

# Dugoročni utjecaj termosonikacije na sadržaj fenola i antocijana u vinu kontaminiranom kvascem *Brettanomyces bruxellensis*

---

Jurić, Sara

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:391965>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Sara Jurić**

6849/PT

**DUGOROČNI UTJECAJ TERMOSONIKACIJE NA SADRŽAJ  
FENOLA I ANTOCIJANA U VINU KONTAMINIRANOM  
KVASCEM *Brettanomyces bruxellensis***

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Kemija i tehnologija vina

**Mentor:** Prof.dr.sc. Karin Kovačević-Ganić

**Zagreb, 2018**

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu projekta "Novi enološki postupci kao alternativa sumporovom dioksidu u proizvodnji visokokvalitetnih vina" (IP-09-2014-3796) financiranom od strane Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ).

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina, Zavoda za Prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić, te uz pomoć dr.sc. Stele Križanović.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo  
Laboratorij za kemiju i tehnologiju vina

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### DUGOROČNI UTJECAJ TERMOSONIKACIJE NA SADRŽAJ FENOLA I ANTOCIJANA U VINU KONTAMINIRANOM KVASCEM *Brettanomyces bruxellensis*

*Sara Jurić, 0058204713*

**Sažetak:** Kvasac *Brettanomyces bruxellensis* jedan je od najznačajnijih uzročnika kvarenja crnog vina jer negativno utječe na senzorske karakteristike vina mijenjajući aromu i boju vina. Za inaktivaciju kvasca *B. bruxellensis* prisutnog u crnom vinu primjenjena je netoplinska tehnika termosonikacija. Nakon tretmana uzorci su čuvani 90 dana s ciljem ispitivanja dugoročnog utjecaja termosonikacije na sadržaj fenola i antocijana u vinu različitog volumnog postotka alkohola, pH vrijednosti i sadržaja šećera te kontaminiranog kvascem *B. bruxellensis*. Spektrofotometrijskim analizama određen je udio ukupnih fenola i ukupnih antocijana. Tretman termosonikacije je pozitivno utjecao na očuvanje koncentracije ukupnih antocijana i koncentracije ukupnih fenola u crnom vinu kontaminiranom kvascem *B. bruxellensis* nakon 90 dana skladištenja. Ispitani fizikalno – kemijski parametri vina: pH vrijednost (3,5; 3,7 i 3,9), volumni udio alkohola (13 i 14 %, v/v) i sadržaj šećera (uobičajen za suha vina, dodatak 4 g/L šećera) nisu značajnije utjecali na koncentraciju ukupnih fenola i koncentraciju ukupnih antocijana u vinu skladištenom 90 dana.

**Ključne riječi:** antocijani, *B. bruxellensis*, fenoli, kvarenje vina, termosonikacija

**Rad sadrži:** 25 stranica, 11 slika, 1 tablicu, 29 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Prof.dr.sc. Karin Kovačević-Ganić

**Pomoć pri izradi:** dr.sc. Stela Križanović, suradnik

**Datum obrane:** lipanj 2018.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of food technology and biotechnology**  
**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Food Engineering**  
**Laboratory for Technology and Analysis of Wine**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Food Technology**

**LONG-TERM INFLUENCE OF THERMOSONICATION ON THE CONTENT OF  
PHENOLICS AND ANTOCYANINS IN THE WINE CONTAMINATED WITH  
*Brettanomyces bruxellensis* YEAST**

***Sara Jurić, 0058204713***

**Abstract:** *Brettanomyces bruxellensis* yeast is one of the most significant spoilage yeasts in red wine production because it can negatively affect the sensory characteristics of the wine by changing the aroma and color of the wine. Thermosonication is a non-thermal technique that was applied for inactivation of *B. bruxellensis* yeast present in red wine. After the treatment, the samples were stored for 90 days. The aim of this study was to determine the long-term influence of thermosonication on the content of total phenols and total anthocyanins in wine with different wine parameters such as alcohol, pH and content of sugar and also contaminated with *B. bruxellensis* yeast. The content of total phenolics and total anthocyanins was analysed by spectrophotometric methods. Our study showed that thermosonication had a positive influence on the preservation of total anthocyanins concentration and the concentration of total phenols in red wine contaminated with *B. bruxellensis* yeast after storage for 90 days. Tested wine parameters: pH (3.5, 3.7 and 3.9), alcohol (13 and 14 %, v/v) and sugar (common in dry wine and wine with excess sugar of 4 g/L) had no significant effect on the content of total phenolics and total anthocyanins in wine stored for 90 days.

**Key words:** anthocyanins, *B. bruxellensis*, phenolics, thermosonication, wine spoilage

**Thesis contains:** 25 pages, 11 figures, 1 table, 29 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of food technology and biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** PhD Karin Kovačević - Ganić, Full Professor

**Technical support and assistance:** PhD Stela Križanović, Scientific Assistant

**Defence day:** June, 2018.

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 2. TEORIJSKI DIO .....   | 2  |
| 2.1. Polifenolni spojevi .....   | 2  |
| 2.1.1. Polifenolni spojevi prisutni u grožđu i vinu .....                                | 2  |
| 2.1.2. Promjene u sastavu polifenolnih spojeva .....                                     | 4  |
| 2.1.3. Antioksidacijska svojstva polifenolnih spojeva i utjecaj na zdravlje čovjeka..... | 4  |
| 2.2. Antocijani.....   | 5  |
| 2.2.1. Antocijani prisutni u vinu .....  | 6  |
| 2.2.2. Promjene u sastavu antocijana.....  | 7  |
| 2.2.3. Piranoantocijani .....  | 8  |
| 2.3. Kvasac <i>Brettanomyces bruxellensis</i> .....                                      | 9  |
| 2.3.1. Utjecaj kvasca <i>B. bruxellensis</i> na vino .....                               | 10 |
| 2.3.2. Kontrola rasta kvasca <i>B. bruxellensis</i> .....                                | 11 |
| 2.3.4. Primjena netoplinske tehnike u vinarstvu .....                                    | 12 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....   | 14 |
| 3.1. Materijali.....   | 14 |
| 3.1.1. Mikroorganizam <i>Brettanomyces bruxellensis</i> .....                            | 14 |
| 3.1.2. Vino.....   | 14 |
| 3.1.3. Instrumenti .....   | 14 |
| 3.1.4. Laboratorijsko posuđe i pribor .....  | 14 |
| 3.1.5. Kemikalije .....  | 14 |
| 3.2. Metode .....  | 15 |
| 3.2.1. Priprema vina za tretman termosonikacijom .....                                   | 15 |
| 3.2.2. Tretman termosonikacijom i skladištenje uzoraka .....                             | 16 |
| 3.2.3. Priprema uzoraka za spektrofotometrijske analize .....                            | 16 |
| 3.2.4. Određivanje koncentracije ukupnih fenola .....                                    | 16 |
| 3.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih antocijana .....                                | 17 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA .....  | 18 |
| 5. ZAKLJUČAK.....  | 22 |
| 6. LITERATURA .....  | 23 |

## 1. UVOD

Na kemijski sastav vina utječu mnogi faktori od kojih su najznačajniji kakvoća i sastav mošta, tijek i uvjeti fermentacije, tehnološki postupci obrade mošta i vina te postupci čuvanja vina. Polifenolni spojevi jedni su od najznačajnijih spojeva u vinu zbog svojih antioksidacijskih karakteristika koji pozitivno utječu na zdravlje čovjeka, a prvenstveno zbog doprinosa senzorskim karakteristikama vina kao i kompleksnosti vina. Također polifenoli utječu na stabilnost i dozrijevanje vina. Polifenolni sastav vina ovisi o inicijalnom polifenolnom sastavu grožđa, postupcima proizvodnje vina i uvjetima tijekom starenja i skladištenja vina. Ovisno o procesu vinifikacije, crna vina se mogu razlikovati i po volumnom udjelu alkohola, pH vrijednosti te sadržaju šećera zaostalom nakon alkoholne fermentacije.

Tijekom proizvodnje vina odvijaju se mnogi procesi uzrokovani mikroorganizmima koji mogu imati pozitivan ili negativan utjecaj na sastav i organoleptička svojstva vina. Kvasac *Brettanomyces bruxellensis* pripada u grupu mikroorganizama uzročnika kvarenja vina jer negativno utječe na organoleptička svojstva i kvalitetu vina. Ovaj kvasac se može pojaviti u različitim fazama proizvodnje vina i svojom prisutnošću uzrokovati brojne probleme u vinariji. *B. bruxellensis* ima sposobnost proizvodnje hlapivih fenola (4-etilfenol i 4-etilgvajakol), spojeva koji negativno utječu na aromu crnih vina, a nastaju iz hidroksicimetnih kiselina prirodno prisutnih u vinu. Također ovaj kvasac utječe i na boju crnih vina jer posjeduje glikozidnu aktivnost koja mu omogućuje cijepanje glukoze iz monoglukozidnih antocijana, crvenih pigmenata u crnom vinu, stvarajući nebojene pseudo forme antocijana kao i sposobnost stvaranja vinilfenol piranoantocijana. Danas postoje mnoge kemijske, biološke i fizikalne metode kojima se provodi suzbijanje rasta kvasca *B. bruxellensis*. Od kemijskih metoda najvažnija je primjena sumporovog dioksida, od bioloških metoda primjena proteina i polisaharida, a primjena fizikalnih metoda poput netoplinskih tehnika sve se više istražuje u suzbijanju neželjenih mikroorganizama u proizvodnji vina. Jedna od netoplinskih tehnika s velikim potencijalom u primjeni u vinarskoj industriji je ultrazvuk visokih snaga. Kombinacija ultrazvuka visokih snaga s povišenom temperaturom povećava inaktivaciju mikroorganizama, a može smanjiti dužinu tretmana te time osigurati smanjenje gubitka organoleptičkih karakteristika vina kao što su boja, miris i okus.

Cilj ovog rada bio je istražiti dugoročni utjecaj tretmana termosonikacije na sadržaj fenola i antocijana u vinu različitog volumnog postotka alkohola, pH vrijednosti i sadržaja šećera te kontaminiranog kvascem *B. bruxellensis*.

## **2. TEORIJSKI DIO**

### **2.1. Polifenolni spojevi**

Polifenoli su skupina spojeva koji sadrže jednu ili više hidroksilnih skupina direktno vezanih na aromatski prsten. Struktura polifenola je vrlo slična alkoholima koji imaju alifatsku strukturu gdje je hidroksilna skupina vezana na ugljikovodični lanac, no zbog prisutnosti aromatskog prstena kod fenola i gubitka pozitivno nabijenog vodikova atoma, polifenoli pripadaju skupini slabih kiselina. Polifenolni spojevi obuhvaćaju jako veliku skupinu kemijskih spojeva različitih struktura, a mogu se klasificirati na nekoliko načina. Harborne and Simmons (1964) podijelili su polifenolne spojeve u grupe na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli. Druga klasifikacija prema Ribereau-Gayon (1972) dijeli polifenolne spojeve u tri grupe. Prva grupa su široko rasprostranjeni polifenoli koji su prisutni u svim biljkama, drugu grupu čine slabije rasprostranjeni polifenoli, dok treću čine polifenoli kao polimeri. Treća klasifikacija prema Swain i Bate-Smith (1962) dijeli polifenole na "uobičajene" i "manje uobičajene" (Vermerris i Nicholson, 2006). Polifenolni spojevi imaju različite funkcije u rastu, razvoju i zaštiti biljaka od insekata, bakterija i virusa, a mogu biti signalne molekule ili pigmenti. Većina polifenolnih spojeva u biljkama prisutni su u obliku estera ili glikozida, a ne u slobodnom obliku (Vermerris i Nicholson, 2006).

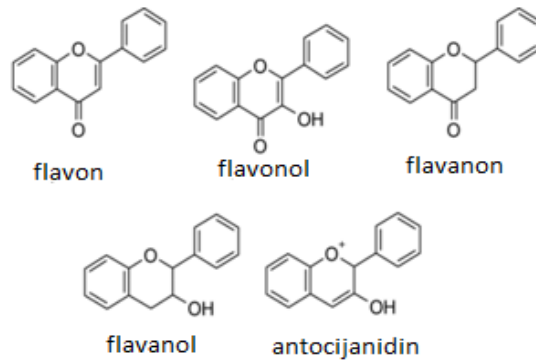
#### **2.1.1. Polifenolni spojevi prisutni u grožđu i vinu**

Sadržaj polifenola u zreloom grožđu uvelike utječe na aromu i kvalitetu vina kao krajnjeg proizvoda. Mnogi faktori poput sorte, zrelosti i tla, utječu na sastav i kvalitetu fenolnih spojeva u bobici grožđa (Weston, 2000). Polifenolni spojevi su jako važni za kvalitetu vina i upravo iz toga razloga napravljena su mnoga istraživanja koja proučavaju utjecaj vinogradarske prakse na koncentraciju polifenolnih spojeva u grožđu (Kennedy, 2008). Utvrđeno je da koncentracija polifenola ovisi o godini berbe grožđa, kao i agro i kultivarnim uvjetima razvoja grožđa (Kennedy, 2008). Poznato je da se koncentracija polifenola povećava s dozrijevanjem bobice (Kennedy, 2008). Također, različito izlaganje suncu i temperaturi utječe na proizvodnju polifenolnih spojeva u grožđu (Weston, 2000).

Sadržaj polifenolnih spojeva u vinu nije isti kao i onaj u grožđu jer se tijekom procesa proizvodnje vina događaju razne strukturne promjene polifenolnih spojeva, koje započinju kod muljanja i ruljanja grožđa, zatim tijekom procesa fermentacije i naposljetku za vrijeme starenja vina (López-Vélez i sur., 2003). Sve te strukturne promjene polifenolnih spojeva tijekom procesa proizvodnje i starenja vina nesumnjivo utječu na organoleptička svojstva vina (Kontoudakis i sur., 2011). Zbog svega navedenoga, polifenolni sastav vina ovisi o inicijalnom



polifenolnom sastavu grožđa, proizvodnji vina odnosno enološkim tretmanima i o uvjetima tijekom starenja i skladištenja vina.



**Slika 1.** Strukture flavonoida prisutnih u vinu (Balasundram i sur., 2006).

Polifenolni spojevi u vinu mogu potjecati iz hrastove bačve, no najveći udio polifenolnih spojeva u vinu potječe iz same sirovine tj. grožđa. Polifenoli su u vinu jako važne komponente koje utječu na boju, okus i miris vina, a također su i glavni parametri o kojima ovisi stabilnost i dozrijevanje vina (Kennedy, 2008). Polifenolni spojevi prisutni u vinu dijele se na neflavonoide (hidroksicimetne kiseline, hidroksibenzojeve kiseline, hidrolizirajuće tanine, stilbene), flavonoide (flavan-3-ole, flavonole, antocijane) i polimerne kondenzirane tanine (Waterhouse, 2002). Tri najvažnija spoja koji utječu na samu kvalitetu vina su hidroksicimetne kiseline, antocijani i tanini. U bijelim vinima najvažniji polifenolni spojevi su hidroksicimetne kiseline i monomeri flavan-3-ola koji uvelike utječu na vizualni izgled vina, dok su u crnim vinima tanini i antocijani najvažnije vrste polifenola. Hidroksicimetne kiseline su najzastupljenija skupina polifenolnih spojeva u bijelim vinima, i skupina koja najbrže oksidira i time izaziva pojavu posmeđivanja što je veliki problem u bijelim vinima (Waterhouse, 2002). Najzastupljenije hidroksicimetne kiseline u grožđu i vinu su kafeinska, kumarinska i ferulinska kiselina. Od ostalih neflavonoida, hidrolizirajući tanini potječu iz hrastove bačve tijekom čuvanja vina, a glavni predstavnik stilbena, resveratrol, nastaje u vinu koje potječe iz grožđa napadnutim plijesnima *Botrytis cinerea*. Flavonoidi su spojevi koji u svojoj strukturi imaju više aromatskih prstena na koje je vezana hidroksilna skupina. Većinu polifenolnih spojeva u crnim vinima čine flavonoidi koji u vino dolaze ekstrakcijom iz pokožice i sjemenki grožđa tijekom procesa fermentacije. Flavan-3-oli su najzastupljenija skupina flavonoida, najviše prisutni u formi oligomernih i polimernih proantocijanidina, a nalaze se u pokožici i sjemenci grožđa. Flavonoli se nalaze u pokožici bobice grožđa i koncentracija im se povećava sa što većom izloženosti suncu, dok su antocijani crveno obojeni polifenolni spojevi kojima se boja mijenja procesom

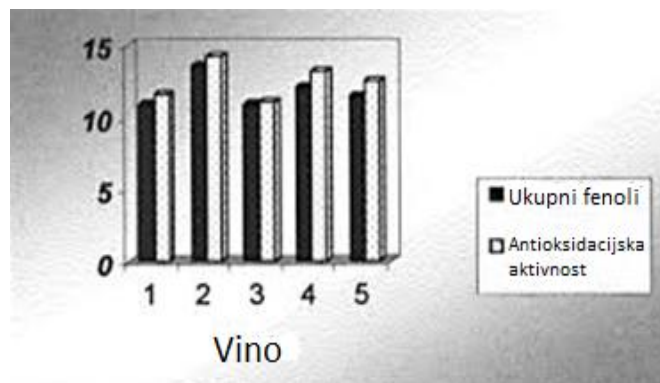
starenja vina, a nalaze se u pokožici (Waterhouse, 2002). Proantocijanidini, odnosno kondenzirani tanini od svih su spojeva najvažniji za osjećaj teksture kao što su gorčina i trpkoca vina i zajedno sa antocijanima stvaraju obojene polimere koji su važni za dugoročnu stabilnost boje crnih vina (Kontoudakis i sur., 2011). Struktura proantocijanidina odgovorna je za trpkocu vina na način da s povećanjem stupnja polimerizacije raste i osjećaj trpkocce, tj. stezanja usta.

### **2.1.2. Promjene u sastavu polifenolnih spojeva**

Na promjene kod fenolnih spojeva utječe nekoliko faktora: temperatura, pH, koncentracija slobodnog SO<sub>2</sub> i izloženost kisiku kao najutjecajnijem faktoru (Kontoudakis i sur., 2011). Istraživanja su pokazala da neki prirodni polifenolni spojevi koji su dio naše prehrane mogu biti oštećeni tijekom izloženosti visokom pH te da osjetljivost na pH ovisi o njihovoj kemijskoj strukturi (Friedman i Jurgens, 2000). Poznato je da se struktura antocijana mijenja ovisno o pH uvjetima (Kontoudakis i sur., 2011). U jako kiselom pH području prisutna je struktura flavijevog kationa koji je crvene boje, a povećanjem pH vrijednosti koncentracija flavijevog kationa se smanjuje. Uslijed deprotoniranja dolazi do nastajanja plavo obojene kvinoidalne baze ili do nastajanja neobojenih poluketala zbog dehidracije i deprotoniranja. Sukladno tome, što je niža pH vrijednost vina, veća je koncentracija flavijevog kationa, a time i veći udio crveno obojenih antocijana. Nekoliko istraživanja pokazalo je da su polimerni pigmenti puno manje osjetljivi na navedene promjene od antocijana (Dallas i Laureano, 1994).

### **2.1.3. Antioksidacijska svojstva polifenolnih spojeva i utjecaj na zdravlje čovjeka**

Kao polifenolni spojevi, flavonoidi djeluju kao antioksidansi uklanjajući slobodne radikale (stvaranjem manje reaktivnih flavonoid fenoksil radikala) i keliranjem metalnih iona (Minussi i sur., 2003). Istraživanje Ghiselli i suradnika (1998) je pokazalo da su antocijani najviše odgovorni za zaštitu od slobodnih radikala od svih polifenolnih spojeva u vinu. Također, antocijani pokazuju veću mogućnost uklanjanja slobodnih radikala i od tanina. Ipak, antioksidacijski kapacitet crnih vina najvjerojatnije možemo pripisati sinergijskom djelovanju svih polifenolnih spojeva (López-Vélez i sur., 2003). Istraživanja su također potvrdila pozitivnu korelaciju između koncentracije galne kiseline, katehina, epikatehina i ukupnih polifenola i antioksidacijskog potencijala vina (Minussi i sur., 2003).



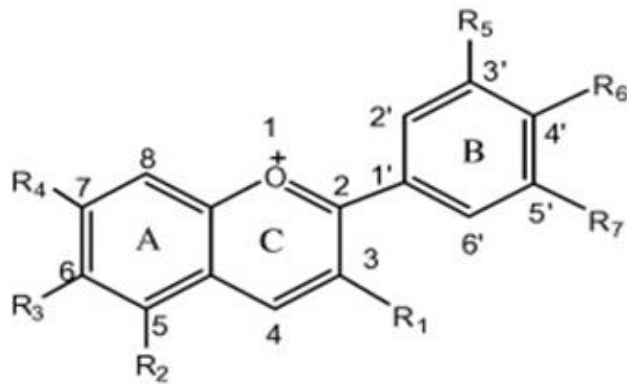
**Slika 2.** Odnos između antioksidacijske aktivnosti i koncentracije ukupnih fenola u crnom vinu (López-Vélez i sur., 2003).

Polifenoli imaju važnu ulogu u ljudskom zdravlju kao fitonutrijenti i istražuju se kao potencijalni sudionici u prevenciji protiv degenerativnih bolesti kod ljudi (Minussi i sur., 2003). Nedavna istraživanja pokazala su da polifenolni spojevi iz prehrambenih proizvoda zahvaljujući svojoj antioksidativnoj aktivnosti imaju značajnu ulogu u zdravlju čovjeka, osobito kod bolesti kao što su koronarna bolest srca, ateroskleroza, inflamacija i mutaganeza koja dovodi do karcinogeneze. Potvrđeno je da crno vino ima veću ulogu u zaštiti od koronarne bolesti srca u odnosu na druga alkoholna pića, te da polifenolni spojevi u vinu mogu spriječiti agregaciju trombocita i sudjeluju u prevenciji protiv oksidacije LDL-a (López-Vélez i sur., 2003). Druge studije utvrdile su da resveratrol koji je prisutan u visokoj koncentraciji u crnom grožđu ima jaku kemopreventivnu aktivnost, dok spojevi poput kvercetina i trans-resveratrola smanjuju pojavu stanica raka dojke. Također, fenoli iz vina se absorbiraju u krvotok povećavajući sadržaj antioksidansa u ljudskom serumu (Weston, 2000).

## 2.2. Antocijani

Antocijani su kod biljaka najveća skupina pigmenata topivih u vodi (Bridle i Timberlake., 1997), najvažniji biljni pigmenti vidljivi ljudskom oku, a pripadaju široko rasprostranjenoj skupini polifenolnih spojeva, flavonoidima (Kong i sur., 2003).

Osnovna struktura antocijana su antocijanidini. Antocijanidini se sastoje od 3 aromatska prstena A, B i C. Aromatski prsten A vezan je na heterociklični prsten C koji sadrži kisikov atom, a prsten C vezan je ugljik-ugljik vezom za treći aromatski prsten B. Kada su antocijanidini u glikozidnoj formi vezani za jedinicu šećera nazivaju se antocijani.



**Slika 3.** Struktura antocijana (Castañeda-Ovando i sur., 2009).

Najznačajnije svojstvo antocijana je da daju boju biljkama i biljnim proizvodima, ali uz to ponašaju se i kao antioksidansi, fitoalergeni te djeluju antibakterijski (Kong i sur., 2003). Također, imaju ulogu u zaštiti biljaka od insekata. Antioksidativni mehanizmi antocijana su doniranje vodikovog atoma, vezanje proteina i keliranje metalnih iona čime se može spriječiti oksidacija askorbinske kiseline.

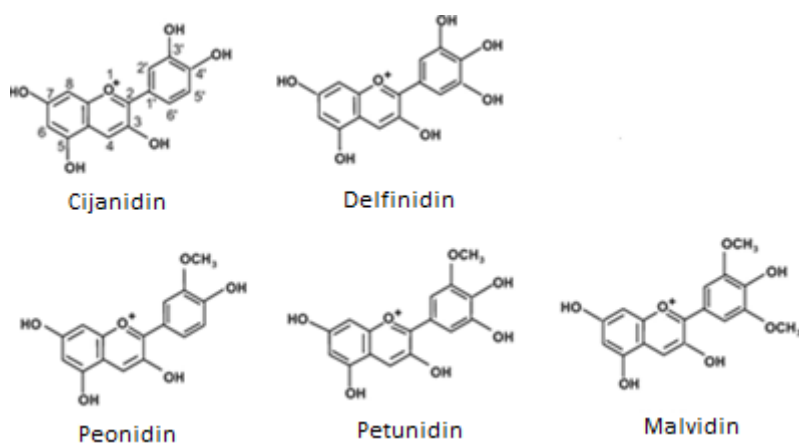
Dosadašnje studije pokazale su da antioksidativna aktivnost antocijana doprinosi zaštitnom učinku voća i povrća protiv degenerativnih i kroničnih bolesti te da antocijanidini i antocijani imaju veću antioksidacijsku aktivnost od vitamina C i E. Ovi spojevi imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala donirajući vodikove atome iz svoje fenolne strukture i zbog toga pokazuju antikancerogeni učinak (Castañeda-Ovando i sur., 2009). Također, dosadašnja istraživanja pokazala su važnu ulogu antocijana u prevenciji protiv neuroloških i kardiovaskularnih bolesti, raka i dijabetesa.

### 2.2.1. Antocijani prisutni u vinu

Postoji mnogo različitih vrsta antocijana u prirodi. Glavne razlike među njima su broj hidroksilnih skupina, broj vezanih jedinica šećera, te alifatski ili aromatski hidroksilati vezani na jedinicu šećera u molekuli kao i samo mjesto vezanja (Castañeda-Ovando i sur., 2009). Do sada je potvrđeno više od 500 različitih antocijana i 23 antocijanidina od kojih je samo 6 prisutno u biljkama. Antocijani su vrlo nestabilni spojevi podložni degradaciji. Na njihovu stabilnost utječe nekoliko faktora kao što su pH, temperatura, kemijska struktura, svjetlost, kisik, prisutnost proteina, enzima i metalnih iona (Castañeda-Ovando i sur., 2009).

Antocijani su prirodni pigmenti koji biljnim tkivima daju široki spektar boja i odgovorni su za crveno-ljubičastu boju u crnim vinima. Postoji 5 osnovnih vrsta antocijana u vinu a to su cijanidin, delfinidin, peonidin, petunidin i malvidin koji je najviše zastupljen u crnim vinima (Waterhouse, 20002). Antocijani mogu biti prisutni u kemijskim formama različitih boja koje

ovise o pH vrijednosti medija u kojem se nalaze (Sáenz-López i sur., 2003). Nabijeni C prsten je elektrofilni centar koji može reagirati s nukleofilima kao što su voda ili bisulfit, te ovisi o pH vrijednosti u kojoj se nalazi. U takvim reakcijama, dolazi do gubitka crvene boje ako se naruši elektronska konfiguracija C prstena (Waterhouse, 2002). U kiselom pH području (pH 1) prevladava flavijev kation crvene boje i antocijani su stabilni samo u tom pH području gdje prevladava flavijev kation. U pH području između 2 i 4 prevladava nestabilna kvinoidalna forma plave boja, u pH vrijednosti između 5 i 6 nastaju nebojene pseudo forme (Sáenz-López i sur., 2003), a iznad pH 7 dolazi do degradacije antocijana (Castañeda-Ovando i sur., 2009).



**Slika 4.** Antocijani prisutni u vinu (Rodriguez-Amaya, 2017).

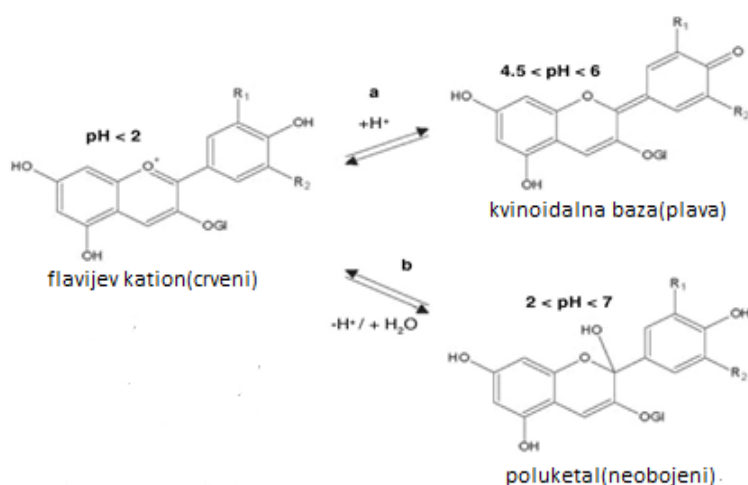
Crvena boja vina potječe iz dviju reakcija koje obuhvaćaju prevođenje antocijana iz grožđa u druge pigmente te kopigmentaciju antocijana. Pigmenti dobiveni transformacijom ili kopigmentacijom antocijana imaju široki spektar boja od narančaste do plave. Spojevi nastali reakcijom antocijana i tanina su crvene boje kao i njihovi prekursori antocijani, piranoantocijani su narančaste, a flavanol-piranoantocijani plave boje (Castañeda-Ovando i sur., 2009). Sve te novonastale strukture mijenjaju boju ovisno o pH području u kojem se nalaze.

### 2.2.2. Promjene u sastavu antocijana

Antocijani mogu ući u interakciju s drugim fenolnim spojevima u otopini i tako stvoriti efekt kopigmentacije (Waterhouse, 2002). Kopigmentacijom ne dolazi do stvaranja kemijskih veza nego do prijenosa naboja i stvaranja  $\pi$ - $\pi$  interakcija. Kada u otopini postoje 2 aromatska prstena koji su različite elektronske gustoće, dolazi do preraspodjele elektrona između prstena bogatog elektronima i prstena siromašnog elektronima te se tako stvaraju ove slabe kemijske veze. S obzirom da je flavijev kation pozitivno nabijen, ulazi u interakcije sa supstratima koji

su bogati elektronima. Takvi supstrati su polifenolni spojevi jer sadrže fenolnu grupu koja je jaki elektron donor i zbog toga su interakcije koje dovode do kopigmentacije vrlo česte. Kopigmentacijom dolazi do stabilizacije flavijevog kationa čime se povećava koncentracija crveno obojenih struktura antocijana u vinu, a kopigmenti mogu biti flavonoidi, alkaloidi, amino kiseline, organske kiseline, nukleotidi, polisaharidi, metali ili drugi antocijani (Castañeda-Ovando i sur., 2009).

Obojene forme antocijana imaju planarnu strukturu i mogu ulaziti u reakcije sa drugim supstratima planarne strukture te tako stvoriti molekulu u kojoj je flavijev kation zaštićen od nukleofilnog napada vode i drugih tvari poput peroksida i sumporovog dioksida (Castañeda-Ovando i sur., 2009). Na taj način pomiče se ravnoteža od neobojenih hidratiziranih formi prema crvenom flavijevom kationu i plavoj kvinoidalnoj bazi što je izrazito važno za vino koje se nalazi u pH području u kojem dominiraju hidratizirane forme antocijana jer se tako povećava intenzitet boje i dolazi do nastajanja ljubičaste boje. Također, utvrđeno je da stabilnost boje nije povezana s molekulskom masom jer se polimeri nastali reakcijom tanina i antocijana ponašaju jednako kao i njihovi prekursori antocijani u ovisnosti o pH području i tretmanu sulfitom.



**Slika 5.** Forme antocijana u ovisnosti o pH vrijednosti (Cheynier i sur., 2005).

### 2.2.3. Piranoantocijani

Reakcijom antocijana sa spojevima male molekulske mase poput 4-vinilfenola, piruvata i flavonola nastaju produkti piranoantocijani (Castañeda-Ovando i sur., 2009). Zadnjih godina piranoantocijani su privukli mnogo pažnje jer su puno stabilniji pri različitim pH vrijednostima od antocijana. Do strukture piranoantocijana dolazi ciklizacijom između C-4 ugljikova atoma i

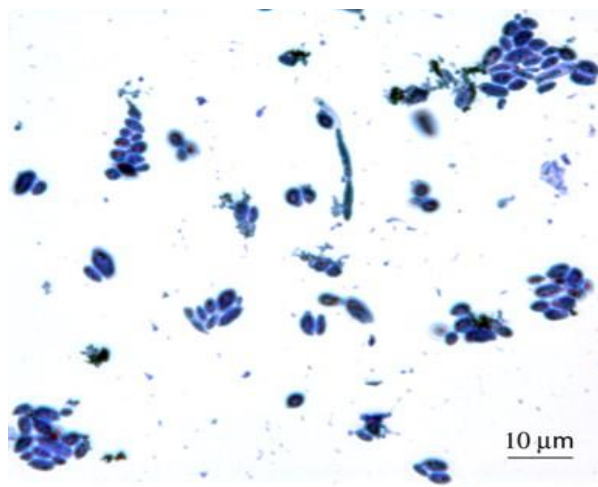
hidroksilne grupe na C-5 ugljikovom atomu čime dolazi do stvaranja još jednog aromatskog prstena koji daje dodatnu stabilnost strukturi (Castañeda-Ovando i sur., 2009). Studije su pokazale da koncentracija piranoantocijana ovisi o koncentraciji antocijana, piruvata, acetaldehida, pH i temperaturi te da se s dužim starenjem vina povećava koncentracija ovih novonastalih pigmenata. Također, tijekom starenja vina dolazi do smanjenja trpkocće zbog reakcije cijepanja antocijana u male strukture tanina.

### **2.3. Kvasac *Brettanomyces bruxellensis***

Kvasac *Brettanomyces bruxellensis* može se pronaći na površini pokožice grožđa, u bačvi, no najviše problema stvara njegova prisutnost u vinu.

Također se kvasac *B. bruxellensis* može pronaći u pivu, jabukovači, pogonu za proizvodnju jabukovače, tekili i opremi za proizvodnju mliječnih proizvoda. *Brettanomyces* se može naći u ovim proizvodima zahvaljujući svojoj sposobnosti da preživi vrlo dugi vremenski period u okolišu s niskim sadržajem hranjivih tvari, u prisutnosti alkohola i niskog pH i započne rast tijekom skladištenja i starenja proizvoda.

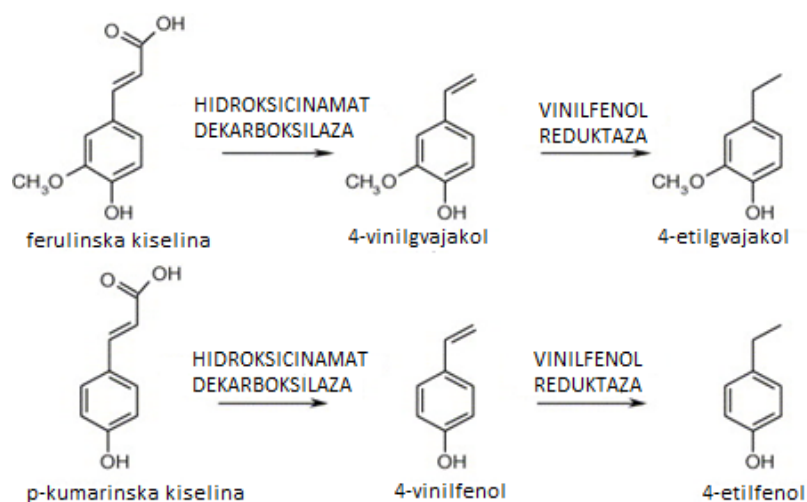
*Brettanomyces* je ne-sporogeni oblik roda *Dekkera*. Postoji pet vrsta koje pripadaju rodu *Brettanomyces/Dekkera* a to su *Brettanomyces custersianus*, *Brettanomyces naardenensis*, *Brettanomyces nanus*, *Brettanomyces anomalus*, i *B. bruxellensis*. *B. bruxellensis* ima ovalno-eliptični oblik i razmnožava se pupanjem. Razmnožavanje pupanjem odvija se na način da iz stanice kvasca izrasta pup, potom se jezgra dijeli na dva dijela od čega jedan dio prelazi u pup koji kada desegne određenu veličinu se odvaja od stanice majke i dalje na isti način razmnožava.



**Slika 6.** Fotomikrografija kvasca *B. bruxellensis* (Wedral i sur., 2010).

### 2.3.1. Utjecaj kvasca *B. bruxellensis* na vino

Kvasac *B. bruxellensis* stvara karakteristične spojeve koji mogu utjecati na aromu i kompleksnost vina. Nastali metaboliti prisutni u malim koncentracijama utječu na kompleksnost vina, dok u većim koncentracijama mogu doprinijeti neželjenom okusu i mirisu vina koji nadvladava samu aromu vina. Stoga metaboliti nastali djelovanjem kvasca *B. bruxellensis* mogu djelovati pozitivno ili negativno, ovisno o njihovoj koncentraciji u vinu i o očekivanjima potrošača. Glavni spojevi koji utječu na senzorska svojstva vina, a nastaju metabolizmom kvasca *B. bruxellensis* su hlapivi fenoli (4-etilfenol i 4-etilgvajakol). Ovi spojevi nastaju enzimskim reakcijama kojom se ferulinska i *p*-kumarinska kiselina prevode u 4-vinilfenol i 4-vinilgvajakol koji se zatim pomoću enzima vinilfenol reduktaze reduciraju u 4-etilfenol i 4-etilgvajakol. Miris vina koji sadrži hlapive fenole opisuje se kao "po fenolima" ili "medicinski", "po konjskom znoju ili štali". Fenolni spojevi u vinu ne inhibiraju aktivnost cinamat dekarboksilaze zbog čega kvasac *B. bruxellensis* proizvodi nekoliko miligrama po litri etilfenola u vinu. Kontrola rasta kvasca *B. bruxellensis* je najveći mikrobiološki izazov vinara jer može doći do značajnih ekonomskih gubitaka.



**Slika 7.** Stvaranje 4-etilfenola i 4-etilgvajakola iz hidroksicimetnih kiselina kao prekursora (Suarez i sur., 2007).

Osim promjena okusa i arome, vino kontaminirano ovim kvascem može imati i drukčiju boju zbog glikozidnih reakcija i stvaranja vinilfenol piranoantocijana u vinu. Nekoliko istraživanja dokazalo je glikozidnu aktivnost kvasca *B. bruxellensis*. Veliki dio ukupne koncentracije glikozida u grožđu čine monoglukozidi antocijana koji su najvažniji crveni pigmenti. Hidrolizom



glukoze stvaraju se forme antocijana koje se prevode u nebojene pseudo baze čime dolazi do gubitka crvene boje vina i razloga nepoželjne boje vina kontaminiranog kvascem *B. bruxellensis* (Oelofse i sur., 2008). Postoji i druga teorija koja objašnjava gubitak boje vina zbog hidroksicinamat dekarboksilazne aktivnosti kvasca *B. bruxellensis* i sposobnosti stvaranja vinilfenola iz hidroksicimne kiseline. U reakciji kondenzacije, vinilfenoli s antocijanima iz grožđa daju spojeve vinilfenol piranoantocijane čime se smanjuje koncentracija antocijana i dolazi do gubitka crvene boje vina.

Dosadašnja istraživanja uočila su da *B. bruxellensis* nije jedini mikroorganizam u vinu koji stvara spojeve 4-etilfenol i 4-etilgvajakol, no od svih prisutnih mikroorganizama proizvodi najveću koncentraciju etilfenola. Na stvaranje Brett karaktera vina (mirisa vina po konjskom znoju, fenolima, medicinski) utječu: soj kvasca *B. bruxellensis*, pH vrijednost vina, dostupnost hranjivih tvari u moštu/vinu te u kojoj fazi proizvodnje vina je došlo do kontaminacije. *B. bruxellensis* može biti prisutan u bilo kojoj fazi proizvodnje vina, no s obzirom da je tolerantan na visoki udio alkohola najčešće se pojavljuje tijekom starenja vina u bačvi, prekinute alkoholne fermentacije ili jabučno mliječne fermentacije.

*B. bruxellensis* može tolerirati 14-14,5 % (v/v) etanola te rasti u vinima sa visokim postotkom alkohola ili tijekom prekinute fermentacije, a može i usporiti rast kvasca *Saccharomyces* proizvodnjom octene kiseline. Crna vina podložna su kontaminaciji kvascem *B. bruxellensis* jer su manje kisela, imaju veći sadržaj polifenolnih spojeva i sazrijevaju u bačvi. Visoko kvalitetna vina najčešće stare u hrastovim bačvama čime su više izložena kontaminaciji ovim kvascem i zbog toga može doći do kvarenja vina iako je ono prvotno bilo vrhunske kvalitete. Malolaktička fermentacija je također faza u kojoj može doći do kontaminacije zbog niske koncentracije sumpornog dioksida. Kvasac *B. bruxellensis* najčešće je prisutan u crnim vinima, a manje u bijelim zbog efikasnosti sumpornog dioksida pri niskoj pH vrijednosti.

### **2.3.2. Kontrola rasta kvasca *B. bruxellensis***

Kvasac *B. bruxellensis* pojavljuje se na oštećenom grožđu i na vinarskoj opremi, stoga je vrlo bitna stavka u zaštiti od pojave kvasca sanitacija i ispravna higijena. Također, tijekom fermentacije važno je dodati adekvatnu količinu sumporovog dioksida kako bi se spriječio rast ovog mikroorganizma. Koncentracija slobodnog sumporovog dioksida trebala bi biti 30 mg/L tijekom cijelog procesa proizvodnje vina, iako se kod vina sa visokim pH smanjuje učinak dodanog sumporovog dioksida. Tijekom fermentacije vina potrebno je kontrolirati dodatak starter kultura, temperaturu, volumni udio alkohola i koncentraciju kiselina te izloženost kisiku (Wedral i sur., 2010). Korištenjem grožđa sa većim udjelom kiselina ili dodatkom kiselina tijekom proizvodnje vina može se utjecati na smanjenje rasta kvasca iz roda *Brettanomyces*,

iako su neka istraživanja pokazala da kvarenje vina ovim kvascem ne ovisi o pH vrijednosti vina. Također, tijekom fermentacije može doći do kontaminacije ovim kvascem jer kisik pogoduje rastu *B. bruxellensis*, stoga se mikrooksigenacija treba koristiti s oprezom. Tijekom fermentacije potrebno je posebno obratiti pažnju na potencijalnu pojavu ovog kvasca i poduzeti sve mjere opreza jer mjere kontrole nakon ove faze proizvodnje vina više ne mogu ukloniti utjecaj kvasca *B. bruxellensis*, nego ga samo reducirati. Filtriranje i bistrenje vina proteinima također se koristi za smanjenje broja kontaminirajućeg kvasca iako ti postupci nisu poželjni kod visoko kvalitetnih vina. Nefiltrirana vina ili vina sa zaostalim šećerom tretiraju se dimetil dikarbonatom koji inaktivira *B. bruxellensis* i druge kvasce te se na taj način sprječava naknadna fermentacija u boci. Postupci za kontroliranje nastanka neželjene arome djelovanjem kvasca *B. bruxellensis* su temeljito čišćenje i održavanje higijene u vinariji, regulacija pH, korištenje sumporovog dioksida, smanjeno izlaganje mošta kisiku i najvažnije, korištenje nekontaminiranih bačvi (Wedral i sur., 2010).

#### **2.3.4. Primjena netoplinske tehnike u vinarstvu**

Osim navedenih metoda za prevenciju rasta kvasca *B. bruxellensis*, istražuju se i netoplinske tehnike kako bi se primjenile za smanjenje broja stanica ovoga kvasca tijekom vinifikacije. Jedna od navedenih netoplinskih tehnika je ultrazvuk visokih snaga (HPU). Općenito se raspon ultrazvuka može podijeliti na tri različita raspona frekvencija: dijagnostički ultrazvuk (1-10 MHz), ultrazvuk visoke frekvencije koji ima 100 kHz-1 MHz s niskim intenzitetom zvuka (0,1-1 W cm<sup>-2</sup>) i ultrazvuk niske frekvencije u kHz (20-100 kHz) s visokim intenzitetom zvuka (10-1000 Wcm<sup>-2</sup>) (Gracin i sur., 2015). Snaga ultrazvuka (20-100 kHz) može imati mehanički učinak kavitacije u tekućim sustavima i na taj način mijenjati fizikalna i kemijska svojstva hrane ovisno o vrsti uzoraka u kojima se primjenjuje ultrazvuk visokih snaga (Gracin i sur., 2015). Uz fizikalni efekt (kavitaciju i mikro-mehaničke šokove) HPU uzrokuje i kemijski efekt (stvaranje slobodnih radikala). HPU se može primjenjivati u šaržnoj i kontinuiranoj izvedbi. Ako se ultrazvuk visokih snaga kombinira s povišenom temperaturom govorimo o termosonikaciji. Također primjenom tretmana termosonikacije može se smanjiti dužina tretmana što dovodi do smanjenja gubitka organoleptičkih karakteristika vina kao što su boja, okus i miris. Inaktivacija mikroorganizama u vinu ovisi o obliku, veličini i vrsti. HPU se može primijeniti u vinarstvu kako bi se smanjio utjecaj neželjenih mikroorganizama tijekom prerade mošta, alkoholne fermentacije, jabučno mliječne fermentacije i sanitacije bačava. Istraživanja su pokazala da se tretmanom vina s ultrazvukom visokih snaga može reducirati broj aktivnih stanica kvasca *B. bruxellensis* u vinu što je najvjerojatnije rezultat kombiniranog djelovanja kavitacije, stvaranja slobodnih radikala i vodikovog peroksida te povišene temperature koji zajedno s prisutnim

etanolom u vinu uzrokuju pucanje stanice (Gracin i sur., 2015; Gracin i sur., 2017) ili prelazak stanica u „viable but non-culturable“ stanje.

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. Materijali**

##### **3.1.1. Mikroorganizam *Brettanomyces bruxellensis***

Pri izradi završnog rada korišten je kvasac *Brettanomyces bruxellensis* CBS 2499 (iz zbirke mikroorganizama Westerdijk Fungal Biodiversity Institute).

##### **3.1.2. Vino**

Pri izradi završnog rada korišteno je mlado crno vino Cabernet Sauvignon iz vinarije Erdut, proizvedeno 2016 godine. Fizikalno - kemijski parametri mladog crnog vina su: 13 % (v/v) alkohola; pH 3,5; 3,7 g/L reducirajućih šećera; 6,4 g/L ukupne kiselosti izražene kao vinska kiselina; 0,6 g/L hlapive kiselosti izražene kao octena kiselina; 0,5 g/L jabučne kiseline, 1,5 g/L mliječne kiseline; 12 mg/L slobodnog SO<sub>2</sub> i 24 mg/L ukupnog SO<sub>2</sub>.

##### **3.1.3. Instrumenti**

- Centrifuga, Rotina 380 R, Hettich, Njemačka
- Tehnička vaga, Sartorius, Njemačka
- Ultrazvučni procesor S-4000, Misonix Sonicators, Newtown, USA
- Spektrofotometar Specord 50 Plus AnalytikJena, Jena, Njemačka
- Ultrazvučna kupelj, Bandelin Sonorex, Berlin, Njemačka

##### **3.1.4. Laboratorijsko posuđe i pribor**

- Menzure, čaše, odmjerne tikvice
- Staklene bočice
- Staklene epruvete
- Stalak za epruvete
- Staklene pipete
- Propipete
- Mikropipete 100 µL, 1000 µL, 5000 µL
- Tipsevi za mikropipete
- Staklene kivete od 10 mm za spektrofotometar

##### **3.1.5. Kemikalije**

- 96 % etanol s 0,1 (v/v) HCl
- 2 % vodena otopina klorovodične kiseline

- 15 % otopina natrijevog hidrogensulfita
- Folin-Ciocalteu reagens
- 20 % otopina natrijevog karbonata
- Galna kiselina u 12 % etanolu

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprema vina za tretman termosonikacijom

Pojedinim uzorcima osnovnog mladog crnog vina korigiran je udio alkohola, sadržaj šećera te pH. Volumni udio alkohola je povećan dodatkom apsolutnog alkohola, dok je sadržaj šećera povećan dodatkom 4 g/L glukoze. Za korekciju pH na 3,7 odnosno 3,9 korištena je 10 M otopina NaOH. Zatim su svi uzorci vina inokulirani kvascem *B. bruxellensis* 24 sata prije tretmana, a boce su inkubirane na 20 °C ± 2 °C.

**Tablica 1.** Fizikalno - kemijski parametri vina korišteni u istraživanju.

| Varijanta | pH  | Šećer (g/L)              | Alkohol (% v/v) |
|-----------|-----|--------------------------|-----------------|
| 1         | 3,5 | uobičajen kod suhih vina | 13              |
| 2         | 3,7 | uobičajen kod suhih vina | 13              |
| 3         | 3,9 | uobičajen kod suhih vina | 13              |
| 4         | 3,5 | dodatak 4 g/L glukoze    | 13              |
| 5         | 3,7 | dodatak 4 g/L glukoze    | 13              |
| 6         | 3,9 | dodatak 4 g/L glukoze    | 13              |
| 7         | 3,5 | uobičajen kod suhih vina | 14              |
| 8         | 3,7 | uobičajen kod suhih vina | 14              |
| 9         | 3,9 | uobičajen kod suhih vina | 14              |
| 10        | 3,5 | dodatak 4 g/L glukoze    | 14              |
| 11        | 3,7 | dodatak 4 g/L glukoze    | 14              |
| 12        | 3,9 | dodatak 4 g/L glukoze    | 14              |

### **3.2.2. Tretman termosonikacijom i skladištenje uzoraka**

Uzorci različitog crnog vina inokulirani kvascem *B. bruxellensis* (200 mL) uliveni su u staklenu čašu od 250 mL. Za tretman je korišten ultrazvučni proces snage 600 W i 20 kHz. U uzorak je uronjena sonda (promjera=12,7 mm) i centrirana u sredinu čaše. Korištena je amplituda ultrazvučnog vala od 100 % (120 μm). Uzorci su prije tretmana zagrijani u vodenoj kupelji oko 2 minute do 43 °C, a ultrazvučni tretman se provodio 3 minute. Tijekom ultrazvučnog tretmana temperatura je održavana na 43 °C ± 1 °C. Nakon tretmana, 100 mL uzorka je spremljeno u sterilne bacto boce od 100 mL i čuvano 90 dana na temperaturi od 20 °C ± 2 °C.

### **3.2.3. Priprema uzoraka za spektrofotometrijske analize**

Nakon 90 dana skladištenja uzorci vina su centrifugirani pri 4 000 o/min tijekom 10 minuta s ciljem uklanjanja kvasca *B. bruxellensis*. Vino je zatim čuvano na -20 °C do analize.

### **3.2.4. Određivanje koncentracije ukupnih fenola**

Ukupna koncentracija polifenolnih spojeva određuje se reakcijom s Folin Ciocalteu reagensom (Singleton i Rossi, 1965). Folin Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline, gdje pri reakciji s fenolnim spojevima, hidroksilne grupe fenolnih spojeva oksidiraju, dok se kiseline reduciraju u plavo obojeni volframov oksid i molibdenov oksid. Intenzitet nastalog plavog obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm, a rezultat se izražava kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u mg/L.

Postupak određivanja ukupnih fenola provodi se na sljedeći način: Crno vino razrijedi se u omjeru 1:9, v:v, s destiliranom vodom. U tikvicu od 25 mL otpipetira se 0,25 mL razrijeđenog uzorka, 1,25 mL FC reagensa (razrijeđenog 1:2) i 15 mL vode. Sve se dobro promiješa i poslije 30 sekundi doda se 3,75 mL 20 % natrij-karbonata. Nadopuni se do oznake destiliranom vodom te ostavi 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm nasuprot slijepoj probi. Slijepa proba priprema se na sljedeći način: 0,25 mL vode, 1,25 mL FC reagensa, 15 mL vode te nakon 30 sekundi doda 3,75 ml 20 % natrij-karbonata i nadopuni destiliranom vodom.

Za računanje koncentracije ukupnih fenola potrebno je izraditi baždarnu krivulju. Iz baždarne krivulje dobije se jednadžba pravca:  $y=0,001x+0,0296$  uz  $R^2=0,9979$  prema kojoj se izračuna koncentracija ukupnih fenola izražena kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u mg/L.

Baždarna krivulja izrađuje se na sljedeći način: pripreme se otopine galne kiseline u 12 % etanolu slijedećih koncentracija: 50, 100, 200, 400, 600 i 800 mg/L. Otpipetira se se 0,25 mL otopine, doda 1,25 mL FC reagensa i 15 mL vode. Sve se dobro promiješa i poslije 30 sekundi doda se 3,75 mL 20 % natrijevog karbonata. Nadopuni se do oznake destiliranom vodom i ostavi 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 765

nm nasuprot slijepoj probi. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrtana se baždarna krivulja pri čemu se na apscisi nanese koncentracija galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije kod 765 nm.

### **3.2.5. Određivanje koncentracije ukupnih antocijana**

Metoda za određivanje ukupnih antocijana temelji se na činjenici da se  $\text{HSO}_3^-$  ion veže na položaju 2' te tako prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko oblik. Istovremeno paralelni uzorak tretira se s destiliranom vodom. Spektrofotometrijski se određuje razlika apsorbancije u oba uzorka. Ta razlika pokazuje količinu antocijana prisutnih u uzorku (Ribereau-Gayon i Stonestreet, 1965).

Postupak određivanja ukupnih antocijana provodi se na sljedeći način. U čašu od 50 ml otpipetira se 1 mL vina, 1 mL 96 %-tnog etanol s 0,1 (v/v) HCl i 20 mL 2 %-tne vodene otopine HCl. Po 10 mL ove otopine otpipetira se u 2 epruvete. U prvu epruvetu doda se 4 mL vode, a u drugu 4 mL 15 %-tne otopine natrij hidrogensulfita. Nakon 15 minuta izmjeri se apsorbancija u obje otopine na 520 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi. Koncentracija antocijana ( $A_c$ ) u ispitivanom uzorku izračuna se prema formuli:

$$A_c \text{ (mg/L)} = 875 \times (D_1 - D_2).$$

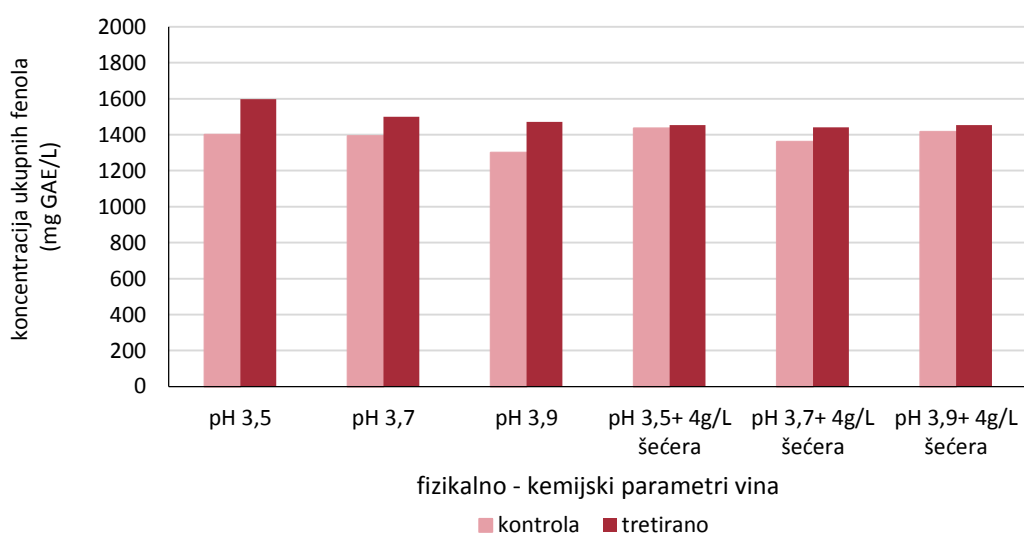
875 – faktor preračunavanja

$D_1$  – apsorbancija uzorka kojem je dodana voda

$D_2$  – apsorbancija uzorka kojem je dodana 15 %-tna otopine natrijevog hidrogensulfita

#### 4. REZULTATI I RASPRAVA

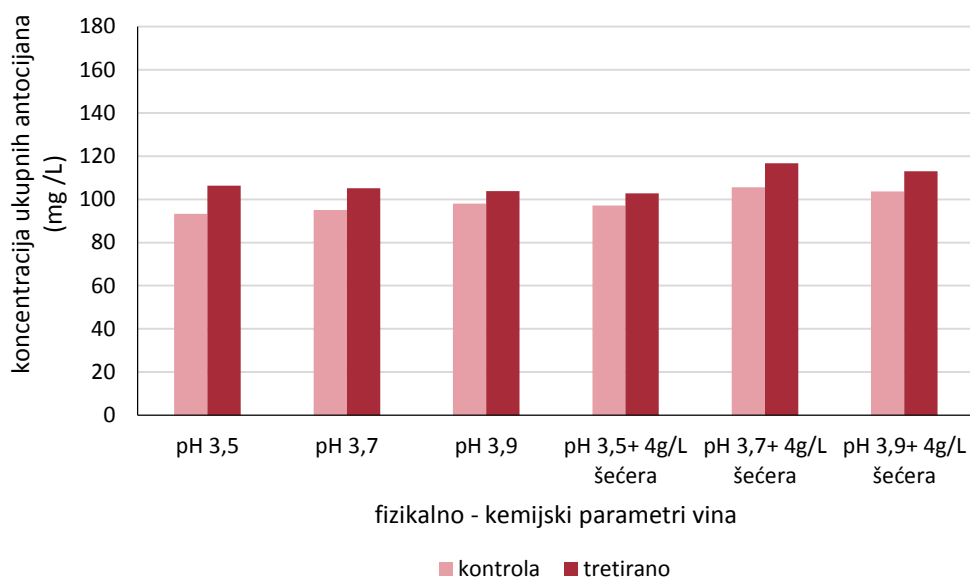
U svrhu utvrđivanja dugoročnog utjecaja tretmana termosonikacije na vino kontaminirano kvascem *B. bruxellensis*, 90 dana nakon tretmana određene su koncentracije ukupnih fenola i ukupnih antocijana u tretiranim i netretiranim uzorcima vina različitih fizikalno-kemijskih parametara. Praćeni fizikalno-kemijski parametri vina su pH vrijednost, sadržaj šećera i volumni postotak alkohola. Pri određivanju ukupnih fenola i ukupnih antocijana korišteno je vino s pH vrijednosti 3,5 , 3,7 i 3,9 ; vino s uobičajenim sadržajem šećera za suha vina i dodatkom šećera od 4 g/L te vino s 13 % (v/v) alkohola i 14 % (v/v) alkohola.



**Slika 8.** Koncentracija ukupnih fenola u vinu s 13 % (v/v) alkohola, različite pH vrijednosti i sadržaja šećera.

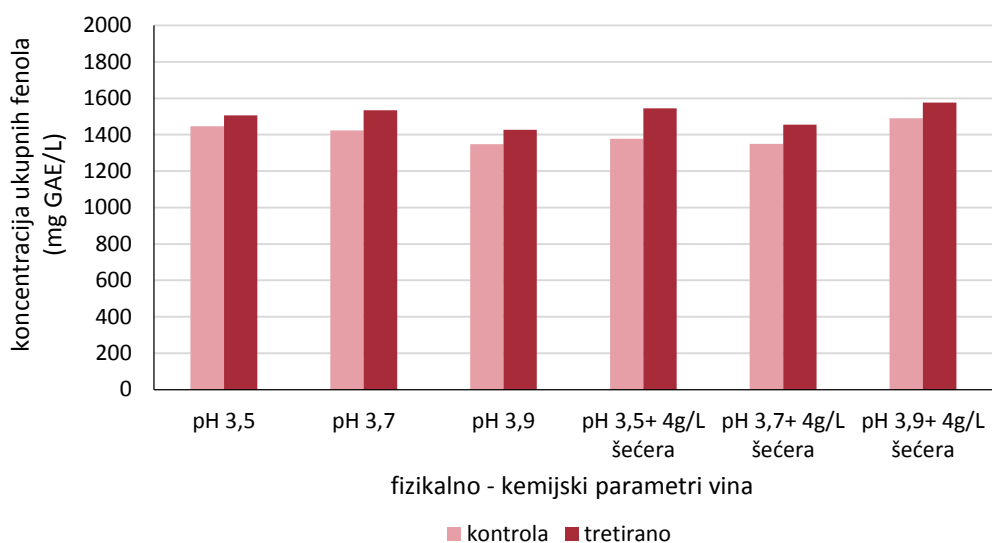
Mjerenjem koncentracije ukupnih fenola u svim uzorcima vina s 13 % (v/v) alkohola nakon 90 dana uočena je veća koncentracija ukupnih fenola u tretiranim uzorcima u odnosu na netretirane uzorke. U tretiranim uzorcima izmjerena je koncentracija ukupnih fenola u rasponu od 1400 mg GAE/L do 1600 mg GAE/L, a u netretiranim uzorcima od 1300 mg GAE/L do 1400 mg GAE/L. Najveća koncentracija ukupnih fenola u tretiranim uzorcima izmjerena je u vinu s pH vrijednosti 3,5, dok je u netretiranim uzorcima najveća koncentracija ukupnih fenola izmjerena u vinu s pH vrijednosti 3,5 i dodatkom šećera od 4 g/L.





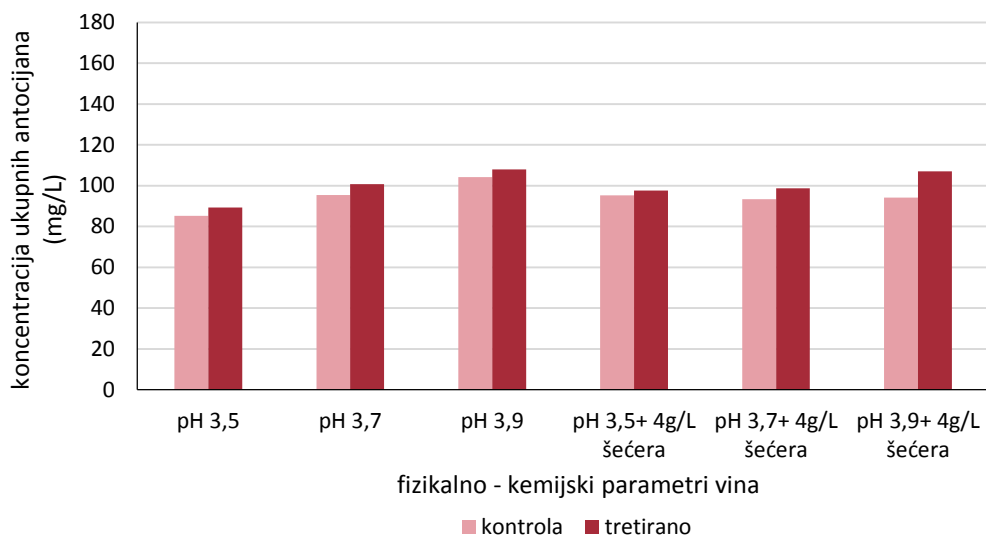
**Slika 9.** Koncentracija ukupnih antocijana u vinu s 13 % (v/v) alkohola, različite pH vrijednosti i sadržaja šećera.

Mjerenjem koncentracije antocijana u vinu s 13 % (v/v) alkohola nakon 90 dana uočena je veća koncentracija ukupnih antocijana u tretiranim uzorcima u odnosu na netretirane uzorke. U tretiranim uzorcima izmjerena je koncentracija ukupnih antocijana u rasponu od 102 mg/L do 116 mg/L, dok je u netretiranim uzorcima od 93 mg/L do 105 mg/L. Najveća koncentracija antocijana izmjerena je kod vina s pH vrijednosti 3,7 i dodatkom šećera od 4 g/L, te kod tretiranog uzorka iznosi 116,68 mg/L, a kod netretiranog uzorka 105,53 mg/L.



**Slika 10.** Koncentracija ukupnih fenola u vinu s 14 % (v/v) alkohola, različite pH vrijednosti i sadržaja šećera.

Mjerenjem koncentracije ukupnih fenola u vinu s 14 % (v/v) alkohola nakon 90 dana, u svim uzorcima izmjerena je veća koncentracija fenola kod tretiranih uzoraka u odnosu na netretirane uzorke. U tretiranim uzorcima izmjerena je koncentracija ukupnih fenola od 1427 mg GAE/L do 1577 mg GAE/L, a u netretiranim uzorcima od 1348 mg GAE/L do 1489,5 mg GAE/L. Najveća koncentracija ukupnih fenola izmjerena je u vinu pH vrijednosti 3,9 i s dodatkom šećera od 4 g/L, te kod tretiranog uzorka iznosi 1577,33 mg GAE/L, a kod netretiranog uzorka 1489,5 mg GAE/L.



**Slika 11.** Koncentracija ukupnih antocijana u vinu s 14 % (v/v) alkohola, različite pH vrijednosti i sadržaja šećera.

Mjerenjem koncentracije ukupnih antocijana u vinu s 14 % (v/v) alkohola nakon 90 dana, u svim ispitivanim uzorcima veća koncentracija antocijana izmjerena je u tretiranim uzorcima, u odnosu na netretirane uzorke. Kod tretiranih uzoraka izmjerena je koncentracija antocijana od 89 mg/L do 107 mg/L, a kod netretiranih uzoraka izmjerena je koncentracija antocijana od 85 mg/L do 104 mg/L. Najveća koncentracija antocijana izmjerena je u uzorku vina pH vrijednosti 3,9 pri čemu je u tretiranim uzorcima koncentracija znosila 107,98 mg/L, a u netretiranom 104,13 mg/L.

Veća koncentracija ukupnih antocijana, a time i ukupnih fenola u tretiranim uzorcima u odnosu na netretirane vjerojatno je posljedica smanjene aktivnosti kvasca *B. bruxellensis* nastale primjenom tretmana termosonikacije. Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da kvasac *B. bruxellensis* prevodi antocijane u nebojane pseudo forme, a može stvarati i vinilfenol piranoantocijane što dovodi do smanjenja koncentracije antocijana odnosno negativnog utjecaja na boju crnih vina (Wedral i sur., 2010; Oelofse i sur., 2008).

## 5. ZAKLJUČAK

- Upotreba tretmana termosonikacije (ultrazvuka visokih snaga u kombinaciji s povišenom temperaturom) je pozitivno utjecala na očuvanje koncentracije ukupnih antocijana i koncentracije ukupnih fenola u crnom vinu kontaminiranom kvascem *Brettanomyces bruxellensis* tijekom skladištenja od 90 dana.
- Ispitani fizikalno - kemijski parametri vina (alkohol: 13 i 14 % (v/v); pH: 3,5, 3,7 i 3,9; sadržaj šećera: uobičajen kod suhih vina i povećani) nisu imali značajniji utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola i koncentraciju ukupnih antocijana u vinu skladištenom 90 dana.

## 6. LITERATURA

Adams, D. O. (2006) Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**: 249-256.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry* **99**: 191-203.

Bridle, P., Timberlake, C. F. (1997) Anthocyanins as natural food colours—selected aspects. *Food Chemistry* **58**: 103-109.

Castaneda-Ovando, A., de Lourdes Pacheco-Hernández, M., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., Galán-Vidal, C. A. (2009) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **113**: 859-871.

Chandra, M., Barata, A., Ferreira-Dias, S., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. (2014) A Response Surface Methodology study on the role of factors affecting growth and volatile phenol production by *Brettanomyces bruxellensis* ISA 2211 in wine. *Food Microbiology* **42**: 40-46.

Cheynier, V., Dueñas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J. M., Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H. (2006) Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**: 298-305.

Dallas, C., Laureano, O. (1994) Effects of pH, sulphur dioxide, alcohol content, temperature and storage time on colour composition of a young Portuguese red table wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **65**: 477-485.

Friedman, M., Jürgens, H. S. (2000) Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48(6)**: 2101-2110.

Fulcrand, H., Atanasova, V., Salas, E., Cheynier, V. (2004) *Red Wine Color*, 1.izd., American Chemical Society. str. 68-88.

Gracin, L., Jambrak Režek, A., Juretić, H., Dobrović, S., Barukčić, I., Grozdanović, M., Smoljanić, G. (2015) Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Applied Acoustics* **103**: 143-147.

Gracin, L., Križanović, S., Režek Jambrak, A., Tomašević, M., Kelšin, K., Lukić, K., Kovačević Ganić, K. (2017) Monitoring the influence of high power ultrasound treatment and thermosonication on inactivation of *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **12**: 107-112.

- Hartmanova, L., Ranc, V., Papouskova, B., Bednar, P., Havlicek, V., Lemr, K. (2010) Fast profiling of anthocyanins in wine by desorption nano-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1217**: 4223-4228.
- Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B., Kinsella, J. E. (1994) Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42**: 64-69.
- Kennedy, J. A. (2008) Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e investigación agraria* **35**: 107-120.
- Kennedy, J. A., Saucier, C., Glories, Y. (2006) Grape and wine phenolics: history and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture* **57**: 239-248.
- Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R. (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* **64**: 923-933.
- Kontoudakis, N., González, E., Gil, M., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., Zamora, F. (2011) Influence of wine pH on changes in color and polyphenol composition induced by micro-oxygenation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**: 1974-1984.
- Lapidot, T., Harel, S., Akiri, B., Granit, R., Kanner, J. (1999) pH-dependent forms of red wine anthocyanins as antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 67-70.
- López-Vélez, M., Martínez-Martínez, F., Del Valle-Ribes, C. (2003) The Study of Phenolic Compounds as Natural Antioxidants in Wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **43**: 233-244.
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., Durán, N. (2003) Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chemistry* **82**: 409-416.
- Oelofse, A., Pretorius, I. S., Du Toit, M. (2008) Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review. *South African Journal for Enology and Viticulture* **29**: 128-144.
- Rodríguez-Amaya D.B. (2017) *Bioactive Molecules in Food*, 1. izd., Springer. str. 3.
- Sancho, R. A. S., Pastore, G. M. (2012) Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. *Food Research International* **46**: 378-386.

Sáenz-López, R., Fernández-Zurbano, P., Tena, M. T. (2003) Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the quantitative determination of anthocyanins in wine. *Journal of Chromatography A* **990**: 247-258.

Suárez, R., Suárez-Lepe, J. A., Morata, A., Calderón, F. (2007) The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: a review. *Food Chemistry* **102**: 10-21.

Vermerris W., Nicholson, R. (2008) *Phenolic Compound Biochemistry*, 1. izd., Springer. str.1-3.

Waterhouse, A. L. (2002) Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **957**: 21-36.

Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J. (2010) The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT-Food Science and Technology* **43**: 1474-1479.

Weston, L. A. (2000) Grape and Wine Tannins and Phenolics - Their Roles in Flavor, Quality and Human Health, *29th Annual New York Wine Industry Workshop*, str. 6-13, New York State Department of Horticulture, Cornell University, Ithaca, NY.

## Izjava o izvornosti

*Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.*

---

ime i prezime studenta