

# Utjecaj vinske posude na polifenolni sastav i aromu vina Merlot kutjevačkog vinogorja

---

**Kegalj, Barbara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:109:022582>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-22**

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

Barbara Kegalj

**UTJECAJ VINSKE POSUDE NA POLIFENOLNI SASTAV I  
AROMU VINA MERLOT KUTJEVAČKOG VINOGORJA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, svibanj, 2023.

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

**Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo****Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Tehnologija vina**Tema rada** je prihvaćena na VIII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 27. svibnja 2022.**Mentor:** prof. dr. sc. *Anita Pichler***Pomoć pri izradi:** *Ivana Ivić, dr.sc.***Utjecaj vinske posude na polifenolni sastav i aromu vina Merlot kutjevačkog vinogorja***Barbara Kegalj, 0113141660***Sažetak:**

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj vinskih posuda na polifenolni sastav Merlot vina, te njegovu aromu. Uzorci vina čuvani su u sedam različitih posuda tijekom 12 mjeseci, a na kraju su uzorci analizirani, te su praćene promjene koncentracije polifenolnih spojeva i arome. Polifenolni spojevi, antocijani i antioksidacijska aktivnost određeni su spektrofotometrijski, dok je aromatski profil identificiran plinskom kromatografijom i mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi. Većina elemenata u tragovima najvišu koncentraciju je postigla u inoks posudama, a najmanju u hrastovim posudama jakog paljenja. Parametar crvenila i zasićenosti boje vina u najvišoj koncentraciji postignut u bačvi srednjeg paljenja ukazujući da je to najprikladnija posuda za čuvanje Merlot vina s obzirom na boju. Iz rezultata je vidljivo da je većina spojeva arome vina postigla najviše koncentracije pri visokom paljenju vinskih posuda.

**Ključne riječi:** vino, polifenoli, Merlot, hrastove bačve, inoks**Rad sadrži:** 52 stranica  
10 slika  
4 tablica  
0 priloga  
41 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

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

**Datum obrane:** 12. svibnja 2023.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

### Graduate program Food Engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Wine technology

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VIII held on May 27, 2022

**Mentor:** *Anita Pichler*, PhD, prof.

**Technical assistance:** *Ivana Ivić*, PhD

### **The Influence of Wine Vessel on the Polyphenolic Composition and Aroma of Merlot Wine from Kutjevo Vineyards**

*Barbara Kegalj*, 0113141660

#### **Summary:**

The aim of this work was to determine the influence of wine containers on the polyphenol composition of Merlot wine and its aroma. The wine samples are stored in seven different containers for 12 months, at the end the samples were analyzed, and changes in the concentration of polyphenolic compounds and aromas were monitored. Polyphenolic compounds, anthocyanins and antioxidant activity were determined spectrophotometrically, while the aromatic profile was identified by gas chromatography and solid-phase microextraction. Most of the trace elements achieved the highest concentration in stainless steel containers, and the lowest in oak barrel with heavy toasting. The highest values of red color parameter and saturation of the wine color were achieved in a barrel of medium toasting, indicating that it is the most suitable vessel for keeping Merlot wine in terms of color. It is evident from the results that most aroma compounds reached the highest concentrations in the wine barrels with heavy toasting.

**Key words:** wine, polyphenols, Merlot, oak barrels, inox

**Thesis contains:** 52 pages  
10 figures  
4 tables  
0 supplements  
41 references

**Original in:** Croatian

#### **Defense committee:**

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

**Defense date:** May 12, 2023

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

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Aniti Pichler, na velikoj pomoći, uloženom trudu i radu, te savjetima pri izradi diplomskog rada.

Posebno hvala mojim roditeljima, sestri Karli i najboljoj prijateljici Mariji što su bili uz mene kroz sve godine studiranja, kako u lijepim tako i teškim trenucima. Hvala vam što ste vjerovali u mene onda kad ni sama nisam.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. VINOVA LOZA</b> .....	<b>4</b>
2.1.1. Morfologija vinove loze .....	4
<b>2.2. PROIZVODNJA CRNIH VINA</b> .....	<b>6</b>
<b>2.3. MERLOT</b> .....	<b>7</b>
<b>2.4. KEMIJSKI SASTAV VINA</b> .....	<b>9</b>
2.4.1. Alkohol.....	9
2.4.2. Kiseline.....	10
2.4.3. Ugljikohidrati .....	11
2.4.4. Esteri .....	12
2.4.5. Aldehidi i ketoni.....	12
2.4.6. Terpeni.....	13
2.4.7. Elementi u tragovima .....	13
2.4.8. Polifenolni spojevi .....	14
2.4.9. Antioksidacijska aktivnost .....	18
2.4.10. Aroma vina.....	19
<b>2.6. PLINSKA KROMATOGRAFIJA</b> .....	<b>21</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2. MATERIJALI</b> .....	<b>24</b>
3.2.1. Merlot vino .....	24
3.2.2. Kemikalije .....	24
<b>3.3. METODE</b> .....	<b>25</b>
3.3.1. Određivanje elemenata u tragovima.....	25
3.3.2. Određivanje aromatskog profila.....	26
3.3.3. Određivanje ukupnih polifenola.....	28
3.3.4. Određivanje ukupnih flavonoida .....	28
3.3.5. Određivanje monomernih antocijana .....	29
3.3.6. Određivanje polimerne boje.....	29
3.3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti .....	30
3.3.8. Određivanje boje u CIELab sustavu .....	31
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>33</b>
<b>4.1. UTJECAJ RAZLIČITIH VINSKIH POSUDA NA ELEMENTE U TRAGOVIMA</b> .....	<b>41</b>
<b>4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH VINSKIH POSUDA NA BOJU VINA</b> .....	<b>42</b>
<b>4.3. UTJECAJ RAZLIČITIH VINSKIH POSUDA NA SASTAV FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKU</b> <b>AKTIVNOST</b> .....	<b>43</b>
<b>4.4. UTJECAJ RAZLIČITIH VINSKIH POSUDA NA AROMATSKI PROFIL VINA</b> .....	<b>44</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>47</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>49</b>

## **1. UVOD**

Vino je alkoholno piće nastalo fermentacijom mošta ili masulja. Kemijski sastav vina čine voda, alkoholi, kiseline, šećeri, viši alkoholi, hlapivi aromatski spojevi, bioaktivne komponente i mineralne tvari. Kvaliteta vina je usko povezana sa sortom i sastavom grožđa. Može se klasificirati na crno, bijelo i rose vino ovisno o boji, slatkoći, udjelu alkohola i ugljičnog dioksida te procesu fermentacije i sazrijevanja. Crna vina nastaju kao produkt fermentacije mošta u prisutnosti dijelova bobice (kožica i sjemenka). Sadrže 10 puta više fenolnih spojeva u usporedbi s bijelim vinima (Markoski i sur., 2016).

Glavni spojevi koji se ekstrahiraju iz grožđa u procesu proizvodnje vina su polifenolni spojevi. Nastaju drobljenjem grožđa, a njihova koncentracija se povećava postupkom maceracije. U crnim vinima prisutni su u koncentraciji između 2000 i 6000 mg/L. Najzastupljeniji u crnim vinima su: flavanoli, antocijani i resveratrol. Katehin i epikatehin daju trpkost i gorčinu crnim vinima, te čine i do 60% ukupnih fenolnih spojeva. S druge strane, za crvenu boju vina odgovorni su antocijani koji se ekstrahiraju iz kožice u procesu proizvodnje vina. Nadalje, u ljusci i sjemenkama prisutan je resveratrol, funkcionalni spoj crnog vina čija koncentracija je nešto niža od ostalih polifenolnih spojeva (Markoski i sur., 2016).

Merlot sorta grožđa je druga najrasprostranjenija sorta vinove loze u svijetu. Uspijeva na svježim, toplim i suhim površinama. Ova sorta otporna je na smrzavanje te gljivična oboljenja (Kopić, 2017). Vino sorte Merlot poznato je po notama crvenog bobičastog voća, trešanja, ribizla i šljiva. Potječe iz pokrajine Bordeaux, a proizvodi se i u Kaliforniji. Najprikladnija temperatura za čuvanje ove sorte vina je 12,7 °C (Fazinić i Benčić, 1998).

Cilj ovog rada bio je odrediti utjecaj vinskih posuda na polifenolni sastav Merlot vina, te njegovu aromu. Uzorci vina čuvani su u sedam različitih posuda tijekom 12 mjeseci, a na kraju su uzorci analizirani, te su praćene promjene koncentracije polifenolnih spojeva i arome. Polifenolni spojevi, antocijani i antioksidacijska aktivnost određeni su spektrofotometrijski, dok je aromatski profil identificiran plinskom kromatografijom i mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi.



## **2. TEORIJSKI DIO**

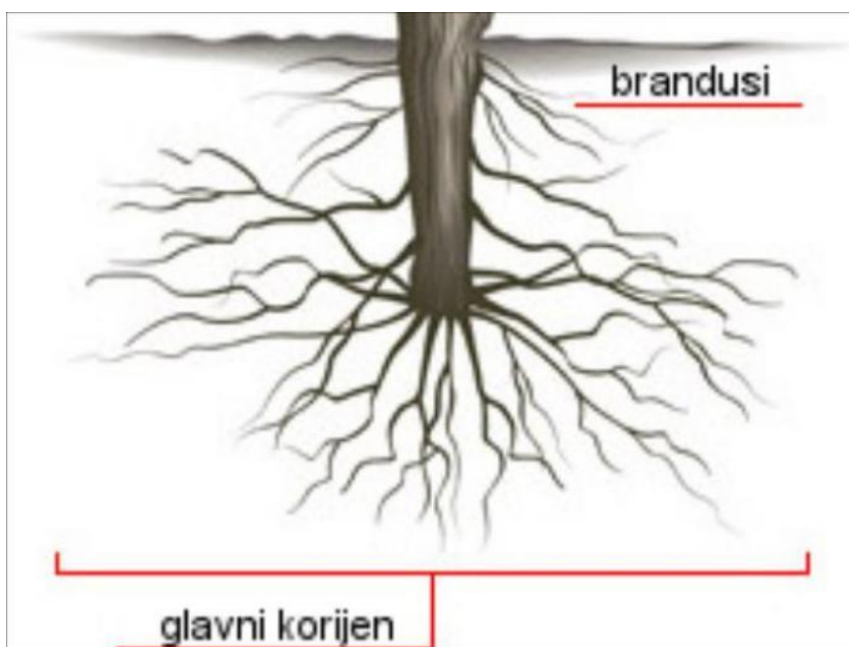
## 2.1. VINOVA LOZA

Vinova loza jedna je od najvažnijih voćnih kultura u svijetu. Održivost sektora, ovisi o velikom broju čimbenika kao što su: fluktuacije u godišnjim berbama, uvjeti okoliša, bolesti, štetnici i uzgojne prakse. Reproductivni razvoj vinove loze odvija se u dva vegetativna ciklusa. Započinje formiranjem cvata u prvoj godini, slijedi diferencijacija cvjetova, zatim razvoj grozdova te fiziološko sazrijevanja bobica i sjemenki sljedeće godine. Ovisno o plodnosti pupova, možemo znati potencijalni prinos za sljedeću sezonu. Sama plodnost ovisi o vrsti pupa i položaju te veličini cvjetova i broju cvjetova po pupu. Pupaljak postaje plodan u trenutku kada ima barem jedan primordium cvat, a neplodan kada nema primordium cvatova. Baš iz tog razloga potrebno je izvršiti kompletan pregled morfologije i fiziologije pupova (Maletić i sur., 2008).

### 2.1.1. Morfologija vinove loze

Zasebna biljka vinove loze naziva se čokot, trs ili panj. Razlikujemo vegetativne i generativne organe, pri čemu vegetativni organi apsorbiraju vodu i hranjive tvari te ih skladište, a generativni služe za razmnožavanje. Korijen je vegetativni organ koji utječe na stabilnost čokota, opskrbljuje nadzemne dijelove vodom i hranjivim tvarima i služi kao spremište hranjivih tvari. Razlikujemo površinsko korijenje na koje suša i niže temperature djeluju nepovoljno te se nalazi samo 5 – 10 cm ispod razine tla, srednje koje je znatno deblje i duže i glavno koje prodiro iznimno duboko u tlo. Najviše se razvija na razinama od 30 – 70 cm u proljeće i jesen. Stablo je također vegetativni organ koji se razvija iz zimskih pupova, sadrži krakove i ogranke te mladice i lišće. Hranjive tvari i voda protječu od korijena do lista i natrag uz pomoć provodnih snopova. Visina ovisi o uzgojnom obliku, a debljina o podlozi te uvjetima i načinu uzgoja. Ovisno o dijelu pupa iz kojeg se razvijaju, razlikujemo rodne mladice s grozdovima i nerodne koje ne sadrže grozdove. Sastoje se od internodija koje imaju na sebi list, zimske i ljetne pupove, a u slučaju da su rodne i grozd. U početku vegetacije, zelene su boje i sporo se razvijaju zbog vanjskih faktora kao što su voda, temperature i podloga. Tijekom cvatnje je rast također usporen, zatim se povećava. Od pupova razlikujemo ljetne, zimske i spavajuće. Ljetne pupove možemo prepoznati zato što su tanji i svjetliji od glavne mladice, a ovisi o vlažnosti, kultivaru i dovodu hranjiva. Zimski pupovi kao zaštitu od vanjskih čimbenika sadrže dva lista prekrivena smolom te ih možemo prepoznati po stožastom obliku. Spavajući pupovi se ne aktiviraju sve dok se ne stvore povoljni uvjeti za to, kao što je veći dovod hranjiva.

Listovi sadrže peteljke i plojke, a plojka lice i naličje. Mogu biti mali, srednje dugi i veliki s obzirom na dužinu plojke. Dlačice različitih veličina i gustoće prekrivaju naličje lista. Listovi sudjeluju u procesu fotosinteze, disanja i transpiracije te rastu kroz tri faze od čega najviše u drugoj fazi. Cvat je generativni organ koji se sastoji od skupine cvjetova skupljenih u grozd. Na svakoj mladici se većinom nalaze dva cvata, no može ih biti i do pet. Svaki pojedini cvat uglavnom sadrži između 100 i 1500 cvjetova. Cvjetnu ložu čini peteljka s cvjetovima koji su najčešće dvospolni, sitni i pravilni te se sastoje od: čaške, vjenčića, prašnika, žlijezde nektarije i tučka. Vinova loza kao biljka penjačica ima vitice koje se nalaze nasuprot listovima i spiralno se uviju oko žice. Grozd je građen isto kao i cvat i oblikom može biti: valjkasti, stožasti, valjkasto-stožasti, krilati i nepravilni. S obzirom na veličinu razlikujemo: mali, srednje veliki, veliki i vrlo veliki, a obzirom na zbijenost: vrlo zbijeni, zbijeni, rastresiti i vrlo rastresiti. Bobica je također generativni organ i razvija se nakon oplodnje. Dijelovi bobice su: kožica, meso i sjemenka. Broj sjemenki u bobici se razlikuje ovisno o tome hoće li se zametci oploditi ili ne. Ima oblik kruške i sastoji se od kljuna i tijela. Bobice rastu po završetku oplodnje sve do fiziološke zrelosti (Robinson i sur., 2012; Mirošević i Karoglan-Kontić, 2008)



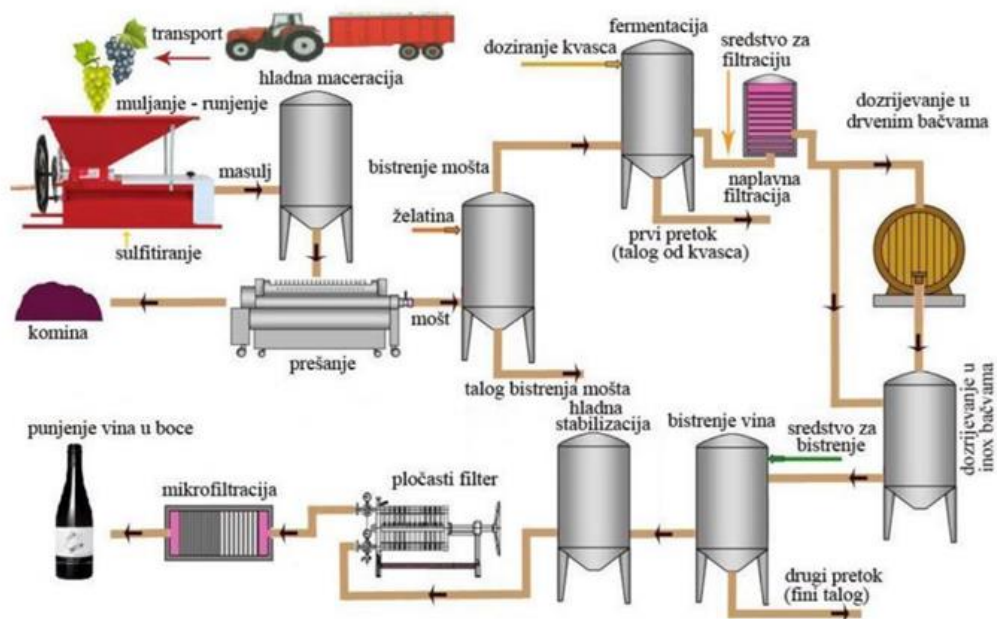
**Slika 1** Korijen vinove loze (Web 1)

## 2.2. PROIZVODNJA CRNIH VINA

Proizvodnja crnih vina ovisi o karakteristikama vina kao npr. sorta grožđa, boja, okus, i potencijal starenja. Jedna od važnijih karakteristika za proizvodnju vina je i sazrijevanje vina. Obično se tijekom sazrijevanja nakupljaju šećeri, titracijska kiselost opada, pH raste, a fenolni spojevi se povećavaju i dolazi do stvaranja izrazitih komponenti sorte arome. Bilo bi vrlo poželjno da svi ti parametri budu u idealnoj ravnoteži. Treba napomenuti da za proizvodnju crnog vina, samo pridržavanje ovih kriterija prilikom berbe nije dovoljno. Sastojci opne poput pigmenata, tanina i tvari arome snažno utječu na crvenu boju i aromu vina te njihovu razinu također treba procijeniti pri donošenju odluka o berbi (Iowa State University, 2016).

Proces proizvodnje vina (**Slika 2**) podrazumijeva procese: muljanja, maceracije masulja, sumporenja, dodavanja selekcioniranih kvasaca, alkoholne fermentacije masulja, prešanja masulja i otakanja mošta, završne fermentacije, eventualno malolaktičke fermentacije te otakanja vina s taloga, bistrenja i odležavanja. Prilikom muljanja, potrebno je izbjeći pretjeranu maceraciju kožice i lomljenje sjemenki. Pulpa dobivena gnječenjem, sjemenke i kožica, čine masulj koji se prenosi u posudu i sumpori s 30 mg/L slobodnog SO<sub>2</sub> u svrhu sprječavanja razvoja neželjenih mikroba. Kako bi se stvorio bolji kontakt kožice i soka, masulj se hladi na 15 do 20 °C, te se na taj način usporava fermentacija dodatkom autohtonog kvasca. Potiče se ekstrakcija pigmenata i drugih fenolnih spojeva iz kožice. U usporedbi s bijelim vinima, crna se vina proizvode s nižim stupnjem kiselosti. Općenito titrabilna kiselost u rasponu od 6,5 do 7,5 g/L i pH vrijednost od 3,4 do 3,6 je poželjna. Ako grožđe ima nizak udio kiseline (npr. manji od 5 g/L), tada kiselost treba povisiti dodatkom vinske kiseline. Ponekad crno grožđe pri berbi sadrži visoke razine kiseline (>9 g/L). Za proizvodnju dobro uravnoteženih vina od ovog grožđa, može biti poželjno smanjenje razine kiseline. Nadalje, masulj se podvrgava fermentaciji. Fermentacija se provodi u otvorenim posudama, međutim, nekad se koriste zatvorene posude kako bi se spriječile vinske mušice. Postupak se odvija u prozračenom prostoru te je potrebno ukloniti CO<sub>2</sub> koji nastaje fermentacijom. Povećana temperatura ubrzava fermentaciju, kao i ekstrakciju boje i fenolnih spojeva. Ovisno o vinu, nakon postignute optimalne količine tanina, boje i okusa, provodi se prešanje masulja. Sok ili mošt se ocijedi ili ispumpa te se stavlja u posude i ostavlja na završnu fermentaciju ili malolaktičku fermentaciju. U mladom vinu mogu biti prisutne čestice kao što su kalijev bitartarat, koloidni spojevi, kvasci, bakterije i sl. U svrhu uklanjanja tih čestica, vino se podvrgava procesima bistrenja i filtracije. Pretakanje se odvija 3

do 4 puta godišnje te je nakon svakog potrebno dodati odgovarajuću količinu slobodnog SO<sub>2</sub> (Iowa State University, 2016).



Slika 2 Shema proizvodnje crnih vina

### 2.3. MERLOT

Listovi sorte Merlot su uglavnom duguljasti, srednje veličine. Lice lista zelene je boje, dok je naličje zeleno ljubičasto. Grozd je valjkastog oblika, srednje velik, s okruglim nejednakim bobicama tamne boje, a peteljka duga i crvena. Sok dobiven od ove sorte grožđa, slatkastog je ukusa i crvene boje, a udio alkohola osrednji. Kožica je dosta izdržljiva s manje intenzivnom bojom od Cabernet Sauvignon sorte. Također sadrži manji udio tanina. Cvijet je dvospolan. Prilikom cvatnje, ova sorta je poprilično osjetljiva i manje otporna na peronosporu i trulež, baš zbog debljine kože grožđa. Broj sjemenki ovisi o broju oplodjenih sjemenih zametaka. Svaka plodnica tučka sadrži 4 sjemenka zametka (Robinson i sur., 2012; Mirošević i Karoglan-Kontić, 2008).



**Slika 3** Merlot grožđe (Web 2)

Merlot je vino poznato po notama crvenog i suhog bobičastog voća, ribiza, trešanja i šljiva. Također, mogu biti prisutne naznake suhog bilja poput kadulje, a ukoliko je vino odležalo u novom hrastu ili postotku novog hrasta, mogu se pronaći i arome i okusi nalik čokoladi i vaniliji. Najčešće mjesto proizvodnje su Bordeaux i Kalifornija. Nešto poznatiji merlot proizvodi se u dolini Napa i okrugu Sonoma. Osim gore navedenih područja, Toskana je također izvor merlota svjetske klase kao što su: Massetta, Ornellaije, Antinorijevog Il Bruciata i Messorija iz Le Macchiolea. Najprikladnija temperatura Merlota ukoliko se čuva u podrumima je 12,7 °C te je najbolji za konzumaciju oko 20 minuta nakon uklanjanja iz podruma ili hladnjaka (Fazinić i Benčić, 1998).

## 2.4. KEMIJSKI SASTAV VINA

### 2.4.1. Alkohol

Alkoholi su skupina organskih spojeva s jednom ili više hidroksilnih skupina u molekuli. Prema toj osnovi možemo ih podijeliti na monohidroksilne alkohole ili monoalkohole. S obzirom na atom ugljika na koji je vezana OH skupina, dijelimo ih na primarne, sekundarne i tercijarne alkohole. Poslije vode, najvažniji sastojak vina je etanol koji nastaje alkoholnom fermentacijom, metabolizmom kvasca. Osim etanola, nastaje i ugljični dioksid koji hlapi, a mali dio se otapa u vinu. Prisutnost etanola dovodi do promjene fizikalnih svojstava vode, viskozitet se povećanjem udjela etanola smanjuje, a topivost povećava. Obzirom na tu promjenu, vino se smatralo najboljim prirodnim agensom za dobivanje biljnih ekstrakata u svrhu proizvodnje medicinskih pripravaka. Postotak etanola u suhim vinima kreće se u rasponu od 12,0 do 14,0 vol.%. Tijekom fermentacije može doći do promjene etanola sudjelovanjem u nekim kemijskim reakcijama kao što su esterifikacija, oksidacija i dr. Miješanjem s vodom, može doći do nastanka vodikovih veza između vode i alkohola pri čemu dolazi do kontrakcije volumena. To se postiže povećanjem energetske vrijednosti vina. Okus etanola opisan je kao gorko-sladak iako se svojstva razlikuju ovisno o njegovom sadržaju (Jordão i sur., 2015).



**Slika 3** Reakcija glikolize, alkoholnog i mliječnog vrenja (Web 3)

Metilni alkohol se može u pronaći u različitim koncentracijama u vinu, ovisno o sadržaju pektinskih tvari, količini pektolitičkih enzima, maceraciji, termičkoj obradi i dr. Vina hibridnih grožđa sadrže veću količinu metilnih alkohola, crna vina sadrže oko 150 mg/L, a bijela 40 do 100 mg/L. Proizvodnja etanola odvija se tijekom alkoholne fermentacije, hidrolizom pektina, pomoću pektinaza prisutnih u voću. Kada mošt fermentira na kožici grožđa, proizvode se najviše koncentracije metanola te ga iz tog razloga ima više u crnim vinima. Dimetilkarbonat sredstvo je koje se koristi za sterilizaciju prije punjenja u boce. Također, može se koristiti za stabilizaciju proizvoda te se njegovom razgradnjom u vinu proizvodi ugljični dioksid, ostavljajući metanol pri vrlo niskim koncentracijama koje nisu štetne za zdravlje (Hodson i sur., 2017).

Viši alkoholi, kao i metanol nastaju metabolizmom kvasca zbog različitih faktora kao što su: sadržaj nitratnih tvari, sadržaj ugljikohidrata, vrsta i soj kvasca te uvjeti fermentacije. Jedan od najvažnijih sastojaka vina je alkohol glicerol koji utječe na ekstrakt vina, a ovisi o: sadržaju ugljikohidrata u moštu, vrsti kvasca iz vrenja, stupnju sumporenja mošta te uvjetima i trajanju vrenja. Uobičajene vrijednosti su između 5 i 15 g/L (Pietruszka i sur., 2010).

#### 2.4.2. Kiseline

Organske kiseline znatno utječu na sastav, stabilnost i organoleptička svojstva vina. Jedan od najvažnijih čimbenika kvalitete vina je kiselost koja se dijeli na ukupnu kiselost, pH i hlapljivu kiselost. Nadalje, osiguravaju mikrobiološku i fizikalno – kemijsku stabilnost vina, djeluju na promjenu boje, potencijal starenja i ravnotežu okusa vina. Također, organske kiseline mogu izazvati kemijsku i enzimatsku oksidaciju spojeva prisutnih u vinu i moštu, djelovati na topljivost bjelančevina i kalijevog bitartarata te učinkovitost sumpornog dioksida, bistrila i pektolitičkih enzima. Kao najzastupljenije kiseline u vinima ističu se: vinska, jabučna, mliječna i jantarna. One se mogu podijeliti u dvije skupine s obzirom na porijeklo: formirane u grožđu s direktnim prijelazom u vino i one koje se razvijaju u procesu fermentacije (Alpeza, 2008; Jordão i sur., 2015).

Položaj vinograda, stupanj zrelosti grožđa i vremenski uvjeti tijekom dozrijevanja utječu na postotak navedenih kiselina koji se mijenja tijekom dozrijevanja grožđa. Najveći udio od ukupnih kiselina u grožđu predstavljaju jabučna i vinska kiselina čiji odnos se mijenja ovisno o kultivaru. U toplijim krajevima koncentracije jabučne kiseline se smanjuje dozrijevanjem, dok

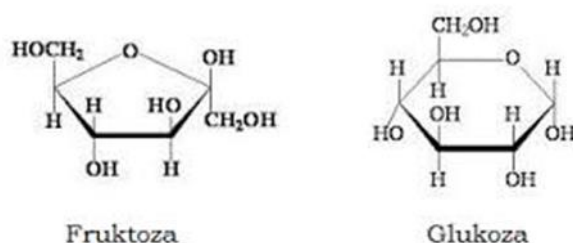


u hladnijim krajevima ostaje povišena i daje vino kiselo-gorkog okusa. S druge strane, koncentracija vinske kiseline ostaje ista ili se neznatno mijenja. Spajanjem vinske kiseline s kalcijem ili kalijem dolazi do nastanka tartarata čija prisutnost uzrokuje nestabilnost u vinima. Stoga, kako bi vino bilo adekvatno pripremljeno za tržište, potrebno je provesti stabilizaciju na tartarate. Tijekom alkoholne fermentacije nastaju manje količine mliječne kiseline, a veći udio bakterije prevode u jabučnu kiselinu tokom malolaktičke fermentacije. Jantarna kiselina, nastala alkoholnom fermentacijom, prisutna je u koncentracijama između 0,5 do 1,5 g/L.

Količina navedene kiseline ovisi o soju kvasaca, koncentraciji šećera u moštu te njegovoj pH vrijednosti (Alpeza, 2008).

### 2.4.3. Ugljikohidrati

Skupina primarnih metabolita koji utječu na kvalitetu vina su šećeri. Glavni šećeri prisutni u grožđu su glukoza i fruktoza prisutni u manjim koncentracijama uslijed procesa fermentacije. Osim glukoze i fruktoze, nefermentirajući šećeri poput ksiloze i arabinoze također mogu biti prisutni. Koncentracija šećera u vinu ovisi o čimbenicima kao što su stupanj sazrijevanja grožđa, regija podrijetla, klima, sorta, kulturalne prakse i uvjeti procesa. Od disaharida najzastupljenija je saharoza, a od polisaharida pektin. Fruktoza je duplo slađa od glukoze pa ju kvasci ne previru tako brzo. Njihov omjer se znatno mijenja tijekom dozrijevanja grožđa, pa tako nezrela bobica sadrži dvije trećine glukoze, u zreloj su koncentracije vrlo slične, a prezrela sadrži puno višu koncentraciju fruktoze. Saharoza je uobičajeni sastojak grožđa, ali njena prisutnost u vinu je dokaz da je vino patvoreno. Uz pomoć enzima invertaze, saharoza se hidrolizira i tek tada koristi kao mogući izvor energije (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008).



**Slika 4** Struktura fruktoze i glukoze (Erejuwa i sur., 2012)

Polisaharidi su skupina makromolekula koja reagira s polifenolnim i aromatskim spojevima te na taj način utječe na organoleptička svojstva vina. Najznačajniji polisaharidi u grožđu su pektin, celuloza i hemiceluloza, a njihov udio u vinu mijenja se ovisno o tehnološkim postupcima obrade grožđa. Mošt je ponekad potrebno dosladiti ili dokiseliti iz razloga što bobice grožđa koje rastu u sušnim krajevima imaju manju koncentraciju šećera i obrnuto. Na osnovu neprevrelog šećera, vina dijelimo na: suha, polusuha, slatka i poluslatka (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

#### 2.4.4. Esteri

Jedni od najznačajnijih spojeva odgovornih za aromu i okus vina su esteri. Tijekom alkoholne fermentacije nastaju dvije skupine estera: oni koji nastaju tijekom fermentacije koji mogu biti etil esteri ravnolančanih masnih kiselina i acetatni esteri viših alkohola, te oni koji se razvijaju tijekom dozrijevanja vina. Od etilnih estera u vinu možemo pronaći etil-propionat, etil-butanoat, etil-heksanoat, etil-oktanoat i etil-dekanoat. Udio estera se smanjuje u prvoj godini dozrijevanja, naročito pri višim temperaturama i oksidativnim procesima. Osim toga, jedan od razloga za održavanje niže temperature je mogućnost hidrolitičkog cijepanja što vodi do gubitka voćne arome. Etil-acetat je prisutan u umjerenim količinama od oko 50 do 60 mg/L i najviše doprinosi voćnosti vina, a u višim koncentracijama uzrokuje trpkost (Alpeza, 2008).

#### 2.4.5. Aldehidi i ketoni

Aldehidi i ketoni se u vinu mogu javljati u manjim i većim količinama, sa značajnim utjecajem na senzorska svojstva vina. Najznačajniji predstavnici ove skupine spojeva su acetaldehid i diacetil. Nastaju kao metaboliti fermentacije ili produkti oksidacije. Ukoliko je vino mikrobnostabilno, mogu nastati neenzimskim oksidacijskim putevima. Derivirani aldehidi grožđa također se mogu pronaći u soku, međutim, tijekom proizvodnje vina, reducirat će se na odgovarajuće alkohole. Hlapljivi aldehidi mogu znatno utjecati na aromu vina zato što imaju puno niže osjetilne pragove od svojih odgovarajućih alkohola (Waterhouse i sur. i sur., 2016). Najzastupljeniji vinski aldehid, acetaldehid, kemijski je povezan s etanolom te u vinima prisutan u koncentracijama od 20 do 100 mg/L. Vrlo mali udio acetaldehida postoji u slobodnom, hlapljivom obliku sa slobodnim SO<sub>2</sub>, te iz tog razloga gotovo ne utječe na aromu stolnog vina, ali može pridonijeti aromi vina s niskim SO<sub>2</sub> kao što je Sherry vino. Pri niskim

koncentracijama acetaldehida, povećava se voćnost, no kako koncentracija raste razvija se aroma orašastih plodova i trule jabuke. Kvasci proizvode acetaldehid alkoholnom fermentacijom, netom prije formiranja etanola. Iz tog razloga, koncentracija acetaldehida je gotovo jednaka kao i molarna količina nastalog etanola. Ketoni nisu toliko zastupljeni u vinima u usporedbi s aldehydima, a najviše se ističu: diacetil, acetoin i geranil acetone. Diacetil nastaje kao produkt aktivnosti bakterija mliječne kiseline i daje vinu maslačastu aromu (Waterhouse i sur., 2016).

#### **2.4.6. Terpeni**

Terpeni su metaboliti biljaka prisutni u gotovo svim vinima u manjim koncentracijama. Odgovorni su za cvjetnu ili voćnu aromu muškatih vina kao što je traminac. Mogu biti prisutni i u nearomatičnim vinima, ali u znatno manjim koncentracijama. Klasifikacija terpena temelji se na broju izoprenskih jedinica u molekuli. Mogu biti prisutni u slobodnom, hlapljivom i vezanom obliku. Primarnu aromu vina čine monoterpeni, najzastupljeniji u bijelim muškatinim sortama. U grožđu ih možemo pronaći u slobodnoj i vezanoj formi, a u vinima najčešće u slobodnoj. Monoterpeni ne sudjeluju u metabolizmu kvasaca te su iz tog razloga idealni za klasifikaciju sorte vina jer ne dolazi do nikakvih promjena pri alkoholnoj fermentaciji. Udio i vrsta monoterpena u grožđu i vinu ovisi o zrelosti i sorti grožđa, izloženosti bobica sunčevoj svjetlosti, prešanju, starenju vina i korištenju glikozidaza (Wedler i sur., 2015).

#### **2.4.7. Elementi u tragovima**

Vino pripada skupini pića koja doprinosi unosu elemenata u tragovima u količini većoj od 10%. Svakodnevna konzumacija vina u umjerenim količinama ispunjava zahtjeve organizma za esencijalnim elementima kao što su: kobalt, nikel, mangan, cink i mnogi drugi. Oko 10 puta veći sadržaj olova se nalazi u vinu nego u većini drugih pića, stoga je potrebno provesti temeljnu analitičku kontrolu elemenata u tragovima i toksičnih elemenata. Postotak elemenata u tragovima u grožđu i vinu ovisi o vrsti tla, te opremi za preradu vina i vinifikaciju. Jedni od najznačajnijih elemenata u tragovima su: kalij, kalcij, aluminij, željezo i dr. Visoke koncentracije kalija se pojavljuju u završnoj fazi sazrijevanja bobica te utječu na stabilnost vina u odnosu na kalijev hidrogen tartarat taloženje. S druge strane, visoke koncentracije kalcija mogu uzrokovati taloženje kalcij tartarata te ukupni udio kalcija nije dovoljan za određivanje stabilnosti vina. Nadalje, aluminij je prisutan pri povišenim koncentracijama zbog prisutnosti

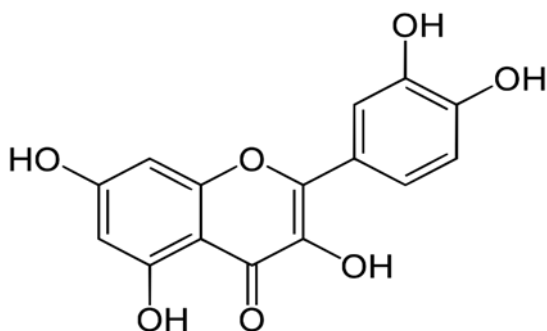
bentonita i kontakta s aluminijskim površinama. Željezo pak ima veoma važnu ulogu kao aktivator enzima i solubilizator u metabolizmu i procesima fermentacije pri niskim koncentracijama. Pri visokim koncentracijama djeluje negativno na stabilnost vina stvarajući komplekse s taninima te uzrokuje oksidaciju (Stafilov i Karadjova, 2006).

#### **2.4.8. Polifenolni spojevi**

Polifenoli su skupina spojeva koji se razlikuju po kemijskom sastavu, a u vinu se nalaze u malim koncentracijama. Imaju velik utjecaj na boju, aromu, trpkost, gorčinu, oksidacijske reakcije, promjene tijekom starenja vina i dr. U procesu vinifikacije, ekstrahiraju se iz kožice, sjemenke ili peteljke, a dio polifenola može potjecati od mikroorganizama. U mnogim istraživanjima dokazano je da polifenoli imaju antikancerogene, protuupalne učinke te sposobnost blokiranja staničnih događaja koji uzrokuju aterosklerozu i druge bolesti srca. Razlikujemo dvije osnovne skupine polifenolnih spojeva, a to su: flavonoidi i neflavonoidi (Waterhouse i sur., 2006).

Flavonoidi su najčešće prisutni u crnim vinima te mogu biti slobodni ili vezani za druge flavonoide ili neflavonoide. Dijelimo ih na: flavan-3-ole, flavonole, antocijane i tanine. U gotovo svim fazama proizvodnje mogu se pronaći polimerni flavonoidi vrlo stabilne i specifične strukture. Najčešće ih pronalazimo u kožici i sjemenci, a strukturu čine dva benzenska prstena povezana propanskim lancem (Waterhouse i sur., 2006).

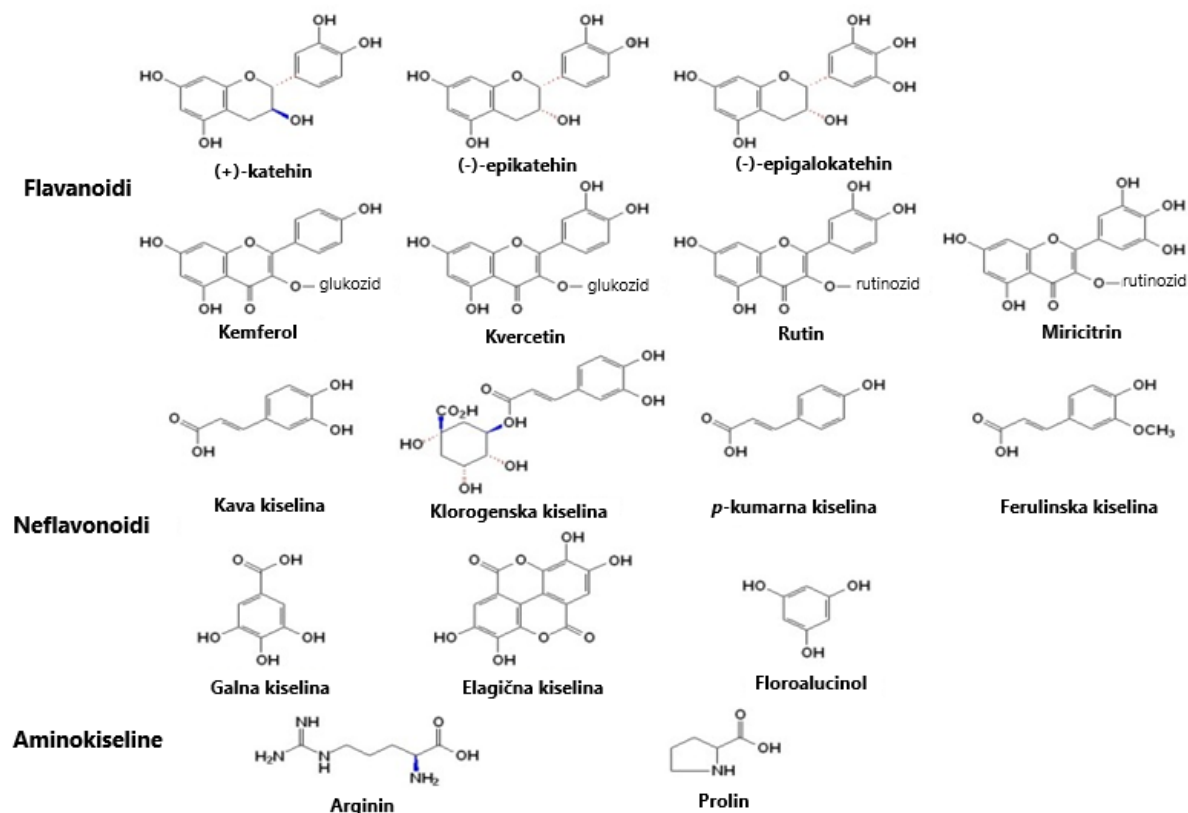
Flavanole u biljkama možemo pronaći u obliku glikozida, uključujući bobice grožđa u kojima su prisutni u kožici. Osnovna 3 oblika flavanola su: kvercetin, miricetin i kemferol, iako možemo pronaći i druge kombinacije navedenih spojeva s glikozidnim oblicima. Glukozidi koji se najčešće pojavljuju u različitim sortama grožđa su: 3-glukozidi, 3-glukorinidi i manji udio diglikozida. Studije su pokazale da se djelovanjem sunčeve svjetlosti na kožicu grožđa, koncentracija flavanola povećava. Zbog snažne apsorpcije UV svjetlosti, biljka koristi ove spojeve kao prirodnu zaštitu od sunca. Razine ukupnih flavanola u Cabernet vinima iznosi 53 mg/L, a za određena skuplja vina preko 200 mg/L (Waterhouse, 2006).



**Slika 5** Struktura kvercetina (Web 4)

Flavonoidi odgovorni za gorčinu vina i grožđa su flavan-3-oli čija koncentracija može ovisiti o kultivaru, ekološkim uvjetima te roku berbe. U vinima se ne nalaze samo u monomernim, nego i u oligomernim i polimernim oblicima. Dokazano je da tijekom starenja vina u interakciji s antocijanima sudjeluju u stvaranju novih pigmenata i odgovorni su za postojanost boje crnih vina. Kožica grožđa ima puno višu koncentraciju flavan-3-ola, te sadrži katehine, galokatehine i njihove proantocijanidine, a sjemenka samo katehine i procijanidine. Katehin je najznačajniji flavanol poznat kao nositelj gorčine vina. Postupkom maceracije, različite koncentracije flavanola ekstrahiraju se iz različitih dijelova grožđa (González-Manzano i sur., 2004).

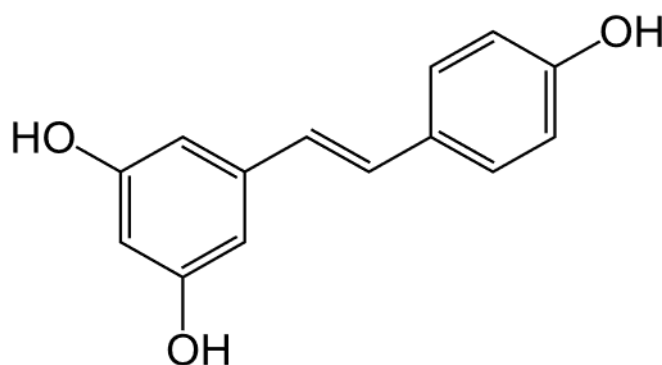
Antocijani su flavonoidni pigmenti topljivi u vodi, koji doprinose bojama kao što su plava, ljubičasta i crvena, ovisno o pH vrijednosti. Možemo ih pronaći u tkivima viših biljaka, korijenju, cvijeću itd. Koncentracije antocijana u crnim vinima obično su oko 150 g/L, a nekad i veće. Tijekom fermentacije i početnih godina dozrijevanja grožđa, monomerni antocijani prolaze kroz niz reakcija čiji su produkti novi pigmenti koji uvelike utječu na stabilnost boje. Iako njihova koncentracija konstantno opada, crvena boja u vinima je postojana. Neke od reakcija su: samoasocijacija, kopigmentacija, stvaranje polimernih antocijana s flavan-3-olima i proantocijanidinima i dr. Antocijani ne utječu na gorčinu i oporost vina kao drugi flavonoidni spojevi, iako mogu utjecati na okus interakcijom s drugim tvarima arome. Istraživanja su pokazala da antocijani i njihovi derivati imaju pozitivne učinke na ljudsko zdravlje kao što su: hvatanje slobodnih radikala, antioksidacijska aktivnost, zaštita od UV zračenja, antikancerogeno, antimutageno djelovanje i mnogi drugi. Njihov udio u crnom grožđu uvelike ovisi o sorti grožđa, uvjetima uzgoja te tehnikama proizvodnje vina (Jakobek, 2007).



**Slika 6** Strukture glavnih kofaktora koji se prirodno pojavljuju u mladim crnim vinima (He i sur., 2012)

Tanini su polifenolni sekundarni metaboliti koji se mogu pronaći u višim biljkama, ali još nisu izolirani iz nižih biljaka. Možemo ih identificirati po sposobnosti kompleksiranja i taloženja proteina. To je karakteristična interakcija tanina s proteinima, po kojoj se tanini razlikuju od drugih polifenolnih spojeva. Smatraju se adstringentima, uz neke druge molekule prisutne u vinu, kao što su organske kiseline koje doprinose trpkosti i kiselosti vina. S obzirom na strukturu, tanine dijelimo na dvije skupine makromolekula: hidrolizabilni tanini i kondenzirani tanini. Hidrolizabilne čine esteri glukoze i esteri elaginske kiseline. Hidrolizabilni ekstrahirani su iz hrasta ili dodani u proizvodnji vina kao enotanini. Kondenzirani tanini su velike makromolekule dobivene polimerizacijom flavan-3-olnih podjedinica kao što su: katehin, epikatehin, epigalokatehin i epi-katehin-3-O-galat. Sastav ovisi o tome nalaze li se tanini u kožici, sjemenci ili peteljci grožđa. Tanini prisutni u vinima utječu na stabilizaciju boje i oporost stvaranjem antocijan-tanin konjugata (Castaldo i sur., 2019).

Neflavonoidi su sastavni dio lignina i tkiva biljaka. Jednostavnije su građe od flavonoida, s jednim fenolnim prstenom manje. Najviše koncentracije nalaze se u mesu bobice grožđa. U vinima mogu biti prisutni kao esteri ili slobodni te ih dijelimo na: derivate hidroksicimetne kiseline, derivate hidroksibenzojeve kiseline i stilbene (Castaldo i sur., 2019). Stilbeni su manja skupina neflavonoidnih spojeva, od kojih je najznačajniji resveratrol koji proizvodi vinova loza kao odgovor na infekciju *Botrytis*om ili neku drugu gljivičnu infekciju. *Cis* i *trans* izomeri, kao i glukozidi oba izomera resveratrola prisutni su u vinima, dok u grožđu nema *cis*-resveratrola. Derivati ovoga spoja, prisutni su samo u kožici grožđa, stoga su prisutni u višim koncentracijama u crnom vinu (Castaldo i sur., 2019).



**Slika 7** Struktura resveratrola (Web 5)

Derivati hidroksicimetne kiseline su najznačajniji fenoli koji su prisutni u soku grožđa i glavna klasa fenola u bijelim vinima. Oksidiraju brzo, pri čemu dolazi do posmeđivanja, što predstavlja problem pri proizvodnji bijelih vina. Najznačajniji hidroksicinamati se temelje na kumarnoj kiselini, kafeinskoj i ferulinskoj. Navedene kiseline postoje kao esteri vinske kiseline s trivijalnim nazivima: *p*-kumarna, *p*-kaftarna i *p*-fertarna kiselina. Njihove razine variraju ovisno o grožđu, ali kumarna i fertarna su prisutne u koncentracijama od oko 20 mg/kg, dok kaftarna kiselina prevladava s koncentracijom od oko 170 mg/kg. Što se tiče senzorskih karakteristika, nemaju značajnu trpkost i gorčinu u vinima (Castaldo i sur., 2019).

Derivati hidroksibenzojeve kiseline su skupina spojeva u koju ubrajamo galnu, salicilnu i vanilinsku kiselinu. Galna kiselina nastaje hidrolizom galatnih estera hidrolizabilnih tanina i kondenziranog tanina kroz nekoliko mjeseci te je prekursor svih hidrolizirajućih tanina. S druge

strane, djelomičnom degradacijom antocijana za vrijeme starenja vina nastaje vanilinska kiselina. Ukoliko se vina drže u drvenim bačvama, koncentracija ovih spojeva bit će viša. U vinima prisutni su u slobodnom obliku, dok ćemo ih u grožđu pronaći u obliku glukozida i estera (Castaldo i sur., 2019).

#### **2.4.9. Antioksidacijska aktivnost**

Antioksidansi su spojevi koji u niskoj koncentraciji u odnosu na oksidirani supstrat, usporavaju ili inhibiraju oksidaciju tog supstrata (Halliwell i Gutteridge, 1995). Oni imaju svojstva koja djeluju kao reducirajuće sredstvo te neutraliziraju slobodne radikale dajući im svoj elektron i na taj način inhibiraju njihovu aktivnost. Slobodni radikali su molekule koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u elektronskim orbitalama, što ih čini vrlo reaktivnima prema mnogim drugim molekulama u stanici. Jednom takvom reakcijom slobodni radikali se mogu vezati na molekulu DNA, a što dovodi do njenog oštećenja. Također su moguće i druge reakcije slobodnih radikala koje naposljetku dovode do uništavanja stanične strukture te brojnih degenerativnih bolesti. Slobodni radikali mogu oštetiti lipidnu membranu stvarajući ugljikov radikal koji reagira s kisikom i daje peroksidni radikal koji dalje reagira s masnim kiselinama stvarajući nove ugljikove radikale. Kada neka od nastalih oštećenja ostanu nepopravljena, dolazi do narušavanja raznih funkcija unutar stanice. To se posebno događa pri oksidativnom stresu kada razina slobodnih radikala poraste te mehanizmi popravka ne mogu efikasno uklanjati sva nastala oštećenja. Vrlo je bitno održavati ravnotežu antioksidansa u tijelu, stoga je potrebno uz endogene antioksidanse, unositi dodatne zdravom prehranom (Ames i sur., 1993).

Najviše antioksidansa ima u voću, povrću, žitaricama, tamnoj čokoladi i dr. Antioksidanse dijelimo na enzimatske i neenzimatske. Neki od najznačajnijih enzimatskih antioksidansa su superoksid dismutaza, katalaza, askorbat peroksidaza i glutation-4-reduktaza. Superoksid dismutaza je metaloenzim zaslužan za dismutaciju  $O_2^-$  u vodikov peroksid. Nalazi se u citosolu, mitohondrijima, peroksisomima, a kod biljnih stanica i u kloroplastima. Askorbat, karotenoidi i polifenoli su neki od najvažnijih neenzimatskih antioksidansa. Askorbat je najzastupljeniji antioksidans pronađen u svim tipovima biljnih stanica i veoma je bitan za zaštitu membrana, jer reagira direktno s  $O_2^-$  i  $H_2O_2$ . Antioksidacijska aktivnost polifenola prisutnih u vinu predmet je brojnih istraživanja najviše zbog njihovog blagotvornog utjecaja na ljudsko zdravlje, ali i na



organoleptička svojstva vina. U grožđu, pa tako i u vinu polifenolni spojevi su zastupljeni u dvije osnovne grupe: flavonoidi i neflavonoidi. Polifenolni sastav vina primarno ovisi o kultivaru, ali i o ampelotehničkim zahvatima u vinogradu, te o tehnologiji proizvodnje vina. Antioksidansi imaju vrlo bitnu ulogu u redukciji slobodnih radikala čime se sprječava oksidacija daljnjih važnih molekula u nizu reakcija. Međutim, jedan od glavnih problema tijekom vinifikacije je proces tamnjenja vina, koji se dijeli na enzimsko i neenzimsko, za što su odgovorni fenoli. Enzimsko tamnjenje obuhvaća reakcije hidrosilacije fenola, a neenzimsko tamnjenje reakcije oksidacije i polimerizacije fenola. Sve te reakcije utječu na promjenu boje vina, pri čemu bijela vina poprimaju nepoželjnu smeđu boju, dok crna vina postaju mekša i manje trpka (Jakobek, 2007).

#### **2.4.10. Aroma vina**

Percepcija okusa i mirisa vina nastaje zbog mnogo interakcija između kemijskih spojeva i osjetilnih receptora. Kemijski spojevi koji tvore kemijski profil vina drugačiji su kod svake sorte zbog različitosti između vrste i kvalitete grožđa, njegove fermentacije te zbog različitih uvjeta starenja i skladištenja vina. Sastav grožđa ovisi o sortnom i klonskom genotipu vinove loze te o interakciji genotipa i njegovog fenotipa s mnogim okolišnim čimbenicima. Kvasci odgovorni za fermentaciju, pridonose aromi vina putem nekoliko mehanizama: prvo iskorištavanjem sastojaka soka od grožđa i njihovom biotransformacijom u komponente koje utječu na aromu ili okus, zatim proizvodnjom enzima koji pretvaraju neutralne spojeve grožđa u aktivne spojeve koji daju drugačije okuse. Glavni cilj u proizvodnji vina je proizvodnja kvalitetnog grožđa koje će odražavati sorte okuse i arome te karakteristike tipične za određenu regiju. To uključuje berbu grožđa u određenim fazama zrelosti, ovisno o stilu vina koje se proizvodi. Nakon berbe, specifične tehnike obrade i strategije fermentacije koje se provode dalje će odrediti razvoj arome i okusa vina (Lin i sur., 2019).

Konačni profil arome i okusa ovisi i o postupcima koji se događaju nakon fermentacije kao što su filtracija i strategije sazrijevanja, uključujući odležavanje u drvenim posudama. Iako je ukupni sastav većine sorti grožđa vrlo sličan, postoje jasne razlike u mirisu i okusu između većine kultivara. Te se razlike uglavnom mogu pripisati relativno malim varijacijama u omjerima spojeva koji čine profil arome grožđa. Samo nekoliko aromatičnih spojeva izravno je povezano s određenim sortnim okusima i aromama. Aroma vina iz muškarnog grožđa, na

primjer, uglavnom je posljedica prisutnosti različitih izoprenoidnih monoterpena u grožđu, od kojih su najvažniji linalol, geraniol, nerol i citronelol. Monoterpeni se mogu naći u slobodnim i glikozidno vezanim oblicima bez mirisa u bobicama grožđa. Omjer slobodnih i vezanih oblika mijenja se tijekom zrenja bobica, pri čemu zrele bobice pokazuju više vezanih nego slobodnih oblika ovih spojeva (Lin i sur., 2019; Ribéreau – Gayon i sur., 2006).

## 2.5. VINSKE POSUDE

Vinske posude najčešće se razlikuju po tome od kojeg su materijala proizvedene te ih dijelimo na drvene, betonske, kovinske - od nehrđajućeg čelika (inoks) i plastične. U davnoj prošlosti, na primjer u staroj Grčkoj i Rimu, u upotrebi su bile amfore, vrčevi različita oblika i mješine od životinjske kože. One su se još i danas zadržale u nekim sredozemnim krajevima, uglavnom za prijevoz mošta i vina. Vinsko posuđe ima važnu ulogu u proizvodnji, osobito u čuvanju vina i u prijevozu. Kvaliteta drvene bačve ovisi o vrsti hrastova drva koji je različit ovisno o regiji u kojoj je rastao s obzirom na nadmorsku visinu i geografsku širinu. U slavonskim šumama raste hrast kitnjak i lužnjak. Kitnjak je kompaktniji i manje porozan pa se zbog toga bačve najčešće izrađuju od hrasta kitnjaka. One mogu biti od kalane i piljene hrastovine. Bačve od kalane hrastovine skuplje su, jer se pri klanju hrastova trupca za proizvodnju duga iskoristi samo 25 – 35% hrastova trupca, a kod piljenja je iskorištenost oko 70%. Paljenje bačvi od velikog je značaja zbog uklanjanja vlažnosti, arome i trpkosti, te razvijanja karakteristične arome. Paljenje može biti laganog intenziteta, srednjeg i jakog. Vino čuvano u bačvama laganog paljenja obično ima najmanji udio aromatskih spojeva. Skladištenje u drvenim bačvama jako utječe na svojstva alkohola pa zbog toga nije potrebno starenje u bačvama svih sorti vina. Lagano crno vino kao što je Merlot može se čuvati u novim spremnicima. Veliki broj bijelih vina, zbog tehnoloških karakteristika sazrijevaju u čeličnim posudama. Čelik od kojeg se proizvode cisterne za vino mora imati 18 – 20% kroma te 9 – 14% nikla, što im daje otpornost prema kiselinama. Molibden je ključni sastojak čelika za izradu cisterni u kojima će se držati vino s visokom koncentracijom sumporaste kiseline (Tao i sur., 2014).

## 2.6. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

U plinskoj kromatografiji (engl. Gas Chromatography, GC), stacionarna faza je kolona ispunjena različitim materijalom (razna silikonska ulja, ugljikovodici velike molekulske mase ili esteri nanaseni na kruti nosač), a mobilna faza je inertni plin i to najčešće dušik, helij, vodik ili argon. GC se koristi kao analitička metoda za otkrivanje koliko se komponenti nalazi u smjesi, također se može koristiti za odvajanje malih količina materijala.

Proces plinske kromatografije provodi se u posebno dizajniranom instrumentu koji se naziva plinski kromatograf. Plinski kromatograf je kompleksan uređaj i sastoji se od 5 osnovnih dijelova: rezervoara za plin nositelj, injektora, kolone s pećnicom, detektora i pisača/računala. Vrlo mala količina tekuće smjese ubrizgava se kroz gumeni septum u instrument i isparava u vrućoj komori za ubrizgavanje. Prilikom ulaska uzorka u kolonu, on se trenutno razdjeljuje između mobilne i stacionarne faze. Pri tome, naizmjeničnom adsorpcijom i desorpcijom dolazi do razdvajanja lakše hlapivih sastojaka koje plin nositelj odnosi kroz kolonu. Kada detektor uoči spoj, šalje elektroničku poruku snimaču, koji odgovara iscrtavanjem vrha. Za slične spojeve, površina ispod GC pika je otprilike proporcionalna količini ubrizganog spoja. Ako dvokomponentna smjesa daje relativne površine 75:25, može se zaključiti da smjesa sadrži približno 75% jedne komponente i 25% druge (Skoog i sur., 2007).

Vrijeme zadržavanja (engl. retention time, RT) je vrijeme koje je potrebno spoju da putuje od otvora za ubrizgavanje do detektora; javlja se za nekoliko minuta na plinskom kromatografu. Vrijeme zadržavanja je zapravo vrijeme između trenutka kada se uređaj pokrene i trenutka kada detektor „vidi“ vrh. Učinkovito odvajanje spojeva u GC ovisi o spojevima koji putuju kroz kolonu različitim brzinama. Brzina kojom spoj putuje kroz određeni GC sustav ovisi o hlapljivosti spoja (komponente niskog vrelišta (hlapljive) putovat će brže kroz kolonu nego komponente visokog vrelišta), polaritetu spojeva (polarni spojevi kretat će se sporije, osobito ako je kolona polarna), temperaturi kolone (podizanje temperature kolone ubrzava sve spojeve u smjesi), polaritetu pakiranja kolone (obično će se svi spojevi kretati sporije na polarnim stupcima, ali će polarni spojevi pokazati veći učinak), brzina protoka plina kroz kolonu (ubrzavanje protoka plina nosača povećava brzinu kojom se svi spojevi kreću kroz kolonu) te duljini kolone (što je duža kolona, to će dulje trebati svim spojevima da se eluiraju).

Razlike u polaritetu spojeva važne su samo ako se odvaja smjesa spojeva koja ima jako različite polaritete. Temperatura kolone, polaritet kolone, brzina protoka i duljina kolone najčešće su konstantni u GC ciklusima (Petrović, 2015).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak rada je ispitati utjecaj različite vinske posude na polifenolni sastav i aromu vina Merlot. U tu svrhu, nakon provedene alkoholne fermentacije vino Merlot je odležavalo u posudi od nehrđajućeg čelika, te u hrastovim barrique bačvama laganog (LT), srednjeg (MT) i jakog paljenja (HT) kroz dvanaest mjeseci. Po završetku jednogodišnjeg odležavanja, uzeti su uzorci vina u kojima će se odrediti polifenolni sastav, aroma, elementi u tragovima i boja te međusobno usporediti. Polifenoli, antocijani i antioksidacijska aktivnost odredit će se upotrebom spektrofotometra, a određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka provest će se primjenom instrumentalne plinske kromatografije i mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME). U radu će biti korišten plinski kromatograf tvrtke Agilent 7890 B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5977. Elementi u tragovima odredit će se EDXRF (energetsko-disperzivna rendgenska fluorescencija) metodom uz prethodno zamrzavanje tekućim dušikom. Boja uzoraka odredit će se pomoću kromametra i izraziti parametrima CIELab sustava.

### 3.2. MATERIJALI

#### 3.2.1. Merlot vino

Analizirano je crno vino sorte grožđa Merlot. Podrijetlo analiziranog vina:

- vinogradarska regija: Istočna Kontinentalna Hrvatska;
- podregija: Slavonija;
- vinogorje: Kutjevo.

#### 3.2.2. Kemikalije

- Folin-Ciocalteu reagens, natrijev karbonat, natrijev acetat, kalijev bisulfit (Kemika, Zagreb, Hrvatska);
- Amonijev acetat (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska);
- Mirtenol, monohidrat galne kiseline, Trolox ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin sulfonska kiselina)),

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazine) (Sigma-Aldrich, St. Lois, SAD);

- Standardi elemenata K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Rb, Sr i Pb (TraceCERT, Fluka Analytical, St. Gallen, Švicarska).

### 3.3. METODE

Odležavanje vina u hrastovim bačvama može znatno utjecati na kakvoću vina zato što prilikom čuvanja vina dolazi do ekstrakcije brojnih hlapivih spojeva. Ekstrakcija tih spojeva ovisi o vremenu odležavanja i svojstvima materijala posude u kojem se čuvaju. U ovom radu, vino se čuvalo u 7 različitih posuda.

#### 3.3.1. Određivanje elemenata u tragovima

Određivanjem elemenata u tragovima 50 mL uzorka zajedno s 10 µg internog standarda selenija (TraceCERT 1000 mg/L) zamrznuto je tekućim dušikom (40 h, Labconco – FreeZone 2,5 L, Labconco Corporation, Kansas City, SAD) u plastičnim vrećicama dimenzija 58 x 58 x 40 mm na –80 °C i 0.015 mbara. Nadalje, uzorak se umeće u plastične držače koji na vrhu imaju dna mylar foliju od 3 mm debljine. Uzorci se podvrgavaju EDXRF metodi s anodom molibdena. Upotrijebljeni detektor (Mirion Technologies/Canberra Industries, Meriden, SAD) za detekciju koji je hlađen dušikom je Canberra Si (Li). Trajanje zračenja je 1000 s, ostali parametri 45 kV i 35 mA. Debljina detektora je 30 mm i aktivna površina 30 mm<sup>2</sup>, dok je debljina Be prozora 0,025 mm, a rezolucija 170 eV FWHM na 5,9 keV. U svrhu analiziranja podataka, koristio se IAEA QXAS software (International Atomic Energy Agency, Seibersdorf, Austria). TraceCERT 1000 mg/L certificirani standardi upotrijebljeni su u svrhu izrade kalibracijskih pravaca za sljedeće elemente: K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Rb, Sr i Pb. Također, za vrijeme analize elemenata u vinu, uz pomoć koeficijenata korelacijskih krivulja ostvarene su vrijednosti relativnih pogrešaka: K – 15,22%; Ca – 16,66%; Mn – 10,03%; Fe – 5,32%; Cu – 1,67%; Zn – 2,83%; Br – 10,82%; Rb – 5,34%; Sr – 1,98% i Pb – 2,4%. U svrhu određivanja vrijednosti limita detekcije koristi sljedeća jednadžba (1):

$$LD = c x \sqrt[3]{\frac{N_c}{B}}$$

gdje je:

LD – limit detekcije;

c – poznata koncentracija traženog elementa;

Nc – intenzitet pozadinskog zračenja ispod karakterističnog pika X-zraka;

B – broj snimanja pozadinskog zračenja.

Konačna koncentracija elemenata u tragovima dobivena je izračunom srednje vrijednosti 3 mjerenja.

### 3.3.2. Određivanje aromatskog profila

U svrhu određivanja aroma u crnom Merlot vinu i koncentratima, korišten je plinski kromatograf Agilent 7890B s masenim detektorom Agilent 5977A (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Upotrijebljena je tehnika mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME) koja koristi iglu za uzorkovanje. Igla sadrži punilo od polidimetilsiloksana-divinilbenzena (PDMS/DVB) kao polimernu stacionarnu fazu debljine 65  $\mu\text{m}$  (Supelco, Bellefonte, SAD).

U staklenu vijalu injektirano je 5 mL vina te je dodano 1 g NaCl radi bolje ekstrakcije. Nadalje, kako bi se odredile koncentracije aroma u uzorcima, dodaje se i 10  $\mu\text{L}$  internog standarda mirtenola u koncentraciji od 0,5 g/L. Zatim se vijala zatvara s teflonskim čepom i uranja u vodenu kupelj i miješa na magnetskoj miješalici. Uzorak se uz pomoć grijača na miješalici zagrijava na 40 °C u trajanju od 5 min. Također, SPME igla se stavlja u prostor s punilom od polidimetilsiloksana-divinilbenzena na koje se adsorbiraju spojevi arome. Nakon 45 min zagrijavanja uzorka, igla se prenosi u injektor plinskog kromatografa. Zatim dolazi do toplinske desorpcije spojeva arome u kolonu uređaja, koja se postupno zagrijava kako bi se osiguralo razdvajanje spojeva na temelju njihove hlapivosti.

#### Uvjeti rada plinskog kromatografa

Parametri ekstrakcije:

- temperatura ekstrakcije: 40 °C;
- vrijeme ekstrakcije: 45 min;
- SPME punilo: 65  $\mu\text{m}$  PDMS/DVB (Supelco).



**GC – MS analitički uvjeti**

- kolona: HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm);
- početna temperatura: 40 °C (10 min);
- temperaturni gradijent 1: 3 °C/min do 120 °C;
- temperaturni gradijent 2: 10 °C/min do 250 °C;
- konačna temperatura: 250 °C;
- temperatura injektora: 250 °C;
- vrijeme desorpcije: 7 min;
- temperatura detektora: 250 °C;
- plin nosač: helij 5,0 (čistoće 99,9%) (Messer Austria, Gumpoldskirchen, Austria);
- energija ionizacije: 70 eV;
- maseni interval (m/z): 40 – 400.

Na temelju retencijskog indeksa i masenih spektara, već izgrađenih baza spojeva Nist11 (National Institute of Standards i Technology, Gaithersburg, SAD) i Wiley 9 (Wiley, SAD), detektirat će se pikovi na kromatogramu. Stoga je provedena analiza standarda sa smjesom alkana C7-C30, kako bi se dobile vrijednosti retencijskog indeksa za pojedine spojeve, uz pomoć sljedeće jednadžbe:

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

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 (min).

Određivani su odabrani spojevi arome:

- kiseline (octena, dekanska, laurinska, miristinska, palmitinska kiselina);
- alkoholi (izoamilni alkohol, but-2,3-diol, heksan-1-ol);
- karbonilni spojevi (4-propilbenzaldehyd, geranil aceton, lili aldehyd, heksilcinamaldehyd);
- terpeni ( $\alpha$ -jonon,  $\beta$ -jonon,  $\beta$ -damascenon,  $\beta$ -jonon, linalol);
- esteri (etil-heksanoat, dietil-sukcinat, etil-oktanoat, fenetil-acetat, etil-dekanoat, etil izopentil-sukcinat, etil-laurat, izoamil-dekanoat, heksil-salicilat, etil-miristat, izopropil-miristat, diizobutil-ftalat, etil-pentadekanoat, dibutil-ftalat, etil-palmitat);
- hlapivi fenoli (4-etilfenol, 4-etilgvajakol, 2,4-di-tert-butilfenol).

### 3.3.3. Određivanje ukupnih polifenola

Kod crnih vina kao što je Merlot i koncentrata, koristi se Folin-Ciocalteu metoda za određivanje ukupnih polifenola (Ough i Amerine, 1988). U epruvetu je otpipetirano 0,2 ml uzorka, zatim 1,8 mL destilirane vode, 10 mL Folin-Ciocalteu reagensa u omjeru 3,3:100 te 8 mL otopine natrijeva karbonata (7,5% otopina). Uzorak zatim mora odstajati na sobnoj temperaturi između 2 i 20 h, te se nakon toga mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm koristeći spektrofotometar UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD). Ukupni sadržaj polifenolnih spojeva je dobiven izračunom srednje vrijednosti sva 3 mjerenja, te prikazan pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline i izražen u g galne kiseline/kg uzorka.

### 3.3.4. Određivanje ukupnih flavonoida

U crnim vinima i koncentratima, za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije ukupnih flavonoida, koristi se  $\text{AlCl}_3$  kao reagens (Kim i sur., 2003). Prvi korak pri određivanju je dodavanje 0,5 mL uzorka, nakon toga 4 mL destilirane vode i 0,3 mL  $\text{NaNO}_2$  (5%). Potrebno je ostaviti smjesu da odstoji 5 min, pa dodati 1,5 mL  $\text{AlCl}_3$  (2%), pričekati još 5 min te za kraj dodati 0,3 mL  $\text{NaNO}_2$  (5%) i 1,7 destilirane vode. Mjerenje apsorbancije se obavlja pri valnoj duljini od 510 nm. Ponovno se izračunava srednja vrijednost sva 3 mjerenja i rezultati se izražavaju pomoću kalibracijske krivulje katehina u g katehina/L uzorka.

### 3.3.5. Određivanje monomernih antocijana

Pri određivanju monomernih antocijana koristi se pH diferencijalna metoda. Ova metoda zasniva se na strukturnoj transformaciji kromofora antocijana pri promjeni vrijednosti pH koja se očituje promjenom spektra apsorbancije (Giusti i Wrolstad, 2001). Pri određivanju monomernih antocijana potrebno je pripremiti po uzorku dvije epruvete i u svaku otpipetirati 0,2 mL uzorka te u jednu dodati 2,8 mL pufera pH vrijednosti 1 (0,025 mol/L KCl, pH podešen s koncentriranom HCl), a u drugu epruvetu 2,8 mL pufera pH vrijednosti 4,5 (0,4 mol/L CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na x 3H<sub>2</sub>O, pH podešen s koncentriranom HCl). Nakon 15 min od dodatka pufera, spektrofotometrom mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 512 i 700 nm te računa prema sljedećoj jednadžbi:

$$A = (A_{512} - A_{700})_{pH\ 1,0} - (A_{512} - A_{700})_{pH\ 4,5}$$

Udio monomernih antocijana računa se pomoću jednadžbe:

$$\text{monomerni antocijani } \left(\frac{mg}{L}\right) = \frac{A \times MW \times FR \times 1000}{\epsilon \times l}$$

gdje je:

A – apsorbancija uzorka;

MW – relativna molekulska masa cijanidin 3-glukozida (449,2 g/mol);

FR – faktor razrjeđenja;

$\epsilon$  – molarni ekstincijski koeficijent cijanidin 3-glukozida (26900 L/mol cm);

l – duljina kivete (1 cm).

Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tri mjerenje u mg cijanidin 3-glukozida/L uzorka.

### 3.3.6. Određivanje polimerne boje

Prema metodi koju su opisali Giusti i Wrolstad, 2001., reakcijom između antocijana i bisulfita dolazi do nastajanja bezbojnog kompleksa što uzrokuje degradaciju antocijana u crnim vinima i koncentratima. Iako, boja nastala pri stvaranju bezbojnog kompleksa rezistentna je na djelovanje bisulfita. U jednu epruvetu potrebno je dodati 0,2 mL uzorka i 3 mL destilirane vode. U drugu epruvetu se također dodaje 0,2 mL uzorka te 2,8 mL vode i 0,2 mL otopine kalijeva bisulfita u omjeru 1:5. Uzorke je potrebno ostaviti da odstoje 15 min. Za kraj je

izmjerena apsorbancija pri 420 (stupanj posmeđivanja;  $A_{420}$ ), 512 (degradacija antocijana, tj. smanjenje intenziteta crvene boje;  $A_{512}$ ) i 700 nm ( $A_{700}$ ). Udio boje dobiven polimerizacijom računa se prema jednadžbi:

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

Gdje je: boja nastala polimerizacijom (uzorak tretiran bisulfitom):

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

gustoća boje (kontrolni uzorak tretiran vodom):

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

Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja i rezultati su izraženi kao srednja vrijednost.

### 3.3.7. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost u crnim vinima također se mjeri pomoću spektrofotometra na temelju sljedeće 4 metode: DPPH, ABTS, FRAP I CUPRAC. S obzirom na to da većina spojeva ima drugačiju strukturu, ne može se koristiti jedinstvena metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti (Jakobek, 2007).

DPPH reagens je stabilni dušikov radikal ljubičaste boje čija se koncentracija smanjuje u prisutnosti antioksidansa, a boja prelazi u žutu (Popović, 2019). DPPH metoda koristi se zato što reakcija između antioksidansa i uzorka kroz određeni period može biti potpuna, pa čak i s hidrofilnim, lipofilnim i slabim antioksidansima (Kedare i Singh, 2011). Postupak se provodi dodatkom 0,2 mL uzorka s 3 mL DPPH otopine ( $A_{517} = 1,0$ ) u epruvetu. Nakon pipetiranja, smjesa mora odstajati 15 min, nakon čega se provodi mjerenje apsorbancije pri 517 nm. Dobiveni rezultati izrazit će se pomoću kalibracijske krivulje Troloxa u  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$  (Brand-Williams i sur., 1995).

ABTS reagens u istoimenoj metodi miješa se s kalijevim persulfatom, a produkt reakcije je oksidirani ABTS radikal zelene boje. Zelena boja nestaje prilikom reakcije s antioksidansom, a radikal postaje bezbojan. U usporedbi s DPPH metodom, provedba ABTS metode je znatno duža, ali upotrebljiva pri različitim pH vrijednostima (Gupta, 2015). Kao i kod DPPH metode, u epruvetu se dodaje 0,2 mL uzorka i nešto veća količina ABTS reagensa (3,2 mL). Reagens je

potrebno pripremiti dan prije miješajući 7,4 mmol/L otopine ABTS s 2,45 mmol/L otopine kalijeve persulfata. Uzorak mora odstajati 95 min, a mjerenje apsorbancije se provodi pri valnoj duljini od 734 nm. Rezultati su prikazani kalibracijskom krivuljom Troloxa u  $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$  (Re i sur., 1999).

FRAP metoda se zasniva na redukciji željeza s piridil triazinom iz trovalentnog u dvovalentno djelovanjem antioksidanasa pri pH vrijednosti 3,6, nakon čega dolazi do pojave plavoljubičaste boje. Željezo može reagirati s nekim drugim tvarima koje imaju sposobnost redukcije željeza, a nisu antioksidansi. FRAP reagens korišten u ovoj metodi sastoji se od 300 mmol/L otopine natrijevog acetata pH vrijednosti 3,6, 10 mmol/L otopine TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin otopljen u 40 mmol/L otopini HCl) i 20 mmol/L otopine  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  u omjeru 10:1:1 (Benzie i Strain, 1999). Nakon što je reagens pripremljen, zagrijava se na 37 °C i dodaje u epruvetu (3 mL) zajedno s 0,2 mL uzorka. Po završetku se mjeri intenzitet obojenja pri valnoj duljini od 597 nm, a rezultati izražavaju preko kalibracijske krivulje Troloxa ( $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$ ) (Benzie i Strain, 1999).

CUPRAC metoda se zasniva na reakciji između antioksidanasa i CUPRAC reagensa pri čemu nastaje žuta boja. U prisutnosti limunske kiseline i šećera, može doći do promjene rezultata pojedine metode, ali ova metoda utječe na antioksidanse bez utjecaja na limunsku kiselinu i šećere. Koristi se za određivanje antioksidacijske aktivnosti flavonoida, tiola i fenolnih kiselina (Gupta, 2015). Ova metoda koristi tri sljedeća reagensa: 10 mmol/L otopine  $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 7,5 mmol/L otopine neokuproina (Nc) i 1 mol/L otopine amonij acetata, pH vrijednosti 7,0. Dodatkom 1 mL od svakog reagensa, 0,2 mL uzorka i 0,9 mL destilirane vode dolazi do žutog obojenja čiji intenzitet se mjeri nakon 30 min pri valnoj duljini od 450 nm, a rezultati prikazuju preko kalibracijske krivulje Troloxa ( $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$ ).

### 3.3.8. Određivanje boje u CIELab sustavu

CIELab sustav predstavlja trodimenzionalni prostor koji se zasniva na promatračevoj percepciji boje. Koordinate odgovaraju teoriji suprotnih boja tj. parova. Boje u ovom sustavu opisane su kao tri osi: dvije kromatske osi i jedna akromatska. Kromatske osi su: a (crvena i zelena) i b (plava i žuta), a akromatska os je svijetlost čija se vrijednost mjeri od 0 do 100. Crna boja ima vrijednost 0, a bijela 100 (Ivić i sur., 2021; Vukoja i sur., 2019).

Udaljenost boja od ishodišta računa se prema sljedećoj formuli:

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$$

Ton boje računa se prema sljedećem izrazu:

$$^{\circ}h = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

Ukupna razlika u boji računa se prema sljedećem izrazu:

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}}$$

U ovom radu, u CIELab sustavu, izmjereni su parametri  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $dL^*$ ,  $da^*$ ,  $db^*$ ,  $dE^*_{ab}$ ,  $C^*$  i  $h^*$  te je konačni rezultat predstavljen kao srednja vrijednost sva 3 mjerenja.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

**Tablica 1** Sadržaj elemenata u tragovima u Merlot crnom vinu u različitim vinskim posudama

Uzorak	K (mg/L)	Ca (mg/L)	Mn (µg/L)	Fe (µg/L)	Cu (µg/L)	Zn (µg/L)	Br (µg/L)	Rb (µg/L)	Sr (µg/L)	Pb (µg/L)
<b>Merlot 225 LT</b>	795 ± 43	46 ± 2	870 ± 11	1367 ± 14	75 ± 3	514 ± 11	69,8 ± 4,3	516 ± 22	812 ± 51	<MDL
<b>Merlot 225 MT</b>	690 ± 28	34 ± 2	779 ± 42	1259 ± 10	71 ± 6	454 ± 4	81,0 ± 4,7	542 ± 35	858 ± 55	<MDL
<b>Merlot 225 HT</b>	994 ± 42	38 ± 4	883 ± 15	1562 ± 18	74 ± 1	470 ± 5	87,7 ± 2,9	596 ± 30	1066 ± 71	<MDL
<b>Merlot INOX</b>	806 ± 40	47 ± 2	1010 ± 57	1717 ± 11	72 ± 1	888 ± 4	100,5 ± 5,6	515 ± 33	991 ± 50	3,9 ± 0,4
<b>Merlot 500 LT</b>	902 ± 24	38 ± 2	924 ± 14	1376 ± 18	75 ± 6	510 ± 5	88,9 ± 3,4	553 ± 36	899 ± 17	<MDL
<b>Merlot 500 MT</b>	746 ± 83	47 ± 1	966 ± 37	1484 ± 93	72 ± 6	437 ± 47	80,2 ± 2,6	613 ± 25	1066 ± 23	8,2 ± 1,3
<b>Merlot 500 HT</b>	774 ± 10	44 ± 1	881 ± 14	1320 ± 23	71 ± 7	347 ± 13	98,9 ± 6,4	482 ± 21	789 ± 37	<MDL

Oznake: Merlot 225 LT - Merlot odležan u lagano paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot 225 MT - Merlot odležan u srednje paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot 225 HT - Merlot odležan u jako paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot inox - Merlot odležan u inoksu; Merlot 500 LT - Merlot odležanu lagano paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L; Merlot 500 MT - Merlot odležan u srednje paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L; Merlot 500 HT - Merlot odležan u jako paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L.



Tablica 2 CIELab parametri boje Merlot crnog vina u različitim vinskim posudama

Uzorak	L*	a*	b*	$\Delta L^*$	$\Delta a^*$	$\Delta b^*$	$\Delta E^*$	C*	$^{\circ}h$
<b>Merlot 225 LT</b>	19.59	0.93	0.85	0.07	0.37	0.17	0.41	1.26	42.68
<b>Merlot 225 MT</b>	19.79	1.90	1.29	-0.13	-0.60	-0.27	0.67	2.29	34.09
<b>Merlot 225 HT</b>	19.56	0.72	0.84	0.10	0.58	0.18	0.62	1.10	49.38
<b>Merlot INOX</b>	19.66	1.30	1.02	-	-	-	-	1.65	37.88
<b>Merlot 500 LT</b>	19.66	1.14	0.92	0.00	0.16	0.10	0.19	1.47	38.94
<b>Merlot 500 MT</b>	19.62	0.73	0.80	0.04	0.57	0.22	0.61	1.09	47.77
<b>Merlot 500 HT</b>	19.89	1.72	1.18	-0.23	-0.42	-0.16	0.50	2.08	34.54

-  $\Delta E^*$  - razlika u boji računata je u odnosu na uzorak vina koji je odležao u inoks posudi.

Oznake: Merlot 225 LT- Merlot odležan u lagano paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot 225 MT- Merlot odležan u srednje paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot 225 HT- Merlot odležan u jako paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot inox - Merlot odležan u inoksu; Merlot 500 LT- Merlot odležan u lagano paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L; Merlot 500 MT- Merlot odležan u srednje paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L; Merlot 500 HT- Merlot odležan u jako paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L.

**Tablica 3** Sadržaj ukupnih polifenola, flavonoida, antocijana, udio polimerne boje i antioksidacijska aktivnost određena DPPH, ABTS, FRAP I CUPRAC metodom u Merlot crnom vinu u različitim vinskim posudama

Uzorak	Ukupni polifenoli (mg/L)	Ukupni flavonoidi (mg/L)	Monomerni 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 ( $\mu\text{mol}/100 \text{ mL}$ )
<b>Merlot 225 LT</b>	1423,47 $\pm$ 5,61	541,94 $\pm$ 0,62	11,97 $\pm$ 0,12	80,23 $\pm$ 0,38	5,94 $\pm$ 0,02	9,76 $\pm$ 0,08	0,93 $\pm$ 0,01	59,81 $\pm$ 0,22
<b>Merlot 225 MT</b>	1474,04 $\pm$ 4,01	527,63 $\pm$ 4,60	12,34 $\pm$ 0,55	77,02 $\pm$ 0,58	7,97 $\pm$ 0,01	12,61 $\pm$ 0,09	1,19 $\pm$ 0,01	61,45 $\pm$ 0,42
<b>Merlot 225 HT</b>	1460,06 $\pm$ 5,10	605,82 $\pm$ 0,34	10,24 $\pm$ 0,29	77,70 $\pm$ 0,26	6,03 $\pm$ 0,01	14,85 $\pm$ 0,04	0,98 $\pm$ 0,03	58,43 $\pm$ 0,60
<b>Merlot INOX</b>	1435,82 $\pm$ 4,85	611,03 $\pm$ 4,49	15,70 $\pm$ 0,08	75,49 $\pm$ 0,51	6,04 $\pm$ 0,02	12,16 $\pm$ 0,09	1,00 $\pm$ 0,01	55,09 $\pm$ 0,15
<b>Merlot 500 LT</b>	1546,33 $\pm$ 3,58	629,40 $\pm$ 4,68	15,52 $\pm$ 0,86	68,62 $\pm$ 0,50	6,52 $\pm$ 0,06	9,79 $\pm$ 0,31	1,03 $\pm$ 0,01	55,05 $\pm$ 0,31
<b>Merlot 500 MT</b>	1455,60 $\pm$ 5,29	570,34 $\pm$ 3,88	8,26 $\pm$ 0,45	73,03 $\pm$ 0,46	6,31 $\pm$ 0,01	17,33 $\pm$ 0,06	0,99 $\pm$ 0,02	69,11 $\pm$ 0,19
<b>Merlot 500 HT</b>	1500,52 $\pm$ 1,87	571,35 $\pm$ 2,07	12,26 $\pm$ 0,87	81,27 $\pm$ 1,55	7,13 $\pm$ 0,01	14,67 $\pm$ 0,18	1,16 $\pm$ 0,01	49,91 $\pm$ 0,17

Oznake: Merlot 225 LT - Merlot odležan u lagano paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot 225 MT - Merlot odležan u srednje paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot 225 HT - Merlot odležan u jako paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot inox - Merlot odležan u inoksu; Merlot 500 LT - Merlot odležanu lagano paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L; Merlot 500 MT - Merlot odležan u srednje paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L; Merlot 500 HT - Merlot odležan u jako paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L.

Tablica 4 Aromatski spojevi ( $\mu\text{g/L}$ ) identificirani u Merlot crnom vinu u različitim vinskim posudama

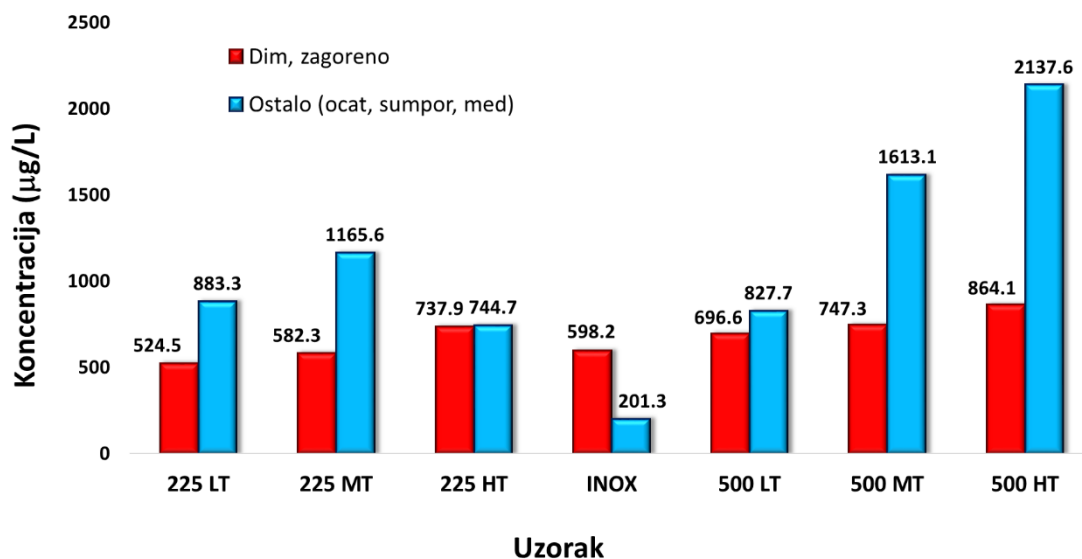
Spoj	RT (min)	RI	Merlot 225 LT	Merlot 225 MT	Merlot 225 HT	Merlot INOX	Merlot 500 LT	Merlot 500 MT	Merlot 500 HT	Opis mirisa
$\Sigma$ Kiseline			<b>957,5 <math>\pm</math> 5,3</b>	<b>1242,4 <math>\pm</math> 4,8</b>	<b>831,8 <math>\pm</math> 7,5</b>	<b>323,6 <math>\pm</math> 6,7</b>	<b>872,2 <math>\pm</math> 1,8</b>	<b>1671,8 <math>\pm</math> 51,3</b>	<b>2316,9 <math>\pm</math> 33,1</b>	
Octena kiselina	2,5650	622	870,6 $\pm$ 4,3	1154,6 $\pm$ 2,8	715,7 $\pm$ 4,9	181,4 $\pm$ 2,6	802,6 $\pm$ 0,8	1587,4 $\pm$ 47,7	2122,5 $\pm$ 23,4	ocat
Dekanska kiselina	37,4621	1376	20,8 $\pm$ 0,3	44,1 $\pm$ 1,5	64,8 $\pm$ 0,7	107,2 $\pm$ 3,3	21,4 $\pm$ 0,5	33,0 $\pm$ 1,7	24,2 $\pm$ 1,2	mast
Laurinska kiselina	41,7672	1558	28,9 $\pm$ 0,3	22,9 $\pm$ 0,1	19,2 $\pm$ 0,3	22,5 $\pm$ 0,4	38,3 $\pm$ 0,3	31,2 $\pm$ 1,9	35,8 $\pm$ 1,8	mast
Miristinska kiselina	44,4804	1749	11,2 $\pm$ 0,2	11,6 $\pm$ 0,2	10,1 $\pm$ 0,7	12,5 $\pm$ 0,5	9,9 $\pm$ 0,2	20,2 $\pm$ 0,1	110,7 $\pm$ 5,8	mast
Palmitinska kiselina	47,3237	2004	25,9 $\pm$ 0,1	9,2 $\pm$ 0,2	22,1 $\pm$ 1,0				23,8 $\pm$ 0,9	mast
$\Sigma$ Alkoholi			<b>13785,3 <math>\pm</math> 343,1</b>	<b>32740,4 <math>\pm</math> 244,5</b>	<b>32540,0 <math>\pm</math> 5,8</b>	<b>20884,5 <math>\pm</math> 292,8</b>	<b>56348,0 <math>\pm</math> 190,3</b>	<b>60202,2 <math>\pm</math> 304,8</b>	<b>46134,0 <math>\pm</math> 282,9</b>	
Izoamilni alkohol	3,6617	734	12600,3 $\pm$ 336,1	32016,9 $\pm$ 236,5	31642,0 $\pm$ 1,1	20192,5 $\pm$ 286,1	55029,2 $\pm$ 184,8	58527,8 $\pm$ 288,4	44808,0 $\pm$ 231,0	voćni
2,3-butanediol	5,4000	804	832,9 $\pm$ 6,7	628,5 $\pm$ 7,7	529,5 $\pm$ 0,9	374,4 $\pm$ 0,8	1039,0 $\pm$ 4,9	1293,1 $\pm$ 5,9	1002,6 $\pm$ 47,9	voćni
Heksan-1-ol	9,3398	868	352,2 $\pm$ 0,1	95,0 $\pm$ 0,3	368,5 $\pm$ 3,8	317,6 $\pm$ 5,9	279,9 $\pm$ 0,6	381,3 $\pm$ 10,5	323,3 $\pm$ 4,0	zeleni
$\Sigma$ Terpeni			<b>52,3 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>168,9 <math>\pm</math> 2,7</b>	<b>190,4 <math>\pm</math> 3,2</b>	<b>188,9 <math>\pm</math> 6,6</b>	<b>40,6 <math>\pm</math> 1,5</b>	<b>30,1 <math>\pm</math> 1,7</b>	<b>142,4 <math>\pm</math> 3,5</b>	
Linalool	24,0670	1096		106,2 $\pm$ 1,4	141,8 $\pm$ 1,6	113,3 $\pm$ 3,2			88,8 $\pm$ 1,8	citrusni
$\beta$ -damascenon	37,5110	1377				30,6 $\pm$ 1,3				voćni
$\alpha$ -jonon	38,8675	1417	24,3 $\pm$ 0,4	31,2 $\pm$ 0,2	18,0 $\pm$ 0,1	23,6 $\pm$ 0,9	19,3 $\pm$ 0,4	15,7 $\pm$ 1,2	27,7 $\pm$ 1,0	
$\beta$ -jonon	40,3863	1477	28,0 $\pm$ 0,2	31,5 $\pm$ 1,1	30,6 $\pm$ 1,6	21,4 $\pm$ 1,3	21,4 $\pm$ 1,1	14,4 $\pm$ 0,4	26,0 $\pm$ 0,7	drvo, cvijet

Oznake: Merlot 225 LT - Merlot odležan u lagano paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot 225 MT - Merlot odležan u srednje paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot 225 HT - Merlot odležan u jako paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot inox - Merlot odležan u inoksu; Merlot 500 LT - Merlot odležan u lagano paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L; Merlot 500 MT - Merlot odležan u srednje paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L; Merlot 500 HT - Merlot odležan u jako paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L.

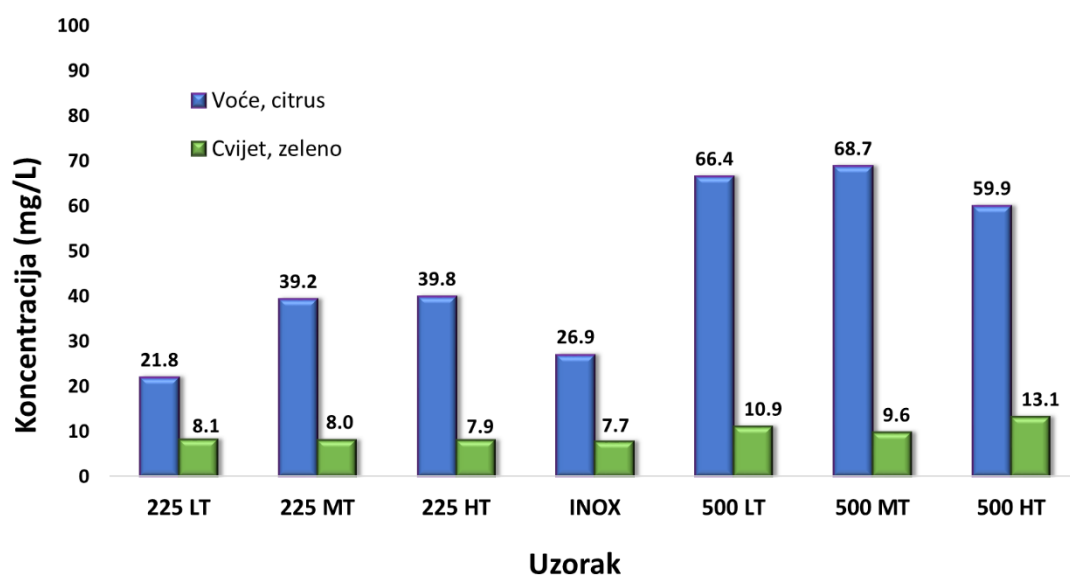
Tablica 4 nastavak

Spoj	RT (min)	RI	Merlot 225 LT	Merlot 225 MT	Merlot 225 HT	Merlot INOX	Merlot 500 LT	Merlot 500 MT	Merlot 500 HT	Opis mirisa
<b>ΣEsteri</b>			<b>9111,0 ± 53,2</b>	<b>7193,8 ± 81,2</b>	<b>8155,6 ± 34,8</b>	<b>6856,5 ± 15,3</b>	<b>11126,1 ± 113,3</b>	<b>9621,8 ± 63,0</b>	<b>15026,9 ± 80,0</b>	
Etil-heksanoat	17,9015	997	129,6 ± 0,9	118,7 ± 1,3	89,8 ± 1,8	96,0 ± 0,8	204,1 ± 2,7	159,6 ± 5,1	138,4 ± 5,1	voćni
Dietil-sukcinat	28,4291	1179	8052,0 ± 41,2	6173,5 ± 64,7	7226,0 ± 19,4	6046,2 ± 2,7	10009,4 ± 92,7	8633,0 ± 38,2	13727,9 ± 38,7	voćni
Feniletil-acetat	31,8489	1248	90,8 ± 0,9	62,6 ± 0,7	51,1 ± 1,1	51,9 ± 1,5	71,9 ± 2,3	64,9 ± 1,9	77,1 ± 1,1	cvijet
Etil-dekanoat	38,0468	1391	134,2 ± 3,9	106,1 ± 4,1	72,8 ± 0,8	56,1 ± 1,6	33,1 ± 1,4	21,3 ± 1,3	40,6 ± 0,8	voćni
Etil izopentil-sukcinat	39,0055	1423	507,5 ± 4,0	541,5 ± 4,9	505,6 ± 5,4	399,9 ± 1,2	593,5 ± 7,8	500,8 ± 8,9	764,0 ± 29,2	drvo, dim, karamela
Etil-laurat	42,2221	1584	21,8 ± 0,2	20,3 ± 0,5	16,6 ± 0,2	27,5 ± 0,2	11,8 ± 0,5	42,9 ± 2,7	37,5 ± 0,5	mast
Izoamil-dekanoat	42,9618	1632	18,9 ± 0,6	17,1 ± 0,4	28,8 ± 1,6	25,5 ± 0,7	31,3 ± 0,8	20,2 ± 0,8	32,0 ± 0,9	voćni
Heksil-salicilat	43,4406	1667	21,6 ± 0,2	16,4 ± 0,2	10,9 ± 0,7	10,0 ± 0,4	25,6 ± 1,0	27,0 ± 0,2	25,1 ± 0,6	zeleni
Etil-miristat	44,8622	1778	15,0±0,3	14,3±0,4	14,7±0,3	9,8±0,5	11,7±0,1	16,8±0,5	16,5±0,5	mast
Izopropil-miristat	45,2282	1810	22,3±0,1	16,2±0,4	13,9±0,8	11,2±1,1	16,9±0,6	14,0±0,2	24,9±1,0	mast
Diizobutil-ftalat	45,7557	1859	25,4±0,1	24,4±0,2	35,6±0,1	33,5±1,3	20,2±0,6	24,5±1,2	36,2±0,3	mast
Etil-pentadekanoat	45,9913	1880	12,6±0,2	10,9±0,3	29,0±0,1	19,8±0,6	25,0±0,6	25,7±0,6	15,1±0,1	med
Dibutil-ftalat	46,7711	1953	48,0±0,3	46,2±2,1	45,9±2,2	35,4±1,4	33,5±0,2	42,8±1,1	40,7±0,1	slab
Etil-palmitat	47,0229	1978	11,1±0,4	25,7±1,1	14,8±0,3	33,7±1,1	38,1±1,8	28,2±0,3	51,1±1,1	mast
<b>ΣHlapivi fenoli</b>			<b>552,9±0,8</b>	<b>620,1±2,1</b>	<b>937,3±6,8</b>	<b>740,9±12,0</b>	<b>716,3±6,5</b>	<b>721,8±6,1</b>	<b>842,3±5,1</b>	
4-etil fenol	27,9417	1166	17,0±0,1	40,7±0,8	201,7±3,1	170,9±1,4	103,1±2,9	215,9±0,7	100,1±2,1	dim
4-etil gvajakol	32,8648	1268			30,5±0,1	27,4±0,8		30,6±0,1		dim
2,4-Di-T-butil fenol	40,8493	1504	535,8±0,8	579,3±1,3	705,0±3,6	542,5±9,8	613,2±3,6	475,2±5,4	742,2±3,0	slab

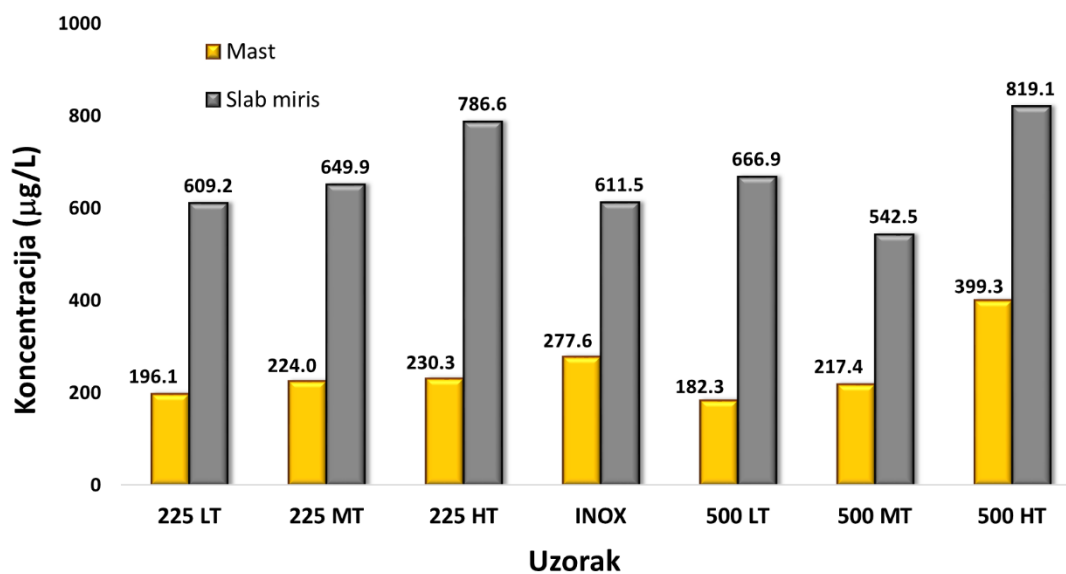
Oznake: Merlot 225 LT - Merlot odležan u lagano paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot 225 MT - Merlot odležan u srednje paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot 225 HT - Merlot odležan u jako paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 225 L; Merlot inox - Merlot odležan u inoksu; Merlot 500 LT - Merlot odležan u lagano paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L; Merlot 500 MT - Merlot odležan u srednje paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L; Merlot 500 HT - Merlot odležan u jako paljenoj hrastovoj barrique bačvi volumena 500 L.



**Slika 8** Ukupna koncentracija aromatskih spojeva koji doprinose mirisu po dimu i zagorenom, te mirisu po octu, sumporu i medu u vinu Merlot odležanom u hrastovim bačvama volumena 225 L i 500 L s laganim (LT), srednjim (MT) i jakim (HT) paljenjem te inoks posudi



**Slika 9** Ukupna koncentracija aromatskih spojeva koji doprinose mirisu na voće i citruse, te mirisu na cvijeće i zelenilo u vinu Merlot odležanom u hrastovim bačvama volumena 225 L i 500 L s laganim (LT), srednjim (MT) i jakim (HT) paljenjem te inoks posudi



**Slika 10** Ukupna koncentracija aromatskih spojeva koji doprinose mirisu na mast spojeva sa slabim mirisom u vinu Merlot odležanom u hrastovim bačvama volumena 225 L i 500 L s laganim (LT), srednjim (MT) i jakim (HT) paljenjem te inoks posudi

#### 4.1. UTJECAJ RAZLIČITIH VINSKIH POSUDA NA ELEMENTE U TRAGOVIMA

Odležavanje vina u hrastovima bačvama može znatno utjecati na kakvoću vina zato što prilikom čuvanja vina dolazi do ekstrakcije brojnih hlapivih spojeva. Ekstrakcija tih spojeva ovisi o vremenu odležavanja i svojstvima materijala posude u kojoj se čuvaju. U ovom radu, vino se čuvalo u 7 različitih posuda te su se pratile promjene polifenolnog sastava i arome vina s obzirom na materijal i volumen posuda.

Elementi u tragovima veoma su važni s tehnološkog gledišta zbog utjecaja na kemijsku stabilnost vina. Nadalje, K, Ca, Na, Mg i Fe glavne su komponente drvenog pepela te se očekuje njihov prijenos iz drveta u vino s obzirom na toplinsku obradu bačvi. Promjena koncentracije elemenata u tragovima ovisno o vinskim posudama u kojima je vino odležavalo prikazano je u **Tablici 1**. Kalij u vinima može stvarati stabilne tartarate, pa je njegova prisutnost poželjna, iako u prevelikim koncentracijama može doći do taloženja kiselog kalijeve tartarata. U crnim vinima, koncentracija kalija iznosi između 1200 i 1700 mg/L. Možemo uočiti da je koncentracija kalija nakon odležavanja vina u posudama najviša (994 mg/L) u uzorku vina koje se držalo u hrastovoj barrique bačvi jakog paljenja (225 HT), a najniža (690 mg/L) u uzorku vina koje se držalo u hrastovoj barrique bačvi srednjeg paljenja (225 MT). Koncentracija kalcija, također je najmanja u hrastovim barrique bačvama srednjeg paljenja (34 mg/L), dok je najviša (47 mg/L) koncentracija zabilježena u posudi od nehrđajućeg čelika, hrastovoj barrique bačvi laganog (225 LT) i hrastovoj bačvi srednjeg paljenja (500 MT). Njegova koncentracija u crnim vinima kreće se od 14,5 do 50,5 mg/L. Mangan je element čija prisutnost najviše utječe na rast i razvoj vinove loze te je dokazano da utječe na nastajanje acetaldehida tijekom oksidacije. Kao i kod kalcija, koncentracija mangana, željeza, cinka i broma, također, je najviša u posudama od nehrđajućeg čelika. Najviša koncentracija rubidija i stroncija evidentirana je u hrastovim bačvama jakog paljenja (225 HT i 500 HT). S druge strane, najniže koncentracije mangana, željeza i bakra potvrđene su u hrastovoj barrique bačvi srednjeg paljenja (225 MT), dok su preostali elementi najnižu koncentraciju postigli u hrastovim barrique bačvama jakog paljenja. Olovo je pronađeno jedino u vinu odležanom u inoks posudi (3,9 µg/L) te hrastovoj bačvi srednjeg paljenja (500 MT; 8,2 µg/L).

## 4.2. UTJECAJ RAZLIČITIH VINSKIH POSUDA NA BOJU VINA

U svrhu određivanja boje Merlot vina nakon odležavanja u različitim vinskim posudama određeni su parametri  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$ ,  $\Delta b^*$ ,  $\Delta E^*$ ,  $C^*$  i  $^{\circ}h$ , s tim da je razlika  $\Delta E^*$  između uzoraka računata u odnosu na uzorak odležavan u inoks posudi. Iz prikazanih rezultata u **Tablici 2** vidljivo je da svjetlina u svih sedam posuda nema značajnu razliku. Može se primijetiti da je najintenzivnija svjetlina u hrastovoj barrique bačvi jakog paljenja (500 HT), a najmanje intenzivna u hrastovoj barrique bačvi jakog paljenja s manjim volumenom bačve (225 HT), ali s vrlo malom razlikom u odnosu na ostale uzorke. Vrijednost  $a^*$  kreće se od crvene do zelene boje, stoga ukoliko je vrijednost manja od nule, boja je zelena. Dakle,  $a^*$  vrijednost odnosno crvena boja nešto više varira nego svjetlina te je najveća u hrastovoj barrique bačvi srednjeg paljenja (225 MT), a najmanja u bačvi istog volumena jakog paljenja (225 HT).

S druge strane, vrijednost  $b^*$  tj. žuta boja najmanja je u hrastovoj barrique bačvi srednjeg paljenja (500 MT), a najveća u barrique bačvi srednjeg paljenja manjeg volumena (225 MT), kao i  $a^*$  vrijednost. Vrijednost  $C^*$  predstavlja zasićenost boje tj. doprinos crvenila i žutine u ukupnoj boji. Iz **Tablice 2** vidljivo je kako je uzorak čuvan u barrique bačvi srednjeg paljenja (225 MT) ima najveću vrijednost  $C^*$  parametra. Najmanja zasićenost boje izmjerena je u uzorku vina koje je čuvano u bačvi srednjeg paljenja većeg volumena (500 MT). Vrijednost  $^{\circ}h$  predstavlja ton boje i označava se u stupnjevima, pa tako  $0^{\circ}$  karakterizira crvenu boju,  $90^{\circ}$  žutu,  $180^{\circ}$  zelenu i  $270^{\circ}$  plavu. Vrijednost  $^{\circ}h$  se u uzorcima kretao od 34,09 (225 MT) do 49,38 (225 HT). Razlika u boji između uzoraka u odnosu na vino odležano u inoks posudi,  $\Delta E^*$ , je u svim slučajevima manja od 1 (od 0,19 – 0,67), što znači da različite posude za odležavanje vina neznatno utječu na promjenu ukupne boje vina, odnosno ta promjena nije vidljiva golim okom (Pérez-Magariño i GonzálezSanjosé, 2003).



### 4.3. UTJECAJ RAZLIČITIH VINSKIH POSUDA NA SASTAV FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

Fenolni sastav vina, pod utjecajem je mnogih čimbenika kao što su: sorta, stupanj zrelosti grožđa, okolišni uvjeti, tehnologija proizvodnje i dr. Znatno utječu na senzorske karakteristike crnih vina. Tijekom dozrijevanja dolazi do promjene sastava zbog reakcija kopigmentacije, polimerizacije, i kondenzacije, te zbog otpuštanja fenola iz drveta u vino. Iz **Tablice 3** može se uočiti da je najveća količina polifenola izražena u mg/L zabilježena u hrastovoj bačvi laganog paljenja većeg volumena (500 LT), dok je najmanja količina pronađena u istoj bačvi manjeg volumena (225 LT), implicirajući važnost volumena bačve na polifenolni sastav vina. Najviše koncentracije flavonoida također su pronađene u bačvama laganog paljenja većeg volumena (500 LT), što je i karakteristično za Merlot vino. Naime, istraživanja su pokazala kako se koncentracija katehina, najznačajnijeg spoja skupine flavan-3-ola, značajno smanjuje pri dozrijevanju vina u bačvama jakog paljenja, dok je kod srednje paljenih bačvi stalna. Isto je dokazano i za koncentraciju procijanidina. Najviša koncentracija iznosi 629,40 mg/L, a najmanja zabilježena u bačvi srednjeg paljenja manjeg volumena iznosi 527 mg/L. Najviša koncentracija antocijana zapažena je u inoks posudi i posudi laganog paljenja većeg volumena (500 LT). U ispitivanju koje su proveli Dumitriu i sur., (2017), potvrđeno je kako se količina antocijana u vinu smanjuje odležavanjem vina u bačvama jačeg paljenja. Polimerna boja je bila visoka u svim uzorcima (iznad 68%), a najviša izmjerena je bila u uzorku Merlot 500 HT.

Za antioksidacijsku aktivnost u uzorcima odgovorne su različite skupine fenolnih spojeva. Stoga, kako bi se prikazala što bolja slika antioksidacijske aktivnosti analiziranih uzoraka, ona je određena pomoću 4 različite metode (DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC) koje se razlikuju po načinu djelovanja na pojedine skupine fenolnih spojeva.

Iz **Tablice 3** vidljivo je da su najveće vrijednosti dobivene DPPH (7,97  $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ ) i FRAP (1,19  $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ ) metodom zabilježene u vino odležanom u barrique bačvi srednjeg paljenja (225 MT). Međutim, srednje paljenje u bačvi većeg volumena (500 MT) je više pogodovalo za spojeve određene pomoću ABTS i CUPRAC metode te su u tom uzorku i izmjerene najveće vrijednosti (redom 17,33 i 69,11  $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ ). Jači i slabiji intenzitet paljenja bačve rezultirao je manjim vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u uzorcima, bez obzira na volumen. Odležavanje vina u inoks posudi također nije rezultiralo višim vrijednost antioksidacijske aktivnosti, uspoređujući s bačvama srednjeg paljenja.

#### 4.4. UTJECAJ RAZLIČITIH VINSKIH POSUDA NA AROMATSKI PROFIL VINA

Kiseline su jedan od najznačajnijih pokazatelja kakvoće vina, jer utječu na njegov sastav te organoleptička svojstva. U vinu potiču ili iz sirovine ili nastaju alkoholnom fermentacijom. Kiseline koje su identificirane u Merlot vinu su: octena, kapronska, laurinska, miristinska i palmitinska kiselina pri čemu je octena prisutna u najvišoj koncentraciji. Iz rezultata se može vidjeti kako dobivene vrijednosti značajno variraju s obzirom na posudu u kojoj je vino odležalo. Najveća vrijednost ukupnih kiselina dobivena je u uzorku vina čuvanom u hrastovoj posudi s jakim paljenjem većeg volumena i iznosi čak 2316,9  $\mu\text{g/L}$ , dok je najmanja vrijednost zabilježena u inoks posudi sa samo 323,6  $\mu\text{g/L}$ , a razlog tome je udio octene kiseline. Udio ostalih kiselina varira, ovisno o posudi u kojoj je vino odležavalo. Vino iz inoks posude sadržavalo je najveću količinu dekanske kiseline (107,2  $\mu\text{g/L}$ ), ali u tom uzorku, kao i u Merlot 500 LT te Merlot 500 MT, palmitinska kiselina nije detektirana. Najviša koncentracija laurinske kiseline (38,3  $\mu\text{g/L}$ ) izmjerena je u uzorku Merlot 500 LT, a miristinske (110,7  $\mu\text{g/L}$ ) u Merlot 500 HT.

Viši alkoholi također doprinose aromatskom profilu vina i proizvode se metabolizmom kvasaca kao sekundarni produkti. Oni vidljivi u uzorku su: izoamilni alkohol, 2,3-butandiol i heksan-1-ol. Znatno veći udio izoamilnog alkohola je prisutan u usporedbi s preostala dva, tako da je njegova koncentracija znatno utjecala na ukupnu koncentraciju viših alkohola. Najviša ukupna koncentracija alkohola izmjerena je u uzorku Merlot 500 MT (60,2 mg/L), gdje su izmjerene i najviše koncentracije sva tri navedena alkohola. Manji volumen bačve te inoks posuda rezultirali su nižim koncentracijama viših alkohola.

Terpeni su odgovorni za primarnu aromu grožđa. Aroma je uglavnom cvjetno voćna kao što možemo vidjeti u **Tablici 4**. Jedan od terpena prisutan u analiziranom uzorku Merlot vina je linalool koji je prisutan u velikim količinama u inoks posudi i hrastovim bačvama s većim intenzitetom paljenja, dok bačvama s laganim paljenjem te bačvi 500 MT nije detektiran. Nadalje,  $\beta$ -damascenon koji je prisutan samo u inoks posudi (30,6  $\mu\text{g/L}$ ). U uzorku Merlot 225 MT izmjerena je najviša koncentracija  $\alpha$ -jonona i  $\beta$ -jonona (31,2 i 31,5  $\mu\text{g/L}$ ). Najviša ukupna koncentracija terpena izmjerena je u vinu odležanom u hrastovoj posudi jakog paljenja i manjeg volumena (225 HT) te inoks posudi.

Esteri su produkti reakcije acetyl-CoA s višim alkoholima koji nastaju degradacijom aminokiselina ili ugljikohidrata, a vinima daju voćnu aromu. U uzorcima vina identificirana je

veliki broj estera: etil-heksanoat, dietil-sukcinat (prisutan u najvišoj koncentraciji u svih 7 posuda), fenil etil-acetat, etil-dekanoat, etil izopentil-sukcinat, etil-laurat, izoamil-dekanoat, heksil-salicilat, etil-miristat, izopropil-miristat, diizobutil-ftalat, etil-pentadekanoat, dibutil-ftalat i etil-palmitat. Najveći udio estera zabilježen je u bačvi jakog paljenja većeg volumena i iznosi 15 mg/L, dok je najmanja količina od samo 6,9 mg/L identificirana u inoks posudi. Najveći utjecaj na ukupnu koncentraciju estera imao je dietil-sukcinat kojeg je u svim uzorcima bilo od 6 do 14 mg/L te etil izopentil-sukcinat s 0,4 do 0,8 mg/L. Najviše koncentracije oba estera izmjerene su u uzorku Merlot 500 HT (13,7 mg/L dietil-sukcinata i 0,76 mg/L etil-izopentil sukcinata). Ostali esteri su imali niže koncentracije, a one su se razlikovale među uzorcima s obzirom na tip posude za odležavanje vina. Koncentracija fenetil-acetata, etil-dekanoata te dibutil-ftalata je bila najviša u barrique bačvi s laganim paljenjem (225 LT), a etil-pentadekanoata u bačvi istog volumena, ali s jakim paljenjem. Iako su najviše koncentracije etil-laurata i heksil-salicilata izmjerene u Merlot 500 MT, a etil-heksanoata u Merlot 500 LT, koncentracije svih ostalih estera su bile najviše u Merlot 500 HT.

Skupina hlapivih fenola sadržavala je 3 spoja: 4-etil fenol, 4-etil gvajakol i 2,4-Di-T-butil fenol. Prva dva su produkti divljeg kvasca *Brettanomyces*, a prekomjerne količine ovih spojeva u vinu (preko 230 µg/L za 4-etilfenol te preko 47 µg/L za 4-etilgvajakol) mogu uzrokovati kvarenje i negativno utjecati na aromu vina, dajući neugodan „brett“ miris po seoskom dvorištu, štali, konjima ili pljesnivom siru (Kheir i sur., 2013). To u ovim uzorcima nije slučaj, iako je najviša koncentracija 4-etil fenola od 215 µg/L izmjerena u uzorku Merlot 500 MT. S druge strane, 4 etil-gvajakol detektiran je samo u Merlot Inox, 225 HT i 500 MT, u koncentracijama oko 30 µg/L ili niže. Treći spoj, 2,4-Di-T-butil fenol nema izraženu aromu, ali njegova koncentracija u uzorcima je bila iznad 500 µg/L, posebice u vinu odležanom u bačvi s jakim paljenjem (500 HT), gdje je njegova koncentracija bila 742,2 µg/L.

U **Tablici 4** uz svaki spoje navedeno je kojoj aromatskoj noti ili mirisu doprinose. Stoga, na **Slikama 8, 9 i 10** prikazane su ukupne koncentracije aromatskih spojeva koji su podijeljeni na 6 skupina s obzirom na to kojem mirisu doprinose: miris po dimu i zagorenom, miris na cvijeće i zelenilo, miris na voće i citrusne, miris na mast, slab miris i ostali (miris na ocat i med). Iz **Slike 8** vidljivo je da jači intenzitet paljenja bačve rezultira višom koncentracijom spojeva koji doprinose mirisu po dimu i zagorenom. Miris na ocat ima octena kiselina, dok na med ima etil-pentadekanoat. Najvišu ukupnu koncentraciju navedenih spojeva imao je uzorak iz bačve od

500 L s jakim paljenjem (2137,6 µg/L). **Slika 9** prikazuje ukupnu koncentraciju skupine spojeva koji doprinose mirisu na voće i citruse, a tih spojeva je bilo više u vinima odležanim u bačvama većeg volumena, posebice s laganim i srednjim paljenjem (66 – 68 mg/L). U istim uzorcima izmjerena je i najviša koncentracija skupine spojeva koji doprinose mirisu na cvijeće i zelenilo, posebice u uzorku Merlot 500 HT (13,1 mg/L). Navedeni uzorak sadržavao je i najviše koncentracije spojeva koji doprinose mirisu na mast (399,3 µg/L) te spojeva koji imaju slab miris (819,1 µg/L), što je prikazano na **Slici 10**. Tim spojevima pogodovalo je jako paljenje. Nešto više koncentracije spojeva koji doprinose mirisu na mast izmjerene su i u vinu iz inoks posude (277,6 µg/L).

## **5. ZAKLJUČCI**

Na osnovu prethodno navedenih rezultata mogu se izvući sljedeći zaključci:

1. Posuda u kojoj vino odležava utječe na njegov kemijski sastav, odnosno udio elemenata u tragovima, boju vina, sadržaj fenolnih spojeva, antioksidacijsku aktivnost te aromatski profil.
2. Udio elemenata u tragovima varirao je s obzirom na tip posude, s tim da je odležavanje u inoks posudi rezultiralo višim koncentracijama kalcija, mangana, željeza, cinka i broma, nego ostali tipovi posuda. Olovo je detektirano samo u vinu iz inoks posude te hrastovoj bačvi srednjeg paljenja i volumena 500 L.
3. Ukupna boja vina prema CIELab sustavu nije se značajno razlikovala između uzoraka (nije vidljivo golim okom). Male razlike se primijete između uzoraka kada se zasebno promatraju svjetlina, zasićenost i ton boje te udio crvene/zelene i žute/plave boje.
4. Koncentracije ukupnih polifenola i flavonoida više su ukoliko vino odležava u bačvama većeg volumena i laganijeg paljenja. To isto vrijedi i za antocijane, kojima je također pogodovalo i odležavanje u inoks posudi.
5. Odležavanje vina u bačvama srednjeg paljenja rezultiralo je najvišim vrijednostima antioksidacijske aktivnosti, i to u bačvama od 225 L prema DPPH i FRAP metodi, te u bačvama od 500 L prema ABTS i CUPRAC metodi.
6. Tip posude znatno je utjecao na aromatski profil vina Merlot tijekom odležavanja. Najviše ukupne koncentracije kiselina i estera izmjerene su u vinu odležanom u hrastovoj bačvi od 500 L s jakim paljenjem.
7. Odležavanje u bačvi od 500 L sa srednjim paljenjem pogodovalo je ukupnoj koncentraciji viših alkohola, dok je najviša ukupna koncentracija terpena izmjerena u uzorku iz barrique bačve od 225 L s jakim paljenjem.
8. S obzirom kojoj aromatskoj noti doprinose, svi spojevi arome podijeljeni su u 6 skupina, i to spojevi koji doprinose mirisu na: dim i zagoreno, voće i citrusne, cvijeće i zelenilo, mast, slab miris i ostali (ocat i med).
9. Odležavanje vina u bačvama s jačim intenzitetom paljenja rezultira višim koncentracijama spojeva koji doprinose mirisu po dimu, masti, octu i medu. Slabiji intenzitet paljenja bačvi, kao i odležavanje u inoks posudi, rezultiralo je višim koncentracijama spojeva svježijih nota, s mirisom voća, citrusa, cvijeća i zelenila.

## **6. LITERATURA**

- 
- Alpeza I: Temelji kemijskog sastava vina. *Glasnik Zaštite Bilja* 31(6):143–150, 2008.
- Ames BN, Shigenaga M K, Hagen T M: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90(17):7915–22, 1993.
- Benzie IFF i Strain JJ: Ferric Reducing/Antioxidant Power assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods in Enzymology* 299:15–27, 1999.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME i Berset C: Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology* 28:25–30, 1995.
- Castaldo L, Narváez A, Izzo L, Graziani G, Gaspari A, Di Minno G i Ritieni A: Red wine Consumption and Cardiovascular health. *Molecules* 24(19):3626, 2019.
- Fazinić M i Benčić M: Merlot crni. *Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva* 60 (5-6), 1998.
- Giusti MM i Wrolstad RE: Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV - Visible Spectroscopy. U Wrolstad RE and Schwartz SJ (ur.): *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, pp. 5–69, John Wiley & Sons Inc., New York, SAD, 2001.
- González-Manzano S, Rivas-Gonzalo J, Santos-Buelga C: Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta* 513 (283-289), 2004.
- Gupta D: Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 6(2):546–566, 2015.
- Halliwell B, Gutteridge J M: The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* 18(1):125–6, 1995.
- He F, Liang N, Mu L, Pan Q, Wang J, Reeves M, Duan C: Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. *Molecules* 17(2): 1571–1601, 2012.
- Hodson G, Wilkes E, Azevedo S and Battaglene T: Methanol in wine. *BIO Web of Conferences* 9: 02028, 2017.
- Ivić I, Kopjar M, Pichler D, Buljeta I i Pichler A: Concentration with Nanofiltration of Red Wine Cabernet Sauvignon Produced from Conventionally and Ecologically Grown Grapes: Effect on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity. *Membranes* 11(5):6–8, 2021.
- Jakobek L, Šeruga M, Medvidović-Kosanović M i Novak I: *Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices*. Department of Applied Chemistry and Ecology, 2007.
- Jordão A, Vilela A i Cosme F: From Sugar of Grape to Alcohol of Wine: Sensorial Impact of Alcohol in Wine. *Beverages* 1(4):292–310, 2015.



- 
- Kheir J, Salameh D, Strehaiano P, Brandam C i Lteif R: Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts. *European Food Research and Technology* 237(5):655–671, 2013.
- Kim DO, Jeong SW i Lee CY: Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* 81:321–326, 2003.
- Kopić M: *Utjecaj ukljanjanja lišća na antioksidacijsku i antibakterijsku aktivnost ekstrakata pokožice grožđa sorti Frankovka i Merlot (Vitis vinifera L.)*. Diplomski rad. Odjel za biologiju, 2017.
- Lin J, Massonnet M, Cantu D: The genetic basis of grape and wine aroma. *Horticulture Research* 6(81), 2019.
- Maletić E, Karoglan Kontić J, Pejić I: *Vinova loza-ampelografija, ekologija, oplemenjivanja*. Školska knjiga, Zagreb, 2008.
- Markoski M., Garavaglia J., Oliveira A., Olivaes J, Marcadenti A.: Molecular Properties of Red Wine Compounds and Cardiometabolic Benefits. *Nutrition and metabolic insights* 9, 2016.
- Mirošević N i Karlogan Kontić J: *Vinogradarstvo*. Zagreb, Nakladni zavod globus, 2008.
- Ough CS i Amerine MA: *Methods analysis of musts and wines*. John Wiley & Sons Inc., New York, SAD, 1988.
- Pérez-Magariño S i González-Sanjosé ML: Application of Absorbance Values Used in Wineries for Estimating CIELAB Parameters in Red Wines. *Food Chemistry* 81(2):301–306, 2003.
- Petrović V: *Određivanje sastava eteričnog ulja nekih vrsta roda Artemisia L. plinskom kromatografijom*. Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
- Pietruszka M, Pielech-Przybylska K i Szopa JS: Synthesis of higher alcohols during alcoholic fermentation of rye mashes. *Food Chemistry and Biotechnology* 74(1081):51–64, 2010.
- Popović K: *Utjecaj koncentriranja membranskim procesima na tvori boje i arome soka od aronije*. Doktorska disertacija. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2019.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M i Rice-Evans C: Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26:1231–1237, 1999.
- Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D, Darriet P, Tovey J: *Organic Acids in Wine*. Handbook of Enology, Third Edition, 2(1-56), 2021.
- Robinson J, Harding J i Vouillamouz J: *Wine grapes*. Penguin Books, London, Velika Britanija, 2012.

---

Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR: *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*. Thomson Brooks/Cole, Thomson Higher Education, USA, 2007.

Stafilov T and Karadjova I: Methods for determination and speciation of trace elements in wine. *International Journal of Pure and Applied Chemistry* 1(2):273-305, 2006.

Tao Y, García JF i Sun D-W: Advances in Wine Aging Technologies for Enhancing Wine Quality and Accelerating Wine Aging Process. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 54(6):817–835, 2014.

Vukoja J, Pichler A i Kopjar M: Stability of Anthocyanins, Phenolics and Color of Tart Cherry Jams. *Foods* 8(7):255, 2019.

Waterhouse AL., Sacks GL, Jeffery DW: *Understanding Wine Chemistry || Aldehydes, Ketones, and Related Compounds*. Understanding Wine Chemistry (pp.79-87) 2016.

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

Web 1: <https://www.agronomija.info/vinogradarstvo/uklanjanje-bradusa-na-vinovoj-lozi> [17.4.2023.]

Web 2: <https://hr.agrolib.rs/merlot-grozde-1567> [17.4.2023.]

Web 3: <https://mozks-zzh.com/mozks/wp-content/uploads/2020/04/Gimnazija-1-Vrenje-ili-fermentacija.pdf> [17.4.2023.]

Web 4: <https://sh.wikipedia.org/wiki/Kvercetin> [18.4.2023.]

Web 5: <https://en.m.wikipedia.org/wiki/> [18.4.2023.]