

# Određivanje tvari boje u crnim vinima erdutskog vinogorja

---

Andrašek, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:109:927122>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Iva Andrašek

Određivanje tvari boje u crnim vinima erdutskog vinogorja

završni rad

Osijek, 2015.

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

**PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**

Završni rad

**ODREĐIVANJE TVARI BOJE U CRNIM VINIMA ERDUTSKOG  
VINOGORJA**

Nastavni predmet:

Tehnologija prerade sirovina biljnog podrijetla II

Osnove tehnologije vina

Predmetni nastavnik: izv.prof.dr.sc. Andrija Pozderović

doc.dr.sc. Anita Pichler

---

Student/ica: Iva Andrašek

(MB: 3473/15)

Mentor: dr. sc. Anita Pichler, docent

Predano (datum):

Pregledano (datum):

---

**Ocjena:**

**Potpis mentora:**

---

# Određivanje tvari boje u crnim vinima erduskog vinogorja

## Sažetak

Boja vina uz okus daje karakter vinu te se prema intenzitetu boje i tonu vino može svrstati u određenu kategoriju. Polifenolni spojevi imaju presudnu ulogu u boji vina, međutim vrlo malo utječu na okus vina. Antocijani, razvijeni u lišću fotosintetskih biljaka, služe kao zaštita od foto-oštećenja UV i plavo-zelenog svjetla. Važnost antocijana u vinu nije samo u tome što su oni glavni nositelji boje crnih vina, već i to što je znanstveno dokazano njihovo pozitivno djelovanje na ljudsko zdravlje koje se zasniva na njihovom antioksidativnom djelovanju u organizmu čovjeka. Cilj ovog istraživanja bio je odrediti sadržaj flavonoida, polifenola i antocijana te antioksidativnu aktivnost u crnim vinima erduskog vinogorja u istočnoj Slavoniji, tijekom dvije uzastopne berbe. Ispitivani uzorci crnih vina bili su Merlot, Pinot crni i Cabernet Sauvignon. Utvrdili smo da sorta, položaj vinograda i klimatski uvjeti utječu na sadržaj flavonoida, polifenola i antocijana te antioksidativno djelovanje u crnim vinima. Rezultati analiziranih vina pokazali su da nema značajne razlike u antioksidativnom djelovanju između ispitivanih vina. Crno vino iz Erduskih vinograda, sorte Pinot crni imalo je najveći sadržaj antocijana u odnosu na ostala ispitivana vina.

**Ključne riječi:** crno vino, antocijani, polifenoli, antioksidativno djelovanje

# Determination of color substances of red wines from erdut vineyard

## Summary

Color of a wine as well as a flavour gives character to the wine, and according to the intensity of the color, wine can be categorized. Polyphenols play a crucial role in the colour of red wine; however they contribute little to the taste of wine. Anthocyanins, developed in the leaves of photosynthetic plants as protection from the photo-damage of UV and blue-green light. Importance of anthocyanins is because of their scientifically proved positive impact on human's health as anti-oxidants. The aim of this study was to determinate quantity of flavonoids, polyphenol and anthocyanin content in red wines from Erdut vineyard in Eastern Slavonia during two consecutive vintages. The examined samples of red wines were Merlot, Pinot noir and Cabernet Sauvignon. It was found that variety, vineyard position and climatic conditions were affected on antioxidant activity, flavonoids, polyphenol and anthocyanin content in red wines. The results of analyzed wines showed that there were no significant differences in antioxidant activity between all of examined wines. The red wine from Erdut vineyards, variety Pinot noir had the highest content of anthocyanins compared to all examined wines.

**Keywords:** red wine, anthocyanins, polyphenols, antioxidant activity

# Sadržaj

Sadržaj .....	4
1. UVOD .....	1
1. TEORIJSKI DIO .....	2
1.1. Grožđe kao sirovina za proizvodnju vina.....	2
1.2. Crno vino .....	2
1.2.1. Utjecaj temperature maceracije na sadržaj fenolnih spojeva.....	5
1.2.2. Utjecaj potapanja klobuka.....	5
1.3. Kemijski sastav grožđa i mošta.....	6
1.3.1. Fenolni spojevi.....	6
1.3.1.1. Flavonoidi .....	7
1.3.1.1.1. Flavan-3-oli .....	8
1.3.1.1.2. Flavonoli: kvercetin, kamferol i miricetin.....	8
1.3.1.1.3. Antocijani.....	9
1.3.1.1.4. Utjecaj različitih faktora na antocijane.....	10
1.3.1.1.5. Tanini .....	10
1.3.1.2. Neflavonoidi .....	11
1.3.1.2.1. Stilbeni.....	12
1.4. Utjecaj pH na svojstva i boju antocijana .....	12
2.6. Kopigmentacija antocijana .....	14
2.7. Utjecaj fenolnih spojeva na zdravlje ljudi.....	15
2.8. Sadržaj polifenola u crnim sortama grožđa.....	15
2.9. Sadržaj fenolnih spojeva u pojedinim dijelovima grozda.....	16
2.9.1. Peteljka .....	16
2.9.2. Sjemenka .....	16
2.9.3. Kožica.....	16
3. EKSPRIMENTALNI DIO .....	17
3.1. Zadatak .....	17
3.2. Materijali i metode.....	17
3.2.1. Uzorci vina koji su analizirani .....	17
3.2.2. Određivanje ukupnih polifenola.....	17

3.2.3.	Određivanje antocijana .....	18
3.2.4.	Određivanje degradacije antocijana .....	19
3.2.5.	Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	19
3.2.6.	Određivanje ukupnih flavonoida .....	20
4.	REZULTATI.....	21
5.	RASPRAVA.....	24
6.	ZAKLJUČAK.....	25
7.	LITERATURA.....	26

## 1. UVOD

Vino je poljoprivredni prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg i za preradu u vino pogodnoga grožđa.

Crno vino se dobiva vrenjem masulja - vinifikacijom (najčešće bez peteljkovine). Vrenjem i maceracijom masulja postiže se ekstrakcija boje iz pokožice u groždani sok. Osim tvari boje, izdvajaju se tanini, mineralne tvari i tvari arome, o kojima ovisi kvaliteta crnih vina. Najvažnije tvari koje daju boju crnim sortama grožđa i crnom vinu su antocijani. To su flavonoidni polifenoli koji u prirodi dolaze u obliku antocijanina, odnosno glikozida pojedinih antocijanidina. U grožđu se uglavnom nalaze monoglikozidi. Glavni dio antocijanina su antocijanidini čiji su konjugirani dvostruki vezovi odgovorni za crvenu, narančastu i ljubičastu boju. Od polifenolnih spojeva složene strukture, u grožđu se nalaze kondenzirani tanini kao polimeri flavonoidnih fenola. Sudjeluju u reakcijama enzimskog i neenzimskog posmeđivanja u vinu, daju gorčinu i trpkost vina, a nalaze se u kožici, sjemenkama i peteljci. Vino je uvršteno u prehrambene proizvode upravo zahvaljujući bogatstvu polifenola, koji imaju antibaktericidno i antivirusno djelovanje.

U ovom radu ću opisati utjecaj sorte na kakvoću vina, odnosno na sadržaj polifenola i boju (sadržaj antocijana).



# 1. TEORIJSKI DIO

## 1.1. Grožđe kao sirovina za proizvodnju vina

Vino se proizvodi od grožđa koje pripada porodici *Ampelideae*, roda *Vitis*. Zbog svojih fizioloških, kemijskih, senzorskih i drugih svojstava koristi se za potrošnju u svježem neprerađenom stanju, ali i kao sirovina za proizvodnju vina, alkoholnih i bezalkoholnih pića te drugih proizvoda. Osnovni dijelovi grozda su peteljka i bobica. Bobica se sastoji od kožice, mesa i sjemenke (Moreno, Peinado, 2012.).

## 1.2. Crno vino

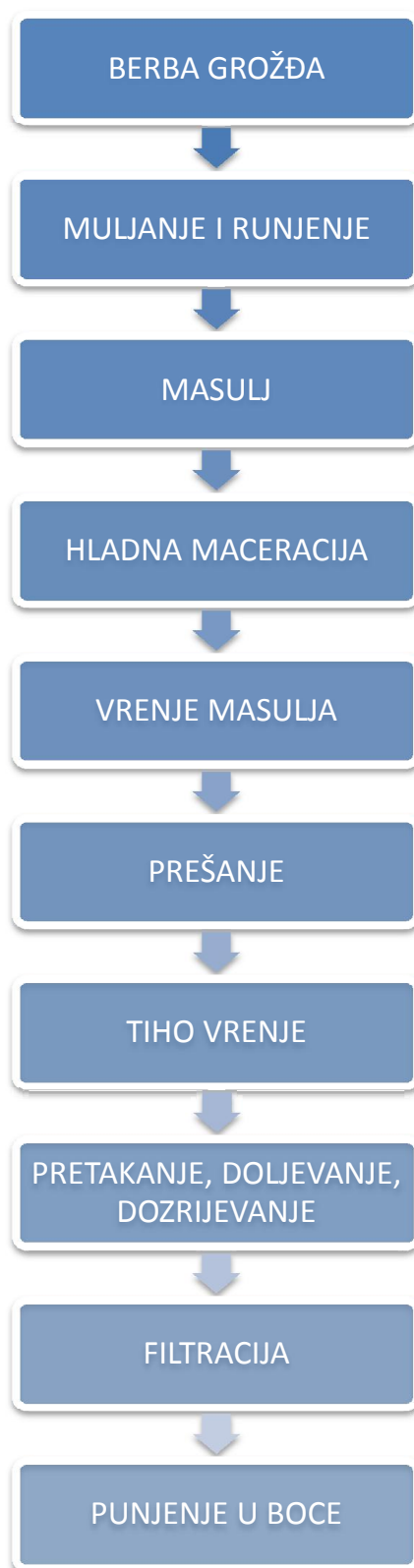
Vino je poljoprivredni prehrambeni proizvod, dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg i za preradu u vino pogodnoga grožđa. Vinogradarsko područje Republike Hrvatske dijeli se na dvije regije: kontinentalna i primorska Hrvatska (**Slika 1**). Kontinentalna Hrvatska dijeli se na sedam regija, kojoj pripada i Podunavlje, gdje se nalazi vinogorje Erdut (Zakon o vinu, 2003.).

Crno vino se proizvodi vrenjem masulja, odnosno procesom vinifikacije, prilikom čega se ekstrahira boja iz pokožice i optimalna količina tanina (**Slika 2**). Upravo o tome ovisi kvaliteta crnih vina. Ukoliko se ekstrahira prevelika količina tanina, dobije se trpkovo vino, što nije poželjno svojstvo. Parametri koji utječu na ekstrakciju boje iz kožice su: temperatura, sadržaj alkohola, vrijeme zadržavanja pod kljukom, tj. tropinom, sadržaj boje u rožđu, miješanje komine tijekom fermentacije, potapanje klobuka, umjereno sumporenje kljuka i prethodna maceracija kljuka. Vinifikacija se može provoditi na dva načina: otvorena fermentacija i zatvorena fermentacija sa potopljenom kominom. Boja se najintenzivnije ekstrahira u prvih 3-5 danavrenja nakon čega je završena ekstrakcija boje, a to znači prije završetka vrenja. Nakon tog perioda intenzivnije se povećava sadržaj tanina, pa ukoliko se masulj predugo ostavi na vrenju, u vino se otapa više tanina, zbog čega vino kasnije poprima trpak i opor okus. Zbog toga se nakon 3-5 dana vrenje masulja prekida i vrši se prešanje. U slučaju da se

masulj predugo ostavi na vrenju, neće se postići veća ekstrakcija boje, već baš obrnuto, boja će se izgubiti. Također, boja se više oksidira kisikom iz zraka (Pozderović, 2013.).



Slika 1 Vinogradarska područja Republike Hrvatske (web 1)



**Slika 2** Tehnološki postupak proizvodnje crnih vina (Pozderović, 2013.)

### **1.2.1. Utjecaj temperature maceracije na sadržaj fenolnih spojeva**

Temperatura je jedan od najvažnijih faktora kod klasične maceracije, kada se govori o ekstrakciji fenolnih spojeva. Povišenjem temperature, ekstrakcija fenolnih spojeva se znatno ubrzava. Usporedno, ispitivanje utjecaja temperature i vremena maceracije, može zaključeno je da kod kratkotrajne maceracije (4 dana) sadržaj antocijana i nijansa boje blago rastu, dok se intenzivnije povećava intenzitet boje, sadržaj proantocijanidina i ukupnih fenolnih spojeva. Maceracijom na temperaturi od 25 °C dobivaju se vina lijepo boje i izraženih voćnih nota, koja su namijenjena potrošnji dok su mlada. Na temperaturi maceracije od 28 °C dolazi do blagog gubitka voćne arome, što je povezano sa isparavanjem komponenata sa formiranim ugljikovim dioksidom. Ukoliko se maceracija provodi na višim temperaturama, ekstrakcija tanina je intenzivnija te se dobivaju vina prikladna dugotrajnom starenju. Maceracijom na temperaturi od 35 °C dobivaju se vina sa većim sadržajem fenolnih spojeva od vina koja su dobivena na nižim temperaturama. Kao rezultat, dobivena su vina sa visokim sadržajem ukupnih fenolnih spojeva, antocijana i intenziteta boja, ali visoke astringencije i loših senzorskih svojstava. Najbolji rezultat dobiva se postfermentativnom maceracijom na umjerenj temperaturi (30 °C) tijekom nekoliko dana (Moreno, Peinado, 2012.).

### **1.2.2. Utjecaj potapanja klobuka**

Miješanjem se masulj homogenizira čime se stvaraju uvjeti za ravnomjernu i potpuniju ekstrakciju fenolnih spojeva. Klobuk se potapa mehanički-potiskivanjem u otvorenim fermentorima. Vino se tijekom fermentacije može periodično potiskivati s donjnjeg dijela fermentora u gornji, pri čemu se moči klobuk ili vrši istakanje cjelokupne tekuće faze u fermentaciji sa donjnjeg dijela fermentora i vraćanje u gornji dio, pri čemu se klobuk potapa. Kvašenje i potapanje klobuka je vrlo važno zbog homogenizacije masulja, ne samo zbog rasporeda temperature i biomase kvasaca te aeracije, već i zbog homogenizacije ekstrahiranih sastojaka. Ovim postupkom se dobivaju vina izražene strukture, bez gorčine i biljnih tonova. Sadržaj antocijana raste do petog dana tradicionalnog postupka maceracije,

nakon čega počinje opadati. Ukoliko se maceracija provodi u rotacijskom fermentoru maksimalan sadržaj antocijana postignut je nakon 44 h maceracije, nakon čega je zabilježen blagi pad (Moreno, Peinado, 2012.).

### **1.3. Kemijski sastav grožđa i mošta**

Najznačajniji sastojci grožđa su šećeri, kiseline, tvari arome, tvari boje te druge organske i mineralne tvari. Na kemijski sastav moštava utječu različiti čimbenici prvenstveno sastav grožđa, zdravstveno stanje i dozrelost grožđa, klimatski uvjeti pojedinih godina, te način prerade. Neki od tih čimbenika su stalni (sorta, položaj, način uzgoja i sl.), dok su drugi nestalni (dozrelost, zdravstveno stanje, klimatske prilike). Na stalne čimbenike može se utjecati pravilnim izborom sorte, položaja, načina uzgoja i slično, no na varijabilne čimbenike, kao što su klimatske prilike, a s njima u vezi i dozrelost, vinogradari ne mogu utjecati. O kemijskom sastavu mošta u najvećoj mjeri ovisi kasnija kvaliteta vina (Moreno, Peinado, 2012.).

#### **1.3.1. Fenolni spojevi**

Fenolni spojevi su široka i složena grupa spojeva, posebno važni za svojstva i kakvoću crnih vina. Također su važni i za bijela vina, ali su prisutni u znatno nižim koncentracijama. Po broju hidroksilnih grupa dijele se na mono, di, tri i polifenole. U prirodi se vežu sa šećerima tvoreći glikozide. U mošt fenoli dolaze iz kožice, sjemenke i soka grožđa kao i peteljke (ovisno o načinu prerade grožđa). Količina ukupnih fenola u grožđu je veća nego u vinu. Tradicionalnim postupcima vinifikacije ekstrahira se najviše 60 % fenola od ukupno prisutnih u grožđu. Zahvaljujući bogatstvu polifenola vino je uvršteno u prehrambene proizvode učinkovitog antivirusnog i antibaktericidnog djelovanja.

U grožđu i moštu javljaju se dvije osnovne grupe polifenola: flavonoidi i neflavonoidi. Flavonoidi primarno potječu iz kožice, sjemenke i peteljke grožđa i toj skupini pripadaju: flavan-3-oli, flavonoli, antocijani i tanini. Flavonoli i antocijani uglavnom dolaze iz kožice, dok

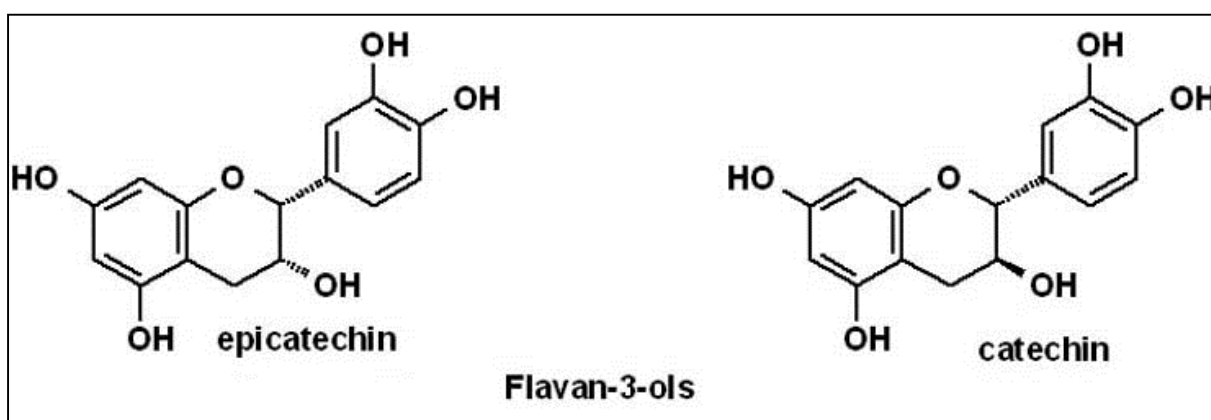
flavan -3- oli potječu iz sjemenke i peteljke. Neflavonoidni spojevi se nalaze u mesu bobice grožđa i tu spadaju: derivati hidroksicimetne kiseline, hidroksibenzojeve kiseline i stilbeni. Crno grožđe sadrži oko 5500 mg/L ukupnih fenola (izraženo kao galna kiselina), a najviše ih se nalazi u sjemenci (46 – 69 %), u kožici oko 50 %, u soku 5 % i u mesu bobice 1 %. Njihova koncentracija u grožđu značajno varira, što ovisi i kultivaru te klimatskim i agrotehničkim uvjetima. Sadržaj tanina i antocijana se povećava u razdoblju od šare do zrelosti. Povećanje sadržaja fenola vezano je za rast bobice, dok prezrelo i presušeno grožđe sadrži manje fenola. Kako grožđe dozrijeva, tako dolazi do polimerizacije fenola pri čemu nastaju po okusu mekši i manje trpki fenoli. Sastav fenolnih spojeva je važan faktor za određivanje vremena berbe crnog grožđa (Moreno, Peinado, 2012.).

#### **1.3.1.1. Flavonoidi**

Flavonoidi predstavljaju najrašireniju grupu prirodno složenih fenola. Struktura flavonoida temelji se na flavonoidnoj jezgri koja se sastoji od tri fenolna prstena (A, B i C prsten). Prsten A – benzenski prsten, kondenziran je s tročlanim alifatskim nizom koji zajedno s kisikom tvori šesteročlani prsten C, a na poziciji 2 prstena C nalazi se benzenski prsten B. Karakteristični su upravo za crna vina, sadrže 85 % ili više ukupnih polifenola. Flavonoidni fenoli nalaze se kao slobodni ili vezani s drugim flavonoidima, šećerima (glikozidi) ili neflavonoidima. Vezanje šećera na flavonoide povećava polarnost molekule što je potrebno za pohranjivanje tih spojeva u vakuolama biljnih stanica. Ima ih malo u soku, dosta u sjemenkama, kožici i peteljci grožđa. Kod crnih sorti grožđa antocijani (flavonoidi) grožđa nalaze se u kožici. Sjemenke sadrže katehin monomere, dimere i katehin polimere (Jakobek, 2007.; Moreno, Peinado, 2012.).

### 1.3.1.1.1. Flavan-3-oli

Osnovni flavan-3-oli su katehin, epikatehin (**Slika 3**) i leukoantocijani. Flavan-3-oli se u vino ekstrahiraju iz sjemenke, kožice i peteljke. Koncentracija katehina u moštu i vinu varira od 5-100 mg/l. U bijelim vinima, koja se proizvode kratkotrajnim kontaktom sa kožicom, katehini su najzastupljeniji flavonoidni fenoli. Oni su nositelji svojstva gorčine vina. Katehini daju vinu gorak okus i ne stvaraju glikozide, dok leukoantocijani daju vinu oporost i stvaraju glikozide (Moreno, Peinado, 2012.).



**Slika 3** Flavan-3-oli: epikatehin i katehin (web 2)

### 1.3.1.1.2. Flavonoli: kvercetin, kamferol i miricetin

Flavonoli kvercetin, kamferol i miricetin su flavonoidi pronađeni u mnogim biljnim vrstama u obliku glikozida. To su pigmenti žute boje koji određuju boju bijelih vina, dok su u crnim vinima maskirani antocijanima, odnosno crvenim pigmentima. Najviše se nalaze u kožici grožđa i brzo hidroliziraju. Glikozidi su trpkiji po okusu od aglikona. Najzastupljeniji od navedenih flavonola je kvercetin. Kamferol, kvercetin i njihovi derivati, prisutni su i u bijelom u crnom grožđu i vinu, dok su miricetin, izoramnetin i njihovi derivati pronađeni samo u crnom grožđu i crnim vinima. Glukoza je najzastupljeniji šećer na C-3 ugljikovom atomu kempferola, kvercetina, miricetina i izoramnetina. Flavonoli su izuzetno važni za kvalitetu crnih vina. Reakcijama kopigmentacije stabiliziraju flavilijum oblike antocijana u mladim

crvnim vinima. Vina proizvedena od grožđa sa debljom kožicom (npr. Cabernet sauvignon) sadrže znatno veće količine flavonola od vina dobivenih od grožđa sa tanjom kožicom (npr. Grenache). Na sadržaj flavonola značajno utječe osunčanost grožđa. Grožđe iste sorte vinove loze može sadržavati i do 10 puta više flavonola ako je bilo izloženo suncu, u odnosu na grožđe sa osjenčanih dijelova čokota (Moreno, Peinado, 2012.).

### 1.3.1.1.3. Antocijani

Antocijani predstavljaju najznačajniju i najrašireniju grupu prirodnih biljnih pigmenata, koji daju boju crnim sortama grožđa i crnom vinu. To su flavonoidni polifenoli koji u prirodi dolaze u obliku antocijanina, tj. glikozida pojedinih antocijanidina. U grožđu se najviše nalaze monoglikozidi. Glavni dio antocijanina su antocijanidini čiji konjugirani dvostruki vezovi su odgovorni za apsorpciju svjetla kod oko 500 nm zbog čega su odgovorni za širok spektar boja u biljkama i biljnim proizvodima, uključujući narančastu, crvenu, ljubičastu i plavu. Najznačajniji antocijanidini su: malvidin, delphinidin, pentunidin, peonidin i cijanidin. Šećeri koji su vezani na antocijanidine, pri čemu čine glikozide, su: monosaharidi (glukoza, ramanoza, galaktoza...) te disaharidi i trisaharidi (rutinoza, soforoza, glukorutinoza...) (**Slika 4**). Na antocijanin glikozil jedinicu esterski mogu biti vezane alifatske organske kiseline i aromatske fenolne kiseline. Najčešće alifatske kiseline su malonska, octena, maslačna, oksalna i sukcininska, dok najčešće fenolne kiseline, tj. njihovi derivati su hidroksicinaminska, ferulinska, kafeinska, sinapikinska i hidrogenbenzojeva (Pozderović, 2013.). Sadržaj antocijana u grožđu ovisi o vrsti grožđa, klimatskim faktorima, uvjetima uzgoja vinove loze, sastavu tla..., a povećava se zrenjem grožđa (Moreno, Peinado, 2012.).





Slika 4 Antocijanidin i antocijan (Moreno, Peinado, 2012.).

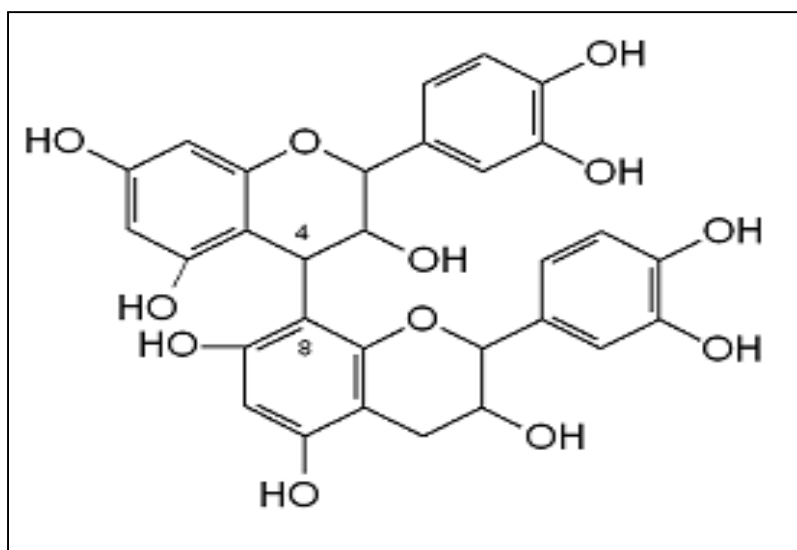
#### 1.3.1.1.4. Utjecaj različitih faktora na antocijane

Osim o sorti, sastav i intenzitet boje grožđa ovisi i o vanjskim faktorima: klima, položaj i tlo. Antocijani su vrlo nestabilne molekule, na čiju stabilnost utječu različiti faktori: temperatura, pH, svjetlost, kisik, prisutnost enzima te struktura i koncentracija antocijana. Koncentracija antocijana u vinu određena je sadržajem antocijana u grožđu i tehnološkim postupkom proizvodnje vina (Moreno, Peinado, 2012.).

#### 1.3.1.1.5. Tanini

Tanini su polifenolni spojevi složene strukture, u grožđu se nalaze kondenzirani tanini kao polimeri flavonoidnih i neflavonoidnih fenola, odnosno proantocijanidini (**Slika 5**). Uglavnom se nalaze u kožici, peteljci i sjemenkama te značajno utječu na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva vina, odnosno vinu daju gorčinu i trpkost. Osim što utječu na navedena svojstva, sudjeluju u reakcijama enzimskog i neenzimskog posmeđivanja u vinu. Podložni su oksidaciji s kisikom iz zraka pri čemu prelaze u visokomolekularne kondenzirane spojeve tamno crvene boje. Kondenzirani tanini, odnosno proantocijanidini se sastoje od flavan-3-olskih jedinica:

katehina i epikatehina. Imaju afinitet za proteine (afinitet se povećava povećanjem molekule polimera) i antioksidacijski učinak (Pozderović, 2013.).



Slika 5 Proantocijanidin (web 3)

### 1.3.1.2. Neflavonoidi

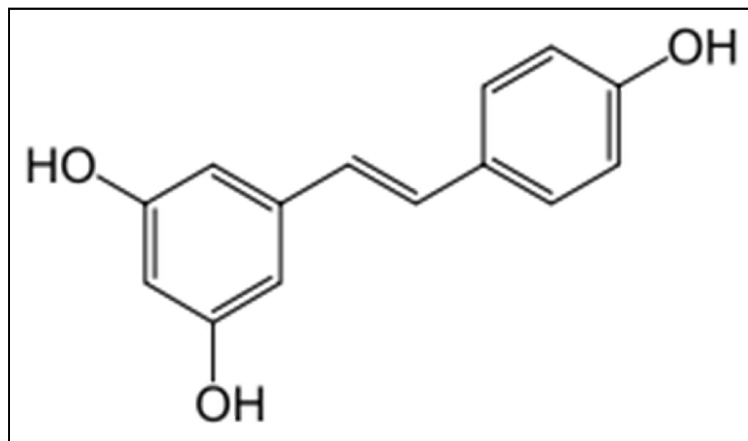
Neflavonoidni spojevi su jednostavnije strukture, ali njihovo podrijetlo u vinu je složeno. Osnovni neflavonoidi su:

1. derivati hidroksicimetne kiseline (*p* – kumarinska, ferulinska, kava kiselina...) i
2. derivati hidroksibenzojeve kiseline (galna, vanilinska, salicilna kiselina...).

Neflavonoidi se nalaze u mesu bobice grožđa i lako se ekstrahiraju muljanjem. U soku grožđa najveći dio fenola čine neflavonoidi. Tijekom dozrijevanja grožđa njihova koncentracija opada. U ukupnim fenolima mošta bijelih kultivara najviše su zastupljeni neflavonoidi i to derivati hidroksicimetne kiseline (kaftarna kiselina oko 100 mg/l), dok koncentracija galne kiseline iznosi od 1-5 mg/l. Neflavonoidi su u grožđu i moštu prisutni kao slobodne kiseline, etilni esteri, vezani sa tartaratima ili u obliku mješovitih estera sa glukozom i tartaratima. Većina neflavonoida prisutna je u niskim koncentracijama, no zajedno pridonose oporosti i trpkosti okusa (Moreno, Peinado, 2012.).

### 1.3.1.2.1. Stilbeni

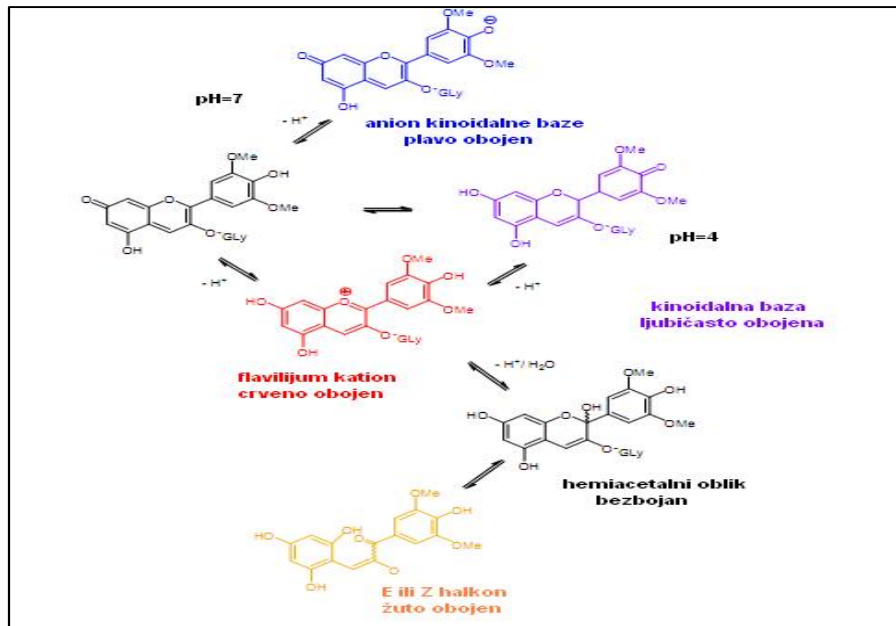
Od stilbena u grožđu i vinu najzastupljeniji je resveratrol, 3,5,4'-trihidroksistilben (**Slika 6**). Resveratrol nastaje u grožđu kao odgovor na infekciju izazvanu plijesnima ili pod utjecajem UV-zračenja. Pretpostavlja se da UV-B zračenje stimulira stvaranje enzima odgovornih za biosintezu stilbena, kako bi se bobice grožđa zaštitile od oštećenja izazvanih UV zrakama. U kožici, sjemenkama i peteljci nalaze se *trans*- i *cis*-resveratrol, pri čemu je dominantan *trans*-izomer, slobodan ili u obliku glikozida. Resveratrol se ekstrahira tijekom vinifikacije crnih vina (Moreno, Peinado, 2012.).



**Slika 6** 3,5,4'-trihidroksistilben (web 4)

## 1.4. Utjecaj pH na svojstva i boju antocijana

Svojstva antocijana uvjetovana su strukturom molekule i pH medija u kojem se nalaze. U kiseloj sredini (vinu) antocijani se nalaze u pet dinamički uravnoteženih molekulskih oblika: crveno obojeni flavilijum kationi, ljubičasto obojene kinoidalne baze, kinoidalne baze plave boje, slabo obojene karbinol baze i žuti halkoni (**Slika 7**). U normalnim uvjetima prisutni su flavilijum kationi i karbinol baze, dok se kinoidalne baze i halkoni javljaju pri višim temperaturama.



**Slika 7** Utjecaj pH na obojenost antocijana (Moreno, Peinado, 2012.)

Boja antocijana ovisi o pH medija. U kiselom mediju antocijani se nalaze u obliku kationa i imaju crvenu boju, dok porastom pH antocijani iz obojenog prelaze u bezbojni hidratizirani oblik. Omjer koncentracija pojedinih antocijana bitno utječe na stabilnost boje i njene nijanse. Plava nijansa se povećava s brojem slobodnih hidroksilnih skupina, dok se crvena nijansa povećava sa stupnjem metiliranja. U neoštećenim biljnim stanicama antocijani dolaze u obliku crveno obojenog antocijan kationa, dok u oštećenim stanicama mijenjaju strukturu i iz antocijan kationa prelaze u leuko bazu (pseudo bazu).

Jedna od najvažnijih karakteristika antocijana je što kisik u heterocikličkom prstenu ima pozitivan naboj. Zahvaljujući ovoj osobini antocijani se u kiseloj sredini ponašaju kao kationi i sa kiselinama stvaraju soli, dok se u alkalnoj sredini ponašaju kao anioni i sa bazama stvaraju soli (Moreno, Peinado, 2012.).

## 2.5. Boja crnih vina

Intenzitet crne boje vina prije svega ovisi o tome koliko će sebojenih tvari ekstrahirati iz kožice, ali i o tome koliko će se antocijana zadržati u vinu tijekom čuvanja. Slobodni antocijani nisu stabilni, pa je polimerizacija od presudne važnosti za kvalitetu i stabilnost boje. Osim reakcija kopigmentacije, stabilnost boje veoma ovisi o reakcijama kondenzacije sa flavan-3-olima i proantocijanidinima. Crna boja vina primarno ovisi o udjelu flavilijum kationa. Udio flavilijum kationa u velikoj mjeri ovisi o pH vrijednosti i količini slobodnog sumpor-dioksida u vinu. Niže pH vrijednosti usporavaju hidrolizu antocijana, porastom pH povećava se udio flavilijum kationa.

U ovisnosti o sorti vinove loze, sadržaj antocijana u mladim vinima iznosi od 100 mg/l (Pinot crni) do oko 1500 mg/l (Cabernet sauvignon), a nakon nekoliko godina čuvanja u boci ili bačvi, vina sadrže manje od 50 mg/l navedenih spojeva (Moreno, Peinado, 2012.).

## 2.6. Kopigmentacija antocijana

Antocijane karakterizira fenomen kopigmentacije, koji je odgovoran za potpuni vizualni doživljaj boje grožđa. Kopigment je molekula koja sama nema vidljive boje, ali kada se nađe u mediju antocijana ona intenzivira i stabilizira početnu boju antocijana. Najznačajniji mehanizmi kopigmentacije su formiranje intermolekularnih i intramolekularnih kompleksa. Međusobno povezivanje i stvaranje metalnih kompleksa su također mogući mehanizmi za stvaranje kopigmenata. Dokazano je da sve veze kopigmenta s antocijanom nakon razaranja biljne stanice pucaju, pa tako za razliku od grožđanog soka, otopina alkohola, a posebno vino, nije medij pogodan za opstanak kopigmentacije prije prisutne u grožđu. Nakon što u moštu nastane alkohol, boja se mijenja prema svijetlo crvenoj, zbog pucanja veza koje su bile odgovorne za kopigmentaciju boje u grožđu (Moreno, Peinado, 2012.).

## 2.7. Utjecaj fenolnih spojeva na zdravlje ljudi

Polifenoli su značajni zbog njihovog antioksidativnog djelovanja, odnosno oni u stanicama tijela sprječavaju opasne i neželjene reakcije kisika koje su odgovorne za cijeli niz bolesti. Takvim reakcijama kisika nastaju slobodni radikali koji uslijed reakcija izgube jedan elektron te ga uzimaju na nekom drugom mjestu i na taj način izazivaju lančane reakcije. Vino sadrži puno veću količinu polifenola, odnosno antioksidanasa u odnosu na drugo voće i sokove, što je jedan od razloga njegovog povoljnog utjecaja na zdravlje. Poznati je „Francuski paradoks“, odnosno kod Francuza je zabilježen mnogo manji stupanj oboljevanja od kardiovaskularnih bolesti bez obzira na prehranu (visok unos animalnih masti), upravo zbog redovitog, ali umjerenog konzumiranja crnog vina uz obrok (Moreno, Peinado, 2012.).

## 2.8. Sadržaj polifenola u crnim sortama grožđa

Sadržaj polifenola u grožđu ovisi o sljedećim čimbenicima: sorti, agroekološkim uvjetima, regiji i stupnju zrelosti. Crne sorte grožđa predstavljaju iznimno bogat izvor flavonoida. U sjemenci dolazi oko 60% polifenola, dok oko 30% potječe iz kožice grožđa. Crno grožđe prosječno sadrži oko 5500 mg/L ukupnih fenola (izraženo kao galna kiselina). Od ukupne količine fenola u bobici, u sjemenci se nalazi 46 – 69 %, u mesu bobice 1 %, u soku 5 %, a u kožici bobice se nalazi 50 % fenola.

Koncentracija fenola u grožđu značajno varira ovisno o kultivaru, klimatskim i agrotehničkim uvjetima. U razdoblju od šare do zrelosti povećava se sadržaj tanina i antocijana. Izuzimajući antocijane, povećanje fenola u grožđu vezano je za rast bobice. Prezrelo i presušeno grožđe ima manje fenola, uključujući i antocijane. Usporedno sa dozrijevanjem grožđa, dolazi do polimerizacije fenola, pri čemu nastaju po okusu mekši i manje trpki fenoli. Upravo je sastav fenolnih spojeva važan faktor za određivanje vremena berbe crnog grožđa (Moreno, Peinado, 2012.).

## **2.9. Sadržaj fenolnih spojeva u pojedinim dijelovima grozda**

### **2.9.1. Peteljka**

Peteljka je, pogotovo kod crnih sorti, bogata polifenolima. Ukoliko se tijekom prerade ona ne odvaja, ukupna količina polifenola u budućem vinu, osobito tanina, može biti povećana i do 25 %.

### **2.9.2. Sjemenka**

Sjemenka sadrži najviše tanina od svih dijelova grozda. Tanini su u sjemenki smješteni u vanjskom dijelu (taninska kutikula) i lako prelaze u vino tijekom maceracije.

### **2.9.3. Kožica**

Kožica je bogata polifenolima, naročito kod crnih sorti (duplo više). Sadrži i taninske spojeve, čija se količina može znatno smanjiti ukoliko dođe do pojave plijesni (*Botrytis cinerea* svojim enzimima razara taninske spojeve u kožici). Antocijani se u kožici akumuliraju tijekom zrenja, pa se s njima povećava i ukupni udio fenolnih spojeva u grožđu do faze pune zrelosti. Boja se počinje javljati u šari, a maksimum postiže u fazi pune zrelosti (Moreno, Peinado, 2012.).

### 3. EKSPRIMENTALNI DIO

#### 3.1. Zadatak

Zadatak rada bio je odrediti sadržaj antocijana, degradaciju antocijana, sadržaj polifenola i flavonoida te antioksidativnu aktivnost u crnim vinima iz kontinentalne Hrvatske, istočna Slavonija, vinogorje Erdut, sorte Merlot, Cabernet Sauvignon i Pinot crni.

#### 3.2. Materijali i metode

Uzorci crnih vina iz vinogorja Erdut nabavljeni su na tržištu.

##### 3.2.1. Uzorci vina koji su analizirani

**Tablica 1** Prikaz uzoraka vina koji su analizirani

Oznake uzorka	Sorta	Vinogorje	Godina berbe
1	Merlot	Erdut	2012.
2	Cabernet Sauvignon		
3	Pinot crni		
4	Merlot		2013.
5	Cabernet Sauvignon		
6	Pinot crni		

##### 3.2.2. Određivanje ukupnih polifenola

Koncentracija ukupnih fenola određena je Folin-Ciocalteu metodom, mjerenjem absorbance pri valnoj duljini od 765 nm (Ough, & Amerine, 1988.) Sadržaj polifenolnih spojeva je interpoliran pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline i izražen u g galne kiseline/kg uzorka.



### 3.2.3. Određivanje antocijana

Za određivanje antocijana primijenjena je pH-diferencijalna metoda. pH-diferencijalna metoda se zasniva na strukturnoj transformaciji kromofora antocijana u ovisnosti o promjeni pH. Antocijani podliježu reverzibilnoj strukturnoj transformaciji s promjenom pH koja se manifestira promjenom spektra absorpcije. pH-diferencijalna metoda za određivanje antocijana omogućava brzo i točno mjerenje ukupnih antocijana, bez obzira na prisutnost polimeriziranih, degradiranih pigmenta i drugih tvari koje bi mogle smetati. Antocijani su određivani metodom prema Giusti i Wrolstadu (2001.) s malom modifikacijom (Giusti i Wrolstad, 2001.). Otpipetirano je 0,2 mL ekstrakta uzorka u dvije kivete, u jednu je dodano 1 mL pufera pH 1, a u drugu 1 mL pufera pH 4,5. Nakon stajanja od 15 min uzorcima je pomoću spektrofotometra mjerena absorbanca pri valnim duljinama od 512 nm i 700 nm. Sadržaj antocijana je izračunat prema slijedećoj formuli:

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

gdje je:

A - absorbanca uzorka, a izračunava se prema izrazu:

$$A = (A_{508} - A_{700})_{\text{pH } 1} - (A_{508} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$$

M - 449,2

FR - faktor razrjeđenja

$\epsilon$  - molarna absorptivnost; 26 900

l - duljina kivete; 1 cm

(M i  $\epsilon$  su uzeti za dominantnu vrstu antocijanina odnosno za cijanidin-3-glukozida).

### 3.2.4. Određivanje degradacije antocijana

Degradacija antocijana odnosno smanjenje intenziteta crvene boje ( $A_{508}$ ) i povećanje posmeđivanja ( $A_{420}$ ) se izračunava prema formuli:

Gustoća boje kontrolnog uzorka (tretiranog vodom):

$$\text{Gustoća boje} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{508} - A_{700})] \times \text{FR}$$

Boja nastala polimerizacijom (uzorak tretiran bisulfitom):

$$\text{Boja nastala polimerizacijom} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{508} - A_{700}) \times \text{FR}]$$

FR – faktor razrjeđenja

$$\% \text{ boje nastale polimerizacijom} = \text{boja nastala polimerizacijom} / \text{gustoća boje} \times 100$$

### 3.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

#### ABTS metoda

U ABTS metodi prati se raspadanje radikala  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  koji nastaje oksidacijom 2, 2'-azinobis(3-etilbenzotiazilin-6-sulfonat) (ABTS) djelovanjem fenolnih tvari. U odsutstvu fenolnih tvari,  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  je relativno stabilan, ali brzo reagira u prisutstvu donora  $\text{H}^{\cdot}$  te prelazi u nebojeni oblik ABTS-a (Arnao i sur., 2001.).

Postupak: odpipetirano je 0,2 ml uzorka te dodano 3,2 ml otopine ABTS, dobro promiješa i smjesa se ostavi reagirati 1 h i 35 min u mraku. Nakon toga mjeri se absorbanca pri 734 nm. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz trolox kao standard. Za svaki uzorak provedena su dva mjerenja.

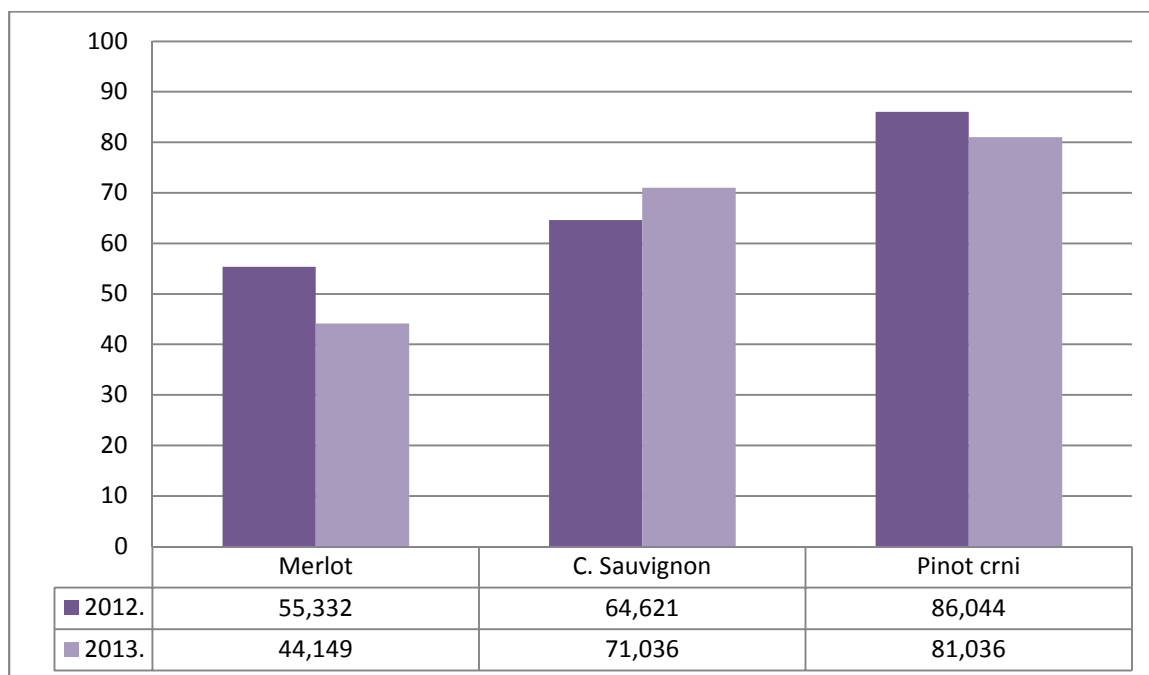
### 3.2.6. Određivanje ukupnih flavonoida

Za određivanje ukupnih flavonoida primjenjena je metoda prema Kim, Jeong i Lee (2003.) s modifikacijom (Blasa i sur., 2005.). Za kalibraciju su uzete različite koncentracije kvercetina (5-114  $\mu\text{g/ml}$ ), a linearnost je 0,9953 ( $R^2$ ). Ukratko, 1 ml otopine vina (1 mg/ml) je pomiješan s 0,3 ml  $\text{NaNO}_2$  (5%), a nakon 5 min je dodano 0,3 ml  $\text{AlCl}_3$  (10%). Uzorci vina su pomiješani i 6 min kasnije neutralizirani s 2 ml otopine  $\text{NaOH}$  (1M). Absorbanca je izmjerena za sve uzorke pri 510 nm, a kvantifikacija izvedena koristeći kalibracijsku krivulju. Rezultati su izraženi u mg ekvivalenata kvercetina (QE) / 100 g vina, kao srednja vrijednost triju ponavljanja.

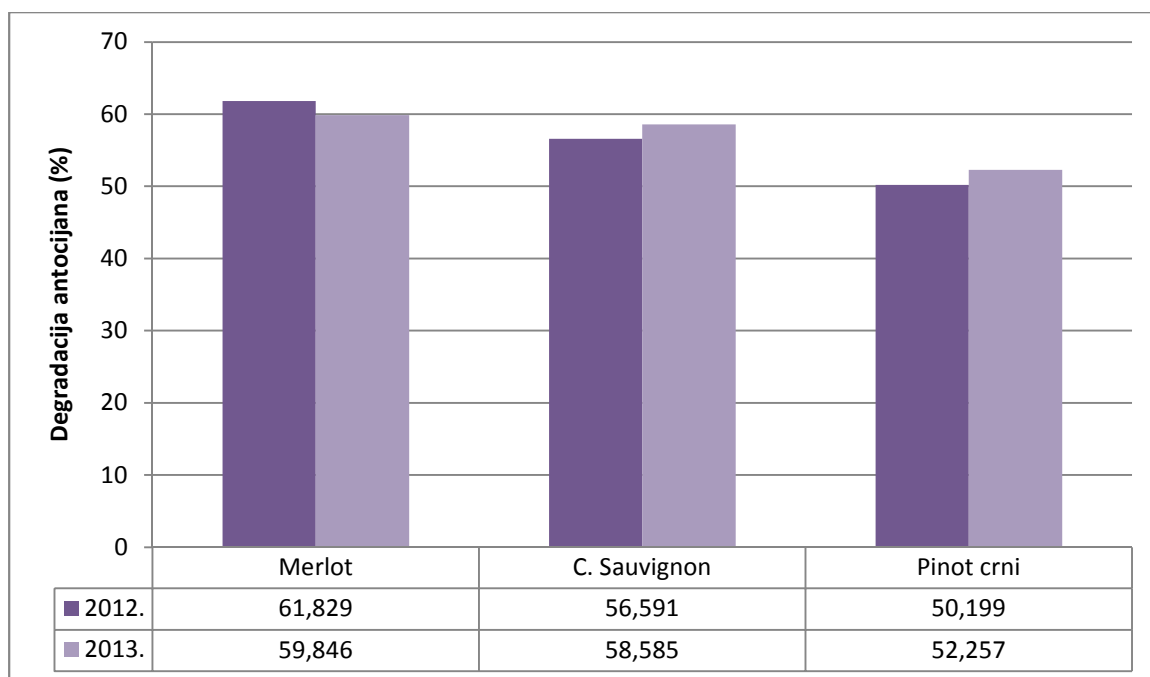
## 4. REZULTATI

**Tablica 2** Rezultati dobiveni u ispitivanim crnim vinima

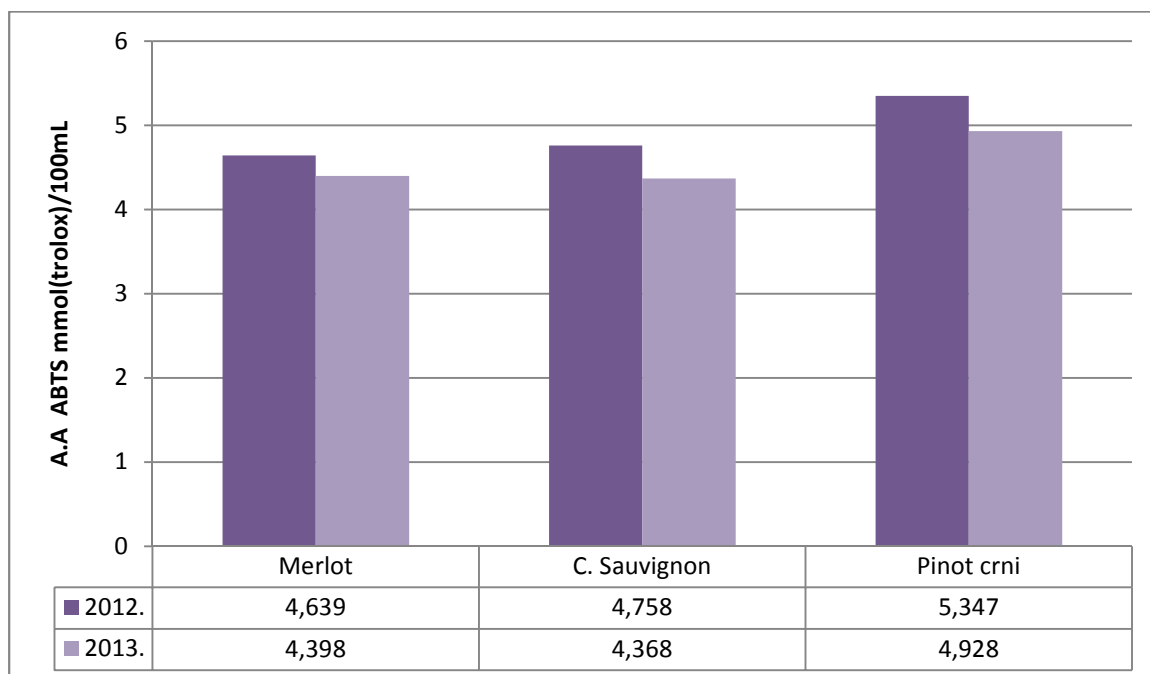
Oznake uzorka	Sorta	Vinogorje	Godina berbe	Degradacija antocijana (%)	Antocijani (mg/L)	A.A. (ABTS) mmol (trolox)/100 mL	Polifenoli (mh/L)	Flavonoidi (mg/L)
1	Merlot	Erdut	2012.	61,829	55,332	4,639	1374,3	1980
2	C. Sauvignon			56,591	64,621	4,758	1497	2285
3	Pinot crni			50,199	86,044	5,347	1633	2460,3
4	Merlot		2013.	59,846	44,149	4,398	1499	1978
5	C. Sauvignon			58,585	71,036	4,368	1486	2196,6
6	Pinot crni			52,257	81,036	4,928	1492	2407



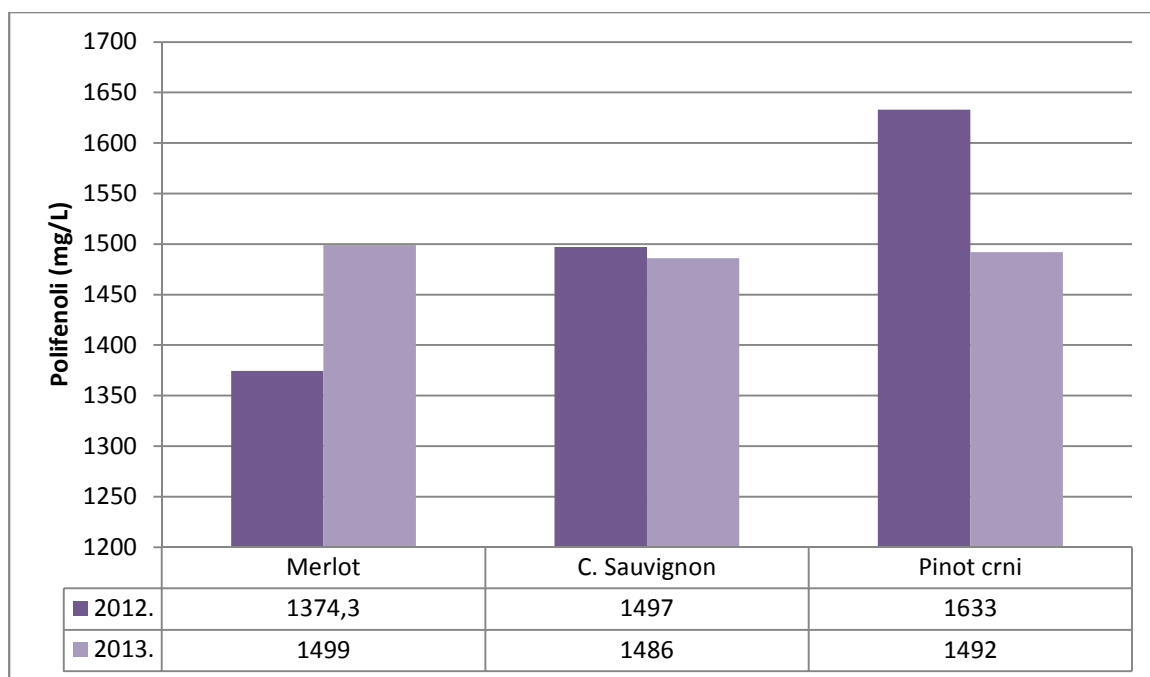
**Slika 8** Sadržaj antocijana u ispitivanim crnim vinima



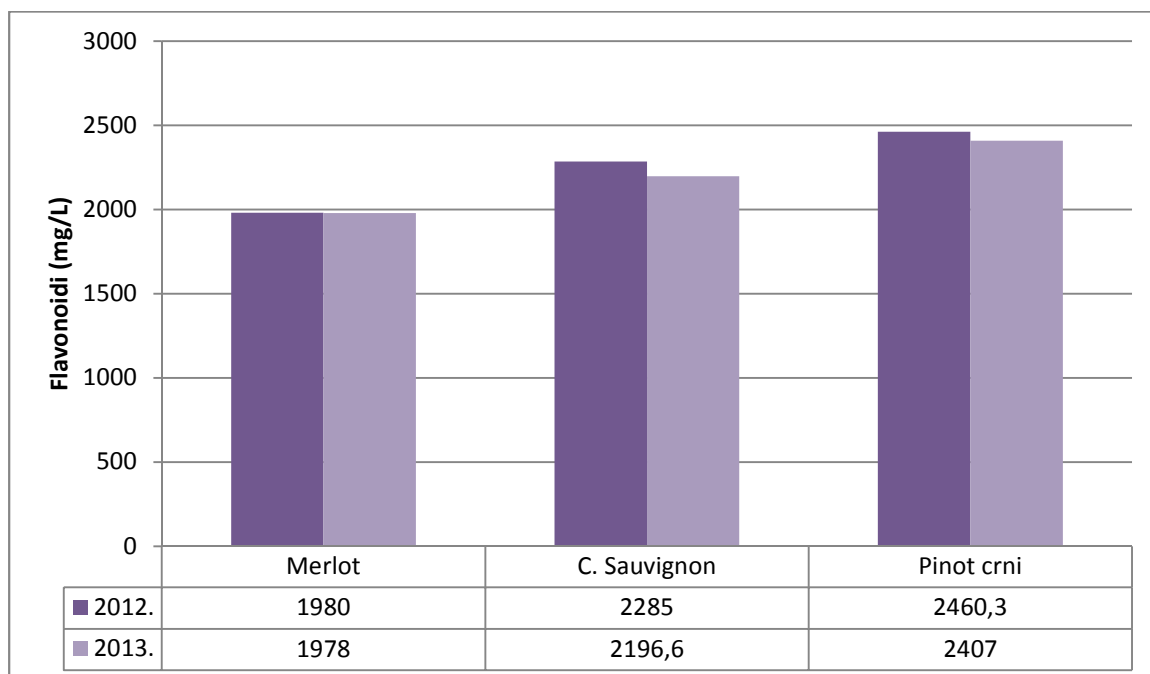
**Slika 9** Degradacija antocijana u ispitivanim crnim vinima



**Slika 10** Antioksidativna aktivnost u ispitivanim crnim vinima



**Slika 11** Sadržaj polifenola u ispitivanim crnim vinima



**Slika 12** Sadržaj flavonoida u ispitivanim crnim vinima

## 5. RASPRAVA

### Sadržaj antocijana

U ovom istraživanju utvrđeno je da se najviše antocijana nalazi u vinu sorte Pinot crne iz 2012. godine, nešto manje u istoj sorti iz 2013. godine, a najmanje u vinu Merlot iz 2013. godine.

### Degradacija antocijana

Najmanja degradacija antocijana određena je u vinu sorte Pinot crni, zatim Cabernet Sauvignon, a najveća degradacija je određena u crnom vinu sorte Merlot, što se podudara sa sadržajem antocijana u ispitivanim vinima i to možemo vidjeti uspoređujući grafički prikazane rezultate (**Slika 8** i **Slika 9**).

### Antioksidativna aktivnost

U ispitivanim uzorcima najveća antioksidativna aktivnost određena je u vinu Pinot crni u boje ispitivane godine, dok vina Merlot i Cabernet Sauvignon imaju podjednake vrijednosti u obje godine i kreću se u rasponu od 4,368 do 4,758 mmol(trolox)/100mL.

### Sadržaj polifenola

Najveći sadržaj polifenola određeni je u vinu Pinot crni iz 2012.godine, najmanji u vinu Merlot iz iste godine, dok je u ostalim uzorcima određena podjednaka vrijednost polifenola (1486 – 1499 mg/L).

### Sadržaj flavonoida

Sadržaj flavonoida u pojedinim uzorcima vina u obje godine ne razlikuje se značajno. Najmanji sadržaj flavonoida određeni je u vinu sorte Merlot, zatim u vinu Cabernet Sauvignon i nešto više u vinu Pinot crni.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata istraživanja i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

- Na sadržaj antocijana u ispitivanim crnim vinima utječe sorta, okolinski i klimatski uvjeti odnosno godina berbe;
- Sadržaj antocijana u ispitivanim vinima je veći što je određena degradacija antocijana manja i obrnuto;
- Odležavanjem vina povećava se degradacija antocijana i smanjuje sadržaj antocijana;
- U ispitivanim vinima je utvrđena značajna korelacija između sadržaja polifenola i flavonoida;
- Sadržaj polifenola i flavonoida u vinima ovisi o sorti, okolinskim i klimatskim uvjetima odnosno o godini berbe i karakteristikama vinogorja;
- Utvrđena je vrlo visoka korelacija između sadržaja polifenola i flavonoida u vinima i antioksidativne aktivnosti;
- Što je veći sadržaj polifenola i flavonoida u vinu, to je veća i antioksidativna aktivnost.



## 7. LITERATURA

Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M. (2001): The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food*. 73 (2), 239-244

Blasa, M., Candiracci, M., Accorsi, A., Piacentini, P. M., Albertini, M. C., & Piatti, E. (2005). Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry*, 97, 217- 222.

Giusti MM, Wrolstad RE: Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. R.E. Wrolstad, S.J. Schwartz (ur.). John Wiley & Sons, Inc. New York, NY. Pogl. 1.2.1 – 1.2.13., 2001.

Jakobek L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. Doktorski rad, PTF, Osijek, 2007.

Moreno J, Peinado R: *Enological chemistry*. Academic Press, Boston, 2012.

Ough CS, Amerine MA: *Phenolic Compounds. Methods for Analysis of Musts and Wines*. (2nd ed.). New York: John Wiley & Sons Inc., str. 196-221, 1988.

Pozderović A: *Osnove tehnologije vina*, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2013.

Zagorščak, M: Utjecaj vinogorja i sorte na sadržaj polifenola i antocijana crnih vina, Diplomski rad, PTF, Osijek, 2011.

web 1: Baranja.hr: Istok Hrvatske imat će priličnu štetu, 2013.

<http://baranja.hr/2013/02/strucnjaci-istok-hrvatske-imat-ce-prilicnu-stetu/> (14.08.2015.)

Web 2: Hagerman A.E. i sur.: Antioxidant activity of tannins and tannin-protein complexes: Assesment in vitro and in vivo, 2002.

<http://chemistry.muohio.edu/hagerman/index.php/pubsandpres/publications/138-riedl-book-2002> (20.08.2015.)

Web 3: Wikipedia: B type proanthocyanidin, 2015.

[http://www.wikiwand.com/en/B\\_type\\_proanthocyanidin](http://www.wikiwand.com/en/B_type_proanthocyanidin) (21.8.2015.)

Web 4: Wikipedija: Resveratrol, 2014. <https://sh.wikipedia.org/wiki/Resveratrol> (21.8.2015.)