

# Utjecaj koncentriranja membranskim procesom nanofiltracije na tvari boje vina Cabernet Sauvignon

---

**Marić, Barbara**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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:109:063589>

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

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

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Barbara Marić

**Utjecaj koncentriranja membranskim procesom nanofiltracije na  
tvari boje vina Cabernet Sauvignon**

diplomski rad

Osijek, rujan 2020.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

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

### Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Tehnologija vina  
**Tema rada** je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2019./2020. održanoj 27. svibnja 2020.  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Anita Pichler*  
**Pomoć pri izradi:** *Ivana Ivić*, mag. ing.

### Utjecaj koncentriranja membranskim procesom nanofiltracije na tvari boje vina Cabernet Sauvignon

*Barbara Marić*, 0113141821

#### Sažetak:

Membranski proces nanofiltracija (NF) se vrlo često koristi u vinarstvu za koncentriranje vina u svrhu korekcije njegovog kemijskog sastava. Vrlo je bitno odrediti optimalne procesne parametre tijekom tog procesa kako bi gubitci pojedinih spojevi bili što manji. Stoga, cilj ovog diplomskog rada je bio odrediti utjecaj procesnih parametara na zadržavanje tvari boje tijekom koncentriranja crnog vina Cabernet Sauvignon procesom nanofiltracije. Koncentriranje je provedeno na membranskom filteru Alfa Laval s pločastim modulom i NF M20 poliamidnim membranama, a primijenjena su četiri različita tlaka (25, 35, 45 i 55 bara) te dva temperaturna režima (s i bez primjene hlađenja). U početnom uzorku vina i dobivenim retentatima spektrofotometrijski te pomoću metode tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) određeni su ukupni polifenoli, flavonoidi, antocijani, polimerna boja, antioksidacijska aktivnost, fenolne kiseline te katehinski spojevi. Nanofiltracijske membrane zadržavaju visok postotak svih spojeva, s tim da je zadržavanje bilo veće ukoliko je primijenjen veći transmembranski tlak. Suprotan učinak zabilježen je povećanjem temperature retentata i smanjenjem tlaka. Iz tog razloga, najveće zadržavanje tvari boje detektirano je u retentatu dobivenom nanofiltracijom na 55 bara uz primjenu hlađenja.

**Ključne riječi:** crno vino Cabernet Sauvignon, koncentriranje, nanofiltracija, polifenolni spojevi

**Rad sadrži:** 53 stranica  
17 slika  
6 tablica  
0 priloga  
62 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. izv. prof. dr. sc. <i>Anita Pichler</i>	član-mentor
3. prof. dr. sc. <i>Nela Nedić Tiban</i>	član
4. doc. dr. sc. <i>Ante Lončarić</i>	zamjena člana

**Datum obrane:** 28. rujna 2020.

**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. VII held on May 27, 2020.  
**Mentor:** *Anita Pichler*, PhD, associate prof.  
**Technical assistance:** *Name and surname*, title

**Influence of membrane concentration by nanofiltration on colour compounds of Cabernet Sauvignon red wine variety**

*Barbara Marić*, 0113141821

### Summary:

Nanofiltration (NF) process is very often used in winemaking for wine concentration in order to achieve desired chemical composition of wine. It is very important to determine the optimal process parameters so that the losses of individual compounds are minimized. Therefore, the aim of this thesis was to determine the influence of process parameters on the retention of colour compounds during the concentration of Cabernet Sauvignon red wine variety by nanofiltration. Concentration was performed on an Alfa Laval plate-and-frame membrane filter and NF M20 polyamide membranes, where four different pressures (25, 35, 45 and 55 bar) and two temperature regimes (with and without cooling) were applied. Total polyphenols, flavonoids, anthocyanins, polymer colour, antioxidant activity, phenolic acids and catechin compounds were determined spectrophotometrically and by high performance liquid chromatography (HPLC) in the initial wine and the obtained retentates. Nanofiltration membranes retain a high percentage of all compounds, with the retention being higher if a higher transmembrane pressure was applied. The opposite effect was observed by increasing the retentate temperature and decreasing the pressure. For this reason, the highest retention of the colour compounds was detected in the retentate obtained by nanofiltration at 55 bar with cooling.

**Key words:** Cabernet Sauvignon red wine, concentration, nanofiltration, polyphenols

**Thesis contains:** 53 pages  
17 figures  
6 tables  
0 supplements  
62 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

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

**Defense date:** September 28, 2020

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

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GLAVNI DIO.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. GROŽĐE .....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Podrijetlo i botanička svojstva vinove loze .....	4
2.1.2. Mehanički i kemijski sastav .....	4
<b>2.2. VINO .....</b>	<b>7</b>
2.2.1. Definicija vina .....	7
2.2.2. Crno vino .....	7
<b>2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA .....</b>	<b>8</b>
2.3.1. Voda .....	8
2.3.2. Alkoholi .....	8
2.3.3. Šećeri .....	10
2.3.4. Kiseline .....	11
2.3.5. Esteri .....	12
2.3.6. Aldehidi i ketoni .....	12
2.3.7. Polifenoli .....	12
2.3.8. Tvari arome .....	16
2.3.9. Antioksidativna aktivnost.....	17
<b>2.4. MEMBRANSKI PROCESI .....</b>	<b>19</b>
2.4.1. Mikrofiltracija .....	20
2.4.2. Ultrafiltracija .....	21
2.4.3. Nanofiltracija.....	21
2.4.4. Reverzna osmoza .....	21
2.4.5. Vrste membrana .....	22
2.4.6. Vrste modula.....	23
2.4.7. Membranski procesi u vinarstvu .....	24
<b>2.5. Kromatografske tehnike.....</b>	<b>25</b>
2.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) .....	25
2.5.2. Plinska kromatografija .....	26
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. ZADATAK.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>29</b>
3.2.1. Priprema koncentriranog vina Cabernet Sauvignon .....	29
3.2.2. Spektrofotometrijska analiza tvari boje .....	31
3.2.3. Određivanje polifenola HPLC metodom .....	35
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1. GRAFIČKI PRIKAZI ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA .....</b>	<b>39</b>
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>42</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>47</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>49</b>

## **1. UVOD**

Vino je proizvod koji se dobiva od grožđa koje pripada porodici *Ampelideae* te rodu *Vitis*. Grožđe se zbog svojih kemijskih, senzorskih, fizioloških i drugih svojstava može koristiti u svježem stanju, ali se koristi i kao sirovina za proizvodnju vina, bezalkoholnih i alkoholnih pića (Andabak, 2017). Vino se dobiva alkoholnim vrenjem mošta ili masulja uz pomoć kvasaca koji provode alkoholnu fermentaciju pod određenim uvjetima. Kemijski sastav vina je izričito kompleksan; tu se ubrajaju: ugljikohidrati, esteri, alkoholi, ketoni i aldehidi, fenolni spojevi, tvari arome, kiseline i mineralne tvari (Lytra, 2013). U kompleksnom sastavu vina posebno se ističu polifenoli. Ovisno o tehnologiji, preradom grožđa polifenoli se u većoj ili manjoj mjeri prenose u vino te na taj način stvaraju komplekse koji pridonose kvaliteti vina. Uz polifenole ističu se i antocijani koji pripadaju flavonoidnoj grupi polifenola. Antocijani nisu samo glavni nositelji boje vina nego oni imaju i pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje, koji se očituje u njihovom antioksidacijskom djelovanju. Može se reći da je vino bogat izvor različitih skupina polifenola koje uključuju flavonoide, fenolne kiseline i trihidroksistilben-resveratrol. Danas je potaknuto veliko zanimanje za ove spojeve jer su dokazani njihovi pozitivni učinci na zdravlje čovjeka. Postoji značajan broj metoda kojim se određuju polifenoli i tvari boje u vinu, a one uključuju: kromatografske metode, elektrokemijske i spektrofotometrijske metode (Rastija i Medić-Šarić, 2009). Nanofiltracija je tehnologija koja je u usponu proteklih nekoliko godina. To je tlačni membranski proces koji se najviše koristi za čišćenje vode, ali se može koristiti u proizvodnji hrane i pića. Veličina pora membrana za nanofiltraciju iznose od 1 nm do 10 nm te je upravo po tome ovaj proces dobio naziv nanofiltracija. Za razliku od reverzne osmoze, membrane za nanofiltraciju propuštaju manje organske i anorganske molekule te zbog toga permeat nije čista voda. Potrebni tlak za nanofiltraciju je 10 do 40 bara (Rukavina, 2016).

Zadatak rada je ispitati utjecaj koncentriranja postupkom nanofiltracije, odnosno istražiti utjecaj procesnih parametara tlaka i temperature na tvari boje vina Cabernet Sauvignon.

## **2. GLAVNI DIO**



## 2.1. GROŽĐE

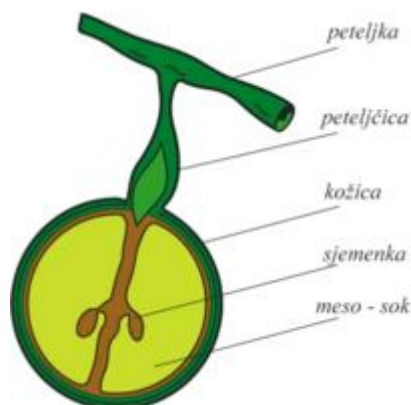
### 2.1.1. Podrijetlo i botanička svojstva vinove loze

Vinova loza (*Vitis vinifera*) pripada među najranije kultivirane biljne vrste. *Vitis vinifera* potječe od divlje euroazijske loze *Vitis sylvestris*. Sami rod *Vitis* je jako veliki jer sadržava više desetaka vrsta, a većina ih je vezana za Sjevernu Ameriku. *Vitis vinifera* pripada porodici *Vitaceae*, sama porodica sadrži 11 rodova s oko 600 vrsta. Samo pripadnici roda *Vitis* mogu nositi naziv vinova loza (Prce, 2014). Loza se ubraja u porodicu *Ampelideae*. Za biljke iz ove porodice karakteristično je da su to povijuše vitkog stabla koje traže potporanj uz koji se oslanjaju i penju, a biljka se učvršćuje viticama za potporanj ili puže po zemlji. Cvjetovi vinove loze skupljeni su u cvat ili grozd i cvjetovi mogu biti dvospolni ili jednospolni. Porodica *Ampelideae* prilično je velika i grana se na 10 rodova: *Landukia*, *Pterisanthes*, *Ampelocisus*, *Vitis* i *Rhoicissus Cissus*. Za vinogradarstvo najvažniji je rod *Vitis*, koji sadrži 2 podroda, a to su *Euvitis* i *Muscadinia*. Sami podrod *Euvitis* obuhvaća oko 40 azijskih i 30 američkih vrsta, te samo jednu euroazijsku. Od azijskih vrsta najvažnija je *Vitis amuransis*, a od američkih za vinogradarski značaj imaju samo one koje se u obliku hibrida koriste kao podloge za europsku vinovu lozu. Najpoznatije američke vrste su: *Vitis riparia*, *Vitis berlandieri* i *Vitis rupestris* (Andabak, 2017; Licul i Premužić, 1997). Osim američkog hibrida vrlo česti je i francusko-američki hibrid. Hibridi su ili nastali slučajnim oprašivanjem ili su čak dobiveni namjerno jer kao takvi su otporniji na različite klimatske uvjete, ali su također otporni i na peronosporu, filokseru i pepelnicu (Zoričić, 1996).

### 2.1.2. Mehanički i kemijski sastav

Mehanički vinova loza se dijeli na generativne organe (cvat, cvijet, vitice, grozd, sjemenke i bobice) te na vegetativne organe (stablo, mladice, korijen, lišće i rozgva). Uloga korijena je da učvršćuje trs za tlo te da mu daje stabilnost. Korijen je također bitan za skladištenje rezervnih hranjivih tvari te za sintezu organskih spojeva, a ujedno opskrbljuje nadzemne dijelove s vodom i mineralnim tvarima. Lišće na stabljici služi za transpiraciju, fotosintezu i za disanje. Stabljika služi za provođenje asimilata od lista prema korijenu te za prijenos vode i mineralnih tvari od korijena do lista. Na samoj zelenoj stapci nalazi se cvijet koji se pri vrhu proširuje i čini cvjetnu ložu. Nakon završene cvatnje, točnije nakon oplodnje i oblikovanja

bobica razvija se grozd (Vrdoljak, 2009). Kod grozda razlikujemo dva dijela, a to su bobice, koje se sastoje od sjemenke mesa i kožice, i peteljkovina (Maletić i sur., 2008).



Slika 1 Presjek bobice (Vrdoljak, 2009)

### Dijelovi bobice

#### Kožica

Kod kožice bobice razlikujemo šest do čak deset slojeva. Voštani sloj na površini kožice ili mašak bobici daje sjajni i baršunasti izgled. Mašak na svojoj površini ujedno sadrži i mikroorganizme (kvasce i bakterije) koji potpomažu kasnije u fermentaciji. Kemijski sastav kožice ima veliki značaj jer uvelike pridonosi kvaliteti vina. Kožica bobice vinu daje tvari mirisa, boje i okusa. Postoji razlika između kožice crnih i bijelih sorata, jer je kožica crnih sorti bogatija polifenolima (Mirošević i Karlogan Kontić, 200).

Tablica 1 Kemijski sastav kožice (Zoričić, 1996)

voda	60-80%
celuloza	3-4%
mineralne tvari	2-4%
šećeri	1-3%
kiseline	3-7%
pepeo	0.3-3%
dušične tvari	1.5-5.2%
tvari boje	1-15% (najveći udio odnosi se na polifenole)

## Sjemenka

Većina sorata sadrži 2 do 7 sjemenki, no neke sorte su i bez sjemenki. Dijelovi sjemenke su masna jezgra, koja je okružena drvenom ljuskom na čijoj se površini nalazi taninska kutikula (Zoričić, 1996).

**Tablica 2** Kemijski sastav sjemenke (Zoričić, 1996)

tanini	3-6%
voda	25-50%
Ugljikohidrati (većinom celuloza)	30-35%
ulje	12-20%
Mineralne tvari	2-5%

Iz **Tablice 2** vidljivo je da u sjemenci, ako isključimo vodu, najveći udio odnosi se na ugljikohidrate i ulje. Ulje sjemenki grožđa vrlo je cijenjeno i najčešće se koristi za proizvodnju kozmetičkih preparata (Zoričić, 1996).

## Meso bobice

Najveći udio bobice zauzima meso, i to oko 75-85% same težine bobice. Meso bobice sastoji se od velikih stanica koje su obavijene izvana celuloznom pektinskom membranom, dok je unutrašnjost ispunjena sokom. Meso bobice možemo razlikovati prema sastavu i strukturi, te na temelju ovih razlika meso bobice se može podijeliti u tri zone: periferna, središnja i međuzona. Najviše vinske kiseline i šećera može se pronaći u međuzoni dok sadržaj jabučne kiseline raste od periferije prema samom središtu bobice (Zoričić, 1996).

**Tablica 3** Kemijski sastav mesa bobice (Zoričić, 1996)

voda	75-80%
šećeri	18-25%
kiselina (organska)	0.5%
mineralne tvari	0.3-1%
celuloza	0.6%

## Peteljkovina

Sastoji se od peteljčica i peteljki. Peteljčica nosi cvijet, a nakon oplodnje i bobicu. Proizvodi asimilacije putem peteljkovine dospijevaju u bobicu. Udio peteljkovine u grozdu iznosi 2-5% i također svojim kemijskim sastavom utječe na kvalitetu konačnog proizvoda – vina (Andabak 2017; Zagorščak, 2011).

## **2.2. VINO**

### **2.2.1. Definicija vina**

Vino je kompleksan proizvod, a ujedno i jedno od najstarijih prirodnih pića. U vinu je alkohol kvantitativno najzastupljeniji sastojak, ali vino također sadrži i stotine drugih spojeva različitih kemijskih struktura i svojstava. Grožđe je najbitnija stavka kvalitete vina, jer je ono najvažniji izvor kemijskog sastava i senzorskih svojstava, ali nije i jedini faktor koji uvjetuje kvalitetu vina. U obzir se moraju uzeti i uvjeti dozrijevanja vina i tehnologija proizvodnje (Alpeza, 2008). Prema Zakonu o vinu (NN, 32/2019), vino je poljoprivredni prehrambeni proizvod dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem mošta ili masulja, od svježeg i za preradu pogodnog grožđa. Pod grožđem se podrazumijeva zdrav, zreo, prezreo, prosušen ili prirodno zamrznut plod vinove loze priznatih kultivara namijenjen proizvodnji vina ili drugih proizvoda od grožđa i vina, a čiji sok sadrži minimalnu količinu šećera od 64° Oechsla.

### **2.2.2. Crno vino**

Crno vino se proizvodi vrenjem masulja, odnosno procesom vinifikacije. Prilikom vinifikacije ekstrahira se boja iz pokožice i optimalna količina tanina te o tome ovisi i kvaliteta vina. Parametri o kojima ovisi ekstrakcija boje iz kožice su: sadržaj alkohola, temperatura, sadržaj boje u grožđu, vrijeme zadržavanja pod kljukom, potapanje klobuka, miješanje komine tijekom fermentacije, umjereno sumporenje kljuka i prethodna maceracija kljuka. Postoje dva načina na koja se može provoditi vinifikacija, a to su: zatvorena fermentacija sa potopljenom kominom i otvorena fermentacija. Do najintenzivnije ekstrakcije boje dolazi u

prvih 3 - 5 dana vrenja nakon čega završava ekstrakcija boje. Nakon ovog perioda dolazi do intenzivnijeg povećanja sadržaja tanina, te vino poprima trpak i opor okus. Zbog toga se nakon 3 - 5 dana vrenje masulja prekida i slijedi prešanje, ako se masulj predugo ostavi na vrenju, neće se postići veća ekstrakcija boja nego će doći do gubitka boje (Pozderović, 2013).

### **2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA**

Mnoštvo čimbenika utječe na kemijski sastav vina, ali najvažniji čimbenik jest sastav grožđa, dozrelost grožđa, zdravstveno stanje, način prerade te klimatski uvjeti prethodnih godina. Razlikujemo i stalne čimbenike poput položaja, sorte ili načina uzgoja. Kemijski sastav mošta ponajviše će utjecati na kvalitetu vina (Pozderović, 2010).

#### **2.3.1. Voda**

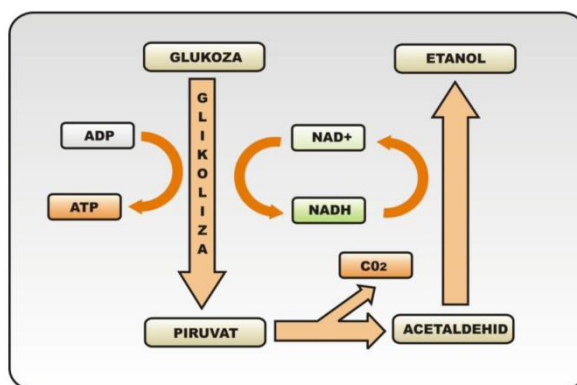
Glavni sastojak u vinu je voda, a njen se udio može mijenjati s obzirom na alkohol. Kod vina s oko 12% vol. alkohola na vodu će otpasti udio od oko 85%. Veliki udio vode ujedno znači i velika sposobnost otapanja različitih spojeva u vinu, prvenstveno kiselina, alkohola i soli, te manje količine voska i ulja ili drugih komponenti sličnog sastava. Ulje i vosak su teški spojevi, ali ti se spojevi ne nalaze u vinu zbog tehnologije koja ograničava pucanje sjemenke, jer sjemenka sadrži najviše ulja, ali i zbog njihove ograničene topivosti u vodi (Alpeza, 2008).

#### **2.3.2. Alkoholi**

U vinu razlikujemo veliki broj različitih alkohola i oni se mogu svrstati u dvije osnovne skupine: aromatske i alifatske. Alifatski alkoholi se mogu podijeliti na viševalentne i monovalentne. Najvažniji alkohol u vinu je etanol, a uz njega je također najzastupljeniji i metanol. Etilni alkohol nastaje fermentacijom šećera uz pomoć kvasca. Fermentacijom nastaje i CO<sub>2</sub> koji hlapi te zbog toga se vrlo mali udio otapa u vinu. Udio alkohola mijenja i fizikalna svojstva vode jer s povećanim udjelom alkohola smanjuje se viskozitet, ali s druge strane dolazi do povećanja topivosti (Alpeza, 2008). Koliko će nastati etilnog alkohola ovisi o udjelu šećera u grožđu i moštu (Vrdoljak, 2009).

Metilni alkohol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) ne nastaje kao produkt fermentacije. U vinu ga možemo naći kao nusprodukt. Hidrolizom pektinskih tvari nastaje metanol jer se pektinske tvari nalaze u čvrstim dijelovima grožđa poput peteljkovine ili sjemenke. Sorte grožđa koje sadrže veći udio pektina davat će i vina s većim udjelom metanola. Tehnologija proizvodnje crnih vina temelji se na fermentaciji masulja te zbog toga će crna vina imati veći udio metanola u odnosu na bijela vina (Herjavec, 1990). Metanol je toksičan te može i oksidirati i preći u formaldehid i mravlju kiselinu koji su toksični za centralni živčani sustav. U vinima koja dobijemo od plemenitih sorti grožđa, sadržaj metanola ne smije prelaziti granicu od 350 mg/kg. Ukoliko se vina proizvode od hibridnih sorti grožđa, takva vina sadrže visok udio metanola te su ujedno i toksična i zato ih je zabranjeno proizvoditi. Otopina etanola i metanola smanjuje otrovnost (vino) (Andabak, 2017; Zoričić, 1996). Udio metanola u vinu kreće se od 0.18 do 0.44% u odnosu na količinu ekstrakta (Planinić, 1998).

Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) je proizvod alkoholne fermentacije šećera iz grožđa uz pomoć vinskih kvasaca. Fermentacija je složeni proces pretvorbe šećera glikolizom do piruvata, a zatim dekarboksilacijom piruvata u acetaldehid i njegova redukcija u etanol (Grba, 2000).



**Slika 2** Prikaz alkoholnog vrenja (Stehlik-Tomas, 2016)

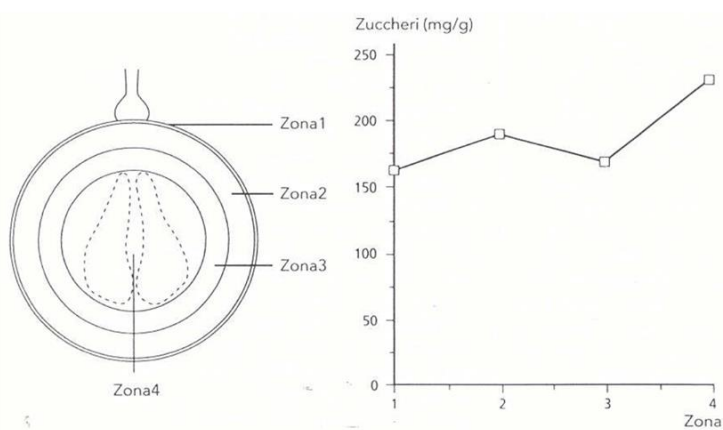
U proizvodnji pića i hrane najčešće se upotrebljavaju kvasci iz roda *Saccharomyces*. Iz ovog roda najpoznatiji je *S. Cerevisiae* čiji se sojevi danas najčešće koriste u proizvodnji hrane, vina, kruha, piva i jakih alkoholnih pića (Šumanovac, 2016).

Izomere viših alkohola poput, butilnog, propilnog, heptilnog ili heksilnog, možemo naći u minimalnim količinama u vinu. Značajnu ulogu u formiranju arome vina imaju terpeni

alkoholi. Od aromatskih alkohola u vinima se može naći benzil alkohol, tirozol i feniletanol (Planinić, 1998).

### 2.3.3. Šećeri

Šećeri predstavljaju osnovni sastojak grožđa, a nastaju procesom fotosinteze. Fotosinteza je proces u kojem pod utjecajem sunčeve svjetlosti, klorofila i ugljikovog dioksida (CO<sub>2</sub>) u zelenoj bobici i listu prvo dolazi do stvaranja škroba koji dalje prelazi u šećer. Najveći dio šećera se stvara u listu, a manji dio se stvara u bobici, ali samo dok je ona zelena jer sadrži u tom trenutku klorofil (Roger, 2008). Udio šećera u grožđu iznosi u prosjeku 15 do 25% (150-250 g/L). Grožđe napadnuto plemenitom plijesni (*Botrytis cinerea*) ili grožđe izborne berbe može imati i veći udio šećera i preko 300 g/L. Na ukupni udio šećera utječu: sorta, klima, stupanj zrelosti, agrotehničke mjere, štetočine, bolesti ili elementarne nepogode (Pozderović, 2010).



**Slika 3** Raspored šećera unutar bobice (Possner i Kliewer, 1985)

Vrlo je značajan i raspored šećera u bobici, a unutrašnjost bobice se može podijeliti u četiri zone. Zone bogate šećerom su centralna i periferna zona, a središnja zona je siromašnija šećerom. S obzirom na raspodjelu šećera mogu se utvrditi i razlike na samome grozdu. One bobice koje se nalaze bliže peteljci imaju veći sadržaj šećera jer one prve dobivaju hranjive tvari s obzirom na bobice na suprotnom dijelu grozda (Possner i Kliewer, 1985). Najzastupljeniji šećeru su monosaharidi, a najveći udio otpada na D-fruktozu i D-glukozu. Omjer glukoza:fruktoza iznosi 1.5. Tijekom dozrijevanja dolazi do povećanja udjela fruktoze, te je u dozrijelom grožđu omjer glukoza:fruktoza jednak 1 (Zagorščak, 2011).

Sama glukoza (groždani šećer, dekstroza) podložna je mikrobiološkoj razgradnji. U fermentaciji glukoze najviše se ističu kvasci roda *Saccharomyces* te *Kloeckera*. Fruktosa (levuloza, voćni šećer) je vrlo rašireni šećer među biljkama i vrlo često dolazi uz glukozu. Fruktosa se također može fermentirati uz pomoć mikroorganizama, a podložna je octenoj, alkoholnoj, manitnoj te mliječnoj fermentaciji (Tondini i sur., 2020).

U vinu šećer služi za balansiranje okusa te se u vinarstvu često koriste ciljani prekidi fermentacije kako bi u vinu ostao određeni udio šećera (do desetak g/L, ovisno o sorti). Šećer reducira trpkost, gorčinu i kiselost. Namjerno dodavanje šećera u vino je strogo zabranjeno, osim kod nekih specijalnih vina (Alpeza, 2008).

#### **2.3.4. Kiseline**

Kiselost u vinu uzrokuju kiseline i njihove soli koje mogu biti u vezanom ili slobodnom obliku. Od većeg značaja u vinu su: vinska, jabučna, limunska i jantarna. Kiseline nastaju nepotpunom oksidacijom šećera u bobicama grožđa te iz bobica prelaze preko mošta u vino. Samo vino manje je kiselo od mošta jer tijekom vrenja i dozrijevanja u vinu dolazi do smanjenja pojedinih kiselina (Andabak, 2017). U moštu koncentracija kiselina se kreće od 5 g/L do 12 g/L. Tijekom razvoja bobice i dozrijevanja grožđa sama kiselost se mijenja. U početku razvoja bobice kiselost ide do svoga maksimuma te pojavom šare dolazi do velikog pada koncentracija kiselina. Tijekom daljnjeg dozrijevanja kiselost se smanjuje što je uvjetovano potpunom oksidacijom kiselina u CO<sub>2</sub> i vodu, a djelomično i zbog neutralizacije kiselina s alkalnim hranjivim tvarima iz tla te dijelom zbog disanja bobice. Kod vezanja s alkalima iz tla dio kiselina će se vezati s magnezijem i kalcijem, a u najvećoj koncentraciji je zastupljen kiselini tartarat (Zoričić, 1996). Grožđe zaraženo *Botrytisom* ima veće koncentracije glukonske kiseline. Kao sekundarni produkt fermentacije u vinu se može pronaći mliječna kiselina, ali veće koncentracije mliječne kiseline javljaju se u pokvarenom vinu metabolizmom mliječno-kiselinskih bakterija, dok octena kiselina služi za raspoznavanje bolesnih vina (Zagorščak, 2011). Postoje 2 temeljna načina mjerenja kiselosti u vinu, a to su ukupna titracijska kiselost koja se izražava u g/L vinske kiseline koja je ujedno i najjača kiselina i najčešće iznosi 5 i 6 g/L, te pH vrijednost (između 3 i 4). Kiselinski sastav je bitan za



senzorsku kakvoću vina, a ujedno doprinosi i stabilnosti vina te je zbog toga dopušteno dodavanje kiselina i to pretežno vinske (Alpeza, 2008).

### **2.3.5. Esteri**

U vinu esteri nastaju reverzibilnom reakcijom kiselina i alkohola enzimatskom esterifikacijom tijekom fermentacije te kemijskom esterifikacijom tijekom dugotrajnog starenja i odležavanja. U grožđu koncentracija estera je niska dok se ona u vinima povećava. Od estera najviše ima: etil estera, dietil sukcinata, dietil malata, dietil tartarata te nešto manje količine estera jabučne, jantarne i vinske kiseline (Planinić, 1998). U vinu razlikujemo dvije grupe estera: voćni esteri, koji nastaju tijekom alkoholne fermentacije i oni koji nastaju tijekom dozrijevanja vina (Alpeza, 2008).

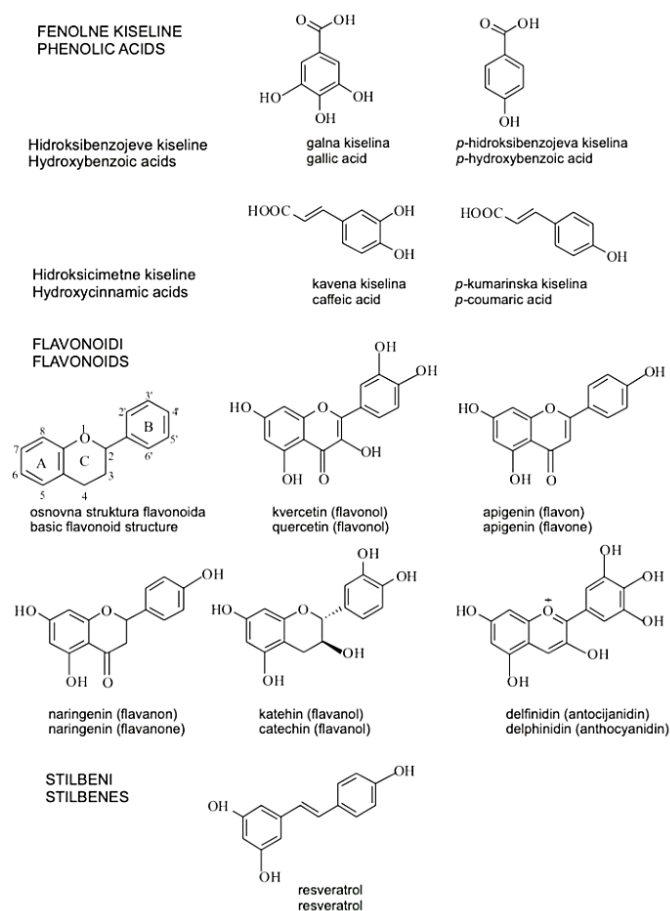
### **2.3.6. Aldehidi i ketoni**

Aldehidi i ketoni imaju najveći utjecaj na senzorska svojstva vina jer tvore karakteristične arome i bouquet vina, ali mogu tvoriti i neke nepoželjne mirise. Ovi spojevi su vrlo reaktivni i mogu lako oksidirati u karboksilne kiseline, inaktiviraju se dodatkom sumporaste kiseline te se upravo zbog ovoga provodi sumporenje bačvi (Prce, 2014). U čistom obliku aldehidi daju miris koji podsjeća na voće. Alkoholnim vrenjem nastaju novi aldehidi i to većinom acetaldehid. Ketona u vinu nema puno, najviše ima: acetona, diacetila i acetoina. Ketoni imaju miris svježeg maslaca te zbog toga pridonose mirisu užeglosti (Zagorščak, 2011).

### **2.3.7. Polifenoli**

Polifenoli spadaju u skupinu molekula biljnog podrijetla. Kemijsku strukturu polifenola čini aromatski prsten na koju je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (-OH). U najvećim koncentracijama se nalaze u povrću, voću, vinu, čaju, kavi te u voćnim sokovima i upravo zbog toga čine uobičajenu sastavnicu ljudske prehrane. Tijekom procesa vinifikacije polifenoli iz kožice sjemenki i usplođa crnog grožđa mogu se ekstrahirati u crno vino tijekom procesa vinifikacije. Količina i sastav polifenola ponajviše ovisi o sorti grožđa, postupcima uzgoja vinove loze, klimatskim uvjetima te o tehnologiji proizvodnje vina (Rastija i Medić-

Šarić, 2009). Sadržaj fenola u vinu odnosi se na fenolne spojeve - prirodni fenoli i polifenole u vinu koji uključuju veliku skupinu od nekoliko stotina kemijskih spojeva koji utječu na okus, boju i osjećaj vina u ustima. Ti spojevi uključuju fenolne kiseline, stilbenoide, flavonole, dihidroflavonole, antocijanine, monomere flavanola (katehine) i polimere flavanola (proantocijanidini). Ova velika skupina prirodnih fenola može se široko podijeliti u dvije kategorije, flavonoide i neflavonoide. Flavonoidi uključuju antocijane i tanine koji doprinose boji vina i osjećaju trpkosti u ustima. Neflavonoidi uključuju stilbenoide poput resveratrola i fenolne kiseline poput benzojeve, kofeinske i cimetne kiseline. Od neflavonoida najznačajnije su fenolne kiseline koje su najčešće derivati cimetne (C6-C3) kiseline i benzojeve (C6-C1) kiseline. Fenolne kiseline se vrlo rijetko javljaju u slobodnom obliku, uglavnom su esterificirane kina kiselinom ili vinskom kiselinom (Popović, 2019). Polifenolni spojevi sudjeluju u raznim kemijskim reakcijama koje se odvijaju tijekom zrenja i prilikom dozrijevanja voća također su uključeni i u mehanizme formiranja okusa, boje i arome koja je karakteristična za pojedino voće (Dubrović, 2012).



**Slika 4** Strukturne formule nekih polifenola prisutnih u vinu (Rastija i Medić-Šarić, 2009)

Postoji više razloga za određivanje i identifikaciju polifenola u vinu. Polifenoli imaju veliki utjecaj na osjetilne karakteristike poput: arome, boje, oporost i gorčinu, a zbog toga ujedno imaju veliki utjecaj na kvalitetu vina. Brojna istraživanja su pokazala da hrana bogata polifenolima pozitivno utječe na ljudsko zdravlje i to najvećim dijelom zbog antioksidacijskog učinka polifenola. Vina, pogotovo crna, sadrže veće koncentracije polifenolnih tvari (od 1000 mg/L do 1300 mg/L) koje pokazuju brojne biološke učinke. Istraživanja su ujedno pokazala da antioksidacijsko djelovanje polifenolnih tvari štiti od nastanka koronarnih bolesti i ateroskleroze te se smatra da umjerena konzumacija vina smanjuje mogućnost pojave tih bolesti. Dokazano je i protuupalno i antikancerogeno te antimikrobno djelovanje tih tvari. Na temelju toga se razvija razni broj metoda pomoću kojih se nastoje otkriti biološko aktivne supstance u vinu. U svrhu identifikacije ovih tvari najčešće metode koje se koriste su: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), tankoslojna kromatografija (TLC), a u današnje vrijeme se sve više koriste vezani sustavi plinske i tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa, kapilarna elektroforeza, tekućinske kromatografije s nuklearnom magnetskom rezonancijom te ciklička voltametrija pomoću koje je moguće brzo detektirati fenolne antioksidanse u hrani, ali i u drugim fiziološkim sustavima poput urina ili krvi (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

#### **2.3.7.1. Flavonoidi**

Flavonoidi čine grupu najraširenijih prirodnih, složenih polifenola. Karakteristični su uglavnom za crna vina, dok u bijelim najviše prevladavaju neflavonoidi. Flavonoidi su žuti pigmenti koje se nalaze u kožici grožđa (Jakobek, 2007).

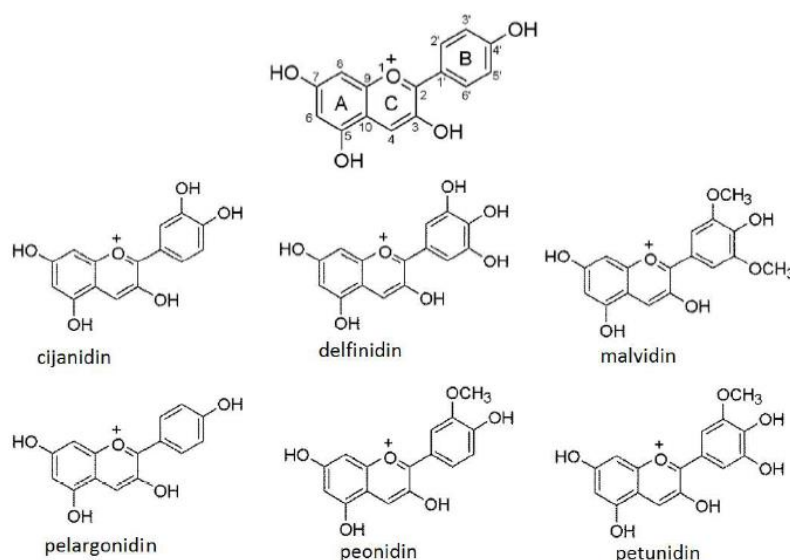
#### **2.3.7.2. Flavanoli i proantocijanidini**

Flavanoli ili flavan-3-oli se vrlo često nazivaju i katehinima. Od ostalih flavonoida se razlikuju po tome što nemaju dvostruku vezu između C2 i C3 atoma. Na C4 u heterocikličkom prstenu ne postoji kisik te im je ovakva struktura zajednička s antocijanidinima. Ovakve osobine te hidroksilacija na C3 omogućavaju im da sadrže dva kiralna centra na C2 i C3 ugljikovu atomu te četiri moguća diastereoizomera. Epikatehin je izomer s *cis* konfiguracijom, a katehin s *trans* konfiguracijom. Flavanoli se nalaze u voću, a kožica grožđa je posebno bogata

flavanolima. Epikatehin i katehin imaju mogućnost stvaranja polimera koji se nazivaju proantocijanidini (Popović, 2019).

### 2.3.7.3 Antocijani

Antocijani predstavljaju najvažnije tvari boje, a sadrži pigmente od crvene do plave boje i derivati su flavana. U kožici čine i do 50% fenolnih spojeva. Tijekom alkoholne fermentacije (uz povišenu temperaturu) tvari boje prelaze u vino. Veliki broj antocijana su oblici osnovnih spojeva: delfinidina, cijanidina, pelargonidina, malvidina i petunidina.



**Slika 5** Kemijska struktura najzastupljenijih antocijanidina i flavilium kationa (Popović, 2019)

U grožđu se uglavnom pojavljuju kao glukozidi. Molekula antocijana sastoji se od šećera glukoze, ramnoze i galaktoze. Na slobodnu –OH skupina vežu se kina, ferulinska ili kava kiselina. Ukupno pet molekula antocijana je identificirano u grožđu ili vinu na temelju dva ili tri supstituenta (OCH<sub>3</sub> ili OH) prema supstituciji na vanjskom dijelu jezgre molekule. Monoglukozidi antocijana i acilirani monoglukozidi uz kavu, octenu i *p*-kumarinsku kiselinu su identificirani u sortama *Vitis vinifera*. Monoglukozidi su najzastupljeniji od diglukozida. Razlike između mono i diglukozida mogu biti kriterij za utvrđivanje podrijetla vina. Cabernet

sauvignon i pinot crni sadrže i diglukozide, ali puno manje od hibrida. Ujedno na temelju razlike u sastavu antocijana možemo razlikovati vina američke i europske loze. Za antocijane je karakterističan fenomen kopigmentacije koji pridonosi boljem vizualnom doživljaju grožđa. Boja antocijana ovisi o: koncentraciji i vrsti antocijana te o vrsti i koncentraciji kopigmenta, temperaturi, prisutnosti kisika, svjetlosti ili enzima, pH te tipu otapala, ali i prisustvu drugih molekula koje utječu na nastanak boje i njen intenzitet (Zobundžija, 2016).

#### **2.3.7.4. Neflavonoidi**

U ovoj skupini najznačajnije su fenolne kiseline, a one su najčešće derivati cimetine i benzojeve kiseline. U slobodnom obliku se rijetko nalaze, a u većini slučajeva su esterificirane kina ili vinskom kiselinom. Vezane fenolne kiseline oslobađaju se jedino alkalnom ili kiselinskom hidrolizom ili uz pomoć enzima (Popović, 2019).

#### **2.3.8. Tvari arome**

Grožđe kao plod vinove loze sadrži u sebi aromatske sastojke. Ukupna aroma grožđa rezultat je kombinacije više od sto različitih kemijskih spojeva koji su lako hlapljivi, a sačinjavaju mirisno-aromatični kompleks grožđa koji se oblikuje tijekom fermentacije i kasnije zrenja vina te doprinosi karakterističnoj sortnoj aromi vina. Aroma ovisi o sorti, stupnju zrelosti, ekološkim uvjetima, zdravstvenom stanju grozda, obradi mošta (tijekom maceracije se potiče i povećava sadržaj aromatičnih tvari), fermentaciji vina, doradi te o starenju vina u boci. Aromatski sastojci grožđa koji prelaze u vino mogu se podijeliti na sortne i predfermentativne arome (primarne arome) te na fermentativne arome (sekundarne arome) koje se razvijaju tijekom fermentacije. Različitim kemijskim reakcijama, zrenjem vina razvijaju se i postfermentativne arome (tercijarne arome ili bouquet vina). Sortne arome se mogu podijeliti na travne, voćne i cvjetne. Za cvjetne arome karakteristični su oksidirani terpenski spojevi (geraniol, nerol, linalol, hotrienol, rosenoksid ili neroloksid). Terpeni se nalaze u neoštećenoj biljnoj stanici bobice i većinom su vezani kao di-glikozidi. Predfermentativne arome se formiraju tijekom prerade grožđa i dobivanja mošta, a usko su povezane s primijenjenom tehnologijom. Fermentativne arome se formiraju tijekom malolaktičke i alkoholne fermentacije. Metabolizam kvasaca tvori najveći udio sekundarnih

aroma vina, a to su: viši alkoholi, etanol, esteri, hlapljive kiseline, aldehidi i ketoni. U najvažniju grupu fermentativnih aroma spadaju: masne kiseline, viši alkoholi i esteri. Postfermentativne arome razvijaju se u procesu starenja različitim kemijskim reakcijama (esterifikacija ili oksidoredukcijski procesi) (Marais, 1983; Pozderović, 2010)

### **2.3.9. Antioksidativna aktivnost**

Antioksidansi spadaju u grupu različitih sintetskih i prirodnih spojeva koji sprječavaju ili usporavaju oksidaciju drugih spojeva. Antioksidansi su molekule koje mogu prekinuti lanac reakcije prije oštećenja spoja jer reagiraju sa slobodnim radikalima. Najpoznatije komponente u voću i povrću koje posjeduju antioksidativnu aktivnost su vitamini i minerali (Skupień i Oszmiański, 2004). Uz hranu izvor antioksidansa predstavlja i ljudsko tijelo koje je sposobno proizvesti antioksidanse uz pomoć vitamina i minerala (Antolovich, 2002). Nepoželjno svojstvo kod prirodnih antioksidansa je njihova osjetljivost na kisik, posebice kod sušenja, izlaganja visokoj temperaturi i svjetlu. Antioksidacijska aktivnost predstavlja sposobnost određenih tvari da kroz različite mehanizme stabiliziraju tvari koje mogu dovesti do oksidativnih promjena (Popović, 2019). Postoje 2 načina na koji antioksidansi mogu usporiti ili inhibirati oksidaciju. Prvi način je uklanjanje slobodnih radikala i tada se sastojak može definirati kao primarni antioksidans, a drugi način predstavlja mehanizam koji ne uključuje direktno uklanjanje slobodnih radikala i tada se sastojak definira kao sekundarni antioksidans. Fenolne tvari spadaju u primarne antioksidanse, a sekundarni antioksidansi djeluju putem različitih mehanizama. Sekundarni antioksidansi pokazuju antioksidativnu aktivnost samo ako je prisutna neka druga manja komponenta poput limunske kiseline koja postaje aktivna samo u prisustvu metalnih iona, a askorbinska kiselina je aktivna ukoliko je prisutan tokoferol ili neki drugi primarni antioksidans (Gordon, 2001). Antioksidacijsko svojstvo polifenolnih spojeva bazira se na njihovoj sposobnosti da doniraju vodikov atom i na taj način hvataju slobodne radikale koji nastaju u reakciji peroksidacije lipida (Popović, 2019).

### 2.3.9.1. Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Metode pomoću kojih se može odrediti antioksidacijska aktivnost mogu se podijeliti u dvije grupe: HAT (*eng.* hydrogen atom transfer) i ET (*eng.* electron transfer) metode. HAT metode se baziraju na transferu vodika, a ET na transferu elektrona. ET metode imaju određeno vrijeme trajanja za pojedine redoks reakcije i mjere termodinamičku pretvorbu u određenom vremenskom razdoblju. Dolazi do reakcije antioksidansa s oksidirajućim sredstvom, odnosno s fluorescentnom probom umjesto s peroksidnim radikalom. Spektrometrijske metode mjere intenzitet obojenja. Stupanj promjene boje (smanjenje ili porast apsorbancije probe pri određenoj valnoj duljini) korelira s koncentracijom antioksidansa u uzorku (Apak i sur., 2013).

U HAT metode spadaju:

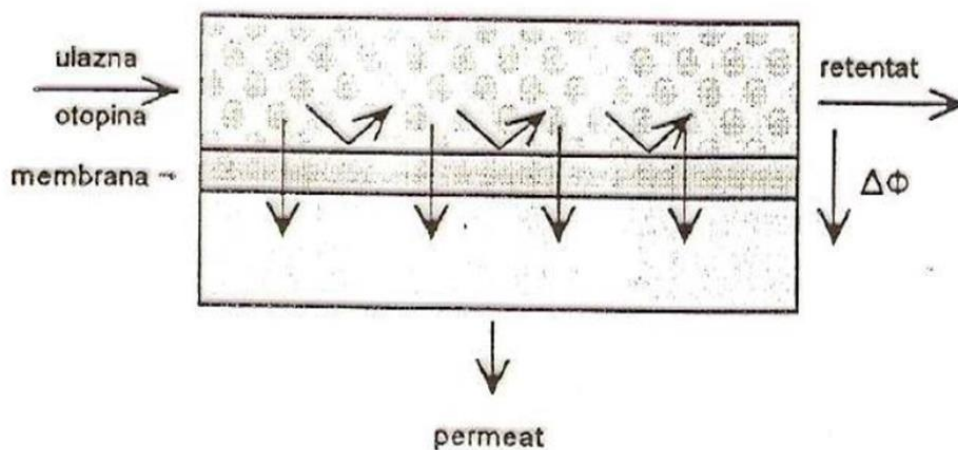
- TRAP metoda (Total Reactive Antioxidant Potential) i
- ORAC metoda (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

U ET metode spadaju:

- FRAP metoda (Ferric Reducing Antioxidant Power),
- FCR (Folin-Ciocalteu reagens),
- CUPRAC (Cupric Iron Reducing Antioxidant Capacity),
- DPPH metoda (reakcija s 1,1-difenil-2-pikrilhidrazilom),
- ABTS<sup>+</sup> metoda (radikal kation 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline)) i
- TEAC metoda (Trolox-equivalent Antioxidant Capacity) (Apak i sur., 2013).

## 2.4. MEMBRANSKI PROCESI

Membranski procesi se vrlo često koriste na područjima prehrambenog inženjerstva, kemijskog inženjerstva te u biotehnologiji. Temelje se na primjeni polupropusnih membrana određene kemijske i fizičke strukture, koje imaju mogućnost selektivnog propuštanja, odnosno zadržavanja pojedinih iona i molekula. Svim membranskim procesima zajedničko je postojanje membrane kao tankog sloja koji razdvaja dvije tekuće faze i tako omogućava selektivni transport tvari kroz membranu djelovanjem pogonske sile, a najčešća pogonska sila je tlak. Ulazna otopina se djelovanjem tlaka potiskuje kroz membranu te se razdvaja na dvije struje: retentat i permeat. Prolaskom kroz membranu u permeatu se smanjuje koncentracija otopljenih tvari, odnosno permeat predstavlja skup svih prodifundiranih komponenata. Retentat je skup svih komponenata koje nisu prošle kroz membranu (Mijatović i Matošić, 2008). U prehrambenoj industriji najčešće se koriste: mikrofiltracija (MF), ultrafiltracija (UF), nanofiltracija (NF) i reverzna osmoza (RO).



**Slika 6** Shematski prikaz membranskog procesa (Smiljanić, 2013)



**Tablica 4** Veličine pora, raspon transmembranskih protoka za različite membranske procese  
(Mijatović i Matošić, 2008)

Proces	Tlak (bar)	Veličina pora (nm)	Fluks (L/m <sup>2</sup> h)
MF	0,1-2	>100	>50
UF	1-5	5-20	10-50
NF	5-20	1-5	1,4-12
RO	10-100	<1	0,05-1,4

Membranski procesi mogu se podijeliti i s obzirom na cilj separacije na procese koji služe za :

- koncentriranje,
- čišćenje,
- posredovanje pri reakciji i
- razdjeljivanje.

Karakteristike prema kojima se može provesti klasifikacija membranskih postupaka su:

- mehanizam zadržavanja,
- membranska struktura,
- pokretačka sila i
- faze u kontaktu (Popović, 2019).

### 2.4.1. Mikrofiltracija

Mikrofiltracija predstavlja postupak filtracije čestica s porama promjera od 0,1 do 1  $\mu\text{m}$ , a debljina membrane je 10-15  $\mu\text{m}$ . Separacija iz dobavne tekućine se odvija primjenom simetričnih membrana. Materijal od kojega su građene membrane za mikrofiltraciju najčešće se sastoji od keramike s mikroporoznom strukturom ili polimernog materijala. Princip separacije temelji se na mehanizmu sita. Kod primjene mikrofiltracije često se pojavljuju i problemi koji se očituje kao fenomen apsorcije koji pridonosi začepljenju membrana prilikom nakupljanja čestica na samoj površini membrane i pritom dolazi do opadanja protoka prilikom filtracije (Moslavac, 2003).

### 2.4.2. Ultrafiltracija

Kod ovog postupka podrazumijeva se prolaz tvari kroz membranu čija relativna molekulska masa ne prelazi 500 (koloidi). Ultrafiltracija podrazumijeva korištenje asimetričnih membrana koje imaju pore 1 – 100 nm i debljine su 150  $\mu\text{m}$ . Tlak kod kojeg se odvija ultrafiltracija iznosi 1 do 10 bara jer otopljene tvari koje ne mogu proći kroz membranu imaju veliku molekularnu masu te se njihov osmotski tlak zanemaruje (Moslavac, 2003).

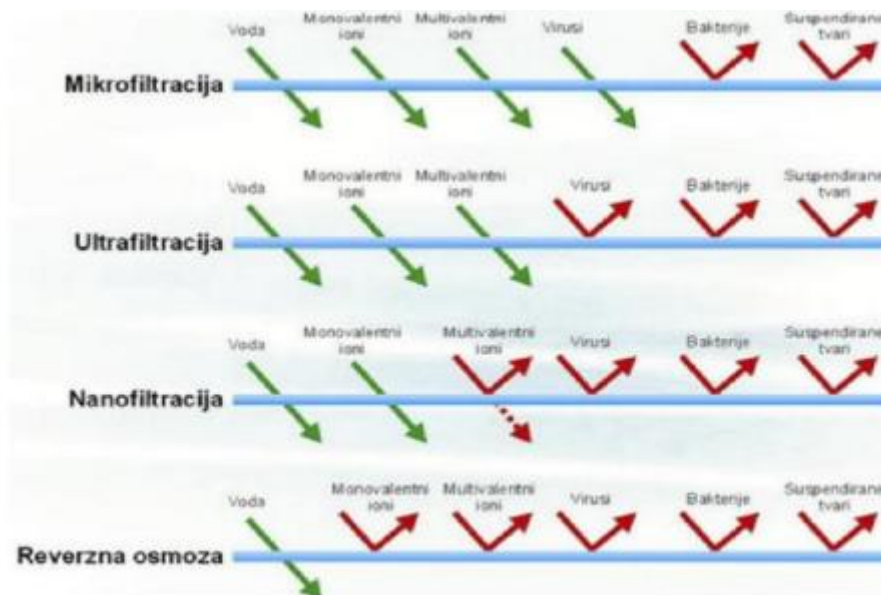
### 2.4.3. Nanofiltracija

Nanofiltracija je membranski proces kod kojega se filtriraju veće, ali i manje molekule poput nekih anorganskih soli. Kod nanofiltracije moguće je filtrirati i neke manje organske molekule poput šećera (disaharidi i monosaharidi). Nanofiltracija troši manje energije u odnosu na reverznu osmozu za čak 21% (Warczok, 2004). Princip separacije kod reverzne osmoze i nanofiltracije je isti, a razlika je u veličini molekula koje se zadržavaju na membrani i u veličini pora na membranama. Veličina pora membrana za nanofiltraciju iznosi oko 1 nm. Radni tlak koji je potreban kod nanofiltracije iznosi 10 – 40 bara, a princip prema kojem se odvija separacija je otapanje i difuzija. Kod nanofiltracije permeat nije čista voda, kao što je slučaj kod reverzne osmoze, jer membrane za nanofiltraciju propuštaju manje organske i anorganske molekule (Popović, 2019). Membrane za nanofiltraciju su uglavnom kompozitne i sastoje se od dva sloja. Potporni i gornji sloj su izgrađeni od različitog polimernog materijala, a propuštaju najveći postotak monovalentnih iona (Seman, 2010). Nanofiltracija se često koristi i u prehrambenoj industriji, jedan od primjera korištenja nanofiltracije u prehrambenoj industriji je koncentriranje mošta (Versari i sur., 2003).

### 2.4.4. Reverzna osmoza

Reverzna osmoza je proces koji se koristi za uklanjanje mikromolekularnih otopljenih tvari čije su molekule istog reda veličine kao i molekule vode. Kod reverzne osmoze na membrani se zadržavaju male organske molekule i anorganski ioni i takve molekule razvijaju značajan osmotski tlak. Potrebno je koristiti visoke radne tlakove 30 – 120 bara čime se omogućuje nadvladavanje visokog osmotskog tlaka koji je nastao zbog sitnih zadržanih čestica na površini membrane. Veličina pora membrana kod reverzne osmoze iznosi 0,1 – 1 nm.

Kompozitne i asimetrične membrane su najčešće u upotrebi. Kod asimetričnih membrana gornji i potporni sloj su izgrađeni od istog materijala, a kod kompozitnih od različitog. Veličina pora na membrani manje su od 2 nm te tako ioni koji imaju naboj imaju i veću mogućnost odbijanja od membrane nego oni ioni koji nemaju naboj (Popović, 2019).



Slika 7 Podjela membranskih procesa s obzirom na veličinu pora (Puškarić, 2016)

#### 2.4.5. Vrste membrana

Općenita podjela membrana je na sintetičke i biološke (statične) membrane. Sintetičke membrane moguće je podijeliti u nekoliko skupina s obzirom na kemijski sastav i mehanizam separacije, geometrijski oblik i fizičku strukturu (Mulder, 1996).

Prema strukturi membrane se dijele na:

- *heterogene* (izgrađene od više vrsta materijala) i
- *homogene* (jedna vrsta materijala).

Prema mehanizmu separacije:

- neporozne,
- porozne i
- membrane s ionskom izmjenom.

Prema fizičkoj strukturi:

- simetrične,
- asimetrične i
- kompozitne.

S obzirom na kemijski sastav membrane mogu biti:

- *anorganske membrane* (od keramike, stakla ili metala) i
- *organske membrane* (izrađene od organskih polimera).

Prema geometrijskom obliku:

- *cijevne membrane,*
- *kapilarne membrane,*
- *ravne (planarne) membrane* i
- *membrane u obliku šupljih vlakana* (Mulder, 1996).

#### **2.4.6. Vrste modula**

Modul je najmanja jedinica koja sadrži jednu membranu, ali može i više njih i potrebnu prateću potpornu strukturu koja je jako važna. Stupanj membranskog postrojenja čini broj modula povezanih zajedno bilo paralelno ili serijski, a ujedno daje i mogućnost vrlo jednostavne promjene kapaciteta uređaja promjenom načina povezivanja modula ili mijenjanjem njihovog broja. Moduli se općenito sastoje od membrane i kućišta u koje je ugrađena membrana. U kućištu se dovodi otopina te odvodi permeat i retentat.

Samom konstrukcijom modula pokušava se postići:

- velika iskoristivost aktivnih membranskih površina,
- velika otpornost na koroziju i radni tlak,
- što veća površina u relativno malom volumenu,
- dobri hidraulički uvjeti koji su potrebni za smanjenje koncentracijske polarizacije, što veća turbulencija i smanjenje stvaranja taloga,

- lako čišćenje membrana, mogućnost pravilnog rada i kontrole ispravnosti svake membrane te brzu zamjenu oštećene membrane i
- da pad tlaka ne bude previsok u modulu.

Ovisno o konstrukciji, razlikujemo nekoliko tipova modula:

- cijevni modul,
- spiralni modul,
- pločasti modul,
- kapilarni moduli
- moduli sa šupljim vlaknima (Popović, 2019).

#### **2.4.7. Membranski procesi u vinarstvu**

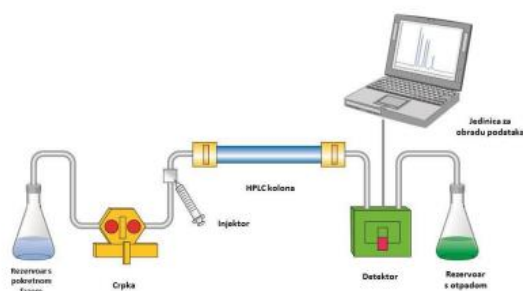
U suvremenoj proizvodnji vina velika pozornost posvećuje se tehnološkim postupcima tijekom proizvodnje vina (od berbe do punjena u boce) kako bi se dobilo vino odgovarajuće kvalitete. Operacije filtracije i bistrenja vina danas imaju veliki značaj u proizvodnji vina jer uvelike utječu na organoleptička i kemijska svojstva vina, a posebno utječu na njihovu stabilnost i održivost tijekom transporta i čuvanja. Tijekom dosadašnjih godina filtracija vina se provodila na naplavnim i pločastim filtrima, a bistrenje pomoću različitih sredstava koja ubrzavaju bistrenje vina. Ovakvi postupci ne obavljaju često u potpunosti stabilizaciju vina i tako mogu uzrokovati nepoželjne organoleptičke i kemijske promjene u vinu (Vuković, 2000). Membranska filtracija je novi postupak filtracije vina. Membranskom filtracijom iz vina se uklanjaju čestice mutnoće, ali i spojevi koji su nestabilni. Sama filtracija ovisi o veličini molekula, odnosno o molekularnoj masi. Kod vina se prvenstveno uklanjaju proteini, makromolekule, tanini i pektini. Membranskom filtracijom uklanjaju se i mikroorganizmi te se tako dobije sterilno vino (Derimšek, 2010).

## 2.5. Kromatografske tehnike

Kromatografija predstavlja zajednički naziv za više fizikalnih laboratorijskih tehnika pomoću kojih se provodi razdvajanje smjesa. Kromatografija je vodeća analitička metoda koja omogućuje razdvajanje i ujedno kvantitativno određivanje tvari koje imaju slične kemijske osobine i strukture. Kod svih kromatografskih postupaka je zajedničko postojanje stacionarne faze, koja može biti tekućina ili čvrsta tvar, i mobilne faze koja može biti tekućina ili plin. Temelj kromatografije je pojava adsorpcije, ionske izmjene, razdjeljenja ili isključenja koji omogućavaju odjeljivanje sastojaka iz smjese (Skoog, 1999).

### 2.5.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) se smatra najupotrebljivijom metodom separacije. HPLC metoda ima mogućnost identifikacije, razdvajanja i kvantifikacije spojeva koji su prisutni u bilo kojem uzorku i koji se mogu otopiti u tekućini (Mihaljević, 2017). Temelj odjeljivanja sastojaka je u različitoj brzini kretanja kroz stacionarnu fazu. Razlikujemo nekoliko vrsta tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti: adsorpcijska kromatografija, razdjelna kromatografija, kromatografija na gelu i kromatografija ionske izmjene. Najčešće se koristi razdjelna kromatografija i uobičajeno se dijeli na kromatografiju vezane faze i kromatografiju u sustavu tekućina-tekućina; stacionarnu fazu čini silikagel kod ove vrste kromatografije na koji su vezane pojedine organske grupe (Skoog, 1999).



Slika 8 Shema HPLC uređaja (Mihaljević, 2017)

### **2.5.1.1. Određivanje polifenola HPLC metodom**

Sami izbor kolone koja će se upotrijebiti za analizu fenolnih kiselina i flavonoida ovisi o karakteristikama stacionarne faze koja treba biti sposobna omogućiti zadovoljavajuću retenciju, oblik pika i selektivnost, ali ovisi i o grupi flavonoida koji se žele razdvojiti (Popović, 2019). Uz pomoć HPLC metode danas su kvantificirane i identificirane brojne polifenolne tvari u vinu. Odabir metode ovisi o načinu pripreme uzorka vina te o skupini spojeva koji se žele analizirati. Uz odabir kolone važan je način eluiranja i odabir pokretnih faza. Način eluiranja najčešće je gradijentan uz uporabu dva sustava otapala, jednog polarnog poput vodene otopine octene, mravlje ili fosforne kiseline i manje polarnog otapala kao što je zakiseljeni metanol ili acetonitril. Kod analize mircetina i kvercetina u uzorcima crnog vina često se spominje izokratno ispiranje tijekom kojeg se ne mijenja sastav pokretne faze. Polifenoli apsorbiraju u vidljivom i ultraljubičastom dijelu spektra te se detekcija tih spojeva u analizi HPLC-om temelji na mjerenju apsorbancije vidljivog (Vis) zračenja, pomoću UV-Vis detektora i na mjerenju ultraljubičastog zračenja. Povećanje osjetljivosti i selektivnosti HPLC analize moguće je dobiti uvođenjem dodatnog elektrokemijskog detektora uz detektor s velikim brojem dioda. Ovakva metoda detekcije vrlo je važna za određivanje polifenola koji se nalaze u vinu u vrlo malim koncentracijama (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

### **2.5.2. Plinska kromatografija**

Plinska kromatografija koristi se za kvantitativnu analizu, odvajanje i izolaciju komponenata smjese te za utvrđivanje čistoće tvari te pomoć pri identifikaciji. U plinskoj kromatografiji mobilna faza je inertni plin nositelj koji eluira sastojke smjese iz kolone koja je ispunjena stacionarnom fazom. Pri ulasku smjese komponenti u kolonu, ona se trenutno razdjeljuje između mobilne i stacionarne faze. Odvajanje smjese hlapljivih sastojaka odvija se naizmjenično desorpcijom i adsorpcijom lakše hlapljivih sastojaka pod djelovanjem plina nositelja koji odnosi komponente kroz kolonu. Plinsku kromatografiju s obzirom na nepokretnu fazu možemo podijeliti na plinsko-razdjelnu kromatografiju i plinsko adsorpcijsku kromatografiju. Kod plinsko-razdjelne kromatografije nepokretna faza je tekućina nanosena na kruti nosač (tekući ugljikovodici velike molekulske mase, silikonsko ulje, alkoholi visokog vrelišta i esteri). Stacionarna faza kod plinsko-adsorpcijske

kromatografije je adsorbens (aluminijev oksid, silikagel, diatomjeske zemlje), koja na sebe adsorbira komponente smjese. Plinskom kromatografijom može se postići kvantitativna i kvalitativna analiza uz bolje razlučivanje i u kraćem vremenu (Popović, 2019).



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Istražiti utjecaj koncentriranja nanofiltracijom na zadržavanje tvari boje u vinu Cabernet Sauvignon pri tlakovima od 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja. Pokuse provesti na uređaju za nanofiltraciju Lab Unit M20 s membranom Alfa Laval NF M20. Početni volumen je 3 L.

### 3.2. MATERIJAL I METODE

#### 3.2.1. Priprema koncentriranog vina Cabernet Sauvignon

U provedenim istraživanjima korišten je vino Cabernet Sauvignon. Početna suha tvar vina bila je 8,2 %. Nakon provedenog postupka koncentriranja nanofiltracijom ispitivane su tvari boje u koncentriranom vinu.

Pribor

1. Za proces koncentriranja vina nanofiltracijom upotrijebljene su kompozitne membrane tipa NF M20. Kod NF membrana porozni sloj (nosač) je izrađen od poliestera. Karakteristike membrana navedene su u **Tablici 5**.

**Tablica 5** Karakteristike NF membrana

Tip membrane	NF M20
Proizvođač	Alfa Laval Danska
Materijal	poliamid
$R_{MgSO_4}$	> 0,99
Maksimalna radna temperatura °C	50
Maksimalni radni tlak bar	55
Dozvoljeni pH	3 – 10

Upotrijebljeno je šest kompozitnih membrana, složenih u pločasti modul, ukupne površine 0,1736 m<sup>2</sup> ( jedna membrana ima površinu od 0,02893 m<sup>2</sup> ).

2. **Slika 9** prikazuje laboratorijski uređaj za nanofiltraciju „Lab Unit M20“ danske tvrtke Dow Danmark Separation Systems De Danske Sukkerfabrikker, Copenhagen, s pločastim modulom i membrana tipa Alfa Laval-NF.



**Slika 9** Prikaz uređaja „Lab Unit M20“ (Smiljanić, 2013)

Pokusi su provedeni s vinom Cabernet Sauvignon početnog udjela suhe tvari 8,2 %. Početna temperatura vina u tanku kod svih pokusa bila je 20°C. Količina uzorka u tanku iznosila je 3 L. Koncentriranje je provedeno pri tlakovima od 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja. Kod svih pokusa vino je koncentrirano do maksimalne koncentracije koju je uklanjanjem alkohola bilo moguće postići, a to je 22,9 % suhe tvari. Svake 4 minute bilježio se volumen permeata, temperatura uzorka u tanku (ukoliko se radilo o postupku s primjenom hlađenja bilježila se i temperatura rashladnog sredstva) i udio suhe tvari. U pokusu s hlađenjem korištena je pokretna rashladna jedinica koja je priključena na izmjenjivač topline uređaja za membransku filtraciju. Kao rashladno sredstvo koristila se voda.

### 3.2.2. Spektrofotometrijska analiza tvari boje

#### Određivanje antocijana

Za određivanje antocijana primijenjena je pH-diferencijalna metoda. pH-diferencijalna metoda se zasniva na strukturnoj transformaciji kromofora antocijana u ovisnosti o promjeni pH. Antocijani podliježu reverzibilnoj strukturnoj transformaciji s promjenom pH koja se manifestira promjenom spektra apsorpcije. pH-diferencijalna metoda za određivanje antocijana omogućava brzo i točno mjerenje ukupnih antocijana, bez obzira na prisutnost polimeriziranih, degradiranih pigmenata i drugih tvari koje bi mogle smetati. Antocijani su određivani metodom prema Giusti i Wrolstadu (2001) s malom modifikacijom (Giusti i Wrolstad, 2001). Otpipetirano je 0,2 mL uzorka u dvije kivete, u jednu je dodano 2,8 mL pufera pH 1, a u drugu 2,8 mL pufera pH 4,5. Nakon stajanja od 15 min spektrofotometrijski je mjerena apsorpcija uzoraka pri valnim duljinama od 512 nm i 700 nm. Sadržaj antocijana je izračunat prema slijedećoj formuli:

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

gdje je: A - apsorpcija uzorka, a izračunava se prema izrazu:

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

M - 449,2

FR - faktor razrjeđenja

$\epsilon$  - molarna absorptivnost;

26 900 l - duljina kivete; 1 cm

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

#### Određivanje degradacije antocijana

Degradacija antocijana odnosno smanjenje intenziteta crvene boje ( $A_{512}$ ) i povećanje posmeđivanja ( $A_{420}$ ) se izračunava prema formuli:

Gustoća boje kontrolnog uzorka (tretiranog vodom):

$$\text{Gustoća boje} = [(A_{420} - A_{700}) + (A_{512} - A_{700})] \times \text{FR}$$

Boja nastala polimerizacijom (uzorak tretiran bisulfitom):

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

FR – faktor razrjeđenja

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

### **Određivanje polifenolnih spojeva**

Koncentracija ukupnih fenola se određuje Folin-Ciocalteu metodom. Metoda se temelji na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom, te mjerenjem nastalog intenziteta obojenja (apsorbancije) pri valnoj duljini od 765 nm (Ough i Amerine, 1988). Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfowolframove i fosfomolibden kiseline, a pri oksidaciji fenolnih tvari ove kiseline se reduciraju u wolframov oksid i molibdenov oksid koji su plavo obojeni. Otpipetirano je 0,2 ml uzorka soka određenog razrjeđenja, te dodano 1,8 ml destilirane vode, 10 ml Folin-Ciocalteu reagensa (1:10; pripremljen tako da je otpipetirano 3,3 ml Folin-Ciocalteu reagensa u odmjernu tikvicu od 100 ml i do oznake dopunjeno s destiliranom vodom), te nakon stajanja 30 sekundi do 8 minuta dodano 8 ml 7,5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (ukupni volumen mora biti 20 ml). Za slijepu probu otpipetira se 2 ml destilirane vode u epruvetu, te doda 10 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 8 ml 7,5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Nakon stajanja u mračnom prostoru 2-20 sati, pri čemu dolazi do razvijanja boje, mjeri se apsorbanacija na spektrofotometru pri valnoj dulji od 765 nm. Sadržaj polifenolnih spojeva je interpoliran pomoću kalibracijske krivulje galne kiseline i izražen u g galne kiseline/L uzorka.

### **Određivanje antioksidativne aktivnosti**

#### **DPPH metoda**

Jedna od najrazvijenijih metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti, na osnovi sintetskih radikala, je reakcija s 2,2-difenil-1-pikrilhidrazilom (DPPH). To je stabilni slobodni radikal organskog dušika. Kod DPPH testa, nestanak DPPH radikala se prati smanjenjem apsorbanacije pri 517 nm, do koje dolazi zbog smanjenja količine antioksidansa ili reakcije s

radikalima (Brand-Williams i sur., 1995). Dodatkom antioksidansa dolazi do redukcije DPPH radikala te nastaje aroksil radikal koji dalje ulazi u reakciju s još jednim DPPH radikalom pri čemu dolazi do njihove kondenzacije te konačno nastaje stabilni oblik. Prednost metode je brza i jednostavna izvedba, a neki od nedostataka su usko linearno područje te sterička priroda molekule DPPH radikala, koja je pogodnija za male molekule te one imaju bolji pristup DPPH radikalima.

#### **ABTS metoda**

U ABTS metodi prati se raspadanje radikala  $ABTS^{\cdot+}$  koji nastaje oksidacijom plavo-zelenog 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazilin-6-sulfonat) (ABTS) djelovanjem fenolnih tvari. U odsutnosti fenolnih tvari,  $ABTS^{\cdot+}$  je relativno stabilan, ali u prisustvu donora  $H^+$  brzo reagira te prelazi u neobojeni oblik ABTS-a. Promjena boje detektira se spektrofotometrijski pri valnoj duljini 734 nm.

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka te se doda 3,2 mL otopine ABTS, dobro promiješa i smjesa se ostavi reagirati 1h i 35 min u mraku. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 734 nm.

Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje trolox-a koji se koristi kao standard za izražavanje antioksidacijske aktivnosti. Slijepa proba se priprema tako da se umjesto uzorka doda ista količina destilirane vode. Mjerenja su provedena u tri paralele.

#### **CUPRAC metoda**

Ova metoda ima za cilj procijeniti sposobnost uzorka da reducira bakrene ione u vodenom mediju, odnosno određuje sposobnost uzorka da reducira Cu (II)-neokuproin kompleks (Apak i sur., 2004). Osnova metode je da kompleks  $Nc$  s reduciranim oblikom metala prikazuje karakteristične vidljive apsorpcijske vrpce s maksimalnim intenzitetom na 593 i 450 nm za CUPRAC test. Prema tome, sposobnost uzorka da reducira metalne komplekse, nakon određenog vremena inkubacije stvara odgovarajuće vidljive apsorpcijske vrpce koje se koriste za određivanje CUPRAC vrijednosti.

Postupak: otpipetira se 1 mL otopine bakar klorida, 1 mL otopine neokuproina, 1 mL amonij

acetata, 0,2 mL uzorka te 0,9 mL vode. Smjesa se homogenizira te ostavi stajati 60 minuta. Nakon inkubacije mjeri se apsorbancija na 450 nm. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje trolox-a koji se koristi kao standard za izražavanje antioksidacijske aktivnosti. Slijepa proba se priprema tako da se umjesto uzorka doda ista količina destilirane vode. Mjerenja su provedena u tri paralele.

#### **FRAP metoda**

U FRAP metodi se prati redukcija Fe<sup>3+</sup> iona (feri oblik) u Fe<sup>2+</sup> ion (fero oblik) u prisutnosti antioksidansa. Nastali ion u prisutnosti TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin) reagensa formira intenzivno obojeni kompleks koji pokazuje maksimum apsorbancije pri 593 nm (Roginsky i Lissi, 2005).

Postupak: otpipetira se 0,2 mL uzorka i doda 3 mL FRAP otopine. Reakcijska smjesa se dobro promiješa i ostavi stajati 30 minuta. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 593 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodana je voda. Antioksidativna aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje uz trolox kao standard. Određivanje je provedeno u tri paralele.

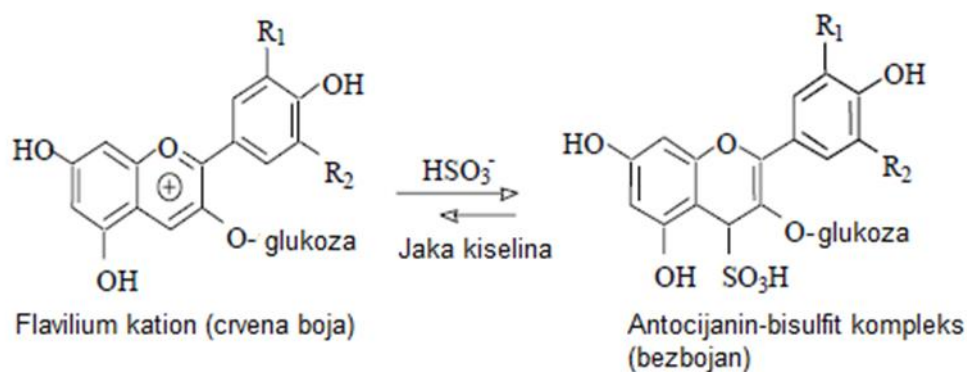
#### **Određivanje ukupnih flavonoida**

Metoda za određivanje ukupnih flavonoida je Kim, Jeong i Lee s modifikacijom. Kalibracija se radi s različitim koncentracijama kvercetina, a linearnost je 0,9953. U epruvete se stavlja 0,5 mL uzorka i 4 mL vode zajedno s 0,3 ml 5% NaNO<sub>2</sub>, a nakon 5 minuta dodaje se 1,5 mL 2% AlCl<sub>3</sub>. Nadalje se nakon 5 minuta sadržaj neutralizira s 2 mL 1M otopine NaOH te nadopuni do 10 mL s vodom. Dodatkom NaOH sadržaj mijenja boju, a apsorbancija se mjeri na 510 nm. Izvodi se kvantifikacija koristeći kalibracijsku krivulju. Rezultat je izražen u mg ekvivalenta kvercetina (QE)/100 g vina, a izražava se kao srednja vrijednost tri ponavljanja.

#### **Određivanje polimerne boje**

Degradacija antocijana može se pratiti očitanjem apsorbancije u uzorcima koji su tretirani bisulfitom. Antocijani s bisulfitom tvore bezbojan kompleks (**Slika 10**). Boja koja nastaje polimerizacijom antocijana odnosno nastajanjem kompleksa antocijani/tanini je otporna na djelovanje bisulfita. Apsorbancija uzorka tretiranog bisulfitom, na 420 nm predstavlja stupanj posmeđivanja, a gustoća boje se definira kao suma apsorbancija na 420 nm i λ<sub>vis-max</sub> (512

nm). Omjer između polimerne boje i gustoće boje se koristi kao postotak boje koja je nastala polimerizacijom.



**Slika 10** Nastajanje bezbojnog kompleksa između antocijana i bisulfita (Wrolstad i sur., 2005).

### 3.2.3. Određivanje polifenola HPLC metodom

#### HPLC analitički sustav

Analiza flavan-3-ola i fenolnih kiselina izvedena je na HPLC analitičkom sustavu (HPLC 1260 Infinity II s PDA detektorom; Agilent Technologies, CA, USA). Separacija polifenolnih spojeva izvedena je na Poroshell 120 EC-C18 koloni koja je zaštićena pretkolonom (Poroshell 120 EC-C18, Agilent, USA). Za svaki uzorak provedena su dva mjerenja.

Koncentrati su razrijeđeni na udio topljive suhe tvari osnovnog soka (8,2%) i profiltrirani kroz filter Chromafil Xtra (PTFE; 0,45  $\mu\text{m}$ , 25 mm) (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prije HPLC analize. Metode za analizu flavan-3-ola i fenolnih kiselina su prethodno validirane (Jakobek i sur., 2012). Flavanoli su identificirani na valnoj 360 nm te fenolne kiseline na 320 nm. Kvantifikacija flavanola i fenolnih kiselina provedena je na osnovi kalibracijskih krivulja standardnih spojeva (rutina, kvercetina i klorogenske kiseline). Neki spojevi su određeni djelomično (neoklorogenska kiselina). Zbrajanjem količina pojedinih flavanola i fenolnih kiselina, dobivene su količine ukupnih flavanola i fenolnih kiselina, određenih pomoću HPLC.





Slika 11 HPLC analitički sustav

#### HPLC metoda za analizu flavanola i fenolnih kiselina

Flavanoli i fenolne kiseline razdvojeni su reverzno-faznom HPLC metodom primjenom 0,1 % fosforne kiseline kao mobilne faze A te 100 %-nog metanola kao mobilne faze B. Uvjeti analize prikazani su u **Tablici 6**. Period re-ekvilibracije između pojedinih analiza bio je 10 minuta. Spektar je sniman u području valnih duljina od 200 do 600 nm.

Uvjeti rada:

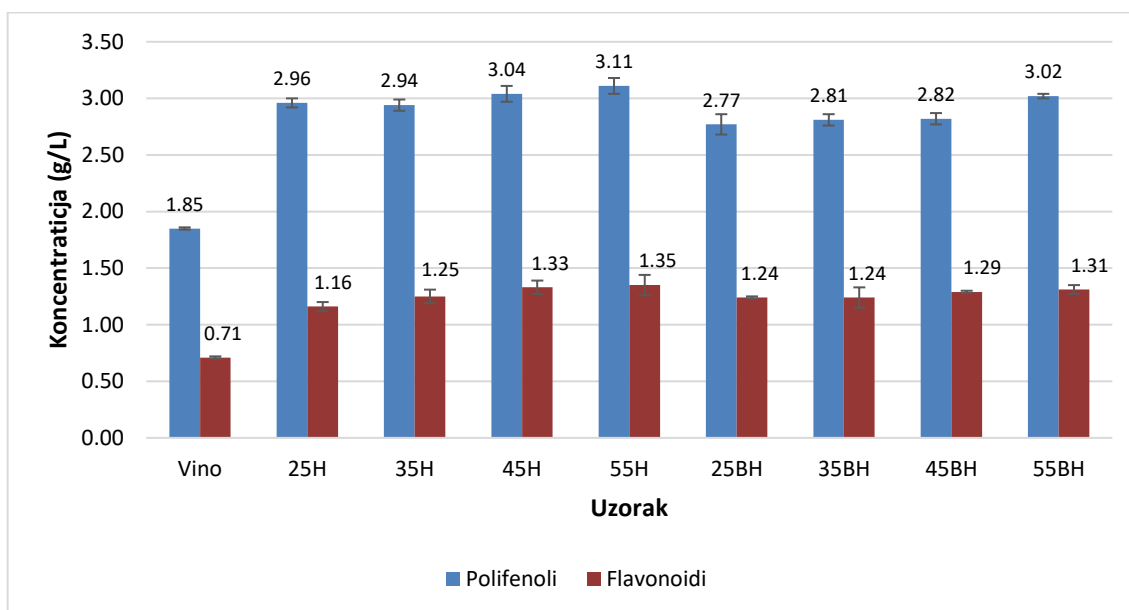
- kolona: Poroshell 120 EC-C18 column (4.6 x 100 mm, 2.7  $\mu$ m); pretkolona: Poroshell 120 EC-C18 guard column (4.6 x 5 mm, 2.7  $\mu$ m);
- Protok: 1 mL/min;
- Volumen injektiranja: 10  $\mu$ L;
- Spektar: 200 do 600 nm;
- Uvjeti rada za mobilne faze A (0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) i B (100% metanol) dani su u tablici:

**Tablica 6** HPLC metoda za analizu polifenolnih spojeva

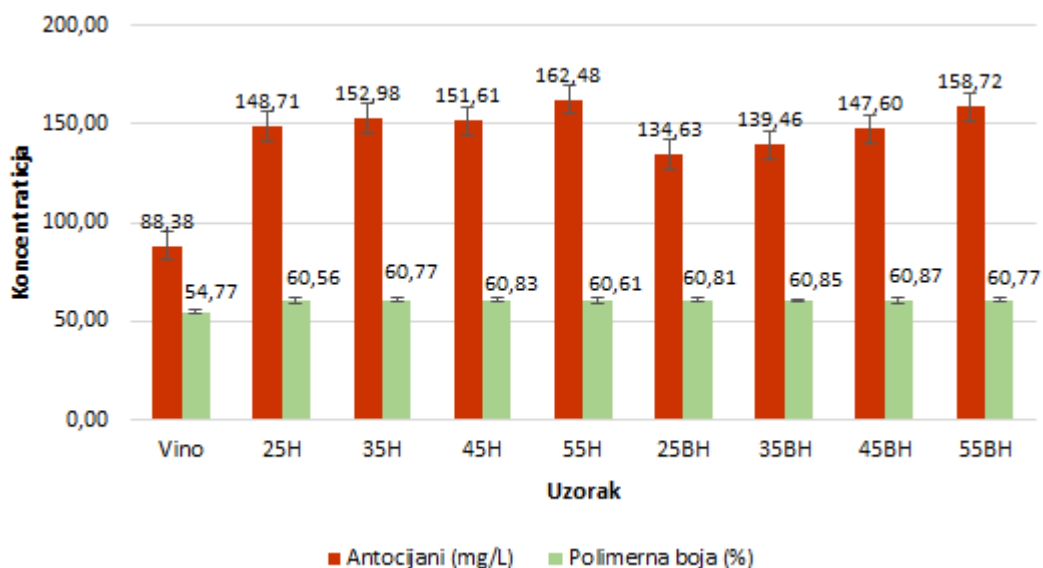
<b>min</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
0	95	5
3	70	30
15	65	35
22	63	37
30	59	41
32	55	45
40	51	49
45	20	80
48	20	80
50	95	5
53	95	5

## **4. REZULTATI**

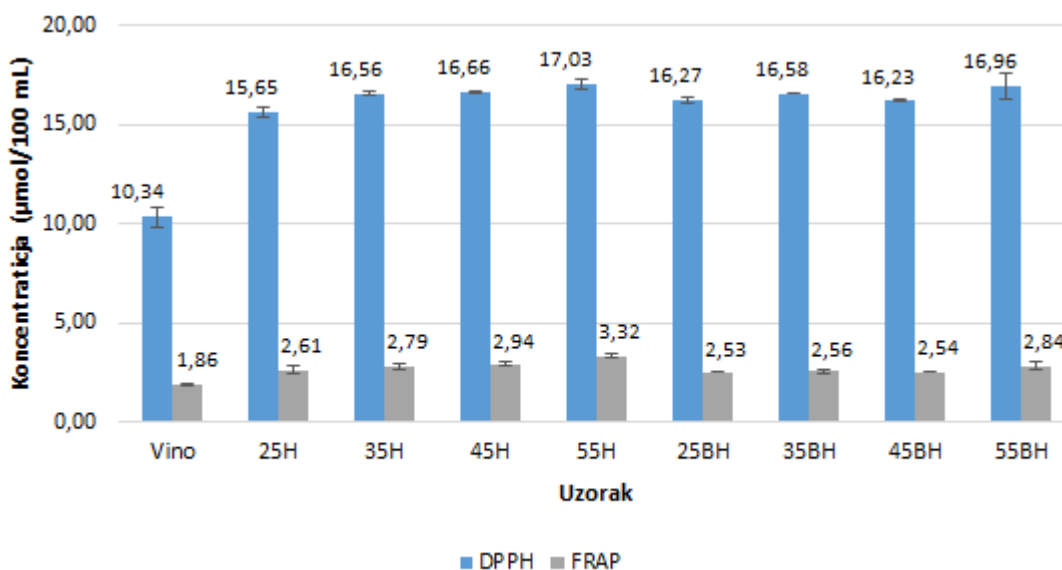
## 4.1. GRAFIČKI PRIKAZI ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA



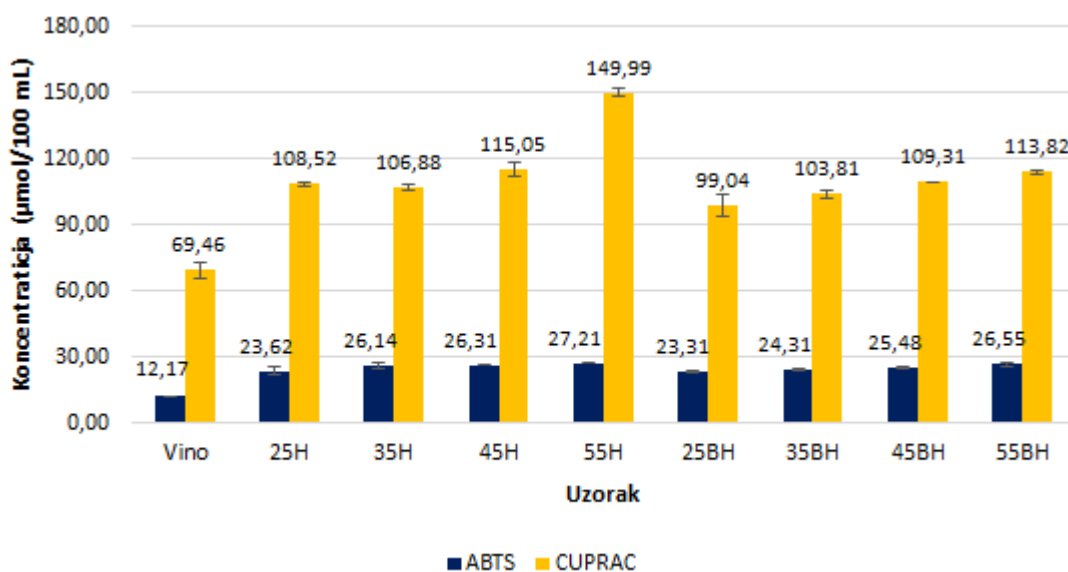
**Slika 12** Sadržaj polifenola i flavonoida u početnom uzorku vina Cabernet Sauvignon te koncentratima dobivenim procesom nanofiltracije pri tlaku 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja



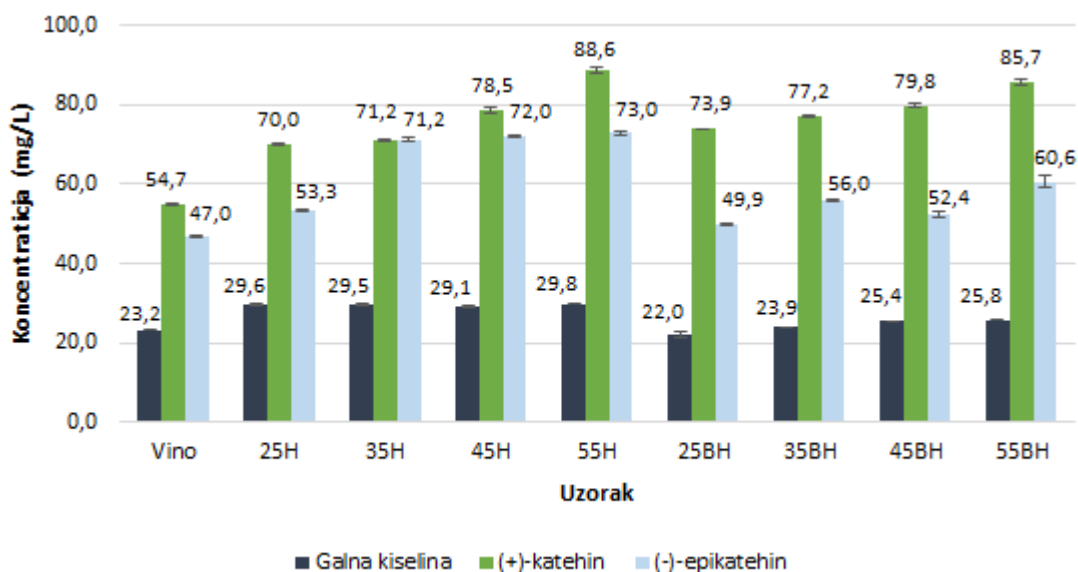
**Slika 13** Sadržaj antocijana i polimerne boje u početnom uzorku vina Cabernet Sauvignon te koncentratima dobivenim procesom nanofiltracije pri tlaku 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja



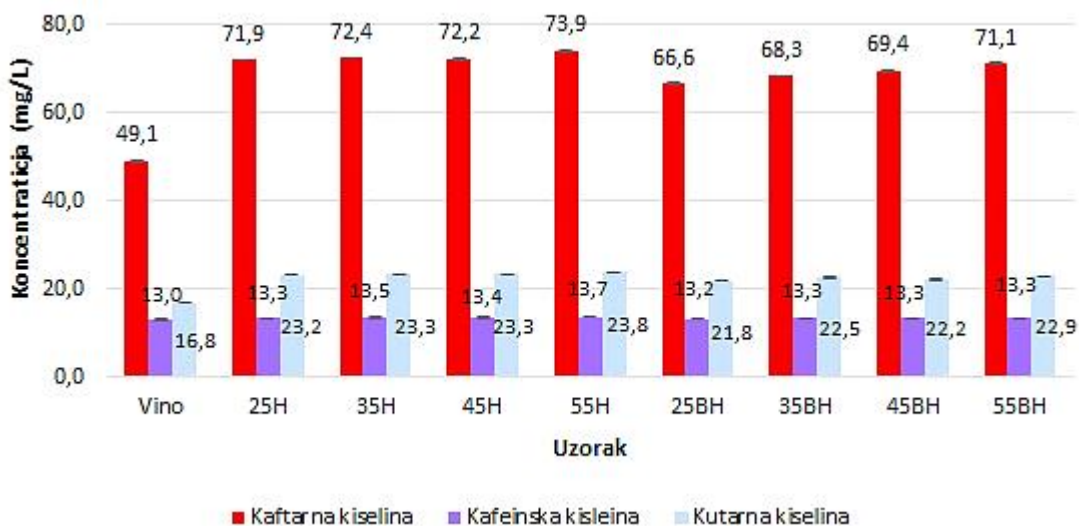
**Slika 14** Antioksidacijska aktivnost određena DPPH i FRAP metodom u početnom uzorku vina Cabernet Sauvignon te koncentratima dobivenim procesom nanofiltracije pri tlaku 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja



**Slika 15** Antioksidacijska aktivnost određena ABTS i CUPRAC metodom u početnom uzorku vina Cabernet Sauvignon te koncentratima dobivenim procesom nanofiltracije pri tlaku 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja



**Slika 16** Sadržaj galne kiseline, (+) – katehina u početnom uzorku vina Cabernet Sauvignon te koncentratima dobivenim procesom nanofiltracije pri tlaku 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja



**Slika 17** Sadržaj kaftarne, kafeinske i kutarne kiseline u početnom uzorku vina Cabernet Sauvignon te koncentratima dobivenim procesom nanofiltracije pri tlaku 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja

## **5. RASPRAVA**

Koncentriranje voćnih sokova i vina moguće je provesti uparavanjem, koncentriranjem zamrzavanjem, pervaporacijom ili membranskim procesima. U većini slučajeva, tijekom koncentriranja dolazi do gubitaka tvari arome ili boje, posebice kod uparavanja zbog primjene povišene temperature. Membranski procesi se mogu odvijati pri sobnoj temperaturi čime se gubici svode na minimum. Koncentriranje nanofiltracijom daje brojne mogućnosti obrade vina i mošta, od korekcije udjela kiselina, šećera, tvari arome i boje do smanjenja udjela alkohola i stabilizacije tartarata.

Cilj ovog diplomskog rada je bio utvrditi utjecaj koncentriranja nanofiltracijom na zadržavanje tvari boje crnog vina Cabernet Sauvignon primjenom različitih tlakova s i bez primjene hlađenja. U vinu i retentatima dobivenim pri različitim procesnim parametrima određeni su ukupni polifenoli, flavonoidi, antocijani, polimerna boja, udio galne, kaftarne, kafeinske i kutarne kiseline te udio (+)-katehina i (-)-epikatehina. Antioksidacijska aktivnost određena je u uzorcima pomoću četiri spektrofotometrijske metode: DPPH, FRAP, ABTS i CUPRAC. Rezultati su prikazani na **Slikama 12-17**.

Na **Slici 12**, gdje su prikazane koncentracije ukupnih polifenola i flavonoida u uzorcima, vidljivo je da je tijekom koncentriranja nanofiltracijom došlo do značajnog zadržavanje navedenih spojeva. Vrijednosti su se kretale od 1,85 g/L polifenola i 0,71 g/L flavonoida u početnom uzorku vina do 3,11 g/L polifenola i 1,35 g/L flavonoida u retentatu dobivenom nanofiltracijom na 55 bara uz hlađenje. Pri tome, vidljivo je da povećanje tlaka pogoduje zadržavanju polifenola i flavonoida, s tim da povećanje temperature (proces bez hlađenja) ima suprotan učinak te su u tim retentatima određene nešto niže koncentracije spomenutih spojeva (od 3 do 7% niže u odnosu na retentate dobivene nanofiltracijom uz hlađenje). Najmanje zadržavanje navedenih spojeva zabilježeno je u retentatima dobivenim pri nižim tlakovima (25 i 35 bara) bez primjene hlađenja. Isti trend zabilježen je i kod koncentracije antocijana (**Slika 13**) gdje je njihova koncentracija u retentatima dobivenim procesima s primjenom hlađenja bila gotovo dvostruko veća (162,48 mg/L u retentatu na 55 bara) u odnosu na početni uzorak vina (88,38 mg/L). To je sukladno s prethodnim istraživanjima procesa koncentriranja nanofiltracijom (Bánvölgyi i sur., 2016; Giacobbo i sur., 2018) u kojima je vidljivo da su najviši primijenjeni tlak i najniža temperatura rezultirali najvećim zadržavanjem polifenolnih spojeva. Zadržavanje antocijana tijekom procesa nanofiltracije bez primjene hlađenja bilo je od 3 do 10% niže u odnosu na procese s hlađenjem, s tim da je



i u tom slučaju povećanje tlaka povećalo retenciju antocijana na membrani. Među retentatima, najmanja koncentracija izmjerena je u onom uzorku dobivenom koncentriranjem na 25 bara bez hlađenja (134,63 mg/L).

Povećanje temperature tijekom koncentriranja nanofiltracijom rezultira smanjenjem viskoznosti retentata i povećanjem permeabilnosti i difuzijskog koeficijenta membrane, a može dovesti i do određenih oštećenja i kemijskih promjena na membrani i u uzorku (Gurak i sur., 2010; Pozderović i sur., 2016). Iz tog razloga, zadržavanje polifenolnih spojeva se smanjuje povećanjem temperature, a pri tome može doći i do termičke degradacije tih spojeva, posebice monomera antocijana koji su vrlo nestabilni i termolabilni u slobodnom obliku. Intenzitet boje vina ovisiti će o stabilnosti slobodnih antocijana koja se povećava polimerizacijom tih spojeva s drugim tvarima u vinu (npr. tanini). Termičkom razgradnjom antocijana uz prisutnost kisika dolazi do stvaranja polimernog obojenog materijala i smeđih pigmentata, čiji udio i intenzitet boje raste povećanjem temperature (Danişman i sur., 2015; Pozderović, 2016). **Slika 13** prikazuje postotak polimerne boje u analiziranim uzorcima vina i retentata pri različitim procesnim parametrima. Početni uzorak vina sadržavao je 54,77% polimerne boje, a nakon procesa koncentriranja nanofiltracijom došlo je do povećanja njenog udjela za oko 6% u svim dobivenim retentatima. Vrijednosti su se kretale od 60,56% u retentatu dobivenom nanofiltracijom na 25 bara uz hlađenje do 60,87% u retentatu dobivenom bez hlađenja s primjenom tlaka od 45 bara. Iako su razlike nisu velike, vidljivo je da je povećanje temperature pogodovalo razgradnji antocijana (proces bez hlađenja). Primjenom višeg tlaka tijekom procesa nanofiltracije dolazi do bržeg rasta temperature s vremenom, pa je, iz tog razloga, udio polimerne boje nešto veći u retentatima dobivenim pri višim tlakovima (45 i 55 bara), naročito ukoliko hlađenje nije primijenjeno.

Antioksidacijska aktivnost svojstvo je koje posjeduju polifenolni spojevi, budući da sprječavaju nepoželjno djelovanje slobodnih radikala. Slobodni radikali su nestabilni budući da im nedostaje jedan elektron te zbog toga mogu izazvati niz štetnih lančanih reakcija u organizmu koje rezultiraju razvojem raznih kroničnih bolesti. Antioksidansi, odnosno polifenolne tvari, doniraju svoj elektron čime stabiliziraju molekulu radikala (Lobo i sur., 2010).

U analiziranom crnom vinu i retentatima dobivenim koncentriranjem vina nanofiltracijom pri različitim transmembranskim tlakovima i temperaturama, antioksidacijska aktivnost određena je primjenom četiri različite metode (DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC). DPPH i ABTS metode za određivanje antioksidacijske aktivnosti su dekolorizacijske metode, odnosno temelje se na gubitku boje reagensa u prisutnosti antioksidanasa. FRAP i CUPRAC metode se temelje na suprotnom principu po kojem povećanje udjela antioksidanasa rezultira povećanjem intenziteta boje i apsorbancije upotrijebljenog reagensa. Sve četiri metode razlikuju se prema mehanizmu određivanja antioksidacijske aktivnosti i uvjetima reakcija te samo jedna najčešće nije dovoljna za prikaz antioksidacijskog kapaciteta vina (Büyüktuncel i sur., 2014).

Antioksidacijska aktivnost analiziranih uzoraka prikazana je na **Slikama 14** i **15**. Početni uzorak vina sadržavao je 10,34  $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$  prema DPPH metodi (**Slika 14**), a nakon koncentriranja nanofiltracijom, dobiveni retentati sadržavali su 50 do 65% veće koncentracije antioksidanasa. Najveći udio detektiran je u retentatu dobivenom nanofiltracijom na 55 bara uz hlađenje (17,03  $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$ ). Povećanje temperature (proces bez hlađenja) nije imao značajan utjecaj na zadržavanje antioksidanasa koji su određeni DPPH metodom. Slično ponašanje zabilježeno je i kod FRAP metode (**Slika 14**), s tim da su FRAP vrijednosti bile najmanje u odnosu na ostale metode. U početnom uzorku izmjereno je 1,86  $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$ , a najveća vrijednost je ponovno zabilježena u retentatu dobivenom koncentriranjem uz hlađenje i primjenu tlaka od 55 bara (3,32  $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$ ).

Prema ABTS metodi (**Slika 15**), antioksidacijska aktivnost početnog uzorka vina iznosila je 12,17  $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$ , čija se vrijednost udvostručila nakon koncentriranja nanofiltracijom. Najveća vrijednost, kao i u slučaju DPPH i FRAP metode, izmjerena je nakon koncentriranja vina na 55 bara uz primjenu hlađenja (27,21  $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$ ). Neznatno niže vrijednosti izmjerenu su u retentatima dobivenim procesima koncentriranja bez primjene hlađenja, s tim da povećanje tlaka i u tom slučaju, rezultira većim zadržavanjem antioksidanasa. CUPRAC metodom izmjerene su najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u uzorcima (69,46  $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$  u početnom uzorku vina) te je ujedno primijećeno i najveće povećanje tih vrijednosti nakon koncentriranja nanofiltracijom (149,99  $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$  u retentatu nakon koncentriranja na 55 bara uz hlađenje). Značajno manje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti izmjerene CUPRAC metodom detektirane su u retentatima nakon koncentriranja

bez primjene hlađenja, u odnosu na one dobivene procesima s hlađenjem, gdje je najmanja vrijednost dobivena pri najnižem tlaku, 25 bar (99,04  $\mu\text{mol TE}/100\text{ mL}$ ).

Sadržaj galne kiseline, (+)-katehina i (-)-epikatehina u analiziranom crnom vinu Cabernet Sauvignon i njegovim retentatima dobivenim koncentriranjem nanofiltracijom prikazan je na **Slici 16**, dok su koncentracije kaftarne, kafeinske i kutarne kiseline prikazane na **Slici 17**.

Vrijednosti koncentracija (+)-katehina i (-)-epikatehina u početnom vinu su redom iznosile 54,7 i 47,0 mg/L. Najveće vrijednosti zabilježene su ponovno u retentatu nakon koncentriranja na 55 bara uz hlađenje. Povećanje temperature (procesi bez hlađenja) rezultiralo je nešto manjim zadržavanjem ovih spojeva u retentatima pri viši tlakovima, dok su pri nižim tlakovima (25 i 35 bara) koncentracije bile nešto više u odnosu na one u retentatima dobivenim koncentriranjem s primjenom hlađenja.

Galna kiselina spada u fenolne, hidroksibenzojeve kiseline. U prirodi se može pronaći u slobodnom obliku ili kao dio hidroliziranih tanina. Njena koncentracija u početnom uzorku vina iznosila je 23,2 mg/L. Nakon koncentriranja nanofiltracijom uz hlađenje, u retentatima su izmjerene 25 do 28% veće vrijednosti galne kiseline, s najvišom koncentracijom u retentatu dobivenom primjenom tlaka od 55 bara (29,8 mg/L). Nakon procesa nanofiltracije bez primjene hlađenja, došlo je do gubitka i smanjenja koncentracije galne kiseline u retentatima, posebice kod primijenjenog tlaka od 25 bara (22,0 mg/L).

Pored galne kiseline, dominantne fenolne kiseline u analiziranom vinu su kaftarna, kafeinska i kutarna kiselina (**Slika 17**) koje spadaju u hidroksicimetne kiseline. Promjene koncentracija ovih kiselina prati već spomenuti trend, gdje je nakon koncentriranja došlo do zadržavanja i povećanja njihovih koncentracija u odnosu na početni uzorak vina koji je sadržavao 49,1 mg/L kaftarne, 13,0 mg/ kafeinske te 16,8 mg/L kutarne kiseline. Razlike između koncentracija navedenih kiselina u pojedinim retentatima dobivenim pri različitim primijenjenim tlakovima nisu značajne, ali se može primijetiti da su najveće vrijednosti sve tri kiseline izmjerene u retentatu dobivenom koncentriranjem na 55 bara uz hlađenje. Smanjenjem temperature retentata zbog primjene hlađenja rezultiralo je nešto većim zadržavanjem ovih spojeva, iako u slučaju kutarne kiseline, razlika među uzorcima gotovo i da nema.

## **6. ZAKLJUČCI**

Na osnovu dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Membranski proces nanofiltracija se pokazala kao dobra metoda za koncentriranje crnog vina Cabernet Sauvignon, posebice uz primjenu tlaka od 55 bara i uz hlađenje retentata.
2. Porast primijenjenog transmembranskog tlaka pogodovao je većem zadržavanju polifenolnih spojeva, flavonoida i antocijana kod oba temperaturna režima (s i bez hlađenja), s tim da je povećanje temperature rezultiralo nešto manjim koncentracijama navedenih spojeva u retentatima u odnosu na one dobivene koncentriranjem uz primjenu hlađenja.
3. Povećanje radnog tlaka rezultiralo je većim zadržavanjem spojeva, ali i porastom temperature retentata, posebice u procesima bez hlađenja. To može rezultirati degradacijom pojedinih sastojaka vina kao što su antocijani, što rezultira povećanjem udjela polimerne boje. Porast od oko 6% detektiran je u svim retentatima.
4. Sniženje temperature i povećanje radnog tlaka rezultiralo je i većim zadržavanjem antioksidacijske aktivnosti u retentatima.
5. Slično ponašanje detektirano je i kod fenolnih kiselina te (+)-katehina i (-)-epikatehina gdje je primjena viših tlakova (45 i 55 bara) te hlađenja smanjila gubitak navedenih spojeva.
6. Najveće koncentracije tvari boje postignute su koncentriranjem vina procesom nanofiltracije na 55 bara uz primjenu hlađenja.

## **7. LITERATURA**

- Alpeza I: Temelji kemijskog sastava vina. *Stručni rad*. Glasnik zaštite bilja, Zagreb, 2008.
- Andabak J: Utjecaj fermentacijske posude na aromatski profil i boju vina sorte plavac mali. Diplomski rad, Prehrambeno- tehnološki fakultet Osijek, 2017.
- Andersen OM: Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. CRC Press, Boca Raton FL, USA, 2006.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K: Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* 127:183-198, 2002.
- Ameriane MA: The Technology of wine making. *Oesterreichischer Milchwirtschaftsfonds*, Vienna, 1980.
- Apak R, Gorinstein , Böhm V, Schaich K M, Özyürek M, Güçlü K: Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 85 (5), 957–998, 2013.
- Bakula I: Membranski procesi u prehrambenoj industriji. *Završni rad*. Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, 2015.
- Banvolgyi S, Savaş Bahçeci K, Vatai G, Bekassy S i Bekassy-Molnar E: Partial dealcoholization of red wine by nanofiltration and its effect on anthocyanin and resveratrol levels. *Food Science and Technology International* 22:677–687, 2016.
- Büyüktuncel E, Porgalı E, i Çolak C: Comparison of total phenolic content and total antioxidant activity in local red wines determined by spectrophotometric methods. *Food and Nutrition Sciences* 5:1660–1667, 2014.
- Danişman G, Arslan E, Toklucu AK: Kinetic analysis of anthocyanin degradation and polymeric. *Czech Journal of food science* 33: 103-108, 2015.
- Derimšek H: Suvremeni tehnološki postupci u proizvodnji bijelih vina. *Završni rad*. Prehrambeno tehnološki fakultet Osijek, 2010.
- Dubrović I: Utjecaj ultrazvuka visokog intenziteta na antioksidacijsku aktivnost te mikrobiološku kakvoću soka od jagode. *Doktorski rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2012.
- Giacobbo A, Bernardes AM, Rosa MJF i Norberta de Pinho M: Concentration polarization in ultrafiltration/nanofiltration for the recovery of polyphenols from winery wastewaters. *Membranes* 8:46-57, 2018.
- Giusti MM, Wrolstad RE: Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In *Current protocols in food analytical chemistry*. John Wiley & Sons, New York, F1.2.3-F.1.2.13., 2001.
- Gordon MH: The development of oxidative rancidity in foods. *Antioxidants in food*, Woodhead Publishing Ltd, 2001.
- Grba S: Alkohol i kvasci. *Stručna i poslovna knjiga*, Zagreb , 2000.

- Gurak PD, Cabral MC, Rocha-Leão M H, Matta VM: Quality evaluation of grape juice concentrated by reverse osmosis. *Journal of food engineering* 96: 421-426, 2010.
- Haslam, E. (1980) In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* 19, 2577–2582
- Herjavec S: Način izvođenja berbe grožđa i kretanje metanola u bijelim vinima. *Znanstveni rad*. Fakultet poljoprivrednih znanosti Zagreb, 1990.
- Jakobek L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Kopjar M: Utjecaj dodatka trehaloze na kvalitetu paste od jagoda. *Doktorski rad*. Prehrambeno- tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Licul R, Premužić D: *Praktično vinogradarstvo i podrumarstvo*. Znanje, Zagreb, 1977.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N: Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy review* 4: 118-126, 2010.
- Lytra G, Tempere S, Floch A, Revel G, Barbe JC: Study of Sensory Interactions among Red Wine Fruity Esters in a Model Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 8504-8513, 2013.
- Maletić E, Karaglan Kontić J, Pejić I: *Vinova loza; ampelografija, ekologija, oplemenjivanje*. Školska knjiga, Zagreb 2008.
- Maris J: Terpenes in the Aroma of Grapes and Wines. *A Review* 4:39-44, 1983.
- Mihaljević M: Primjena tekućinske kromatografije za određivanje vitamina C u sokovima od povrća. *Završni rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2017.
- Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodnog gospodarstva: Zakon o vinu (Narodne novine br. 32/2019), 2019.
- Mirošević N: *Vinogradarstvo*. Nakladni zavod Globus Zagreb, 1996.
- Moslavac T: Koncentriranje model otopina alkohola, estera i aldehida reverznom osmozom. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno tehnološki fakultet u Osijeku, 2003.
- Mulder M: *Basic principles of membrane technology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, 1996.
- Pichler A: Tehnologija vina. Nastavni materijali. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2016.
- Pichler A: Utjecaj dodataka i skladištenja na kvalitetu, reološka i termofizikalna svojstva paste od maline. *Doktorski rad*. Prehrambeno – tehnološki fakultet u Osijeku, 2011.
- Planinić M :;Utjecaj procesnih parametara na kvalitetu vina Erdutska graševina kod ultrafiltracije pločastim modulom. *Diplomski rad*. Prehrambeno- tehnološki fakultet, Osijek, 1998.



- Popović K: Utjecaj koncentriranja membranskim procesima na tvari boje i arome soka od aronije. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno- tehnološki fakultet Osijek, 2019.
- Possner DRE, Kliwer WM: The localisation of acids, sugars, potassium and calcium in developing grape berries. *Vitis* 24: 229 – 240, Department of viticulture and enology, USA, 1980.
- Pozderović A: Tehnologija vina. Interna skripta, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2010.
- Pozderović A: Tehnologija vina. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2013.
- Pozderović A, Popović K, Pichler A i Jakobek L: Influence of processing parameters on permeate flow and retention of aroma and phenolic compounds in chokeberry juice concentrated by reverse osmosis. *Cyta-Journal of Food* 14:382-390, 2016.
- Prce V: Sadržaj antocijana, polifenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost u crnim vinima slovačkih vinogorja. *Diplomski rad*. Prehrambeno- tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Prce V: Sadržaj antocijana, polifenola, flavonoida i antioksidativna aktivnost u crnim vinima slovačkih vinogorja. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Puškarčić A: Utjecaj pH vrijednosti na mehanizam uklanjanja farmaceutika RO/NF membranama. *Diplomski rad*. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016.
- Rastija V, Medić-Šarić M: Kromatografske analize polifenola u vinima. *Kemija u industriji*, 58 (3): 121-128, 2009.
- Ribereau Gayon, Glories Y, Maujean A, Dudourdiu D: Handbook of enology – the microbiology of wine and vinifications, second edition. *John Wiley and sons*, Chichester, West Sussex, England, 2006.
- Roger B: When did oxygenic photosynthesis evolve?. *Philosophical Transactions B* 363: 2731–2743, 2008.
- Roginsky V, Lissi E: Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92: 235-254, 2005.
- Rukavina J: Zadržavanje tvari boje i arome u soku aronije tijekom koncentriranja nanofiltracijom. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2016.
- Seman A, Khayet M, Hilal M: Nanofiltration thin-film composite polyester polyethersulfone-based membranes prepared by interfacial polymerization. *Journal of Membrane Science* 348 :109–116, 2010.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ: *Osnove analitičke kemije. 1st edition*. Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- Skupien K, Oszmajnski J,: Comparison of six cultivars of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch) grown in northwest Poland. *European Food Research Technology*, 219: 66-70, 2004.

- Smiljanić J: Utjecaj temperature i tlaka na protok permeata kod koncentriranja soka aronije nanofiltracijom. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki, Osijek, 2013.
- Šumanovac S: Proizvodnja etilnog alkohola iz melase šećerne repe modificiranim postupkom po Vogelbuschu, Specijalistički rad, Prehrambeno- tehnološki fakultet Osijek, 2016.
- Tondini F, Cristoba A, Vladimir Jiranek: Early adaptation strategies of *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* to coinoculation in high sugar grape must-like media: *Food Microbiology* 90: 160-167, 2020.
- Stehlik-Tomas: Proizvodnja alkohola i prehrambenog kvasca. Nastavni materijali. [http://www.pbf.unizg.hr/content/.../1/file/BT\\_3\\_Tehnologija\\_+Alkohola?fbclid=IwAR3n\\_L1XZmilAM6HtCYRsQQH-X1IWWnlqLt9VhWzz3IDPvsp8IkKvoZUz2M](http://www.pbf.unizg.hr/content/.../1/file/BT_3_Tehnologija_+Alkohola?fbclid=IwAR3n_L1XZmilAM6HtCYRsQQH-X1IWWnlqLt9VhWzz3IDPvsp8IkKvoZUz2M) [7.8.2020.]
- Versari A, Ferrarini R, Parpinello GP, Galassi S: Concentration of grape must by nanofiltration membranes. *Food and Bioproducts Processing*, 81(3): 275–278, 2003.
- Vrdoljak I: Utjecaj membranske filtracije na aromu i kemijski sastav vina sorte graševina. *Diplomski rad*, Prehrambeno- tehnološki fakultet, Osijek, 2009.
- Vuković M: Utjecaj membranske filtracije na organoleptička svojstva vina sorte Graševina. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2000.
- Warczok J, Ferrando M, Lopez F, Guell C: Concentration of apple and pear juices by nanofiltration at low pressures. *Journal of Food Engineering*, 63: 63–70, 2004.
- Wrolstad RE, Durst RW, Lee J: Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, 16: 423-428, 2005.
- Zagorščak M: Utjecaj vinogorja i sorte na sadržaj polifenola i antocijana crnih vina. *Diplomski rad*. Prehrambeno- tehnološki fakultet Osijek, 2011.
- Zobundžija D: Utjecaj dodataka na tvari boje i arome kupinovih vina. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2016.
- Zoričić M: *Podrumarstvo*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, 1996.