

Utjecaj vinskog kvasca i vinske posude na polifenolni sastav i aromu vina Chardonnay kutjevačkog vinogorja

Babić, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:109:089594>

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

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

REPOZITORIJ

PTF

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

Kristina Babić

**UTJECAJ VINSKOG KVASCA I VINSKE POSUDE NA POLIFENOLNI
SASTAV I AROMU VINA CHARDONNAY KUTJEVAČKOG VINOGRJA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za prehrambene tehnologije
Katedra za prehrambeno inženjerstvo
Franje Kuhača 18, 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 2021./2022. održanoj 28.04.2022.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Anita Pichler*
Pomoć pri izradi: dr.sc. *Ivana Ivić*

Utjecaj vinskog kvasca i vinske posude na polifenolni sastav i aromu vina Chardonnay kutjevačkog vinogorja

Kristina Babić, 0113141195

Sažetak:

Vino je proizvod koji obiluje različitim hlapljivim spojevima koji doprinose njegovoj kvaliteti i aromi. Spojevi koji se pronalaze u vinu djelomično potječu iz samog grožđa dok jedan dio nastaje tijekom fermentacije i odležavanja vina. Stoga, odabir kvasca i posude za odležavanje ima veliki utjecaj na kemijski sastav i aromu vina. Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj vinskog kvasca i primjenu različitih vinskih posuda na polifenolni sastav i aromu vina Chardonnay. Prilikom istraživanja koristili su se autohtoni kvasci i selekcionirani kvasac *Saccharomyces bayanus*. Odležavanje vina provedeno je tijekom dvanaest mjeseci u inox posudi te u *barrique* bačvama srednjeg i jakog paljenja. Rezultati su pokazali da je najveća koncentracija polifenolnih spojeva zabilježena kod uzorka vina koje je dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima te koje je odležalo u hrastovoj bačvi sa srednjim paljenjem. U analiziranom Chardonnay vinu najviše je prisutno spojeva koji vinu daju voćnu notu dok je najmanje zastupljena citrusna nota. Tijekom istraživanja dodatno se odredilo prisustvo elemenata u tragovima i parametri boje.

Ključne riječi: vino, polifenoli, arome, vinski kvasac, Chardonnay, vinska posuda

Rad sadrži: 56 stranica
11 slika
7 tablica
0 priloga
44 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. Izv. prof. dr. sc. <i>Ante Lončarić</i>	zamjena člana

Datum obrane: 27. rujna 2022.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Food Technologies
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

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 April 28, 2022.

Mentor: *Anita Pichler*, PhD associate prof.

Technical assistance: *Ivana Ivić*, PhD

The Influence of Wine Yeast and Wine Vessel on the Polyphenolic Composition and Aroma of Chardonnay Wine from the Kutjevo Vineyards

Kristina Babić, 0113141195

Summary:

Wine is a product which contains various volatile compounds that contribute to its quality and aroma. Compounds that are found in wine partly originate from the grapes themselves, while other part is created during the fermentation and aging of wine. Therefore, the choice of yeast and vessel for wine aging has a great influence on the chemical composition and aroma of wine. The aim of this thesis was to examine the influence of wine yeast and the use of different wine vessel on polyphenolic composition and aroma of Chardonnay wine. During the research, autochthonous yeasts and selected *Saccharomyces bayanus* yeasts were used. Aging of the wine was carried out through twelve months in stainless steel tank and barrique barrels with medium and heavy toasting. The results showed that the highest concentration of polyphenolic compounds was measured in the sample of wine that was obtained by spontaneous fermentation with autochthonous yeasts and that was aged in an oak barrel with medium toasting. In the analysed Chardonnay wine, the compounds that contribute to the fruity aroma were most abundant, while the citrus aroma was the least present. During the research, the presence of trace elements and colour parameters were additionally determined.

Key words: Wine, polyphenols, aroma, wine yeast, Chardonnay, wine vessel

Thesis contains: 56 pages
11 figures
7 tables
0 supplements
44 references

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: September 27, 2022.

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 izv. prof. dr. sc. Aniti Pichler i asistentici dr. sc. Ivani Ivić na izdvojenom vremenu, pomoći i stručnim savjetima prilikom izrade diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji na neizmjernoj podršci i razumijevanju tijekom studiranja.

Hvala mom bratu koji je svaki moj pad okrenuo na šalu i izvukao osmijeh na moje lice. Hvala mom dečku na podršci i razumijevanja kada je bilo potrebno. Najveće hvala mojoj mami na bezuvjetnoj ljubavi, hvala što si tijekom života, pa tako i studiranja bila moj najveći oslonac i podrška. Ovo je naš zajednički uspjeh!

Hvala mojim prijateljima i kolegama na svakoj pomoći, savjetu i zajedničkim trenucima provedenim tijekom ovih godina. I za kraj, ništa ne bi bilo isto bez moje Sile, Lole i Bibi, hvala vam!

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. VINOVA LOZA	4
2.2. CHARDONNAY	5
2.3. PROIZVODNJA BIJELIH VINA	6
2.4. VINSKI KVASAC	9
2.5. VINSKE POSUDE	10
2.6. KEMIJSKI SASTAV	12
2.6.1. Alkoholi	12
2.6.2. Kiseline	13
2.6.3. Ugljikohidrati.....	13
2.6.4. Esteri	14
2.6.5. Aldehidi i ketoni	14
2.6.6. Terpeni	15
2.6.7. Elementi u tragovima	15
2.6.8. Polifenolni spojevi	15
2.6.9. Antioksidacijska aktivnost	16
2.6.10. Aroma vina	16
2.7. KROMATOGRFSKE METODE	17
2.7.1. Plinska kromatografija	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. ZADATAK	20
3.2. MATERIJALI	21
3.2.1. Konvencionalno bijelo vino	21
3.2.2. Kemikalije	21
3.3. METODE	22
3.3.1. Određivanje aromatskog profila	22
3.3.2. Određivanje elemenata u tragovima	24
3.3.3. Određivanje ukupnih polifenola.....	24
3.3.4. Određivanje ukupnih flavonoida.....	24
3.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti.....	24
3.3.6. Određivanje boje u CIELab sustavu.....	27
3.3.7. Statistička obrada podataka.....	28
4. REZULTATI	29
5. RASPRAVA	40
6. ZAKLJUČCI	44
7. LITERATURA	46

Popis oznaka, kratica i simbola

HPLC	TEKUĆINSKA KROMATOGRFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI
GC	PLINSKA KROMATOGRFIJA
UV/VIS	ULTRALJUBIČASTA-VIDLJIVA SPEKTROSKOPIJA
MT	SREDNJE PALJENJE
HAT	JAKO PALJENJE
ABTS	2,2-AZINOBIS(3-ETILBENZOTIAZOLIN SULFONSKA KISELINA)
FRAP	ENG. FERRIC-REDUCING ANTIOXIDANT POWER ASSAY
CUPRAC	ENG. CUPRIC-REDUCING ANTIOXIDANT CAPACITY
DPPH	2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIL
SPME	MIKROEKSTRAKCIJA NA ČVRSTOJ FAZI
ANOVA	ANALIZA VARIJANCI
PCA	ANALIZA GLAVNIH KOMPONENTI
PC1	PRVA GLAVNA KOMPONENTA
PC2	DRUGA GLAVNA KOMPONENTA
LSD	FISHER-OV TEST NAJMANJE ZNAČAJNE RAZLIKE

1. UVOD

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) se ubraja u porodicu Vitaceae. Listopadna je drvenasta biljka koja raste u obliku grma. Unutar porodice Vitaceae razlikuju se oko 970 vrsta koje su podijeljene u 14 rodova. Vinova loza prilagodljiva je različitim klimatskim uvjetima. Pri proizvodnji vina koristi se isključivo *Vitis vinifera* (Mirošević i sur., 2009).

Vino se prema Zakonu o vinu (NN 32/19) definira kao poljoprivredno prehrambeni proizvod koji se dobiva alkoholnom fermentacijom masulja ili mošta od grožđa koje je svježije i pogodno za preradu. Prema kakvoći vina se mogu podijeliti u 3 kategorije: stolna, kvalitetna i vrhunska. Također vina možemo kategorizirati i prema boji kao bijela, crna i ružičasta vina (Mirošević i sur., 2009).

Bijelo vino se proizvodi od bijelog grožđa te najznačajnije bijele sorte vina u Istočnoj kontinentalnoj Hrvatskoj su Graševina, Rajnski rizling, Chardonnay i Pinot sivi. Bijela vina se osim po sorti i boji grožđa razlikuju od crnih vina i po tehnologiji proizvodnje. Kod proizvodnje bijelog vina provodi se fermentacija soka grožđa bez peteljki i kože dok se kod crnog vina u proizvodnji uz sok koriste peteljka i koža. Na kvalitetu vina najveći utjecaj imaju hlapive i nehlapive komponente vina. Hlapivi spojevi odgovorni su za karakterističan miris vina, međutim tijekom proizvodnje može doći do gubitka hlapivih spojeva ili stvaranja sekundarnih aromatskih spojeva. Poznato je da vino sadrži antioksidanse koji sprječavaju štetan učinak slobodnih radikala na ljudski organizam i time pridonose očuvanju ljudskog zdravlja. Komponente koje su prvenstveno odgovorne za antioksidacijski učinak vina su fenolni spojevi. Količina fenolnih spojeva a samim time antioksidacijska aktivnost ovisit će o sorti vina i uvjetima tijekom proizvodnje. Bijela vina sadrže puno manje količine fenolnih spojeva u odnosu na crna vina (Giovinazzo i sur., 2019).

Cilj ovog istraživanja je bio ispitati utjecaj vinskog kvasca i različite vinske posude na polifenolni sastav i aromu vina Chardonnay. U tu svrhu, provedena je fermentacija sa selekcioniranim i autohtonim vinskim kvascem u posudi od nehrđajućeg čelika te u hrastovim barrique bačvama srednjeg i jakog paljenja u kojima je vino odležavalo dvanaest mjeseci. Nakon odležavanja vina, uzeti su uzorci kojima se odredio polifenolni sastav i aroma te su se dobiveni rezultati međusobno usporedili.

2. TEORIJSKI DIO

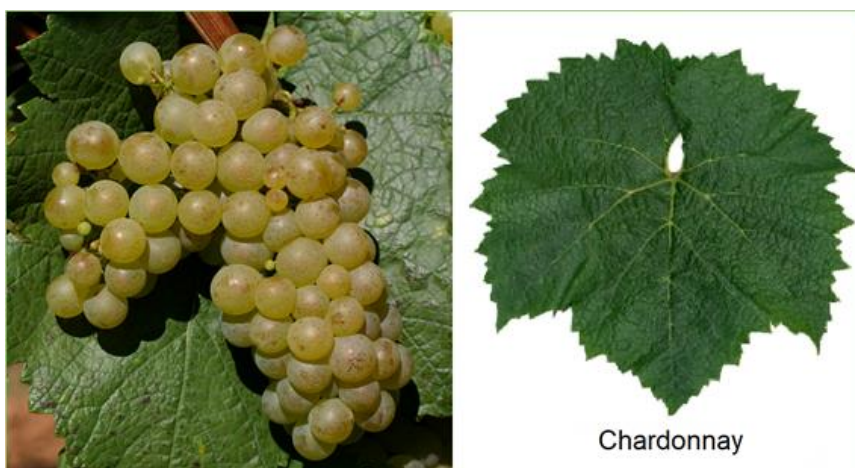
2.1. VINOVA LOZA

Vinova loza (*Vitis vinifera* L.) pripada porodici lozica (Vitaceae). Drvenasta je trajna penjačica grmolike građe. Visinom biljka može doseći i do 20 metara. Boja joj može varirati od crvenosmeđe do tamnožute boje. Pomoću vitica se uspinje po drveću i grmlju. Porijeklom je sa Sredozemlja, međutim, možemo ju pronaći i na drugim prostorima.

Kod proizvodnje vina koriste se vinove loze vrste *Vitis vinifera* ili križanci *Vitis vinifera* s drugim vrstama roda *Vitis*. Sjevernoameričke vrste vinove loze su otporne na niske temperature i filokseru, zbog čega se koriste kao podloga za ostale vrste. Istočnoazijske vrste uglavnom služe u dekorativne svrhe. Euroazijskoj vrsti pripada samo vrsta *Vitis vinifera* L., s dvije podvrste (*Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* i *Vitis vinifera* L. subsp. *vinifera* (Maletić i sur, 2008).

2.2. CHARDONNAY

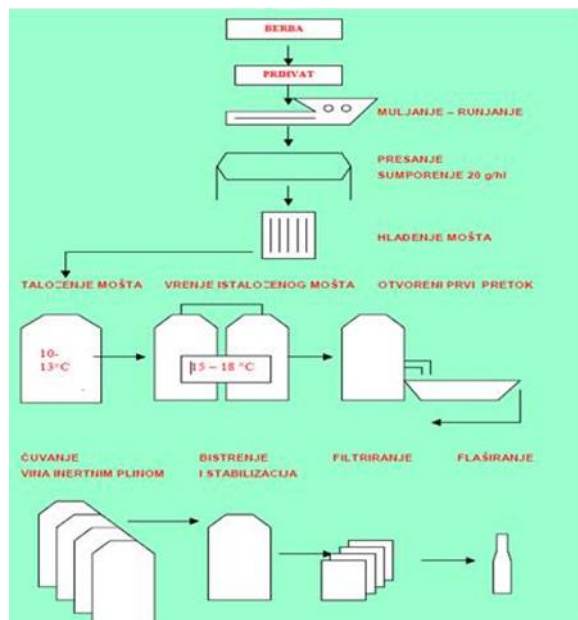
Chardonnay pripada među najpoznatije vrste vinskih sorta grožđa u svijetu. Ova sorta potječe iz vinskih regija Burgundije u istočnoj Francuskoj, ali je danas široko rasprostranjena po svijetu. Trenutno je najzastupljenija u SAD-u, Australiji, Francuskoj i Italiji. S obzirom da se može uzgajati u različitim klimatskim uvjetima to će uvelike utjecati na aromu i okus bobice. Svaka regija u kojoj se chardonnay uzgaja ima karakterističan i jedinstven okus. Najizraženiji okus imaju grožđa uzgojena u umjerenj klimi (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008). Prosječni grozd bude težine od oko 200 g. Loza je srednje veličine, ali je vrlo jaka i brzo raste. Listovi su srednje veličine, okruglog oblika, tamno zelene boje sa vrlo malo dlačica po sebi. Bobice grožđa chardonnay su srednje veličine, od zelenkasto žute boje do blijedo zlatne boje. Sorta grožđa chardonnay je osjetljivija na *Botrytis* dok je vrlo otporna na ostale bolesti (Robinson, 2006).



Slika 1 Izgled grozda i lista sorte grožđa Chardonnay (Web 1)

2.3. PROIZVODNJA BIJELIH VINA

Vinifikacija je proces proizvodnje vina, od odabira grožđa i berbe pa sve do punjenja vina u boce. Svaki korak procesa vinifikacije je strogo kontroliran kako bi se rizik od pogrešaka sveo na minimum.



Slika 2 Shema vinifikacije bijelih vina (Web 2)

Proces vinifikacije bijelih vina možemo podijeliti na 3 osnovne faze: berba i prerada grožđa (muljanje, cijeđenje, prešanje), alkoholno vrenje mošta i formiranje kakvoće vina (Vrdoljak, 2009). Početni korak je berba grožđa koja se može obavljati pomoću strojeva ili manualno, ovaj proces je bitno korektno provesti kako ne bi došlo oštećenja bobica što bi mogle dovesti do infekcija i prijevremene fermentacije. Kada je berba završena grožđe se transportira u vinarije. Tijekom prijema grožđa provodi se vaganje, određivanje zrelosti i pregled grožđa. Zatim slijedi prerada grožđa.

Runjenje je proces pomoću kojeg se odvajaju bobice od peteljki te se ono može provoditi prije ili poslije muljanja. Muljanje je proces kojim se grožđe gnječi te dobivamo sok (mošt).

Danas postoje specijalizirani uređaji, runjače-muljače gdje se prvo odvija runjanje u bubnjevima s otvorima te se nakon toga provodi muljanje na valjcima. Na taj način dobijemo smjesu soka, sjemenki i kožice koja se naziva masulj. Peteljkovina se uklanja prva jer time uklanjamo gorčinu i trpkost te se oslobađaju mirisne komponente ove sorte (Muštović, 1985).

Kada je muljanje završeno slijedi cijedenje te nakon što zaostane masulj on se preša. Prije prešanja poželjno je depektinizirati masulj kako bi prešanje bilo lakše, a iskorištenje mošta veće. Prešanje se najčešće provodi kontinuiranim pužnim prešama.

Sumporenje mošta i vina se provodi iz nekoliko razloga, prvenstveno sprječava oksidaciju, kontrolira mikroorganizme i koagulaciju bjelančevina kod taloženja mošta. Sumporenje se provodi kod muljanja grožđa, a mošt sumporimo nakon prešanja pomoću kalijeva metabisulfita. Količina dodanog sumpora prvenstveno ovisi o zdravstvenom stanju grožđa, a istovremeno treba voditi računa da se ne koriste prevelike količine sumpora koje bi mogle štetiti ljudskom zdravlju. Ukoliko se sumporenje mošta provede korektno smanjit će se potreba za sumporenjem samog vina (Muštović, 1985).

Depektinizacija mošta služi kako bi se pektin razgradio i time se smanjila viskoznost mošta što bi pridonijelo bržem bistrenju mošta i vina. Ovaj proces se provodi pomoću pektolitičkih enzima, pri temperaturi od 10 – 25 °C. Ovisno o temperaturi vrijeme depektinizacije, proces može trajati od 3 do 4 sata (Vrdoljak, 2009).

Bistrenje mošta je proces prilikom kojeg se talože nečistoće iz mošta čija bi prisutnost u kasnijim fazama proizvodnje vina mogla loše utjecati na kvalitetu vina. Bistrenje osigurava smirenije i sigurnije vrenje. Imamo dva načina na koje se bistrenje može provesti: dodatkom bistrila ili taloženjem mošta tijekom 24 sata. Ukoliko je bistrenje mošta pravilno provedeno neće biti potrebe za naknadnim bistrenjem vina. Također bistrenje depektiniziranog mošta će trajati značajno kraće nego bistrenje mošta koji nije depektiniziran (Vrdoljak, 2009).

Alkoholna fermentacija mošta odvija se u dvije faze: glavno vrenje koje traje 5 – 10 dana kada se provodi u toplim uvjetima (do 20 °C) ili 7 – 14 dana ukoliko se provodi tijekom nižih temperatura (10 – 15 °C), te se provodi u aerobnim uvjetima. Druga faza je tiho vrenje koje se provodi na temperaturi od 15 °C, 3 – 6 tjedana pri anaerobnim uvjetima uz povremeno provjetravanje što pridonosi boljem iskorištenju šećera. Tijekom fermentacije dolazi do razlaganja šećera na primarne i sekundarne produkte uz pomoć kvasaca. Primarni produkti alkoholne fermentacije su etanol i CO₂, dok u sekundarne produkte se ubrajaju glicerol, hlapive kiseline, metanol, viši alkoholi, acetaldehid.

Prema tome kvasci imaju vrlo važnu ulogu kod proizvodnje vina s obzirom da pomoću njih nastaju glavne komponente koje su odgovorne za aromu vina te trebamo biti vrlo pažljivi prilikom odabira kvasca i kontrole parametara fermentacije.

Nakon provedene fermentacije vinu je potrebno odležavanje kako bi se vino odvojilo od taloga, dobila aroma i bistra boja. Temperature pri kojim se provodi odležavanje vina kreću se od 10 do 12 °C. Nakon odležavanja vino je spremno za pohranjivanje u boce koje će sačuvati kvalitetu vina (Vrdoljak, 2009).

2.4. VINSKI KVASAC

Kvasci su jednostanični eukariotski mikroorganizmi. Mogu biti okruglog ili ovalnog oblika, fakultativni anaerobi su iz roda gljiva. Prilagodljivi su na životinje uvijete pa tako mogu rasti na različitim temperaturama, pri različitim koncentracijama šećera te pri različitim pH vrijednostima (Aranda i sur., 2011).

Za vinarstvo važni kvasci su oni koje pronalazimo na samom grozdu, među kojima su najpoznatiji *Candida*, *Pichia*, *Cryptococcus*, *Hansenula* i *Rhodothorula*, te oni koji u kasnijim fazama proizvodnje dolaze u dodir sa sokom grožđa među kojima je najvažniji *Saccharomyces cerevisiae* (Fleet i sur., 2003). Također je važno imati na umu da mikroflora ponajprije ovisi o vremenskim uvjetima, temperaturi, tlu, geografskom položaju, sorti, korištenju pesticida i načinu berbe grožđa (Pretorius i sur., 1999).

U proizvodnji vina koriste se često starter kulture, najčešće *S. cerevisiae*, koje omogućavaju sigurnu i brzu fermentaciju koja je ključna za vino jednolike kvalitete (Capece i sur., 2010).

2.5. VINSKE POSUDE

Vinske posude možemo kategorizirati prema vrsti materijala od kojeg su izrađene na drvene, betonske, i kovinske od nehrđajućeg čelika i od plastike. Od prošlosti pa sve do danas najveću primjenu imaju drvene bačve od hrasta. Bačve imaju velik utjecaj na kakvoću vina, zbog toga je vrlo bitno pravilno održavanje bačve (Maletić i sur., 2008).

Kod proizvodnje drvenih bačvi koristi se drvo koje je bilo sušeno na otvorenom i izloženo svim vremenskim uvjetima tijekom tri godine te se od njega proizvodi dužica promjera od 45 do 60 cm (Jackson, 2008). Kada je bačva presvučena s dva obruča plašta bačva se izlaže otvorenom plamenu i vrši se tzv. „toasting“. Paljenjem drvo postaje savitljivo te na taj način dobijemo karakterističan oblik bačve. S obzirom na jačinu paljenja, bačve možemo podijeliti na 3 kategorije : bačve laganog paljenja (LT), srednjeg paljenja (MT) i jakog paljenja (HAT). Kod bačvi s laganim paljenjem prisutna je veća koncentracija tanina i manji udio aromatskih spojeva. Bačve sa srednjim paljenjem imaju aromu vanilije, dok jako paljenje bačve doprinosi stvaranju topljivih fenola koji su odgovorni za pikantnu aromu i aromu po dimu (Tao i sur., 2014).



Slika 3 Hrastova bačva (Web 3)

Danas se u vinskim podrumima sve češće koriste cisterne od nehrđajućeg čelika. Sastav čelika od kojeg se proizvode cisterne mora sadržavati 18 do 20% kroma i 9 do 14% nikla. Sastav čelika od kojeg se proizvodi cisterna je vrlo bitan kako bi se omogućila otpornost prema kiselinama. Za proizvodnju betonskih cisterni koristi se armirani beton. Upotrebljavaju se uglavnom za stolna vina (Zoričić, 1996).



Slika 4 Inox cisterne (Tomas i Kolovrat, 2014)

2.6. KEMIJSKI SASTAV

2.6.1. Alkoholi

Najzastupljeniji alkohol u vinu je etanol (C_2H_5OH). Etanol vinu daje karakteristična svojstva vina, trpkost, viskoznost te je odgovoran za slatku, voćnu aromu vina (Jordao i sur., 2015).

Etanol nastaje prilikom alkoholne fermentacije iz šećera kao primarni produkt. Količina nastalog etanola ovisi o samom grožđu. Prema Pravilniku o proizvodnji vina (NN 2/05) kod proizvodnje stolnih vina dopušten volumni udio alkohola u vinu je minimalno 8,5 vol.%, a maksimalno 14 vol.% za proizvodnju vrhunskih i kvalitetnih vina. Uz etanol u vinu se mogu pronaći i drugi alkoholi kao što je metanol, glicerol i viši alkoholi.

Metanol (CH_3OH) se u vinu javlja kao nusprodukt fermentacije. Veće količine metanola pronalazimo kod vina koja su tijekom proizvodnje prošla proces maceracije i fermentacije masulja. Metanol je toksičan i u prevelikim dozama može dovesti do smrti, zbog toga postoje granične vrijednosti koncentracije metanola u vinu koje se ne smiju prekoračiti te iznose 150 mg/L. Kod bijelih vina prosječan udio metanola je oko 60 mg/L dok je kod crnih i ružičastih vina udio metanola nešto veći (Hodson i sur., 2017).

Glicerol ($C_3H_8O_3$) je nakon etanola najzastupljeniji alkohol u vinu. Na koncentraciju glicerola u vinu najveći utjecaj ima vrsta soja vinskog kvasca, sorta grožđa i koncentracija šećera u moštu. Također, njegova koncentracija se smanjuje tijekom odležavanja vina (Moreno i Peinado, 2012).

Kada govorimo o višim alkoholima tada mislimo na alkohole koji imaju 2 ili više ugljikova atoma. Njihova prisutnost u vinu ovisi o sorti grožđa, soju kvasca te uvjetima tijekom vinifikacije, uglavnom su prisutni u manjim koncentracijama od 150 – 550 mg/L. Od viših alkohola u vinu su najzastupljeniji amilalkohol, izobutanol i izoamilalkohol (Vrdoljak, 2009).

2.6.2. Kiseline

Kiseline u vinu su odgovorne za miris i okus vina stoga su poželjne, međutim, neke kiseline mogu biti prisutne u vinu kao pokazatelji kvarenja vina. U vinu se javljaju organske kiseline (hlapive i nehlapive), anorganske kiseline te soli kiselina. Najznačajnije su organske kiseline jer su one važne za organoleptička svojstva vina i za fizikalno – kemijsku i mikrobiološku ispravnost vina. Izvor organskih kiselina može biti grožđe (limunska kiselina, vinska kiselina, oksalna kiselina i dr.) siva plijesan na grožđu, te mogu nastati kao produkt fermentacije (octena kiselina, mliječna kiselina, piruvična kiselina i dr.) (Horvat, 2010).

U vinu najznačajnije hlapive kiseline su: octena kiselina, propionska kiselina, maslačna kiselina te karboksilne kiseline koje sadrže šest do deset ugljikovih atoma, one su prisutne u manjim koncentracijama dok povećana koncentracija ovih kiselina je pokazatelj kvarenja vina (Jackson, 2008).

Nehlapive kiseline koje se nalaze u vinu su : vinska, jabučna, limunska i jantarna kiselina. Najzastupljenija je jabučna i vinska kiselina, međutim, njihova koncentracija opada povišenjem temperature, disanjem i oksidacijom grožđa (Alpeza, 2008).

2.6.3. Ugljikohidrati

Ugljikohidrati su najučestalija skupina organskih spojeva u prirodi. Nastaju fotosintezom u kojoj sudjeluju zeleni dijelovi biljke, kod grožđa tu ulogu prvenstveno vrše listovi i malim dijelom bobice. Najzastupljeniji ugljikohidrati koji se nalaze u moštu i vinu su monosaharidi, oligosaharidi, sluzave tvari i pektin. Količina šećera u vinu ovisit će o zrelosti i zdravlju grožđa, vremenskim uvjetima, sorti itd. Grožđe pripada među najsladje voće te će udio šećera u grožđu biti od 17 do 25%. Tijekom zrenja bobica mijenja se i omjer glukoze i fruktoze pa je u početku glukoza u većim količinama, dok je pri postizanju tehnološke zrelosti njihov omjer izjednačen. Nakon što grožđe prođe tehnološku zrelost, a nije ubrano u njemu se povećava omjer saharoze (Mirošević i Karlogan Kontić, 2008).

Tijekom alkoholne fermentacije šećeri se prevode u alkohol, CO₂ i sekundarne produkte fermentacije. Ukoliko tijekom fermentacije ne reagira sav prisutan šećer može doći do zaostajanja tzv. neprevrelog šećera (nefermentiranog) koji je odgovoran za slatkasti okus vina. Prema količini neprevrelog šećera, vina možemo podijeliti na četiri kategorije:

Suho vino (do 4 g/L nefermentiranog šećera)

Polusuho vino (4 – 12 g/L nefermentiranog šećera)

Poluslatko vino (12 – 50 g/L nefermentiranog šećera)

Slatko vino (više od 50 g/L nefermentiranog šećera).

Također, šećeri se mogu prevesti do estera i aldehida što će u konačnici utjecati na aromu vina (Jackson, 2008).

Prisutnost pektina, sluzavih tvari i ostalih visokomolekularnih polisaharida može ometati procese taloženja i bistrenja vina.

Količinu šećera u grožđu i moštu se određuje pomoću moštne vage i refraktometra. Moštne vage koje se koriste za određivanje šećera su Oechslova i Baboova vaga (Horvat, 2010).

2.6.4. Esteri

Esteri u vinu imaju vrlo važnu ulogu jer utječu na okus i aromu vina. Nastaju esterifikacijom alkohola i kiselina. U vinu pronalazimo dvije vrste estera: voćni ester i ester koji nastaju tijekom fermentacije i ester koji nastaju tijekom dozrijevanja vina. Obje skupine su odgovorne za voćnu, svježiju aromu vina. Esteri su lako hlapivi spojevi pa zbog toga u prvoj godini dozrijevanja vina njihova koncentracija najviše opada. Također na njihovu koncentraciju utječu i uvjeti u kojima se vino čuva. Stoga je važno osigurati odgovarajuću ambalažu, niže temperature prostora i potpunu zaštitu od sunca (Alpeza, 2008).

U vinu najzastupljeniji ester masnih kiselina su etil-propionat, etil-acetat, fenil-acetat, etil-valerijat i drugi (Vrdoljak, 2009).

2.6.5. Aldehidi i ketoni

Aldehidi i ketoni su spojevi u vinu koji utječu na senzorska svojstva vina. Vrlo su reaktivni spojevi te reagiraju sa sulfitnom kiselinom i njezinim solima stvarajući lako topljive kiseline. Aldehidi nastaju alkoholnom fermentacijom te daju oštar miris vinu. Najviše nastaje acetaldehid, međutim veliki dio njega se prevodi u etanol, a manji dio doprinosi aromi. Za najintenzivniji miris je zaslužan heptanal. Alifatski aldehidi su prisutni u izrazito malim količinama (Vrdoljak, 2009).

Ketoni se u moštu i vinu mogu pronaći u puno manjim koncentracijama. Od ketona najviše pronalazimo aceton, acetoin i diacetil. Miris koji je karakterističan za prisutnost ketona je miris maslaca (Vrdoljak, 2009).

2.6.6. Terpeni

Koncentracija terpena u vinu je vrlo mala, međutim oni predstavljaju primarnu grožđanu aromu. Njihova koncentracija je ispod 1 mg/L. Terpeni su odgovorni za voćnu i citrusnu aromu vina (Moreno i Peinado, 2012). Terpene možemo podjeliti na slobodne i vezane. Slobodni terpeni su zaslužni za aromu grožđa, dok su vezani terpeni prekursori aromatskih spojeva u vinu. Djelovanjem enzima na vezane terpene oni se prevode do slobodnih terpena ili terpenskih alkohola koji su još aromatičniji (Michlmayr i sur., 2012).

2.6.7. Elementi u tragovima

Elementi u tragovima vrlo su važni kofaktori za enzime i vitamine, utječu na nutritivnu vrijednost vina i na aktivnost kvasaca. U vinu najzastupljeniji elementi u tragovima su :željezo, cink, bakar ,živa, kadmij, selen (Moreno i Peinado, 2012).

Na koncentraciju ovih elemenata u grožđu utječe sastav i tip tla, vremenski uvjeti, pesticidi, sorta grožđa i drugi okolišni čimbenici. Uz navedene čimbenike na koncentraciju elemenata u tragovima utječe i oprema za proizvodnju vina . Na primjer, ukoliko je oprema za proizvodnju zahrđana, te sadrži povišene koncentracije olova, željeza i bakra to može rezultirati povišenom koncentracijom ovih elemenata u gotovom vinu (Jackson, 2008).

2.6.8. Polifenolni spojevi

Polifenoli su kemijski spojevi koje pronalazimo u namirnicama biljnog podrijetla. Nastaju kao sekundarni metaboliti biljaka. Njihova koncentracija u biljkama ovisi o sorti, vremenskim uvjetima, načinu uzgoja i prerade biljke (Popović, 2019).

Poznati su kao antioksidansi zbog čega su poželjni za ljudski organizam jer sprječavaju štetan učinak slobodnih radikala. Bijelo vino ima puno manje količine polifenola u odnosu na crna vina (Giovinazzo i sur., 2019)

Polifenole možemo podijeliti u dvije kategorije : flavonoide i neflavonoide. Flavonoidi su biljni pigmenti čija je osnovna struktura aglikon. U flavonoide ubrajamo flavonole, antocijane i

flavan-3-ole. U neflavonoide ubrajamo fenolne kiseline i derivate benzojeve i cimetne kiseline kao što su: hidroksibenzojeva kiselina i hidroksicimetna kiselina (Jackson, 2008).

2.6.9. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidansi su tvari koje sprječavaju štetan učinak slobodnih radikala na stanice. Antioksidansi doniraju svoj elektron ili vodikov atom slobodnom radikalu kako bi on postao stabilniji. U vinu antioksidacijsku aktivnost pokazuju flavonoidi, antocijani, tanini, fenolne kiseline, lignani i stilbeni (Moreno i Peinado, 2012).

2.6.10. Aroma vina

Aroma vina predstavlja važnu karakteristiku vina, ona je pokazatelj zrelosti, zdravstvene ispravnosti, ali može biti i pokazatelj kvarenja vina. Također, aroma ima veliki utjecaj na potrošače pa tako i na odabir samog vina od strane potrošača. Za aromu su uglavnom odgovorne komponente kao što su aldehidi, ketoni, kiseline, esteri i druge. Na aromu grožđa utječe zrelost grožđa, način uzgoja, vremenski uvjeti i proces prerade. Svaka sorta grožđa ima svoju specifičnu aromu, međutim, prilikom prerade grožđa i proizvodnje vina, uslijed fermentacije i tijekom skladištenja vina prvobitna aroma grožđa se prevodi do konačne arome koja je karakteristična za vino (Moreno i Peinado, 2012).

S obzirom na izvor, arome u vinu možemo podijeliti na:

primarne arome – arome koje potječu iz samog grožđa i prema kojima se razlikuju pojedine sorte grožđa,

sekundarne arome – arome koje nastaju procesom alkoholne fermentacije, djelovanjem kvasca, i malolaktičke fermentacije, djelovanjem mliječnih bakterija,

tercijarne arome („bouquet“) – nastaju prilikom odležavanja vina uslijed kemijskih i enzimskih reakcija koje se događaju u vinu (Belda i sur., 2017).

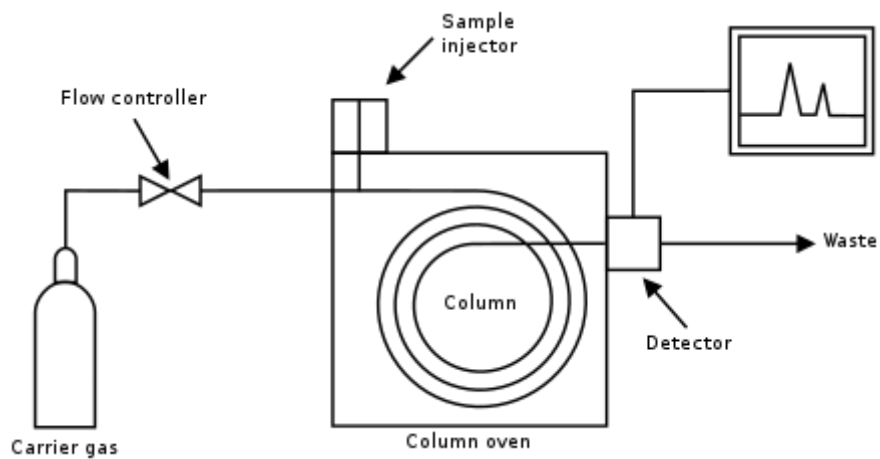
2.7. KROMATOGRAFSKE METODE

Kromatografske metode se zasnivaju na različitoj raspodjeli komponenata uzorka između dvije faze, od kojih je jedna stacionarna ili nepokretna, a druga je mobilna ili pokretna faza. Kod kromatografskih metoda pokretna faza je uglavnom u plinovitom ili tekućem stanju dok je stacionarna faza u čvrstom ili plinovitom stanju. Princip razdvajanja smjesa se zasniva na adsorpciji, ionskoj izmjeni ili fizikalnim svojstvima npr. gustoći molekula. Za kemijsku analizu vina najčešće se upotrebljavaju tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) i plinska kromatografija (GC) (Popović, 2019).

2.7.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (eng. *gas chromatography*) je analitička tehnika koja se primjenjuje za razdvajanje i analizu uzoraka koji mogu isparavati bez termičke razgradnje. Također, primjenjuje se i za odjeljivanje i pročišćavanje komponenti smjese, određivanje tlaka pare, koeficijenta aktivnosti i topline otopine. Osnovni uvjet za provođenje plinske kromatografije je hlapivost uzorka koji se analizira. Kod plinske kromatografije mobilna faza je inertni plin, stacionarna faza se nalazi u koloni i nju čine različiti ugljikovodici velike molekulske mase, esteri ili silikonska ulja. Plinska kromatografija radi na principu da se uzorak injektira u uređaj gdje on ulazi u plinski tok koji ga prenosi do kolone. Kao plin nosioc najčešće se upotrebljava helij, dušik, vodik ili argon. Lakše hlapive komponente se razdvajaju unutar kolone te ih plin nosioc provodi kroz kolonu. Detektor mjeri količinu komponenti koje izlaze izvan kolone (Skoog i sur., 1999; Pichler, 2011). Prema načinu separacije komponenti u smjesi plinsku kromatografiju dijelimo na tri tipa: frontalna plinska kromatografija, plinska kromatografija istiskivanjem i plinska kromatografija eluiranjem. Plinska kromatografija eluiranjem ima najveću primjenu u prehrambenoj industriji. Eluiranje se provodi konstantnim uvođenjem struje inertnog plina koja ispire separirane komponente s kolone. Kako bi eluiranje bilo ispravno plin nosioc ne smije reagirati s analiziranim uzorkom, mora biti suh i čist (Pichler, 2011). Također, vrlo je važno odabrati odgovarajuću kolonu koja će biti selektivna, termički stabilna, nehlapiva i koja neće stupati u reakciju s komponentama iz analiziranog uzorka. Postoje različite vrste detektora koje se mogu koristiti kod plinske kromatografije. Oni se

kategoriziraju prema kemijskom ili fizikalnom svojstvu koje koriste za detektiranje eluirane komponente. Prema tome postoje detektori koji rade na principu mjerenja toplinske vodljivosti komponenti, spektrometriji masa, radioaktivnoj i plamenoj ionizaciji, infracrvenoj i ultraljubičastoj spektrometriji. Koji god se detektor odabere najvažnije je da daje brzi odgovor i da je osjetljiv i na vrlo male količine komponente u plinu nosiocu (Pichler, 2011).



Slika 5 Sustav plinske kromatografije (Web 4)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj vinskog kvasca i različite vinske posude na polifenolni sastav i aromu vina Chardonnay kutjevačkog vinogorja. U tu svrhu korišteni su selekcionirani i autohtoni kvasci te je odležavanje provedeno u posudi od nehrđajućeg čelika i u hrastovim bačvama srednjeg i jakog paljenja u kojima je vino odležalo 12 mjeseci. U navedenom vinu bilo je potrebno odrediti polifenole, antocijane te antioksidacijsku aktivnost pomoću spektrofotometra. Kvantitativni udjela aromatičnih sastojaka proveo se primjenom instrumentalne plinske kromatografije i mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME).

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Konvencionalno bijelo vino

Analizirano je bijelo vino sorte grožđa Chardonnay. Karakteristike analiziranog vina:

- vinogradska regija: Istočna Kontinentalna Hrvatska,
- podregija: Slavonija,
- vinogorje: Kutjevo.

3.2.2. Kemikalije

Tijekom ovog istraživanja korištene su sljedeće kemikalije:

- Folin Ciocalteu reagens, natrijev klorid, kalijev, natrijev acetat, kalijev klorid, klorovodična kiselina, natrijev karbonat, natrijev nitrat, natrijev hidroksid, etanol, amonij acetat (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- natrijev acetat trihidrat, željezov klorid heksahidrat (Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska)
- mirtenol, aluminij klorid, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), monohidrat galne kiseline, kalij persulfat, Trolox ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kiselina), ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin sulfonska kiselina), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazine)(Sigma-Aldrich, St. Lois, SAD),
- bakrov klorid (Acros Organics, New Jersey, SAD),
- standardi elemenata Se, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, i Pb (TraceCERT, Fluka Analytical, St. Gallen, Švicarska)
- neokuproin, metanol (Merck, Darmstadt, Njemačka).

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje aromatskog profila

Kod metode za određivanje aromatskih spojeva u bijelom vinu primijenili smo plinsku kromatografiju. Određivanje kvantitativnog udjela aromatičnih sastojaka se provelo pomoću instrumentalne plinske kromatografije i mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME). Korišten je kromatograf tvrtke Agilent 7890B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5977A (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD).

Analiza je započela pipetiranjem 5 mL uzorka (bijelog vina) u staklenu vijalu uz dodavanje 1 g NaCl-a kako bi poboljšala ekstrakcija arome. Kako bi smo odredili koncentraciju spojeva arome koristili smo 10 μ L inertnog standarda mirtenola koji je naknadno dodan u vijalu. Vijala se stavlja u vodenu kupelj te se pomoću magnetske miješalice vrši konstantno miješanje uzorka pri čemu dolazi do adsorpcije spojeva arome na stacionarnu fazu u igli. Adsorpcija se odvija 45 min pri temperaturi od 40 °C nakon čega slijedi prenošenje igle u injektor. Unutar injektora dolazi do toplinske desorpcije spojeva arome u kolonu. Slijedi zagrijavanje kolone što rezultira odvajanjem spojeva arome zbog njihove različite hlapivosti, na način da se prvo odvoje lakše hlapivi spojevi.



Slika 6 Plinski kromatograf s masenim detektorom tvrtke Agilent (Web 5)

Plinski kromatograf je radio pod sljedećim uvjetima:

Parametri ekstrakcije:

temperatura: 40 °C,

vrijeme: 45 min,.

SPME punilo : 65 µm PDMS/DVB (Supelco)

GS-MS analitički uvjeti:

kolona: HP-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 µm),

početna temperatura: 40 °C (10 min),

temperatura gradijent 1: 3 °C/min do 120 °C,

temperatura gradijent 2: 10 °C/min do 250 °C,

završna temperatura: 250 °C,

temperatura injektora: 250 °C,

vrijeme desorpcije: 7 min,

temperatura detektora: 250 °C,

plin nosač: helij 5,0 (čistoća 99,9 %) ,

energija ionizacije: 70 eV,

maseni interval (m/z): 40 – 400.

Za identifikaciju dobivenih pikova na kromatogramu korištene su unaprijed postavljene baze spojeva Nist08 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, SAD) i Wiley 9 (Wiley, SAD) te retencijski indeks. Prilikom izračuna retencijskog indeksa korištena je dolje navedena jednadžba:

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

gdje je:

RI – retencijski indeks,

n – broj C atoma u alkanu koji izlaze prije nepoznatog spoja,

N – broj C atoma u alkanu koji izlaze nakon nepoznatog spoja,

x – nepoznati spoj,

t – retencijsko vrijeme (min).

3.3.2. Određivanje elemenata u tragovima

Za određivanje elemenata u tragovima korištena je metoda EDXRF s anodom molibdena. Za analizu smo odvojili 50 mL uzorka koji smo pomiješali s 10 µg inertnog standarda selenija. Pripremljeni uzorak je zamrznut tekućim dušikom u plastičnim posudama na temperaturu od - 80 °C i 0,015 mbara. Nakon zamrzavanja uzorak je stavljen u plastične držače koji su zatvoreni s mylar folijom i podvrgnut EDXRF metodi. Prilikom detekcije korišteni su sljedeći parametri: 45 kV, 35 mA te vrijeme zračenja 1000 s. Za detektiranje rendgenskog zračenja korišten je Canberra Si(Li) detektor hlađen s dušikom. Prilikom analize podataka koristio se IAEA QXAS software. Kako bi uspješno izradili kalibracijsku krivulju elemenata K, Mn, Pb, Zn, Ca, Rb, Br, Sr, Fe i Cu, koristili su se TraceCERT 1000 mg/ L certificirani standardi.

3.3.3. Određivanje ukupnih polifenola

Za određivanje ukupne koncentracije fenola korištena je Folin-Ciocalteu metoda. Ova metoda se zasniva na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom pri čemu dolazi do promjene boje, a zatim se mjeri dobiveni intenzitet boje pri valnoj duljini 765 nm (Ough i Amerine, 1988). Analiza je započela uzimanjem uzorka od 0,2 mL analiziranog vina u koje smo dodali 1,8 mL destilirane vode, 10 mL Folin-Ciocalteu reagensa te 8 mL otopine Na₂CO₃. Nakon miješanja, pripremljena smjesa se ostavi na sobnoj temperaturi i u zatamnjenom da stoji do 20 sati. Za mjerenje korišten je spektrofotometar Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) te se mjerila apsorbancija pri 765 nm.

3.3.4. Određivanje ukupnih flavonoida

Ukupna koncentracija flavonoida određuje se prema metodi opisane u Kim i sur., 2003, gdje se u epruvetu prvo otpipetira 0,5 mL uzorka, 4 mL destilirane vode i 0,3 mL 5%- tnog natrijevog nitrata. Kroz pet minuta u epruvetu smo dodali 1,5 mL 2%-tnog aluminij klorida. Smjesa stoji 5 minuta nakon čega dodajemo 2 mL natrijeva hidroksida i 1,7 mL vode. Kada je smjesa uzorka bila pripremljena mjerili smo apsorbanciju pri 510 nm.

3.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti koristi se nekoliko metoda kako bi dobili što preciznije rezultate antioksidacijske aktivnosti, s obzirom da postoji velik broj različitih spojeva koji imaju antioksidativan učinak ne postoji univerzalna metoda kojom bi se odredila

antioksidativna aktivnost već se koristi nekoliko metoda s različitim mehanizmom. S obzirom na reakcijski mehanizam razlikujemo HAT mehanizam, SET mehanizam i mehanizam vezanja lipida na antioksidans i stvaranje lipid-antioksidans kompleksa. HAT mehanizam (eng. *hydrogen atom transfer*) radi na principu donacije atoma vodika, a SET mehanizam (eng. *single electron transfer*) koji radi na principu donacije elektrona (Jakobek, 2007).

Za određivanja antioksidacijske aktivnosti u bijelom vinu koristile su se 4 metode: DPPH, CUPRAC, ABTS i FRAP metoda.

DPPH metoda (2,2-difenil- 1-pikrilhidrazil) – zasniva se na principu redukcije DPPH reagensa djelovanjem antioksidansa te se pomoću spektrofotometra mjeri apsorbancija pri 517 nm i rezultat se prikazuje pomoću kalibracijske krivulje Troloxa ($\mu\text{mol TE}/100\text{mL}$) (Popović, 2019). Za provedbu ove metode prvo je bilo potrebno pripremiti tri epruvete s po 0,2 mL uzorka, s obzirom da se rade tri ponavljanja. Uzorku je zatim dodano 3 mL DPPH otopine te se nakon 15 minuta mjerila apsorbancija pri 517 nm.

Metoda CUPRAC – zasniva se na redoks reakciji CUPRAC reagensa i antioksidansa iz uzorka prilikom čega dolazi do obojenja u žuto. Ova metoda se koristi kada želimo odrediti antioksidacijsku aktivnost tiola, flavonoida i fenolnih kiselina (Gupta, 2015). Za provedbu ove metode prvo pripremimo tri epruvete s 0,2 mL uzorka i 0,9 ml destilirane vode jer se rade tri ponavljanja te se kao konačni rezultat uzima njihova srednja vrijednost. Zatim u epruvete dodajemo po 1 ml svakog od tri reagensa za CUPRAC metodu. Reagensi koji su se koristili su: otopina $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (10 mM), otopina neokuproina (7,5 mM) i otopina NH_4Ac pri pH 7,0. Nakon pola sata mjerio se intenzitet žute boje pri apsorbanciji od 450 nm. Rezultati su se prikazali preko kalibracijske krivulje Troloxa ($\mu\text{mol TE}/100\text{mL}$).

Metoda ABTS- ABTS je radikal koji reagira s mnogo antioksidanasa pa tako i s fenolnom kiselinom i flavonoidim. Metoda se zasniva na primjeni reagensa ABTS koji se mješa s kalijevim persulfatom što rezultira nastankom zeleno obojanog ABTS radikala. Prilikom reakcije ABTS radikala s antioksidansom zelena boja se gubi te nastaje bezbojan oblik radikala (Gupta, 2015). Za provedbu ove metode bilo je potrebno pripremiti 0,2 mL uzorka kojemu se dodaje 3,2 mL ABTS reagensa kojeg je potrebno pripremiti dan prije upotrebe (7,4 mmol/L otopine ABTS pomješano je s 2,45 mmol/L otopinom kalijeva persulfata). Pripremljeni uzorak potrebno je ostaviti 95 minuta u mraku, nakon čega se mjeri apsorbancija na 734 nm. Rezultati dobiveni ovom metodom se također izražavaju kao srednja vrijednost tri mjerenja , preko kalibracijske krivulje Troloxa u $\mu\text{mol TE} /100 \text{ mL}$.

Metoda FRAP - metoda se zasniva na redukciji kompleksa trovalentnog željeza s piridil triazinom u dvovalentno željezo uz pomoć prisutnih antioksidanasa u uzorku, pri pH 3,6. Prilikom ove reakcije nastaje plavo obojenje. Za provedbu ove metode potrebno je pripremiti 0,2 mL uzorka i 3 mL FRAP reagensa zagrijanog na 37 °C. Pripremljeni uzorak se ostavio 15 minuta da odstoji nakon čega se mjeri intenzitet plave boje pri 593 nm . Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tri uzastopna mjerenja ,preko kalibracijske krivulje Troloxa ($\mu\text{mol TE}/100\text{mL}$).

3.3.6. Određivanje boje u CIELab sustavu

CIELab sustav je trodimenzionalni prostor boja koji se bazira na percepciji boje standardnog promatrača. Njegove koordinate odgovaraju teoriji suprotnih boja tj. parova. U CIELab sustavu boja je definirana L^* , a^* i b^* parametrima. Parametri CIELab sustava predstavljaju sljedeće:

L^* parametar prikazuje svjetlinu boje koja ja se mjeri u brojčanoj vrijednosti od 0 (crna) do 100 (bijela boja) po vertikalnoj osi,

a^* parametar prikazuje brojčanu vrijednost u relaciji od crvene ($+a^*$) do zelene boje ($-a^*$).

b^* parametar prikazuje brojčanu vrijednost u relaciji od žute ($+b^*$) do plave ($-b^*$) boje (Vukoja i sur., 2019).

Boje u blizini ishodišta karakterizirane su manjom zasićenosti boje (C^*) dok su boje udaljenije od ishodišta karakterizirane s većom zasićenosti boje. Udaljenost od ishodišta se računa prema izrazu:

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

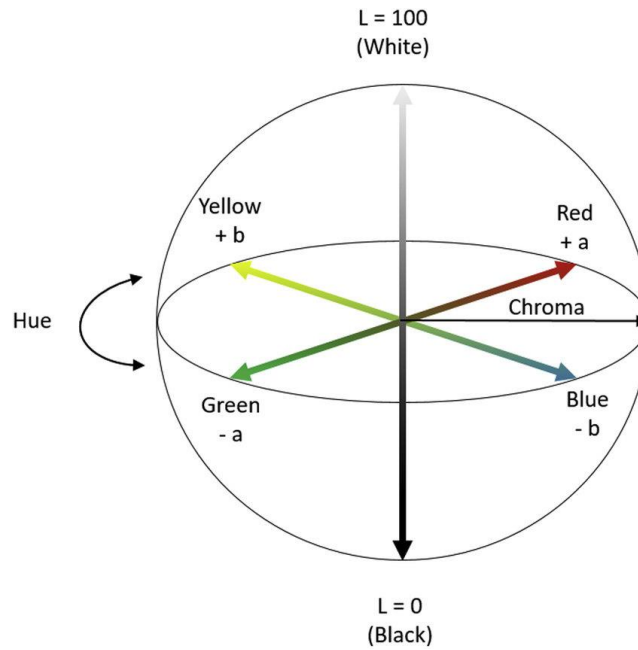
Kut nijanse ili ton boje ($^{\circ}h$) računa se prema sljedećem izrazu:

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

Za izračun ukupne razlike u boji određene pomoću CIELab sustava koristimo izraz:

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

Za analizu boja uzoraka bijelog vina korišten je kromametar CR-400 te su provedena po 3 mjerenja i za konačni rezultat je uzeta njihova srednja vrijednost.



Slika 7 CIE Lab sustav boja (Web 6)

3.3.7. Statistička obrada podataka

Za analizu dobivenih podataka korišten je program Statistica 13.1, obrada rezultata izvedena je uz pomoć metode analize varijance (ANOVA), Fisher-ovog LSD testa i metoda analize glavnih komponentata (PCA).

4. REZULTATI

Tablica 1 Rezultati mjerenja parametara boje u CIELab sustavu vina Chardonnay dobivenog spontanom i kontroliranom fermentacijom te odležavanjem u bačvama različitog stupnja paljenja

Uzorak	L*	a*	b*	dL*	da*	db*	C*	°h
Chardonnay INOX A	25,09	-0,26	1,05	-0,37	-18,68	-5,5	1,08	104,15
Chardonnay HAT A	24,5	-0,45	2,94	-0,97	-18,87	-3,61	2,97	98,72
Chardonnay B-MT A	24,16	-0,37	2,97	-1,3	-18,79	-3,57	3	97,16
Chardonnay B-MT 9	24,88	-0,34	1,87	-0,58	-18,76	-4,68	1,9	100,34
Chardonnay INOX SYHA 9	24,57	-0,4	1,96	-0,9	-18,82	-4,59	2	101,66
Chardonnay HAT 9	24,53	-0,44	2,87	-0,93	-18,86	-3,68	2,9	98,76

Oznake: INOX A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u inox-u; HAT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u hrastovim bačvama s jakim paljenjem; B-MT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima odležano u hrastovoj bačvi sa srednjim paljenjem; B-MT 9 – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi srednjeg paljenja; INOX SYHA 9 – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u inox-u; HAT 9 – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi sa jakim paljenjem.

Tablica 2 Sadržaj tvari boje i antioksidacijska aktivnost vina Chardonnay dobivenog spontanom i kontroliranom fermentacijom te odležavanjem u bačvama različitog stupnja paljenja

Uzorak	Polifenoli (mg/L)	ABTS ($\mu\text{mol}/100\text{ml}$)	Flavanoidi (mg/L)	DPPH ($\mu\text{mol}/100\text{ml}$)	FRAP ($\mu\text{mol}/100\text{ml}$)	CUPRAC ($\mu\text{mol}/100\text{ml}$)
Chardonnay INOX A	258,33 \pm 1,21	1,60 \pm 0,001	79,98 \pm 1,34	1,23 \pm 0,04	0,64 \pm 0,00	13,2 \pm 0,12
Chardonnay HAT A	471,11 \pm 0,24	2,88 \pm 0,01	139,72 \pm 2,60	2,38 \pm 0,02	0,80 \pm 0,18	18,90 \pm 0,11
Chardonnay B- MT A	446,79 \pm 1,19	2,49 \pm 0,00	132,20 \pm 1,99	1,04 \pm 0,07	0,56 \pm 0,08	17,54 \pm 0,01
Chardonnay B- MT 9	430,31 \pm 1,14	2,60 \pm 0,01	118,43 \pm 0,90	0,88 \pm 0,05	0,52 \pm 0,01	11,50 \pm 0,09
Chardonnay INOX SYHA 9	269,93 \pm 0,77	1,11 \pm 0,02	56,96 \pm 0,68	0,62 \pm 0,04	0,48 \pm 0,01	16,37 \pm 0,08
Chardonnay HAT 9	433,18 \pm 0,95	2,43 \pm 0,01	115,59 \pm 1,47	1,46 \pm 0,02	0,68 \pm 0,01	23,67 \pm 0,04

Oznake: INOX A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u inox-u; HAT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u hrastovim bačvama s jakim paljenjem; B-MT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima odležano u hrastovoj bačvi sa srednjim paljenjem; B-MT 9 – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi srednjeg paljenja; INOX SYHA 9 – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u inox-u; HAT 9 – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi sa jakim paljenjem.

Tablica 3 Elementi u tragovima u vinu Chardonnay dobivenom spontanom i kontroliranom fermentacijom te odležavanjem u bačvama
različitog stupnja paljenja

Uzorak	K (ppm)	Ca (ppm)	Mn (ppb)	Fe (ppb)	Cu (ppb)	Zn (ppb)	Br (ppb)	Rb (ppb)	Sr (ppb)	Pb (ppb)
Chardonnay INOX A	761 ± 54	57 ± 7	595 ± 45	948 ± 25	59 ± 2	474 ± 37	28,1 ± 9,2	971 ± 81	183 ± 13	14,8 ± 5,7
Chardonnay HAT A	1559 ± 209	29 ± 11	716 ± 116	1062 ± 111	67 ± 5	592 ± 94	30,9 ± 5,6	1763 ± 172	205 ± 27	24,5 ± 5,7
Chardonnay B-MT A	1064 ± 117	27 ± 13	791 ± 48	1169 ± 113	92 ± 9	725 ± 82	30,7 ± 3,7	1570 ± 101	278 ± 27	23,5 ± 10,1
Chardonnay B-MT 9	1205 ± 305	31 ± 8	641 ± 180	920 ± 39	69 ± 9	719 ± 74	23,6 ± 11,3	1305 ± 116	217 ± 28	6,0 ± 2,2
Chardonnay INOX SYHA 9	697 ± 34	54 ± 4	625 ± 33	974 ± 75	54 ± 6	626 ± 16	17,0 ± 5,7	947 ± 80	185 ± 22	12,6 ± 2,6
Chardonnay HAT 9	1824 ± 393	35 ± 19	690 ± 46	1112 ± 87	71 ± 4	566 ± 70	20,2 ± 8,5	1895 ± 357	244 ± 60	28,0 ± 10,9

Oznake: INOX A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u inox-u; HAT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u hrastovim bačvama s jakim paljenjem; B-MT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima odležano u hrastovoj bačvi sa srednjim paljenjem; B-MT 9 – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi srednjeg paljenja; INOX SYHA 9 – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u inox-u; HAT 9 – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi sa jakim paljenjem

Tablica 4 Prikaz retencijskog indeksa i sadržaj identificiranih spojeva aroma koji utječu na notu vina Chardonnay dobivenog autohtonim i selekcioniranim kvascem te odležanog u različitim vinskim posudama.

Spojevi (µg/L)	RT (min)	RI	INOX A	MT A	HT A	INOX B	MT B	HT B	
masti									
Heksanska kiselina	19,2418	1007	457,1 ± 0,3	709,5 ± 1,5	250,2 ± 3,0	514,9 ± 9,0	747,3 ± 8,3	424,2 ± 9,2	mast
Oktanska kiselina	30,273	1195	3510,6 ± 3,4	4902 ± 66,5	1251,6 ± 15,8	3430,5 ± 10,6	3690,2 ± 71,0	2458,4 ± 29,0	mast
Dekanska kiselina	37,4621	1376	1011,5 ± 5,5	1839,8 ± 8,1	892,9 ± 1,2	4077,5 ± 41,3	2112,7 ± 70,2	1387,8 ± 14,4	mast
Laurinska kiselina	41,7672	1558	46,0 ± 1,9	23,0 ± 0,7	22,3 ± 0,9	49,5 ± 0,5	14,2 ± 0,1	15,2 ± 0,0	mast
Miristinska kiselina	44,4804	1749	44,1 ± 0,7	32,7 ± 1,2	21,8 ± 0,5	58,0 ± 2,5	21,3 ± 0,4	13,5 ± 0,3	mast
Palmitinska kiselina	47,3237	2004		11,3 ± 0,2	16,3 ± 0,4	19,9 ± 0,2	11,7 ± 0,0	8,2 ± 0,3	mast
Dodekanol	40,0452	1469	34,9 ± 0,0	29,7 ± 0,5	11,6 ± 0,1	92,9 ± 1,5	25,1 ± 0,1	37,5 ± 1,5	mast
Miristaldehid	45,1384		87,9 ± 1,9	24,6 ± 1,0	71,3 ± 0,9	86,4 ± 2,2	42,1 ± 1,0	76,5 ± 1,0	mast, vosak
Etil laurat	42,2221	1584	98,4 ± 1,3	113,0 ± 1,0	89,0 ± 2,5	145,4 ± 2,4	99,1 ± 0,9	117,4 ± 5,2	mast
Etil miristat	44,8622	1778	54,9 ± 0,2	65,4 ± 0,6	25,3 ± 0,3	157,3 ± 0,3	66,2 ± 1,6	67,2 ± 0,2	mast
Etil oleat	48,7	2150	9,2 ± 0,2	37,6 ± 0,3	10,1 ± 0,3	67,9 ± 0,9	24,4 ± 0,0	34,3 ± 1,2	mast
Etil stearat	48,92	2175	43,1 ± 0,9	67,7 ± 2,3	37,6 ± 1,6	103,0 ± 0,2	73,1 ± 0,2	55,1 ± 0,0	mast
Isopropil miristat	45,2282	1810	12,5 ± 0,2	16,2 ± 0,8	22,7 ± 0,4	23,0 ± 0,8	23,8 ± 0,6	11,3 ± 0,1	mast
Etil palmitat	47,0229	1978	94,9 ± 0,4	188,7 ± 2,2	103,6 ± 1,0	367,9 ± 3,2	278,3 ± 10,4	179,6 ± 0,6	mast

Tablica 5 Nastavak

Spojevi ($\mu\text{g/L}$)	RT (min)	RI	INOX A	MT A	HT A	INOX B	MT B	HT B	
Voće									
Izoamilni alkohol	3,662	734	9466,4 \pm 140,3	21979,6 \pm 49,6	19032,8 \pm 61,5	25194,9 \pm 132,5	33105,7 \pm 11,7	19207,9 \pm 291,6	voće
2,3- butandiol	5,4	804	100,1 \pm 2,7	1114,1 \pm 4,7	1112,5 \pm 5,9	1362,7 \pm 15,8	1018,5 \pm 26,5	1107,0 \pm 39,3	voće
Etil heksanoat	17,9	997	617,2 \pm 12,4	866,5 \pm 1,1	476,6 \pm 11,6	962,6 \pm 7,6	849,3 \pm 15,3	917,2 \pm 4,8	voće
Dietil sukcinat	28,43	1179	1115,0 \pm 4,6	4997,0 \pm 99,0	5428,2 \pm 99,1	2067,5 \pm 33,6	7882,4 \pm 14,0	6433,4 \pm 81,9	voće
Etil oktanoat	29,1	1191	913,8 \pm 6,8	1595,0 \pm 35,1	1289,3 \pm 13,8	1901,3 \pm 26,1	1415,0 \pm 49,9	1388,2 \pm 54,0	voće
Etil dekanoat	38,05	1391	867,0 \pm 4,0	1451,1 \pm 14,8	1069,4 \pm 6,2	3205,0 \pm 58,6	884,2 \pm 14,0	1364,9 \pm 1,8	voće
Izoamil dekanoat	42,96	1632		24,3 \pm 3,0	8,6 \pm 0,2	31,9 \pm 0,5	33,8 \pm 1,5	16,0 \pm 0,5	voće
B- ionon	40,39	1477	104,0 \pm 4,0	42,3 \pm 1,4	22,7 \pm 0,4	62,9 \pm 1,8	74,5 \pm 0,5	31,2 \pm 0,9	voće

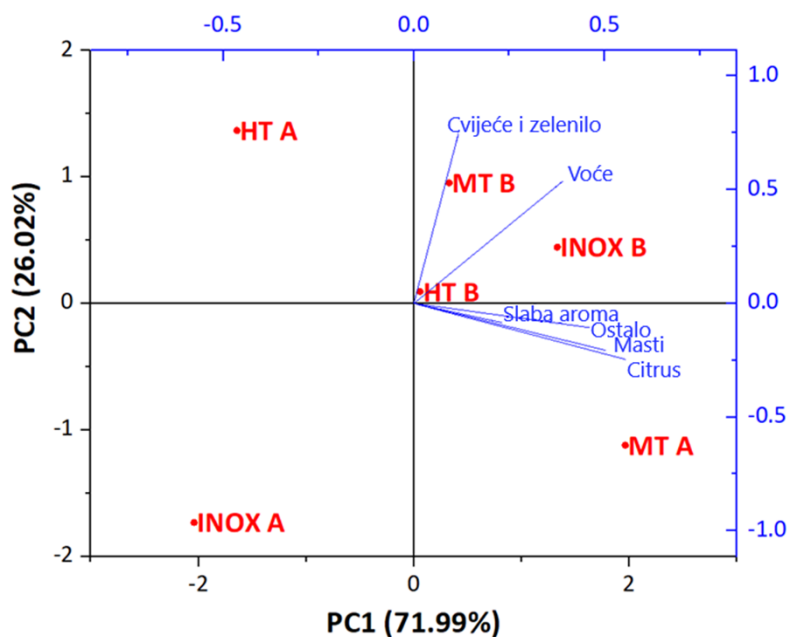
Tablica 6 Nastavak

Spojevi (µg/L)	RT (min)	RI	INOX A	MT A	HT A	INOX B	MT B	HT B	
Citrus									
2-etilheksan-1-ol	19,9003	1030		163,8 ±4,8	42,1 ±0,7		62,8 ±1,2	34,9 ±2,6	citrus
Lauraldehid	38,3799	1398	61,4 ±1,4	211,5 ±2,7		137,6 ±1,3	31,1 ±0,5	100,6 ±1,7	citrus
Linalool	24,067	1096		106,4 ±1,1	35,6 ±0,4	120,5 ±1,7	37,4 ±0,9	98,2 ±1,4	citrus
Cvijeće									
Heksan-1-ol	9,3398	868		453,5 ±4,2	920,0 ±5,9		498,3 ±4,6	500,8 ±5,5	zelenilo
2-feniletanol	24,53	1103	1769,3 ±13,7	3204,9 ±77,8	5867,4 ±37,9	6254,9 ±21,0	4535,5 ±39,1	4464,2 ±41,2	cvijeće
Fenil acetat	31,8489	1248	139,2 ±1,0	59,3 ±1,3	105,3 ±3,4	200,5 ±6,0	50,5 ±1,1	52,6 ±2,0	cvijeće
Heksil salicilat	43,4406	1667	14,4 ±0,0	19,6 ±0,5	9,8 ±0,1	85,4 ±2,9	20,1 ±0,8	14,2 ±0,7	zelenilo

Tablica 7 Nastavak

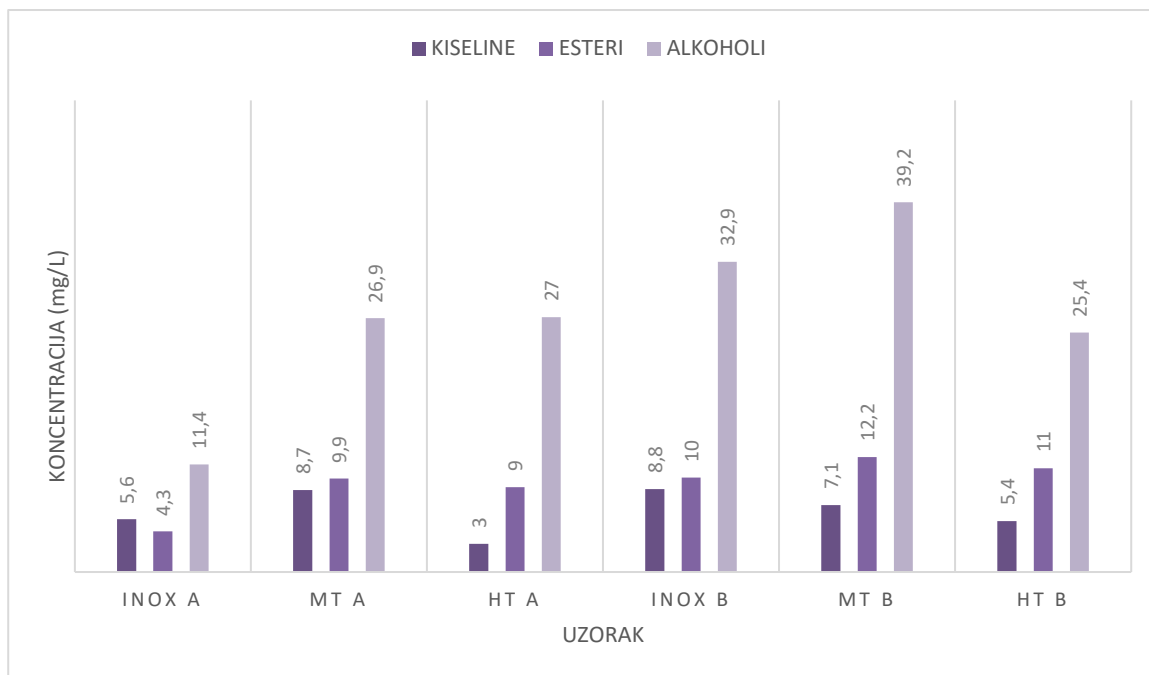
Spojevi ($\mu\text{g/L}$)	RT (min)	RI	INOX A	MT A	HT A	INOX B	MT B	HT B	
Ostalo									
Octena kiselina	2,565	622	459,8 \pm 1,4	1183,0 \pm 34,8	576,5 \pm 1,2	686,5 \pm 8,2	459,0 \pm 8,7	1116,2 \pm 30,2	ocat
4-etilfenol	27,9417	1166		225,5 \pm 4,4	88,1 \pm 2,0		224,9 \pm 4,2	86,9 \pm 2,5	dim
Etilizopentil sukcinat	39,0055	1423	118,8 \pm 0,0	147,6 \pm 2,0	153,5 \pm 0,0	111,2 \pm 2,4	282,0 \pm 11,7	145,8 \pm 4,1	drvo,karamela, izgoreno
Etil pentadekanoat	45,9913	1880	93,8 \pm 0,6	107,6 \pm 3,4	62,6 \pm 4,0	160,9 \pm 1,9	67,7 \pm 2,0	79,9 \pm 1,1	med
Slaba aroma									
2,4-Di-T-butilfenol	40,8493	1504	910,8 \pm 2,8	683,3 \pm 10,7	425,0 \pm 0,2	1614,4 \pm 12,1	643,7 \pm 16,4	546,4 \pm 2,5	slaba
Diizobutil ftalat	45,7557	1859	57,0 \pm 0,7	57,1 \pm 1,1	50,9 \pm 0,4	140,4 \pm 4,7	50,5 \pm 2,2	34,4 \pm 2,4	slaba
Dibutil ftalat	46,7711	1953	83,3 \pm 2,0	82,5 \pm 0,3	65,7 \pm 2,1	220,5 \pm 2,3	89,1 \pm 2,2	90,6 \pm 1,2	slaba

Oznake: INOX A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u inox-u; HT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u hrastovim bačvama s jakim paljenjem; MT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima odležano u hrastovoj bačvi sa srednjim paljenjem; MT B – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi srednjeg paljenja; INOX B – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u inox-u; HT B –vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi sa jakim paljenjem.



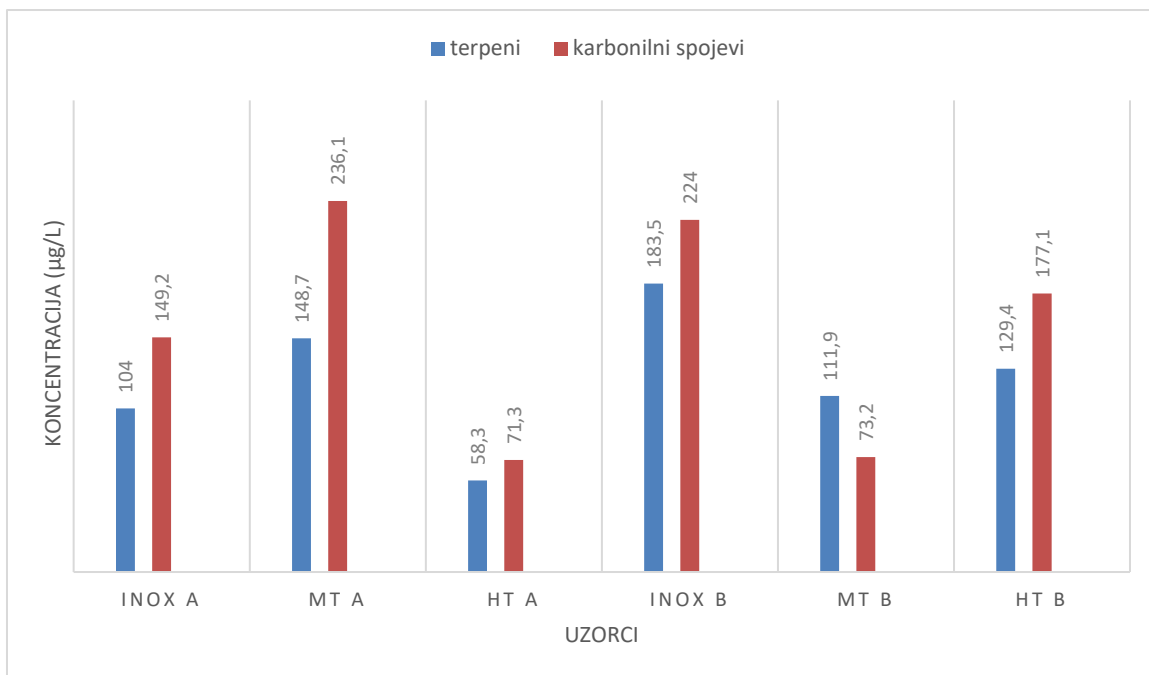
Slika 8 PCA analiza aromatskog profila Chardonnay vina. Aromatski spojevi su podijeljeni prema glavnom mirisu koji doprinosi konačnoj aromi.

Oznake: INOX A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u inox-u; HT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u hrastovim bačvama s jakim paljenjem; MT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima odležano u hrastovoj bačvi sa srednjim paljenjem; MT B – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi srednjeg paljenja; INOX B – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u inox-u; HT B – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi sa jakim paljenjem.



Slika 9 Ukupan sadržaj kiselina, estera i alkohola u analiziranim uzorcima vina Chardonnay dobivenog spontanom i kontroliranom fermentacijom te odležavanjem u bačvama različitog stupnja paljenja

Oznake: INOX A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u inox-u; HT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u hrastovim bačvama s jakim paljenjem; MT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima odležano u hrastovoj bačvi sa srednjim paljenjem; MT B – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi srednjeg paljenja; INOX B – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u inox-u; HT B – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi sa jakim paljenjem.



Slika 10 Ukupan sadržaj terpena i karbonilnih spojeva u analiziranim uzorcima vina Chardonnay dobivenog spontanom i kontroliranom fermentacijom te odležavanjem u bačvama različitog stupnja paljenja

Oznake: INOX A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u inox-u; HT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima, odležano u hrastovim bačvama s jakim paljenjem; MT A – vino dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima odležano u hrastovoj bačvi sa srednjim paljenjem; MT B – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi srednjeg paljenja; INOX B – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u inox-u; HT B – vino dobiveno fermentacijom s kvascem *Saccharomyces bayanus*, odležano u hrastovoj bačvi sa jakim paljenjem.

5. RASPRAVA

Rezultati ispitivanja utjecaja vinskog kvasca i vinske posude na polifenolni sastav i aromu vina Chardonnay prikazani su u **Tablicama 2 i 4** te na **Slikama 9, 10 i 11**. Tijekom ovog istraživanja ispitana je i prisutnost elemenata u tragovima i određena boja vina pomoću CIELab sustava, te su dobiveni rezultati prikazani u **Tablicama 1 i 3**.

Tablica 1 prikazuje parametre boje Chardonnay vina koje je dobiveno spontanom fermentacijom s autohtonim kvascem i sa selekcioniranim kvascem *Saccharomyces bayanus*, te koje je skladišteno u tri različite vinske posude: inox posudi, hrastovoj bačvi sa srednjim paljenjem i u hrastovoj bačvi s jakim paljenjem. Iz rezultata je vidljivo da vrsta kvasca i odabir vinske posude nije značajno utjecao na promjenu boje uzoraka s obzirom da nema uočljivih promjena u vrijednostima parametara boje u CIELab sustavu (L^* , a^* , b^* , C^* i h).

Tablica 2 prikazuje koncentraciju polifenola i flavonoide u uzorcima. Polifenoli i flavanoidi doprinose antioksidacijskoj aktivnosti vina pri čemu štite ljudski organizam od štetnog učinka slobodnih radikala. Bijelo vino je siromašnije polifenolima i flavanoidima za razliku od crnog vina (Giovinazzo i sur., 2019). Iz dobivenih rezultata možemo uočiti da je koncentracija polifenola i flavonoide najveća kod vina proizvedenog spontanom fermentacijom s autohtonim kvascem i odležanog u bačvi od drveta. Polifenoli su zastupljeniji kod bačve sa srednjim paljenjem (MT) dok su flavanoidi zastupljeniji kod bačve s jakim paljenjem (HT). Najmanja koncentracija polifenola i flavonoida je zabilježena kod uzorka koji su odležavani u inox posudi. U istoj tablici navedeni su rezultati mjerenja antioksidacijske aktivnosti pojedinih uzoraka. Prilikom određivanja antioksidacijske aktivnosti koristile su četiri metode: DPPH, FRAP, ABTS i CUPRAC. Usporedbom ove četiri metode uočava se da je prema metodama ABTS, FRAP i DPPH najveća antioksidacijska aktivnost zabilježena kod uzorka dobivenog spontanom fermentacijom autohtonih kvasaca, odležanog u bačvi od drveta s jakim paljenjem. Prema CUPRAC metodi antioksidacijska aktivnost je najveća kod uzorka dobivenog selekcioniranim kvascem i odležanog, također, u bačvi od drveta s jakim paljenjem. Međutim, metode prikazuju različite rezultate za najmanju antioksidacijsku aktivnost. Kod ABTS, FRAP i DPPH metoda, najmanju antioksidacijsku aktivnost ima uzorak dobiven fermentacijom selekcioniranog kvasca i odležan u inox posudi dok je prema CUPRAC metodi najmanja antioksidacijska aktivnost kod uzorka dobivenog selekcioniranim kvascem i odležanog u drvenoj bačvi srednjeg paljenja. Iz gore navedenog se uočava povezanost između ukupnih polifenola, flavonoida i antioksidacijske aktivnosti. Veća prisutnost flavonoida i polifenola rezultira većom antioksidacijskom aktivnošću.

Količina elemenata u trgovima u vinu ovisi o nekoliko faktora: metodi uzgoja vinove loze, vremenskim uvjetima, tlu, aditivima koji su korišteni tijekom proizvodnje, procesu proizvodnje vina i naknadnoj obradi vina (Tariba, 2011). Prisutnost pojedinih metala u vinu Chardonnay kutjevačkog vinogorja prikazana je u **Tablici 3**. Iz navedene tablice vidimo nekoliko metala koji se nalaze u vinu a to su K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Rb, Sr i Pb. Neki od metala u vinu potječu iz samog grožđa dok neki od elemenata u vino dospijevaju tijekom proizvodnje i odležavanja vina. Neki od elemenata u trgovima imaju povoljan utjecaj na ljudski organizam kada su prisutni u nižim koncentracijama (bakar i cink). S druge strane, većina elemenata ima suprotan efekt na ljudsko zdravlje ukoliko se nalaze u većim koncentracijama. Neki od prisutnih elemenata su potencijalno toksični, npr. živa, olovo, kadmij. Kalij i kalcij su najzastupljeniji metali u vinu. Kalij se u većoj koncentraciji nalazi kod uzorka koji je dobiven fermentacijom sa selekcioniranim kvascem i odležan u drvenoj bačvi s jakim paljenjem (1824 mg/L), dok je najmanja koncentracija u uzorku dobivenom sa selekcioniranim kvascem i odležanim u inox posudi (697 mg/L). Kalcij je jedini metal koji se u većoj koncentraciji nalazi u uzorku koji je odležan u inox posudama. Ostali elementi su zastupljeniji u uzorcima koji su odležani u drvenim bačvama sa srednjim paljenjem. Bakar je prisutan u koncentraciji od 0,054- 0,092 mg/L. Prisutnost bakra u prevelikim koncentracijama može uzrokovati tamnjenje vina. Iznimka su stroncij i olovo koji su zastupljeniji kod bačvi s jakim paljenjem.

Tablica 4 prikazuje retencijski indeks i sadržaj identificiranih spojeva arome te glavnu aromatsku notu kojom identificirani spoj pridonosi ukupnoj aromi vina Chardonnay. Iz navedenog vidimo da je najveća koncentracija aromatskih spojeva koji pridonose voćnoj noti dok je najmanja koncentracija spojeva koji daju citrusnu notu. Na **Slici 8** je prikazan rezultat PCA analize aromatskog profila. Prilikom izrade PCA analize aromatski spojevi koji doprinose konačnoj aromi vina podijeljeni su na osam kategorija: miris na mast, cvijeće i zelenilo, voće, citruse, dim, slabi miris te ostalo. Također, na navedenoj slici se vidi da na glavnu komponentu (PC1) otpada 71,99%, a druga glavna komponenta (PC2) predstavlja 26,02% ukupne varijance. Uočljivo je da pri korištenju selekcioniranih kvasaca odabir posude za odležavanje nema veliki utjecaj na aromu. Kod svih posuda sa selekcioniranim kvascima najizraženija je aroma cvijeća i zelenila te voća. Kod upotrebe autohtonih kvasaca, prilikom proizvodnje vina, posuda za odležavanje ima veliki utjecaj na krajnju aromu vina te se zbog toga aroma vina razlikuje u sve tri posude. Voćna aroma vina najvećim dijelom potječe od estera koji vinu daju miris po bananama. Esteri nastaju pri kemijskoj reakciji između acetyl-CoA i viših alkohola. U

analiziranim uzorcima podjednaka je zastupljenost estera bez obzira na korišteni kvasac i vinsku posudu te se koncentracija kreće između 9,9 do 11 mg/L što je prikazano na **Slici 9**. Izuzetak je uzorak koji je dobiven spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima i odležavan u inox posudi kod kojeg je koncentracija dvostruko manja te iznosi 4,3 mg/L. Esteri u najvećoj količini nastaju tijekom fermentacije uz djelovanje kvasaca. Vina koja sadrže veće količine estera imaju intenzivniju voćnu i cvjetnu aromu vina (Boss i sur., 2015). Osim estera **Slika 9** nam prikazuje prisutnost ukupnih alkohola i kiselina u analiziranim uzorcima. Alkoholi doprinose aromi vina ukoliko njihova koncentracija ne prelazi koncentraciju od 300 mg/L, ukoliko je koncentracija veća od 400 mg/L tada će imati negativan utjecaj na aromu vina (Yue i sur., 2014). Najzastupljeniji alkohol je izoamilni u koncentraciji od 39245,4 µg/L. Ostali prisutni alkoholi su: 2- feniletanol, dodekanol, heksan-1-ol, 2,3-butandiol i 2-etilheksan-1-ol. Najviša koncentracija ukupnih alkohola određena je kod uzorka sa selekcioniranim kvascem koji je odležao u drvenoj bačvi srednjeg paljenja te ona iznosi 32,9 µg/L, nasuprot tome trostruko manja koncentracija je zabilježena kod uzorka dobivenog fermentacijom s autohtonim kvascima i odležanog u inox posudi (11,4 µg/L). Zahvaljujući alkoholima vino dobiva zelene, cvjetne, citrusne i masne arome. Kiseline u vinu mogu biti porijeklom iz sirovine ili mogu nastati tijekom alkoholne fermentacije. U analiziranim uzorcima koncentracija kiselina je u svim uzorcima podjednaka te se kreće između 5,4 i 8,8 mg/L, dok je iznimka uzorak vina koje je dobiveno spontanom fermentacijom i odležano u drvenoj bačvi jakog paljenja gdje je udio 3 mg/L. Od kiselina je najzastupljenija oktanska kiselina, dekanska, heksanska i octena kiselina. Ukupne kiseline doprinose osvježavajućem okusu vina te imaju konzervirajući učinak. Karbonilni spojevi su najmanje zastupljeni kod uzorka koji je dobiven fermentacijom autohtonih kvasaca i odležan u drvenoj bačvi jakog paljenja te kod uzorka odležanog u bačvi srednjeg paljenja, dobivenog uz selekcionirani kvasac što se vidi na **Slici 10**. Od karbonilnih spojeva u chardonnay vinu pronalazimo lauraldehid i mirisaldehyd. Terpeni su glavna skupina spojeva koji predstavljaju aromu sorte, vinu daju citrusnu, drvenu i cvjetnu aromu. Najzastupljeniji su kod uzorka sa selekcioniranim kvascem u inoxu što je također vidljivo na **Slici 10**. Terpeni koji su prisutni u chardonnay vinu su linalol i β-ionon.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobivenih ovim istraživanjem, može se zaključiti sljedeće:

Odabir kvasca i fermentacijske posude nije značajno utjecao na promjenu boje što se vidi iz rezultata dobivenih u CIELab sustavu.

Udio polifenola i flavonoida je veći kod uzoraka koji su odležani u drvenim bačvama i dobiveni spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima. Uzorak odležan u bačvi srednjeg paljenja bogatiji je polifenolima dok je flavonoidima bogatije vino iz bačve s jakim paljenjem.

Vina odležana u drvenim bačvama imaju veću antioksidacijsku aktivnost od vina iz inox posude.

Elementi u tragovima koji su najzastupljeniji u Chardonnay vinu su kalij i kalcij. Kaliji se u većoj koncentraciji nalazi kod drvenih bačvi, dok je kalciji zastupljeniji kod inox posuda. Ostali metali se u većoj koncentraciji pronalaze kod uzoraka vina koji su odležali u drvenim bačvama.

Ukupan udio alkohola najveći je kod vina odležanog u bačvi od drveta sa srednjim paljenjem.

Kiseline su podjednako zastupljene u svim uzorcima. Izuzetak je uzorak dobiven spontanom fermentacijom s autohtonim kvascima odležan u drvenoj bačvi s jakim paljenjem, koji ima znatno manji udio kiselina.

Uzorci vina koji su odležali u inox posudama imaju najmanje koncentracije estera. Također 4-etilfenol nije prisutan kod uzoraka iz inox posuda.

2,4-di-tert-butilfenol se u najvećoj koncentraciji nalazi kod vina odležanih u inox posudama.

7. LITERATURA

- Alpeza I: Temelji kemijskog sastava vina. *Glasnik Zaštite Bilja* 31(6):143-150, 2008.
- Aranda A, Matallana E, Del Olmo M. Saccharomyces yeasts I: Primary fermentation. U Carrascosa A, Munoz R, Gonzalez R: *Molecular wine microbiology*, Elsevier str.1-31, 2011.
- Belda I, Ruiz J, Esteban- Fernandez A, Navascues E, Marquina D, Santos A i Moreno- Arribas M: Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules* 22(2):189,2017.
- Boss P, Pearce A, Zhao Y, Nicholson E, Dennis E i Jeffery D: Potential Grape- Derived Contributions to Volatile Ester Concentrations in Wine. *Molecules* 20(5):7845-7873
- Capece A, Romaniello R, Siesto G, Pietrafesa R, Massari C, Poeta C, Romano P: Selection of indigenous Saccharomyces cerevisiae strains for Nero d ' Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *International Journal of Food Microbiology* (144) 187-192, 2011.
- Czaplicki S: Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. U *Column Chromatography, InTechOpen*, Olsztyn, Poland, 2013.
- Fleet GH, Heard GM : Yeasts- growth during fermentations. *Journal of Wine Research* (1) str.211-223, 1990.
- Giovinazzo G, Carluccio MA i Grieco F: Wine Polyphenols and Health. U *Mérillon J i Ramawat K(ur.): Bioactive Molecules in Food. Reference Series in Phytochemistry*, pp. 1135-1155, Springer Nature, Switzerland, 2019.
- Gupta D: Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 6(2): 546-566,2015.
- Hodson G, Wilkes E, Azevedo S i Battaglione T: *Methanol in wine*. BIO Web of Conferences 9:02028, 2017
- Horvat B: Od berbe do mladog vina. Gospodarski list; prilog prema knjizi Zoričić M: *Domaće vino*. Novinarsko nakladničko i trgovačko d.d., Zagreb, 2010.
- Ivić I: Reverzna osmoza i nanofiltracija: utjecaj koncentriranja na bioaktivne komponente i arome crnog vina Cabernet Sauvignon. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno- tehnološki fakultet, Osijek, 2022.
- Jackson RS: Wine science: Principles and application , third edition. Uln Paper Knowledge. Toward a Media History of Documents, Academica Press, Elsevier Inc., Burlington London, San Diego, 2008.
- Jordao A, Vilela A i Cosme F: Sugar of Grape to Alcohol of Wine: *Sensorial Impact of Alcohol in Wine*. *Beverages* 1(4):292-310,2015.
- Kim S i Hoek EMV: Modeling concentration polarization in reverse osmosis processes. *Distillation* 162(1-3):295-300,2004.

- Licul R, Premužić D: *Praktično vinogradarstvo i podrumarstvo*, Znanje, Zagreb, 1979.
- Luterotti S: *Uvod u kemijsku analizu*, Zagreb, 2002.
- Maletić E, Karoglan Kontić J, Pejić I: *Vinova loza- Ampelografija, ekologija, oplemenjivanje*. Školska knjiga, Zagreb, 2008.
- Michlmayr H, Nauer S, Brandes W, Schumann C, Kulbe KD, Del Hierro AM i Eder R: Release of wine monoterpenes from natural precursors by glycosidases from *Oenococcus oeni*. *Food Chemistry* 135 (1): 80-87, 2012
- Mirošević N i Karoglan Kontić J: *Vinogradarstvo*. Nakladni zavod Globus , Zagreb, 2008
- Mirošević N i Turković Z: *Ampelografski atlas*. Golden marketing- Tehnička knjiga, Zagreb, 2003.
- Mirošević N: *Vinogradarstvo*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, 1996.
- Moreno J i Peinado R: *Enological chemistry*. Elsevier Inc., Universidad de Cordoba, Cordoba, Spain, 2012.
- Muštrović S: Vinarstvo sa enohemijom i mikrobiologijom; proizvodnja, kvalitet, kontrola od čokota do čaše. *Privredni pregled*, Beograd, 1985.
- Narodne Novine: *Zakon o vinu*. NN 32/19, 2019.
- Narodne novine: *Pravilnik o proizvodnji vina*. NN2/05, 2005
- Pichler A: Utjecaj dodataka i skladištenja na kvalitetu, reološka i termofizikalna svojstva paste od maline. *Doktorski rad*. Prehrambeno -tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Popović K: Utjecaj koncentriranja membranskim procesima tvori boja i aroma soka od aronije. Doktorska disertacija. Prehrambeno- tehnološki fakultet , Osijek, 2019.
- Pretorius IS, Van der Westhuizen TJ , Augustyn OPH: Yeast diversity in vineyards and wineries and its importance to South African wine industry. *South African Journal of Enology and Viticulture* (20)61-74, 1999.
- Robinson J: Jancis Robinson's Wine Course: A Guide to the World of Wine. Abbeville, 2006.
- Skoog DA, West DM i Holler FJ: *Osnove analitičke kemije*. Školska knjiga, 1999.
- Tariba B: Metal sin Wine- Impact on Wine Quality and Health Outcomes. *Biological Trace Element Research* 144(1-3):143-156, 2011.
- Tao Y, Garcia 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.
- Tomas D i Kolovrat D: *Priručnik za proizvodnju vina – za male proizvođače i hobiste*. Federalni agromediterranski zavod, Mostar, 2011.

Vrdoljak I: Utjecaj membranske filtracije na aromu i kemijski sastav vina sorte Graševina. *Diplomski rad*, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2009.

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

Yue TX, Chi Mi, Song CZ, Liu MY, Meng JF, Zhang ZW i Li MH: Aroma characterization of Cabernet Sauvignon wine from the Plateau of Yunnan (China) with different altitudes using SPME-GC/MS. *International Journal of Food Properties* 18:1584–1596, 2014

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

Web izvori:

Web 1: <https://ovinu.info/sorta-chardonnay/> [12.9.2022.]

Web 2: <http://www.maturski.org/Poljoprivreda/Proizvodnja-i-vrste-bjelog-vina.html>
[12.9.2022.]

Web 3: <https://pozvek.hr/en/kategorija/barrique-bacve/> [12.9.2022.]

Web 4: https://www.wikiwand.com/hr/Plinska_kromatografija [12.9.2022.]

Web 5: <https://www.news-medical.net/5977A-Series-GCMS-System-from-Agilent>
[12.9.2022.]

Web 6: https://www.researchgate.net/figure/The-CIELAB-color-space-diagram-The-CIELAB-or-CIE-L-a-b-color-system-represents_fig1_338303610 [12.9.2022.]