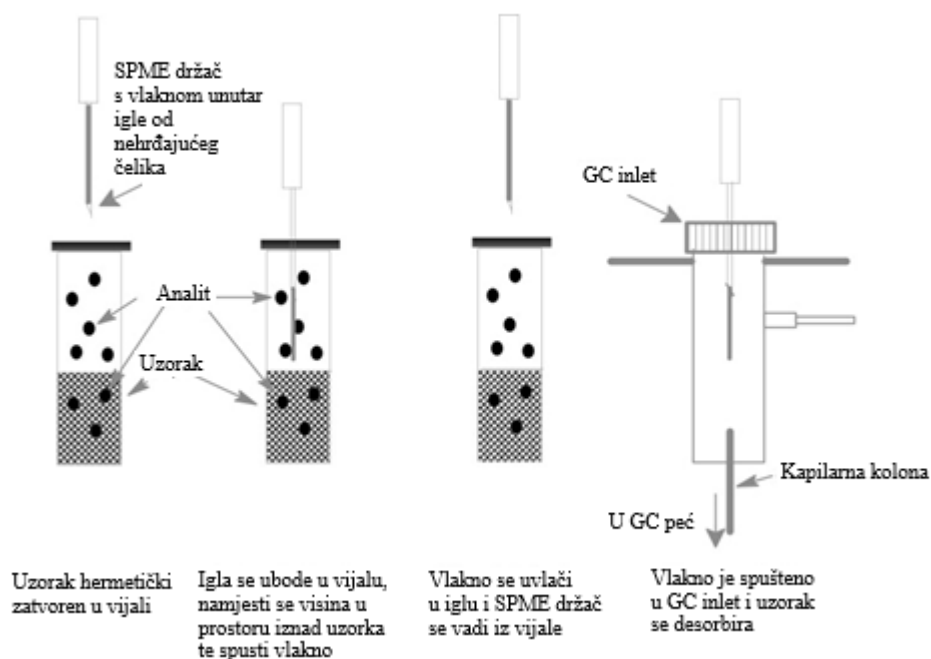
pokretne i nepokretne faze. Adsorpcijom i desorpcijom razdvajaju se lakše hlapljivi sastojci koje plin nosioc eluira iz kolone. Plin nositelj (vodik, dušik, helij) služi samo kao sredstvo za eluiranje stoga ne smije doći do kontakta i reagiranja s analiziranim komponentama. Također plin nositelj mora biti suh i visoke čistoće te se bira ovisno o tipu detektora. Kolona predstavlja najvažniji dio te mora biti selektivna, termički stabilna, kemijski inertna (kao i plin nosioc), nehlapljiva. Detektor mora imati brz odaziv, dobru stabilnost i visoku osjetljivost. Detekcija se temelji na toplinskoj vodljivosti, radioaktivnoj ionizaciji, plamenoj ionizaciji, električnoj vodljivosti, spektrometriji masa, UV i IR spektrometriji (Primorac, 2020; Tomljanović, 2000).

Detektori za identifikaciju komponenata na temelju spektra masa imaju čestu primjenu u sklopu plinskog kromatografa. Spektrometrija masa je analitička tehnika koja se temelji na analiziranju molekula s obzirom na omjer masa i naboja. Maseni detektor sastoji se od ionskog izvora (ioniziranje molekula uzorka), masenog analizatora (razdvaja ione prema omjeru m/z) te detektora i sustava za obradu podataka (Ivić, 2022).

2.4.2. Mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME)

SPME metoda je metoda izolacije i ekstrakcije hlapljivih spojeva koja priprema uzorak za analizu na plinskom kromatografu u kombinaciji s masenim detektorom. Ova novija metoda se sve više koristi u pripremi uzoraka kao što su vino, pivo, voće, ulje i med. Razvijena je kako bi se smanjilo vrijeme pripreme uzorka, upotreba organskih otapala te općenito kako bi se izbjegli nedostaci ekstrakcije na čvrstoj fazi i ekstrakcije tekućina-tekućina. Metodu karakterizira jednostavnost, brzina, a velika prednost je što SPME metoda ne zahtjeva upotrebu dodatnih kemikalija koje bi mogle stupiti u reakciju s komponentama uzorka koji se analizira. Ovom metodom omogućeno je izdvajanje samo hlapljivih komponenata uzorka, a onemogućen je ulazak kisika i ulazak vlage u kolonu plinskog kromatografa. Metoda se sastoji od dvije faze koje moraju biti optimizirane: adsorpcije i desorpcije. Adsorpcija je faza u kojoj analit zaostaje na stacionarnoj fazi. Prvi korak je zagrijavanje i miješanje uzorka s ciljem oslobađanja hlapljivih spojeva. Iznad uzorka postavlja se igla s vlaknom na koje će se hlapljivi spojevi adsorbirati, a vlakno se potom unosi u injektor plinskog kromatografa (**Slika 6**). U plinskom kromatografu se pod utjecajem vakuuma i temperature odvija proces desorpcije sastojaka s vlakna u kolonu. Na ekstrakciju utječu vrijeme i temperature ekstrakcije, ionska jakost, pH i tip uzorka. SPME aparatura sastoji se od kućišta s iglom i vlakna unutar igle. Kombinacije polidimetilsiloksana, divinilbenzena ili Carboxena (PDMS/DVB, PDMS/Carboxen) te polidimetilsiloksan (PDMS), sa slojem poliakrilata (PA) predstavljaju najčešće korištena

vlakna. Ova metoda je pogodna za uzorke, poput vina, čiji je većinski sastojak voda jer tada nije moguće direktno injektirati (Vas i Vekey, 2004; Stauffer, 2013; Ivić, 2022).



Slika 5 Princip SPME metode (Felgate, 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je ispitati utjecaj procesa fermentacije na tvari boje i tvari arome vina Cabernet Sauvignon kutjevačkog vinogorja. Prikupljeni su uzorci mošta odmah nakon berbe, na početku, u tijeku i nakon završene fermentacije. U svim uzorcima određen je polifenolni sastav i aroma te je provedena usporedba rezultata. Ukupni polifenoli, flavonoidi, antocijani i polimerna boja određeni su spektrofotometrijskim metodama. Antioksidacijska aktivnost je također određena spektrofotometrijski primjenom različitih metoda: DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC. Aromatski spojevi u uzorcima određeni su primjenom plinskog kromatografa s masenim detektorom, a uzorkovanje je provedeno pomoću mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME).

3.2. MATERIJALI

Za izradu ovog rada korišteno je crno grožđe cabernet sauvignon uzgojeno u kutjevačkom vinogorju, berba iz 2023. godine. Za pokretanje procesa fermentacije korišten je kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, a temperatura tijekom procesa održavala se na 23 °C do 25 °C. Uzorci grožđa uzeti su odmah nakon berbe (za analizu se iz bobica isprešao sok), zatim uzorak mošta odnosno masulja dobiven nakon prerade grožđa i dodatka kvasca, zatim uzorak na početku fermentacije (nakon 24 sata i nakon 48 sati od dodatka kvasca), tijekom burne fermentacije (nakon 96 sati od dodatka kvasca) te po završetku fermentacije (vino).

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje aromatskog profila

Spojevi arome i njihovi kvantitativni udjeli u uzorcima su određeni pomoću plinskog kromatografa (**Slika 6**) tvrtke Agilent 7890B s masenim detektorom Agilent 5977A.



Slika 6 Plinski kromatograf s masenim detektorom (Web 3)

Za pripremu uzorka korištena je mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME metoda) s iglom kao polimernom stacionarnom fazom koja sadrži punilo od polidimetilsiloksana-divinilbenzena (PDMS/DVB) debljine 65 μm (Supelco, Bellefonte, SAD).

Priprema uzorka za analizu:

U vijalu volumena 10 mL odvagano je 5 mL uzorka te je za povećanje učinkovitosti ekstrakcije spojeva arome dodan i 1 g NaCl. Također je dodano i 10 μL internog standarda mirtenola u koncentraciji od 0.5 g/L za određivanje koncentracije spojeva arome. U vijalu se stavio magnet, potom se bočica hermetički zatvorila s teflonskim čepom te se postavila u vodenu kupelj gdje se uzorak miješao i zagrijavao na magnetskoj miješalici u trajanju od 5 min na 40 °C. Hlapljivi spojevi su se zbog miješanja i zagrijavanja u gore navedenim uvjetima izdvojili u nadprostoru uzorka u koji se potom postavila SPME igla s punilom. Adsorpcija aromatskih spojeva na punilo (vlakno) odvijala se 45 minuta na temperaturi od 40 °C nakon čega se igla s adsorbiranim sastojcima prebacila u injektor plinskog kromatografa. U injektoru se odvijala toplinska desorpcija spojeva arome u kolonu uređaja koja se postupno zagrijava kako bi došlo do razdvajanja spojeva arome na osnovu njihove hlapljivosti. Na taj način, u maseni detektor prvo dopijevaju spojevi koji su lakše hlapljivi.

Uvjeti rada plinskog kromatografa:

Parametri ekstrakcije:

- temperatura: 40 °C,
- vrijeme: 45 minuta,

- SPME punilo: 65 µm PDMS/DVB.

GC/MS analiza provedena je na kromatografskoj koloni HP-5MS dimenzija 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Agilent). Kao plin nosioc korišten je helij 5,0, čistoće 99,9% (Messer Austria, Gumpoldskirchen, Austria).

GC/MS uvjeti:

- početna temperatura: 40 °C; vrijeme: 10 minuta,
- temperaturni gradijent 1 (do 120 °C): 3 °C/min; temperaturni gradijent 2 (do 250 °C): 10 °C/min,
- konačna temperatura: 250 °C,
- temperatura injektora/detektora: 250 °C,
- vrijeme desorpcije: 7 minuta,
- energija ionizacije: 70 eV,
- maseni interval (m/z): 40 – 400.

Analizom su dobiveni pikovi na kromatogramu identificirani na osnovu spektara masa i vremena zadržavanja odnosno retencijskog indeksa. Provedeno je uspoređivanje dobivenih pikova na kromatografu identificiranih na temelju spektara masa sa bazama podataka *Nist08* (National Institute of Standards i Technology, Gaithersburg, SAD) i *Wiley 9* (Wiley, SAD). Pri identičnim GC/MS uvjetima i s ciljem izračuna retencijskog indeksa provedena je i analiza standarda koji sadrži smjesu alkana C7–C30. Retencijski indeksi komponenata izračunati su prema jednadžbi (1):

$$RI = 100 \times \left[n + (N - n) \left(\frac{\log t_x - \log t_n}{\log t_N - \log t_n} \right) \right] \quad (1)$$

gdje je:

- RI – retencijski indeks,
- n – broj C atoma u alkanu koji izlazi prije nepoznatog spoja,
- N – broj C atoma u alkanu koji izlazi nakon nepoznatog spoja,
- x – nepoznati spoj,
- t – retencijsko vrijeme u minutama (Ivić, 2022).

Na ovaj način određeni su sljedeći spojevi arome:

- kiseline: octena, heptanska, nonanska, dekanska, laurinska, miristinska, palmitinska;
- alkoholi: izoamilni alkohol, but-2,3-diol, heksan-1-ol, okten-3-ol, metionol, 2-etilheksan-1-ol, oktan-1-ol, 2-feniletanol, nonan-1-ol, perilni alkohol, dodekanol;
- aldehidi i ketone : heksanal, 2-heksenal, benzaldehid, 2-heptenal, metil heptenon, oktanal, fenilacetaldehid, 2-oktenal, 2-nonenal, dekanal, 2-decenal, 4-propilbenzaldehid, 2,4-dekadienal, dodekanal, geranil aceton, lili aldehid, miristaldehid, heksilcinamaldehid;
- terpeni: linalool oksid, linalool, hotrienol, trans-pinokarveol, β -citronellool, vitispiran, β -damascenon, α -jonon, β -farnesen, γ -jonon, β -jonon;
- esteri: etil-heksanoat, etil-oktanoat, dietil-sukcinat, fenetil-acetat, etil-laurat, izopropil laurat, metil-dihidrojasmonat, etil-dekanoat, heksil-salicilat, izopropil miristat, diizobutil-ftalat, dibutil-ftalat, etil-palmitat, etil-linoleat, etil-oleat, etil-stearat;
- superoksid dismutaza (SOD).

3.3.2. Određivanje ukupnih polifenola

Udio ukupnih fenola određen je po Folin-Ciocalteu metodi. Folin-Ciocalteouv reagens pripremljen je na način da je 3,3 mL FC otpipetirano u odmjernu tikvicu od 100 mL te je ista do oznake nadopunjena destiliranom vodom. Otpipetirano je 0,2 mL uzorka (uzorak grožđa, mošt + kvasac, mošt 24 h, mošt 48 h, mošt 96 h, vino), 1,8 mL destilirane vode, 10 mL Folin-Ciocalteu reagensa razrjeđenja 3,3:100 i 8 mL 7,5 % otopine Na_2CO_3 . Navedena smjesa se promućkala i ostavila 2 sata do 20 sati na sobnoj temperaturi u mračnom prostoru nakon čega se mjerila apsorbancija na spektrofotometru Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) pri valnoj duljini od 765 nm. Slijepa proba je odrađena s 0,2 mL destilirane vode umjesto uzorka, 10 mL FC reagensa i 8 mL Na_2CO_3 . Mjerenja su provedena u tri paralele, a rezultati izraženi preko kalibracijske krivulje galne kiseline u g galne kiseline/L uzorka (Ough i Amerine, 1988).

3.3.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Udio ukupnih flavonoida u uzorcima određen je spektrofotometrijski s primjenom AlCl_3 kao reagensa. Otpipetirano je 0,5 mL uzorka (uzorak grožđa, mošt + kvasac, mošt 24 h, mošt 48 h, mošt 96 h, vino), 4 mL destilirane vode, 0,3 mL 5% otopine NaNO_2 . Nakon što je smjesa odstojala 5 minuta dodano je 1,5 mL 2% otopine AlCl_3 , a poslije još 5 minuta dodano je i 2

mL 1 M otopine NaOH te 1,7 mL destilirane vode. Apsorbanca je očitana odmah na 510 nm. Destilirana voda koristila se za kalibraciju spektrofotometra. Rezultati (srednja vrijednost tri mjerenja) su izraženi pomoću kalibracijske krivulje katehina u g katehina/L uzorka (Kim i sur., 2003).

3.3.4. Određivanje ukupnih antocijana

Količina antocijana u uzorcima određena je korištenjem pH-diferencijalne metode. Metoda je zasnovana na strukturnoj transformaciji kromofora antocijana u ovisnosti o promjenama pH vrijednosti. Promjena pH vrijednosti, osim što mijenja strukturu, mijenja i spektar apsorpcije (Giusti i Wrolstad, 2001). Za metodu je korišten pufer čiji pH iznosi 1 (0,025 mol/L KCL, pH podešen s koncentriranom HCl) i pufer sa vrijednošću pH 4,5 (0,4 mol/L CH₃CO₂Na x 3H₂O, pH podešen s koncentriranom HCl). Otpipetirano je 0,2 mL uzorka (uzorak grožđa, mošt + kvasac, mošt 24 h, mošt 48 h, mošt 96 h, vino) u dvije epruvete. Potom je u prvu epruvetu dodano 2,8 mL pufera pH 1, a u drugu 2,6 mL pufera pH 4,5. Nakon 15 minuta apsorbanca je mjerena pri 512 i 700 nm. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tri mjerenja u mg cijanid 3-glukozida/L uzorka. Sadržaj antocijana izračunat je prema slijedećoj jednadžbi (2):

$$A = (A_{512} - A_{700})pH_{1,0} - (A_{512} - A_{700})pH_{4,5} \quad (2)$$

Udio monomernih antocijana računa se preko jednadžbe (3):

$$\text{monomerni antocijani} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{A \times MW \times FR \times 100}{\epsilon \times l} \quad (3)$$

gdje je:

- A: apsorbanca uzorka;
- MW: relativna molekulska masa cijanid 3-glukozina (449,2 g/mol);
- FR: faktor razrjeđenja (4) $\rightarrow FR = \frac{V_{\text{ukupni}}}{V_{\text{uzorka}}}$ (4)
- ϵ : molarni ekstincijski koeficijent cijanid 3-glukozida (26900 L/mol cm);
- l: duljina kivete (1 cm).

3.3.5. Određivanje polimerne boje

Degradacija antocijana određena je na temelju stvaranja bezbojnog kompleksa u reakciji antocijana s bisulfitom (Giusti i Wrolstad, 2001). Polimerizacijom antocijana nastaje boja otporna na djelovanje bisulfitu. Za pripremu otopine potrebno je otopiti 1 g Kalij bisulfitu u 5 g destilirane vode. Otpipetirano je 0,2 mL uzorka (uzorak grožđa, mošt + kvasac, mošt 24 h, mošt 48 h, mošt 96 h, vino) u dvije epruvete. U prvu epruvetu dodano je 3,0 mL destilirane

vode, a u drugu 2,8 mL destilirane vode i 0,2 mL otopine K-bisulfita. Nakon 15 minuta izmjerena je apsorbancija na 420 nm, 512 nm i 700 nm. Na valnoj duljini od 420 nm mjerena je stupanj posmeđivanja, a na 512 nm mjerena je degradacija antocijana i smanjenje intenziteta crvene boje. Rezultati dobiveni u tri mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost. Količina boje nastala polimerizacijom računa se preko jednadžbe (5):

$$\text{polimerna boja\%} = \frac{\text{boja nastala polimerizacijom}}{\text{gustoća boje}} \times 100 \quad (5)$$

gdje je:

- boja nastala polimerizacijom → uzorak tretiran bisulfitom (6)

$$\text{boja nastala polimerizacijom} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{512} - A_{700})] \times FR \quad (6)$$

- gustoća boje → kontrolni uzorak tertian vodom (7)

$$\text{boja nastala polimerizacijom} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{512} - A_{700})] \times FR \quad (7)$$

3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost u uzorcima određena je spektrofotometrijski. Antioksidansi stabiliziraju i sprječavaju štetan utjecaj radikala donirajući vodikov atom. Za bolji i reprezentativniji prikaz rezultata antioksidacijske aktivnosti analiziranih uzoraka koriste se četiri različite metode: DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC, pogodne za crno vino. Ne postoji univerzalna metoda s obzirom da postoji veliki broj spojeva koji djeluju kao antioksidansi, ali su različite strukture. Metode se temelje na različitim reakcijskim mehanizmima poput prijenosa atoma vodika tj. donacije vodika (DPPH) ili prijenosa elektrona (FRAP, ABTS i CUPRAC) (Jakobek, 2007; Prior i sur., 2005).

3.3.6.1. DPPH metoda

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) metoda je metoda koja koristi DPPH reagens tj. ljubičasto obojen i stabilan dušikov radikal. Antioksidansi (elektron donori) posjeduju slabo vezan vodikov atom s kojima DPPH reagens reagira, reducira se i obojenje iz ljubičastog prelazi u žuto. Prednost ove metode je što reagens može reagirati s cjelokupnim uzorkom, s hidrofilnim i lipofilnim antioksidansima i slabim antioksidansima. Ova metoda nije selektivna i ima primjenu samo kod nižih pH vrijednosti (Brand-Williams i sur., 1995). U epruvetu je otpipetirano 0,2 mL uzorka (uzorak grožđa, mošt + kvasac, mošt 24 h, mošt 48 h, mošt 96 h, vino) i 3,0 mL DPPH otopine. Razrjeđenje je potrebno napraviti takvo da se nakon 15 minuta ne izgubi ljubičasta boja i da se ne pojavi smeđa boja. Nakon 15 minuta apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 517 nm. Za slijepu probu koristi se 0,2 mL destilirane vode u koju je također

dodano 3,0 mL DPPH reagensa. Rezultati tri mjerenja izraženi su preko kalibracijske krivulje Troloxa u $\mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$.

3.3.6.2. ABTS metoda

ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin sulfonska kiselina)) metoda je metoda koja koristi ABTS reagens. Oksidirani zeleno obojeni ABTS radikal nastaje miješanjem ABTS reagensa s kalijevim persulfatom. Do gubitka zelenog obojenja i redukcije radikala u bezbojan oblik dolazi u reakciji s antioksidansima. ABTS metoda ima sljedeća svojstva: reaktivnosti radikala prema velikom broju antioksidansa (fenolne kiseline i flavonoidi), primjenjiva je pri različitim pH vrijednostima, traje duže od DPPH metode, a sama priprema ABTS radikala traje minimalno 12 sati. ABTS reagens pripremljen je miješanjem 7,4 mM otopine ABTS s 2,6 mM otopine kalijevog persulfata te je ostavljen u mraku do sutrašnjeg dana. Otpipetirano je 0,2 mL uzorka (uzorak grožđa, mošt + kvasac, mošt 24 h, mošt 48 h, mošt 96 h, vino) i dodano je 3,2 mL ABTS reagensa. Razrjeđenje je potrebno napraviti takvo da se zelena boja ne izgubi tijekom vremena stajanja. Nakon što je prošlo 95 minuta u mraku apsorbancija se mjerila na 734 nm. Za slijepu probu otpipetirano je 0,2 mL destilirane vode i dodano je 3,2 mL ABTS reagensa. Rezultati tri mjerenja i njihova srednja vrijednost izraženi su preko kalibracijske krivulje Troloxa u $\mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$ (Gupta, 2015; Re i sur., 1999).

3.3.6.3. FRAP metoda

FRAP (*eng. ferric reducing/antioxidant power assay*) metoda je metoda koja se temelji na redukciji trovalentnog željeza s piridil triazinom u dvovalentno željezo pomoću antioksidanasa u uzorku. Zbog gore navedenog dolazi do plavog obojenja. Prednost ove metode je jednostavnost i brzina. Međutim, metoda nije selektivna te postoji mogućnost reakcije i redukcije željeza s komponentama koje nisu antioksidansi (Roginsky i Lissi, 2005). FRAP otopina nastaje miješanjem 25 mL acetatnog pufera, 2,5 mL TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin otopljen u otopini HCl), 2,5 mL $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ koju je potrebno zagrijati na 37°C prije upotrebe. Otpipetirano je 0,2 mL uzorka (uzorak grožđa, mošt + kvasac, mošt 24 h, mošt 48 h, mošt 96 h, vino) i dodano je 3 mL FRAP otopine. Razrjeđenje treba biti takvo da se nakon stajanja ne izgubi svijetlo ljubičasta boja. Nakon 15 do 30 minuta u mraku mjeri se apsorbanca na 593 nm. Za slijepu probu otpipetirano je 0,2 mL destilirane vode i 3 mL FRAP otopine. Srednja vrijednost tri paralelna mjerenja izražena je preko krivulje Troloxa u $\mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$.

3.3.6.4. CUPRAC metoda

CUPRAC (*eng. cupric reducing antioxidant capacity*) metoda je metoda koja se bazira na redoks reakciji CUPRAC reagensa i antioksidansa u uzorku. Tijekom reakcije nastaje žuto obojenje. Glavna prednost ove metode je njena primjena za lipofilne i hidrofilne antioksidanse. Karakteristično za metodu je i selektivno djelovanje na antioksidativne spojeve, ali bez utjecaja na šećere i limunsku kiselinu. Flavonoidi, tioli i fenolne kiseline su skupina spojeva čija se antioksidacijska aktivnost određuje CUPRAC metodom (Gupta, 2015). Korištena su tri reagensa: otopina $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, otopina neokuproina i otopina amonij acetata. Otpipetirano je po 1 mL od svakog reagensa, 0,2 mL uzorka (uzorak grožđa, mošt + kvasac, mošt 24 h, mošt 48 h, mošt 96 h, vino) te 0,9 mL destilirane vode. Razrjeđenje treba biti takvo da se nakon stajanja ne izgubi svijetlo žuta boja. Nakon 30 minuta u mraku mjerena je apsorbanca na 450 nm. Srednja vrijednost mjerenja prikazana je preko kalibracijske krivulje Troloxa ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$).

4. REZULTATI

Tablica 1 Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, antocijana, polimerna boja i antioksidacijska aktivnost određena DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metodom u uzorcima Cabernet Sauvignon vina prije, tijekom i nakon fermentacije

Uzorak	SOD (ng/L)	Polifenoli (mg/L)	Flavonoidi (mg/L)	Antocijani (mg/L)	Polimerna boja (%)	DPPH ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$)	ABTS ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$)	FRAP ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$)	CUPRAC ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$)
Grožde	30,15 \pm 0,37	640,90 \pm 7,34	432,28 \pm 6,80	0,25 \pm 0,97	78,70 \pm 3,66	1,71 \pm 0,02	2,77 \pm 0,20	0,34 \pm 0,01	9,29 \pm 0,84
Mošt + kvasac	34,66 \pm 0,49	648,30 \pm 7,14	236,77 \pm 1,48	7,38 \pm 1,13	78,14 \pm 1,70	1,54 \pm 0,03	3,55 \pm 0,28	0,31 \pm 0,01	10,57 \pm 0,63
Mošt 24 h	90,17 \pm 0,99	692,18 \pm 7,65	255,16 \pm 4,06	17,16 \pm 1,83	58,24 \pm 4,44	1,74 \pm 0,03	5,60 \pm 0,03	0,31 \pm 0,03	10,21 \pm 0,33
Mošt 48 h	107,43 \pm 2,07	688,05 \pm 7,30	277,66 \pm 2,95	19,87 \pm 1,68	56,30 \pm 0,13	1,72 \pm 0,01	5,52 \pm 0,06	0,33 \pm 0,00	10,13 \pm 0,34
Mošt 96 h	248,96 \pm 6,94	666,59 \pm 7,07	271,00 \pm 5,02	18,14 \pm 1,52	58,00 \pm 4,71	1,74 \pm 0,02	5,61 \pm 0,02	0,44 \pm 0,01	10,88 \pm 0,60
Vino	425,67 \pm 5,80	703,79 \pm 9,47	245,36 \pm 3,00	21,13 \pm 1,60	46,28 \pm 2,77	1,79 \pm 0,02	5,71 \pm 0,07	0,46 \pm 0,01	10,83 \pm 0,19

Oznake: SOD – superoksid dismutaza; Grožde - uzorak grožđa cabernet sauvignon odmah nakon berbe; Mošt + kvasac – uzorak mošta cabernet sauvignon uz dodatak kvasca, period prije početka fermentacije; Mošt 24 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 24 h; Mošt 48 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 48 h; Mošt 96 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 96 h (započela burna fermentacija); Vino - C. Sauvignon, završena fermentacija.

Tablica 2 Retencijsko vrijeme, retencijski indeks i sadržaj kiselina ($\mu\text{g/L}$) identificiranih u uzorcima Cabernet Sauvignon vina prije, tijekom i nakon fermentacije te glavne mirisne note pojedinog spoja

Spoj	RV (min)	RI	Grožde	Mošt + kvasac	Mošt 24 h	Mošt 48 h	Mošt 96 h	Vino	Glavna mirisna nota
Σ Kiseline			71,46 \pm 1,39	44,25 \pm 0,40	55,58 \pm 0,37	61,09 \pm 0,60	1529,75 \pm 29,58	1835,87 \pm 37,51	
Octena kiselina	2,1346	622				20,62 \pm 0,20	1150,70 \pm 24, 65	1246,76 \pm 29,32	ocat
Heptanska kiselina	23,9496	1084	1,67 \pm 0,06	3,92 \pm 0,15	4,15 \pm 0,03	1,49 \pm 0,01	2,36 \pm 0,04	1,72 \pm 0,02	masna, sirna
Nonanska kiselina	33,9042	1279	9,94 \pm 0,35	8,49 \pm 0,00	7,84 \pm 0,08	4,14 \pm 0,00	24,71 \pm 0,79	34,79 \pm 0,83	masna
Dekanska kiselina	38,1283	1380	36,34 \pm 0,72	12,32 \pm 0,18	25,60 \pm 0,09	20,28 \pm 0,29	209,01 \pm 2,89	320,42 \pm 3,89	masna
Laurinska kiselina	42,1492	1562	3,64 \pm 0,16	2,43 \pm 0,01	3,94 \pm 0,01	1,48 \pm 0,05	123,43 \pm 0,91	208,32 \pm 3,22	masna
Miristinska kiselina	45,6839	1845	1,29 \pm 0,01	0,47 \pm 0,02	0,85 \pm 0,01	0,58 \pm 0,00	8,53 \pm 0,13	15,73 \pm 0,17	masna
Palmitinska kiselina	47,4374	2049	18,58 \pm 0,09	16,61 \pm 0,04	13,20 \pm 0,16	12,51 \pm 0,05	11,02 \pm 0,18	8,14 \pm 0,05	masna

Oznake: RV retencijsko vrijeme; RI – retencijski indeks; Grožde - uzorak grožđa cabernet sauvignon odmah nakon berbe; Mošt + kvasac – uzorak mošta cabernet sauvignon uz dodatak kvasca, period prije početka fermentacije; Mošt 24 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 24 h; Mošt 48 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 48 h; Mošt 96 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 96 h (započela burna fermentacija); Vino – Cabernet Sauvignon, završena fermentacija.

Tablica 3 Retencijsko vrijeme, retencijski indeks i sadržaj alkohola ($\mu\text{g/L}$) identificiranih u uzorcima Cabernet Sauvignon vina prije, tijekom i nakon fermentacije te glavne mirisne note pojedinog spoja

Spoj	RV (min)	RI	Grožde	Mošt + kvasac	Mošt 24 h	Mošt 48 h	Mošt 96 h	Vino	Glavna mirisna nota
Σ Alkoholi			106,63 \pm 1,31	316,78 \pm 3,54	328,25 \pm 1,25	411,59 \pm 1,45	1347,13 \pm 14,26	3795,01 \pm 93,71	
Izoamilni alkohol	3,6780	743		2,56 \pm 0,10	2,58 \pm 0,01	2,58 \pm 0,04	484,69 \pm 1,40	2390,27 \pm 81,06	voćna
Butan-2,3-diol	6,2936	805					14,42 \pm 0,06	20,33 \pm 0,01	voćna
Heksan-1-ol	11,2255	892	53,37 \pm 0,42	271,82 \pm 2,94	286,34 \pm 0,46	370,04 \pm 0,81	137,49 \pm 3,29	99,64 \pm 1,05	biljna
Okten-3-ol	17,2682	980	3,89 \pm 0,07	4,98 \pm 0,11	7,47 \pm 0,32	2,43 \pm 0,10	3,21 \pm 0,03	3,35 \pm 0,03	biljna/gljive
Metionol	17,3979	982					1,76 \pm 0,01	5,03 \pm 0,11	sumpor
2-etilheksan-1-ol	21,8067	1051	21,60 \pm 0,41	17,90 \pm 0,23	15,36 \pm 0,05	16,57 \pm 0,13	7,10 \pm 0,08	4,11 \pm 0,00	zemljana, cvjetna
Oktan-1-ol	23,8161	1079	10,83 \pm 0,19	9,15 \pm 0,00	5,67 \pm 0,25	6,44 \pm 0,23	25,64 \pm 0,31	11,02 \pm 0,02	biljna
2-feniletanol	25,2286	1099	3,49 \pm 0,03	2,74 \pm 0,02	3,44 \pm 0,09	5,86 \pm 0,02	641,80 \pm 8,33	1197,05 \pm 10,94	cvjetna
Nonan-1-ol	29,1104	1186					17,46 \pm 0,41	27,43 \pm 0,16	citrusna
Perilil alkohol	34,4122	1288	9,48 \pm 0,13	4,00 \pm 0,07	3,93 \pm 0,05	3,53 \pm 0,06	3,33 \pm 0,05	5,68 \pm 0,05	biljna
Dodekanol	40,5890	1476	3,97 \pm 0,06	3,64 \pm 0,06	3,46 \pm 0,01	4,13 \pm 0,06	10,23 \pm 0,30	31,10 \pm 0,28	masna

Oznake: RV retencijsko vrijeme; RI – retencijski indeks; Grožde - uzorak grožđa cabernet sauvignon odmah nakon berbe; Mošt + kvasac – uzorak mošta cabernet sauvignon uz dodatak kvasca, period prije početka fermentacije; Mošt 24 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 24 h; Mošt 48 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 48 h; Mošt 96 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 96 h (započela burna fermentacija); Vino – Cabernet Sauvignon, završena fermentacija.

Tablica 4 Retencijsko vrijeme, retencijski indeks i sadržaj aldehida i ketona ($\mu\text{g/L}$) identificiranih u uzorcima Cabernet Sauvignon vina prije, tijekom i nakon fermentacije te glavne mirisne note pojedinog spoja

Spoj	RV (min)	RI	Grožde	Mošt + kvasac	Mošt 24 h	Mošt 48 h	Mošt 96 h	Vino	Glavna mirisna nota
Σ Aldehidi i ketoni			136,61 \pm 2,14	199,59 \pm 1,95	175,48 \pm 2,16	125,56 \pm 1,98	81,87 \pm 1,34	55,54 \pm 0,84	
Heksanal	6,5494	820	6,49 \pm 0,08	100,20 \pm 0,64	55,81 \pm 0,87	32,60 \pm 1,11	14,30 \pm 0,20	1,75 \pm 0,02	biljna
2-heksenal	8,0448	847	47,43 \pm 0,41	51,51 \pm 0,46	77,85 \pm 0,42	60,35 \pm 0,35			biljna/zelena jabuka
Benzaldehid	15,3878	955					8,00 \pm 0,10	8,36 \pm 0,12	badem
2-heptenal	15,4694	957	10,69 \pm 0,38	6,28 \pm 0,02	8,57 \pm 0,05	4,62 \pm 0,08			voćna
Metil heptenon	17,5488	984	8,54 \pm 0,27	5,42 \pm 0,05	3,98 \pm 0,08	4,45 \pm 0,10			citrusna
Oktanal	18,5725	993	9,87 \pm 0,14						voćna
Fenilacetaldehid	22,4097	1061	3,93 \pm 0,05	4,05 \pm 0,08	4,92 \pm 0,01	6,33 \pm 0,04	17,31 \pm 0,09	2,00 \pm 0,00	cvjetna
2-oktenal	23,3690	1076	10,31 \pm 0,03	8,21 \pm 0,01	5,69 \pm 0,20	3,16 \pm 0,05	2,91 \pm 0,08		masna
2-nonenal	28,8870	1183	2,00 \pm 0,09	1,71 \pm 0,00	1,35 \pm 0,02	1,19 \pm 0,02			Masna/travnata
Dekanal	31,2418	1230	3,53 \pm 0,25	2,73 \pm 0,08	3,53 \pm 0,22	2,97 \pm 0,03			citrusna/kora naranče
2-decenal	32,6823	1257	2,74 \pm 0,02	1,65 \pm 0,10	3,03 \pm 0,02	1,65 \pm 0,03	14,93 \pm 0,22	2,91	masna

Tablica 4 Nastavak

4-propilbenzaldehyd	33,1068	1264	20,83 ± 0,20	8,77 ± 0,02						slab miris
2,4-dekadienal	35,3922	1309	1,30 ± 0,03	0,84 ± 0,05	1,01 ± 0,01	0,86 ± 0,04	1,68 ± 0,03			citrus/grejp
Dodekanal	39,5006	1427	1,77 ± 0,02	1,00 ± 0,07	1,33 ± 0,01	1,31 ± 0,03	8,54 ± 0,23	10,01 ± 0,07		citrus
Geranil aceton	40,5063	1472	5,28 ± 0,10	3,58 ± 0,12	5,52 ± 0,14	3,07 ± 0,04	7,59 ± 0,32	15,10 ± 0,36		cvjetna
Lili aldehyd	41,9381	1550	0,89 ± 0,04	2,74 ± 0,23	1,38 ± 0,05	1,06 ± 0,01				cvjetna
Miristaldehyd	42,8153	1604			0,62 ± 0,02	0,80 ± 0,02	4,14 ± 0,03	5,62 ± 0,08		masna
Heksilcinamaldehyd	45,0620	1777	0,99 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,88 ± 0,05	1,14 ± 0,03	2,47 ± 0,06	9,79 ± 0,09		cvjetna

Oznake: RV retencijsko vrijeme; RI – retencijski indeks; Grožđe - uzorak grožđa cabernet sauvignon odmah nakon berbe; Mošt + kvasac – uzorak mošta cabernet sauvignon uz dodatak kvasca, period prije početka fermentacije; Mošt 24 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 24 h; Mošt 48 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 48 h; Mošt 96 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 96 h (započela burna fermentacija); Vino – Cabernet Sauvignon, završena fermentacija.

Tablica 5 Retencijsko vrijeme, retencijski indeks i sadržaj terpena ($\mu\text{g/L}$) identificiranih u uzorcima Cabernet Sauvignon vina prije, tijekom i nakon fermentacije te glavne mirisne note pojedinog spoja

Spoj	RV (min)	RI	Grožđe	Mošt + kvasac	Mošt 24 h	Mošt 48 h	Mošt 96 h	Vino	Glavna mirisna nota
Σ Terpeni			156,86 \pm 3,54	49,13 \pm 3,85	46,97 \pm 0,85	42,53 \pm 0,85	72,22 \pm 1,06	45,92 \pm 1,23	
Linalool oksid	23,8234	1080	5,28 \pm 0,08						citrusna
Linalool	24,3920	1088		1,60 \pm 0,00	3,55 \pm 0,02	3,87 \pm 0,12	5,99 \pm 0,16	2,68 \pm 0,07	citrusna
Hotrienol	24,9201	1091	20,24 \pm 0,37	6,45 \pm 0,03	5,80 \pm 0,09	6,02 \pm 0,01	19,15 \pm 0,21	12,34 \pm 0,18	cvjetna, tropska
Trans-pinokarveol	26,1432	1125	22,60 \pm 0,13	4,48 \pm 0,12	4,17 \pm 0,14	5,93 \pm 0,19	2,60 \pm 0,03	3,26 \pm 0,03	biljna
β -citronellol	31,3942	1232	5,31 \pm 0,19	0,65 \pm 0,01	0,59 \pm 0,01	0,77 \pm 0,00			citrusna
Vitispiran	33,4576	1271	32,10 \pm 0,70	4,59 \pm 0,03	4,19 \pm 0,25	3,12 \pm 0,14	15,31 \pm 0,11	18,78 \pm 0,72	cvjetna
β -damascenon	38,8359	1398	63,36 \pm 1,98	27,73 \pm 0,11	24,91 \pm 0,14	19,97 \pm 0,28	24,49 \pm 0,29		voćna
α -jonon	39,6731	1428	2,95 \pm 0,02	0,98 \pm 3,54	1,06 \pm 0,02	0,89 \pm 0,02			cvjetna
β -farnesen	40,5626	1475					2,79 \pm 0,19	6,33 \pm 0,06	biljna/drvo
γ -jonon	40,6999	1481	0,66 \pm 0,01	0,40 \pm 0,01	0,49 \pm 0,02	0,46 \pm 0,01			biljna/drvo
β -jonon	40,8621	1488	4,36 \pm 0,06	2,24 \pm 0,00	2,22 \pm 0,16	1,51 \pm 0,07	1,89 \pm 0,08	2,52 \pm 0,16	cvjetna

Oznake: RV retencijsko vrijeme; RI – retencijski indeks; Grožđe - uzorak grožđa cabernet sauvignon odmah nakon berbe; Mošt + kvasac – uzorak mošta cabernet sauvignon uz dodatak kvasca, period prije početka fermentacije; Mošt 24 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 24 h; Mošt 48 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 48 h; Mošt 96 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 96 h (započela burna fermentacija); Vino – Cabernet Sauvignon, završena fermentacija.

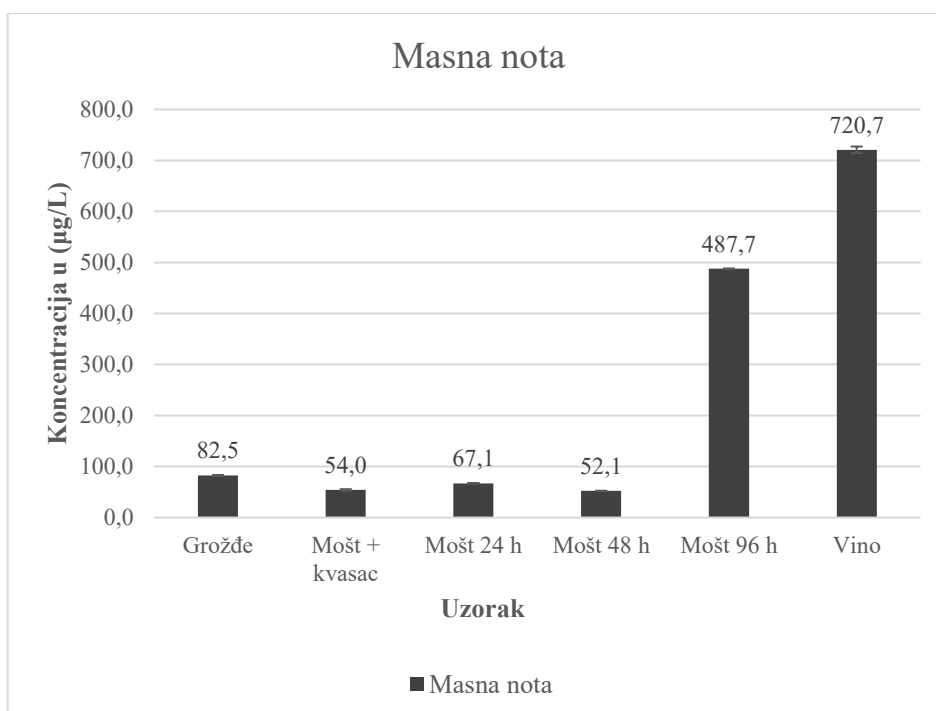
Tablica 6 Retencijsko vrijeme, retencijski indeks i sadržaj estera ($\mu\text{g/L}$) identificiranih u uzorcima Cabernet Sauvignon vina prije, tijekom i nakon fermentacije te glavne mirisne note pojedinog spoja

Spoj	RV (min)	RI	Grožde	Mošt + kvasac	Mošt 24 h	Mošt 48 h	Mošt 96 h	Vino	Glavna mirisna nota
Σ Esteri			$41,45 \pm 0,48$	$47,65 \pm 0,49$	$70,00 \pm 0,79$	$74,88 \pm 1,30$	$2032,31 \pm 32,88$	$1889,67 \pm 21,64$	
Etil-heksanoat	18,5001	992		$5,89 \pm 0,03$	$18,78 \pm 0,31$	$20,57 \pm 0,53$	$26,33 \pm 0,42$	$29,23 \pm 0,39$	voćna
Dietil-sukcinat	29,1360	1188	$15,00 \pm 0,14$	$15,19 \pm 0,02$	$9,62 \pm 0,04$	$7,86 \pm 0,20$	$7,72 \pm 0,09$	$7,83 \pm 0,04$	voćna
Etil-oktanoat	29,8264	1201	$7,42 \pm 0,09$	$10,72 \pm 0,31$	$22,86 \pm 0,06$	$23,74 \pm 0,20$	$535,90 \pm 12,34$	$255,50 \pm 2,56$	voćna
Fenetil-acetat	32,3490	1251	$0,96 \pm 0,00$	$1,31 \pm 0,05$	$2,60 \pm 0,07$	$3,90 \pm 0,12$	$618,24 \pm 8,32$	$235,77 \pm 0,01$	cvjetna
Etil-dekanoat	39,1803	1412			$1,44 \pm 0,10$	$1,81 \pm 0,02$	$731,09 \pm 10,23$	$1103,39 \pm 14,93$	voćna
Etil-laurat	42,4988	1573					$73,24 \pm 1,01$	$58,74 \pm 0,50$	masna
Izopropil laurat	43,2989	1639			$0,22 \pm 0,00$	$0,34 \pm 0,03$	$3,12 \pm 0,05$	$4,7 \pm 0,05$	slab alkoholni miris
Metil-dihidrojasmonat	43,4652	1651	$2,24 \pm 0,02$	$1,47 \pm 0,02$	$1,90 \pm 0,02$	$1,34 \pm 0,03$	$2,86 \pm 0,08$	$10,27 \pm 0,05$	cvjetna
Heksil-salicilat	43,9326	1685	$0,77 \pm 0,02$	$0,52 \pm 0,00$	$0,59 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,05$	$2,86 \pm 0,00$	$10,13 \pm 0,13$	cvjetna
Izopropil miristat	45,8643	1848	$0,96 \pm 0,01$	$1,81 \pm 0,00$	$1,99 \pm 0,00$	$2,26 \pm 0,03$	$8,75 \pm 0,03$	$20,39 \pm 0,02$	slab miris/bez mirisa
Diizobutil-ftalat	46,4070	1897	$7,24 \pm 0,13$	$6,03 \pm 0,05$	$5,18 \pm 0,15$	$5,05 \pm 0,04$	$10,61 \pm 0,20$	$85,11 \pm 1,02$	slab miris

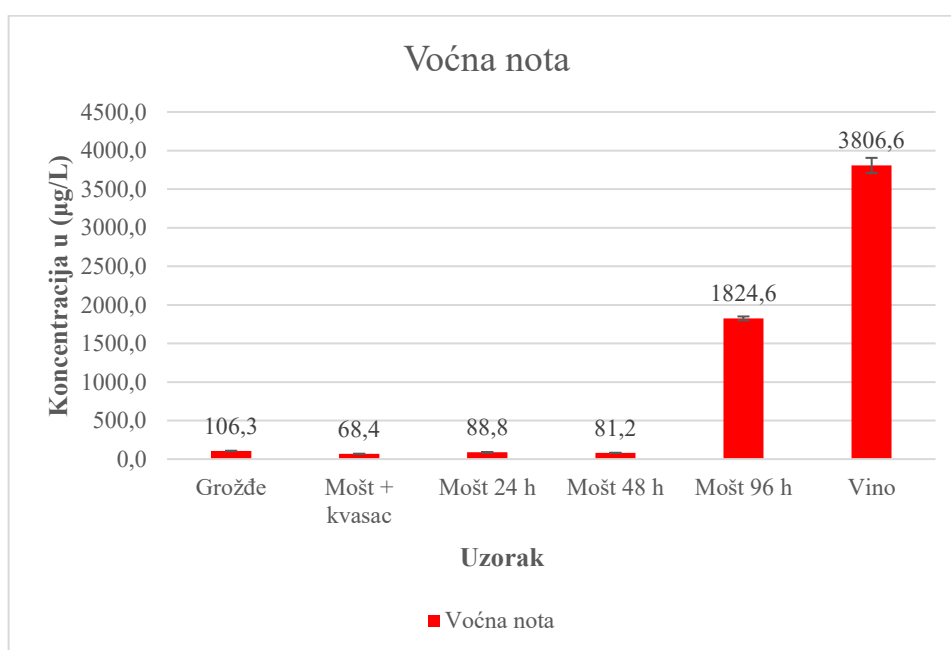
Tablica 6 Nastavak

Dibutil-ftalat	47,3855	1992	4,57 ± 0,05	1,94 ± 0,01	1,75 ± 0,01	3,38 ± 0,02	5,44 ± 0,07	35,32 ± 1,09	slab miris
Etil-palmitat	47,6289	2017	2,28 ± 0,01	2,78 ± 0,00	3,09 ± 0,02	3,88 ± 0,04	4,87 ± 0,04	22,55 ± 0,70	masna
Etil-linoleat	48,8832	2149					0,35 ± 0,00	3,76 ± 0,01	masna
Etil-oleat	48,9482	2156					0,53 ± 0,00	3,43 ± 0,11	masna
Etil-stearat	49,0863	2172					0,40 ± 0,00	3,50 ± 0,03	masna

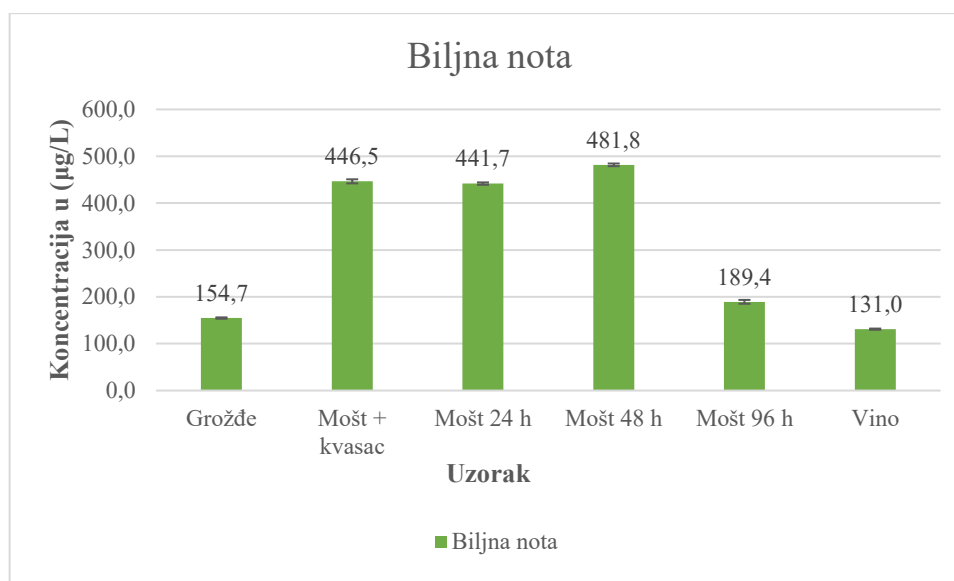
Oznake: RV retencijsko vrijeme; RI – retencijski indeks; Grožđe - uzorak grožđa cabernet sauvignon odmah nakon berbe; Mošt + kvasac – uzorak mošta cabernet sauvignon uz dodatak kvasca, period prije početka fermentacije; Mošt 24 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 24 h; Mošt 48 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 48 h; Mošt 96 h - uzorak mošta cabernet sauvignon u kojem je fermentacija trajala 96 h (započela burna fermentacija); Vino – Cabernet Sauvignon, završena fermentacija.



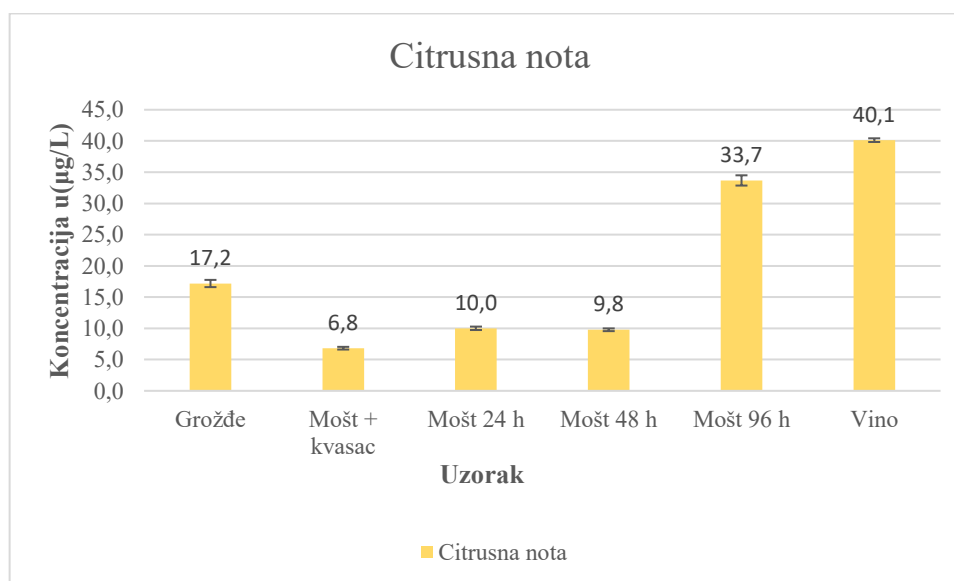
Slika 7 Ukupna koncentracija ($\mu\text{g/L}$) aromatske skupine spojeva koji doprinose masnoj noti u analiziranim uzorcima mošta i vina Cabernet Sauvignon



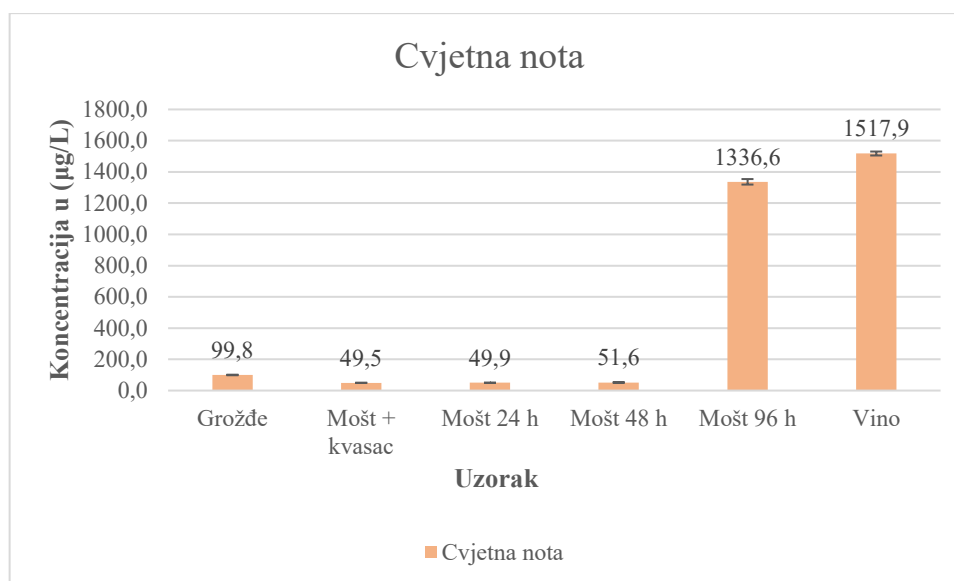
Slika 8 Ukupna koncentracija ($\mu\text{g/L}$) aromatske skupine spojeva koji doprinose voćnoj noti u analiziranim uzorcima mošta i vina Cabernet Sauvignon



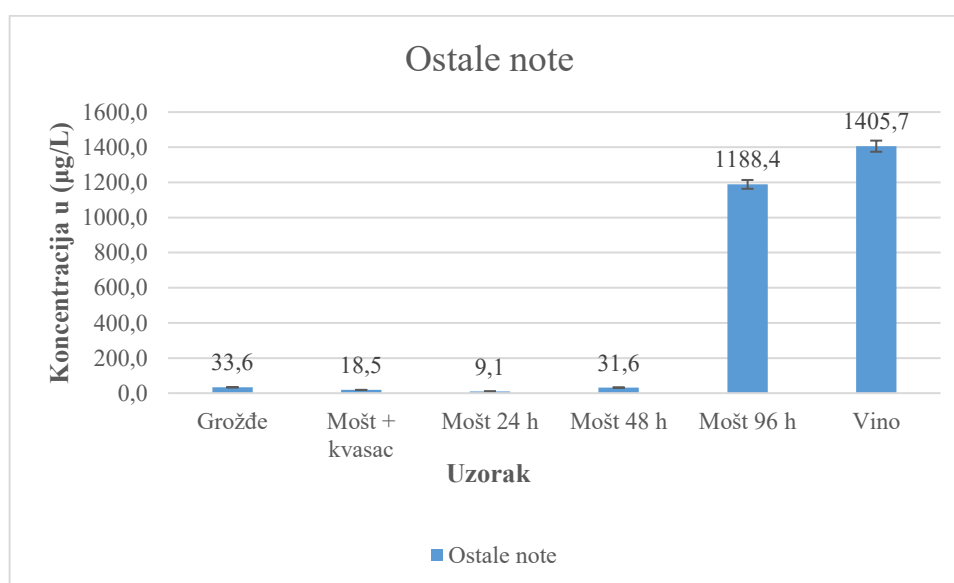
Slika 9 Ukupna koncentracija ($\mu\text{g/L}$) aromatske skupine spojeva koji doprinose biljnoj noti u analiziranim uzorcima mošta i vina Cabernet Sauvignon



Slika 10 Ukupna koncentracija ($\mu\text{g/L}$) aromatske skupine spojeva koji doprinose citrusnoj noti u analiziranim uzorcima mošta i vina Cabernet Sauvignon



Slika 11 Ukupna koncentracija (µg/L) aromatske skupine spojeva koji doprinose cvjetnoj noti u analiziranim uzorcima mošta i vina Cabernet Sauvignon



Slika 12 Ukupna koncentracija (µg/L) aromatskih spojeva koji doprinose mirisu po octu, bademu i sumporu te spojeva sa slabim mirisom u analiziranim uzorcima mošta i vina Cabernet Sauvignon

5. RASPRAVA

Rezultati istraživanja utjecaja procesa fermentacije na tvari boje i arome crnog vina Cabernet Sauvignon kutjevačkog vinogorja prikazani su u **Tablicama 1-6** te na **Slikama 7-12**. U uzorcima (uzorak grožđa, mošt + kvasac, mošt 24 h, mošt 48 h, mošt 96 h, vino) su spektrofotometrijski određeni ukupni polifenoli, flavonoidi, antocijani, polimerna boja te antioksidacijska aktivnost određena DPPH, FRAP, ABTS i CUPRAC metodom. Aromatski profil uzoraka određen je primjenom plinske kromatografije s masenim detektorom i mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPME).

Utjecaj procesa fermentacije na sastav fenolnih spojeva i antioksidacijsku aktivnost

Fenolni spojevi su odgovorni za kvalitetu vina, posebice crnih te za karakterističnu boju, okus i trpkost vina. U analiziranim uzorcima izmjerena je koncentracija ukupnih polifenola, flavonoida, antocijana i polimerne boje. Rezultati su prikazani u **Tablici 1**. Iz rezultata je vidljivo da nije došlo do gubitka ukupnih polifenola, nego se sadržaj ukupnih polifenola tijekom procesa fermentacije postupno povećavao. Najmanju koncentraciju polifenola imao je uzorak grožđa i mošta s kvascem (640, 90 i 648,30 mg/L), a najveću vino nakon završene fermentacije (703,79 mg/L). Prikazane su i koncentracije flavonoida u navedenim uzorcima čije su vrijednosti tijekom procesa fermentacije znatno smanjene u odnosu na početnu vrijednost za uzorak grožđa (432,28 mg/L). Zabilježen je blagi porast koncentracije flavonoida nakon 48 h i tijekom burne fermentacije (277,66 i 271,00 mg/L), a u gotovom vinu se koncentracija snizila na 245,36 mg/L. Zabilježen je i veliki porast antocijana čija je najveća koncentracija izmjerena u vinu (21,13 mg/L), a najmanja u uzorku grožđa (0,25 mg/L). Koncentracija antocijana se u uzorcima znatno promijenila iz čega možemo zaključiti da proces fermentacije ima veliki utjecaj na boju crnih vina. Polimerna boja predstavlja udio smeđih ili bezbojnih pigmenata koji nastaju degradacijom antocijana u prisutnosti kisika. Iz rezultata je vidljivo da je udio polimerne boje manji što je veći udio antocijana u uzorcima. Polimerna boja u početnom uzorku grožđa iznosila je 78,70%, a u vinu 46,28%. Povećanje polifenolnih spojeva i antocijana očekivan je zbog njihove ekstrakcije iz čvrstih dijelova bobice, zbog razlaganja bezbojnih kompleksa na slobodne obojene pigmente te polimerizacije i vezanja pojedinih antocijana u stabilnije polimere. S druge strane, kod flavonoida te reakcije su dovele do sniženja njihove koncentracije (Hou i sur., 2023).

Polifenoli, osim što daju boju crnom vinu, štite organizam od štetnog djelovanja slobodnih radikala, odnosno imaju antioksidacijska svojstva. Antioksidacijska aktivnost određivala se prema četiri različite metode: DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC. Rezultati izraženi u $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ prikazani su u **Tablici 1**. Svaka metoda obuhvaća različite skupine polifenolnih spojeva

koji djeluju kao antioksidansi, a s obzirom da je crno vino bogato tim spojevima, upotrijebljene su četiri navedene metode kako bi se što bolje prikazao antioksidacijski potencijal crnog vina (Ivić, 2022). Prema rezultatima sve četiri metode, došlo je do povećanja antioksidacijske aktivnosti tijekom procesa fermentacije u odnosu na početni uzorak grožđa. Prema DPPH metodi najmanju vrijednost je imao uzorak u kojem je moštu dodan samo kvasac, period prije fermentacije (1,54 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$), a najveću vino nakon završene fermentacije (1,79 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$). ABTS metodom je također najmanja aktivnost izmjerena u uzorku grožđa (2,77 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$), a vrijednost je gotovo udvostručena i najveća u vinu (5,71 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$). Kod ABTS metode vidljiv je i najveći raspon povećanja antioksidacijske aktivnosti u uzorcima. FRAP metodom su dobivene najniže vrijednosti u odnosu na ostale metode. Početni uzorak grožđa sadržavao je 0,34 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$, a koncentracija u uzorku vina nakon završene fermentacije bila je 0,46 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$. CUPRAC metodom su izmjerene najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u uzorcima gdje je najveća koncentracija bila u uzorku u kojem je fermentacija trajala 96 sati i gdje je započela burna fermentacija (10,88 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$) te u uzorku vina (10,83 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$), bez značajne razlike među uzorcima. Rezultati su pokazali da je tijekom procesa fermentacije došlo do povećanja antioksidacijske aktivnosti, što se podudara s povećanjem polifenola i antocijana u svim uzorcima.

Koncentracija superoksid dismutaze (SOD) izražena je u ng/L , a rezultati su pokazali znatno povećanje koncentracije tijekom procesa fermentacije. Najveća koncentracija određena plinskom kromatografijom bila je u vinu (425,67 ng/L), a najmanja u uzorku grožđa (30,15 ng/L). Zabilježen je veliki porast u odnosu na početni uzorak, posebno u uzorcima u fazama fermentacije nakon 48 h, nakon 96 h te nakon završene fermentacije.

Utjecaj procesnih parametara na aromatski profil

U analiziranim uzorcima identificirano je 63 spoja arome koji potječu iz grožđa ili koji su nastali tijekom procesa fermentacije te su prikazani u **Tablicama 2-6**. Pronađeni spojevi arome podijeljeni su u 5 skupina: kiseline, alkoholi, aldehidi i ketoni, terpeni i esteri. Za svaki spoj unutar skupine napisana je glavna mirisna nota kojom doprinosi ukupnoj aromi vina. Kod svake skupine spojeva izračunata je i ukupna koncentracija spojeva u pojedinom uzorku.

U **Tablici 2** prikazano je sedam kiselina koje su identificirane u uzorcima. Prisutne kiseline su: octena, heptanska, nonanska, dekanska, laurinska, miristinska i palmitinska kiselina. Najmanji udio ukupnih kiselina određen je u uzorku mošta neposredno nakon dodatka kvasca, prije početka fermentacije te iznosi 44,25 $\mu\text{g}/\text{L}$, a najveći udio zabilježen je u vinu i iznosi 1835,87

$\mu\text{g/L}$. Vidljiv je nagli porast ukupne koncentracije kiselina u uzorku gdje je započela burna fermentacija. Od sedam prisutnih kiselina, octena kiselina je imala najvišu koncentraciju. Octena kiselina nije detektirana u uzorku grožđa, u moštu s dodatkom kvasca te u uzorku gdje je fermentacija trajala 24 h. Octena kiselina je imala najvišu koncentraciju, $1246,76 \mu\text{g/L}$ u uzorku vina, a najmanju u uzorku nakon fermentacije koja je trajala 48 h ($20,62 \mu\text{g/L}$). Njena koncentracija se povisila kao nusprodukt djelovanja kvasaca u anaerobnim uvjetima alkoholne fermentacije. Međutim, ukoliko je njena koncentracija ispod 900 mg/L , ona doprinosi aromi vina (Ivić, 2022), što je ovdje i slučaj. Ostale navedene kiseline detektirane su u svim uzorcima i zaslužne su za masnu aromu vina. Koncentracije pojedinih kiselina razlikovale su se od uzorka do uzorka. Uspoređujući uzorak grožđa i konačno vino, iz rezultata je vidljivo da je došlo do povišenja koncentracija gotovo svih kiselina, izuzev palmitinske kiselina, čija se koncentracija snizila s $18,58 \mu\text{g/L}$ na $8,14 \mu\text{g/L}$.

U **Tablici 3** prikazano je 11 identificiranih viših alkohola. Uspoređujući svih 5 aromatskih skupina alkoholi su imali najvišu ukupnu koncentraciju. Ukupna koncentracija viših alkohola je bila najmanja u uzorku grožđa ($106,63 \mu\text{g/L}$), a najviša u vinu ($3795,01 \mu\text{g/L}$). Iz rezultata je vidljivo da se koncentracija alkohola znatno povisila tijekom procesa fermentacije. Prisutni alkoholi u uzorcima su: izoamilni alkohol, but-2,3-diol, heksan-1-ol, okten-3-ol, metionol, 2-etilheksan-1-ol, oktan-1-ol, 2-feniletanol, nonan-1-ol, perilni alkohol i dodekanol. Najviše koncentracije u vinu imaju izoamilni alkohol i 2-feniletanol ($2390,27 \mu\text{g/L}$ i $1197,05 \mu\text{g/L}$). Heksan-1-ol, okten-3-ol, 2-etilheksan-1-ol, oktan-1-ol, 2-feniletanol, perilni alkohol i dodekanol detektirani su u svim uzorcima. Izoamilni alkohol nije detektiran u uzorku grožđa te je vidljivi nagli porast njegove koncentracije. U moštu s kvascem koncentracija izoamilnog alkohola iznosila je $2,56 \mu\text{g/L}$, a u vinu nakon završene fermentacije $2390,27 \mu\text{g/L}$. Butan-2,3-diol, metionol i nona-1-ol detektirani su samo u uzorcima burne fermentacije i završene fermentacije, što upućuje na to da oni nastaju isključivo procesom fermentacije. Viši alkoholi odgovorni su za voćnu (izoamilni alkohol, butan-2,3-diol), biljnu (heksan-1-ol, okten-3-ol, oktan-1-ol, perilni alkohol), cvjetnu (2-etilheksan-1-ol, 2-feniletanol), citrusnu (nonan-1-ol), masnu (dodekanol) notu i notu po sumporu (metionol).

U **Tablici 4** prikazano je 18 identificiranih aldehida i ketona. Od 5 spomenutih skupina aromatskih spojeva, aldehidi i ketoni su bili najbrojnija skupina. Najviše ih je pronađeno u uzorku mošta s dodatkom kvasca ($199,59 \mu\text{g/L}$), a najmanje u vinu nakon završene fermentacije ($55,54 \mu\text{g/L}$). Aldehidi i ketoni doprinose voćnoj (2-heptanal, oktanal), biljnoj (heksanal, 2-heksenal), citrusnoj (metil heptenon, dekanal, 2,4-dekadienal, dodekanal), cvjetnoj

(fenilacetaldehid, geranil aceton, lili aldehid, heksilcinamaldehid) i masnoj (2-oktenal, 2-nonenal, 2-decenal, miristaldehid) aromi, mirisu po bademu (benzaldehid) te slabom mirisu (4-propilbenzaldehid). Vidljivo je da se tijekom procesa fermentacije ukupna koncentracija aldehida i ketona snižava. Identificirani su spojevi: heksanal, 2-heksenal, benzaldehid, 2-heptenal, metil heptenon, oktanal, fenilacetaldehid, 2-oktenal, 2-nonenal, dekanal, 2-decenal, 4-propilbenzaldehid, 2,4-dekadienal, dodekanal, geranil aceton, lili aldehid, miristaldehid i heksilcinamaldehid. Najzastupljeniji spojevi iz ove skupine u moštu su 2-heksenal i heksanal. U svim uzorcima prisutni su heksanal, fenilacetaldehid, 2-decenal, dodekanal, geranil aceton i heksilcinamaldehid. Ostali karbonilni spojevi nakon fermentacije nisu detektirani u vinu, dok benzaldehid i miristaldehid nisu pronađeni u moštu, nego su nastali tijekom alkoholne fermentacije te su prisutni u vinu (8,36 µg/L benzaldehida i 5,62 µg/L miristaldehida).

U **Tablici 5** prikazano je 11 identificiranih terpena u uzorcima. Koncentracije pojedinih terpena variraju u uzorcima od početka do kraja fermentacije. Prisutni terpeni su: linalool oksid, linalool, hotrienol, trans-pinokarveol, β-citronellol, vitispiran, β-damascenon, α-jonon, β-farnesen, γ-jonon i β-jonon. Za citrusnu aromu vina zaslužni su linalool oksid, linalool i β-citronellol, za cvjetnu hotrienol, vitispiran, α-jonon i β-jonon, a za biljnu trans-pinokarveol, β-farnesen i γ-jonon. β-damascenon je najzastupljeniji terpen koji doprinosi voćnoj aromi, ali njegova koncentracija se snižavala tijekom fermentacije te nije pronađen u konačnom vinu. Linalool oksid je terpen detektiran samo u uzorku grožđa, ali nakon dodatka kvasaca došlo je do nastanka linaloola čija se koncentracija povećavala tijekom fermentacije do 5,99 µg/L. Međutim, nakon završene fermentacije, koncentracija linaloola je bila znatno niža, 2,68 µg/L. Hotrienol, trans-pinokarveol, vitispiran i β-jonon su jedini detektirani u svim uzorcima. Gledajući ukupnu koncentraciju terpena, ona je najviša u uzorku grožđa (159,86 µg/L), a najniža u uzorku mošta nakon 48 h fermentacije (42,53 µg/L). Tijekom burne fermentacije njihova ukupna koncentracija se povećala na 72,22 µg/L, ali u konačnom vinu je izmjereno 45,92 µg/L.

Tablica 6 prikazuje 16 identificiranih estera: etil-heksanoat, dietil-sukcinat, etil-oktanoat, fenetil-acetat, etil-dekanoat, etil-laurat, izopropil laurat, metil-dihidrojasmonat, heksil-salicilat, izopropil miristat, diizobutil-ftalat, dibutil-ftalat, etil-palmitat, etil-linoleat, etil-oleat i etil-stearat. Uzorak grožđa sadrži najnižu ukupnu koncentraciju estera (41,45 µg/L), koja se značajno povisila tijekom burne fermentacije (2032,31 µg/L) jer je došlo do povišenja koncentracija gotovo svih navedenih estera. Nakon završene fermentacije, dobiveno vino sadržavalo je 1889,67 µg/L ukupnih estera. Iz rezultata je vidljivo da esteri nastaju tijekom

fermentacije radom kvasaca. Etil-dekanoat je imao najveću koncentraciju u uzorku vina (1103,39 $\mu\text{g/L}$). Koncentracije estera su se razlikovale među uzorcima s obzirom na vrijeme fermentacije. Esteri detektirani u svim uzorcima su: dietil-sukcinat, etil-oktanoat, metil-dihidrojasmonat, heksil-salicilat, izopropil miristat, diizobutil-ftalat, dibutil-ftalat i etil-palmitat. Esteri su najvećim dijelom zaslužni za voćnu aromu vina (etil-heksanoat, dietil-sukcinat, etil-oktanoat, etil-dekanoat), zatim za cvjetnu (fenetil-acetat, metil-dihidrojasmonat, heksil-salicilat) i masnu (etil-laurat, etil-palmitat, etil-linoleat, etil-oleat i etil-stearat) aromu. Slab miris imaju izopropil laurat, izopropil miristat i diizobutil-ftalat.

Svi spojevi arome podijeljeni su u 6 skupina s obzirom na glavnu mirisnu notu kojom pridonose ukupnom aromatskom profilu vina, i to na spojeve koji imaju: masnu notu, voćnu notu, biljnu notu, cvjetnu notu te skupina ostalih nota (sumpor, ocat, badem, bez mirisa). Promjene u aromatskom profilu prema ukupnoj koncentraciji pojedine skupine prikazane su grafičkim prikazima na **Slikama 7-12**. **Slika 7** prikazuje ukupnu koncentraciju skupina spojeva koji doprinose masnoj noti u šest analiziranih uzoraka. Vidljivo je da uzorak vina ima najviše koncentracije spojeva (720,7 $\mu\text{g/L}$) koji doprinose mirisu na mast (uglavnom masne kiseline), slijedi uzorak mošta nakon 96 h fermentacije (487,7 $\mu\text{g/L}$), a najmanju koncentraciju spojeva s masnom notom sadrži uzorak mošta nakon 48 h (52,1 $\mu\text{g/L}$). **Slika 8** prikazuje ukupnu koncentraciju spojeva koji doprinose mirisu na voće. Najviša koncentracija izmjerena je u uzorku vina (3806,6 $\mu\text{g/L}$), a najniža u uzorku mošta kojemu je dodan kvasac (68,4 $\mu\text{g/L}$). Na **Slici 9** su prikazane ukupne koncentracije aromatskih spojeva koji doprinose biljnom mirisu. Najviša koncentracija izmjerena je u uzorku mošta nakon 48 h fermentacije (481,8 $\mu\text{g/L}$), praćene uzorcima mošta s dodatkom kvasca i nakon 24 h fermentacije, dok je najniža izmjerena u vinu (131,0 $\mu\text{g/L}$). **Slika 10** prikazuje ukupnu koncentraciju spojeva koji doprinose citrusnoj noti. Najniža koncentracija zabilježena je u uzorku mošta nakon dodatka kvasca (6,8 $\mu\text{g/L}$), a najviša u uzorku vina (40,1 $\mu\text{g/L}$). Ukupne koncentracije spojeva koji doprinose mirisu na cvijeće prikazani su na **Slici 11**. Najviša koncentracija je izmjerena u uzorku vina (1517,9 $\mu\text{g/L}$), a najniža u uzorku mošta s dodatkom kvasca (49,5 $\mu\text{g/L}$). **Slika 12** prikazuje zastupljenost ostalih nota čije su koncentracije najviše u vinu (1405,7 $\mu\text{g/L}$), a najniže u moštu nakon 24 h fermentacije (9,1 $\mu\text{g/L}$). Iz ovih rezultata je vidljivo da se aromatski profila mošta značajno mijenja tijekom alkoholne fermentacije, posebice tijekom burne fermentacije, pri čemu se formira aroma vina. Izuzetak su bili spojevi koji doprinose biljnoj noti, čija se ukupna koncentracija snizila nakon fermentacije, što se podudara sa sniženjem koncentracija aldehida, ketona te pojedinih terpena koji spadaju u tu skupinu.

6. ZAKLJUČCI

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

- Proces fermentacije ima značajan utjecaj na tvari boje i tvari arome vina Cabernet Sauvignon.
- U uzorcima je izmjerena visoka koncentracija polifenola što je karakteristika crnih vina, a njihov sadržaj se nakon procesa fermentacije povećao.
- Koncentracije flavonoida su tijekom procesa fermentacije znatno smanjene u odnosu na početnu vrijednost u uzorku grožđa.
- Zabilježen je i značajan porast koncentracije antocijana iz čega možemo zaključiti da tijekom procesa fermentacije dolazi do povećanja njihove stabilnosti ili oslobađanja iz bezbojnih polimera u slobodne obojane pigmente.
- Povećanje koncentracije antocijana popraćeno je smanjenjem udjela polimerne boje.
- Tijekom procesa fermentacije došlo je do povećanja antioksidacijske aktivnosti u svim uzorcima korištenjem četiri različite metode: DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC.
- Povećanje antioksidacijske aktivnosti rezultat je povišenja koncentracija polifenolnih spojeva.
- Zabilježeno je znatno povećanje koncentracije superoksid dismutaze tijekom procesa fermentacije.
- U analiziranim uzorcima su aromatski spojevi podijeljeni na glavne skupine: kiseline, alkohole, estere, terpene, aldehide i ketone.
- Aromatski profil vina prikazan je i prema glavnim mirisnim notama, po kojima se svi spojevi svrstavaju u skupine s masnom, voćnom, biljnom, citrusnom, cvjetnom i ostalim notama (ocat, sumpor, badem i slab miris).
- Tijekom procesa fermentacije dolazi do povećanja sadržaja ukupnih kiselina u uzorcima. Najviše koncentracije su izmjerene po završetku fermentacije.
- Tijekom procesa fermentacije dolazi do povećanja koncentracije alkohola u uzorcima.
- U odnosu na 5 aromatskih skupina pronađenih u uzorcima, alkoholi su imali najvišu ukupnu koncentraciju.
- Aldehidi i ketoni su najbrojnija skupina spojeva arome identificirana u uzorcima.
- Koncentracije ukupnih aldehida i ketona se tijekom alkoholne fermentacije mijenjaju, a nakon fermentacije i snižavaju te vino ima nižu koncentraciju ovih spojeva od početnog mošta.
- Koncentracija ukupnih terpena je prije fermentacije i dodatka kvasca najviša, a procesom fermentacije se snizila.

- Koncentracija ukupnih estera se tijekom fermentacije znatno povisila. Esteri nastaju tijekom fermentacije radom kvasaca.
- Biljna aromatska nota je bila najizraženija tijekom fermentacije, a nakon završene fermentacije značajno je reducirana.
- Ukupna koncentracija aromatskih spojeva koji doprinose mirisu na mast, na voće, na citruse, na cvijeće, na ocat, sumpor je najviša u uzorku vina nakon završene fermentacije.

7. LITERATURA

- Alpeza I. (2008) Temelji kemijskog sastava vina. *Glasnik Zaštite Bilja* 31(6), str. 143 – 150.
- Álvarez-Pérez, J. M., Campo, E., San-Juan, F., Coque, J. J. R., Ferreira, V., Hernández-Orte, P. (2012) 'Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: the differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles', *Food Chemistry*, 133(2), str. 284-292.
- Antonelli, A., Castellari, L., Zambonelli, C., Carnacini, A. (1999) 'Yeast influence on volatile composition of wines', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), str. 1139–1144.
- Banović, M. (2020) Kemija i tehnologija vina, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P. (2009) 'Fruit and fruit products' u Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P. (ur.) *Food chemistry*. Berlin: Springer, str. 822-834.
- Blesić, M., Mijatović, D., Radić, G i Blesić, S. (2013) *Praktično vinogradarstvo i vinarstvo*. Sarajevo: CRS - Catholic Relief Services
- Bowers, J., Meredith, C. (1997) 'The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon', *Nature Genetics*, 16(1), str. 84–87.
- Brand Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995) 'Use of free radical method to evaluate antioxidant activity', *Lebensm-Wiss U Technol*, 28, str. 25-30.
- Carrieri, C., Milella, R. A., Incampo, F., Crupi, P., Antonacci, D., Semeraro, N., Colucci, M. (2013) 'Antithrombotic activity of twelve table grape varieties. Relationship with polyphenolic profile', *Food Chemistry*, 140(4), str. 647–653.
- Castaldo, L., Narváez, A., Izzo, L., Graziani, G., Gaspari, A., Di Minno, G., Ritieni, A. (2019) 'Red wine Consumption and Cardiovascular health', *Molecules*, 24(19), br. 3626.
- Ciani, M., Comitini, F. (2019) 'Use of non-saccharomyces yeasts in red winemaking' u Morata, A. (ur.) *Red wine technology*. Cambridge, Massachusetts: Academic press, str. 51 – 64.
- Claus, H. (2019) 'Wine Fermentation', *Fermentation*, 5(1), br. 19.
- Felgate, P.D. (2013) 'Methods of Analysis – Initial Testing' u Siegel, J.A., Saukko, P.J., M., Houck, M.M. (ur.) *Encyclopedia of Forensic Sciences*. 2.izdanje. Waltham: Academic Press, str. 249–264.
- Giusti, M.M., Wrolstad, R.E. (2001) 'Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV - Visible Spectroscopy' u Wrolstad, R.E. i Schwartz, S.J. (ur.) *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York, SAD: John Wiley & Sons Inc, str. 5-69.
- Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J.M., Martínez-Cutillas, A., Fernández, J.I. (2002) 'Maintenance of colour composition of a red wine during storage. Influence of prefermentative practices, maceration time and storage', *LWT - Food Science and Technology*, 35(1), str. 46- 53.
- González-Manzano, S., Dueñas, M., Rivas-Gonazalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C. (2009) 'Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine', *Food chemistry*, 114, str. 649-656.
- Grainger, K., Tattersall, H. (2005) *Wine Production: Vine To Bottle*. Pondicherry, India, Oxford, Velika Britanija: Blackwell Publishing.

- Gupta, D. (2015) 'Methods for determination of antioxidant capacity: A review', *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(2), str. 546–566.
- Herjavec, S. (1990) 'Način izvođenja berbe grožđa i kretanje metanola u bijelim vinima', *Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, 52, str. 21-30,
- Herjavec, S., Maslov Bandić, L. (2019) *Vinarstvo*, Zagreb: Nakladni zavod Globus.
- Hou, X., Chen, S., Pu, Y., Wang, T., Xu, H., Li, H., Ma, P., Hou, X. (2023) 'Effects of winemaking on phenolic compounds and antioxidant activities of Msalais Wine', *Molecules*, 28(3), br. 1250.
- Hulina, N. (2011.) 'Više biljke – stablašice, Sistematika i gospodarsko značenje', *Agronomski glasnik :Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, 73(3), str. 179-183.
- Ivić, I. (2022) 'Reverzna osmoza i nanofiltracija: utjecaj koncentriranja na bioaktivne komponente i arome crnog vina Cabernet Sauvignon', *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
- Jackson, R.S. (2008) *Wine science: Principles and applications*.3.izdanje. Burlington, London, San Diego: Academic Press, Elsevier Inc.
- Jakobek, L. (2007) 'Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća'. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
- Jing, P., Bomser, J.A., Schwartz, S.J., He, J., Magnuson, B.A., Giusti, M.M. (2008) 'Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth', *J Agric Food Chem.*, 56(20), str. 9391-9398.
- Jordão, A., Vilela, A., Cosme, F. (2015) 'From Sugar of Grape to Alcohol of Wine: Sensorial Impact of Alcohol in Wine', *Beverages*, 1(4). str. 292–310.
- Joscelyne-Louise, J. (2009) 'Consequences of extended maceration for red wine colour and phenolics', *Doktorski rad*. School of Agriculture, Food and Wine, Discipline of Wine and Horticulture, The University of Adelaide.
- Kesić, A., Smajlović, B., Hodžić, Z., Ibrišimović Mehmetović, N. (2015) 'Utjecaj geografskog porijekla na antioksidacijsku aktivnost domaćih vina', *Hrana u zdravlju i bolesti*, 4. str. 93-97.
- Kim, S., Hoek, E.M.V. (2005) 'Modeling concentration polarization in reverse osmosis processes', *Desalination*, 186(1–3), str. 111–128.
- Krstulović, A. (2008) *Vina Hrvatske*. Zagreb: Profil.
- Law, J. (2006) *Od vinograda do vina*. Zagreb: Veble commerce.
- Licul, R., Premužić, D. (1993.) *Praktično vinogradarstvo i podrumarstvo* (7. promijenjeno izdanje). Zagreb: Nakladni zavod Znanje.
- Maicas, S., Mateo, J. (2016) 'Microbial Glycosidases for Wine Production', *Beverages*, 2(3), br. 20.
- Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Pejić, I. (2008) *Vinova loza - Ampelografija, ekologija, oplemenjivanje*. Zagreb: Školska knjiga.
- McCord, J. M., Fridovich, I. (1988) 'Superoxide dismutase: The first twenty years (1968–1988)', *Free Radical Biology and Medicine*, 5(5), str. 363–369.

- Michlmayr, H., Nauer, S., Brandes, W., Schumann, C., Kulbe, K.D., Del Hierro, A.M., Eder, R. (2012) 'Release of wine monoterpenes from natural precursors by glycosidases from *Oenococcus oeni*', *Food Chemistry*, 135(1). str. 80–87.
- Miller, A. F., (2012) 'Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights', *FEBS letters*, 586(5), str. 585–595.
- Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva (2005) 'Pravilnik o proizvodnji vina', *Narodne novine* 02/05. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_01_2_17.html (Pristupljeno: 9. 9. 2024.)
- Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva (2022) 'Pravilnik o vinarstvu', *Narodne novine* 81/22. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2022_07_81_1183.html (Pristupljeno: 9. 9. 2024.)
- Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva (2019) 'Zakon o vinu', *Narodne novine* 32/19. Dostupno na: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_01_2_17.html (Pristupljeno: 9. 9. 2024.)
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., Durán, N. (2003) 'Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines', *Food Chem.*, 82, str. 409- 416.
- Mirošević, N. (1996.) *Vinogradarstvo*. Zagreb: Nakladni zavod Globus.
- Mirošević, N., Karoglan Kontić, J. (2008.) *Vinogradarstvo*. Zagreb: Nakladni zavod Globus.
- Morata, A., Gonzalez, C., Tesfaye, W., Loira, I., Suarez-Lepe, J.A. (2019) 'Maceration and fermentation: new technologies to increase extraction' u Morata, A. (ur.) *Red wine technology*. Cambridge, Massachusetts: Academic press, str. 35-48.
- Moreno Arribas, M.V., Polo, C. (2008) *Wine Chemistry and Biochemistry*. New York: Springer Science and Business Media.
- Muštović, S. (1985) *Vinarstvo s enohemijom i mikrobiologijom*. Beograd: Privredni pregled.
- Nykänen, L. (1986) 'Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages', *American Journal of Enology Viticulture*, 37, str 84-96.
- Olmo, H. P. (1995) 'The origin and domestication of the *Vinifera* grape' u McGovern, P.E. (ur.) *The origins and ancient history of wine*. Amsterdam: Gordon and Breach, str. 31-34.
- Ough, C.S., Amerine, M.A. (1988) *Methods analysis of musts and wines*. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Padilla, B., Gil, J.V., Manzanares, P. (2016) 'Past and Future of Non-Saccharomyces Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity', *Frontiers in Microbiology*, 7(1), br.20.
- Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J.C., Câmara, J.S. (2007) 'Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines', *Food Chem.*, 105, str. 204-214.
- Pichler, A (2022) Tehnologija vina. *Nastavni materijali*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.
- Pietruszka, M., Pielech-Przybylska, K., Szopa, J.S. (2010) 'Synthesis of higher alcohols during alcoholic fermentation of rye mashes', *Food Chemistry and Biotechnology*, 74(1081), str. 51–64

- Pretorius, I.S., Toit, M., Rensburg, P. (2003) 'Designer Yeasts for the Fermentation Industry of the 21st Century', *Food Technol. Biotechnol.*, 41, str. 3–10.
- Primorac, Lj. (2020) Kontrola kakvoće hrane. *Nastavni materijali*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005) 'Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements', *J Agric Food Chem*, 53, str. 4290-4302.
- Radovanović, V. (1986) *Tehnologija vina*. (2. prerađeno i dopunjeno izdanje). Beograd: IRO Građevinska knjiga.
- Ramon-Portugal, F., Seiller, I., Taillandier, P., Favarel, J.L., Nepreu, F. Strehaiano, P. (1990) 'Kinetics of production and consumption of organic acids during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*', *Food Technol. Biotechnol.*, 4, br. 235.
- Ribereau Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dudourdieu, D. (2006) *Handbook of enology – the chemistry of wine stabilization and treatments*. 2. izdanje. Chichester, West Sussex, England: John Wiley and sons.
- Roger, B. (2008) 'When did oxygenic photosynthesis evolve?', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363, str. 2731–2743.
- Roginsky, V., Lissi, E. (2005) 'Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food', *Food Chemistry*, 92, str. 235-254.
- Sokolić, I. (1976) *Zlatna knjiga o vinu*. Rijeka: Otokar Keršovani.
- Sokolić, I. (1993) *Prvi hrvatski vinogradarsko-vinarski leksikon*. 2. Izdanje. Rijeka: Vitagraf.
- Stauffer, E. (2013) 'Gas Chromatography–Mass Spectrometry' u Siegel, J.A., Saukko, P.J., M., Houck, M.M. (ur.) *Encyclopedia of Forensic Sciences*. 2.izdanje. Waltham: Academic Press, str 596–602.
- Swiegers, J., Bartowsky, E., Henschke, P., Pretorius, I. (2005) 'Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour', *Aust. J Grape Wine Res.*, 11, str. 139-173.
- Tomas, D., Kolovrat, D. (2011) *Priručnik za proizvodnju vina - za male proizvođače i hobiste*. Mostar: Federalni agromediteranski zavod.
- Tomljanović, M. (2000) *Instrumentalne kemijske metode I. dio*. Zenica: U.G HIJATUS.
- Ugliano, M., Bratowsky, E. J., McCarthy, J., Moio, L., Henschke, P. A. (2006) 'Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains', *J Agri. Food Chem.*, 54, str. 6322-6331.
- Vas, G., Vékey, K. (2004) 'Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis', *Journal of Mass Spectrometry*, 39, str. 233-54.
- Waterhouse, A.L., Sacks, G.L., Jeffery, D.W. (2016) '*Aldehydes, Ketones, and Related Compounds*' u *Understanding Wine Chemistry*. 1.izdanje. Chichester, Velika Britanija: John Wiley & Sons, Ltd, str.79–87.
- Web 1: <https://vinopedia.hr/cabernet-sauvignon/> [16.8.2024.]
- Web 2 <https://microbenotes.com/gas-chromatography/> [20.8.2024.]
- Web 3: <https://www.agilent.com/library/posters/Public/Vorstellung%20Agilent%20GC-MSD%205977.pdf> [22.8.2024.]

Wedler, H., Pemberton, R., Tantillo, D. (2015) 'Carbocations and the complex flavour and bouquet of wine: Mechanistic aspects of terpene biosynthesis in wine grapes', *Molecules*, 20(6), str. 10781-10792.

Zoričić, M. (1996) *Podrumarstvo*. Zagreb: Nakladni zavod Globus.