

Utjecaj temperature na polifenolni sastav i aromu tijekom burne fermentacije vina Cabernet sauvignon

Vinković, Leonardo

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:109:554856>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-19**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



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

Leonardo Vinković

**UTJECAJ TEMPERATURE NA POLIFENOLNI SASTAV I AROMU
TIJEKOM BURNE FERMENTACIJE 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 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij prehrambeno inženjerstvo**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Tehnologija vina**Tema rada** je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2021./2022. održanoj 28. travnja 2022.**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Anita Pichler***Pomoć pri izradi:** dr.sc. *Ivana Ivić***Utjecaj temperature na polifenolni sastav i aromu tijekom burne fermentacije vina Cabernet Sauvignon***Leonardo Vinković, 0113144038*

Sažetak: U ovom radu određivani su spojevi arome, polifenolni sastav i antioksidacijska aktivnost vina sorte crnog grožđa cabernet sauvignon iz konvencionalnog uzgoja. Za analizu su uzeti uzorci tijekom procesa fermentacije sa hlađenjem, kod kojeg je konstantna temperatura od 15°C, i uzorci tijekom procesa fermentacije bez hlađenja kod kojeg se temperatura mijenja ovisno o vremenu. Cilj je bio usporediti rezultate za pojedine spojeve i antioksidacijsku aktivnost između procesa fermentacije sa hlađenjem i bez hlađenja. Također su i vidljivi rezultati u koncentracijama tijekom svakog od procesa, i to na početku fermentacije, nakon 5 dana, nakon 10 dana te na kraju fermentacije. Kvantitativni udio tvari arome određen je pomoću plinske kromatografije (GC) uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME). Uređaj koji se koristio tijekom analize je bio plinski kromatograf tvrtke Agilent 7890B s amseno-selektivnim detektorom Agilent 5977A. Polifenolni sastav i antioksidacijska aktivnost određivane su pomoću spektrofotometra, uz primjenu DPPH reagensa (antioksidacijska aktivnost).

Ključne riječi: *aroma, polifenoli, antioksidacijska aktivnost, fermentacija, Cabernet Sauvignon***Rad sadrži:** 45 stranica
7 slika
3 tablica
0 priloga
28 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: 29. rujna, 2022.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

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

Graduate program Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Wine Tehnology

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII. held on April 28, 2022.

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

Technical assistance: *Ivana Ivić*, PhD

The Influence of Temperature on Polyphenolic Composition and Aroma During Primary Fermentation of Cabernet Sauvignon Wine

Leonardo Vinković, 0113144038

Summary: In this work, the aroma compounds, polyphenolic composition and antioxidant activity from wine of the black grape variety Cabernet Sauvignon from conventional cultivation were determined. For analysis, samples were taken during the fermentation process with cooling, where the temperature was constant at 15°C, and samples during the fermentation process without cooling, where the temperature changed depending on the time of the process. The aim was to compare the results for individual compounds and antioxidant activity between fermentation processes with and without cooling. There were also visible results in concentrations during each of the processes, namely at the beginning of fermentation, after 5 days, after 10 days and at the end of fermentation. The quantitative proportion of aroma substances was determined using gas chromatography (GC) with solid phase microextraction (SPME). The device used during the analysis was an Agilent 7890B gas chromatograph with an Agilent 5977A mass-selective detector. Polyphenol composition and antioxidant activity were determined using a spectrophotometer, with the use of DPPH reagent for the antioxidant activity.

Key words: *aroma, polyphenols, antioxidant activity, fermentation, Cabernet Sauvignon*

Thesis contains: 45 pages
7 figures
3 tables
0 supplements
28 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 29, 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 izdvojenom vremenu, pomoći i stručnim savjetima prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvalan sam članovima svoje obitelji i prijateljima, koji su tijekom cijelog mog studija bili velika podrška i dali su svoj značaj na ovom putu!

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	5
2.1. VINOVA LOZA I PROIZVODNJA CRNIH VINA	6
2.1.1. Morfologija vinove loze	6
2.1.2. Konvencionalni uzgoj vinove loze i proizvodnja vina	8
2.2. CABERNET SAUVIGNON	9
2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA	10
2.3.1. Alkoholi	10
2.3.2. Kiseline	10
2.3.3. Esteri	11
2.3.4. Aldehidi i ketoni	11
2.3.5. Terpeni	12
2.3.6. Polifenolni spojevi	13
2.3.7. Antioksidacijska aktivnost	15
2.3.8. Aroma vina	16
2.4. KROMATOGRAFSKE METODE	17
2.4.1. Plinska kromatografija (GC)	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	21
3.1. ZADATAK	22
3.2. MATERIJALI	22
3.2.1. Crno vino Cabernet Sauvignon	22
3.2.2. Kemikalije	22
3.3. METODE	22
3.3.1. Određivanje aromatskog profila	22
3.3.2. Određivanje ukupnih polifenola	24
3.3.3. Određivanje ukupnih flavonoida	24
3.3.4. Određivanje monomernih antocijana	24
3.3.5. Određivanje polimerne boje	25
3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	26
4. REZULTATI	27
4.1. TABLIČNI PRIKAZ ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA	28
4.2. GRAFIČKI PRIKAZ ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA	33
5. RASPRAVA	35
5.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA KONCENTRACIJU TVARI AROME	36
5.2. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA KONCENTRACIJU POLIFENOLA, ANTOCIJANA I FLAVONOIDA	38
5.3. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA POLIMERNU BOJU VINA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST	39
6. ZAKLJUČCI	41
7. LITERATURA	43

1. UVOD

Vino, poznato još od davnina kao alkoholno piće, je zapravo poljoprivredno - prehrambeni proizvod dobiven potpunim ili djelomičnim alkoholnim vrenjem masulja ili mošta, od svježeg i za preradu pogodnog grožđa, prema Zakonu o vinu (NN 32/19). Uz vodu i alkohole kao najzastupljenije sastojke vina, prisutni su još i šećeri, kiseline, ostali hlapljivi spojevi, a etanol, kao produkt alkoholne fermentacije, najzastupljeniji je alkohol u vinu, dajući vinu specifična organoleptička svojstva (Ivić, 2022).

Za same potrošače bitna su određena senzorska svojstva vina, kao što su aroma i boja, koji su također i parametri kvalitete vina, a na njih utječu upravo spomenuti hlapivi, ali i nehlapivi spojevi u vinu. Na kvalitetu vina ne utječu samo skladištenje i proizvodnja vina, nego i procesi prerade, i sam uzgoj vinove loze iz koje će se kasnije proizvoditi određeno vino. Kroz razne biokemijske, fizikalne, kemijske i mikrobiološke procese tijekom rasta i razvoja vinove loze i prerade u vino događaju se promjene u vidu boje i arome, spojeva koji na njih utječu (Ivić, 2022). Tijekom tih procesa nastaju i fenolni spojevi odgovorni za, po ljudsko zdravlje, pozitivna antioksidativna svojstva i daju trpkost vinu, a najučestaliji predstavnici su antocijani, fenolne kiseline i flavonoidi. Njihov udio uvelike ovisi o sorti vina, načinu proizvodnje i prerade, a više su zastupljeni u crnim vinima, porijeklom iz kožice, peteljke i sjemenke (Garrido i Borges, 2013).

Sorta crnog grožđa cabernet sauvignon, nastala kao križanac sorti sauvignon blanca i cabernet franca, rasprostranjena je po cijelome svijetu, jako je otporna sorta, a vino dobiveno od te sorte grožđa je bogato šećerom, kiselinama, alkoholima i tvarima arome.

Fermentacija je najvažniji proces u proizvodnji vina, tijekom kojeg se šećer iz grožđa pod utjecajem kvasaca roda *Saccharomyces cerevisiae* i djelovanjem enzima pretvara u alkohol etanol i CO₂ kao glavne produkte procesa. Specifično za crna vina, provodi se fermentacija masulja dobivenog muljanjem grožđa zajedno sa čvrstim dijelovima bobice. Specifično za proizvodnju crnih vina je i postupak maceracije koji je važan za dobivanje boje, a riječ je o ekstrakciji fenolnih spojeva iz kožice poput tanina i antocijana, koji su značajni i za aromu vina (Ivić i sur, 2021a).

Polifenolni spojevi su jedna od najraširenijih skupina spojeva općenito u biljkama, pa tako i u grožđu. Proizvodi su sekundarnog metabolizma biljaka i nisu esencijalni za ljude. Najveća skupina ovih spojeva su flavonoidi, sa preko 5000 do sad poznatih spojeva, a najvažnije podskupine su antocijani, flavonoli i flavan-3-oli. Prisutne su još i fenolne kiseline. Polifenoli

su uvelike zaslužni za organoleptička svojstva vina, kao što su boja, miris i trpak okus. Ono što je iznimno važno za ove spojeve, pogotovo za flavonoide, je njihova antioksidacijska aktivnost, odnosno sposobnost inhibiranja ili odgađanja oksidacije nekog supstrata i to neutralizacijom slobodnih radikala dajući im svoj elektron te tako inhibiraju njihov razvoj. To je posebno značajno u ljudskom organizmu, jer antioksidansi mogu spriječiti rizik od nekih bolesti krvožilnog sustava (Jakobek, 2007).

Cilj ovog rada je bio ispitati utjecaj temperature tijekom burne fermentacije na polifenole i aromu vina Cabernet Sauvignon. U tu svrhu postavljen je pokus s dvije fermentacijske posude pri čemu se u jednoj provodilo hlađenje tijekom alkoholne fermentacije vina Cabernet Sauvignon, dok se u drugoj nije provodilo. Na početku, tijekom te po završetku fermentacije uzeti su uzorci vina Cabernet Sauvignon u kojima se određivao polifenolni sastav i aroma.

2. TEORIJSKI DIO

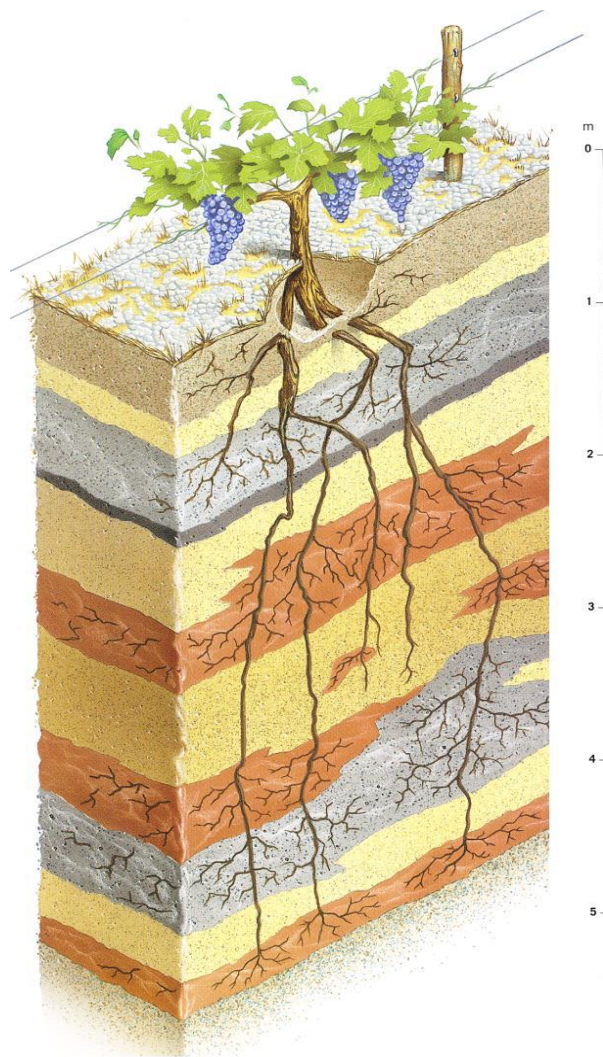
2.1. VINOVA LOZA I PROIZVODNJA CRNIH VINA

Vinova loza pripada porodici *Vitaceae*, a sorte iz roda *Vitis*, vrste *Vitis vinifera* koriste se za proizvodnju vina prema Zakonu o vinu (NN 32/19). Vrsta *Vitis Vinifera* spada u podrod *Euvitis* i jedina je prisutna euroazijska vrsta (Ivić, 2022). Često se križa s drugim vrstama roda *Vitis*, posebno sa sjevernoameričkim zbog njihove otpornosti na filokseru i niske temperature, pa se kao takve koriste kao podloga za euroazijske sorte.

2.1.1. Morfologija vinove loze

Vinova loza je kao biljka grmolika, drvenasta, listopadna, jednogodišnja, s viticama, a svaka biljka zasebno se naziva trs. Trs sadrži nadzemni dio (stablo s ograncima, listovi, vitice, cvjetovi, grozdovi) i podzemni dio, korijen (**Slika 1**). Svaki trs sadrži vegetativne organe za opskrbu vodom i hranjivim tvarima, a to su stablo, mladice i listovi i generativne za razmnožavanje, kao što su cvjetovi, cvatovi, grozdovi (Blesić i sur., 2013). Korijen, kao glavni dobavljač vode i skladište za nutrijente poput ugljikohidrata, može doseći i do 30 m duboko u tlo (Maletić i sur., 2008).

Stablo, kao glavni nadzemni dio, može dostići širinu do 10 cm i visinu od 40 do 150 cm, ovisno o sorti (Mirošević, 1996). Može se razviti vegetativno, i to iz zimskih pupova. Iz pupova se razvijaju i mladice, koje mogu biti rodne i nerodne, a rodne su one iz kojih se razvijaju grozdovi. Sami pupovi mogu biti ljetni (zaperci), zimski (pravi) i spavajući (pričuvni), s time da su zimski pupovi oni koji su rodni, a ostali, kao što i njihov naziv kaže, su pričuvni u slučaju iznimnih uvjeta kao što je nedostatak hranjiva (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008). Listovi vinove loze su specifični za svaku sortu te se po tome mogu prepoznavati različite sorte. Sadrže lice i naličje s dlačicama, koje drže peteljka i plojka te se s obzirom na duljinu plojke dijele na male listove (od 10 do 12 cm), srednje (17 do 20 cm) i velike (duže od 20 cm) listove (Maletić i sur., 2008).



Slika 1 Podzemni i nadzemni dijelovi vinove loze (Blesić i sur., 2013)

Grozdovi se razvijaju iz cvatova na mladici (najviše do pet cvatova na mladici) koji obično sadrže od 100 do 1500 cvjetova, ovisno o sorti (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008). Vitice služe za pričvršćivanje i penjanje biljke za neki potporanj oko kojeg se one uvijaju. Grozdovi su kao i listovi specifični za svaku sortu, a sastoje se od peteljke i bobica koje se na njoj drže. Postoje razni oblici grozdova, veličine, zbijenosti. Peteljka je značajna za randman kod proizvodnje vina, što joj je veći udio (koji može biti i do 8%) to je manji randman i obratno (Moreno i Peinado, 2012). Bogata je taninima koji daju trpkost vinu, posebno crnim vinima. Bobice daju grozdovima specifičnost za svaku vrtu. Sastoje se od kožice i sjemenke, koje su također bogate polifenolima, i mesa u kojem se nalazi groždani sok koji je najznačajniji dio za proizvodnju vina. Na masu bobice u njezinoj punoj zrelosti udio mesa doseže od 75 do 85% (Mirošević i Karoglan Kontić, 2008).

2.1.2. Konvencionalni uzgoj vinove loze i proizvodnja vina

Proizvodnja vina započinje branjem grožđa i to kad grožđe dosegne svoju tehnološku zrelost, odnosno kad je omjer šećera i kiselina najpovoljniji za upotrebu, ovisno o sorti. Nakon branja slijedi postupak muljanja – runjenja koji za svrhu ima oslobađanje grožđanog soka iz bobice, ali i odvajanje taninima bogate peteljke, pri čemu se dobije masulj. Masulj je smjesa grožđanog soka i čvrstih dijelova bobice, odnosno kože, sjemenke i mesa. Dobiveni masulj se sumpori pomoću kalijevog metabisulfitu ($K_2S_2O_7$) u zavisnosti o zrelosti grožđa, vremenu berbe, temperaturi mošta, i to sve kako bi se spriječio utjecaj štetnih mikroorganizama i usporavanja oksidacijskih procesa, te zbog pročišćavanja masulja od nečistoća koje se talože u njemu (Grainger i Tattersall, 2005; Tomas i Kolovrat, 2011).

Za proizvodnju crnih vina značajnu ulogu ima postupak maceracije masulja tijekom koje se ekstrahiraju polifenolni spojevi, tvari arome i boje te mineralne tvari iz čvrstih dijelova bobice (Slika 2). Maceracija se provodi najčešće na sobnoj temperaturi od 25°C (Ivić, 2022).



Slika 2 Postupak maceracije masulja kod proizvodnje crnih vina (Tomas i Kolovrat, 2011)

Najvažniji postupak u proizvodnji vina je anaerobna alkoholna fermentacija. U procesu fermentacije bitnu ulogu igraju selekcionirani kvasci roda *Saccharomyces cerevisiae*, pa može čak i rod *Candida*, čija je glavna uloga pretvorba šećera iz mošta, odnosno glukoze u etanol, koji je i glavni produkt alkoholne fermentacije uz CO_2 (Rainieri i Pretorius, 2000). Sam proces je kataliziran enzimima koje navedeni kvasci metaboliziraju. Djelovanje kvasaca i njihovih enzima potiče i razvoj tvari arome. Bitno je također da se kontrolira temperatura fermentacije koja ne smije biti veća od 35°C da se ne bi usporio rad kvasaca, dok su temperature od 15 do 20°C pogodne za povećanje udjela alkohola i razvoj intenzivnije arome te smanjenje udjela octene kiseline (Claus, 2019; Grainger i Tattersall, 2005).

Prvi dio fermentacije je buran, pri čemu se stvara pjena na površini, nakon čega slijedi pretakanje mošta u nove, čiste posude koje se pune do kraja i zatvaraju. Nakon pretakanja slijedi tiha fermentacija, a moguća je i malolaktička fermentacija kod koje bakterije mliječno-kiselog vrenja rodova *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Pediococcus* prevode jabučnu kiselinu u mliječnu koja je puno slabija uz razvoj arome na maslac. Sprječava se sumporenjem ili hlađenjem vina (Grainger i Tattersall, 2005; Ivić 2022).

Smirenje vina označava kraj fermentacije, a na dnu posude se stvara nepoželjni talog koji se uklanja pretakanjem mladog vina i sumporenjem. Taloženje se može pospješiti utjecajem niske temperature (čak do -6°C) pri čemu se izdvajaju soli vinske kiseline tartarati. Prvi pretok vina je otvoreni, uz prisustvo zraka kako bi se uklonili neugodni mirisi, nakon čega slijedi zatvoreni pomoću kojeg se sprječava oksidacija aromatskih spojeva (Calus 2019; Ivić 2022). Mlado vino se još dodatno bistri pomoću sredstava za bistrenje poput želatine ili bentonita, a sve u svrhu uklanjanja koloidnih čestica koje su uzrok mutnoće (Ivić, 2022).

Vino odležava u drvenim bačvama ili tankovima od nehrđajućeg čelika kako bi se dobila punoća okusa i razvile poželjne tvari arome. Nakon odležavanja vino se puni u staklene boce ili tetrapak, plastične boce te bag-in-box (Ivić, 2022).

2.2. CABERNET SAUVIGNON

Jedna od najpoznatijih sorti crnih vina, Cabernet Sauvignon, potječe iz francuske pokrajine Bordeaux, prisutna je i u Primorskoj Hrvatskoj te kontinentalnim podregijama Slavonija, Moslavina, Plješivica, Prigorje, Podunavlje. Ima specifičan peterodjelan, tamnozelen, srednje veliki list, blago crvenkastu peteljku, zbijeni grozd stožastog oblika i manje bobice s crno-plavo obojenom kožicom (Mirošević i Turković, 2003). Uzgaja se podjednako dobro i na dubokim, i na plitkim i suhim tlima. Kao sorta vrlo je otporna na bolesti vinove loze kao što su peronospora, truljenje i smrzavica, ali je manje otporna na gljivične bolesti (Robinson i sur., 2012). Dozrijeva kasno, a groždani sok je jako bogat kiselinama (5-7 g/L) i šećerima (23 g/L). Vino ove sorte ima snažnu aromu na bobičasto voće i višnje te tamnu čokoladu, daje lagano trpak okus a boja je tamnocrvena do ljubičasta. Zbog visokog udjela šećera vino ima sadržaj alkohola od 12 do 13 vol.%, ukupnog ekstrakta od 18 do 26 g/L, a glicerola od 7,5 do 9,5 g/L (Zoričić, 1996).

2.3. KEMIJSKI SASTAV VINA

2.3.1. Alkoholi

Najvažniji i najzastupljeniji pripadnik iz ove skupine spojeva je etanol, dvovalentni alkohol, uz CO₂ glavni produkt alkoholne fermentacije mošta/masulja i to pretvorbom šećera, odnosno glukoze ili fruktoze. Enzim koji katalizira ovu reakciju je alkohol dehidrogenaza. Volumni postotak u vinima mu varira ovisno o sorti, klimatskim uvjetima tijekom uzgoja, načinu proizvodnje, a prema Pravilniku o proizvodnji vina (NN 2/05) minimalna količina u vinima mu mora biti 8,5 vol.%, a maksimalna može ići i do 14 vol.% pa čak i više za neka specijalna vina. Kao najzastupljeniji alkohol doprinosi organoleptičkim svojstvima vina, dajući slatkastu i voćnu aromu te pun i osvježavajući okus (Alpeza, 2008).

Drugi po zastupljenosti alkohol je glicerol, trovalentni alkohol koji poput etanola utječe na organoleptička svojstva i kvalitetu vina, dajući mu slatkoću i pun okus (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Tijekom procesa fermentacije mu je količina od 2 do 11 g/L, no kasnije tijekom odležavanja opada. Po tome se može i odrediti kraj procesa odležavanja vina, pošto je tada koncentracija glicerola najčešće manja od 1 g/L (Moreno i Peinado, 2022).

Metanol je treći najznačajniji alkohol u vinima, a produkt je hidrolize pektinskih spojeva koju katalizira enzim pektinesteraza. Pektina ima najviše u kožici bobica grožđa, zbog čega su više zastupljeni u crnim vinima čija proizvodnja uključuje maceraciju i fermentaciju masulja. Veće količine metanola su nepoželjne zbog njegove otrovnosti, pa se količina etanola u vinima kontrolira i ne bi smjela biti veća od 150 mg/L (Moreno i Peinado, 2012).

Ostali alkoholi su manje zastupljeni i imaju više od dva ugljikova atoma u svojoj strukturi. Kao sekundarni produkti alkoholne fermentacije, u vinima u manjim količinama do 400 mg/L imaju povoljan učinak za aromu, dok u većim koncentracijama stvaraju nepoželjne arome. S kiselinama u vinu daju estere također poželjne za aromu vina. Najznačajniji predstavnici su propan-1-ol, izobutilni alkohol i heksan-1-ol (Ivić, 2022).

2.3.2. Kiseline

Kiseline su jedna od glavnih komponenta vina, najzastupljenija nehlapiva kiselina je vinska kiselina, pomoću koje se izražava količina kiselina o vinu, čiji je raspon od 4 do 14 g/L prema Pravilniku o proizvodnji vina (NN 2/05). Još su prisutne i jabučna kiselina, te limunska i

jantarna. Udio kiseline opada tijekom sazrijevanja grožđa te kasnije tijekom prerade u vino, a tijekom alkoholne fermentacije nastaju i neke nove poput octene ili oksalne kao sekundarni produkti. Kiseline u reakciji s etanolom daju estere (Alpeza, 2008; Ivić, 2022).

Vinska kiselina potječe iz zelenih dijelova vinove loze, s mineralima K i Ca daje soli tartarate koji su glavni sastojak taloga nakon odležavanja vina u bačvama pod utjecajem sniženja temperature. Jantarna kiselina doprinosi gorkom okusu vina, a limunska svježi citrusni okus. I jedna i druga nastaju iz nekoliko metabolizama, kao što su degradacija glutaminske kiseline (jantarna) i Krebsov ciklus, glikoliza, metabolizam plijesni roda *Botrytis* (limunska) (Ivić, 2022).

Hlapive kiseline su one koje najviše doprinose aromi vina, sekundarni su produkti alkoholne fermentacije čiji je najznačajniji predstavnik ranije spomenuta octena kiselina. Može nastati aerobno pomoću bakterija octene kiseline roda *Acetobacter* u procesu oksidacije etanola ili anaerobno tijekom same alkoholne fermentacije. Ima velik značaj za aromu vina, ali samo pri nižim koncentracijama, ispod 0,9 g/L (Ivić, 2022). Veće koncentracije octene kiseline u vinima su indikator mikrobiološkog kvarenja vina. Ostale kiseline također doprinose ukupnoj aromi vina u nižim koncentracijama, a to su maslačna kiselina (aroma maslaca), propionska (masna nota) i masne kiseline s do 10 ugljikovih atoma (Ivić, 2022).

2.3.3. Esteri

Esteri su spojevi koji imaju najveći doprinos ukupnoj aromi vina. Nastaju kao sekundarni produkti alkoholne fermentacije zaslužni za svježiu, voćnu aromu, a pripadaju skupinama acetatnih estera viših alkohola i etil estera masnih kiselina. Razvijaju se i kasnije, tijekom dozrijevanja vina, pri čemu im koncentracija opada zbog smanjenja temperature i utjecaja kisika, ali zbog svoje lake hlapivosti i dalje održavaju prisutnu voćnu aromu (Ivić, 2022). Esteri su pogotovo zaslužni za spomenutu voćnu aromu mladih vina, a najzastupljeniji od estera je svakako etil-acetat u koncentracijama 50 – 60 mg/L no u većim količinama daje dojam ocitkavosti (Alpeza, 2008). Nakon etil-acetata, zastupljeni su još i etil-heksanoat, etil-oktanoat, fenil-acetat i drugi (Zoričić, 1996).

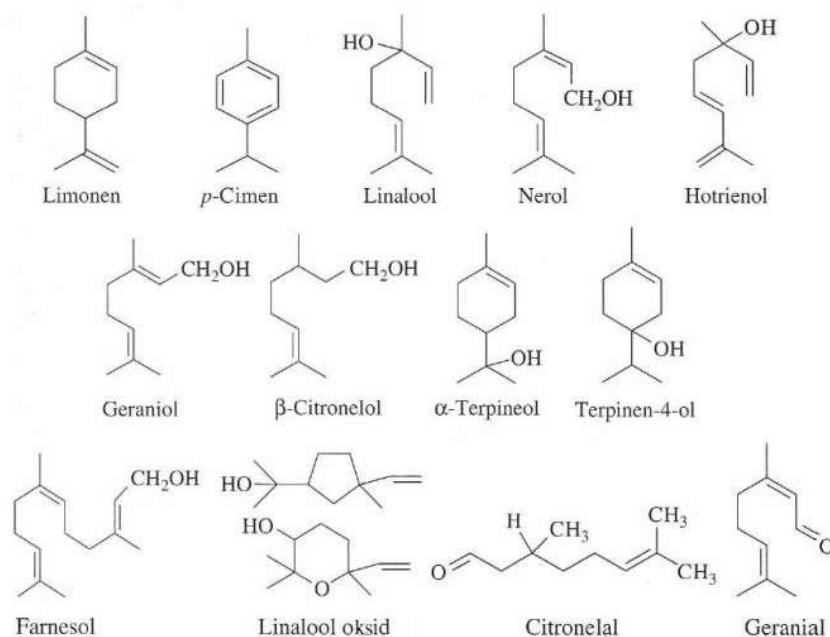
2.3.4. Aldehidi i ketoni

Jedni od spojeva koji značajno utječu na organoleptička svojstva i aromu vina su aldehidi i ketoni. Najznačajniji predstavnik koji nastaje tijekom alkoholne fermentacije je acetaldehid,

no većim se djelom prevede u etanol pomoću alkohol dehidrogenaze. Više koncentracije acetaldehida mogu dati neugodan miris na oksidiranost, pa se iz tog razloga dodaje sumpor. Općenito aldehidi, pogotovo oni s većim brojem ugljikovih atoma, doprinose voćnoj i slatkastoj cvjetnoj aromi. U crnim vinima najznačajniji aldehidi su heksanal s voćnom notom, metional s aromom kuhanog krumpira i aldehidi koji doprinose cvjetnoj noti. Ketoni su puno manje zastupljeni od aldehida u vinu i zaslužni su za maslačnu aromu, a u koncentracijama većim od 1 mg/L stvaraju neugodne arome po užeglom (Ivić, 2022; Moreno i Peinado, 2012).

2.3.5. Terpeni

Terpeni su organski spojevi koji se sastoje od izoprenskih jedinica (C_5H_8), po čemu se dijele na monoterpe (sa dvije izoprenske jedinice), seskviterpe (tri izoprenske jedinice) i diterpe (četiri izoprenske jedinice). U vinu doprinose voćnoj i citrusnoj aromi u koncentracijama ispod 1 mg/L, te daju poseban trpak okus crnim vinima (Moreno i Peinado). Prirodno su prisutni u čvrstim dijelovima bobice, pogotovo kožici i sjemenkama, i često dolaze kao vezani terpeni (vezani sa šećerima u obliku glikozida) (**Slika 3**). Tijekom prerade grožđa u vino, u procesu maceracije i alkoholne fermentacije djeluje enzim glikozidaza, koji je prirodno prisutan u grožđu, pri čemu djeluje na vezane terpe i oslobađaju se za ukupnu aromu mnogo značajniji slobodni terpeni. Pošto su slobodni terpeni značajni i poželjni za ukupnu aromu vina, pogotovo crnih, a aktivnost glikozidaze se tijekom procesa prerade smanjuje, gleda se na metode koje bi tijekom prerade u vino mogle zadržati njenu aktivnost, recimo pomoću kvasaca *Saccharomyces* koji sintetiziraju ovaj enzim (Ivić, 2022).



Slika 3 Strukturne formule terpena (Ivić, 2022)

2.3.6. Polifenolni spojevi

Ovi heterogeni, za čovjeka neesencijalni organski spojevi nastaju kao sekundarni produkti metabolizma biljaka, a poseban značaj imaju za boju i okus voća i proizvoda na bazi voća, a još uz to imaju i poželjna antioksidacijska svojstva. Što se tiče grožđa, najviše ih ima u kožici i drugim čvrstim dijelovima bobice, u crnim vinima je veća koncentracija polifenolnih spojeva nego u bijelim, te se kreće u rasponu od 1800 i 3000 mg/L (Ivić, 2022). Mogu nastati i tijekom prerade vina u metabolizmu kvasaca ili tijekom odležavanja u drvenim bačvama ekstrakcijom iz drveta. Specifični su po tome što u svojoj strukturi na aromatskim prstenima sadrže različito raspoređene hidroksilne skupine, pa ih po tome dijelimo na flavonoide i neflavonoide (Ivić, 2022).

2.3.6.1 Flavonoidi

Flavonoidi sadrže flavansku strukturu, koju čini difenilpropanski kostur (C6-C3-C6). Većinom su u biljkama vezani sa šećerima pa dolaze u obliku glikozida, i to najčešće za D-glukozu β -glikozidnom vezom, no mogu biti i slobodni odnosno aglikoni ili vezani s drugim polifenolnim spojevima. U nastavku su opisani najzastupljeniji flavonoidi u crnim vinima (Ivić, 2022).

Flavonoli

Više su izraženiji u bijelim vinima u kojima su i glavni nositelji boje, nego u crnim vinima gdje su zamaskirani tamnijim pigmentima, antocijanima. Daju svjetlo žutu boju vinima te dolaze u

obliku glikozida. U crnim vinima su prisutni miricetin, izoramnetin, kvercetin i kempferol (Ivić, 2022).

Flavan-3-oli i proantocijanidini

Najzastupljeniji spojevi ove skupine su katehin i epikatehin, zajedno sa svojim derivatima galokatehinom i galoepikatehinom. Stvaraju polimere, proantocijanidine odnosno kondenzirane tanine, koji sadrže 2 do 60 monomera katehina ili epikatehina. S obzirom na mjesto povezivanja, za vino su najznačajniji proantocijanidini tipa B, s 2 do 7 monomernih jedinica povezanih preko C4-C6 ili C4-C8 veza. Proantocijanidini se tijekom procesa prerade vina povezuju u još veće polimere, tanine, zajedno s flavanolima, s molekulskom masom od 2000 do 5000 daltona (Ivić, 2022).

Antocijani

Pigmenti koji voću i povrću daju crvenu, plavu i ljubičastu boju, topljivi u vodi, nastaju povezivanjem antocijanidina sa šećerima, i to oligosaharidima poput rutinoze, soforoze, glukorutinoze ili s monosaharidima, najviše glukozom. Tako povezani kao glikozidi kroz proces glikozilacije daju stabilnije strukture. U grožđu, odnosno vinu antocijani se dijele na cijanidine, delfinidine, malvidine, peonidine i petunidine, ovisno o mjestu vezanja hidroksilne i metilne skupine u flavanskoj strukturi. Antocijani se zbog svoje nestabilnosti, moguće oksidacije i sulfitne dekoloracije vežu s drugim komponentama u nove polimere kako bi zadržali svoju stabilnost (Andersen i Jordheim, 2006; Ivić, 2022).

Antocijani se još mogu podijeliti na monoglikozide (prisutni kod *Vitis vinifera* sorti), diglikozide (europsko-američki hibridi) i triglikozidi (nisu prisutni u grožđu), prema broju molekula šećera povezanih s antocijanidinom. Što se tiče boje crnih grožđa, s obzirom na koncentraciju pojedinih antocijana i njihovoj kopigmentaciji, razlikuje se od sorte do sorte. Malvidin je najzastupljeniji antocijanidin u crnim vinima i najzaslužniji za boju crnih vina (Ivić, 2022).

2.3.6.2 Neflavonoidi

Neflavonoidi nisu spojevi koji nose boju, ali povezani s flavonoidima doprinose boji vina, dajući im stabilnost, doprinose aromi vina i antioksidacijskoj aktivnosti. Fenolne kiseline su najzastupljeniji predstavnik i u prirodi dolaze u vezanom obliku za šećerima kao glikozidi, s vinskom kiselinom ili u obliku etera. Slobodne fenolne kiseline mogu se dobiti samo procesima hidrolize katalizirane kiselinama, lužinama ili enzimima. Inače su derivati benzojeve i cimetine kiseline (Rentsch i sur., 2009).

Hidroksibenzojeve kiseline

U vinu su prisutne kao slobodne fenolne kiseline, sa strukturom C6-C1. Najzastupljeniji predstavnik ove skupine je galna kiselina, s koncentracijom i do 95 mg/L, dok je ostalih kiselina,

poput salicilne, *p*-hidroksibenzojeve, protokatehinske i dr., manje od 10 mg/L. U vinu odnosno grožđu su prisutni i esteri ovih kiselina iz kojih one i nastaju procesom hidrolize tijekom proizvodnje vina. Tako se galna kiselina dobiva hidrolizom galata, tj. estera flavan-3-ola (kondenziranih tanina) (Rentzsch i sur., 2009).

Hidroksicimetne kiseline

Ove kiseline, strukture C6-C3, prisutne su u kožici bobice grožđa, samim time im je koncentracija više u crnim vinima nego u bijelim. Vezane su za vinsku kiselinu kao esteri ili se pojavljuju u obliku glikozida. Njihovi derivati, najčešće u *trans* konfiguraciji, u crnim vinima mogu poslužiti kao markeri za određivanje sorti grožđa (Ivić, 2022). Najzastupljenija je kaftarna kiselina, koja čini i do 50% ukupne koncentracije ovih kiselina (Rentzsch i sur., 2009).

2.3.7. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidansi su vrlo značajni spojevi gledajući ljudsko zdravlje, jer umanjuju ili sprječavaju djelovanje slobodnih radikala i oksidacijske procese koje kronično djeluju negativno na kardiovaskularni i neurološki sustav čovjeka. Često ih čovjek mora uzimati putem hrane, iako je i u manjoj mjeri sam sposoban sintetizirati ih u vidu vitamina i minerala. Zbog mogućnosti odgode ili sprječavanja kvarenja hrane, sve se više provodi istraživanja o tome kao zamjenu za umjetne aditive (Ivić, 2022). U vinu najznačajniju antioksidativnu ulogu imaju fenolni spojevi koji su sposobni donirati vodik ili elektron slobodnom radikalu te ga na taj način onesposobiti, odnosno stabilizirati. Fenolni spojevi također ulaze u reakciju sa slobodnim kisikom te na taj način sami sebe sprječavaju od oksidacijskog djelovanja, budući da u svojoj strukturi sadrže hidroksilne skupine i manje stabilne nezasićene dvostruke veze (Fernández-Pachón i sur., 2004).

Fenolni spojevi su ključni u održavanju niskog redoks potencijala vina, što pozitivno utječe na odležavanje i kasnije poželjna organoleptička svojstva vina. Fenolni spojevi kao potencijalni oksidanti najčešće oksidiraju u dikinone iz dihidroksifenola (katehini i antocijanidini) te tvore hidrogen perokside koji mogu oksidirati druge spojeve i tako dati nepoželjne komponente, naprimjer s etanolom tvore acetaldehid. Može doći i do stvaranja smeđih pigmenata, što također nije poželjno organoleptičko svojstvo. Glicerol, slobodne aminokiseline i sumpor dioksid su također potencijalni oksidanti u vinu (Fernández-Pachón i sur., 2004). Oksidirani fenolni spojevi mogu polimerizirati spajanjem s drugim fenolnim spojevima, pri čemu se reorganizacijom strukture ponovo mogu dogoditi nove oksidacijske reakcije i nove

polimerizacije, a kako bi se to spriječilo i kako se ne bi narušavala stabilnost u vinu, potrebno je smanjiti doticaj većih količina kisika (Ivić, 2022; Moreno i Peinado, 2012).

2.3.8. Aroma vina

Aroma, kao jedno od najznačajnijih organoleptičkih svojstava vina, rezultat je kombinacije djelovanja velikog broja različitih organskih, lako hlapivih kemijskih spojeva poput alkohola, aldehida, ketona, estera, terpena, kiselina i hlapivih fenola, a njihova koncentracija i jačina djelovanja ovisi o zrelosti grožđa, načinu uzgoja, klimatskim i fiziološkim uvjetima, procesu prerade (Moreno i Peinado, 2012). Također bitnu ulogu igraju kemijske, biokemijske i mikrobiološke reakcije uz djelovanje pojedinih enzima tijekom fermentacije i odležavanja vina (Ivić, 2022). Aroma je jako važan pokazatelj kvalitete vina, indikator je zrelosti, kvarenja ili zdravstvene ispravnosti. Aroma se s obzirom na podrijetlo spojeva koji ju čine primarne (sortne), sekundarne (fermentacijske) i tercijarne („*bouquet*“) arome (Belda i sur., 2017).

Primarne arome

Primarne arome su one koje daju osnovu za razlikovanje različitih sorti vina, a razvijaju se tijekom zrenja grožđa. To mogu biti slobodne aromatske molekule poput monoterpena, metokspirazina i tiola, ili se radi o prekursorima poput nezasićenih masnih kiselina, fenolnih kiselina, karotenoida, konjugata S-cisteina i prekursori dimetilsulfida (Ivić, 2022). Ovi su spojevi u grožđu najzastupljeniji u pokožici, zbog čega posebno za aromu crnih vina značajnu ulogu ima proces maceracije, tijekom kojeg se ti spojevi ekstrahiraju iz pokožice u mošt. Na aromu pojedine sorte najviše utječu terpeni, i to slobodni terpeni koji se razvijaju iz vezanih terpena (prekursora, vezanih za šećere kao jednostavni glikozidi) djelovanjem enzima glikozidaze u procesu maceracije i fermentacije (Ivić, 2022).

Sekundarne arome

Sekundarne arome nisu ništa drugo nego kombinacija lako hlapivih spojeva koji nastaju kao sekundarne produkti tijekom alkoholne i malolaktičke fermentacije, djelovanjem kvasaca i bakterija mliječne kiseline te njihovih enzima. To su najvećim djelom viši alkoholi (izobutilni, izoamilni, propan-1-ol, 2-eniletanol), acetat i etil esteri, monoterpenski alkoholi, aldehidi (acetaldehid, propanal, heksanal, benzaldehid) i ketoni (diacetil) (Ivić, 2022).

Tercijarne arome

Nastaju tijekom odležavanja i sazrijevanja vina u drvenim bačvama (oksidativni „*bouquet*“) ili u staklenim bocama (reduktivni „*bouquet*“), tijekom raznih kemijskih i enzimskih reakcija (Ivić, 2022). Mogu nastati novi spojevi ili se modificirati već postojeći te na taj način doprinose ukupnoj aromi vina. Tako na primjer dolazi do promjene u sastavu nekih terpenskih spojeva, poput linaloola, tijekom fermentacije, gdje im počinje opadati koncentracije tijekom određenog vremena (za linalool 20 mjeseci odležavanja) (Oliveira i sur., 2008).

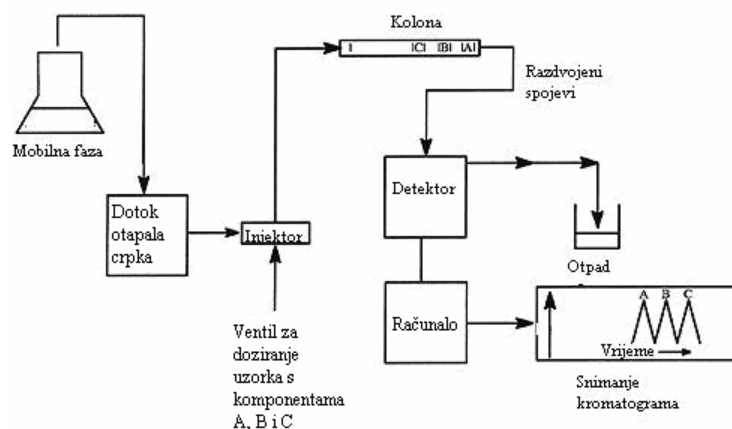
2.4. KROMATOGRFSKE METODE

Ove analitičke metode najbolje su metode za kvantitativno određivanje sastava odnosno pojedinih komponenata neke smjese koje se tijekom procesa određivanja i razdvajaju. Postoji više načina razdvajanja komponenata smjese, ovisno o njihovoj ionskoj jakosti, mogućnosti adsorpcije, hlapivosti i dr. Kromatografske metode se temelje na propuštanju analizirane smjese koja je tekućina ili plin, a naziva se mobilna (pokretna) faza, kroz kolonu ili preko ploha u kojima se nalazi stacionarna (nepokretna) faza koja je najčešće čvrsta tvar ili tekućina. Najčešće se u prehrambenoj industriji koriste tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) i plinska kromatografija (GC) (Coskun, 2016).

2.4.1. Plinska kromatografija (GC)

Plinska kromatografija se kao separacijska analitička metoda jako često koristi u prehrambenoj industriji, pogotovo za određivanje tvari arome u namirnicama. Temelj ove metode je plinska mobilna faza koja prolazi kroz kolonu ispunjenu silikonskim uljima, ugljikovodicima velike M_r ili esterima na krutom nosaču. Prolazeći kroz tako ispunjenu kolonu, plin eluira komponente uzorka, pri čemu se najprije razdvajaju lakše hlapive komponente (**Slika 4**). Kod procesa eluiranja se konstantno unosi inertni plin koji ispiru komponente smjese s kolone, a najčešće se koriste vodik, helij, dušik ili argon (Ivić, 2022). Pri tom navedeni inertni plinovi ne smiju reagirati s uzorkom, pri čemu moraju biti suhi i visoke čistoće. Za što bolje i efikasnije razdvajanje komponenti smjese, bitno je da i sama kolona bude kemijski inertna prema tim komponentama, termički stabilna, selektivna i nehlapiva. Detektori koji se koriste za identifikaciju komponenti mogu mjeriti toplinsku vodljivost komponenti pa ih na taj način

detektirati, ili raditi na principu ultraljubičaste i infracrvene spektrometrije, spektrometrije masa, radioaktivnoj ionizaciji itd (Ivić, 2022).



Slika 4 Shematski prikaz plinske kromatografije (Blažević, 2016)

U sklopu plinskog kromatografa najčešće se koriste detektori koji rade na principu spektrometrije masa. Sam detektor se sastoji od ionskog izvora, masenog analizatora i detekcijskog sustava, a rad mu se temelji na razlikovanju molekula prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Molekule se u ionizatoru bombardiraju elektronima pri čemu se kidaju kemijske veze unutar njihove strukture i nastaje velik broj iona karakterističnih za pojedinu molekulu. Ionima se određuju masene razlike pomoću elektromagnetnog polja pri čemu se kvantificiraju. Maseni spektar prikazuje vrijednosti na dijagramu pomoću navedenog omjera m/z . Svaka komponenta, svaki spoj smjese ima svoj vlastiti maseni spektar, a ukupni spektar smjese se dobije linearnim zbrajanjem komponenti (Ivić, 2022).

Za izolaciju hlapivih komponenti u analizi uzorka pomoću plinskog kromatografa s masenim detektorom (GC-MS) koristi se novija metoda mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME). Ova vrlo jednostavna metoda, bez potrebe dodatnih kemikalija, efikasna je za razdvajanje samo hlapivih komponenti uzorka, što sprječava ulaz kisika i vlage u kolonu. Aparature za ovu metodu sastoji se od igle ispunjene vlaknom koje predstavlja polimernu stacionarnu fazu na kojoj se adsorbiraju hlapive komponente. Najčešća vlakna koja se koriste su polidimetilsiloksan (PDMS) sa slojem poliakrilata (PA) i različite kombinacije PDMS-a s drugim polimernim vlaknima. Važno je tijekom analize održavati temperaturu i vrijeme ekstrakcije konstantnima radi što boljih rezultata. Nakon adsorpcije hlapivih spojeva na vlakno, ono se

postavlja u injektor plinskog kromatografa gdje pod utjecajem visoke temperature i vakuuma dolazi do desorpcije pojedinih komponenti s vlakna u kolonu (Ivić, 2022).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je ispitati utjecaj temperature tijekom burne fermentacije na polifenolni sastav i aromatski profil crnog vina sorte Cabernet Sauvignon. Taj se utjecaj ispitivao pomoću pokusa s dvije fermentacijske posude, od kojih je jedna bila korištena za proces fermentacije s hlađenjem, dok se u drugoj posudi nije provodilo hlađenje tijekom fermentacije vina Cabernet Sauvignon. Uzorci vina su uzeti na samom početku fermentacije, tijekom i nakon završetka fermentacije, u kojima se zatim određivao polifenolni sastav i aroma. U svrhu određivanja polifenola, antocijana i antioksidacijske aktivnosti koristio se spektrofotometar, a pomoću instrumentalne plinske kromatografije i mikroekstrakcije na čvrstoj fazi (SPME) određivao se kvantitativni udio tvari arome. Uređaj koji se koristio tijekom pokusa su bili plinski kromatograf tvrtke Agilent 7890B s maseno-selektivnim detektorom Agilent 5977A (Wardencki i sur., 2009).

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Crno vino Cabernet Sauvignon

U svrhu ovog rada korišteno je crno vino Cabernet Sauvignon, iz grožđa uzgojenog na konvencionalni način (berba 2018. godina) u Zmajevcu, podregija Baranja, Hrvatska. Vinogradi su međusobno udaljeni 5 km zračne linije. Za konvencionalni uzgoj, grožđe se špricalo minimalno 6 puta, u kišnim sezonama i češće, pomoću komercijalnih preparata na bazi bakra.

3.2.2. Kemikalije

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje aromatskog profila

Tvari arome u crnom vinu Cabernet Sauvignon određivani su pomoću plinskog kromatografa američke tvrtke Agilent 7890B, s masenim detektorom Agilent 5977 A (Wardencki i sur., 2009). Uzorci su se uzimali mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPME) i to pomoću igle s punilom od polidimetilsiloksana-divinilbenzena (PDMS/DVB) koje služi kao polimerna stacionarna faza. Injektirano je 5 mL uzorka u staklenu vijalu od 10 mL, zajedno s 10 µL inertnog standarda mirtenola i 1 g NaCl radi bolje ekstrakcije spojeva arome. Vijala zatvorena teflonskim čepom se miješala 5 minuta u vodenoj kupelji na temperaturi od 40 °C kako bi se nadprostor unutar

vijale ispunio hlapivim spojevima arome, koji se potom uzimaju pomoću SPME igle s polimernim punilom. Nakon 45 minuta adsorpcije tvari arome na punilo pri 40 °C igla se prenese na injektor plinskog kromatografa gdje se odvija toplinska desorpcija spojeva arome u kolonu koja je prethodno zagrijana, te na taj način na masenom detektoru najprije dopijevaju lakše hlapivi spojevi. Pomoću unaprijed postavljenih baza spojeva iz američkog Nacionalnog Instituta za Standarde i Tehnologiju te retencijskog indeksa identificirani su pikovi na kromatogramu, na osnovu masenih spektara spojeva. Za izračun retencijskog vremena pojedinih spojeva, analiziran je standard sa smjesom ugljikovodika C7-C30, pri identičnim GC – MS uvjetima, i to pomoću jednadžbe:

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

pri čemu je:

RI – retencijski indeks;

n – broj C atoma u alkanu koji izlazi prije nepoznatog spoja;

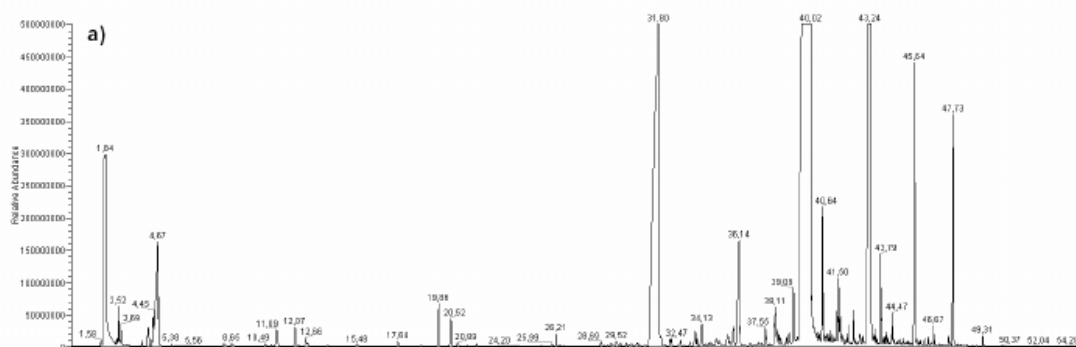
N – broj C atoma u alkanu koji izlazi nakon nepoznatog spoja;

x – nepoznati spoj;

t – retencijsko vrijeme (min).

Spojevi arome koji su određivani:

- esteri (etil-heksanoat, dietil-sukcinat, etil-oktanoat, fenil-acetat, etil-dekanoat, etil-laurat, izopropil-laurat, izoamil-dekanoat, heksil-salicilat, etil-tridekanoat, etil-miristat, izopropil-miristat, diizobutil-ftalat, etil-pentadekanoat, metil-palmitat, dibutil-ftalat, etil-palmitat, izopropil-palmitat, etil-linoleat, etil-oleat, etil-stearat);
- alkoholi (heksan-1-ol, metionol, benzil alkohol, oktan-1-ol, fenetil alkohol, nonanol, dodekanol);
- kiseline (octena, oktanska, dekanska kiselina);
- terpeni (citronelol, damascenon, farnesen, nerolidol, fluoren, farnesol, fenantren);
- aldehidi i ketoni (dekanal, dodekanal, geranil aceton, lilial, tetradekanal, α -heksilcinamal).



Slika 5 Tipičan prikaz pikova dobivenih plinskom kromatografijom (Wardencki i sur., 2009)

3.3.2. Određivanje ukupnih polifenola

U crnom vinu sorte Cabernet Sauvignon iz konvencionalnog uzgoja određena je koncentracija ukupnih polifenola pomoću Folin-Ciocalteu metode (Ivić, 2022). U epruvetu je otpipetirano 0,2 mL uzorka crnog vina, 1,8 mL destilirane vode, 10 mL otopine Folin-Ciocalteu reagensa i 8 mL 7,5%-tne otopine Na_2CO_3 . Nakon mućkanja i stajanja 2-20 sati u mraku pri sobnoj temperaturi, mjerila se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm, na spektrofotometru Cary 60 UV-Vis tvrtke Agilent. Također je određena i slijepa proba s destiliranom vodom umjesto uzorka. Provođena su 3 mjerenja po uzorku, a rezultati su izraženi kalibracijskom krivuljom galne kiseline (g galne kiseline/L uzorka).

3.3.3. Određivanje ukupnih flavonoida

Ukupni flavonoidi u crnom vinu Cabernet Sauvignon određeni su pomoću spektrofotometrije s AlCl_3 reagensom, pri čemu je u epruvetu otpipetirano redom 0,5 mL uzorka, 4 mL destilirane vode i 0,3 mL 5%-tne otopine NaNO_2 , a nakon 5 minuta dodano je i 1,5 ml 2%-tnog reagensa AlCl_3 te nakon još 5 minuta 2 mL 1 M otopine NaOH i 1,7 mL destilirane vode (Ivić, 2022). Za slijepu probu se koristila čista destilirana voda. Mjerila se apsorbancija na 510 nm u tri paralele, a rezultati su izraženi pomoću kalibracijske krivulje katehina (g katehina/L uzorka).

3.3.4. Određivanje monomernih antocijana

Monomerni antocijani u crnom vinu Cabernet Sauvignon određeni su pH-diferencijalnom metodom, zasnovanoj na transformaciji strukture kromofora antocijana tijekom promjene pH vrijednosti manifestirane kao promjene spektra apsorbancije (Ivić, 2022). Korištene su dvije epruvete, u svaku je dodano 0,2 mL uzorka, u jednu epruvetu dodano je 2,8 mL pufera pH 1

(0,025 mol/L KCl, pH podešen koncentriranom HCl), a u drugu 2,8 mL pufera pH 4,5 (0,4 mol/L $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \times 3\text{H}_2\text{O}$, pH podešen koncentriranom HCl). Apsorbancija je mjerena na spektrofotometru nakon 15 minuta pri 512 i 700 nm. Rade se tri mjerenja, te se za rezultat uzima srednja vrijednost izražena kao mg cijanidin-3-glukozida/L uzorka. Apsorbancija uzorka računata je prema jednadžbi:

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

a koncentracija monomernih antocijana prema jednadžbi:

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

gdje su: A – apsorbancija uzorka (A_{512} – na 521 nm; A_{700} – na 700 nm),

MW – relativna molekulska masa cijanidin-3-glukozina ,

FR – faktor razrjeđenja: $FR = \frac{V_{ukupni}}{V_{uzorka}}$,

ϵ – molarni ekstincijski koeficijent cijanidin-3-glukozda,

l – duljina kivete (1 cm).

3.3.5. Određivanje polimerne boje

Određivanje polimerne boje je zapravo praćenje degradacije antocijana u crnim vinima prema metodi s reakcijom antocijana s bisulfitom pri čemu nastaje bezbojni kompleks, a boja nastala polimerizacijom antocijana s taninima je otporna na djelovanje bisulfita (Ivić, 2022). Provedena su tri mjerenja za svaki uzorak, a rezultati izraženi kao srednja vrijednost. Korištene su dvije epruvete po uzorku, u svaku je otpipetirano 0,2 mL uzorka, u jednu je dodano 3,0 mL vode, a u drugu 2,8 mL vode i 0,2 mL kalijevog bisulfita (1:5). Apsorbancija se mjerila na 420 nm, 512 nm i 700 nm. Prema idućim jednadžbama izračunao se udio boje nastale polimerizacijom:

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

gdje su: boja nastala polimerizacijom (uzorak tretiran bisulfitom):

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

gustoća boje (kontrolni uzorak tretiran vodom):

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

A_{420} – apsorbancija na 420 nm (stupanj posmeđivanja),

A_{512} – apsorbancija na 512 nm (smanjenje intenziteta crvene boje),

A_{700} – apsorbancija na 700 nm,

FR – faktor razrjeđenja.

3.3.6. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Za određivanje antioksidacijske aktivnosti postoji više metoda koje se mogu koristiti, a univerzalna metoda ne postoji zbog velikog broja spojeva različitih struktura koji imaju antioksidacijska svojstva. Zbog toga se radi više metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti kako bi rezultati bili što bolji. Određuje se spektrofotometrijski, a metode koje se koriste su DPPH, CUPRAC, ABTS i druge (Jakobek, 2007).

3.3.6.1 DPPH

Ova metoda temeljena je na primjeni DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) reagensa (ljubičaste boje sa stabilnim dušikovim radikalom) koji se u prisutnosti antioksidansa reducira, prima elektron od antioksidansa i prelazi iz ljubičaste u žutu boju. Ovo je takozvani SET mehanizam (eng. *single electron transfere*) gdje antioksidans donira elektron DPPH reagensu. DPPH reagens ima mogućnost reagiranja sa cjelokupnim uzorkom, i s hidrofilnim i s lipofilnim dijelom, pa čak i sa slabijim antioksidansima (Ivić, 2022). Za ovaj postupak otpipetirano je 0,2 mL uzorka (crnog vina Cabernet Sauvignon) i 3 mL DPPH u epruvetu te se nakon 15 minuta stajanja mjerila apsorbancija na 517 nm. Za slijepu probu korištena je samo destilirana voda. Napravljena su po tri mjerenja za svaki uzorak, a rezultati su izraženi kalibracijskom krivuljom Troloxa u mg TE/100 g.

4. REZULTATI

4.1. TABLIČNI PRIKAZ ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA

Tablica 1 Spojevi arome identificirani u uzorcima Cabernet Sauvignon vinu na početku fermentacije, 5. i 10. dan fermentacije te na kraju fermentacije uz hlađenje fermentacijske posude (15 °C)

S HLAĐENJEM						
Spoj (µg/L)	RI*	RT**	Poč. ferm., temp.=15°C	5. dan, temp.=15°C	10. dan, temp.=15°C	Kraj ferm., temp.=15°C
Esteri						
Etil-heksanoat	996	18,0884	844,0 ± 1,3	890,0 ± 3,1	909,9 ± 4,0	897,2 ± 1,8
Dietyl-sukcinat	1179	28,5835	902,0 ± 5,4	423,9 ± 4,2	1404,4 ± 5,0	441,5 ± 5,9
Etil-oktanoat	1191	29,2983	3056,7 ± 12,3	2978,8 ± 22,5	2944,6 ± 23,3	3376,3 ± 12,8
Fenil-acetat	1249	32,0440	365,3 ± 4,1	297,0 ± 1,5	374,8 ± 2,3	359,9 ± 4,7
Etil-dekanoat	1383	38,1931	2564,9 ± 19,2	2584,7 ± 32,5	3028,7 ± 33,3	3239,7 ± 19,8
Etil-laurat	1583	42,3116	694,6 ± 5,2	403,1 ± 1,2	427,3 ± 2,0	494,1 ± 5,7
Izopropil-laurat	1615	42,8071	51,2 ± 1,0	47,8 ± 0,5	17,5 ± 1,4	32,9 ± 1,6
Izoamil-dekanoat	1634	43,0509	65,6 ± 1,1	42,8 ± 0,7	37,1 ± 1,6	55,6 ± 1,6
Heksil-salicilat	1668	43,5382	68,2 ± 0,4	56,5 ± 0,8	46,6 ± 1,7	46,5 ± 1,0
Etil-tridekanoat	1681	43,7169	129,5 ± 2,3	111,7 ± 0,5	71,7 ± 1,3	86,5 ± 2,9
Etil-miristat	1787	44,9597	248,9 ± 4,1	303,9 ± 1,2	93,2 ± 2,0	295,5 ± 4,7
Izopropil-miristat	1817	45,3171	304,5 ± 4,2	132,6 ± 2,5	97,2 ± 3,4	145,9 ± 4,7
Diizobutil-ftalat	1862	45,8533	220,4 ± 2,2	113,0 ± 3,5	87,9 ± 4,4	110,8 ± 2,7
Etil-pentadekanoat	1880	46,0726	238,8 ± 3,6	231,7 ± 3,5	241,2 ± 4,3	480,8 ± 4,2
Metil-palmitat	1909	46,3976	45,0 ± 0,4	23,5 ± 0,5	113,9 ± 1,3	162,8 ± 1,0
Dibutil-ftalat	1954	46,8443	194,9 ± 3,2	1699,3 ± 14,1	175,8 ± 15,0	73,9 ± 3,7
Etil-palmitat	1979	47,1123	769,3 ± 7,2	811,6 ± 1,5	342,9 ± 2,3	626,5 ± 7,7
Izopropil-palmitat	2011	47,4129	47,2 ± 2,2	123,3 ± 0,2	110,6 ± 1,0	124,4 ± 2,7
Etil-linoleat	2148	48,7533	95,5 ± 1,2	21,4 ± 0,5	27,0 ± 1,3	20,8 ± 1,7
Etil-oleat	2153	48,7939	61,4 ± 1,2	116,0 ± 1,5	33,6 ± 2,4	70,2 ± 1,7
Etil-stearat	2179	49,0213	42,8 ± 0,8	34,6 ± 0,6	59,2 ± 1,5	34,1 ± 1,4

*RI – retencijski indeks.

**RT – retencijsko vrijeme.

Tablica 1 Nastavak

S HLADENJEM						
Spoj ($\mu\text{g/L}$)	RI*	RT**	Poč. ferm., temp.=15°C	5. dan, temp.=15°C	10. dan, temp.=15°C	Kraj ferm., temp.=15°C
Alkoholi						
Heksan-1-ol	860	8,8201	455,4 \pm 1,5	3004,7 \pm 52,5	1559,0 \pm 0,9	504,9 \pm 2,1
Metionol	984	17,1624	154,8 \pm 2,2	65,5 \pm 2,5	88,1 \pm 1,6	49,9 \pm 2,7
Benzil alkohol	1033	20,2820		37,8 \pm 1,2		
Oktan-1-ol	1071	22,5887	44,1 \pm 0,8	66,6 \pm 3,1	53,3 \pm 0,3	72,8 \pm 1,4
Fenetil alkohol	1104	24,9118	17479,1 \pm 86,5	13852,7 \pm 41,1	21214,0 \pm 85,9	11209,8 \pm 87,0
Nonanol	1168	27,9906	42,0 \pm 1,0	55,8 \pm 0,5	47,8 \pm 0,5	51,8 \pm 1,6
Dodekanol	1469	40,1427	206,0 \pm 1,1	143,0 \pm 1,5	198,0 \pm 0,5	257,7 \pm 1,6
Kiseline						
Octena kiselina	630	3,6934	4756,2 \pm 45,5	612,1 \pm 2,5	1011,3 \pm 1,9	1054,1 \pm 46,0
Oktanska kiselina	1185	28,9490	1333,6 \pm 23,2	717,0 \pm 11,5	885,6 \pm 10,9	972,7 \pm 23,7
Dekanska kiselina	1371	37,4296	725,0 \pm 12,1	342,8 \pm 8,5	367,7 \pm 7,9	351,6 \pm 12,7
Terpeni						
Citronelol	1221	30,7848	55,1 \pm 1,0	43,0 \pm 0,5	39,3 \pm 0,1	34,2 \pm 1,6
Damascenon	1377	37,6814	136,8 \pm 4,2	110,5 \pm 0,5	108,0 \pm 0,1	97,3 \pm 4,7
Farnesen	1450	39,7610	11,8 \pm 0,2	12,8 \pm 0,7	18,9 \pm 0,2	108,3 \pm 0,7
Nerolidol	1556	41,8242	152,7 \pm 1,2	135,0 \pm 6,5	106,6 \pm 5,9	146,1 \pm 1,7
Fluoren	1569	42,0679	39,3 \pm 0,4	31,1 \pm 0,5	33,3 \pm 0,1	37,0 \pm 1,0
Farnesol	1710	44,1149	205,2 \pm 5,1	98,8 \pm 1,1	88,8 \pm 0,6	97,4 \pm 5,7
Fenantren	1779	44,8788	37,1 \pm 1,0	26,7 \pm 0,5	16,0 \pm 0,1	29,0 \pm 1,5
Aldehidi i ketoni						
Dekanal	1197	29,6314	37,6 \pm 1,0	66,0 \pm 0,5	38,1 \pm 0,1	20,2 \pm 1,6
Dodekanal	1398	38,5344	181,5 \pm 2,1	67,3 \pm 0,1	29,6 \pm 0,4	37,9 \pm 2,7
Geranil aceton	1447	39,6716	37,8 \pm 1,0	40,2 \pm 0,4	39,1 \pm 0,2	80,5 \pm 1,6
Lilial	1517	41,1824	226,1 \pm 2,5	9,8 \pm 0,1	53,5 \pm 0,4	36,3 \pm 1,3
Tetradekanal	1601	42,5796	472,8 \pm 11,2	219,6 \pm 1,2	202,9 \pm 0,6	172,9 \pm 11,7
α -heksilcinamal	1742	44,4561	70,0 \pm 2,2	39,8 \pm 1,1	36,3 \pm 0,6	51,6 \pm 2,7

*RI – retencijski indeks.

**RT – retencijsko vrijeme.

Tablica 2 Spojevi arome identificirani u uzorcima Cabernet Sauvignon vinu na početku fermentacije, 5. i 10. dan fermentacije te na kraju fermentacije bez hlađenja fermentacijske posude (15, 19, 25 i 20 °C)

BEZ HLAĐENJA						
Spoj (µg/L)	RI*	RT**	Poč. ferm., temp.=15°C	5. dan, temp.=19°C	10. dan, temp.=25°C	Kraj ferm., temp.=20°C
Esteri						
Etil-heksanoat	996	18,0884	666,1 ± 17,4	683,3 ± 37,3	625,1 ± 11,8	468,0 ± 9,5
Dietil-sukcinat	1179	28,5835	604,7 ± 15,8	304,2 ± 7,8	325,0 ± 6,4	269,5 ± 5,7
Etil-oktanoat	1191	29,2983	2243,1 ± 58,4	2130,0 ± 53,4	1946,9 ± 35,6	3186,3 ± 61,1
Fenil-acetat	1249	32,0440	61,9 ± 1,7	197,6 ± 5,1	232,4 ± 4,7	33,4 ± 1,2
Etil-dekanoat	1383	38,1931	2553,6 ± 66,5	1767,0 ± 44,4	1944,6 ± 35,6	2507,4 ± 48,2
Etil-laurat	1583	42,3116	749,4 ± 19,6	287,0 ± 7,4	283,4 ± 5,7	341,0 ± 7,1
Izopropil-laurat	1615	42,8071	13,5 ± 0,5	12,4 ± 0,5	23,3 ± 1,0	9,6 ± 0,8
Izoamil-dekanoat	1634	43,0509	45,7 ± 1,3	18,3 ± 0,7	15,2 ± 0,8	22,0 ± 1,0
Heksil-salicilat	1668	43,5382	64,8 ± 1,8	78,5 ± 2,2	57,6 ± 1,6	26,6 ± 1,1
Etil-tridekanoat	1681	43,7169	59,8 ± 1,7	41,8 ± 1,2	32,2 ± 1,1	46,8 ± 1,5
Etil-miristat	1787	44,9597	305,8 ± 8,1	212,7 ± 5,5	88,1 ± 2,1	300,8 ± 6,3
Izopropil-miristat	1817	45,3171	137,8 ± 3,7	64,5 ± 1,8	115,6 ± 2,6	132,5 ± 3,1
Diizobutil-ftalat	1862	45,8533	50,6 ± 1,4	18,8 ± 0,7	19,0 ± 0,9	32,8 ± 1,2
Etil-pentadekanoat	1880	46,0726	91,3 ± 2,5	101,5 ± 2,7	43,5 ± 1,3	157,3 ± 3,6
Metil-palmitat	1909	46,3976	17,1 ± 0,6	14,9 ± 0,6	23,8 ± 1,0	56,3 ± 1,7
Dibutil-ftalat	1954	46,8443	140,6 ± 3,8	93,7 ± 2,5	26,5 ± 1,0	109,3 ± 2,7
Etil-palmitat	1979	47,1123	663,41 ± 7,4	199,1 ± 5,2	164,3 ± 3,5	369,1 ± 7,6
Izopropil-palmitat	2011	47,4129	41,4 ± 1,2	8,1 ± 0,4	20,6 ± 0,9	27,3 ± 1,1
Etil-linoleat	2148	48,7533	19,9 ± 0,6			
Etil-oleat	2153	48,7939	182,8 ± 4,9	4,1 ± 0,3		
Etil-stearat	2179	49,0213	22,2 ± 0,7		53,4 ± 1,6	

*RI – retencijski indeks.

**RT – retencijsko vrijeme.

Tablica 2 Nastavak

BEZ HLAĐENJA						
Spoj (µg/L)	RI*	RT**	Poč. ferm., temp.=15°C	5. dan, temp.=19°C	10. dan, temp.=25°C	Kraj ferm., temp.=20°C
Alkoholi						
Heksan-1-ol	860	8,8201	1312,9 ± 34,3	1595,1 ± 40,1	1833,0 ± 33,6	335,9 ± 7,0
Metionol	984	17,1624	69,9 ± 1,9	57,2 ± 1,6	41,1 ± 1,3	40,5 ± 1,4
Benzil alkohol	1033	20,2820				
Oktan-1-ol	1071	22,5887	83,1 ± 2,3	36,1 ± 1,1	44,8 ± 1,4	27,5 ± 1,1
Fenetil alkohol	1104	24,9118	12215,2 ± 317,7	11300,3 ± 282,7	11083,8 ± 200,1	10063,1 ± 191,8
Nonanol	1168	27,9906	57,7 ± 1,6	29,2 ± 0,9	29,2 ± 1,1	32,4 ± 1,2
Dodekanol	1469	40,1427	283,5 ± 7,5	81,7 ± 2,2	143,8 ± 3,1	145,6 ± 3,4
Kiseline						
Octena kiselina	630	3,6934	2179,3 ± 56,8	2848,6 ± 71,4	1872,8 ± 34,3	2604,9 ± 50,1
Oktanska kiselina	1185	28,9490	624,5 ± 16,4	313,6 ± 8,0	330,6 ± 6,5	318,1 ± 6,6
Dekanska kiselina	1371	37,4296	189,8 ± 5,1	49,5 ± 1,4	78,2 ± 2,0	64,8 ± 1,8
Terpeni						
Citronelol	1221	30,7848	40,4 ± 1,2	24,9 ± 0,8	26,6 ± 1,0	23,9 ± 1,0
Damascenon	1377	37,6814	93,6 ± 2,6	38,6 ± 1,2	64,0 ± 1,7	57,7 ± 1,7
Farnesen	1450	39,7610				
Nerolidol	1556	41,8242	188,3 ± 5,0	47,7 ± 1,4	66,6 ± 1,8	53,3 ± 1,6
Fluoren	1569	42,0679	37,8 ± 1,1	11,6 ± 0,5	6,8 ± 0,7	12,2 ± 0,8
Farnesol	1710	44,1149	69,3 ± 1,9	35,3 ± 1,1	29,4 ± 1,1	28,7 ± 1,1
Fenantren	1779	44,8788	18,1 ± 0,6	96,6 ± 2,6		
Aldehidi i ketoni						
Dekanal	1197	29,6314				
Dodekanal	1398	38,5344	65,9 ± 1,8	28,6 ± 0,9		17,9 ± 0,9
Geranil aceton	1447	39,6716	47,1 ± 1,3	18,6 ± 0,7	18,2 ± 0,9	26,4 ± 1,1
Lilial	1517	41,1824	40,1 ± 1,2	17,3 ± 0,6	33,4 ± 1,2	22,1 ± 1,0
Tetradekanal	1601	42,5796	39,1 ± 1,1	7,4 ± 0,4	14,4 ± 0,8	18,9 ± 0,9
α-heksilcinamal	1742	44,4561	36,7 ± 1,1	12,6 ± 0,5	16,2 ± 0,8	14,2 ± 0,9

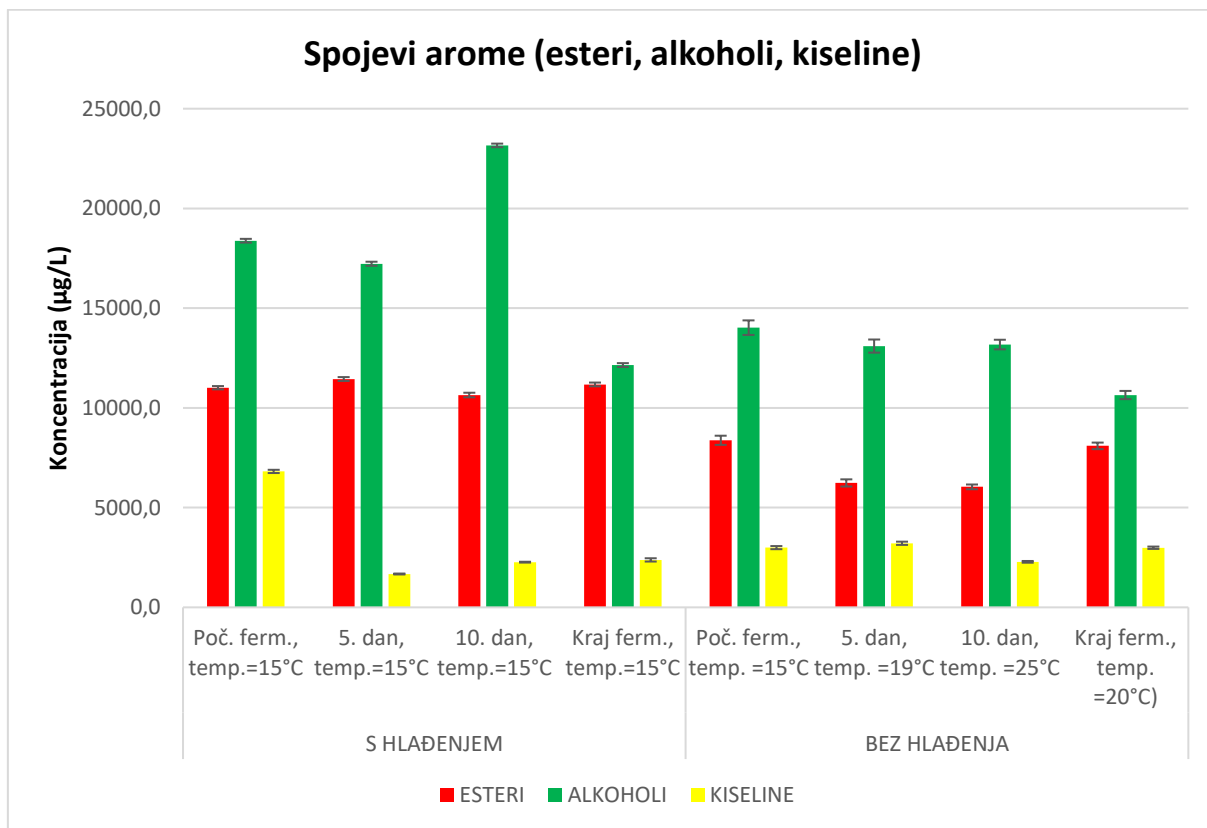
*RI – retencijski indeks.

**RT – retencijsko vrijeme.

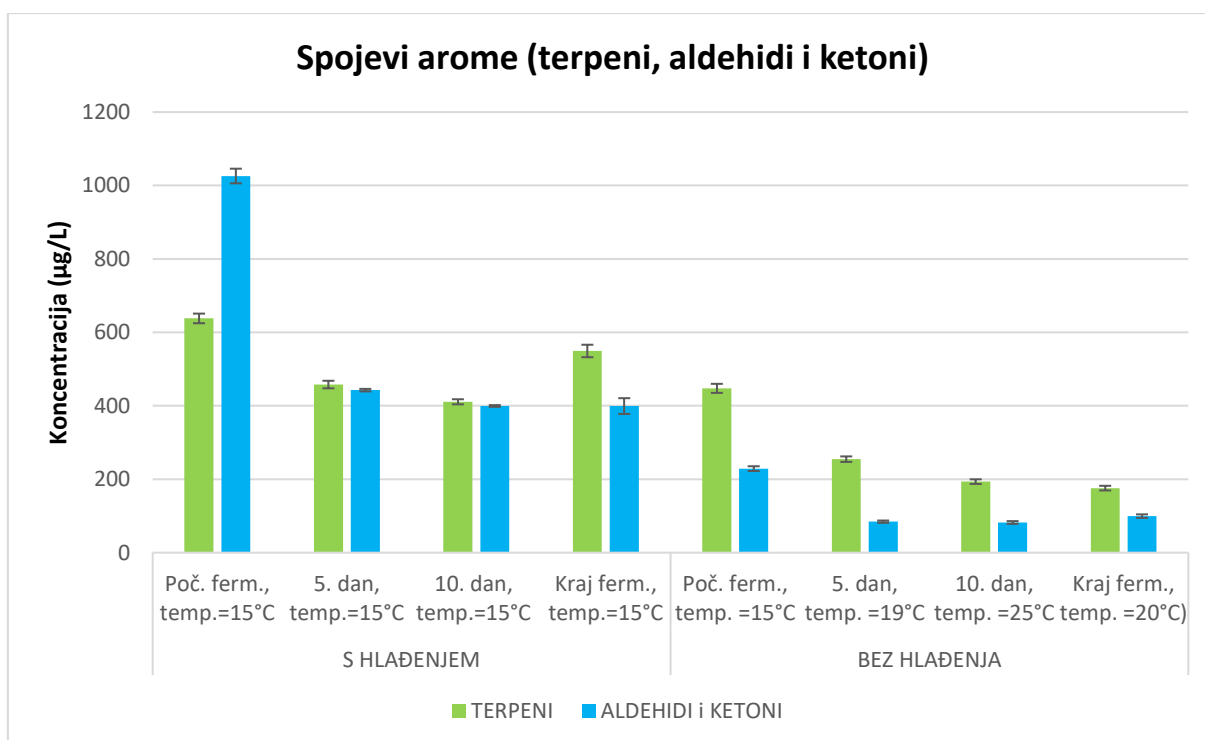
Tablica 3 Ukupni polifenoli, antocijani, flavonoidi, polimerna boja te antioksidacijska aktivnost izmjerena u uzorcima Cabernet Sauvignon vinu na početku fermentacije, 5. i 10. dan fermentacije te na kraju fermentacije s i bez hlađenja fermentacijske posude

	Uzorak	Polifenoli (mg/L)	Antocijani (mg/L)	Polimerna boja (%)	Flavonoidi (mg/L)	Antioksidacijska aktivnost (mg/100g)*
S HLAĐENJEM	Poč. ferm., temp.=15°C	2295,26 ± 25,25	196,27 ± 4,46	45,49 ± 0,71	973,03 ± 4,92	126,82 ± 2,25
	5. dan, temp.=15°C	2194,11 ± 33,71	133,04 ± 2,22	51,50 ± 1,79	1012,60 ± 15,51	115,63 ± 0,08
	10. dan, temp.=15°C	2567,46 ± 39,39	175,00 ± 4,04	48,29 ± 0,75	1081,50 ± 26,54	109,81 ± 2,00
	Kraj ferm., temp.=15°C	2297,28 ± 15,28	169,57 ± 3,93	46,12 ± 0,72	1011,60 ± 5,49	113,19 ± 1,05
BEZ HLAĐENJA	Poč. ferm., temp.=15°C	2014,13 ± 30,97	162,51 ± 2,59	56,00 ± 0,85	910,35 ± 13,98	102,95 ± 1,90
	5. dan, temp.=19°C	2499,03 ± 18,35	120,28 ± 2,94	61,10 ± 1,51	1044,14 ± 5,98	117,80 ± 2,12
	10. dan, temp.=25°C	2095,94 ± 22,22	159,90 ± 3,73	51,50 ± 0,79	1111,63 ± 6,99	124,05 ± 2,21
	Kraj ferm., temp.=20°C	2460,36 ± 37,76	155,33 ± 4,04	60,66 ± 0,91	856,11 ± 1,16	101,39 ± 1,88

4.2. GRAFIČKI PRIKAZ ANALIZOM DOBIVENIH REZULTATA



Slika 6 Koncentracija estera, alkohola i kiselina u uzorcima vina Cabernet Sauvignon tijekom fermentacije sa hlađenjem i tijekom fermentacije bez hlađenja



Slika 7 Koncentracija terpena te aldehida i ketona u uzorcima vina Cabernet Sauvignon tijekom fermentacije sa hlađenjem i tijekom fermentacije bez hlađenja

5. RASPRAVA

5.1. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA KONCENTRACIJU TVARI AROME

Aromatski profil crnog vina sorte Cabernet Sauvignon određen je analitički plinskom kromatografijom s masenim detektorom i mikroekstrakcijom na čvrstoj fazi (SPME). Tvari arome određivali se su tijekom burne fermentacije, a rezultati su praćeni u dva različita procesna parametra: tijekom fermentacije uz hlađenje, kod koje se kroz cijeli proces nastoji održati konstantna temperatura fermentacije; tijekom fermentacije bez hlađenja tijekom koje dolazi do temperaturnih promjena, što automatski utječe na cjelokupni kemijski sastav vina tijekom procesa te na kraju procesa fermentacije. I kod fermentacije s hlađenjem i bez hlađenja praćeni su rezultati u 4 različita vremena: na početku fermentacije (i kod hlađenja i bez hlađenja početna temperatura je 15°C); 5. dan fermentacije (kod procesa s hlađenjem temperatura je 15°C, bez hlađenja je 19°C); 10. dan fermentacije (s hlađenjem T = 15°C, bez hlađenja T = 25°C); na kraju procesa fermentacije (s hlađenjem T = 15°C, bez hlađenja T = 20°C). Tako se uspoređivanjem rezultata za oba procesa može vidjeti kako temperatura tijekom fermentacije utječe na aromatski profil vina, a sami rezultati za pojedine skupine spojeva arome se itekako razlikuju.

Najveća koncentracija spojeva arome u crnom vinu Cabernet Sauvignon prema rezultatima dobivenih analizom uzoraka je iz skupine alkohola. Kao što se može vidjeti u **Tablici 1** i **Tablici 2** te **Slici 6**, i tijekom fermentacije s hlađenjem i bez hlađenja, koncentracija alkohola u uzorcima je uvijek bila visoka, i to preko 10000 µg/L. Kada idemo uspoređivati koncentraciju alkohola tijekom jednog i tijekom drugog procesa, može se primijetiti da je viša koncentracija tijekom fermentacije hlađenjem, gdje se održava konstantna temperatura od 15°C, no ipak kod procesa bez hlađenja malo povišena temperatura fermentacije utječe na degradaciju alkohola što i daje manje koncentracije. Tijekom fermentacije s hlađenjem je nakon određenog vremena (10 dana) porasla koncentracija alkohola, no ipak je na kraju ona bila manja nego na početku. Kod fermentacije bez hlađenja to nije slučaj, jer se zbog porasta temperature i kasnijeg hlađenja kako se bliži kraj fermentacije postepeno smanjivala koncentracija alkohola, te je na kraju također bila manja nego na početku fermentacije. Od alkohola, najzastupljeniji u uzorcima bio je fenilni alkohol, na kraju fermentacije s hlađenjem $11209,8 \pm 87,0$ odnosno na kraju fermentacije bez hlađenja $10063,1 \pm 191,8$. Od zastupljenijih

alkohola tu su još i heksan-1-ol ($504,9 \pm 2,1$ s hlađenjem; bez hlađenja $335,9 \pm 7,0$) te dodekanol ($257,7 \pm 1,6$ s hlađenjem; $145,6 \pm 3,4$ bez hlađenja) (**Tablica 1** i **Tablica 2**).

Druga najzastupljenija skupina spojeva u analiziranim uzorcima bili su esteri, a ujedno i, prema broju detektiranih spojeva, najbrojniji. Njihova je koncentracija tijekom fermentacije s hlađenjem ostala približno jednaka, što znači da vrijeme fermentacije ovdje nije igralo bitnu ulogu, a ta je koncentracija na kraju procesa iznosila $11175,9 \pm 94,1$ $\mu\text{g/L}$, kao što je vidljivo u **Tablici 1**. Tijekom fermentacije bez hlađenja je porast temperature uzrokovao pad koncentracije estera u uzorcima, no kako se bližio kraj fermentacije i smanjivala temperatura, ponovo se povećavala koncentracija, pošto su se ponovo stvorili povoljni uvjeti za nastanak estera. Njihova koncentracija je na kraju ovog procesa bila malo manja nego na početku (**Tablica 1** i **Tablica 2**) i iznosila je $8095,9 \pm 164,3$ $\mu\text{g/L}$. Najzastupljeniji iz ove skupine spojeva bili su etil-oktanoat ($3376,3 \pm 12,8$ s hlađenjem; $3186,3 \pm 61,1$ bez hlađenja), etil-dekanoat ($3239,7 \pm 19,8$ s hlađenjem; $2507,4 \pm 48,2$ bez hlađenja), etil-heksanoat ($897,2 \pm 1,8$ s hlađenjem; $468,0 \pm 9,5$ bez hlađenja).

S kiselinama u vinu je potpuno drugačija situacija. Tijekom procesa fermentacije s hlađenjem može se vidjeti na **Slici 6** nagli pad koncentracije kiselina prisutnih u masulju, što znači da se s vremenom trajanja fermentacije smanjuje njihova količina, pri konstantnoj temperaturi od 15°C . Koncentracija na početku fermentacije je bila $6814,8 \pm 80,8$ $\mu\text{g/L}$, dok je na kraju fermentacije s hlađenjem iznosila $2378,4 \pm 82,5$ $\mu\text{g/L}$ (**Tablica 1**). Kod procesa fermentacije bez hlađenja koncentracija kiselina je bila približno ista, jedino se malo smanjila nakon 10. dana fermentacije (pošto je tad bila i najveća temperatura procesa, i to 25°C). Na početku procesa iznosila je $2993,6 \pm 78,2$ $\mu\text{g/L}$, a na kraju procesa $2987,8 \pm 58,5$ $\mu\text{g/L}$. Može se uočiti da na kraju procesa fermentacije bez hlađenja ima više kiselina nego na kraju procesa s hlađenjem (**Tablica 2**). Najzastupljenija je bila octena kiselina ($1054,1 \pm 46,0$ $\mu\text{g/L}$ s hlađenjem; $2604,9 \pm 50,1$ $\mu\text{g/L}$ bez hlađenja), a prisutne su još i oktanska kiselina i dekanska kiselina, čije su koncentracije, za razliku od octene kiseline, puno manje nakon završetka fermentacije bez hlađenja nego nakon završetka fermentacije s hlađenjem.

Koncentracija terpena je znatno manja nego od prethodnih skupina spojeva. Tijekom fermentacije s hlađenjem se održavala cijelo vrijeme iznad 400 $\mu\text{g/L}$ kao što prikazuje **Slika 7**, te je na kraju procesa iznosila $549,3 \pm 17,0$ $\mu\text{g/L}$ (**Tablica 1**). Pošto su terpeni jako osjetljivi na temperaturne oscilacije, tijekom procesa fermentacije bez hlađenja se njihova koncentracija

znatno smanjila, sa $447,5 \pm 12,3 \mu\text{g/L}$ na $175,8 \pm 6,3 \mu\text{g/L}$. Tijekom analize uzoraka detektirano je 7 spojeva iz skupine terpena. Ono što se može primijetiti iz **Tablice 1** i **Tablice 2** je da koncentracija pojedinih spojeva varira od početka do kraja fermentacije, i u slučaju s hlađenjem i bez hlađenja, što dovoljno govori o njihovoj nestabilnosti i osjetljivosti na promjenu uvjeta. Tako recimo na kraju fermentacije s hlađenjem koncentracija farnesena iznosi $108,3 \pm 0,7 \mu\text{g/L}$ dok je na početku bila samo $11,8 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$, dok je recimo koncentracija damascenona sa $136,8 \pm 4,2 \mu\text{g/L}$ ili farnesola sa $205,2 \pm 5,1 \mu\text{g/L}$ pala ispod $100 \mu\text{g/L}$ (i jednog i drugog oko $97 \mu\text{g/L}$). Na kraju fermentacije najviše je bilo nerolidola ($146,1 \pm 1,7 \mu\text{g/L}$), čija se koncentracija tijekom cijelog procesa održavala iznad $100 \mu\text{g/L}$. Tijekom procesa fermentacije bez hlađenja uopće nije detektiran farnesen, dok se fenantren u potpunosti izgubio nakon povećanja temperature procesa iznad 20°C .

Aldehidi i ketoni su posljednja skupina spojeva arome, čija je koncentracija ujedno bila i najmanja. Kao što prikazuje **Slika 2**, na početku fermentacije s hlađenjem njihova je koncentracija bila izrazito visoka, viša od koncentracije terpena, i to iznad $1000 \mu\text{g/L}$ uzorka. Već nakon 5. dana fermentacije koncentracija je pala ispod $500 \mu\text{g/L}$ te je na kraju procesa bila $399,3 \pm 21,5 \mu\text{g/L}$. Tijekom fermentacije bez hlađenja njihova je koncentracija također drastično pala, sa $228,9 \pm 6,5 \mu\text{g/L}$ na svega $99,5 \pm 4,8 \mu\text{g/L}$. Iz **Tablice 1** i **Tablice 2** vidimo da je ajzastupljeniji spoj iz ove skupine bio aldehid tetradekanal. Ostalih spojeva je na kraju fermentacije bilo manje od $100 \mu\text{g/L}$ i koncentracija im se tijekom procesa smanjivala, jedino se koncentracija geranil acetona povećala s $37 \mu\text{g/L}$ na $80,5 \mu\text{g/L}$. Tijekom fermentacije bez hlađenja u uzorcima uopće nije detektiran dekanal, dok je koncentracija ostalih spojeva do kraja procesa pala na oko $20 \mu\text{g/L}$ i manje, a najviše je bilo geranil acetona ($26,4 \pm 1,1 \mu\text{g/L}$).

5.2. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA KONCENTRACIJU POLIFENOLA, ANTOCIJANA I FLAVONOIDA

Rezultati analiza uzoraka crnog vina Cabernet Sauvignon iz konvencionalnog uzgoja grožđa pokazali su da se koncentracija polifenola, antocijana i flavonoida, kroz procese fermentacije s hlađenjem i bez hlađenja, nije pretjerano mijenjala, odnosno ostala je poprilično stabilna. Kao što je vidljivo u **Tablici 3**, polifenola je bilo najviše. Njihova je koncentracija, i u slučaju s hlađenjem i bez hlađenja, uvijek bila između 2500 i 2000 mg/L , te im u oba slučaja koncentracija varira ovisno o vremenu fermentacije i temperaturi. Kod fermentacije bez hlađenja su veća ta odstupanja u rezultatima zbog povišenja, pa opet sniženja temperature.

No ipak, na kraju fermentacije s hlađenjem je bila manja koncentracija polifenola ($2297,28 \pm 15,28$ mg/L) nego na kraju fermentacije bez hlađenja ($2460,36 \pm 37,76$ mg/L). Koncentracija flavonoida se i u slučaju s hlađenjem i u slučaju bez hlađenja kretala oko 900 mg/L i 1000 mg/L. Dakle bile su puno manje razlike u dobivenim rezultatima kako je prolazila fermentacija, jedino što je opet povišenje i sniženje temperature kod fermentacije bez hlađenja utjecalo na veće oscilacije u rezultatima. Pri tom je vidljivo u **Tablici 3** da je povišenje temperature s 15°C na 25°C za 10 dana fermentacije (bez hlađenja) utjecalo na veći porast koncentracije flavonoida (s 910 mg/L na 1111 mg/L), što dovoljno govori o tome kako blago povišenje temperature pozitivno utječe na njihovo stvaranje. Na završetku procesa bez hlađenja (temperatura je ponovo pala na 15°C), se smanjila njihova koncentracija na $856,11 \pm 1,16$ mg/L i manja je nego koncentracija na kraju procesa s hlađenjem ($1011,60 \pm 4,49$ mg/L). Antocijana je ipak najmanje detektirano, koncentracija im nije prelazila 200 mg/L, kao što je i prikazano u **Tablici 3**. U slučaju bez hlađenja je koncentracija antocijana bila manja nego u slučaju s hlađenjem, a vidljivo je da i u jednom i u drugom slučaju rezultati rastu i padaju, ovisno o vremenu i temperaturi, što govori o njihovoj nestabilnosti. Nakon 5. dana fermentacije je u oba slučaja zabilježena najmanja koncentracija antocijana ($133,04 \pm 2,22$ mg/L s hlađenjem; $120,28 \pm 2,94$ mg/L bez hlađenja). Utjecaj temperature kod procesa bez hlađenja je presudio da je općenito kroz cijeli proces, pa tako i na kraju procesa, koncentracija antocijana bila manja nego kod procesa s hlađenjem.

5.3. UTJECAJ PROCESNIH PARAMETARA NA POLIMERNU BOJU VINA I ANTIOKSIDACIJSKU AKTIVNOST

Boja vina nije ništa drugo nego posljedica zajedničkog djelovanja fenolnih spojeva, poput antocijana ili terpena, koji su najviše prisutni u sjemenki grožđa. Boja vina ovisi o uzgoju grožđa, vremenu prerade u vino, pogotovo maceracije kod crnih vina. Također ovisi o načinu skladištenja, starenju vina te o prisutnosti neki drugih organskih spojeva, kao što su kiseline. Boja vina se izražava su postotcima. Iz **Tablice 3** je vidljivo da je jači intenzitet boje kod crnog vina Cabernet Sauvignon dobivenog fermentacijom bez hlađenja. Kod dobivanja vina fermentacijom s hlađenjem taj je intenzitet iznosio 45 – 50%, a kod procesa s hlađenjem je na kraju bio i 60%. To nam dovoljno govori kako blago povišenje, pa onda sniženje temperature tijekom fermentacije povoljno utječe na intenzitet boje crnog vina Cabernet Sauvignon.

Što se tiče antioksidacijske aktivnosti, ona je mjerena DPPH metodom, a predstavlja zapravo utjecaj antioksidanasa, ponajviše fenolnih spojeva, na održavanje niskog redoks potencijala vina, što je dakako pozitivno. Što je antioksidacijska aktivnost bila veća, to znači da je u vino prisutno više antioksidanasa, odnosno da im je veća inhibitorna sposobnost uklanjanja DPPH radikala. Općenito je ta aktivnost bila veća kod vina dobivenog procesom fermentacije s hlađenjem. U **Tablici 3** može se vidjeti kako kod fermentacije s hlađenjem tokom vremena opada antioksidacijska aktivnost, i to s početnih $126,82 \pm 2,25$ mg/100 g na $113,19 \pm 1,05$ mg/100 g. Tijekom procesa fermentacije bez hlađenja je jasno vidljivo kako povišenjem temperature tijekom vremena fermentacije raste antioksidacijska aktivnost, samim time bolje je djelovanje fenolnih spojeva kao reducensa, no ipak na kraju fermentacije i sniženjem temperature sa 25°C (nakon 10. dana) na 20°C taj iznos opada sa $124,05 \pm 2,21$ mg/100 g na $101,39 \pm 1,88$ mg/100 g.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobivenih rezultata i rasprave provedenih u ovom diplomskom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Tijekom procesa fermentacije sa hlađenjem i bez hlađenja, procesni parametri (temperatura i vrijeme trajanja procesa) imali su značajan utjecaj na rezultate dobivene analizom uzoraka.
- Procesni parametri utjecali su i na koncentraciju pojedinih spojeva tijekom procesa fermentacije sa hlađenjem i bez hlađenja u određenim vremenima procesa.
- Ovisno o skupini spojeva koja se promatra, različito je zadržavanje spojeva u uzorcima tijekom fermentacije sa hlađenjem i tijekom fermentacije bez hlađenja
- Povišenje temperature tijekom procesa fermentacije bez hlađenja povoljno utječe na povećanje koncentracije polifenolnih spojeva i veću antioksidacijsku aktivnost.
- Veća je koncentracija spojeva arome tijekom procesa fermentacije sa hlađenjem, nego kod procesa fermentacije bez hlađenja.
- Tijekom fermentacije sa hlađenjem, vrijeme odvijanja fermentacije znatno utječe na promjenu koncentracije alkohola, kiselina i terpena u uzorcima.
- Udio polifenolnih spojeva u uzorcima se tijekom oba procesa fermentacije slabije mijenja, što govori o njihovoj stabilnosti.
- Antioksidacijska aktivnost veća je u uzorcima dobivenih fermentacijom sa hlađenjem, zbog veće koncentracije flavonoida.
- Veći je intenzitet boje u uzorcima iz procesa fermentacije bez hlađenja zbog utjecaja viših temperatura tijekom samog procesa.

7. LITERATURA

- Alpeza I: Temelj kemijskog sastava vina. *Glasnik Zaštite Bilja* 31(6):143 – 150, 2008.
- Andersen OM i Jordheim M: The anthocyanins. U Andersen OM i Markham KR (ur.): *Flavonoids chemistry, biochemistry and applications*, pp. 4925–4934, CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, SAD, 2006.
- Belda I, Ruiz J, Esteban-Fernández A, Navascués E, Marquina D, Santos A i Moreno-Arribas M: Microbial Contribution to Wine Aroma and Its Intended Use for Wine Quality Improvement. *Molecules* 22(2):189, 2017.
- Blažević M: Određivanje hlapivih komponenti pjenušavih, prefikatnih i fortificiranih vina plinskom kromatografijom. *Završni rad*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2016.
- Blesić M, Mijatović D, Radić G i Blesić S: *Praktično vinogradarstvo i vinarstvo*. CRS - Catholic Relief Services, Fojnica, BiH, 2013.
- Claus H: Wine fermentation. U *Fermentation*, Vol. 5, Issue 1, MDPI, Švicarska, 2019.
- Coskun O: Separation Techniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul* 3(2):156–160, 2016.
- Fernández-Pachón M, Villaño D, García-Parrilla M i Troncoso A: Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. *Analytica Chimica Acta* 513(1):113–118, 2004.
- Garrido J i Borges F: Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International* 54(2):1844–1858, 2013.
- Grainger K i Tattersall H: *Wine Production: Vine To Bottle*. Blackwell Publishin, Pondicherry, India, Oxford, Velika Britanija, 2005.
- Ivić I: Reverzna osmoza i nanofiltracija: utjecaj koncentriranja na bioaktivne komponente i arome crnog vina Cabernet Sauvignon. *Disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2022.
- Ivić I, Kopjar M, Jukić V, Bošnjak M, Maglica M, Mesić J i Pichler A: Influence of Processing Parameters on Phenolic Compounds and Colour of Cabernet Sauvignon Red Wine Concentrates Obtained by Reverse Osmosis and Nanofiltration. *Processes* 9(1):89, 2021a
- Jakobek L: Karakterizacija polifenola u voću i njihov utjecaj na antioksidacijsku aktivnost voća. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2007.
- Maletić E, Karoglan Kontić J i Pejić I: *Vinova loza - Ampelografija, ekologija, oplemenjivanje*. Školska knjiga, Zagreb, 2008.
- Mirošević N: *Vinogradarstvo*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, 1996.

Mirošević N i Karoglan Kontić J: *Vinogradarstvo*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, 2008.

Mirošević N i Turković Z: *Ampelografski atlas*. Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb, 2003.

Moreno J i Peinado R: *Enological chemistry*. Elsevier Inc., Universidad de Cordoba, Cordoba, Spain, 2012.

Narodne Novine: *Pravilnik o proizvodnji vina*. NN 2/05, 2005.

Narodne Novine: *Zakon o vinu*. NN 32/19, 2019.

Oliveira JM, Oliveira P, Baumes RL i Maia O: Changes in aroma characteristics of Loureiro and Avarinho wines during maturation. *Journal of Food Composition and Analysis* 21(8):695–707, 2008.

Rainieri S i Pretorius IS: Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology*

Rentzsch M, Wilkens A i Winterhalter P: Non-flavonoid phenolic compounds. U Moreno-Arribas MV and Polo MC (ur.): *Wine Chemistry and Biochemistry*, pp. 509–527, Springer, New York, SAD, 2009.

Robinson J, Harding J i Vouillamouz J: *Wine grapes*. Penguin Books, London, Velika Britanija, 2012.

Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B i Lonvaud AA: *Handbook of enology, volume 1. The microbiology of wine and vinifications*. John Wiley & Sons, Ltd, Bordeaux, Francuska, 2006.

Wardencki W, Chmiel T, Dymerski T, Biernacka P i Plutowska B: Application of gas chromatography, mass spectrometry and olfactometry for quality assessment of selected food products. *Ecological Chemistry and Engineering S* 16(3):287–300, 2009.

Tomas D i Kolovrat D: *Priručnik za proizvodnju vina - za male proizvođače i hobiste*. Federalni agromediteranski zavod, Mostar, 2011.

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