

Utjecaj koncentriranja membranskim procesom nanofiltracije na tvari boje konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon

Petanjak, Katarina

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:109:427239>

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

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

REPOZITORIJ

PTFS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



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

Katarina Petanjak

**UTJECAJ KONCENTRIRANJA MEMBRANSKIM PROCESOM
NANOFILTRACIJE NA TVARI BOJE KONVENCIONALNOG I
EKOLOŠKOG VINA CABERNET SAUVIGNON**

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 II. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2020./2021. održanoj 27. travnja 2021.**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Anita Pichler***Pomoć pri izradi:** dr. sc. *Ivana Ivić***Utjecaj koncentriranja membranskim procesom nanofiltracije na tvari boje konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon***Katarina Petanjak, 0113136648*

Sažetak: Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj koncentriranja procesom nanofiltracije na tvari boje konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon. Koncentriranje je provedeno na uređaju LabUnit M20 uz primjenu kompozitnih membrana tipa Alfa Laval NF M20 pri tlakovima od 25, 35, 45 i 55 bara pri različitim temperaturnim režimima (s primjenom i bez primjene hlađenja). U početnim uzorcima vina i dobivenim retentatima određeni su ukupni polifenoli i flavonoidi, monomerni antocijani, polimerna boja, antioksidacijska aktivnost, pojedini polifenolni spojevi te parametri boje. Nakon provedene nanofiltracije, zabilježeno je smanjenje vrijednosti ukupnih polifenola i flavonoida te smanjenje antioksidacijske aktivnosti. Upotreba visokog tlaka uz hlađenje pogodovala je boljem zadržavanju, dok je primjena tlaka od 25 bara bez hlađenja uzrokovala znatan gubitak navedenih spojeva. Malo veće vrijednosti ukupne promjene boje dobivene su u retentatima ekološkog vina u usporedbi s retentatima konvencionalnog vina. Retencija pojedinih polifenolnih spojeva ovisila je o vrsti vina, temperaturnom režimu i primijenjenom tlaku.

Gljučne riječi: konvencionalno vino Cabernet Sauvignon, ekološko vino Cabernet Sauvignon, nanofiltracija, polifenolni spojevi, boja**Rad sadrži:** 65 stranica
22 slika
9 tablica
0 priloga
51 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: 28. 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 Technology
Subdepartment of Food Engineering
Franje Kuhača 18, 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. II. held on April 27, 2021.

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

Technical assistance: *Ivana Ivić*, PhD, assistant

The Influence of Concentration by a Membrane Nanofiltration Process on the Colour Compounds of Conventional and Organic Cabernet Sauvignon Wine

Katarina Petanjak, 0113136648

Summary: The aim of this graduate thesis was to examine the influence of concentration with nanofiltration on the colour compounds of conventional and organic Cabernet Sauvignon wine. Concentration was performed on a laboratory filter LabUnit M20 using Alfa Laval NF M20 composite membranes at pressures of 25, 35, 45 and 55 bar, and at different temperature regimes (with and without cooling). In initial wine samples and obtained retentates, total polyphenols and flavonoids, monomeric anthocyanins, polymer colour, antioxidant activity, individual polyphenolic compounds and colour parameters were determined. After nanofiltration, a decrease in total polyphenols and flavonoids and a decrease in antioxidant activity were observed. The usage of high pressure with cooling favoured the retention, while the application of the pressure of 25 bar without cooling caused a significantly loss of these compounds. Slightly higher values of the total colour change were obtained in the retentates of organic wine compared to the retentates of conventional wine. The retention of individual polyphenolic compounds depended on the type of wine, temperature regime and applied pressure.

Key words: conventional Cabernet Sauvignon wine, organic Cabernet Sauvignon wine, nanofiltration, polyphenolic compounds, colour

Thesis contains: 65 pages
22 figures
9 tables
0 supplements
51 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, associate prof. | stand-in |

Defense date: September 28, 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 mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Pichler na pomoći, strpljivosti i susretljivosti prilikom izrade ovog diplomskog rada. Hvala i dr. sc. Ivani Ivić na pomoći.

Iznimnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima, Nevenki i Pavlu, hvala na neizmjernoj ljubavi i podršci tijekom svih godina moga fakultetskog obrazovanja. Uvijek su bili uz mene, čak i kada se kraj činio dalekim i pomalo nedostižnim.

Velikò hvala mome bratu Domagoju i sestri Veroniki što su bili uz mene i bili mi pomoć i podrška.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. VINOVA LOZA	4
2.1.1. Podrijetlo vinove loze	4
2.1.2. Morfologija vinove loze i fiziološke funkcije	4
2.2. VINO	6
2.2.1. Definicija vina	6
2.2.2. Proizvodnja crnog vina	6
2.2.3. Cabernet sauvignon	8
2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA	9
2.3.1. Voda	9
2.3.2. Alkoholi	9
2.3.3. Kiseline	10
2.3.4. Ugljikohidrati	10
2.3.5. Esteri	11
2.3.6. Tanini	11
2.3.7. Aldehidi i ketoni	12
2.3.8. Polifenolni spojevi	12
2.3.8.1 Flavonoidi	14
2.3.8.2 Flavanoli i proantocijanidi	14
2.3.8.3 Antocijani	14
2.3.8.4 Neflavonoidi	15
2.3.9. Antioksidacijska aktivnost	16
2.3.9.1 Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti	17
2.4. KONVENCIONALNO VINOGRADARSTVO	18
2.5. EKOLOŠKO VINOGRADARSTVO	18
2.5.1. Ciljevi ekološkog vinogradarstva	19
2.5.2. Prerada grožđa i proizvodnja vina	19
2.6. MEMBRANSKI PROCESI	20
2.6.1. Mikrofiltracija	21
2.6.2. Ultrafiltracija	22
2.6.3. Nanofiltracija	22
2.6.4. Reverzna osmoza	23
2.6.5. Vrste membrana	23
2.6.6. Vrste modula	24
2.6.7. Membranski procesi u vinarstvu	25
2.7. KROMATOGRAFSKE METODE	25
2.7.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	26
2.7.1.1 Određivanje polifenola HPLC metodom	26
2.7.2. Plinska kromatografija (GC)	27
3. EKSPERIMENTALNI DIO	29
3.1. ZADATAK	30

3.2. MATERIJAL I METODE	30
3.2.1. Priprema koncentriranog konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon	30
3.2.2. Spektrofotometrijska analiza tvari boje	31
3.2.2.1. Određivanje antocijana	31
3.2.2.2. Određivanje polimerne boje	32
3.2.2.3. Određivanje ukupnih polifenola	33
3.2.2.4. Određivanje ukupnih flavonoida	34
3.2.2.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	34
3.2.3. Određivanje boje u CIELab sustavu	36
3.2.4. Određivanje polifenola HPLC metodom	37
3.2.4.1. HPLC analitički sustav	37
3.2.4.2. HPLC metoda za analizu flavanola i fenolnih kiselina	38
4. REZULTATI	41
4.1. TABLIČNI PRIKAZ ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA	42
4.2. GRAFIČKI PRIKAZ ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA	45
5. RASPRAVA	51
6. ZAKLJUČCI	59
7. LITERATURA	61

1. UVOD

Pripadnik roda *Vitis* te porodice *Vitaceae* je vinova loza (*Vitis vinifera*). Plod vinove loze je grožđe koje se koristi za proizvodnju vina. Vino je proizvod koji se dobiva alkoholnom fermentacijom masulja ili mošta pomoću kvasaca koji je provode pod određenim uvjetima. U današnjoj se poljoprivredi uz konvencionalnu proizvodnju sve više razvija i ekološki način proizvodnje vina. Vino sadrži nekoliko stotina kemijskih spojeva koji su različitih struktura i svojstava. Kemijski sastav vina čine: voda, alkoholi, kiseline, šećeri, tanini, esteri, aldehidi i ketoni, polifenoli te tvari arome (Moreno i Peinado, 2012). Polifenoli su izrazito bitni spojevi jer utječu na kvalitetu samog vina, a imaju i pozitivan utjecaj na ljudsko zdravlje zbog svog antioksidacijskog djelovanja. Većom koncentracijom polifenola ističu se crna vina. Antioksidansi su spojevi koji usporavaju ili sprječavaju oksidaciju u organizmu jer neutraliziraju slobodne radikale, a mogu se pronaći u hrani koja se svakodnevno konzumira. Antocijani su glavni pokazatelji boje crnog grožđa i vina, a u grožđu se mogu pronaći u obliku glukozida. Za analizu polifenola u vinu koriste se kromatografske, elektrokemijske i spektrofotometrijske metode. Nanofiltracija je tlačni membranski proces koji, osim što se koristi za pročišćavanje vode, ima primjenu i u prehrambenoj industriji. Veličine pora na membrani za nanofiltraciju iznose od 0.5 do 2 nm. Membrane propuštaju manje organske i anorganske molekule, a to je razlog zbog čega permeat nije čista voda kao kod reverzne osmoze. Radni tlakovi su u rasponu od 5 do 40 bara (Ivić, 2022).

Zadatak rada ispitati je utjecaj koncentriranja procesom nanofiltracije na tvari boje konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon pri različitim tlakovima te uz primjenu i bez primjene hlađenja. U dobivenim retentatima određeni su ukupni polifenoli, flavonoidi, monomerni antocijani, polimerna boja, pojedinačni polifenolni spojevi, antioksidacijska aktivnost te boja uzorka, a sve dobivene vrijednosti uspoređene su s odgovarajućim početnim vinom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. VINOVA LOZA

2.1.1. Podrijetlo vinove loze

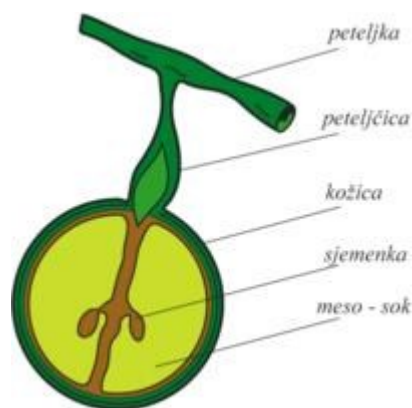
Vinova loza (*Vitis vinifera*) jedna je od najstarijih biljaka na svijetu koja se počela uzgajati prije otprilike sedam tisuća godina (Maletić i sur., 2008; Penavin, 2004). Većina znanstvenika smatra da je kultivacija vinove loze započela na području između današnje Turske, Gruzije i Armenije (Jackson, 2008; Penavin, 2004). Vinova loza pripada rodu *Vitis*, porodici *Vitaceae* koja se sastoji od 11 rodova i oko 600 vrsta. Rod *Vitis* podijeljen je na dva podroda: *Muscadina* i *Euvitis*. Podrod *Muscadina* se sastoji od dvije vrste dok se podrod *Euvitis* sastoji od 30 vrsta. Rod *Vitis* podijeljen je u tri skupine. Prva je Američka skupina roda *Vitis* čije su vrste rasprostranjene u istočnim dijelovima Sjeverne Amerike. Vrste *Vitis riparia*, *Vitis rupestris* i *Vitis berlandieri*, koje se nalaze u ovoj skupini, služe kao podloga za vinovu lozu. One su otporne na filokseru, niske temperature i kriptogamne bolesti. Druga je skupina Istočnoazijska skupina roda *Vitis* čija je najpoznatija vrsta *Vitis amurensis*, a koja je rasprostranjena u sjevernoj Kini, Koreji i istočnoj Rusiji. Može podnijeti temperature do -40 °C, ali nije otporna na filokseru i peronosporu. Upotrebljava se kao jedan od roditelja kod stvaranja novih kultivara koji su otporniji na niske zimske temperature. Posljednja je skupina Europsko-azijska skupina roda *Vitis* u koju pripada samo vrsta *Vitis vinifera* L. s dvije podvrste: *Vitis vinifera* L. ssp. *sativa* i *Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris*. *Vitis vinifera* L. ssp. *sativa* je jednodomna biljka s hermafroditnim tipom cvijeta. *Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris* je dvodomna biljka koja je neotporna na filokseru, kriptogamne bolesti i niske temperature. Smatra se da je *Vitis sylvestris* ili šumska loza divlji predak vinove loze koji je bio dio prirodne vegetacije šuma (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008). Pripadnici vrste *Vitis vinifera* jedini mogu imati naziv vinova loza (Maletić i sur., 2008).

2.1.2. Morfologija vinove loze i fiziološke funkcije

Vinova loza ima nadzemne i podzemne organe, a svaki od njih ima svoju zadaću. Razlikuju se vegetativni i generativni organi. Vegetativne organe čine: korijen, stablo s krakovima i ograncima, pupovi mladice, rozgva i lišće, a generativni organi su: cvijet, cvat, grozd, vitica, bobica te sjemenka. Svaki od ovih organa ima određenu fiziološku funkciju, a one su međusobno povezane i usklađene s rastom i razvojem biljke. Na rast organa utječu različiti

čimbenici, a najvažniji su: temperatura i vlažnost tla, opskrbljenost tla hranjivim tvarima, podloga i kultivar, agrotehnika te ampelotehnika (Maletić i sur., 2008).

Korijen ima nekoliko važnih funkcija: osigurava stabilnost trsa učvršćujući ga u tlo, opskrbljuje nadzemne dijelove vodom i u njoj otopljenim hranjivim tvarima, za proces fotosinteze apsorbira određenu količinu ugljične kiseline iz tla, sintetizira organske spojeve, služi za čuvanje rezervnih hranjivih tvari te se pri odumiranju pojedinih dijelova korijena u tlu povećava količina organskih tvari i nastaju povoljniji uvjeti za mikrobiološke aktivnosti. Stablo služi za provođenje vode i u njoj otopljenih mineralnih tvari od korijena do listova, tj. asimilata iz listova prema korijenu. Tijekom vegetacije nakupljaju se hranjive tvari koje su potrebne za rast i razvoj loze sljedeće godine. Lišće služi za fotosintezu, disanje i transpiraciju. Na tankoj stapci zelene boje nalazi se cvijet koji je pri vrhu proširen i tvori cvjetnu ložu. Cvat nakon oplodnje i oblikovanja bobica, tj. nakon završene cvatnje, postane grozd. Bobica (**Slika 1**) je plod vinove loze, a građena je od kožice, mesa i u sredini smještenih sjemenki (Maletić i sur., 2008; Mirošević i Karoglan Kontić, 2008).



Slika 1 Presjek bobice (Marić, 2020)

Kožica bobice sastoji se od više slojeva, a može biti tanka ili debela te manje ili više pokrivena voštanom prevlakom. Uvjeti čuvanja, prijevoza ili sušenja ovise o debljini i čvrstoći kožice pojedine sorte. Kožica je prekrivena voštanom prevlakom (pepeljak ili mašak) čija je uloga zaštita bobice od prevelike količine vlage i stanište je vinskih kvascima. Tvari arome i boje uglavnom su smještene u kožici. Dok su bobice nezrele, imaju zelenu boju zbog klorofila, a nakon početka sazrijevanja dolazi do promjene boje. Kod bijelih sorti javljaju se ksantofili i karoteni koji daju žutozelene, jantarnožute, bijeložute te druge nijanse žute i narančaste

boje. Sintezom antocijana kod crnih sorti razvija se svjetloružičasta, tamnoružičasta, crvena, tamnocrvena, ljubičasta i tamnoplava boja. Meso čini najveći dio bobice pa o njemu ovisi tehnološka iskoristivost sorte (randman). Ono može biti različite konzistencije što ovisi o namjeni sorte. Kod vinskih je sorti obično mekano i sočno. Broj sjemenki u bobici može biti od 1 do 4, ali postoje i sorte koje ne sadrže sjemenke i koje se koriste za proizvodnju grožđica te za jelo u svježem stanju (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008; Maletić i sur., 2008).

2.2. VINO

2.2.1. Definicija vina

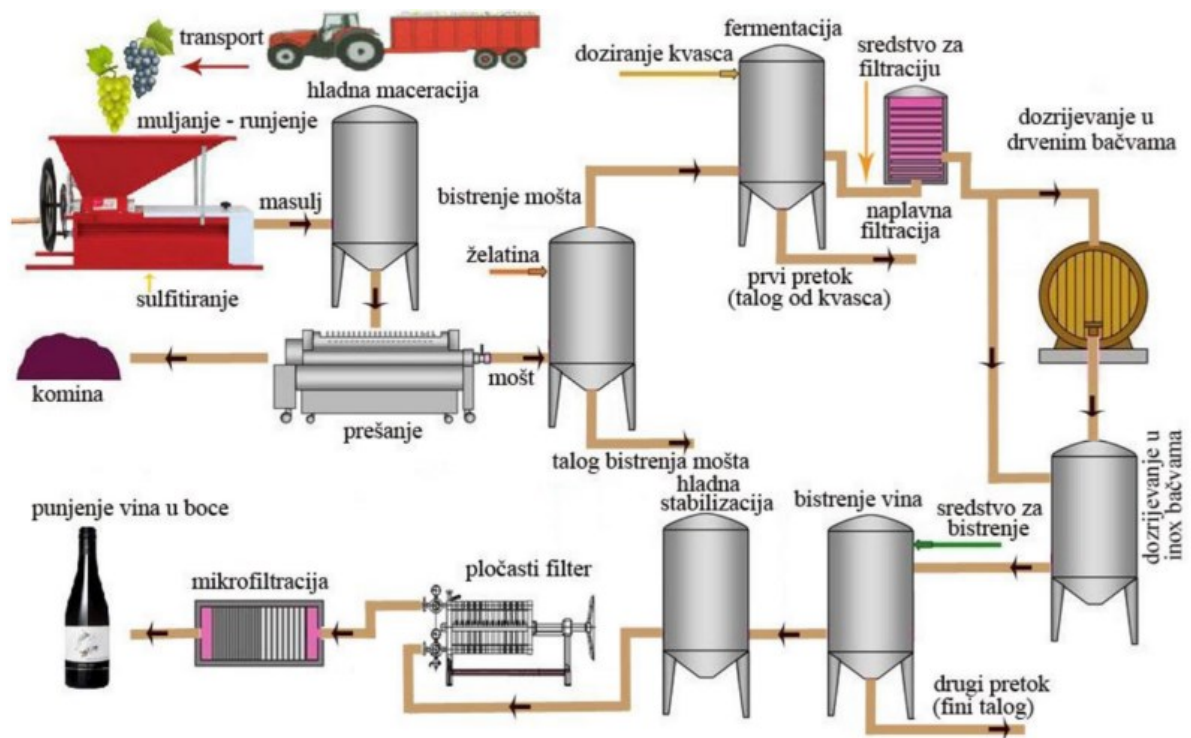
Vino je jedno od najstarijih pića koje je vrlo kompleksno. Ono sadrži stotine spojeva koji imaju različite kemijske strukture i svojstva, međutim alkohol je kvantitativno najzastupljeniji sastojak. Grožđe ima najvažniju ulogu jer je izvor kemijskog sastava i senzorskih svojstava vina. Međutim, za kvalitetu vina bitni su i tehnologija proizvodnje te uvjeti dozrijevanja vina (Alpeza, 2008).

Prema Uredbi (EU) br. 1308/2013 Europskog parlamenta i vijeća, vino je proizvod dobiven isključivo potpunom ili djelomičnom alkoholnom fermentacijom izmuljanog ili cijelog svježeg grožđa ili mošta. Uredba svježe grožđe definira kao plod vinove loze koji se koristi za proizvodnju vina, dozreo ili djelomično prosušeno, može biti muljan ili prešan uobičajenim postupcima u proizvodnji vina i može spontano započeti alkoholnu fermentaciju (web 1).

2.2.2. Proizvodnja crnog vina

Crno se vino proizvodi od sorti grožđa koje sadrže antocijane koji vinu daju crvenu boju. U većini sorti oni se nalaze u kožici bobica. Vino se dobiva otvorenim i zatvorenim vrenjem masulja. Proces proizvodnje (**Slika 2**) sastoji se od sljedećih postupaka: muljanje – runjenje grožđa, maceracija masulja, sumporenje, dodavanje kvasaca, alkoholna fermentacija, tiještenje masulja i otakanje mošta, završna alkoholna fermentacija, otakanje mladog vina s taloga, bistrenje te odležavanje. Peteljka se odvaja procesom runjenja, dok muljanjem dolazi do izdvajanja soka iz bobica pri čemu se dobije masulj koji sadrži sok, kožice i sjemenke. Masulj se sumpori kako bi se spriječilo kvarenje pri čemu se dodaje 10 do 15 g/hL kalijevo metabisulfita. Procesom maceracije dolazi do izdvajanja fenolnih spojeva, bojila, tanina, aroma i drugih sastojaka u mošt. Maceracija se provodi na temperaturama između 20 i 25 °C.

Anaerobnim procesom alkoholne fermentacije dolazi do pretvorbe šećera u alkohol i ugljikov dioksid. Fermentacijom koja se odvija na temperaturama između 15 i 20 °C dobije se vino koje ima veći udio alkohola i ugljikovog dioksida te izraženiju aromu, a ujedno i manji udio octene kiseline. Nakon završetka alkoholne fermentacije slijedi tiještenje, čime se odvaja groždani sok. Malolaktička fermentacija završna je faza koja se izaziva pomoću odgovarajućih bakterija mliječne kiseline. One se dodaju kako bi pretvorile jabučnu kiselinu u mliječnu kiselinu i ugljikov dioksid. Nakon završetka fermentacije, na dnu posude se nalazi talog kojega je potrebno ukloniti. Da bi došlo do odvajanja taloga, mlado vino se pretače. Kako bi se uklonile koloidne čestice koje su uzrok mutnoće vina, primjenjuju se sredstva za bistenje. Vino nakon toga odležava u drvenim bačvama ili čeličnim spremnicima pri čemu dobiva svoj puni okus te dolazi do razvoja arome. Starenje u bačvama naglašava karakteristike vina crnih sorti među kojima je i Cabernet Sauvignon. Prije nego što se puni u boce, vino se bistri i filtrira (Ivić, 2022; Jackson, 2009; Law, 2006; Penavin, 2004).



Slika 2 Shematski prikaz proizvodnje crnog vina (Pichler, 2016)

2.2.3. Cabernet sauvignon

Sorta grožđa cabernet sauvignon (**Slika 3**) nastala je križanjem cabernet franca i sauvignona bijelog. To je ujedno najuspješnija i najpopularnija vrhunska vinska sorta crnoga grožđa. Podrijetlom je iz pokrajine Bordeaux, a uzgaja se u cijelom svijetu. Grožđe kasnije dozrijeva pa ne dostigne potpunu zrelost u hladnim podnebljima te se dobiju slaba, „zelena“ vina s mirisom zelene trave. Grozdovi su mali i stožastog oblika, a bobice su okrugle, male do srednje veličine i crnomodre. Kožica bobice je otporna, dok je meso sočno, a sok sladak. Sorta je srednje rodnosti od koje se dobivaju vina iznimne kvalitete, tamnocrvene boje s prijelazom na ljubičastu, s dosta tanina i malo kiselina. Zbog veće količine tanina, vino je pogodno za starenje u hrastovim bačvama. Vino ima specifičnu voćnu aromu (višnja, crni ribiz, borovnica i kupina) i okus. Obično sadrži između 12 i 13 vol.% alkohola, a sadržaj ukupnih kiselina iznosi između 5 i 7 g/L. Cabernet sauvignon često se miješa sa sortama grožđa koje su mekanije i sočnije kao što su cabernet franc i merlot. Uz merlot je najraširenija svjetska crna sorta grožđa (Ivić, 2022; Krstulović, 2008; Mirošević, 2009; Penavin, 2004; Simon, 2004).



Slika 3 Cabernet sauvignon (web 4)

2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA

Mnogi čimbenici utječu na kemijski sastav vina, a najznačajniji su: sastav grožđa, zdravstveno stanje, zrelost grožđa, princip prerade i klimatski uvjeti koji su vladali prijašnjih godina. Stalni čimbenici uključuju sortu, položaj i način uzgoja grožđa. Na kvalitetu vina najviše utječe kemijski sastav mošta (Marić, 2020).

2.3.1. Voda

Voda je glavni sastojak vina, a s obzirom na količinu alkohola udio se može mijenjati. U vinima koja sadrže oko 12 vol.% alkohola, voda čini 85 % ukupnog udjela. Veliki udio vode znači i veliku sposobnost otapanja različitih spojeva u vinu, a to uključuje alkohole, kiseline i soli, ali i manje količine teških sastojaka kao što su ulje, vosak i druge komponente. Grožđe sadrži puno veće količine ulja i voska, ali zbog ograničene topivosti i tehnologije koja ne dopušta pucanje sjemenki, ta količina u vinu je jako mala (Alpeza, 2008).

2.3.2. Alkoholi

Alkohol je drugi sastojak po količini u vinu nakon vode. U većini suhih vina njegov udio iznosi od 12.0 do 14.0 vol.%. Metabolizmom kvasaca tijekom alkoholne fermentacije nastaje etanol, a uz njega i ugljikov dioksid koji hlapi, dok se samo mali dio otapa u vinu. Povećanjem količine alkohola mijenjaju se fizikalna svojstva vode čime se smanjuje njezin viskozitet, ali se povećava topivost (Alpeza, 2008).

U vinu se nalazi nekoliko vrsta alkohola, ali samo je etanol u dovoljnoj količini te može utjecati na organoleptička svojstva vina kao što su trpkost, viskoznost, punoća okusa te doprinosi voćnoj i slatkastoj aromi vina. Etanol ima sladak okus, ali kiselost vina smanjuje njegov osjetilni značaj. On smanjuje percepciju kiselosti te stoga kisela vina izgledaju manje kisela i uravnoteženija, ali malo pojačava slatkoću šećera. Visoke koncentracije alkohola (iznad 14 vol.%) izazivaju osjećaj peckanja (Ivić, 2022; Jackson, 2009).

Metanol nastaje hidrolizom pektinskih spojeva koji se mogu pronaći u kožici bobice grožđa. Budući da proizvodnja crnih vina uključuje maceraciju i fermentaciju masulja, takva će vina imati veću koncentraciju metanola te ona iznosi oko 150 mg/L (Ivić, 2022).

Viši alkoholi koji se nalaze u koncentracijama većim od 10 mg/L su propanol, izobutanol, izoamilni alkohol i 2-feniletanol, dok se u koncentracijama manjim od 10 mg/L mogu pronaći butanol, pentanol i heksanol (Moreno i Peinado, 2012).

2.3.3. Kiseline

Organske kiseline su skupina spojeva koje su odgovorne za okus vina jer je vino kiselo alkoholna otopina. Kiselost vina mjeri se pomoću ukupne titracijske kiselosti, a iskazuje se u g/L vinske kiseline koja je najjača kiselina i uglavnom je vrijednosti između 5 i 6 g/L te pH vrijednosti koja iznosi između 3 i 4. Najvažnije su kiseline vinska, jabučna, limunska, mliječna te jantarna. Kako vino dozrijeva tako dolazi do promjena i kiselinskog sastava zbog reakcija s etanolom pa nastaju esteri etanola procesom esterifikacije. Kiselinski sastav vina doprinosi senzorskoj kakvoći, ali je bitan i za stabilnost vina pa je dopušten dodatak kiselina, uglavnom vinske. Najznačajnija hlapljiva kiselina je octena kiselina, uz nju se javljaju i mravlja, maslačna i propionska kiselina. Sve one imaju izražen miris te se stoga uglavnom povezuju s neugodnim mirisima. Glavne vinske kiseline, kao što su vinska i jabučna, su nehlapljive (Alpeza, 2008).

Karboksilne kiseline su bitne za senzorska svojstva vina kao i alkohol. One stvaraju osvježavajuće trpak okus ili kiselost (ako su u suvišku), a mogu utjecati na stabilnost i obojenost vina. Stabilnost boje crnog vina postiže se održavanjem niske pH vrijednosti pri čemu kiseline imaju važnu ulogu. Povećanjem pH vrijednosti, antocijani gube boju i mogu poprimiti plavu boju. Vina koja imaju visoku pH vrijednost osjetljivija su na oksidaciju i gubitak boje i arome. Od kiselina koje se mogu pronaći u vinu, jabučna kiselina ima najveću kiselost, mliječna kiselina najmanje je kisela, dok je vinska kiselina između jabučne i mliječne. Procesom malolaktičke fermentacije dolazi do pretvorbe jabučne kiseline u mliječnu pri čemu dolazi do smanjenja osjetne kiselosti (Jackson, 2009).

2.3.4. Ugljikohidrati

U vinu se mogu pronaći monosaharidi, oligosaharidi, pektini, sluzave tvari te drugi polisaharidi koji pripadaju skupini ugljikohidrata.

Udio šećera u vinu ovisi o sorti grožđa, zdravlju i zrelosti bobice, klimatskim uvjetima i drugim čimbenicima. Monosaharidi su najzastupljeniji, odnosno najviše ima glukoze i

fruktoze. Od oligosaharida, u vinu se mogu pronaći saharoza, laktoza, maltoza, trehaloza i rafinoza. Šećeri se u vinu nalaze u količini između 200 i 250 g/L. Kako bi se balansirali okusi u vinu, često se provodi ciljano prekidanje fermentacije pri čemu zaostaje određeni udio šećera (do desetak g/L). Šećer u vinu smanjuje gorčinu, trpkost i kiselost. Zabranjen je dodatak šećera vinu osim u proizvodnji određenih posebnih vina (Alpeza, 2008; Ivić, 2022).

Slatkoća vina posljedica je prisutnosti šećera, osobito neprevrele fruktoze i glukoze. Ostali neprevreli šećeri su: arabinoza, galaktoza, ksiloza, ramnoza i riboza. Potječu iz grožđa, ali ih vinski kvasci nisu prevreli (Jackson, 2009).

Kvasci uglavnom koriste glukozu što je ujedno razlog zbog čega se u vinu nalazi više fruktoze nego glukoze. Saharoza se obično ne može pronaći u vinu jer se male količine koje se nalaze u grožđu tijekom fermentacije hidroliziraju u glukozu i fruktozu. Prisutnost saharoze pokazatelj je da je u vino dodan šećer (Moreno i Peinado, 2012).

Pektini su građevne jedinice kože bobica koji procesom prerade grožđa prelaze u vino. Budući da otežavaju bistrenje i filtraciju vina zbog stvaranja kompleksa s koloidima, u vino se dodaju pektolitički enzimi koji potiču njihovu razgradnju (Ivić, 2022).

2.3.5. Esteri

Esteri su važna skupina spojeva jer osim što su važni za okus, imaju posebnu važnost za aromu vina. Više od 160 estera izolirano je iz vina. U vinu se nalaze dvije skupine estera, a to su „voćni“ esteri koji nastaju tijekom alkoholne fermentacije te druga skupina estera koja nastaje tijekom dozrijevanja vina. „Voćni“ su esteri bitan faktor za razvoj bouquet-a mladih vina. Ako se vino čuva u neodgovarajućim uvjetima, koncentracija estera opada budući da su vrlo hlapljivi spojevi. Tijekom starenja vina nastaju esteri vinske, mliječne i jabučne kiseline, ali oni su slabog mirisa, dok esteri jantarne kiseline doprinose aromi muškatih vina. Najzastupljeniji u vinu je etil-acetat koji pridonosi voćnosti vina u koncentracijama između 50 i 60 mg/L, dok veće količine povećaju dojam octikavosti (Alpeza, 2008; Jackson, 2009).

2.3.6. Tanini

Tanini se nalaze u sjemenkama, peteljka i kožici grožđa. Dije se na kondenzirane i hidrolizirajuće tanine. Kondenzirani tanini se sintetiziraju u kožicama i sjemenkama bobica i to su oligomeri ili polimeri flavanola. Hidrolizirajući tanini su galna kiselina ili esteri elaginske

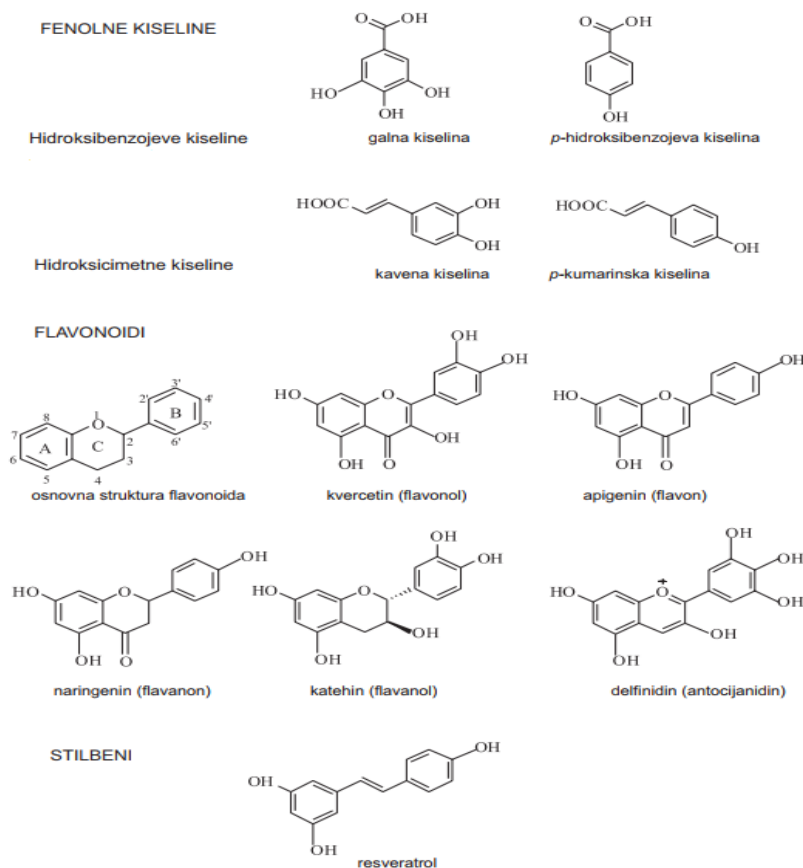
kiseline i glukoze te potječu iz drveta. Tijekom dozrijevanja, tanini reagiraju s antocijanima pri čemu stvaraju stabilnije pigmente te gotovom vinu daju teksturu i strukturu (Alpeza, 2008; Law, 2006).

2.3.7. Aldehidi i ketoni

Acetaldehid je najčešći aldehid u vinu i često čini više od 90 % ukupnog sadržaja aldehida. U kombinaciji s drugim oksidiranim spojevima, doprinosi bouquet-u vina. Na senzorsku kvalitetu vina utječu i furfural i 5-(hidroksimetil)-2-furaldehid čiji miris podsjeća na karamelu. Fenolni aldehidi, kao što su vanilin i cinamaldehyd, mogu se nakupljati u vinima ako su dozrijevala u hrastovim bačvama, dok benzaldehid ima miris gorkog badema i karakterističan je za vina od grožđa gamay. Mnogi ketoni nastaju procesom fermentacije, ali samo mali broj ima utjecaj na senzorska svojstva vina. Glavna iznimka je diacetil koji u niskim koncentracijama daje orašast, maslačni ili prepečeni okus. Međutim, u visokim koncentracijama stvara maslačno-mliječni miris, a to je najčešće rezultat kvarenja koje uzrokuju određeni sojevi bakterija mliječne kiseline (Jackson, 2009).

2.3.8. Polifenolni spojevi

Polifenoli (**Slika 4**) pripadaju skupini molekula biljnog podrijetla. Strukturu tvori aromatski prsten s kojim je vezana jedna ili nekoliko hidroksilnih skupina (-OH). Mogu se pronaći u voću, povrću, vinu, čaju, kavi i voćnim sokovima u različitim količinama. Procesom vinifikacije ekstrahiraju se u crno vino polifenoli iz kožica, sjemenki i usplođa crnog grožđa. Koncentracija i sastav polifenola ovisi koja je sorta grožđa, postupak uzgoja vinove loze, klimatskim uvjetima, ali i primijenjenim metodama izrade vina (Moreno i Peinado, 2012).



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

Polifenoli utječu na karakteristike kao što su boja, aroma, oporost i gorčina, a time i na samu kvalitetu vina. Mnoga su istraživanja dokazala da namirnice bogate polifenolima pozitivno utječu na zdravlje ljudi zbog antioksidacijskog učinka polifenola, a upravo vina, crna vina osobito, sadrže veće koncentracije polifenolnih tvari (od 1000 mg/L do 1300 mg/L). Istraživanja također pokazuju da njihovo antioksidacijsko djelovanje štiti od razvoja koronarnih bolesti te od nastanka ateroskleroze. Smatra se da se mogućnost obolijevanja od upravo tih bolesti smanjuje umjerenom konzumacijom vina, a potvrđeno je i antikancerogeno, antimikrobno i protuupalno djelovanje polifenolnih tvari. Za njihovu se analizu najčešće koriste tankoslojna kromatografija (TLC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Međutim, danas se sve više upotrebljavaju vezani sustavi plinske ili tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa, kapilarna elektroforeza, tekućinska kromatografija s nuklearnom magnetskom rezonancijom te ciklička voltometrija kojom je moguće brzo detektirati fenolne antioksidanse u hrani, ali i u fiziološkim sustavima kao što su krv ili urin (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

Fenoli koji su prevladavajući u vinu, mogu se podijeliti na flavonoide i neflavonoide (Jackson, 2009).

Polifenoli su jedna od najbrojnijih skupina spojeva u biljkama kojoj pripada više od 8000 različitih spojeva. Sudjeluju u kemijskim promjenama tijekom zrenja i dozrijevanja voća te su uključeni u mehanizme formiranja okusa, boje i arome koja je karakteristična za svaku pojedinu vrstu voća. Preradom svježega voća dolazi i do različitih nepoželjnih procesa u koje su polifenoli također uključeni (Popović, 2019).

Jedna od najvažnijih uloga polifenola je ta da doprinose obojenosti hrane. Vrlo su važne komponente grožđa i vina jer doprinose senzorskim svojstvima kao što su boja, gorčina i trpkost, a uz to su uključeni u reakcije oksidacije i proces starenja vina (Moreno i Peinado, 2012).

2.3.8.1 Flavonoidi

Flavonoidi su najveća i najvažnija skupina polifenola koja sadrži više od 5000 spojeva. U prirodi se uglavnom nalaze kao glukozidi, tj. povezani su s molekulama šećera (najčešće s glukozom) (Jakobek, 2007).

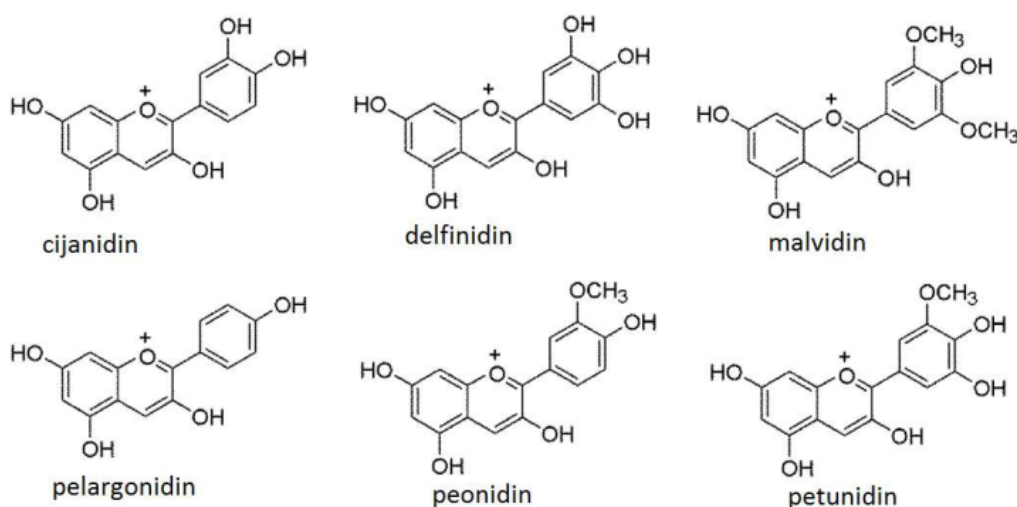
2.3.8.2 Flavanoli i proantocijanidi

Flavanoli ili flavan-3-oli čine veliku skupinu koja se sastoji od različitih izomera katehina i njegovih polimera. Strukturu katehina čine dva asimetrična ugljika (C2 i C3) čime je omogućeno stvaranje četiri različita izomera (Moreno i Peinado, 2012). Nemaju dvostruku vezu između C2 i C3 atoma te se po tome razlikuju od ostalih flavonoida. U heterocikličkom prstenu na mjestu C4 nemaju atom kisika, a to im je ujedno zajednička osobina s antocijanidinima. Hidroksilacija na C3 atomu zajedno s ovim osobinama omogućuju im da sadrže dva kiralna centra na atomima C2 i C3 te uz to četiri moguća diastereoizomera. Katehin ima *trans* konfiguraciju dok epikatehin je izomer s *cis* konfiguracijom. Flavanoli se mogu pronaći u voću, a osobito u kožici grožđa, borovnicama i jabukama. Proantocijanidini su polimeri koje stvaraju katehin i epikatehin (Popović, 2019).

2.3.8.3 Antocijani

Antocijani su primarni pokazatelji boje crnog grožđa i vina. Oni sadrže pigmente ružičaste, crvene, narančaste, plave i ljubičaste boje. U grožđu se uglavnom mogu naći kao glukozidi, a to su spojevi koji sadrže jednu ili više molekula glukoze. Takav spoj povećava topljivost u vodi

i kemijsku stabilnost. Glikozid se također može vezati sa kafeinskom, octenom ili kumarnom kiselinom. Malvidin je prevladavajući antocijan u većini crnog grožđa. Kod većine mladog crnog vina, crvena nijansa dolazi upravo od ovog spoja. Koncentracija drugih antocijana i različitih spojeva koje mogu tvoriti ovisi o sorti grožđa. Zbog toga sorte grožđa imaju različite nijanse crvene boje. Američke vrste (*Vitis riparia* ili *Vitis rupestris*) sadrže diglikozide. Zbog razlike u sastavu antocijana, može se odrediti koja su vina od europske, a koja od američke vrste loze. Za antocijane je karakteristična kopigmentacija pri čemu dolazi do povećanja intenziteta boje. Proces polimerizacije štiti molekulu antocijana od oksidacije ili drugih kemijskih promjena. Uz to, polimerizacijom se povećava topljivost, a smanjuje se gubitak tanina i pigmentata. Crvena boja vina može biti u rasponu od tamnocrveno-ljubičaste do blijedo smeđe crvene boje. Svijetla boja vina je pokazatelj da je grožđe bilo nezrelo ili tehnologija proizvodnje vina nije bila dobra. Intenzivnije pigmentirane sorte, kao što su shiraz i cabernet sauvignon, mogu zadržati duboku crvenu boju desetljećima (Jackson, 2009; Moreno i Peinado, 2012). U prirodi su najzastupljeniji: cijanidin, malvidin, delfinidin, pelargonidin, petunidin i peonidin (**Slika 5**) (Popović, 2019).



Slika 5 Strukturne formule najzastupljenijih antocijanidina (Popović, 2019)

2.3.8.4 Neflavonoidi

Skupinu neflavonoida čine fenolne kiseline koje su podijeljene u dvije glavne skupine, a to su hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Ova skupina također sadrži i stilbene, hlapive fenole, lignane, kumarine i dr. Fenolne kiseline mogu se pronaći u vakuolama stanica kao i u mesu i kožici grožđa dok ih najviše ima u kožici bobice. Nemaju određenu aromu niti okus, ali

su prekursori nekih hlapivih fenola koje stvaraju mikroorganizmi. Hidroskibenzojeve kiseline mogu se pronaći u grožđu u glikoliziranim oblicima ili kao esteri. Glavna je hidroksibenzojeva kiselina galna kiselina koja se u crnim vinima nalazi u koncentraciji od 95 mg/L. Hidroksicimetne kiseline su uglavnom prisutne kao esteri vinske kiseline iako se mogu pronaći i u glikoliziranim oblicima. Njihove su koncentracije veće u koži nego u mesu bobice te ih ima u većim koncentracijama u crnim nego u bijelim vinima (Moreno i Peinado, 2012).

Fenolne kiseline najčešće su derivati hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline. Uglavnom su esterificirane s kina ili vinskom kiselinom te se rijetko mogu pronaći u slobodnom obliku. Vezane se fenolne kiseline jedino oslobađaju alkalnom ili kiselinskom hidrolizom ili pomoću enzima (Popović, 2019).

2.3.9. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidansi su spojevi koji usporavaju ili sprječavaju oksidaciju u organizmu pri čemu neutraliziraju slobodne radikale. Drugim riječima, antioksidacijska aktivnost je sposobnost određenih tvari da različitim mehanizmima stabiliziraju tvari koje mogu dovesti do oksidativnih promjena (Popović, 2019). Izvori antioksidansa su ljudski organizam, koji je u mogućnosti proizvesti ih pomoću vitamina i minerala, te hrana koja se svakodnevno konzumira (Antolovich i sur., 2002).

Prirodni antioksidansi su osjetljivi na kisik što je nepoželjno svojstvo, osobito kod izlaganja suncu, sušenju i visokoj temperaturi. Antioksidacijska aktivnost ovisi o strukturnim svojstvima antioksidansa, temperaturi, svojstvima supstrata, koncentraciji, fizikalnom stanju sustava kao i o prisutnosti sinergista ili prooksidansa (Munteanu i Apetrei, 2021).

Kao antioksidans, u hrani može djelovati bilo koji sastojak koji može odgoditi, spriječiti ili zaustaviti kvarenje hrane ili spriječiti stvaranje nepoželjne arome koja nastaje kao posljedica oksidacije. Vitamini (A, C i E) i polifenoli koji se nalaze u voću i povrću sadrže antioksidacijsku aktivnost. Dva su načina kako antioksidansi mogu usporiti ili inhibirati oksidaciju. Prvi je način uklanjanje slobodnih radikala pri čemu se taj sastojak definira kao primarni antioksidans. Primjena mehanizma koji ne uključuje direktno uklanjanje slobodnih radikala je drugi način, a sastojak se može definirati kao sekundarni antioksidans. Primarnim antioksidansima pripadaju fenolne tvari, dok sekundarni djeluju kroz različite mehanizme. Ako je uz sekundarne antioksidanse prisutna neka druga manja komponenta, oni samo tada

pokazuju antioksidacijsku aktivnost. Primjer je limunska kiselina koja postaje aktivna jedino ako su prisutni metalni ioni ili askorbinska kiselina koja je aktivna u prisutnosti tokoferola ili nekog drugog primarnog antioksidansa (Kopjar, 2007).

Antioksidacijsko svojstvo polifenolnih spojeva temelji se na njihovoj sposobnosti doniranja vodikovih atoma te tako hvataju slobodne radikale stvorene reakcijom peroksidacije lipida (Popović, 2019).

2.3.9.1 Metode određivanja antioksidacijske aktivnosti

Metode kojima se određuje antioksidacijska aktivnost dijele se u dvije skupine: HAT (eng. *hydrogen atom transfer*) i SET (eng. *single electron transfer*) metode. HAT metode se temelje na prijenosu atoma vodika mjereći sposobnost antioksidansa da ukloni slobodne radikale doniranjem atoma vodika. SET metode koje se temelje na prijenosu jednog elektrona još se nazivaju i ET (eng. *electron transfer*) metodama te određuju sposobnost antioksidansa da prenese elektron kako bi smanjio količinu slobodnih radikala. Metode koje mjere antioksidacijsku aktivnost su brze, dostupne i uglavnom automatizirane (Munteanu i Apetrei, 2021).

U SET metodama antioksidativno djelovanje se simulira odgovarajućom probom s redoks potencijalom pri čemu antioksidans reagira s fluorescentnom ili obojenom probom (odnosno oksidirajućim sredstvom) umjesto s peroksidnim radikalom. Spektrofotometrijske metode mjere intenzitet obojenja. Koncentracija antioksidansa u uzorku povezana je sa stupnjem promjene boje (povećanje ili smanjenje apsorbancije probe pri zadanoj valnoj duljini) (Apak i sur., 2013).

U HAT metode pripadaju:

- ORAC metoda (eng. *Oxygen Radical Absorption Capacity*),
- HORAC metoda (eng. *Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity*),
- TRAP metoda (eng. *Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter*) i
- TOSC metoda (eng. *Total Oxyradical Scavenging Capacity*) (Munteanu i Apetrei, 2021).

SET metodama pripadaju:

- CUPRAC metoda (eng. *Cupric Reducing Antioxidant Capacity*),

- FRAP metoda (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*),
- FCR metoda (Folin-Ciocalteu reagens),
- DPPH metoda (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil),
- TEAC metoda (eng. *Trolox-equivalent Oxidant Capacity*) i
- ABTS metoda (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) (Apak i sur., 2013).

2.4. KONVENCIONALNO VINOGRADARSTVO

Kod konvencionalnog uzgoja vinove loze upotrebljava se mehanizacija, pesticidi ili mineralna gnojiva, križanje kako bi se stvorile nove sorte te se koristi velika količina energije, a sve to kako bi se postigao što veći prinos te odgovarajući kemijski sastav i tehnološka zrelost grožđa. Konvencionalni način uzgoja vinove loze pripada skupini većih onečišćivača okoliša zbog česte primjene pesticida, umjetnih gnojiva kao i kemijskih preparata koji suzbijaju bolesti i nametnike. Tijekom branja grožđa može doći do mehaničkog oštećenja vinove loze i tla upotrebom mehanizacije, dok kemijski preparati nepovoljno utječu na biološku aktivnost tla. Proizvodnja vina konvencionalnim postupkom uključuje muljanje i runjenje, maceraciju, alkoholnu i malolaktičku fermentaciju, otakanje, prešanje, bistrenje i na kraju odležavanje. Kako bi se spriječio razvoj nepoželjnih mikroorganizama, kvarenje te suzbile reakcije oksidacije, primjenjuje se postupak sumporenja (Ivić, 2022).

2.5. EKOLOŠKO VINOGRADARSTVO

U današnjoj poljoprivrednoj proizvodnji, ekološko vinogradarstvo se sve više razvija. Međutim, u odnosu na ukupne površine pod ekološkom proizvodnjom, površine na kojima su zasađeni ekološki vinogradi se sporije povećavaju. Švicarska, Austrija i Njemačka su zemlje u kojima je ekološka svijest vrlo razvijena, stoga su upravo u tim zemljama postavljeni temeljni ciljevi ekološkog vinogradarstva.

U Pravilniku o ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji (NN 19/2016), navedeni su svi tehnološki postupci, mjere i sredstva koja su poželjna i mogu se koristiti u uzgoju grožđa i proizvodnji vina, ali i oni koji su zabranjeni. Određeno je također i vrijeme koje je potrebno da bi se prešlo na ekološku proizvodnju, odnosno vrijeme koje je potrebno da bi se

tehnologija proizvodnje uskladila s načelima ekološkog uzgoja kako bi se proizvodi mogli deklarirati kao ekološki i imati odgovarajući znak. U vinogradarstvu je to razdoblje od tri do pet godina. Površine koje se mogu koristiti za ekološki uzgoj moraju biti bez industrijskog onečišćenja ili oštećenja, a ekološki vinogradi moraju biti udaljeni od prometnica najmanje 50 metara (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008).

2.5.1. Ciljevi ekološkog vinogradarstva

Ciljevi ekološkog vinogradarstva najbolje opisuju svrhu ekološkog načina uzgoja vinove loze, a iz njih je moguće uočiti i glavne razlike u odnosu na konvencionalnu proizvodnju. Za početak je potrebno održavati i povećavati prirodnu plodnost tla korištenjem prikladnih uzgojnih mjera, a pritom izbjegavajući prekomjernu obradu tla, upotrebu lako topivih sintetičkih gnojiva i herbicida. Preduvjet za uspješnu proizvodnju je uzgoj zdravih i otpornih biljaka, ali bez primjene sredstava koja onečišćuju okoliš. Kako bi se postigli uvjeti kao u prirodnim ekosustavima, potrebno je poticati raznolikost biljnih i životinjskih vrsta unutar samog vinograda. Potrebno je smanjiti onečišćenje vode i tla jer se u konvencionalnoj poljoprivredi upotrebljavaju velike količine agrokemikalija koje uzrokuju niz problema jer ispiranjem iz tla onečišćuju nadzemne i podzemne vode. Jedan od ciljeva je i uspostavljanje zatvorenog proizvodnog ciklusa mješovitog poljoprivrednog gospodarstva koje uključuje biljnu i stočarsku proizvodnju pri čemu se organski ostaci ponovo iskorištavaju kao gnojivo. Kako bi se dobilo vino visoke kvalitete potrebno je uzgojiti grožđe koje je također visoke kvalitete s povoljnim organoleptičkim svojstvima. Kao posljednji je cilj postavljeno pažljivo gospodarenje prirodnim resursima pri čemu će se omogućiti sigurnija egzistencija čovjeka jer će se stvoriti povoljniji i zdraviji životni uvjeti (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008).

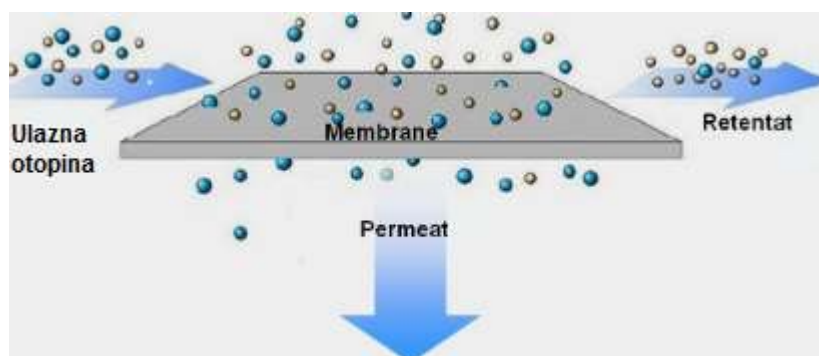
2.5.2. Prerada grožđa i proizvodnja vina

Nema velikih razlika pri preradi grožđa i proizvodnji vina u ekološkom uzgoju u odnosu na konvencionalnu proizvodnju vina. Glavni je uvjet da je grožđe koje se koristi za proizvodnju vina uzgojeno prema propisanim smjernicama. Prilikom branja, grožđe se bere ručno kako bi se ubrali samo zreli i zdravi grozdovi, dok se izbjegava korištenje mehanizacije kako ne bi došlo do oštećenja vinove loze i tla. Procese koji se odvijaju u vinu se nastoji prepustiti prirodnom tijeku te se izbjegava skraćivanje određenih faza kako bi se smanjio utrošak energije i enoloških sredstava. Kod primjene metoda, uvijek se prednost daje fizikalnim

metodama nad kemijskim. Prema Zakonu o vinu (NN 32/2019), dopušteno je koristiti sumporastu kiselinu, ali njena količina treba biti što manja. Kada se biraju enološka sredstva, poželjno je izbjegavati ona čija je uporaba dvojbeno s gledišta zdravlja ljudi i očuvanja okoliša. Pri proizvodnji vina u ekološkom vinogradarstvu, teži se postizanju vina s povoljnim organoleptičkim svojstvima i visokom prehrambenom vrijednošću (Ivić, 2022; Mirošević i Karoglan Kontić, 2008).

2.6. MEMBRANSKI PROCESI

Membranski procesi imaju sve značajniju upotrebu u područjima prehrambenog inženjerstva, biotehnologije i kemijskog inženjerstva. Primjena polupropusnih membrana temelj je membranskih procesa. One imaju određenu kemijsku i fizičku strukturu te posjeduju selektivnu sposobnost propuštanja ili zadržavanja određenih molekula i iona (**Slika 6**). Postojanje membrane zajednička je osobina svih membranskih procesa. Taj tanki sloj, membrana, razdvaja dvije tekuće faze te tako omogućava selektivni transport tvari kroz membranu djelovanjem neke pogonske sile, a najčešće je to tlak. Ulazna se otopina potiskuje kroz membranu djelovanjem tlaka. Razdvajanjem otopine dobiju se permeat i retentat. Permeat čine sve komponente faze koje su prošle kroz membranu te se tako u njemu smanjuje koncentracija otopljenih tvari. Retentat su sve komponente neke frakcije koje nisu prošle kroz membranu, a pri tome mu se povećava koncentracija tvari tijekom filtracije. Najveću upotrebu imaju tlačni membranski postupci: mikrofiltracija (MF), ultrafiltracija (UF), nanofiltracija (NF) i reverzna osmoza (RO) (**Tablica 1**) (Herceg, 2009; Herceg, 2011; Lovrić, 2003; Popović, 2019).



Slika 6 Osnovni princip membranske filtracije (Popović, 2019)

Tablica 1 Veličine pora, raspon transmembranskih tlakova za različite membranske procese (Mijatović i Matošić, 2020)

Proces	Veličina pora (nm)	Tlak (bar)
MF	> 100	0,1 – 2
UF	5 – 100	1 – 5
NF	1 – 5	5 – 20
RO	< 1	10 – 100

S obzirom na cilj separacije, membranski se procesi mogu podijeliti na procese koji služe za:

- odjeljivanje,
- pročišćavanje,
- koncentriranje i
- posredovanje pri reakciji (Mijatović i Matošić, 2020).

Osnovna klasifikacija membranskih postupaka može se provesti prema:

- mehanizmu zadržavanja,
- membranskoj strukturi,
- pokretačkoj sili i
- fazama u kontaktu (Popović, 2019).

2.6.1. Mikrofiltracija

Od svih membranskih procesa, mikrofiltracija najviše podsjeća na klasičnu filtraciju jer su pore veličine od 0,05 do 1 μm što omogućava zadržavanje grubih čestica (Mijatović i Matošić, 2020). Radni tlak iznosi od 0,5 do 2 bara (Conidi i sur., 2020). Membrane mogu biti izrađene od različitih vrsta materijala kao što su organski (polimeri) ili anorganski materijali (keramika, metal, staklo). Kod mikrofiltracije vrlo često dolazi do začepijavanja membrana što

se očituje kao fenomen apsorpcije, a uzrok su vrsta materijala od kojeg je izrađena membrana te karakteristike medija koji se filtrira. Pri tome dolazi do opadanja protoka prilikom filtracije pa je potrebno redovno čišćenje membrana. U industriji se upotrebljava za bistrenje i filtraciju različitih vrsta pića (vino, pivo, voćni sok) (Mijatović i Matošić, 2020; Mulder, 1996).

2.6.2. Ultrafiltracija

Ultrafiltracijom se separiraju otopljene tvari većih molekularnih masa iz otopine primjenom tlaka. Veličina pora je između 0,05 μm i nekoliko nanometara (Mijatović i Matošić, 2020). Radni tlak iznosi između 1 i 10 bara (Conidi i sur., 2020). Membrane su uglavnom asimetrične, a membrana ima najmanje pore prema ulaznoj otopini koje se onda kroz presjek membrane povećavaju prema strani permeata. U industrijskim se procesima koristi za koncentriranje mlijeka i sirutke te proizvodnji sira, za bistrenje vina, voćnih sokova i piva (Mijatović i Matošić, 2020).

2.6.3. Nanofiltracija

Nanofiltracija je membranski proces kod kojega se na membrani osim većih molekula zadržavaju i manje molekule kao što su neke anorganske soli i manje organske molekule (monosaharidi i disaharidi) (Popović, 2019). Membrane imaju sposobnost razdvajanja između onih za ultrafiltraciju i reverznu osmozu (Conidi i sur., 2020). Princip razdvajanja kod nanofiltracije i reverzne osmoze je jednak dok se razlikuju u veličini molekula koje zaostaju na membrani te veličini pora membrane (Popović, 2019). Veličine pora na membrani su u rasponu od 0,5 do 2 nm, dok su radni tlakovi u rasponu od 5 do 40 bara (Conidi i sur., 2020). Membrane koje se koriste za nanofiltraciju posjeduju veće pore i veću propusnost od membrana za reverznu osmozu, stoga je potrebna primjena manjeg procesnog tlaka. Membrane propuštaju manje organske (soli, organske kiseline) i anorganske molekule, stoga permeat nije čista voda kao kod reverzne osmoze. Membrane za nanofiltraciju sadrže dva sloja te su uglavnom kompozitne. Gornji i potporni sloj se izrađuju od različitih polimernih materijala te propuštaju veći udio monovalentnih nego dvovalentnih i trovalentnih iona. Nanofiltracija se u prehrambenoj industriji koristi za koncentriranje mošta, rekuperaciju arome kod proizvodnje voćnih sokova te za koncentriranje i demineralizaciju mlijeka (Popović, 2019).

2.6.4. Reverzna osmoza

Reverzna osmoza primjenjuje se za selektivno otklanjanje mikromolekularnih otopljenih tvari čije molekule imaju dimenzije jednakog reda veličine poput molekula vode. Te tvari su anorganski ioni i druge male molekule koje u otopini razvijaju značajan osmotski tlak pa se stoga upotrebljavaju visoki radni tlakovi kako bi se nadvladao njihov osmotski tlak (Lovrić, 2003). Veličine pora membrana iznose od 0,1 do 1 nm, a radni tlakovi su u rasponu od 30 do 120 bara. Najčešće se upotrebljavaju kompozitne i asimetrične membrane. Gornji i potporni sloj potonjih su izgrađeni od istoga materijala dok su oni kod kompozitnih membrana izgrađeni od različitog materijala (Popović, 2019). Na mehanizam razdvajanja utječu oblik i veličina molekula kao i naboj iona (Conidi i sur., 2020). Reverzna se osmoza u prehrambenoj industriji primjenjuje za koncentriranje mošta od grožđa, vina, voćnih sokova kao i za mnoge druge mogućnosti uporabe (Popović, 2019).

2.6.5. Vrste membrana

Membrane se mogu definirati kao selektivna barijera između dviju faza. One se općenito mogu podijeliti na biološke (stanične) i sintetičke membrane. Sintetičke se membrane mogu podijeliti u skupine s obzirom na fizičku strukturu, mehanizam separacije, geometrijski oblik i kemijski sastav (Mulder, 1996).

S obzirom na strukturu, membrane se dijele na:

- homogene (izgrađene od jedne vrste materijala) i
- heterogene (izgrađene od više vrsta materijala).

S obzirom na fizičku strukturu, membrane mogu biti:

- simetrične,
- asimetrične i
- kompozitne.

Prema mehanizmu separacije, membrane se dijele na:

- porozne,
- neporozne i

- membrane s ionskom izmjenom.

Prema geometrijskom obliku, membrane mogu biti:

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

Prema kemijskom sastavu, membrane se mogu podijeliti na:

- organske membrane (izrađene od organskih polimera) i
- anorganske membrane (izrađene od keramike, stakla i metala) (Mulder, 1996; Osada i Nakagawa, 1992).

2.6.6. Vrste modula

Modul predstavlja najmanju jedinicu koja se može sastojati od jedne ili više membrana te potrebne prateće potporne strukture. Moduli su, serijski ili paralelno, zajedno povezani te broj povezanih modula čini stupanj nekog membranskog postrojenja što omogućava i jednostavnu promjenu kapaciteta uređaja izmjenom načina povezivanja modula ili mijenjanjem njihovog broja. Stoga se ovisno o namjeni, mogu izrađivati laboratorijski moduli manjih kapaciteta, ali i industrijska postrojenja znatno većeg kapaciteta. Modul čine membrana i kućište, a sama membrana je ugrađena u kućište. U kućište se dovodi dobavna otopina, a odvodi retentat i permeat.

Konstrukcijom modula želi se postići:

- što bolja iskoristivost aktivne membranske površine,
- velika otpornost na koroziju i radni tlak,
- da se u relativno malom volumenu dobije što veća površina,
- istovremeno što veća turbulencija, dobri hidraulički uvjeti potrebni za smanjenje koncentracijske polarizacije i smanjenje stvaranja taloga,
- da ne bude previsok pad tlaka u modulu i

- kontrola ispravnosti svake membrane, mogućnost pravilnog rada, lako čišćenje te brza i jednostavna zamjena oštećene membrane.

Ovisno o konstrukciji, razlikuje se nekoliko tipova modula:

- pločasti moduli,
- cijevni moduli,
- spiralni moduli,
- moduli sa šupljim vlaknima i
- kapilarni moduli (Lovrić, 2003; Popović, 2019).

2.6.7. Membranski procesi u vinarstvu

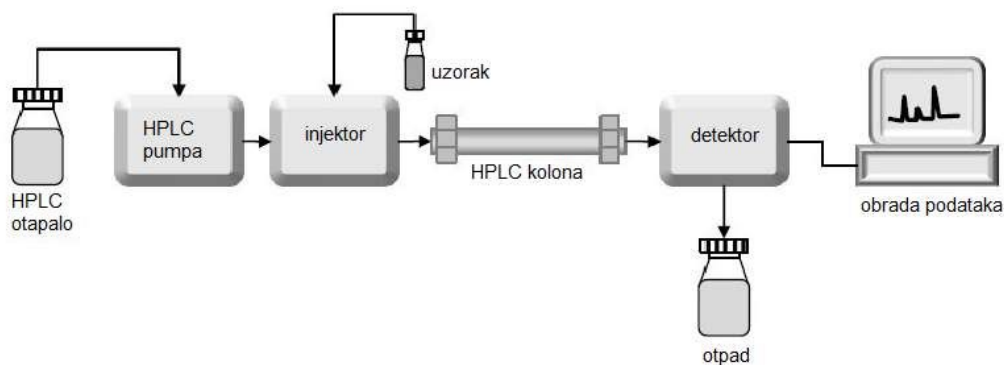
Suvremena proizvodnja vina veliku pozornost pridaje svim operacijama tijekom proizvodnje, od same berbe grožđa pa do punjenja u boce. Operacije bistrenja i filtracije vina imaju utjecaj na kemijska i organoleptička svojstva vina, a osobito na njihovu održivost i stabilnost u procesima čuvanja i transporta. Razvojem novih materijala za izradu membrana i tipova modula, došlo je do proširenja primjene membranskih procesa u procesima stabilizacije i filtracije vina. Upotrebom membranske filtracije iz vina se odstranjuju čestice koje stvaraju mutnoću i dijelom otopljene makromolekule (proteini) koje mogu dovesti do naknadnog замуćenja vina. Procesom filtracije vino se bistri i stabilizira (Pozderović i sur., 2010).

2.7. KROMATOGRFSKE METODE

Kako bi se odijelili, identificirali i kvantitativno odredili kemijski sastojci prisutni u smjesama, koristi se metoda kromatografije. Zajednička osobina svih kromatografskih postupaka je postojanje mobilne (pokretne) faze i stacionarne (nepokretne) faze. Mobilna faza može biti plin ili tekućina, dok stacionarna faza može biti čvrsta tvar ili tekućina (Skoog i sur., 1999). Kromatografija se bazira na pojavama kao što su razdvajanje na osnovu fizikalnih ili kemijskih karakteristika, adsorpcija, ionska izmjena ili isključenje kojima se omogućava odjeljivanje sastojaka iz smjesa (Popović, 2019).

2.7.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Kod tekućinske kromatografije (**Slika 7**), mobilna faza je tekućina. Sastojci su uzorka tekućinom nošeni kroz stacionarnu fazu koja je smještena u koloni. Sastojci se kroz stacionarnu fazu kreću različitim brzinama na temelju kojih dolazi do odjeljivanja sastojaka u koloni. Razlikuje se nekoliko vrsta tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti: adsorpcijska kromatografija, razdjelna kromatografija, kromatografija ionske izmjene i kromatografija na gelu. Najviše se primjenjuje razdjelna kromatografija koja se uobičajeno dijeli na kromatografiju u sustavu tekućina-tekućina te na kromatografiju u sustavu vezane faze. Razlikuju se po načinu na koji je stacionarna faza vezana na punilu. Stacionarna faza u koloni je najčešće silikagel na koji su vezane različite organske skupine (Jakobek, 2007; Popović, 2019; Skoog i sur., 1999).



Slika 7 HPLC sustav (Popović, 2019)

2.7.1.1 Određivanje polifenola HPLC metodom

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ima najširu primjenu u analizi polifenola (Rastija, Medić-Šarić, 2009). Odabir kolone koja će se upotrijebiti za analizu fenolnih kiselina i flavonoida ovisi ne samo o grupi flavonoida koji se žele razdvojiti, već i o karakteristikama stacionarne faze koja treba omogućiti zadovoljavajuću retenciju, oblik pika i selektivnost (Popović, 2019). Upotrebom HPLC metoda, u vinu su identificirane i kvantificirane brojne polifenolne tvari. Kod odabira metode, važan je način pripreve uzorka vina te skupina spojeva koju se želi analizirati. Pored izbora kolone, bitan je i način eluiranja te izbor pokretnih faza. Najčešći način eluiranja je gradijentan. Koriste se dva sustava otapala pri čemu je jedno polarno kao što je vodena otopina octene, fosforne, perklorne ili mravlje kiseline dok je drugo manje polarno otapalo kao što je zakiseljeni metanol ili acetonitril. U crnome vinu, jednostavnim se izokratnim ispiranjem analiziraju mircetin i kvercetin. Tijekom

izokratnoga ispiranja ne dolazi do promjene sastava pokretne faze. Polifenoli apsorbiraju u vidljivom i ultraljubičastom dijelu spektra te se za njihovu detekciju analiza HPLC-om temelji na mjerenju apsorbancije ultraljubičastog i vidljivog (Vis) zračenja korištenjem UV-Vis detektora. Kako bi se povećala selektivnost i osjetljivost HPLC analize, uvodi se dodatni elektrokemijski detektor uz detektor s nizom dioda. Takva metoda detekcije važna je pri određivanju polifenola koji se nalaze u vinu u vrlo malim koncentracijama (Rastija i Medić-Šarić, 2009).

2.7.2. Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija primjenjuje se za identifikaciju tvari, izolaciju i odvajanje komponenata smjese, kvantitativnu analizu te kako bi se utvrdila čistoća tvari. Mobilna faza je inertni plin koji eluira sastojke smjese iz kolone ispunjene stacionarnom fazom. Nakon ulaska smjese komponenti u kolonu, ona se razdjeljuje između stacionarne i mobilne faze. Razdvajanje sastojaka iz smjese odvija se naizmjenično adsorpcijom i desorpcijom lakše hlapivih sastojaka pod djelovanjem plina nositelja koji onda odnosi komponente kroz kolonu (Skoog i sur., 1999).

Plinska se kromatografija, s obzirom na nepokretnu fazu, dijeli na plinsko-adsorpcijsku i plinsko-razdjelnu kromatografiju. Kod plinsko-adsorpcijske kromatografije nepokretna faza je adsorbens (silikagel, diatomajska zemlja, aluminijev oksid), koja na sebe veže komponente iz smjese. Stacionarna faza kod plinsko-razdjelne kromatografije je tekućina koja je nanosena na kruti nosač (silikonska ulja, esteri, alkoholi visokog vrelišta, tekući ugljikovodici velike molekularne mase). Do odvajanja komponenata smjese dolazi zbog razlike u topivosti u stacionarnoj fazi. Plinskom kromatografijom postiže se kvalitativna i kvantitativna analiza smjese u kraćem vremenu i uz bolje razlučivanje u usporedbi s drugim analitičkim postupcima (Popović, 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Ispitati utjecaj koncentriranja procesom nanofiltracije na tvari boje konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon pri tlakovima od 25, 35, 45 i 55 bara, s primjenom i bez primjene hlađenja. Proces koncentriranja je proveden na uređaju LabUnit M20 primjenom kompozitnih membrana tipa Alfa Laval NF M20.

3.2. MATERIJAL I METODE

3.2.1. Priprema koncentriranog konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon

U ovom istraživanju upotrijebljeno je konvencionalno i ekološko vino Cabernet Sauvignon. Nakon što je proveden postupak koncentriranja nanofiltracijom, ispitivane su tvari boje u koncentriranom vinu.

Koncentriranje vina Cabernet Sauvignon procesom nanofiltracije provedeno je pomoću laboratorijskog uređaja za membransku filtraciju LabUnit M20 (Dow Danmark Separation Systems De Danske Sukkerfabrikker, Copenhagen, Danska) s pločastim modulom (**Slika 8**). Pločasti membranski modul sadrži kompozitne membrane tipa Alfa Laval NF M20 na polieterskom nosaču. U modul je postavljeno šest membrana čija je ukupna površina 0,1736 m² (površina jedne membrane iznosi 0,02893 m²). Karakteristike membrana prikazane su u **Tablici 2** (Zhou i sur., 2013).



Slika 8 Laboratorijski uređaj za membransku filtraciju LabUnit M20 (web 3)

Tablica 2 Karakteristike membrana (Zhou i sur., 2013)

Maksimalni radni tlak (bar)	55
Temperatura (°C)	5 – 60
Materijal	poliamid
MgSO ₄ zadržavanje (%)	98,75
NaCl zadržavanje (%)	42,65
pH područje	3 – 10

Za provedbu pokusa korišteno je konvencionalno i ekološko vino Cabernet Sauvignon početnog volumena 3 L i temperature 15 °C. Proces koncentriranja je proveden pri tlakovima od 25, 35, 45 i 55 bara, uz primjenu i bez primjene hlađenja do maksimalnog volumena retentata od 1,3 L. Tijekom koncentriranja, svake 4 minute mjerio se volumen permeata, temperatura uzorka u tanku (kod primjene hlađenja, mjerila se i temperatura rashladnog sredstva) i udio suhe tvari. Kod pokusa s primjenom hlađenja, koristila se pokretna rashladna jedinica koja je priključena na izmjenjivač topline uređaja za membransku filtraciju, a kao rashladno sredstvo korištena je voda.

3.2.2. Spektrofotometrijska analiza tvari boje

3.2.2.1 Određivanje antocijana

Za određivanje antocijana primijenjena je pH-diferencijalna metoda. Ova se metoda temelji na strukturnoj transformaciji kromofora antocijana u ovisnosti o promjeni pH. Antocijani podliježu reverzibilnoj strukturnoj transformaciji s promjenom pH koja je vidljiva kroz promjenu spektra apsorbancije. Ta metoda omogućava točno i brzo mjerenje ukupnih antocijana, bez obzira na prisutnost polimeriziranih, degradiranih pigmenta i drugih tvari koje bi mogle smetati. Antocijani su određivani metodom prema 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

apsorbancija pri valnim duljinama od 512 nm i 700 nm. Apsorbancija uzorka izračunata je prema formuli:

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

Količina antocijana izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$\text{ukupni antocijani} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] = \frac{A \times MW \times FR \times 1000}{\epsilon \times l}$$

gdje je: A – apsorbancija uzorka,

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

FR – faktor razrjeđenja,

$$FR = \frac{V (\text{ukupni})}{V (\text{uzorka})}$$

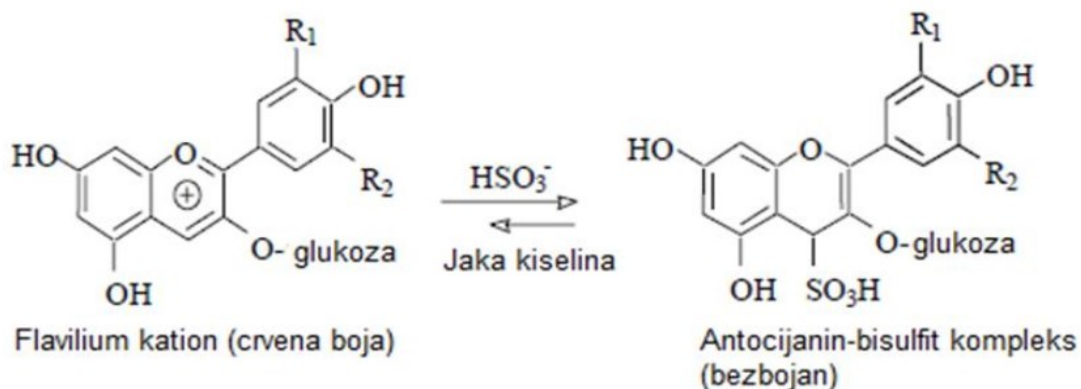
ϵ – molarna absorptivnost cijanidin-3-glukozida (26900 L/mol cm),

l – duljina kivete (1 cm).

Rezultati su izraženi u mg cijanidin-3-glukozida po litri uzorka. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja i izraženi kao srednja vrijednost.

3.2.2.2 Određivanje polimerne boje

Degradacija antocijana može se pratiti očitavanjem apsorbancije u uzorcima koji su tretirani bisulfitom. Antocijani s bisulfitom tvore bezbojan kompleks (**Slika 9**). Boja koja se razvija polimerizacijom antocijana, odnosno kompleks antocijani/tanini, otporna je 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 $\lambda_{\text{vis-max}}$ (512 nm). Omjer između polimerne boje i gustoće boje koristi se kao postotak boje koja je nastala polimerizacijom.



Slika 9 Nastajanje bezbojnog kompleksa između antocijana i bisulfita (Wrolstad i sur., 2005)

Degradacija antocijana određena je prema metodi Giusti i Wrolstad (2001). Otpipetirano je 0,2 mL uzorka u dvije epruvete te je u jednu dodano 3 mL vode, a u drugu 2,8 mL vode i 0,2 mL otopine kalijevog bisulfita. Nakon stajanja od 15 min, mjerena je apsorbancija na 420 nm, 512 nm i 700 nm. Degradacija antocijana, odnosno smanjenje intenziteta crvene boje (A_{512}) i povećanje posmeđivanja (A_{420}) se izračunava prema formuli:

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

gdje je: gustoća boje (kontrolni uzorak tretiran vodom),

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

boja nastala polimerizacijom (uzorak tretiran bisulfitom),

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

FR – faktor razrjeđenja.

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

3.2.2.3 Određivanje ukupnih polifenola

Koncentracija ukupnih fenola određena je Folin-Ciocalteu metodom. Metoda se temelji na reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom i mjerenjem nastalog intenziteta obojenja (apsorbancije) pri valnoj duljini od 765 nm (Ough i Amerine, 1988).

U epruvetu je otpipetirano 0,2 mL uzorka i 1,8 mL destilirane vode te je dodano 10 mL Folin-Ciocalteu reagensa (1 : 10) i 8 mL Na_2CO_3 . Promućka se i ostavi stajati 2 – 20 sati na tamnom mjestu pri sobnoj temperaturi. Apsorbancija se mjeri spektrofotometrijski pri 765 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka dodano je 0,2 mL destilirane vode.

Količina polifenola izračunata je prema formuli:

$$\text{ukupni polifenoli} \left[\frac{g}{L} \right] = \frac{[(A - SP) - 0,0293]}{0,8964} \times FR \times 1000$$

gdje je: A – apsorbancija uzorka,

SP – apsorbancija slijepe probe,

FR – faktor razrjeđenja (5).

Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja, a rezultat je izražen kao srednja vrijednost. Sadržaj polifenolnih spojeva izražen je u g galne kiseline/L uzorka interpolacijom kalibracijske krivulje galne kiseline.

3.2.2.4 Određivanje ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi određeni su prema metodi Kim i sur. (2003). Linearnost iznosi 0,9953, a kalibracija se radi s različitim koncentracijama kvercetina. U epruvete se stavi 0,5 mL uzorka i 4 mL destilirane vode zajedno s 0,3 mL 5 % NaNO₂, a nakon 5 minuta dodaje se 1,5 mL 2 % AlCl₃. Nakon sljedećih 5 minuta sadržaj se neutralizira s 2 mL 1M otopine NaOH te 1,7 mL vode. Nakon dodatka NaOH sadržaj mijenja boju, a apsorbancija se mjeri na 510 nm. Za slijepu probu korištena je destilirana voda. Kvantifikacija se provodi korištenjem kalibracijske krivulje. Rezultati su izraženi pomoću kalibracijske krivulje katehina u g katehina/L uzorka kao srednja vrijednost triju mjerenja.

3.2.2.5 Određivanje antioksidacijske aktivnosti

DPPH metoda

DPPH metoda je brza, jeftina i jednostavna metoda za mjerenje antioksidacijske aktivnosti hrane koristeći slobodni radikal 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (Shalaby i Shanab, 2013). Metoda se temelji na redukciji slobodnih DPPH radikala antioksidansom koji služi kao donor elektrona ili atoma vodika. Nestanak DPPH radikala prati se smanjenjem apsorbancije pri 517 nm do koje dolazi zbog reakcije s radikalima ili smanjenja količine antioksidansa (Brand-Williams i sur., 1995). Može se koristiti za krute ili tekuće uzorke. Daje rezultate o ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti uzorka. Otpipetira se 0,2 mL razrijeđenog uzorka u epruvetu te se doda 3 mL DPPH otopine. Za slijepu probu umjesto uzorka dodano je 0,2 mL destilirane vode. Nakon stajanja od 15 min mjerena je apsorbancija na 517 nm. Antioksidacijska aktivnost izračunata je prema formuli:

$$\text{antioksidacijska aktivnost} \left[\frac{\mu\text{mol}}{100 \text{ mL}} \right] = \frac{[(SP - A) - 0,0504]}{1,3775} \times FR$$

gdje je: A – apsorbancija uzorka,

SP – apsorbancija slijepa probe,

FR – faktor razrjeđenja (100).

Rezultati se preračunaju iz kalibracijske krivulje troloxa kao standard u $\mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost.

ABTS metoda

ABTS metoda prati raspadanje radikala $\text{ABTS}^{\bullet+}$ koji nastaje oksidacijom plavo-zelenog 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazilin-6-sulfonat) djelovanjem fenolnih tvari. Metoda se temelji na redukciji $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radikala atomom vodika ili antioksidansom koji služi kao donor elektrona (Dong i sur., 2015). Prema metodi po Re i sur. (1999), otpipetira se 0,2 mL uzorka te se doda 3,2 mL otopine ABTS, dobro promiješa i smjesa se ostavi u mraku 95 min da reagira. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 734 nm. Za slijepu probu se umjesto uzorka doda jednaka količina destilirane vode. Antioksidacijska aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje troloxa kao standard u $\mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost.

CUPRAC metoda

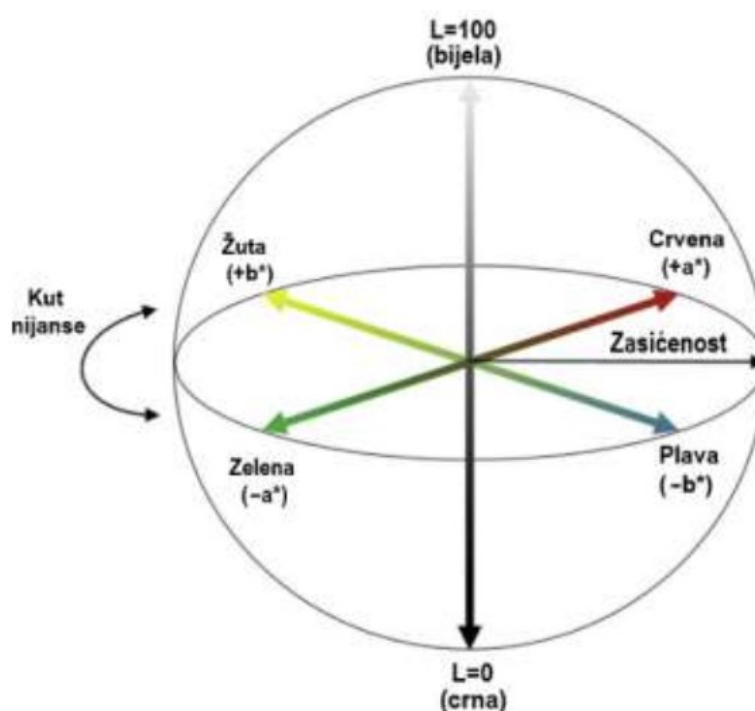
Metoda se temelji na mjerenju apsorbancije CUPRAC kromofora, Cu(I)-neokuproin (Nc) kelata koji je nastao kao posljedica redoks reakcije antioksidansa s CUPRAC reagensom, bis(neokuproin)bakar(II) kationom [Cu(II)-Nc]. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 450 nm (Özyürek i sur., 2011). Otpipetirano je 1 mL otopine bakar klorida, 1 mL otopine neokuproina, 1 mL amonijevog acetata, 0,2 mL uzorka te 0,9 mL destilirane vode. Smjesa se homogenizira te ostavi stajati 30 minuta. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri 450 nm. Za slijepu probu umjesto uzorka doda se jednaka količina destilirane vode. Rezultat se preračuna iz kalibracijske krivulje troloxa u $\mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$. Za svaki uzorak provedena su tri mjerenja i rezultati su izraženi kao srednja vrijednost.

FRAP metoda

FRAP metodom prati se redukcija Fe^{3+} iona (feri oblik) u Fe^{2+} (fero oblik) uz prisutnost antioksidansa. Nastali ion u prisutnosti TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin) reagensa formira kompleks intenzivnog obojenja koji pokazuje maksimum apsorpcije pri 593 nm (Roginsky i Lissi, 2005). U ovom radu korištena je metoda po Benzie i Strain (1999). Otpipetira se 0,2 mL uzorka i doda 3 mL FRAP otopine. Reakcijska smjesa se dobro promiješa i ostavi 15 minuta. Nakon toga mjeri se apsorbcija pri 593 nm. Za slijepu probu doda se destilirana voda umjesto uzorka. Antioksidacijska aktivnost izračunata je iz kalibracijske krivulje za trolox ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ mL}$) kao standard. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tri mjerenja.

3.2.3. Određivanje boje u CIELab sustavu

Boja vina jedna je od najvažnijih vizualnih karakteristika jer pruža određenu količinu vrlo bitnih informacija. Vino apsorbira dio zračenja svjetlosti koje pada i reflektira drugi dio koji dopire do očiju promatrača (Web 2). CIELab sustav (Slika 10) predstavlja trodimenzionalni prostor boja koji je načinjen na temelju percepcije boja od strane standardnog promatrača (Ivić, 2022). Za određivanje parametara boje u CIELab sustavu u početnim uzorcima vina i retentatima korišten je kromametar CR-400 (Konica Minolta, Inc., Osaka, Japan). Za svaki su uzorak provedena tri mjerenja, a rezultati su izraženi kao srednja vrijednost.



Slika 10 CIELab sustav boja (Ly i sur., 2020)

Zasićenost boje (C^*) računa se prema formuli:

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

Kut nijanse ($^{\circ}h$) računa se prema formuli:

$$^{\circ}h = \arctan \frac{b^*}{a^*}$$

Ukupna razlika u boji izračunata je prema formuli:

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

gdje je: L^* - svjetlina, 0 = crna boja, 100 = bijela boja

a^* - crvena (pozitivne vrijednosti) ili zelena (negativne vrijednosti) boja,

b^* - žuta (pozitivne vrijednosti) ili plava (negativne vrijednosti) boja (Ly i sur., 2020).

3.2.4. Određivanje polifenola HPLC metodom

3.2.4.1 HPLC analitički sustav

Analiza flavanola i fenolnih kiselina provedena je na HPLC analitičkom sustavu (HPLC 1260 Infinity II s PDA detektorom; Agilent Technologies, CA, USA) (**Slika 11**). Razdvajanje polifenolnih spojeva provedeno je na Poroshell 120 EC-C18 koloni koja je zaštićena predkolumnom (Poroshell 120 EC-C18, Agilent, USA). Za svaki uzorak provedena su dva mjerenja.

Koncentrati su razrijeđeni na udio topljive suhe tvari vina i profiltrirani kroz filter Chromafil Xtra (PTFE; 0,45 μm , 25 mm) (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka) prije HPLC analize. Metode za analizu flavanola i fenolnih kiselina prethodno su validirane (Jakobek i sur., 2012). Fenolne kiseline identificirane su na valnoj duljini od 320 nm dok su flavanoli pri 360 nm. Kvantifikacija flavanola i fenolnih kiselina provedena je na osnovi kalibracijskih krivulja standardnih spojeva (kvercetina, rutina i klorogenske kiseline) dok su neki spojevi određeni djelomično (neoklorogenska kiselina). Zbrajanjem količina pojedinih flavanola i fenolnih kiselina, dobivene su ukupne količine koje su određene pomoću HPLC.



Slika 11 HPLC analitički sustav (web 3)

3.2.4.2 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. Volumen injektiranja uzorka bio je 10 μ L. Radni uvjeti analize prikazani su u **Tablici 3**. Period je rekvilibracije između pojedinih analiza bio 10 minuta. Snimanje spektra provedeno je u području valnih duljina od 200 do 600 nm.

Tablica 3 Radni uvjeti HPLC metode

Vrijeme (min)	% A	% B	Protok (mL/min)
0	95	5	1
3	70	30	1
15	65	35	1
22	63	37	1
30	59	41	1
32	55	45	1

3. Eksperimentalni dio

40	51	49	1
45	20	80	1
48	20	80	1
50	95	5	1
53	95	5	1

4. REZULTATI

4.1. TABLIČNI PRIKAZ ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA

Tablica 4 Koncentracije ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i monomernih antocijana i udio polimerne boje u početnom uzorku konvencionalnog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom i bez primjene hlađenja

Uzorak	Ukupni polifenoli (g/L)	Ukupni flavonoidi (g/L)	Polimerna boja (%)	Monomerni antocijani (mg/L)
KV	3,19 ± 0,06	1,55 ± 0,04	61,50 ± 0,22	151,41 ± 0,49
KN25H	2,14 ± 0,03	1,18 ± 0,03	61,76 ± 0,16	99,15 ± 0,36
KN35H	2,26 ± 0,06	1,17 ± 0,03	61,94 ± 0,55	101,49 ± 0,87
KN45H	2,40 ± 0,04	1,31 ± 0,03	61,89 ± 0,21	108,79 ± 0,66
KN55H	2,49 ± 0,06	1,30 ± 0,04	61,52 ± 0,38	124,12 ± 0,64
KN25BH	2,08 ± 0,04	1,19 ± 0,03	63,63 ± 0,29	78,28 ± 0,22
KN35BH	2,32 ± 0,04	1,20 ± 0,03	63,64 ± 0,11	96,80 ± 0,09
KN45BH	2,42 ± 0,01	1,24 ± 0,03	63,67 ± 0,14	99,95 ± 0,86
KN55BH	2,46 ± 0,01	1,24 ± 0,01	63,95 ± 0,32	109,99 ± 0,56

*KV – početno konvencionalno vino; KN – retentat konvencionalnog vina; 25, 35, 45, 55 – primijenjeni tlakovi (bar); H i BH – hlađenje i bez hlađenja

Tablica 5 Koncentracije ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida i monomernih antocijana i udio polimerne boje u početnom uzorku ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom i bez primjene hlađenja

Uzorak	Ukupni polifenoli (g/L)	Ukupni flavonoidi (g/L)	Polimerna boja (%)	Monomerni antocijani (mg/L)
EV	3,34 ± 0,06	1,64 ± 0,02	68,62 ± 0,97	103,83 ± 0,72
EN25H	2,35 ± 0,01	1,30 ± 0,01	68,63 ± 0,35	84,95 ± 0,96
EN35H	2,45 ± 0,02	1,33 ± 0,02	68,62 ± 0,36	87,54 ± 0,69
EN45H	2,62 ± 0,10	1,50 ± 0,02	68,20 ± 0,43	88,62 ± 0,86
EN55H	2,84 ± 0,05	1,48 ± 0,02	68,82 ± 0,31	99,24 ± 0,45
EN25BH	2,28 ± 0,02	1,15 ± 0,02	70,93 ± 0,13	78,16 ± 0,09
EN35BH	2,45 ± 0,03	1,30 ± 0,02	70,85 ± 0,18	85,11 ± 0,92
EN45BH	2,62 ± 0,05	1,49 ± 0,03	70,87 ± 0,24	84,60 ± 0,95
EN55BH	2,74 ± 0,05	1,45 ± 0,05	70,99 ± 0,38	91,39 ± 0,29

*EV – početno ekološko vino; EN – retentat ekološkog vina; 25, 35, 45, 55 – primijenjeni tlakovi (bar); H i BH – hlađenje i bez hlađenja

Tablica 6 Antioksidacijska aktivnost određena DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metodom u početnom uzorku konvencionalnog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom i bez primjene hlađenja

Uzorak	DPPH ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$)	ABTS ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$)	FRAP ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$)	CUPRAC ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$)
KV	14,92 \pm 0,97	35,18 \pm 0,15	3,04 \pm 0,15	174,77 \pm 1,07
KN25H	3,74 \pm 0,29	20,32 \pm 0,26	2,28 \pm 0,03	136,46 \pm 1,32
KN35H	3,77 \pm 0,38	24,65 \pm 0,17	2,30 \pm 0,03	149,85 \pm 1,50
KN45H	8,89 \pm 0,47	25,68 \pm 0,10	2,47 \pm 0,05	151,76 \pm 1,50
KN55H	9,87 \pm 0,16	25,77 \pm 0,09	2,62 \pm 0,04	158,23 \pm 0,79
KN25BH	3,01 \pm 0,44	16,43 \pm 0,41	2,09 \pm 0,07	116,44 \pm 0,24
KN35BH	4,05 \pm 0,16	22,15 \pm 0,32	2,24 \pm 0,03	117,31 \pm 1,66
KN45BH	6,45 \pm 0,32	23,13 \pm 0,19	2,41 \pm 0,06	133,35 \pm 1,58
KN55BH	8,00 \pm 0,41	24,87 \pm 0,26	2,52 \pm 0,07	139,34 \pm 0,70

*KV – početno konvencionalno vino; KN – retentat konvencionalnog vina; 25, 35, 45, 55 – primijenjeni tlakovi (bar); H i BH – hlađenje i bez hlađenja

Tablica 7 Antioksidacijska aktivnost određena DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC metodom u početnom uzorku ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom i bez primjene hlađenja

Uzorak	DPPH ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$)	ABTS ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$)	FRAP ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$)	CUPRAC ($\mu\text{mol}/100\text{ mL}$)
EV	14,77 \pm 0,72	33,46 \pm 0,59	3,10 \pm 0,13	170,85 \pm 1,53
EN25H	5,80 \pm 0,39	24,16 \pm 0,16	2,22 \pm 0,14	107,24 \pm 0,45
EN35H	6,45 \pm 0,35	24,14 \pm 0,23	2,34 \pm 0,19	112,96 \pm 1,65
EN45H	8,78 \pm 0,34	31,35 \pm 0,15	2,45 \pm 0,05	138,51 \pm 0,38
EN55H	11,15 \pm 0,03	31,50 \pm 0,17	2,62 \pm 0,20	149,84 \pm 1,23
EN25BH	5,77 \pm 0,38	24,28 \pm 0,15	1,96 \pm 0,09	101,44 \pm 1,74
EN35BH	5,94 \pm 0,49	25,58 \pm 0,07	2,12 \pm 0,03	127,67 \pm 1,06
EN45BH	6,99 \pm 0,05	27,96 \pm 0,11	2,42 \pm 0,19	133,87 \pm 1,35
EN55BH	7,11 \pm 0,11	31,58 \pm 0,17	2,66 \pm 0,16	136,37 \pm 1,80

*EV – početno ekološko vino; EN – retentat ekološkog vina; 25, 35, 45, 55 – primijenjeni tlakovi (bar); H i BH – hlađenje i bez hlađenja

Tablica 8 Parametri boje u početnom uzorku konvencionalnog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom i bez primjene hlađenja

Uzorak	L*	a*	b*	°h	C*	ΔE*
KV	19,70 ± 0,01	1,98 ± 0,03	1,14 ± 0,03	35,80 ± 0,64	1,94 ± 0,02	-
KN25H	19,96 ± 0,04	1,95 ± 0,03	1,16 ± 0,03	28,38 ± 0,28	2,25 ± 0,01	0,26 ± 0,02
KN35H	19,96 ± 0,02	1,95 ± 0,02	1,12 ± 0,03	29,70 ± 0,22	2,24 ± 0,04	0,26 ± 0,02
KN45H	19,98 ± 0,01	2,05 ± 0,02	1,15 ± 0,01	31,11 ± 0,39	2,28 ± 0,02	0,29 ± 0,02
KN55H	19,99 ± 0,01	2,02 ± 0,04	1,11 ± 0,01	31,97 ± 0,22	2,30 ± 0,03	0,30 ± 0,03
KN25BH	20,00 ± 0,03	1,86 ± 0,03	1,14 ± 0,04	29,24 ± 0,32	2,31 ± 0,03	0,32 ± 0,03
KN35BH	20,00 ± 0,01	1,87 ± 0,03	1,14 ± 0,03	29,60 ± 0,33	2,30 ± 0,03	0,32 ± 0,01
KN45BH	20,00 ± 0,02	1,86 ± 0,02	1,14 ± 0,04	30,60 ± 0,32	2,42 ± 0,04	0,32 ± 0,02
KN55BH	20,04 ± 0,04	1,83 ± 0,02	1,15 ± 0,01	30,71 ± 0,39	2,42 ± 0,02	0,37 ± 0,01

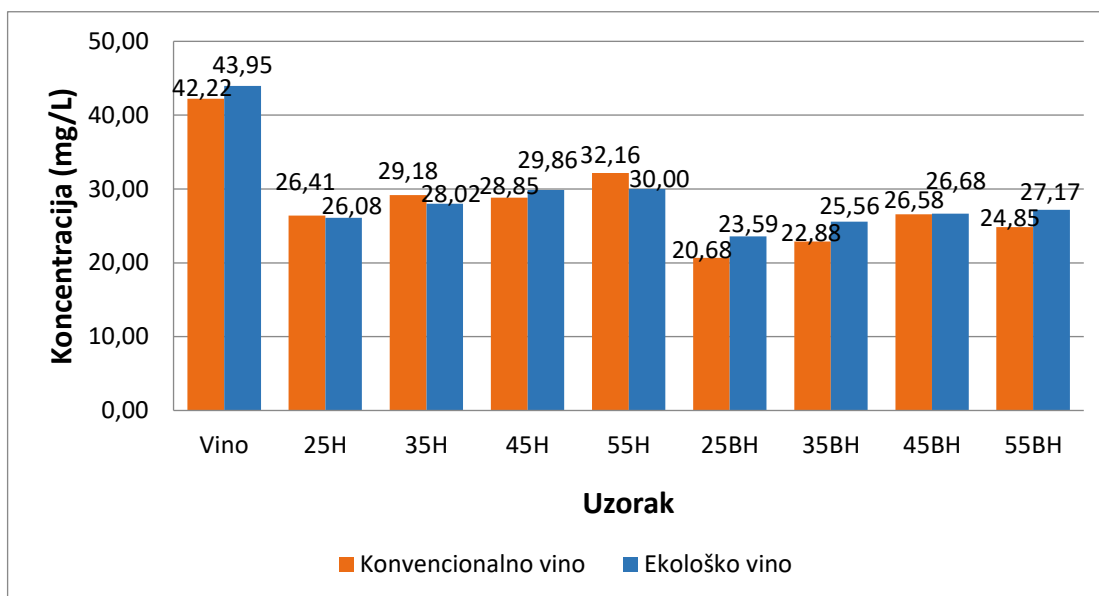
*KV – početno konvencionalno vino; KN – retentat konvencionalnog vina; 25, 35, 45, 55 – primijenjeni tlakovi (bar); H i BH – hlađenje i bez hlađenja

Tablica 9 Parametri boje u početnom uzorku ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom i bez primjene hlađenja

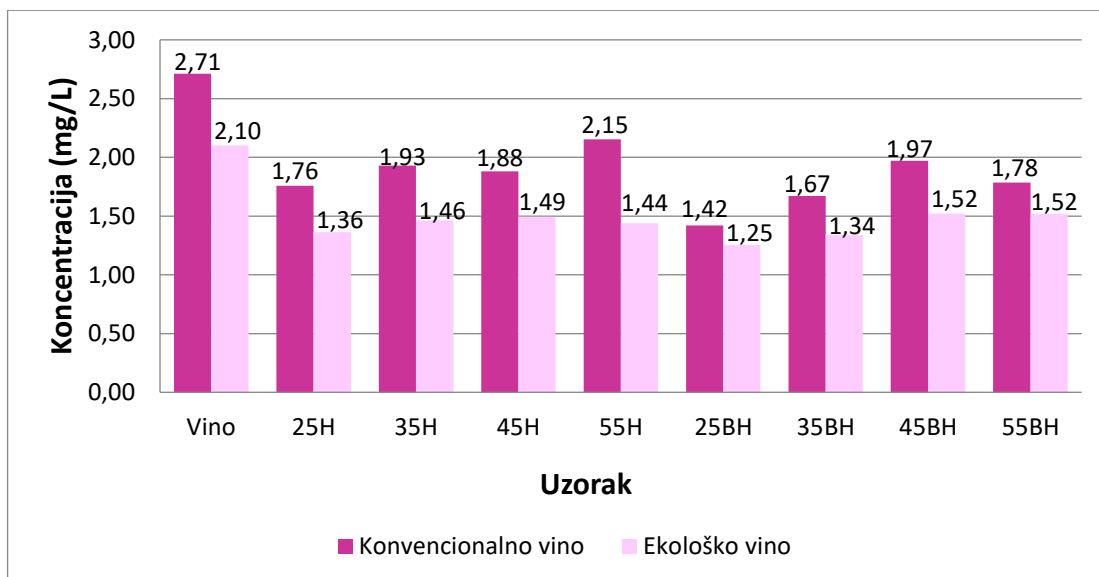
Uzorak	L*	a*	b*	°h	C*	ΔE*
EV	19,70 ± 0,01	2,15 ± 0,02	1,07 ± 0,01	33,54 ± 0,32	1,58 ± 0,03	-
EN25H	20,28 ± 0,02	2,12 ± 0,03	1,05 ± 0,04	30,51 ± 0,28	2,34 ± 0,04	0,58 ± 0,01
EN35H	20,29 ± 0,01	2,17 ± 0,01	1,03 ± 0,01	29,98 ± 0,22	2,29 ± 0,02	0,59 ± 0,02
EN45H	20,31 ± 0,01	2,14 ± 0,02	1,06 ± 0,04	30,31 ± 0,39	2,56 ± 0,02	0,61 ± 0,02
EN55H	20,33 ± 0,02	2,13 ± 0,01	1,07 ± 0,06	23,92 ± 0,22	2,56 ± 0,01	0,63 ± 0,02
EN25BH	20,29 ± 0,01	1,93 ± 0,03	1,05 ± 0,02	32,06 ± 0,32	2,27 ± 0,03	0,63 ± 0,03
EN35BH	20,32 ± 0,05	1,97 ± 0,02	1,04 ± 0,01	30,47 ± 0,33	2,27 ± 0,03	0,65 ± 0,03
EN45BH	20,31 ± 0,01	1,94 ± 0,03	1,07 ± 0,01	30,30 ± 0,32	2,51 ± 0,04	0,65 ± 0,02
EN55BH	20,32 ± 0,01	1,96 ± 0,03	1,05 ± 0,01	30,45 ± 0,39	2,55 ± 0,02	0,65 ± 0,02

*EV – početno ekološko vino; EN – retentat ekološkog vina; 25, 35, 45, 55 – primijenjeni tlakovi (bar); H i BH – hlađenje i bez hlađenja

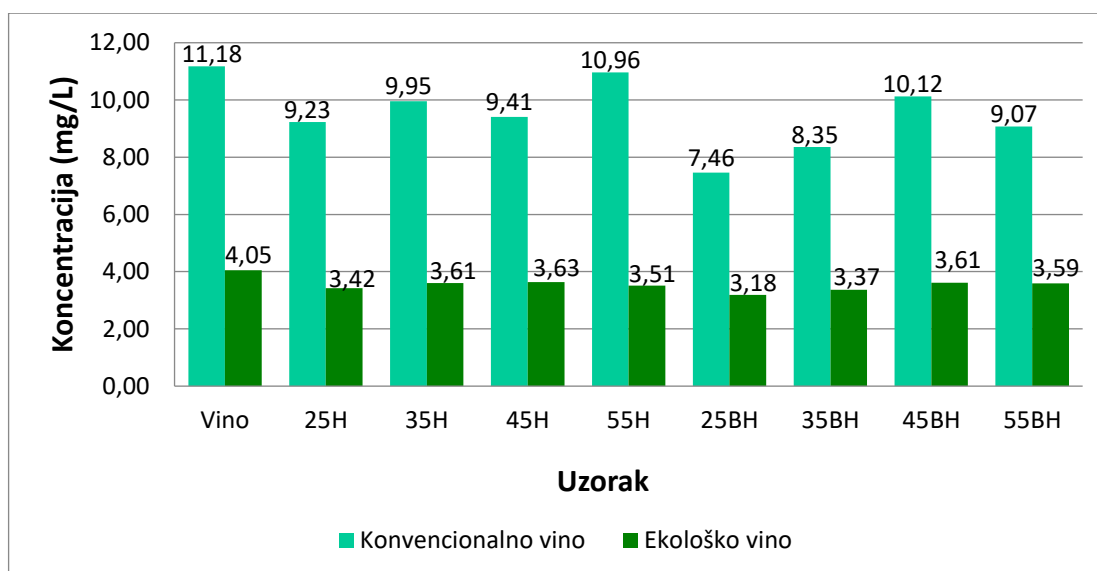
4.2. GRAFIČKI PRIKAZ ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA



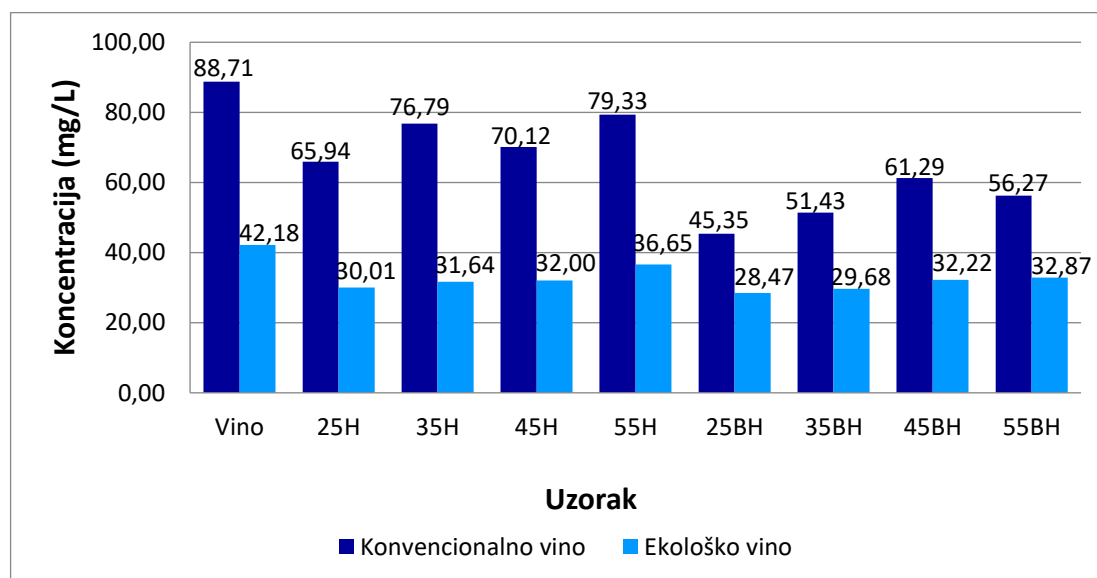
Slika 12 Koncentracija galne kiseline u početnim uzorcima konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom (H) i bez primjene hlađenja (BH)



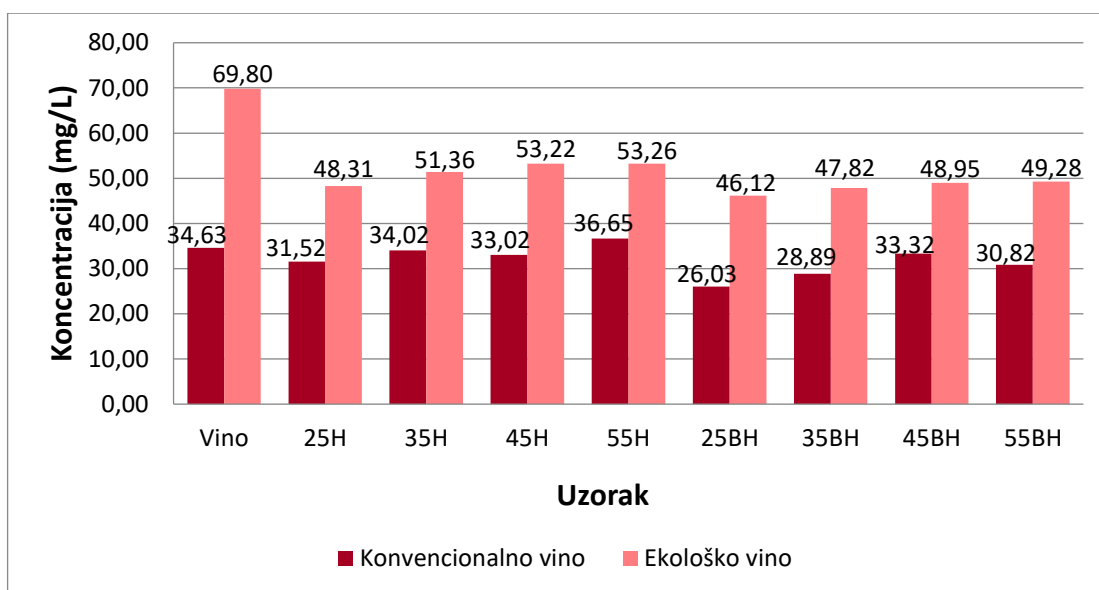
Slika 13 Koncentracija kava kiseline u početnim uzorcima konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom (H) i bez primjene hlađenja (BH)



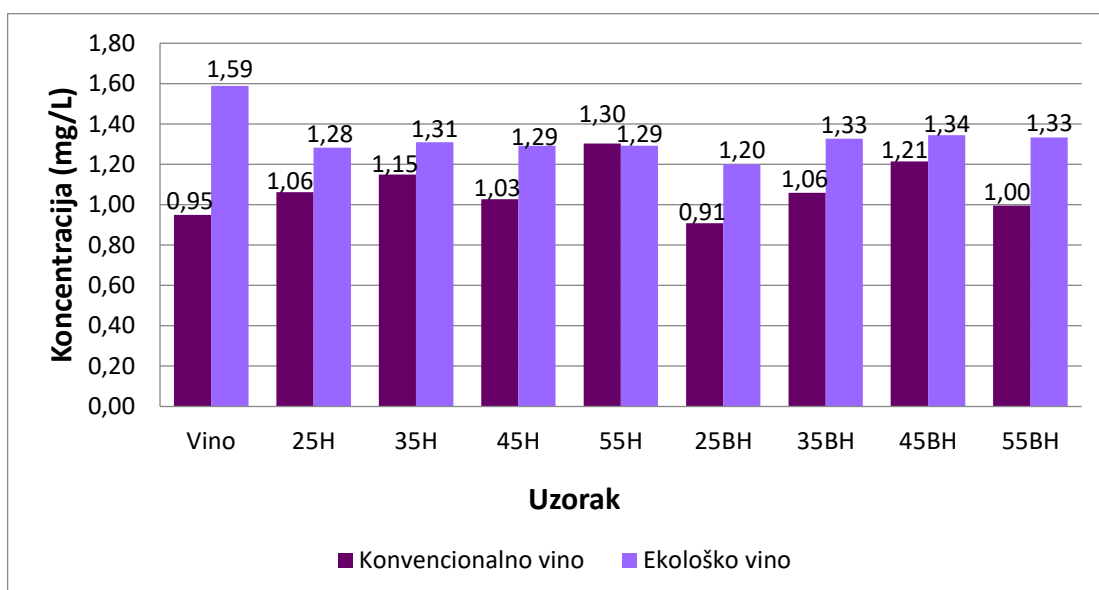
Slika 14 Koncentracija kaftarne kiseline u početnim uzorcima konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom (H) i bez primjene hlađenja (BH)



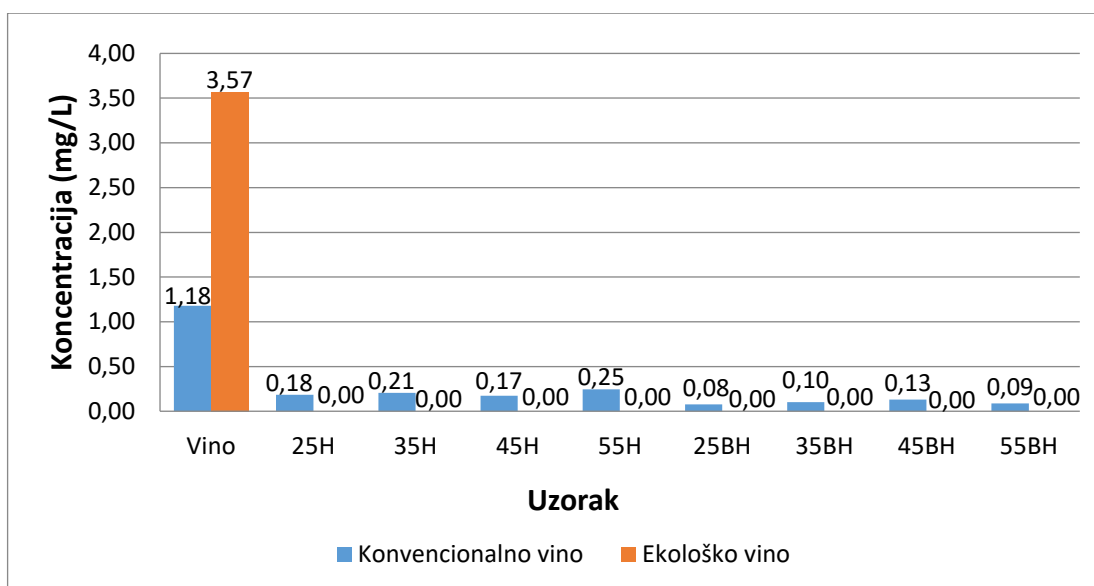
Slika 15 Koncentracija (+)-katehina u početnim uzorcima konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom (H) i bez primjene hlađenja (BH)



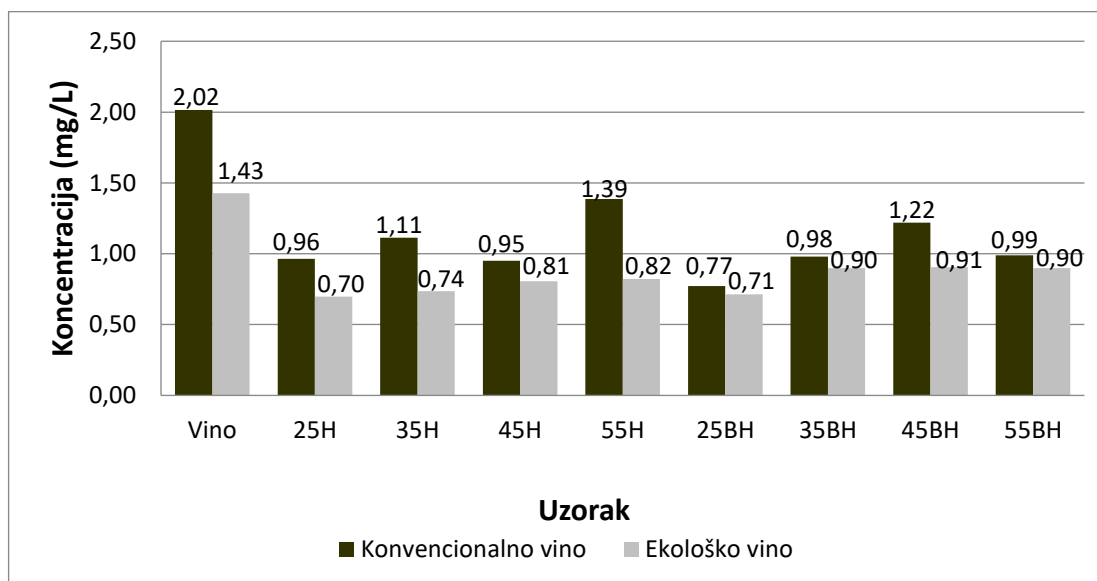
Slika 16 Koncentracija (-)-epikatehina u početnim uzorcima konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom (H) i bez primjene hlađenja (BH)



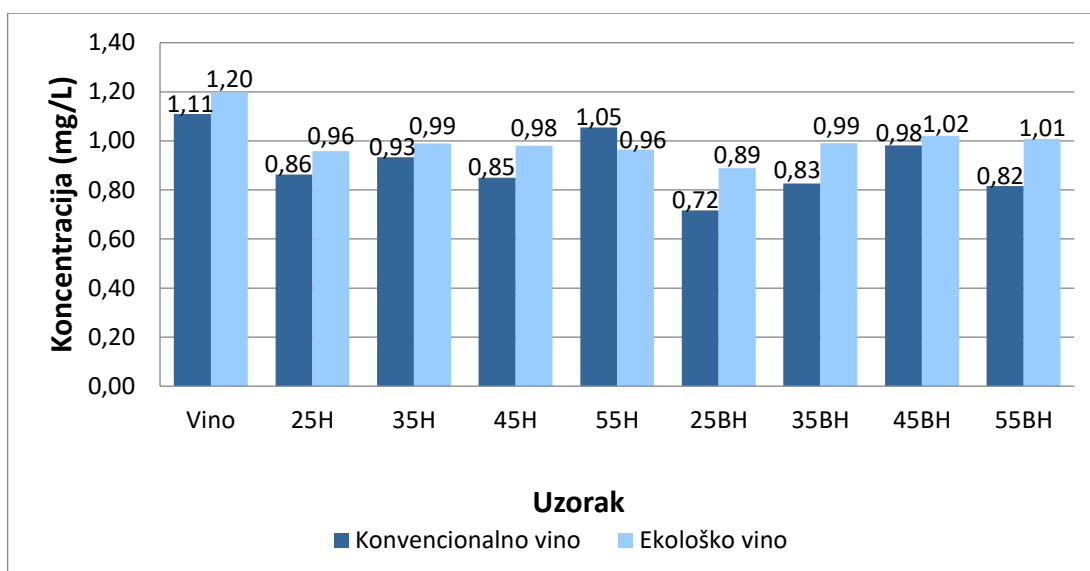
Slika 17 Koncentracija rutina u početnim uzorcima konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom (H) i bez primjene hlađenja (BH)



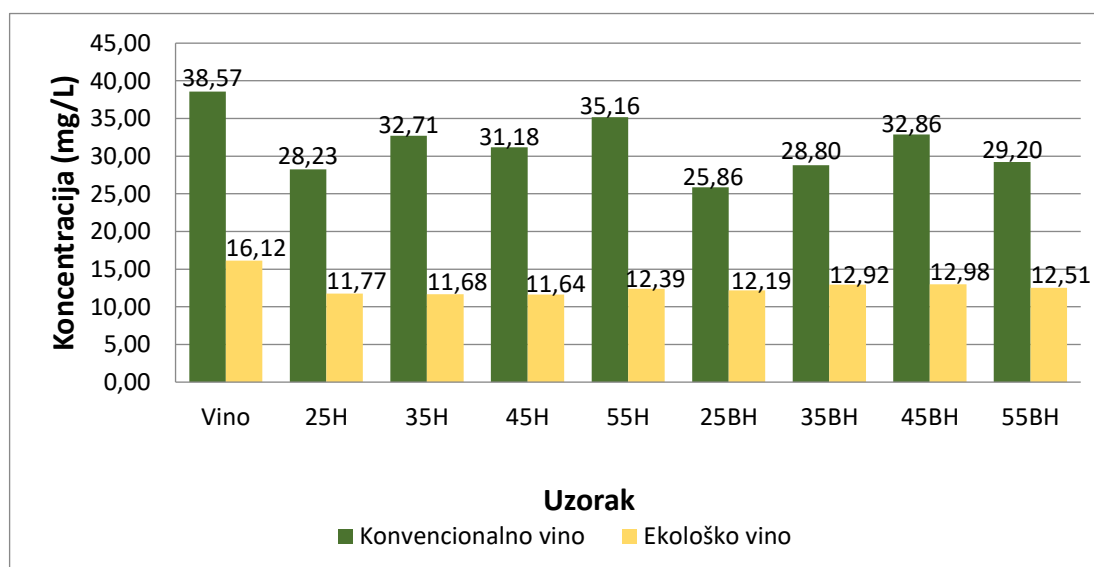
Slika 18 Koncentracija kvercetina u početnim uzorcima konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom (H) i bez primjene hlađenja (BH)



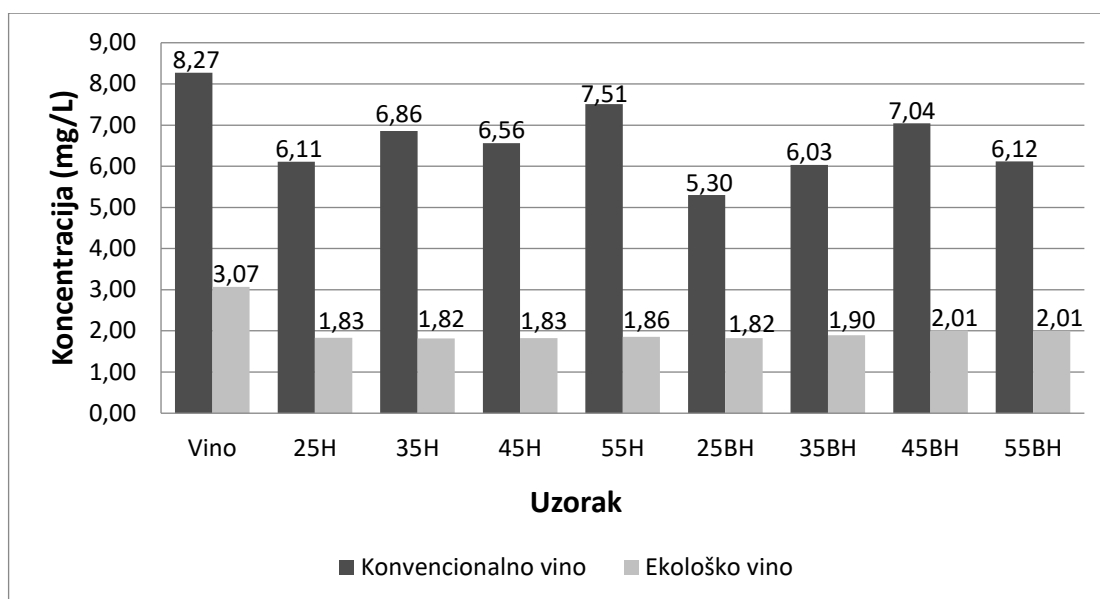
Slika 19 Koncentracija derivata kvercetina 1 u početnim uzorcima konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom (H) i bez primjene hlađenja (BH)



Slika 20 Koncentracija derivata kvercetina 2 u početnim uzorcima konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom (H) i bez primjene hlađenja (BH)



Slika 21 Koncentracija malvidin-3-glukozida u početnim uzorcima konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom (H) i bez primjene hlađenja (BH)



Slika 22 Koncentracija derivata malvidin-3-glukozida u početnim uzorcima konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon te u retentatima dobivenih procesom nanofiltracije pri tlaku od 25, 35, 45 i 55 bara s primjenom (H) i bez primjene hlađenja (BH)

5. RASPRAVA

Koncentriranje tekuće hrane uparavanjem i danas se najčešće upotrebljava. Iako ima široku primjenu, jedan od najvećih nedostataka uparavanja je gubitak tvari arome te nutritivnih sastojaka kao što su vitamini i antocijani. Kako bi se sačuvali osjetljivi sastojci namirnica i gubitci sveli na minimum, proces je potrebno provesti u što kraćem vremenu i pri nižim temperaturama. Stoga se kao alternativni postupci koncentriranja koriste membranski procesi, pervaporacija i koncentriranje zamrzavanjem.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj koncentriranja postupkom nanofiltracije na zadržavanje tvari boje konvencionalnog i ekološkog vina Cabernet Sauvignon primjenom različitih tlakova s i bez primjene hlađenja. U uzorcima vina i retentatima dobivenim pri različitim procesnim parametrima određeni su ukupni polifenoli, flavonoidi, polimerna boja, monomerni antocijani, udio galne, kava i kaftarne kiseline te udjeli (+)-katehina, (-)-epikatehina, rutina, kvercetina, derivata kvercetina 1, derivata kvercetina 2, malvidin-3-glukozida i derivata malvidin-3-glukozida. Antioksidacijska aktivnost određena je u uzorcima upotrebom spektrofotometrijskih metoda: DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC. Boja vina određena je u CIELab sustavu. Rezultati su prikazani u **Tablicama 4 – 9** te **Slikama 12 – 22**.

U **Tablicama 4 i 5** prikazane su koncentracije ukupnih polifenola, ukupnih flavonoida, monomernih antocijana te udio polimerne boje u početnim uzorcima i retentatima konvencionalnog i ekološkog vina. U početnom uzorku ekološkog vina, sadržaj polifenola je bio nešto veći u odnosu na uzorak konvencionalnog vina. Nakon procesa nanofiltracije, uočeno je smanjenje koncentracije polifenola u svima uzorcima retentata. Najveći gubitci uočeni su kod nanofiltracije pri tlaku od 25 bara bez primjene hlađenja, dok su najmanji gubitci pri tlaku od 55 bara uz primjenu hlađenja, s time da su gubitci nešto manji kod uzoraka ekološkog vina. Kao i kod ukupnih polifenola i ovdje je vidljivo kako su u svim uzorcima smanjene koncentracije flavonoida nakon nanofiltracije u odnosu na početne vrijednosti za konvencionalno (1,55 g/L) i ekološko (1,64 g/L) vino. Kod uzoraka retentata konvencionalnog vina, najveće vrijednosti dobivene su pri tlakovima od 45 i 55 bara uz primjenu hlađenja (1,30 i 1,31 g/L), dok su najmanje vrijednosti pri tlakovima od 25 i 35 bara s primjenom i bez primjene hlađenja. Kod uzoraka retentata ekološkog vina, najveća retencija zabilježena je kod tlakova od 45 i 55 bara uz hlađenje (1,50 i 1,48 g/L), dok je najmanja retencija pri tlaku od 25 bara bez hlađenja i iznosi 1,15 g/L. Početna vrijednost polimerne boje za uzorak konvencionalnog vina iznosila je 61,50 %, dok je za ekološko vino

iznosila 68,62 %. Može se uočiti kako nema značajnijih promjena vrijednosti nakon procesa nanofiltracije u odnosu na početne uzorke. Međutim, vidljiv je blagi porast vrijednosti polimerne boje pri procesu nanofiltracije bez upotrebe hlađenja bez obzira na upotrijebljeni tlak. Početna koncentracija monomernih antocijana kod uzorka konvencionalnog vina bila je veća u odnosu na uzorak ekološkog vina i iznosila je 151,41 mg/L, dok je za ekološko iznosila 103,83 mg/L. Nakon provedenog procesa nanofiltracije, vrijednosti antocijana su se u svim uzorcima smanjile. Međutim, porastom tlaka retencija se povećavala. Više temperature (bez primjene hlađenja) i niži tlakovi rezultirali su značajnijim gubitcima antocijana kod obje vrste vina, iako su gubitci kod konvencionalnog vina znatno veći nego kod ekološkog.

Antioksidacijska aktivnost određena je primjenom četiri različite metode (DPPH, ABTS, FRAP i CUPRAC) pri različitim transmembranskim tlakovima i temperaturama u uzorcima konvencionalnog i ekološkog vina i njihovim retentatima. DPPH i ABTS metode temelje se na redukciji radikala antioksidansom pri čemu dolazi do smanjenja intenziteta boje, dok se FRAP i CUPRAC temelje na povećanju udjela antioksidansa i tada dolazi do povećanja intenziteta boje. Ove metode razlikuju se prema načinu određivanja antioksidacijske aktivnosti i uvjetima reakcija. Preporuča se upotreba više metoda kako bi se dobio potpuni prikaz antioksidacijskog kapaciteta vina (Büyüktuncel i sur., 2014).

Antioksidacijska aktivnost prikazana je u **Tablicama 6 i 7**. Nakon provedenog procesa nanofiltracije, uočeno je smanjenje svih vrijednosti antioksidacijske aktivnosti u usporedbi s početnim vrijednostima uzoraka konvencionalnog i ekološkog vina. DPPH metodom izmjerena je najveća antioksidacijska aktivnost pri tlaku od 55 bara uz hlađenje (9,87 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ za konvencionalno i 11,15 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ za ekološko vino), dok je najmanja vrijednost izmjerena pri tlaku od 25 bara bez primjene hlađenja (3,01 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ za konvencionalno i 5,77 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ za ekološko vino). Najmanja vrijednost antioksidacijske aktivnosti određene ABTS metodom za konvencionalno vino dobivena je pri tlaku od 25 bara bez primjene hlađenja i iznosila je 16,43 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$. Za ekološko vino najmanja vrijednost iznosila je 24,14 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ i izmjerena je pri tlaku od 35 bara s hlađenjem. Najveća izmjerena vrijednost iznosila je 25,77 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ za konvencionalno vino pri tlaku od 55 bara s hlađenjem, dok je za ekološko vino iznosila 31,58 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ i izmjerena je pri tlaku od 55 bara bez hlađenja. Slične najveće vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene FRAP metodom izmjerene su pri tlaku od 55 bara primjenom hlađenja i bez primjene

hlađenja za obje vrste vina. Za konvencionalno vino antioksidacijska aktivnost iznosila je 2,62 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ primjenom hlađenja, a za ekološko vino 2,66 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ bez primjene hlađenja. Najmanje vrijednosti dobivene su pri tlaku od 25 bara bez primjene hlađenja (2,09 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ za konvencionalno i 1,96 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ za ekološko vino). Izrazito manje vrijednosti antioksidacijske aktivnosti određene CUPRAC metodom izmjerene su u retentatima nakon procesa koncentriranja bez primjene hlađenja pri tlaku od 25 bara (116,44 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ za konvencionalno i 101,44 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ za ekološko vino). Najveće vrijednosti izmjerene su primjenom hlađenja pri tlaku od 55 bara i iznosile su 158,23 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ za retentat konvencionalnog vina i 149,84 $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ za ekološko vino.

Parametri boje (L^* , a^* , b^* , C^* , $^{\circ}h$ i ΔE^*) za početne uzorke konvencionalnog i ekološkog vina te za njihove retentate prikazani su u **Tablicama 8 i 9**. Početne vrijednosti za L^* u oba uzorka početnog vina iznosile su 19,70. Uočeno je blago povećanje vrijednosti u svim uzorcima retentata bez obzira na uvjete provedbe procesa nanofiltracije. U uzorcima retentata ekološkog vina, izmjerene su malo veće vrijednosti u usporedbi s uzorcima retentata konvencionalnog vina. Procesom nanofiltracije bez hlađenja, uočen je blagi pad vrijednosti za a^* u usporedbi s početnim vrijednostima uzoraka (1,98 za konvencionalno i 2,15 za ekološko vino). Početna vrijednost za b^* u uzorku konvencionalnog vina iznosila je 1,14, dok je za uzorak ekološkog vina iznosila 1,07. Provedenim procesom nanofiltracije nije uočena značajna promjena vrijednosti retentata u odnosu na početne vrijednosti uzoraka vina. Početna vrijednost uzorka konvencionalnog vina za $^{\circ}h$ iznosila je 35,80, dok je za ekološko vino iznosila 33,54. U svim uzorcima retentata izmjerena je manja vrijednost za $^{\circ}h$ nakon provedene nanofiltracije. Međutim, pri tlakovima od 45 i 55 bara s hlađenjem, izmjerene su nešto više vrijednosti u usporedbi s ostalim vrijednostima retentata za konvencionalno vino. Kod retentata ekološkog vina, najveća vrijednost je izmjerena pri tlaku od 25 bara bez hlađenja (32,06). Najmanja vrijednost izmjerena je za retentat ekološkog vina pri tlaku od 55 bara s hlađenjem (23,92) koja je ujedno znatno manja od početne. Početne vrijednosti C^* za uzorke iznosile su 1,94 (konvencionalno vino) i 1,58 (ekološko vino). Nakon provedene nanofiltracije, uočen je porast vrijednosti u svim uzorcima retentata. Najveće vrijednosti izmjerene su bez uporabe hlađenja pri tlakovima od 45 i 55 bara za retentate konvencionalnog vina (2,42), dok su za retentate ekološkog vina izmjerene najveće vrijednosti pri tlakovima od 45 i 55 bara s hlađenjem (2,56). Za ΔE^* dobivene su malo veće

vrijednosti u retentatima ekološkog vina nego u retentatima konvencionalnog vina. Pri tlakovima od 25, 35 i 45 bara uz primjenu hlađenja, dobivene su neznatno manje vrijednosti u usporedbi s ostalim retentatima.

Na **Slikama 12 – 22** su prikazani udjeli galne, kava i kaftarne kiseline te udjeli (+)-katehina, (-)-epikatehina, rutina, kvercetina, derivata kvercetina 1, derivata kvercetina 2, malvidin-3-glukozida i derivata malvidin-3-glukozida određeni HPLC metodom.

Slika 12 prikazuje koncentracije galne kiseline dobivene nanofiltracijom uzoraka konvencionalnog i ekološkog vina. Početne vrijednosti iznosile su 42,22 mg/L (konvencionalno vino) i 43,95 mg/L (ekološko vino). U svim uzorcima retentata zabilježen je pad vrijednosti. Najveće vrijednosti retencije zabilježene su pri tlaku od 55 bara uz hlađenje u oba uzorka (32,16 i 30,00 mg/L). Najmanje vrijednosti zabilježene su u procesu bez hlađenja pri tlaku od 25 bara (20,68 i 23,59 mg/L). U procesima bez hlađenja, veće vrijednosti galne kiseline zabilježene su kod retentata ekološkog vina.

Početne koncentracije kava kiseline (**Slika 13**) iznosile su 2,71 mg/L za konvencionalno vino i 2,10 mg/L za ekološko vino. Nakon provedenog procesa nanofiltracije, uočeno je smanjenje koncentracije u svim uzorcima retentata. Najveća retencija zabilježena je u uzorku retentata konvencionalnog vina pri tlaku od 55 bara s hlađenjem (2,15 mg/L), dok je najveći pad vrijednosti zabilježen u uzorku retentata ekološkog vina pri tlaku od 25 bara bez hlađenja (1,25 mg/L).

Vrijednosti koncentracije kaftarne kiseline u uzorcima početnih vina i retentatima konvencionalnog i ekološkog vina prikazane su na **Slici 14**. Mogu se uočiti značajne razlike u koncentracijama u početnim uzorcima vina (11,18 mg/L konvencionalno vino i 4,05 mg/L ekološko vino). Provedbom procesa nanofiltracije, došlo je do smanjenja koncentracije u svim uzorcima retentata vina. Najveća retencija zabilježena je primjenom hlađenja pri tlaku od 55 bara (10,96 mg/L), dok je najmanja retencija pri tlaku od 25 bara bez hlađenja (7,46 mg/L) u uzorku retentata konvencionalnog vina. Kod retentata ekološkog vina, najveća retencija je pri tlaku od 45 bara s hlađenjem (3,63 mg/L), dok je najmanja pri tlaku od 25 bara bez hlađenja (3,18 mg/L). U retentatima ekološkog vina, nema značajnih razlika u vrijednostima koncentracije pri različitim tlakovima i temperaturama.

U početnom uzorku konvencionalnog vina, koncentracija (+)-katehina (**Slika 15**) iznosila je 88,71 mg/L, dok je u uzorku ekološkog vina iznosila 42,18 mg/L. Ovdje se mogu uočiti značajne razlike u koncentracijama između početnih uzoraka vina. Nakon procesa nanofiltracije, došlo je do smanjenja koncentracije (+)-katehina u svim uzorcima retentata. Najveće koncentracije zabilježene su pri tlaku od 55 bara uz primjenu hlađenja (79,33 i 36,65 mg/L), dok su najmanje vrijednosti zabilježene pri tlaku od 25 bara bez hlađenja (45,35 i 28,47 mg/L). Porastom tlaka uz primjenu hlađenja, povećava se i retencija u obje vrste retentata.

Slika 16 prikazuje koncentracije (-)-epikatehina. U početnom uzorku konvencionalnog vina, koncentracija je iznosila 34,63 mg/L, dok je u uzorku ekološkog vina iznosila 69,8 mg/L. Ovdje je vidljiva značajno veća koncentracija (-)-epikatehina u uzorku ekološkog vina u usporedbi s konvencionalnim vinom. Najmanja vrijednost zabilježena je pri tlaku od 25 bara bez hlađenja (26,03 i 46,12 mg/L) kod obje vrste vina. Najveća koncentracija zabilježena je pri tlaku od 55 bara s hlađenjem (36,65 i 53,26 mg/L). Povećanjem tlaka povećava se i retencija kod retentata obje vrste vina i s hlađenjem i bez hlađenja.

Koncentracije rutina prikazane su na **Slici 17**. Početne vrijednosti koncentracije iznosile su 0,95 mg/L za uzorak konvencionalnog vina i 1,59 mg/L za uzorak ekološkog vina. Nakon provedenog procesa nanofiltracije, uočen je porast koncentracije u retentatima konvencionalnog vina, osim pri 25 bara bez primjene hlađenja gdje je uočen pad koncentracije. U svim uzorcima retentata ekološkog vina uočen je pad koncentracije. Najveći porast koncentracije dobiven je pri tlaku od 55 bara s hlađenjem u retentatu konvencionalnog vina (1,30 mg/L). Kod ekološkog vina, najveća retencija zabilježena je pri tlaku od 45 bara bez hlađenja (1,34 mg/L). U retentatima ekološkog vina nema značajnih razlika u koncentraciji rutina s obzirom na primijenjeni tlak i temperaturu.

Početne koncentracije kvercetina (**Slika 18**) iznosile su 1,18 mg/L za uzorak konvencionalnog vina i 3,57 mg/L za uzorak ekološkog vina. Nakon provedbe procesa nanofiltracije, može se uočiti kako je u uzorcima retentata ekološkog vina došlo do gubitka kvercetina, a u uzorcima konvencionalnog vina do smanjenja koncentracije. Najveća retencija kod retentata konvencionalnog vina zabilježena je pri tlaku od 55 bara uz hlađenje (0,25 mg/L), dok je najmanja retencija pri tlaku od 25 bara bez hlađenja (0,08 mg/L).

U početnom uzorku konvencionalnog vina, koncentracija derivata kvercetina 1 (**Slika 19**) iznosila je 2,02 mg/L, a u uzorku ekološkog vina 1,43 mg/L. Procesom nanofiltracije, došlo je do smanjenja koncentracije u svim uzorcima retentata. Najveća koncentracija u uzorku retentata konvencionalnog vina iznosila je 1,39 mg/L pri 55 bara uz hlađenje, dok je u uzorku retentata ekološkog vina iznosila 0,91 mg/L pri 45 bara bez primjene hlađenja. Najmanja retencija dobivena je pri 25 bara s primjenom i bez primjene hlađenja (0,77 i 0,70 mg/L).

Slika 20 prikazuje koncentracije derivata kvercetina 2. U početnom uzorku konvencionalnog vina, koncentracija je iznosila 1,11 mg/L, dok je u uzorku ekološkog vina iznosila 1,20 mg/L. Nakon provedene nanofiltracije, uočeno je smanjenje koncentracije u svim uzorcima retentata. Kod retentata konvencionalnog vina, najveća je retencija pri 55 bara uz hlađenje (1,05 mg/L), a kod retentata ekološkog vina, najveća je retencija pri 45 bara bez hlađenja (1,02 mg/L). U retentatima ekološkog vina nema značajne razlike u koncentracijama derivata kvercetina 2 bez obzira na primijenjenu temperaturu i tlak.

Vrijednosti koncentracije malvidin-3-glukozida u uzorcima početnih vina i njihovim retentatima prikazane su na **Slici 21**. Mogu se uočiti značajne razlike koncentracije u početnim uzorcima vina (38,57 mg/L konvencionalno vino i 16,12 mg/L ekološko vino). Nanofiltracijom došlo je do smanjenja koncentracije spoja u svim uzorcima retentata bez obzira na primijenjeni tlak i temperaturu. U retentatima konvencionalnog vina, najveća retencija zabilježena je kod tlaka od 55 bara uz hlađenje, dok je najmanja kod tlaka od 25 bara bez hlađenja. Kod retentata ekološkog vina, najveća retencija zabilježena je na 45 bara bez hlađenja, a najmanja na 45 bara s hlađenjem. Povećanjem tlaka bez hlađenja, dolazi do povećanja koncentracije malvidin-3-glukozida kod retentata ekološkog vina.

Koncentracije derivata malvidin-3-glukozida prikazane su na **Slici 22**. Početne koncentracije iznosile su 8,27 mg/L za uzorak konvencionalnog vina i 3,07 mg/L za uzorak ekološkog vina. U svim uzorcima retentata zabilježen je pad vrijednosti. U retentatima ekološkog vina, najveća je retencija zabilježena pri tlakovima od 45 i 55 bara bez hlađenja (2,01 mg/L), dok je najmanja pri tlakovima od 35 bara s hlađenjem i 25 bara bez hlađenja (1,82 mg/L). Kod retentata konvencionalnog vina, najveća je retencija na 55 bara s hlađenjem (7,51 mg/L), a najmanja je na 25 bara bez hlađenja.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Primjena visokog tlaka (55 bara) uz hlađenje pogodovala je većem zadržavanju ukupnih polifenola i flavonoida te monomernih antocijana, dok je primjena tlaka od 25 bara bez hlađenja rezultirala znatno manjom retencijom ovih spojeva.
2. Povećanje temperature (bez primjene hlađenja) dovelo je do blagog porasta udjela polimerne boje bez obzira na upotrijebljeni tlak, što može rezultirati degradacijom osjetljivih sastojaka vina kao što su antocijani.
3. Antioksidacijska aktivnost u uzorcima retentata konvencionalnog i ekološkog vina smanjena je u svim uzorcima u usporedbi s početnim vrijednostima uzoraka vina. Međutim, povećanje radnog tlaka i smanjenje temperature rezultiralo je većim zadržavanjem antioksidacijske aktivnosti u obje vrste vina.
4. Za ΔE^* dobivene su malo veće vrijednosti u retentatima ekološkog vina u usporedbi s retentatima konvencionalnog vina. Povećanje temperature i tlaka rezultiralo je neznatno većim vrijednostima za ΔE^* .
5. Retencija pojedinih polifenolnih spojeva ovisila je o primijenjenom tlaku, temperaturi te vrsti vina.
6. Proces nanofiltracije različito je utjecao na konvencionalno i ekološko vino te su pri jednakim temperaturama i tlakovima dobivene različite retencije za pojedine polifenolne spojeve.

7. LITERATURA

- Alpeza I: Temelji kemijskog sastava vina. *Stručni rad. Glasnik zaštite bilja* 6, Zagreb, 2008.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K: Methods for testing antioxidant activity. *The Analyst* 127:183-198, 2002.
- Apak R, Gorstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek, Güçlü: Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 85(5):957-998, 2013.
- Benzie IFF i Strain JJ: Ferric Reducing/Antioxidant Power assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration. *Methods in Enzymology* 299:15–27, 1999.
- Brand-Williams, Cuvelier ME, Berset C: Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT - Food Science and Technology* 28(1):25-30, 1995.
- 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.
- Conidi C, Catro-Muñoz, Cassano A: Membrane-Based Operations in the Fruit Juice Processing Industry: A Review. *Beverages* 6:18, 2020.
- Dong JW, Cai L, Xing Y, Yu J, Ding ZT: Re-evaluation of ABTS•⁺ Assay for Total Antioxidant Capacity of Natural Products. *Natural Product Communications* 10(12):2169-2172, 2015.
- 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.
- Herceg Z: *Procesi konzerviranja hrane: novi postupci*. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2009.
- Herceg Z: *Procesi u prehrambenoj industriji*. Plejada, Zagreb, 2011.
- Ivić I: Reverzna osmoza i nanofiltracija: utjecaj koncentriranja na bioaktivne komponente i arome crnog vina Cabernet Sauvignon. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2022.
- Jackson RS: *Wine science, Principles and applications*, Academic Press, Elsevier Inc., USA, 2008.
- Jackson RS: *Wine Tasting: A Professional Handbook*. Academic Press, Elsevier Inc., USA, 2009.
- Jakobek L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.

- Jakobek L, Drenjačević M, Jukić V, Šeruga M: Phenolic acids, flavonols, anthocyanins and antiradical activity of “Nero”, “Viking”, “Galinka” and wild chokeberries. *Scientia Horticulturae* 147: 56-63, 2012
- Kim DO, Jeong SW i Lee CY: Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry* 81:321–326, 2003.
- Kopjar M: Utjecaj dodataka trehaloze na kvalitetu paste od jagoda. *Doktorski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Krstulović A: *Vina Hrvatske*. Profil, Zagreb, 2008.
- Law J: *Od vinograda do vina*. Veble commerce, Zagreb, 2006.
- Lovrić L: *Procesi u prehrambenoj industriji*. Hinus, Zagreb, 2003.
- Ly BCK, Dyer EB, Feig JL, Chien AL i Del Bino S: Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. *Journal of Investigative Dermatology* 140(1):3-12.e1, 2020.
- Maletić E, Karoglan Kontić J, Pejić I: *Vinova loza: amelografija, ekologija, oplemenjivanje*. Školska knjiga, Zagreb, 2008.
- Marić B: Utjecaj koncentriranja membranskim procesom nanofiltracije na tvari boje vina Cabernet Sauvignon. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2020.
- Mijatović I, Matošić M: *Tehnologija vode*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2020.
- Mirošević N, Karoglan Kontić J: *Vinogradarstvo*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, 2008.
- Mirošević N: *Atlas hrvatskog vinogradarstva i vinarstva*. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2009.
- Moreno J, Peinado R: *Enological chemistry*. Academic Press, Elsevier Inc., USA, 2012.
- Mulder M: *Basic principles of membrane technology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, 1996.
- Munteanu IG, Apetrei C: Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 22:3380, 2021.
- Narodne Novine: *Pravilnik o ekološkoj poljoprivrednoj proizvodnji*. NN 19/16, 2016.
- Narodne Novine: *Zakon o vinu*. NN 32/19, 2019.
- Osada Y, Nakagawa T: *Membrane Science and Technology*. Marcel Dekker Inc., New York, 1992.

- Ough CS, Amerine MA: Phenolic compounds. In *Methods for Analysis of Musts and Wines*. John Wiley & Sons, New York, 196–221, 1988.
- Özyürek M, Güçlü K, Tütem E, Bakan KS, Erçağ E, Esin Çelik S, Baki S, Yıldız L, Karaman Ş i Apak R: A Comprehensive Review of CUPRAC Methodology. *Analytical Methods* 3:2439–2453, 2011.
- Penavin K: *Vino a – ž. Naklada Zadro*, Zagreb, 2004.
- Pichler A: Tehnologija vina. *Nastavni materijali*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2016.
- Popović K: Utjecaj koncentriranja membranskim procesima na tvari boje i arome soka od aronije. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2019.
- Pozderović A, Pichler A, Paragović K, Moslavac T: Utjecaj membranske filtracije na aromu i kemijski sastav vina sorte graševina. *Znanstveni rad. Glasnik zaštite bilja* 5, 2010.
- Rastija V, Medić-Šarić M: Kromatografske analize polifenola u vinima. *Kemija u industriji* 58: 121-128, 2009.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M i Rice-Evans C: Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26:1231–1237, 1999.
- Roginsky V, Lissi E: Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry* 92: 235-254, 2005.
- Shalaby EA, Shanab SMM: Antioxidant compounds, assays of determination and mode of action. *African Journals of Pharmacy and Pharmacology* 7(10):528-539, 2013.
- Simon J: *Velika knjiga o vinu*. Profil, Zagreb, 2004.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ: *Osnove analitičke kemije*. Prvo izdanje. Školska knjiga, Zagreb, 1999.
- Web 1: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/HR/TXT/PDF/?uri=CELEX:02013R1308-20201229&from=EN> [16.7.2021.]
- Web 2: <https://www.oiv.int/public/medias/2478/oiv-ma-as2-11.pdf> [10.9.2021.]
- Web 3: <http://www.ptfos.hr/images/dokumenti/katalog-opreme-ptf-2021-01.pdf> [30.8.2021.]
- Web 4: http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=Datoteka:Cabernet_sauvignon.jpg [2.10.2021.]
- Wrolstad RE, Durst RW, Lee J: Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends in Food Science and Technology*, 16: 423-428, 2005.

Zhou F, Wang C, Wei J: Separation of acetic acid from monosaccharides by NF and RO membranes: Performance comparison. *Journal of Membrane Science*, 429: 243–251, 2013.