

Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na sastav polifenolnih spojeva i arome vina tijekom starenja

Ljubić, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:427556>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019

Andrea Ljubić

1111/PI

**UTJECAJ ULTRAZVUKA
VISOKIH SNAGA I DODATKA
ANTIOKSIDANSA NA SASTAV
POLIFENOLNIH SPOJEVA I
AROME VINA TIJEKOM
STARENJA**

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 na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Natke Ćurko, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć doc. dr. sc. Marine Tomašević i Katarine Lukić, mag. inž. te u Laboratoriju za tehničku termodinamiku na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu uz pomoć prof. dr. sc. Mladena Brnčića.

ZAHVALA

Od srca se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Natki Ćurko na pristupačnosti i stručnim savjetima te hvala doc. dr. sc. Marini Tomašević i Katarini Lukić, mag. inž. na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima te sestri na nesebičnoj podršci i strpljenju tijekom cijelog akademskog školovanja. Također posebno hvala momku i bliskim prijateljima na neiscrpoj motivaciji.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za tehničku termodinamiku

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKIH SNAGA I DODATKA ANTIOKSIDANSA NA SASTAV POLIFENOLNIH SPOJEVA I AROME VINA TIJEKOM STARENJA

Andrea Ljubić, 1111/PI

Sažetak: Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na polifenolni i aromatski sastav vina Graševina i Cabernet Sauvignon nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Koncentracija ukupnih fenola u bijelom i crnom vinu te koncentracije ukupnih tanina i antocijana u crnom vinu određene su primjenom spektrofotometrijskih metoda. Sastav fenolnih kiselina i flavanola u bijelom vinu te sastav slobodnih antocijana u crnom vinu određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Spojevi arome analizirani su primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME–GC/MS). U bijelom vinu navedeni tretman utjecao je na blago sniženje koncentracije ukupnih i pojedinačnih fenolnih spojeva (hidroksibenzojeve kiseline i flavan-3-ol monomeri) te spojeva arome (esteri i viši alkoholi), dok su crnom vinu utvrđene značajno niže koncentracije ukupnih i slobodnih antocijana posebno u vinima s nižim udjelom antioksidansa te više koncentracije etilnih estera i hlapivih masnih kiselina.

Ključne riječi: ultrazvuk visokih snaga, vino, polifenolni spojevi, aroma, starenje

Rad sadrži: 50 stranica, 4 slike, 7 tablica, 45 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *doc. dr. sc. Natka Ćurko*

Pomoć pri izradi: *prof. dr. sc. Mladen Brnčić, doc. dr. sc. Marina Tomašević, Katarina Lukić, mag. inž.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Karin Kovačević Ganić*
2. Doc. dr. sc. *Natka Ćurko*
3. Prof. dr. sc. *Mladen Brnčić*
4. Doc. dr. sc. *Filip Dujmić* (zamjena)

Datum obrane: 15. srpnja 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Technology and Analysis of Wine
Department of Process Engineering
Laboratory for Thermodynamics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

INFLUENCE OF HIGH POWER ULTRASOUND AND ADDITION OF ANTIOXIDANTS ON POLYPHENOLIC AND AROMA COMPOSITION OF WINE DURING AGEING

Andrea Ljubić, 1111/PI

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of high power ultrasound and the addition of antioxidants (sulfur dioxide and glutathione) on the polyphenolic and aroma composition of Graševina and Cabernet Sauvignon after 12 months of bottle ageing. Concentration of total phenols in white and red wine and concentration of total tannins and anthocyanins in red wine was determined using spectrophotometric methods. The composition of phenolic acids and flavanols in white wine and the composition of free anthocyanins in red wine was determined by application of high performance liquid chromatography (HPLC). The aromatic compounds were analyzed by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC/MS). In white wine, application of high power ultrasound induced slight decrease in concentrations of total and some individual phenolic compounds (hydroxybenzoic acids and flavan-3-ol monomers) and aroma compounds (esters and higher alcohols). Also, significantly lower concentrations of total and free anthocyanins were determined in ultrasound treated red wine, especially in wine with a lower concentration of antioxidants; and increase in concentrations of ethyl esters and volatile fatty acids.

Keywords: high power ultrasound, wine, polyphenolic compounds, aroma, ageing

Thesis contains: 50 pages, 4 figures, 7 tables, 45 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Natka Ćurko, assistant professor*

Technical support and assistance: *PhD. Mladen Brnčić, full professor; PhD. Marina Tomašević, assistant professor; Katarina Lukić, BSc. research assistant*

Reviewers:

1. PhD. *Karin Kovačević Ganić*, Full professor
2. PhD. *Natka Ćurko*, Assistant professor
3. PhD. *Mladen Brnčić*, Full professor
4. PhD. *Filip Dujmić*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 15th July 2019

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Polifenolni spojevi vina.....	2
2.1.1. Flavonoidi	2
2.1.2. Neflavonoidi.....	3
2.1.3. Polifenolni sastav i kemijske promjene tijekom proizvodnje vina.....	4
2.2. Aroma vina.....	5
2.2.1. Podjela arome vina prema fazama nastajanja.....	5
2.2.2. Sastav arome i kemijske promjene tijekom proizvodnje vina	6
2.3. Dodatak antioksidansa u vino	8
2.3.1. Sumporov dioksid	8
2.3.2. Glutation	10
2.4. Ultrazvuk.....	11
2.4.1. Podjela i primjena ultrazvuka.....	11
2.4.2. Primjena ultrazvuka visokih snaga u vinarstvu	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali.....	15
3.1.1. Uzorci.....	15
3.1.2. Kemikalije.....	15
3.1.3. Aparatura i pribor.....	16
3.2. Metode	18
3.2.1. Priprema vina za tretiranje	18
3.2.2. Tretman bijelog vina ultrazvukom visokih snaga (HPU) - ultrazvučna kupelj	18
3.2.3. Tretman crnog vina ultrazvukom visokih snaga (HPU) - sonda	18
3.2.4. Punjenje vina u boce i stavljanje na starenje.....	18
3.2.5. Određivanje ukupnih fenola u bijelom i crnom vinu.....	19
3.2.6. Određivanje ukupnih tanina u crnom vinu	20
3.2.7. Određivanje ukupnih antocijana u crnom vinu	21
3.2.8. Određivanje fenolnih kiselina i flavanola u bijelom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	22
3.2.9. Određivanje slobodnih antocijana u crnom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti	23
3.2.10. Određivanje spojeva sorte i fermentacijske arome bijelog i crnog vina plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME–GC/MS).....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na sastav polifenola.....	28
4.1.1. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na sastav polifenola bijelog vina Graševina	28
4.1.2. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na sastav polifenola crnog vina Cabernet Sauvignon	32
4.2. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na aromu vina.....	39
4.2.1. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na aromu bijelog vina Graševina.....	39
4.2.2. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na aromu crnog vina Cabernet Sauvignon	42
5. ZAKLJUČCI	45
6. LITERATURA	46

1. UVOD

Sumporov dioksid zbog svog antioksidacijskog i antimikrobnog djelovanja ima široku primjenu u vinarstvu. Međutim, ovaj aditiv zbog svog potencijalnog štetnog djelovanja može uzrokovati različite zdravstvene tegobe kod osjetljivih pojedinaca. Upravo iz toga razloga, znanstvenici su usmjereni prema novim alternativnim tehnologijama u vinarstvu, kako bi zadovoljili suvremene zahtjeve potrošača te smanjili upotrebu sumporovog dioksida. U tom kontekstu, uz ostale netoplinke tehnologije kao što su visoki hidrostatski tlak ili hladna plazma, u posljednje vrijeme sve se više istražuje i upotreba ultrazvuka visokih snaga.

Naime, ultrazvuk visokih snaga je netoplinška tehnologija čija je primjena moguća u različitim tehnološkim procesima i za koju se pretpostavlja da bi mogla zamijeniti ili nadopuniti mnoge postupke u prehrambenoj industriji. Dosadašnja istraživanja u vinarstvu pokazala su kako je ultrazvuk visokih snaga potencijalno obećavajuća tehnologija za ekstrakciju polifenolnih spojeva i ubrzavanje kemijskih promjena dozrijevanja i starenja. Međutim, dugoročni utjecaj ove tehnologije, a posebice mogućnosti sinergističkog djelovanja ove tehnologije i dodatka antioksidansa na kvalitetu vina te njen potencijal u proizvodnji vina sa smanjenom koncentracijom sumporovog dioksida je nedostavno istražen.

Cilj ovog rada je ispitati utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na polifenolni sastav i aromu vina nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Optimalni parametri tretmana ultrazvukom visokih snaga primijenit će se na bijelom vinu Graševina i crnom vinu Cabernet Sauvignon. Utjecaj ove tehnologije ispitat će se na vinu sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida, sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, kao i vinu s dodatkom antioksidansa glutaciona sa sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

Rezultati ovog diplomskog rada dati će uvid u nove spoznaje o učinkovitosti i potencijalnoj primjeni ultrazvuka u proizvodnji vina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI VINA

Fenolni spojevi su sekundarni biljni metaboliti (Crozier i sur., 2006) i važne komponentne vina (Recamales i sur., 2006) koje pridonose senzorskim karakteristikama kao što su boja, okus i osjet vina te djeluju kao antioksidansi (Tao i sur., 2013). Ovi spojevi, kemijski gledano, su ciklički benzenski spojevi koji posjeduju jednu ili više hidroksilnih skupina vezanih direktno na strukturu prstena (Jackson, 2000). Mogu se klasificirati prema broju i razmještaju ugljikovih atoma te se mogu konjugirati sa šećerima i organskim kiselinama. Fenoli se dijele u dvije grupe: flavonoidi i neflavonoidi.

2.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su kvantitativno najzastupljeniji polifenolni spojevi (Crozier i sur., 2006), koje nalazimo uglavnom u pokožici i sjemenci grožđa (Jackson, 2000). Glavne grupe flavonoida u grožđu i vinu su flavan-3-oli (monomeri, oligomeri i polimeri), antocijani i flavonoli (Jackson, 2000). Flavonoidi čine glavnu skupinu fenola u crnom vinu, više od 85 % koncentracije ukupnih fenola, te imaju najveći utjecaj na okus i osjet vina u ustima, dok u bijelom vinu ovi spojevi čine manje od 20 % koncentracije ukupnih fenola. Sadržaj flavonoida ovisi o sorti, klimatskim uvjetima te stupnju zrelosti.

Flavan-3-oli se primarno nalaze u pokožici i sjemenci bobice grožđa (Jackson, 2000). Najkompleksniji su razred flavonoida budući da se mogu sastojati od jednostavnih monomera (+)-katehin i njegovog izomera (-)-epikatehin te (-)-epigalokatehina, sve do oligomernih i polimernih flavan-3-ola koji su poznati pod nazivom kondenzirani tanini ili proantocijanidini (Waterhouse, 2002). Tanini pokožice bobice grožđa imaju veći stupanj polimerizacije (i do 50 podjedinica) i udio epigalokatehina (Jackson, 2000), dok tanini sjemenke imaju niži stupanj polimerizacije i veći udio galne kiseline. Ipak, u vinu su najzastupljeniji polimeri koji sadrže 2 do 8 jedinica flavan-3-ola, koji imaju molekularnu masu između 1000 i 4000 Da.

Antocijani su pigmenti smješteni u vanjskim hipodermalnim stanicama pokožice bobice crnog grožđa (Crozier i sur., 2006), a nastaju konjugacijom flavonoidne komponente zvane antocijanidin sa glukozom (Jackson, 2000). Antocijanidini su nestabilni, dok vezani šećer povećava kemijsku stabilnost i topivost antocijana u vodi (Waterhouse, 2002). Također, antocijani sa 2 glukozne jedinice su stabilniji od onih sa 1, međutim i znatno podložniji posmeđivanju (Jackson, 2000).

U grožđu i vinu razlikujemo 5 osnovnih antocijan glukozida: cijanidin, delphinidin, malvidin, peonidin i petunidin. Navedeni spojevi se razlikuju po broju hidroksilnih i metilnih grupa. Također, njihov omjer ovisi o sorti i uvjetima rasta (Jackson, 2000) te utječe na nijansu i stabilnost boje crnog vina. Povećan stupanj hidroksilacije smanjuje stabilnost, dok povećana metilacija povećava stabilnost antocijana. U mladim crnim vinima, antocijani se nalaze u ravnoteži između 5 različitih molekulskih stanja, čiji omjer ovisi o pH vrijednosti vina i koncentraciji slobodnog SO₂. Niži pH pogoduje nastanku flavilijevog kationa koji daje crvenu boju vinu. Koncentracija slobodnog SO₂ djeluje kao reverzibilno sredstvo za izbjeljivanje antocijana. U grožđu i vinu, antocijani se mogu kopigmentirati sa drugima spojevima (Jackson, 2000). Slabe komplekse stvaraju sa proteinima, taninima i drugim flavonoidima. Takvi kompleksi su manje osjetljivi na promjenu pH i otporniji su na obezbojenje pomoću SO₂ (Jackson, 2000). Konjugiraju se sa hidroksicimetnim i organskim kiselinama. Nakon fermentacije oko 25 % slobodnih antocijana veže se u komplekse s taninima, a oko 40 % je vezano nakon 12 mjeseci starenja. Kondenzacija antocijana i tanina je važna za stabilizaciju boje vina te smanjenje trpkocće tijekom dozrijevanja i starenja.

Flavonoli su najrašireniji razred flavonoida u cijelom biljnom carstvu (izuzev gljiva i algi). Najzastupljeniji flavonoli u vinu su miricetin, kvercetin i kampferol (Jackson, 2000), obično glikozidno vezani za glukozu, ramnozu ili glukuronsku kiselinu (Crozier i sur., 2006).

2.1.2. Neflavonoidi

Neflavonoidi su strukturno jednostavniji fenolni spojevi od flavonoida i glavni su fenolni spojevi u bijelom vinu (Jackson, 2000). Glavne skupine neflavonoida su hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline i njihovi konjugirani derivati te stilbeni.

Najznačajnije hidroksibenzojeve kiseline su galna, vanilinska, siringinska i protokatehinska kiselina (Crozier i sur., 2006). Više koncentracije hidroksibenzojevih kiselina prisutne su u bijelom vinu u usporedbi s crnim vinom. Galna kiselina je prekursor hidrolizirajućih tanina (galotanini i elagitanini), koji su polimeri galne kiseline i dimera glukoze; koji se ekstrahiraju u vino tijekom dozrijevanja u bačvama (Waterhouse, 2002).

Najznačajniji predstavnici hidroksicimetnih kiselina su kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska, kaftarinska i kutarinska kiselina. U grožđu se nalaze u obliku estera ili glikozida (Crozier i sur., 2006). Dominantni ester hidroksicimetne kiseline je ester kafeinske i vinske kiseline (Jackson, 2000).

Stilbeni su neflavanoidi koji se stvaraju kao odgovor na napad fungalnog, bakterijskog i virusnog patogena. Resveratrol je najznačajniji stilben u vinu. Postoji *trans* i *cis* izomerni oblik resveratrola u vinu, dok se u grožđu nalazi samo *cis* izomer (Crozier i sur., 2006).

2.1.3. Polifenolni sastav i kemijske promjene tijekom proizvodnje vina

Polifenolni spojevi imaju višestruku ulogu u vinu. Odgovorni su za senzorske karakteristike vina: boju, trpkocu i gorčinu. Navedeni spojevi se u vino ekstrahiraju iz pokožice i sjemenke bobice grožđa (Waterhouse, 2002) tijekom procesa maceracije i fermentacije prilikom proizvodnje crnih vina te procesa prešanja tijekom procesa proizvodnje bijelih i crnih vina (Jackson, 2000). Koncentracija polifenola u grožđu ovisi o sorti grožđa te klimatskim uvjetima. Crno grožđe može imati oko 5600 mg kg⁻¹ ukupnih fenola, dok koncentracija u bijelom grožđu može biti oko 3900 mg kg⁻¹. Fermentirani mošt može sadržavati 40 - 60 % polifenola iz grožđa (Crozier i sur., 2006). Sastav i koncentracija polifenola u vinu ovisi o koncentraciji u grožđu, primijenjenom postupku proizvodnje, međutim i kemijskim promjenama tijekom dozrijevanja i starenja vina (Recamales i sur., 2006).

Tijekom dozrijevanja i starenja vina odvijaju se kemijske reakcije koje uzrokuju senzorske promjene boje i okusa. Vina koja su prošla starenje imaju znatno različit polifenolni sastav od onih mladih vina, uslijed reakcija oksidacije, hidrolize i ostalih transformacija polifenolnih spojeva (Arnous i sur., 2001) kao što su kopigmentacija antocijana te reakcije kondenzacije antocijana sa taninima, polimerizacija tanina te reakcija tanina s proteinima i polisaharidima (Yildirim i Dundar, 2017).

Kemijske promjene u sastavu antocijana utječu na promjenu boje tijekom dozrijevanja i starenja crnog vina, pri čemu dolazi do postepenog smanjenja koncentracije monomernih antocijana i formiranja novih, stabilnih polimernih pigmenata koji doprinose narančasto-smeđoj boji vina (Zafrilla i sur., 2003). To su reakcije između antocijana i flavan-3-ola odnosno tanina, kao i reakcije pri kojima dolazi do formiranja piranoantocijana. Na brzinu opadanja koncentracije antocijana i formiranja novih pigmenata utječu temperatura i pH, međutim i koncentracija kisika i sulfita (Recamales i sur., 2006). Naime, zbog prisutnosti *o*-difenola u B prstenu antocijani su osjetljivi na oksidaciju. Hidroksilne skupine *o*-difenola su posebno osjetljive na enzimsku i neenzimsku oksidaciju. Izuzev lakaze, većina polifenol oksidaza djeluju na *o*-difenol. Malvidin i peonidin pokazali su najveću otpornost prema oksidacijskim promjenama, budući da nemaju orto pozicionirane hidroksilne skupine.

Kondenzacija procijanidina sa antocijanima ne zahtjeva prisutnost kisika, ali joj pogoduje kada su antocijani u flavilijevom molekulskom stanju. Zbog nestabilnosti kopigmentacijskog kompleksa formiranje kovalentnih veza je sporo, što objašnjava postupne promjene u boji crnog vina koje stari (Jackson, 2000). Najintenzivnije promjene u boji crnog vina događaju se tijekom prve godine dozrijevanja odnosno starenja. Formiranjem topljivih antocijan-tanin kompleksa osim promjena u boji vina, također dolazi i do smanjenja trpkooće vina.

Oksidacijskim promjenama u sastavu polifenolnih spojeva može doći i do stvaranja defekta poput posmeđivanja (Kallithraka i sur., 2009). Posmeđivanje je rezultat oksidacije fenola u kinone koji se polimeriziraju u makromolekule tipične žuto-smeđe boje. Pokazalo se da je oksidativno posmeđivanje bijelih vina vezano uz sadržaj flavanola, budući da se iz njihovom oksidacijom stvaraju ksantilijum pigmenti koji pridonose posmeđivanju bijelog vina (Recamales i sur., 2006).

2.2. AROMA VINA

Pod pojmom arome vina podrazumijeva se impresija mirisnih i okusnih komponenti vina. Aroma vina je rezultat interakcija između kemijskog sastava vina sa osjećajem okusa i mirisa kod konzumacije vina. Više od 1000 spojeva čini aromu vina. Aromu vina čine hlapljivi i nehlapljivi spojevi. Hlapljivi spojevi su viši alkoholi, esteri, terpeni, karbonilni spojevi, hlapljive kiseline, hlapljivi fenoli i spojevi sa sumporom. S druge strane, u nehlapive spojeve ubrajamo šećere, organske kiseline, fenolne spojeve te mineralne komponente.

2.2.1. Podjela arome vina prema fazama nastajanja

Aromu možemo klasificirati prema fazama nastajanja, a to su primarna, sekundarna i tercijarna aroma. Primarna aroma ili sortna aroma se formira u grožđu i prelazi u mošt. Grožđe sadrži komponente koje su nosioci sorte arome te prekursore arome. Skupine spojeva koji pripadaju primarnoj aromi su terpeni, norizoprenoidi, metoksipirazini, hlapivi tioli i C6 aldehidi. Sekundarna aroma ili fermentacijska aroma jest najvažniji dio arome vina koji nastaje tijekom alkoholne fermentacije. Fermentacijom se povećava kemijska i aromatska kompleksnost vina, olakšava ekstrakcija tvari iz čvrstih dijelova grožđa, transformiraju se spojevi dobiveni iz grožđa te se proizvode značajne količine kvašćevih metabolita. Odvija se biosinteza viših alkohola, estera, karbonilnih spojeva te hlapivih fenola. Tijekom fermentacije, stvaranje estera se odvija pod kontrolom enzima kvasca (Jackson, 2000).

Za crna vina važna je i jabučno-mliječna fermentacija tijekom koje se jabučna kiselina konvertira u mliječnu kiselinu i CO₂ te dolazi do povećanja koncentracije spojeva arome poput etil laktata, diacetila, acetaldehida, acetoina. Tercijarna aroma ili aroma starenja se oblikuje tijekom dozrijevanja i starenja vina kroz enzimske i fizikalne reakcije vina u drvenoj bačvi ili u boci (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

2.2.2. Sastav arome i kemijske promjene tijekom proizvodnje vina

Primjenom plinske kromatografije sa masenom spektrometrijom izolirano je i identificirano više od 500 spojeva arome vine među kojima je više od 160 estera. Većina tih komponenti se pojavljuje u koncentracijama između 10⁻⁴ i 10⁻⁹ g L⁻¹, što je ispod ljudskog praga senzorske percepcije. Većina komponenti izoliranih iz vina zasebno nemaju utjecaj na senzorske karakteristike vina, međutim u kombinaciji s drugima mogu biti vrlo značajni. Nadalje, većina ovih spojeva u vinu su metabolički produkti aktivnosti kvasca tijekom fermentacije. Za usporedbu, broj izoliranih komponenti iz grožđa je relativno mali. Vino u principu sadrži 0,8 - 1,2 g L⁻¹ aromatskih komponenti.

Najzastupljeniji aromatski spojevi su esteri, viši alkoholi i hlapive kiseline (Jackson, 2000), dok aromi vina najviše pridonose esteri i viši alkoholi. Esteri čine većinu arome mladih vina te su odgovorni za voćnu notu (Francis i Newton, 2005). U skupinu acetatnih estera ubrajaju se etil acetat, *i*-butil acetat, *i*-amil acetat, 2-feniletil acetat itd. S druge strane, skupini etil estera pripadaju etil butanoat, etil heksanoat, etil dekanat itd (Jackson, 2000). Etil acetat je najzastupljeniji ester u vinu, koji nastaje djelovanjem kvasca tijekom fermentacije, ali i pod utjecajem aerobnih bakterija octenog vrenja. Ovisno o koncentraciji, može imati pozitivan i negativan utjecaj na senzorska svojstva vina. Viši alkoholi čine oko 50 % hlapivih komponenti u vinu. Kvantitativno najvažniji aromatski spojevi su viši alkoholi dugog lanca, 1-propanol, 2-metil-1-propanol (*i*-butil alkohol), 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol (*i*-amil alkohol) te 2-fenil etanol. U visokoj koncentraciji nisu poželjni u vinu budući da pridonose oštrom mirisu i smanjenju svježine i voćnosti, dok pri niskim koncentracijama od 0,3 g L⁻¹ pridonose kompleksnosti arome. Formiranju viših alkohola pogoduje prisutnost kisika, visoke temperature fermentacije i prisutnost suspendiranog materijala u soku za fermentaciju. S druge strane, izbistreni mošt prije fermentacije, prisutnost sumporovog dioksida i niske temperature fermentacije suzbijaju stvaranje viših alkohola. Kvasci također variraju sa sposobnošću za stvaranje viših alkohola.

Aromatski spojevi u vinu podliježu mnogim značajnim promjenama tijekom dozrijevanja u hrastovim bačvama i starenja u bocama. Senzorska kvaliteta vina doseže svoj vrhunac nakon određenog perioda dozrijevanja i starenja. Taj period ovisi o vinu, što znači da neka vina vrlo brzo dosegnu vrhunac kvalitete nakon čega slijedi pad senzorske kvalitete, dok druga vina mogu dugi niz godina stariti i razvijati povoljne senzorske karakteristike.

Nizak stupanj oksidacije vina tijekom dozrijevanja i starenja može pridonijeti aromatskoj kompleksnosti vina, međutim sve veće oksidacijske promjene utječu negativno na kvalitetu vina te uzrokuju gubitak svježih i voćnih nota (Badea i Antoce, 2015).

Gubitak arome u bijelim vinima povezan je sa hidrolizom estera, pri čemu se smanjuje voćnost i svježina vina. Istodobno s hidrolizom acetatnih estera dozrijevanjem i starenjem dolazi do stvaranja određenih etil estera poput dietil sukcinata. Također, zabilježeno je da se koncentracija terpena i norizoprenoida (posebice β -damaskenona) značajno smanjuje tijekom dozrijevanja i starenja vina što također pridonosi gubitku voćnosti vina. S druge strane, koncentracija spoja 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalena (TDN) je važna za razvitak arome starenja u vinima poput Rieslinga ili nekim crnim vinima (miris na kerozin). Starenje najmanje utječe na promjene koncentracija viših alkohola i laktona (Jackson, 2000).

Ugliano (2013) se u svom istraživanju bavio utjecajem kisika na sastav arome tijekom starenja vina u boci, s posebnim naglaskom na stvaranje oksidativnih spojeva arome (aldehid, sotolon) i formiranja/degradiranja hlapivih spojeva koje sadrže sumpor. Naime, pojam redukcije vina povezuje se sa nepoželjnim mirisom po trulim jajima, kupusu i češnjaku. Sumporni spojevi male molekulske mase se javljaju u vinu nakon određenog perioda starenja u boci, poput sumporovodika (H_2S) i metil-merkaptana ($MeSH$). Međutim, ustanovljeno je da određene koncentracije sumporovodika mogu povećati kompleksnost vina te navedeni spoj može biti uključen u proces nastajanja poželjnih aromatskih spojeva poput tiazola, furfuril tiola i benzil merkaptana (Ugliano, 2013).

Također, Tao i sur. (2013) istaknuli su da niska temperatura od $5\text{ }^{\circ}C$ može povećati koncentraciju nekih važnih aromatskih spojeva u bijelom vinu tijekom starenja u bocama bez dodatka SO_2 , poput etilnih estera i *i*-amil acetata. Nadalje, usporedbom vina koje je starilo u bocama pri uvjetima od $12\text{ }^{\circ}C$ te pri $22\text{ }^{\circ}C$ utvrđeno je da je vino pri nižoj temperaturi imalo veću sposobnost zadržavanja acetatnih estera, slobodnog i vezanog SO_2 te niži indeks posmeđivanja (Tao i sur., 2013).

Stoga, izlaganje vina visokoj temperaturi tijekom dozrijevanja i starenja potrebno je izbjegavati budući da navedeni uvjeti mogu utjecati na smanjenje koncentracije aromatskih komponenti u vinu te ubrzati posmeđivanje bijelog vina (Jiranek i sur., 2008).

2.3. DODATAK ANTIOKSIDANSA U VINO

2.3.1. Sumporov dioksid

Sumporov dioksid je najvažniji i najučinkovitiji aditiv koji se koristi u vinarstvu zbog svojeg antimikrobnog i antioksidacijskog djelovanja (Santos i sur., 2011). Ukupni sumporov dioksid u vinu čine sumpor prisutan u slobodnom i vezanom obliku (Jackson, 2000). Slobodni SO_2 prisutan je u 3 različite kemijske forme: molekularni SO_2 , bisulfit HSO_3^- i sulfit SO_3^{2-} . Omjeri koncentracija navedenih formi ovise o pH vrijednosti vina (Jackson, 2000). Molekularni SO_2 čini 1 - 7 % slobodnog SO_2 te ima antimikrobno djelovanje. Tijekom prerade i proizvodnje vina preporučena koncentracija molekularnog SO_2 u bijelim vinima iznosi oko 80 mg L^{-1} a u crnim 50 mg L^{-1} . Sredstva za sumporenje u vinarstvu su kalijev metabisulfit, sumporne vrpce, sumporasta kiselina te plinoviti SO_2 .

Svrha sumporenja jest inaktivacija oksidativnih enzima, selekcija kvasaca, inaktivacija prirodne mikroflore, taloženje čestica mutnoće te zaštita od oksidacije tijekom proizvodnje vina. Naime, djelovanjem kisika (čija aktivnost raste u prisutnosti iona željeza i bakra) u vinu dolazi do oksido-redukcijske reakcije i nastanka hidroperoksilnog radikala te i formiranja kinona i vodikovog peroksida. Reakcijom vodikovog peroksida i reduciranog oblika željeza nastaje hidroksilni radikal koji oksidira komponente vina, pa se tako etanol oksidira u acetaldehid, dok se kinoni mogu uključiti u reakcije sa aromatskim komponentama i prekursorima, ali i sa polifenolima. Sumporov dioksid djeluje na način da spriječi oksidaciju etanola te vrati kinone u fenole, čime štiti vino od negativnih oksidacijskih promjena polifenolnih spojeva i arome (Rousiss i sur., 2013). Također, SO_2 se dijelom se veže na polifenolne spojeve, dijelom na kisik i inaktivira grupe nekih oksidativnih enzima koji dovode do posmeđivanja. Sumporenjem se mogu inhibirati Maillardove reakcije između šećera i aminokiselina. Budući da SO_2 inaktivira nekoliko oksidativnih enzima, suzbija stvaranje kinona koji mogu oksidirati spojeve sortnog mirisa, primjerice tiole kod vina Sauvignon Blanc (Jackson, 2000). Sumporov dioksid se stvara kvašćevim metabolizmom u koncentraciji od 12 do 64 mg L^{-1} . Dodatak malih količina SO_2 u vino može stvoriti svježiji miris formiranjem nehlapivih sulfonata sa acetaldehidom (Jackson, 2000).

S druge strane postoje i negativne posljedice sumporenja mošta, masulja i vina. Tijekom alkoholne fermentacije jedan dio SO_2 se gubi sa CO_2 a veći dio se veže sa acetaldehidom. Veže se i na ketokiseline, glukozu, fenolne spojeve itd. Drugo negativno djelovanje sumporenja jest da veća količina SO_2 negativno utječe na aromu (Jackson, 2000) te pojavu redukcije u vinu. Oksidacijom dolazi do eliminacije reduktivnog mirisa kojeg stvaraju spojevi sa sumporom.

Nadalje, SO_2 može utjecati na intenzitet boje vina spriječavanjem nastanka netopivih kompleksa koji su rezultat oksidativne polimerizacije crvenih pigmenta i drugih flavonoida u vinu. Također, velike količine slobodnog SO_2 mogu smanjiti intenzitet boje jer je SO_2 djelotvorno sredstvo za izbjeljivanje (Garcia i sur., 2016). Izbjeljivanjem smeđih pigmenta, SO_2 uzrokuje razvitak svjetlije boje bijelog vina. Navedena reakcija u crnom vinu rezultira neželjenim gubitkom boje (Jackson, 2000). Sumporov dioksid značajno smanjuje brzinu polimerizacije fenolnih spojeva (Santos i sur., 2011).

Također, korištenje SO_2 , točnije sulfita uzrokuje alergije kod osjetljivih pojedinaca kao što su glavobolje, mučnine, iritacije želuca i poteškoće s disanjem kod bolesnika sa astmom (Santos i sur., 2011). Prema uredbi Europske Komisije 607/2009 na vinu je potrebno naznačiti da sadrži sulfite ukoliko ukupna koncentracija SO_2 iznosi više od 10 mg L^{-1} (Farrer-Gallego i sur., 2018). Sukladno s time, zakonodavstvo nastoji postupno smanjiti dopuštenu koncentraciju SO_2 (Santos i sur., 2011). Najveća dopuštena koncentracija sumporovog dioksida u vinima, osim pjenušavih i likerskih vina, iznosi 200 mg L^{-1} za bijela i ružičasta vina a 150 mg L^{-1} za crna vina (Pravilnik, 2010). Iz navednog razloga u proizvodnji vina ključno je smanjiti ili eliminirati korištenje navedenog konzervansa i potražiti sigurniju alternativu (Santos i sur., 2011). S mikrobiološkog stajališta, da bi se smanjila koncentracija SO_2 potrebno je uzeti u obzir mnogo faktora. Kao prvo, treba uzeti u obzir da se tijekom alkoholne fermentacije prirodno kvašćevim metabolizmom stvara određena količina SO_2 . Nadalje, na sposobnost kvasca da proizvede sulfite značajno utječu sastav mošta/masulja, prehrana kvasca i upravljanje fermentacijom. U konačnici, mikrobiološka stabilnost vina bez dodatka sumporovog dioksida ostaje još neizvjesna (Farrer-Gallego i sur., 2018).

Nadalje, Roussis i sur. (2013) proveli su ispitivanje o utjecaju snižene koncentracije SO_2 sa dodatkom antioksidansa na stabilnost hlapivih aromatskih spojeva crnog vina Merlot i Cabernet Sauvignon nakon starenja u bocama.

Analizirali su uzorak sa standardnom koncentracijom slobodnog SO₂ (35 mg L⁻¹), uzorak sa sniženom koncentracijom slobodnog SO₂ (25 mg L⁻¹) i uzorak sa sniženom koncentracijom slobodnog SO₂ sa dodatkom antioksidansa (glutation 20 mg L⁻¹, kafeinska kiselina 60 mg L⁻¹, galna kiselina 20 mg L⁻¹). Nakon 18 mjeseci starenja u bocama, došlo je do smanjenja koncentracije spojeva arome dok među uzorcima nisu utvrđene značajne razlike. Nakon 36 mjeseci starenja, u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ izmjerena je najniža koncentracija etil acetata, etil heksanoata, etil oktanoata i 2-fenil etanola. S druge strane, utvrđene su slične koncentracije spojeva u uzorcima sa standardnom koncentracijom SO₂ i u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom antioksidansa. Dobiveni rezultati pokazali su kako crno vino sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom mješavine antioksidansa može zaštititi estere i druge hlapive tvari te zamijeniti dio SO₂ koji se koristi (Rousiss i sur., 2013). Nadalje, potrebno je provesti daljnja istraživanja o utjecaju glutaciona i/ili askorbinske kiseline kao potencijalne zamjene za SO₂ (Badea i Antoce, 2015).

2.3.2. Glutation

Glutation je tripeptid sastavljen od glutaminske kiseline, cisteina i glicina. Prirodno je prisutan antioksidans u grožđu, a može biti prisutan u različitom rasponu koncentracija. Kao kofaktor nekoliko antioksidativnih enzima, poput glutacion peroksidaze i glutacion reduktaze, glutacion indirektno inhibira posmeđivanje vina. Reducirani oblik glutaciona ima antioksidativna svojstva. U reduciranom stanju, tiolna skupina cisteina može donirati proton reaktivnim vrstama kisika. Oksidirani oblik glutaciona postaje reaktivan te sa drugim reaktivnim glutacionom tvori GSSG, dimerni glutacion.

Glutation može poboljšati stabilnost vina budući da čuva spojeve primarne arome iz grožđa, ograničava stupanj posmeđivanja bijelog vina i razvitak atipičnog mirisa starenja u vinu. Utvrđeno je da glutacion sprječava formiranje slobodnih *o*-kinona u vinu koji sudjeluju u posmeđivanju (Badea i Antoce, 2015). Naime, vina se razlikuju po oksidacijskom kapacitetu zbog njihovog redoks potencijala koji ovisi o antioksidativnom statusu vina.

Rezultati studije El Hosry i sur. (2009) pokazali su da dodatak glutaciona prije buteljiranja poboljšava stabilnost i može spriječiti atipično starenje bijelog vina. Tijekom starenja vina utvrđen je pad koncentracije glutaciona. Koncentracija glutaciona koja ostaje u vinu ovisi o kvascu te je uočeno da odležavanje vina na talogu prevenira smanjenje glutaciona i gubitak hlapivih tiolnih spojeva.

Bijelo vino je izrazito osjetljivo na kisik, što može rezultirati nepoželjnim promjenama u boji i aromi vina. Prethodna istraživanja su dokazala da dodatak glutaciona uz smanjenu koncentraciju SO_2 , inhibira gubitak poželjnih aromatskih spojeva poput monoterpena i estera, te usporava posmeđivanje vina. Zbog visokog afiniteta za kisik, glutation čuva voćnu aromu mladih vina i sprječava preuranjeno starenje vina (Badea i Antoce, 2015).

Sonni i sur. (2011) ispitali su utjecaj dodatka antioksidansa (dodatak glutaciona sa i bez dodatka askorbinske kiseline) u model otopini bijelog vina bez dodatka sumporovog dioksida, nakon 14 dana skladištenja u oksidativnim uvjetima. Glutacion se koristio u koncentracijama koje se inače nalaze u vinu (30 mg L^{-1}) i u 20 puta većim koncentracijama (860 mg L^{-1}) te s askorbinskom kiselinom (500 mg L^{-1}) u omjeru 1:1. Model otopina bijelog vina bila je uskladištena na $45 \text{ }^\circ\text{C}$ u uvjetima sa visokom razinom kisika, odnosno uvjetima izrazito povoljnim za oksidaciju vina. Dobiveni rezultati su pokazali da visoka koncentracija glutaciona može osigurati početnu zaštitu od posmeđivanja, ali ne i dugoročni efekt. Ishod ove studije pokazao je da glutacion ima sposobnost sprječavanja formiranja oksidativnih pigmentata i određenih prekursora kada je u dovoljno visokoj koncentraciji. Međutim, njegovom potrošnjom došlo je do stvaranja novih polimernih pigmentata. Nadalje, rezultati su utvrdili da bolju zaštitu vina od oksidacije pruža kombinacija glutaciona i askorbinske kiseline, u omjeru 1:1, od samog dodatka visoke koncentracije glutaciona. Glutacion je odgodio degradaciju askorbinske kiseline i inhibirao stvaranje prekursora pigmenta koji nastaje iz produkta degradacije askorbinske kiseline (Sonni i sur., 2011).

2.4. ULTRAZVUK

2.4.1. Podjela i primjena ultrazvuka

Ultrazvuk je zvuk frekvencije iznad 16 kHz (McClements, 1995). Električna energija se konvertira u ultrazvučne valove (20 kHz - 10 MHz) čija je frekvencija previsoka za ljudsko slušno područje (Jiranek i sur., 2008). Korištenje ultrazvuka u prehrambenoj industriji i prehrambenoj tehnologiji predmet je intenzivnog istraživanja i primjene unazad nekoliko desetaka godina. Područje primjene ultrazvuka dijeli se na dva dijela, na ultrazvuk niskog intenziteta i ultrazvuk visokog intenziteta. Ultrazvuk niskog intenziteta karakteriziraju zvukovi visokih frekvencija (1 - 10 MHz) i niske snage ($<1 \text{ W cm}^{-2}$), a ultrazvuk visokog intenziteta valovi visokih snaga (10 - 1000 W cm^{-2}) i niskih frekvencija (20 - 100 kHz).

Većina primjena ultrazvuka u prehrambenoj tehnologiji uključuje nedestruktivne analize koje se odnose na procjenu kvalitete proizvoda (ultrazvuk niskog intenziteta).

Naime, ultrazvučni valovi niskog intenziteta ne uzrokuju fizikalna i kemijska oštećenja materijala kroz koji val prolazi, pa se mogu koristiti u analitičke svrhe za određivanje sastava, strukture ili viskoznosti hrane. S druge strane, ultrazvuk visokog intenziteta odnosno ultrazvuk visokih snaga koristi se kao tehnika kojom se prehrambenoj sirovini ili materijalu mijenjaju fizikalno-kemijska svojstva (Brnčić i sur., 2009a). Primjena ultrazvuka visokih snaga može uzrokovati fizikalne promjene na tretiranom materijalu kao i određene kemijske reakcije, ubrzavanje kemijskih reakcija, povećanje brzine difuzije, dispergiranje agregata, ali i uništenje enzima i mikroorganizama (Mason, 1998). Naime, većina istraživanja temelji se na frekvencijskom području od 20-40 kHz, zbog najučinkovitijeg djelovanja u smislu kavitacija.

Tijekom djelovanja ultrazvuka visokih snaga, kada se ultrazvučni val prostire tekućim medijem, stvaraju se longitudinalni valovi pri čemu dolazi do naizmjeničnih ciklusa kompresije i ekspanzije tlaka što uzrokuje pojavu kavitacije i stvaranja mjehurića plina. Ovi mjehurići imaju veću površinu tijekom ciklusa ekspanzije pa se povećava difuzija plina. Kada energija ultrazvuka nije dovoljna da bi se zadržala plinska faza, u mjehuriću dolazi do brze kondenzacije. Kondenzirane molekule se sudaraju stvarajući udarne valove. Ti udarni valovi stvaraju područja vrlo visoke temperature i tlaka, dosežući do 5500 K i 50 MPa. Vruće zone mogu djelovati baktericidno, međutim, one su vrlo ograničene i ne utječu na dovoljno veliku površinu tako da se baktericidni učinak zasniva na promjenama tlaka (Herceg i sur., 2009).

Tretman ultrazvukom visokih snaga se može provoditi pomoću ultrazvučne sonde i ultrazvučne kupelji. Sustav sa direktno uronjenom sondom se sastoji od generatora koji pretvara električnu energiju u visoku frekvenciju izmjenične struje te pretvornika koji pretvara visoku frekvenciju izmjenične struje u mehaničke vibracije koje stvaraju kavitaciju. Pretvornik može biti piezoelektrični, koji se najčešće koristi, i magnetostriktivni pretvornik. U slučaju ultrazvučne kupelji pretvornik je spojen na dno spremnika i direktno šalje vibracije tekućini koja je u spremniku. Većina ultrazvučnih kupelji rade na frekvenciji od 20-40 kHz. Standardne ultrazvučne kupelji rade pri nižem intenzitetu da bi se izbjeglo oštećenje stijenki spremnika uzrokovano kavitacijom a i pri manjim akustičkim snagama jer su volumeni tretirane tekućine u spremniku najčešće veliki (Brnčić i sur., 2009a).

2.4.2. Primjena ultrazvuka visokih snaga u vinarstvu

Mnoga dosadašnja istraživanja pokazala su kako je upotreba ultrazvuka visokih snaga obećavajuća za poboljšanje kvalitete vina. Ultrazvuk visokih snaga se može koristiti u nekoliko faza u proizvodnji vina. Tretman ultrazvukom u moštu prije inokulacije kvasaca ima antimikrobno djelovanje i može se koristiti za inaktivaciju prirodne mikroflore ili općenito za eliminaciju rizika od nepovoljnih mikrobioloških promjena. Nadalje, što se tiče jabučno-mliječne fermentacije, tretman ultrazvukom je može ubrzati, odgoditi ili čak i zaustaviti (Santos i sur., 2011). Ultrazvuk se može koristiti za čišćenje i sanitaciju hrastovih bačvi te fermentacijskih posuda (Garcia i sur., 2016).

Nadalje, primjena ultrazvuka tijekom maceracije smanjuje vrijeme maceracije te pojačava intenzitet boje te koncentraciju polifenolnih spojeva i spojeva arome u vinu. Naime, utvrđeno je kako tretman ultrazvukom visokih snaga poboljšava ekstrakciju antocijana iz masulja sorte Cabernet Sauvignon za čak 50 % u odnosu na kontrolu (Bates i Patist, 2011). Također, tretman ultrazvukom inhibira enzime kao što je polifenol oksidaza i minimalno utječe na degradaciju parametara kvalitete kao što je boja, askorbinska kiselina i koncentraciju antocijana. Tchabo i sur. (2017) proveli su istraživanje o utjecaju ultrazvuka visokih snaga na ekstrakciju polifenolnih spojeva u dudovom vinu bez dodatka sumporovog dioksida. Izgnječena sirovina podvrgnuta je ultrazvučnom i enzimskom tretmanu. Zapakirano vino ultrazvučno je tretirano (26 kHz, 30 min) koristeći pulsiranje od 10 s i 5 s pauze. Nakon 2 mjeseca starenja provedena je analiza. Ukupna koncentracija fenolnih spojeva u kontrolnom uzorku iznosila je $1283,68 \pm 11,06 \text{ mg L}^{-1}$, a $1350,61 \pm 13,89 \text{ mg L}^{-1}$ u ultrazvučno tretiranom uzorku. Tchabo i sur. (2017) su zaključili da povećanje ukupnih fenola može biti rezultat utjecaja ultrazvuka na aktivnost polifenolne oksidaze. Nadalje, došli su do zaključka da na povećanje ukupnih fenola veći utjecaj ima tretman ultrazvukom visokih snaga od tretmana visokim hidrostatskim tlakom (Tchabo i sur., 2017).

Potencijal upotrebe ultrazvuka je nedvojbjen, a posebice u kombinaciji s već poznatim i implementiranim tehnologijama u proizvodnji vina poput mikrooksigenacije i dodatka komadića hrasta (čips) ili odležavanja vina na talogu (Garcia i sur., 2016).

Ultrazvuk visokih snaga može se koristiti i kao tehnologija za ubrzavanje procesa starenja vina, a smatra se kako je ovaj efekt ultrazvuka povezan sa akustičnom kavitacijom (Saterlay i Compton, 2000). Snažni raspad tih mjehurića dovodi do pojave lokalnih područja sa visokom temperaturom i tlakom. Usprkos visokoj temperaturi i tlaku koji mogu biti štetni za proces starenja vina, kontrolirana ultrazvučna energija može utjecati pozitivno na kemijske reakcije u vinu. Ultrazvučna frekvencija u rasponu od 20-100 kHz ubrzava reakcije starenja. Nakon tretmana ultrazvukom visokih snaga, vino može brže dostići svoj vrhunac i kvaliteta takvog vina zadržava kroz dulji period (Tao i sur., 2013).

Zbog antimikrobnog djelovanja, ultrazvuk visokih snaga mogao bi zamijeniti ili smanjiti dodatak SO_2 u vino. Mogućnosti primjene ultrazvuka visokih snaga i njegov dugoročni učinak na kvalitetu vina, odnosno aromu, polifenolne i senzorske karakteristike te u kontekstu adekvatne zamjenu za dio SO_2 potrebno je dalje istražiti kako bi se navedena netoplinska tehnologija razvila i u industrijskom mjerilu (Santos i sur., 2011).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

U ovom radu se koristilo bijelo vino Graševina te crno vino Cabernet Sauvignon (Erdutski vinogradi d.o.o., Erdut, Hrvatska), proizvedeni 2017. godine sa sniženim udjelom sumporovog dioksida. U tablici 1 prikazan je fizikalno-kemijski sastav oba vina.

Tablica 1. Osnovni fizikalno-kemijski sastav vina Graševina i Cabernet Sauvignon

Parametar	Graševina	Cabernet Sauvignon
Alkohol (vol %)	11,4	13,1
Ukupna kiselost (g L ⁻¹ vinske kiseline)	5,1	5,3
Hlapiva kiselost (g L ⁻¹ octene kiseline)	0,31	0,61
Reducirajući šećeri (g L ⁻¹)	2,8	4,1
pH	3,37	3,46
Jabučna kiselina (g L ⁻¹)	1,2	0,1
Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	0,3	1,3
Ukupni sumporov dioksid (mg L ⁻¹)	78	25
Slobodni sumporov dioksid (mg L ⁻¹)	15	15

3.1.2. Kemikalije

Reagensi korišteni u spektrofotometrijskim analizama bili su najmanje pro analysis (p.a.) stupnja čistoće a za analizu provedenu plinskom i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti svi reagensi i standardi bili su pro chromatography stupnja čistoće.

- Acetonitril (100 %), HPLC čistoće, J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
- (-)-Epikatehin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Etanol (96 %), Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska
- Ferulinska kiselina, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Folin Ciocalteu reagens, Reagecon, Shannon, Irska
- Galna kiselina, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD

- Kafeinska kiselina, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Kaftarinska kiselina, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- (+)-Katehin, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Malvidin-3-*O*-glukozid klorid, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Metanol (100 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Metanol, HPLC čistoće, J. T. Baker, Deventer, Nizozemska
- Mravlja kiselina (98-100 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- *n*-amil alkohol, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Natrijev hidrogen sulfit, p. a. Acros, Geel, Belgija
- Natrijev karbonat, bezvodni, p. a. Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev klorid - Carlo Erba, Vale de Reuil, Francuska
- *p*-kumarinska kiselina, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Procijanidin B1, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Procijanidin B2, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Protokatehinska kiselina, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Siriginska kiselina, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD
- Vanilinska kiselina, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Ultrazvučna kupelj Elmasonic P, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka
- Ultrazvučni procesor S-4000, Misonix Sonicators, Newtown, SAD
- Spektrofotometar (Specord 50 Plus), AnalytikJena, Jena, Njemačka
- Analitička vaga, Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD
- Termostat, Inkolab, Zagreb, Hrvatska

- HPLC Agilent Technologies 1260 Series, Santa Clara, CA, SAD sastavljen iz sljedećih komponenti:
 - *Kvarterna Pumpa (Bin Pump SL) G7111B*
 - *Autosampler (DL-ALS) G2258A*
 - *Termostat Autosampler-a (FC/ALS Term) G1330B*
 - *Temostatirani odjeljak za kolonu (TCC SL) G1316B*
 - *Diode Array Detector (DAD VL) G1316A*
 - *Agilent Chemstation Softver*
- Plinski kromatograf (GC), Agilent Technologies 6890 Network GC System, Santa Clara, CA, SAD
- Maseni spektrometar, Agilent Technologies 5973 *Inert Mass Selective Detector*, Santa Clara, CA, SAD
- Termoblok s magnetskom miješalicom, Pierce, Reacti-Therm, Heating/Stirring module, No. 18971, Rockford, IL, SAD

Pribor:

- HSS bočice, 20 mL, Restek, Bellefonte, PA, SAD
- Laboratorijske čaše volumena 100, 150, 250 mL
- Magnet
- Mikropipete od 100 i 1000 μ L, Eppendorf, Hauppauge, NY, SAD
- Odmjerne tikvice volumena 10, 25, 50, 100, 250, 500 i 1000 mL
- Pipete volumena 10, 20, 25 mL
- Plastična lađica za vaganje
- Slikonski čepovi za HSS bočice, Düren, Njemačka
- SPME vlakno: 100 μ m PDMS, 23 Ga, Supelco, Bellefonte, PA, SAD
- Staklena čaša od 250 i 400 mL
- Staklene epruvete
- Staklene kivete od 1 cm
- Staklene tube za hidrolizu, Pirex, Corning, NY, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Priprema vina za tretiranje

Tretmani vina uključivali su nekoliko verzija sa i bez antioksidansa, a sumporov dioksid i glutation su bili korišteni antioksidansi. Verzije tretiranih vina obuhvatile su: (i) vino sa sniženom koncentracijom SO_2 (15 mg L^{-1} slobodnog SO_2); (ii) vino sa sniženom koncentracijom SO_2 i glutationom (15 mg L^{-1} slobodnog SO_2 uz dodatak 20 mg L^{-1} glutationa) te (iii) vino sa standardnom koncentracijom SO_2 (30 mg L^{-1} slobodnog SO_2). Primijenjene verzije bile su jednake kod bijelog i crnog vina. Kontrolno vino bilo je vino standardnom koncentracijom SO_2 .

3.2.2. Tretman bijelog vina ultrazvukom visokih snaga (HPU) - ultrazvučna kupelj

Korištena je ultrazvučna kupelj sa sondom pričvršćenom ispod spremnika pri frekvenciji od 80 kHz za tretman bijelog vina ultrazvukom visokih snaga (Elmasonic P, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Njemačka). Parametri tretmana su iznosili: amplituda ultrazvučnog vala od 100 %, temperatura kupelji $27 \text{ }^\circ\text{C}$ i trajanje tretmana od 30 min. Tijek postupka HPU tretiranja vina bio je sljedeći: u staklenu čašu od 400 mL prenijeti 200 mL vina. Nadalje, čašu sa uzorkom vina staviti u predviđeno ležište kalupa u ultrazvučnoj kupelji. Tijekom HPU tretmana potrebno je temperaturu održavati uz pomoć vode i leda, kako bi se otklonio utjecaj temperature.

3.2.3. Tretman crnog vina ultrazvukom visokih snaga (HPU) – sonda

Za ultrazvučno tretiranje crnog vina korištena je ultrazvučna sonda promjera 12,7 mm te ultrazvučni procesor snage 600 W i 20 kHz (S-4000, Misonix Sonicators, Newtown, SAD). Parametri tretmana su iznosili: amplituda ultrazvučnog vala od 100 % odnosno $120 \text{ }\mu\text{m}$ i trajanje tretmana od 3 min. Tok postupka HPU tretiranja vina bio je sljedeći: u staklenu čašu od 250 mL prenijeti 200 mL vina. Zatim, u čašu s uzorkom vina uroniti ultrazvučnu sondu (oko 2 cm) te je centrirati u sredini čaše. Tijekom ultrazvučnog tretmana temperaturu je nužno održavati na $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2.4. Punjenje vina u boce i stavljanje na starenje

Nakon HPU tretmana, boce su propuhane dušikom (1,5 min) kako bi se iz njih uklonio kisik te su napunjene tretiranim vinom. Napunjene boce su zatvorene plutenim čepom uz pomoć ručne čepilice. Napunjene boce su uskladištene u vodoravnom položaju u hladnjaku za čuvanje vina pri kontroliranim uvjetima.

Vina su čuvana na suhom i tamnom mjestu a temperatura hladnjaka iznosila je 12 °C. Uzorci vina analizirani su nakon 12 mjeseci starenja u bocama.

3.2.5. Određivanje ukupnih fenola u bijelom i crnom vinu

Princip određivanja:

Temelj određivanja ukupnih polifenola zasnovan je na reakciji fenolnih spojeva sa Folin Ciocalteu reagensom kojeg čine smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline (Singleton i Rossi, 1965). Spektrofotometrijskim mjerenjem, pri valnoj duljini od 765 nm, izmjeren je intenzitet nastalog plavog obojenja. Rezultat je izražen kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u mg L⁻¹. Provedena su dva paralelna određivanja na istom uzorku vina.

Postupak određivanja:

U odmjernu tikvicu od 100 mL otpipetirati 1 mL uzorka bijelog vina ili razrijeđenog (1:9) uzorka crnog vina, zatim 5 mL Folin Ciocalteu reagensa (razrijeđenog 1:2) te 60 mL vode. Potrebno je dobro promiješati a nakon 30 s dodati 15 mL 20 % otopine natrijevog karbonata. Nakon dodatka 20 % otopine natrijevog karbonata nadopuniti deioniziranom vodom do oznake na tikvici, dobro protresti (zatvoriti tikvicu). Na tamnom mjestu nadopunjenu tikvicu ostaviti 2 h na sobnoj temperaturi. Slijepu probu pripremiti prema istom postupku, međutim umjesto uzorka uzeti 1 mL destilirane vode. Mjerenje apsorbancije provesti nakon 2 h pri valnoj duljini od 765 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Otopine galne kiseline sljedećih koncentracija: 50, 200, 400 i 600 mg L⁻¹ potrebno je pripremiti u 100 % metanolu. Zatim, 1 mL otopine galne kiseline određene koncentracije otpipetirati u odmjernu tikvicu od 100 mL te slijediti propis za određivanje ukupnih fenola. Nakon mjerenja apsorbancije, izraditi baždarni pravac pri čemu nanijeti koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹) na apcisu a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije kod 765 nm.

Račun:

Koncentracija ukupnih fenola izračunata je iz jednadžbe pravca koja je dobivena pomoću programa Microsoft Excel.

Izračunata jednadžba pravca:

$$y = 0,0010x + 0,0276$$

$$R^2 = 0,999$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 765 nm

x- koncentracija galne kiseline (mg L^{-1})

R^2 - koeficijent determinacije

3.2.6. Određivanje ukupnih tanina u crnom vinu

Princip određivanja:

Određivanje ukupnih tanina crnog vina provedeno je Bate-Smith metodom. Ova metoda bazirana je na kiselinskoj hidrolizi proantocijanidina, tzv. kondenziranih tanina na temperaturi od 100 °C pri čemu dolazi do stvaranja obojenih antocijanidina (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1966).

Razlika obojenja između zagrijanog, hidroliziranog i nehidroliziranog uzorka držanog na sobnoj temperaturi određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 550 nm, a pokazuje količinu ukupnih tanina u uzorku. Rezultat je izražen u g L^{-1} . Provedena su dva paralelna određivanja na istom uzorku vina.

Postupak određivanja:

Otpipetirati 2 mL uzorka (razrijeđenog 49:1), 1 mL deionizirane vode te 3 mL koncentrirane klorovodične kiseline u svaku od dvije staklene tube za hidrolizu, tube hermetički zatvoriti. Ovaj postupak treba provoditi u digestoru. Jednu tubu staviti u vodenu kupelj na 100 °C dok drugu treba ostaviti na sobnoj temperaturi. U vodenoj kupelji zatvorena tuba provodi 30 min, tubu treba izvaditi nakon navedenog vremena te u cilju sprječavanja daljnje kiselinske hidrolize ohladiti je ledom. U ohlađene i nezagrijavane tube dodati po 0,5 mL etanola. Spektrofotometrijski izmjeriti optičku gustoću pri valnoj duljini od 550 nm naspram deioniziranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Koncentracija tanina u 50 puta razrijeđenom uzorku izračunata je prema sljedećoj formuli:

$$\text{Tanini (g L}^{-1}\text{)} = 19,33 \times (D_1 - D_2)$$

gdje je:

19,33 - faktor preračunavanja

D_1 - optička gustoća hidroliziranog uzorka

D_2 - optička gustoća nehidroliziranog uzorka

3.2.7. Određivanje ukupnih antocijana u crnom vinu

Princip određivanja:

Određivanje ukupne količine antocijana crnog vina provedeno je metodom koja se temelji na dodatku otopine natrij hidrogensulfita u uzorak. Obojeni kation antocijana se prevodi u bezbojni leuko oblik kada se na 2' položaj veže ion HSO_3^- iz dodane otopine. U paraleli, uzorku ekstrakta pokožice grožđa dodana je deionizirana voda pri čemu ne dolazi do strukturne promjene antocijana. Nakon spektrofotometrijskog mjerenja, količina antocijana dobivena je iz razlike apsorbancija u oba uzorka (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1965). Rezultat je izražen u mg L^{-1} .

Postupak određivanja:

Otpipetirati 1 mL uzorka, 1 mL 0,1 (v/v) klorovodične kiseline zakiseljenog 96 % etanola i 20 mL 2 % vodene otopine klorovodične kiseline u tikvicu od 25 mL. U dvije tikvice otpipetirati po 10 mL napravljene smjese, zatim u prvu tikvicu dodati 4 mL deionizirane vode a u drugu 4 mL 15 % otopine natrij hidrogensulfita. Nakon 15 min izmjeriti apsorbanciju oba uzorka na valnoj duljini od 520 nm naspram deioniziranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Udio antocijana u ispitivanom uzorku vina izračunat je prema formuli:

$$A_c (\text{mg L}^{-1}) = 875 \times (D_1 - D_2)$$

gdje je:

A_c (mg L^{-1}) - količina antocijana u ispitivanom uzorku

875 - faktor preračunavanja

D_1 - apsorbancija uzorka kojemu je dodana voda

D_2 - apsorbancija uzorka kojemu je dodana 15 % otopina natrijevog hidrogensulfita

3.2.8. Određivanje fenolnih kiselina i flavanola u bijelom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Analiza sastava fenolnih kiselina i flavanola:

Primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) na Agilent1260 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) HPLC uređaju uz module kvarterne pumpe, autosampler-a, modula kolone te uz detekciju na DAD detektoru provedena je analiza hidroksibenzojevih kiselina (galna, protokatehinska, vanilinska, siringinska kiselina), hidroksicimetnih kiselina (kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska, kaftarinska kiselina), flavan-3-ol monomera [(+)-katehin, (-)-epikatehin] i flavan-3-ol dimera (procijanidin B1 i B2).

Priprema uzorka za HPLC analizu:

Priprema uzorka vina sastojala se od filtriranja uzorka kroz celuloza acetat filtar čiji promjer je 25 mm a veličina pora 0,45 μm (Filter-Bio, Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20 μL profiltriranog uzorka. Kromatografsko razdvajanje izvršeno je na koloni Gemini C18, dimenzija 250 x 4,6 mm (Phenomenex, SAD), pri temperaturi od 25 $^{\circ}\text{C}$ te uz primjenu binarne mobilne faze: otapalo A (voda/mravlja kiselina; 98:2; v/v) i otapalo B (metanol). Pripremljene mobilne faze su filtrirane i degazirane. Razdvajanje fenolnih kiselina, flavanola provedeno je primjenom gradijenta prikazanog u tablici 2 uz protok mobilne faze od 1 mL min^{-1} .

Tablica 2. Korišteni gradijent za razdvajanje fenolnih kiselina i flavanola

Vrijeme (min)	A (%)	B (%)	Protok (mL min^{-1})
0	98	2	1
20	68	32	1
30	60	40	1
40	50	50	1
50	50	50	1

Detekcija fenolnih spojeva:

Snimanjem spektra od 220 do 450 nm pomoću DAD detektora provedena je detekcija fenolnih spojeva. Hidroksibenzojeve kiseline i flavanoli identificirani su na valnoj duljini od 280 nm a hidroksicimetne kiseline na valnoj duljini od 320 nm.

Usporedbom retencijskog vremena (R_t) razdvojenog spoja s retencijskim vremenom standarda te uvidom u UV spektar spoja provedena je kvantifikacija spojeva. Koncentracije pojedinačnih polifenolnih spojeva (galna, protokatehinska, vanilinska, siringinska, kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska, kaftarinska kiselina, katehin, epikatehin, procijanidin B1 i B2) izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravca pripadajućih standarda. Analiza svakog uzorka provedena je u paraleli, a dobiveni rezultati izraženi su u mg L^{-1} . Ukupne hidroksibenzojeve kiseline izračunate su kao suma koncentracije galne, protokatehinske, vanilinske i siringinske kiseline, dok su ukupne hidroksicimetne kiseline izračunate kao suma kafeinske, ferulinske, *p*-kumarinske i kaftarinske kiseline. Ukupni flavan-3-ol monomeri izračunati su kao suma katehina i epikatehina, dok su ukupni flavan-3-ol dimeri izračunati kao suma procijanidina B1 i procijanidina B2.

3.2.9. Određivanje slobodnih antocijana u crnom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Analiza sastava slobodnih antocijana:

Primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) u uzorcima vina određen je sastav ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida (delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid, malvidin-3-*O*-glukozid), antocijan-3-*O*-glukozid acetata (peonidin-3-*O*-glukozid acetat, malvidin-3-*O*-glukozid acetat), antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat, malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat). Analiza slobodnih antocijana provedena je na Agilent1260 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) HPLC uređaju uz module kvarterne pumpe, autosampler-a, modula kolone te DAD detektor.

Priprema uzorka za HPLC analizu:

Uzorak vina filtriran je kroz celuloza acetat filtar promjera 25 mm i veličine pora 0,45 μm (Filter-Bio, Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20 μL pripremljenog uzorka. Pripremljene mobilne faze su filtrirane te degazirane. Na koloni Nucleosil C18, dimenzija 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Phenomenex Inc., Torrance, CA, SAD) izvršeno je kromatografsko razdvajanje pri temperaturi od 40 °C te uz primjenu binarne mobilne faze: otapalo A (voda/mravlja kiselina; 95:5; v/v) i otapalo B (acetonitril/mravlja kiselina; 95:5; v/v) (Lorrain i sur., 2011). Primjenom gradijenta prikazanog u tablici 3 uz protok mobilne faze od 1 mL min^{-1} provedeno je razdvajanje slobodnih antocijana.

Tablica 3. Korišteni gradijent za razdvajanje slobodnih antocijana

Vrijeme (min)	A (%)	B (%)	Protok (mL min⁻¹)
0	90	10	1
25	65	35	1
26	0	100	1
28	0	100	1
29	90	10	1
35	90	10	1

Detekcija slobodnih antocijana:

Pomoću DAD detektora, snimanjem spektra od 280 do 600 nm provedena je detekcija slobodnih antocijana. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu. Na valnoj duljini od 520 nm provedena je identifikacija i kvantifikacija slobodnih antocijana usporedbom retencijskog vremena (Rt) razdvojenog spoja s retencijskim vremenom standarda te uvidom u UV spektar spoja. Koncentracije pojedinačnih slobodnih antocijana izražene su kao ekvivalent malvidin-3-*O*-glukozid klorida (mg L⁻¹). Iz sume koncentracija delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3-*O*-glukozida izračunati su ukupni slobodni antocijan-3-*O*-glukozidi. Ukupni antocijan-3-*O*-glukozid acetati izračunati su kao suma koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid acetata te malvidin-3-*O*-glukozid acetata. Iz sume koncentracija peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata izračunati su ukupni antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarati.

3.2.10. Određivanje spojeva sorte i fermentacijske arome bijelog i crnog vina plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME – GC/MS)

Određivanje spojeva arome:

Primjenom plinske kromatografije s masenom detekcijom (GC/MS) uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME) provedeno je određivanje spojeva arome.

Određeni su sljedeći spojevi arome: norizoprenoidi [β -damaskenon i 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen (TDN)], esteri [etilni esteri (etil butanoat, etil dekanat, etil heksanoat, etil oktanoat i dietil sukcinat), acetatni esteri (etil acetat, 2-feniletil acetat, heksil acetat, *i*-amil acetat, *i*-butil acetat) i ostali esteri (metil dekanat i metil oktanoat)], viši alkoholi (*cis*-3-heksen-1-ol, 2-fenil etanol, 1-heksanol, *i*-amil alkohol) i hlapive masne kiseline (kapronska, kaprilna i kaprinska kiselina).

Princip GC/MS analize temeljen je na razdvajanju spojeva arome u uzorku koji je nošen strujom inertnog plina nosioca unosi na kromatografsku kolonu. Između nepokretne faze (stacionarna faza, adsorbens) i pokretne faze (mobilna faza, plin nosioc) na koloni došlo je do razdvajanja spojeva. Svaki pojedini spoj ima retencijsko vrijeme kojeg definiramo kao vrijeme zadržavanja spoja na koloni pri zadanim uvjetima. Pomoću masenog detektora koji se nalazi na kraju kolone, određena je prisutnost razdvojenih sastojaka uzorka u pokretnoj fazi. Budući da u masenom detektoru dolazi do ionizacije spojeva, svaki spoj okarakteriziran je određenim omjerom mase i naboja (m/z). Detektor je redom detektirao količinu eluiranih sastojaka kao funkciju vremena te se u konačnici dobio kromatogram.

Svaki pik na kromatogramu karakterističan je za pojedini spoj. Integracijom površine ispod pika dobivena je točna koncentracija u mg L^{-1} . Proporcionalan je odnos površine pika i koncentracije pojedinog spoja u uzorku.

GC/MS analiza:

Kromatografska kolona: BP20 (50 m x 220 μm x 0,25 μm), SGE Analytical Science, Victoria, Australija

Uvjeti rada plinskog kromatografa (GC/MS):

- Temperatura injektora: 250 °C
- Temperatura detektora: 280 °C
- Temperaturni program: 40 °C, 5 min \rightarrow 200 °C, 3 °C min^{-1} \rightarrow 240 °C, 30 °C min^{-1}

- Pokretna faza: Helij
- Protok pokretne faze: 1,2 mL min⁻¹
- Mode injektiranja: „Splitless“

Priprema uzorka za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME):

U odmjernu tikvicu od 50 mL otpipetirati dio uzorka vina, *n*-amil alkohol (interni standard) u koncentraciji od 20 mg L⁻¹ te nadopuniti tikvicu uzorkom vina do oznake. Nadopunjenu tikvicu s uzorkom staviti u termostat na temperaturu od 20 °C. Odvagati 2 ± 0,05 g natrijevog klorida na analitičkoj vagi u HSS bočicu i dodati 10 mL pripremljenog uzorka s internim standardom. Razlog dodavanja natrijevog klorida je da poveća ionsku jakost, odnosno da poveća učinkovitost mikroekstrakcije. U HSS bočicu s uzorkom i natrijevim kloridom dodati magnet, zatvoriti bočicu i postaviti u termoblok s magnetskom miješalicom prethodno zagrijan na 40 °C. Adsorpciju na SPME iglu provesti kroz 30 min na 40 °C uz neprekidno miješanje. Nakon 30 min u injektor plinskog kromatografa prenijeti vlakno kako bi se mogla odvijati desorpcija u trajanju od 5 min.

Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome:

Usporedbom retencijskih vremena spojeva s retencijskim vremenima standarda te usporedbom masenih spektara spojeva s masenim spektrima u Nist05 knjižnici masenih spektara provedena je identifikacija spojeva arome. Kvantifikacija identificiranih spojeva arome provedena je primjenom baždarnih krivulja pripadajućih standarda. Analiza svakog uzorka vina provedena je u paraleli a dobiveni rezultati izraženi su u mg L⁻¹.

Ukupni norizoprenoidi izračunati su kao suma koncentracija β -damaskenona i 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalena (TDN). Ukupni etilni esteri izračunati su kao suma koncentracija etil butanoata, etil heksanoata, etil oktanoata, etil dekanata i dietil sukcinata; dok su acetatni esteri izračunati su kao suma koncentracija etil acetata, *i*-butil acetata, *i*-amil acetata, heksil acetata i 2-feniletil acetat, a ukupni ostali esteri kao suma metil oktanoata i metil dekanata. Ukupni viši alkoholi izračunati su kao suma *i*-amil alkohola, 1-heksanola, *cis*-3-heksen-1-ola i 2-fenil etanola. Ukupne hlapive masne kiseline izračunate su kao suma kapronske, kaprilne i kaprinske kiseline. Računalna obrada dobivenih kromatograma provedena je u programu Enhanced ChemStation (Agilent Technologies) dok je analiza rezultata provedena u programu Microsoft Excel 2016.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na sastav polifenolnih spojeva i arome vina nakon 12 mjeseci starenja u bocama.

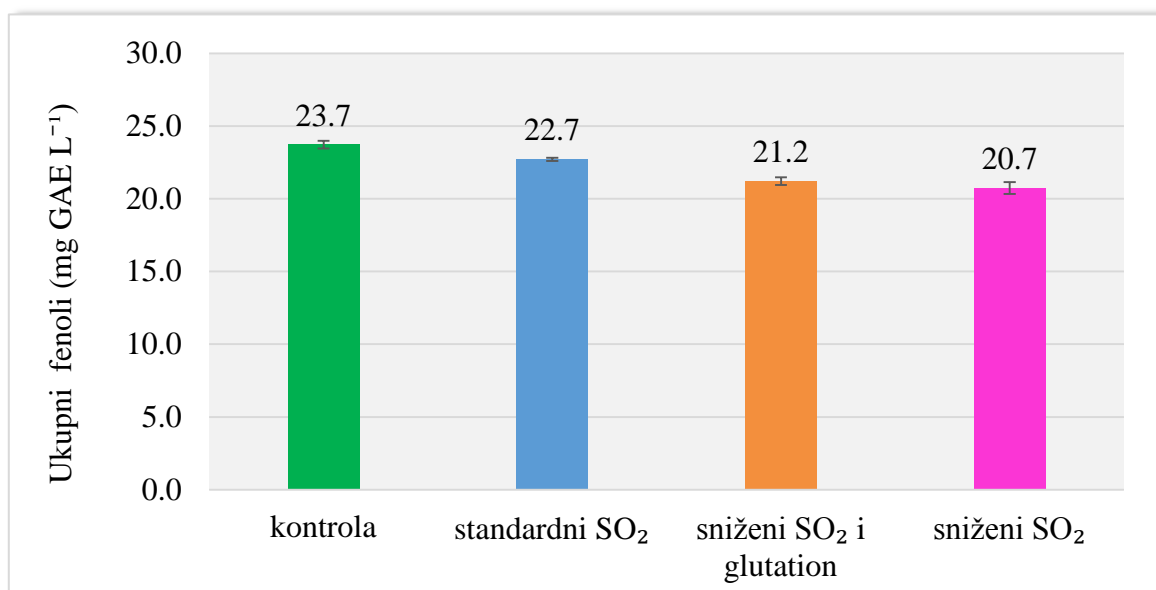
Provedeno je ukupno šest tretmana ultrazvukom visokih snaga, tri na bijelom vinu pomoću ultrazvučne kupelji i tri na crnom vinu pomoću ultrazvučne sonde. Uzorci koji su tretirani imali su različiti sastav sumporovog dioksida i dodanog antioksidansa. Kontrolni uzorak imao je standardni udio sumporovog dioksida.

Koncentracija ukupnih fenola (bijelo i crno vino), antocijana te tanina (crno vino) određena je primjenom spektrofotometrijskih metoda, a rezultati su grafički prikazani na slikama 1 - 4. Sastav fenolnih kiselina i flavanola u bijelom vinu (tablica 4) te sastav slobodnih antocijana u crnom vinu (tablica 5) analiziran je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Sastav spojeva sorte i fermentacijske arome bijelog i crnog vina (tablice 6 i 7) određen je primjenom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME-GC/MS).

4.1. UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKIH SNAGA I DODATKA ANTIOKSIDANSA NA SASTAV POLIFENOLA VINA

4.1.1. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na sastav polifenola bijelog vina Graševina

Utjecaj ultrazvuka visokih snaga na koncentraciju ukupnih fenola bijelog vina Graševina (tretiranog u ultrazvučnoj kupelji) nakon 12 mjeseci starenja u bocama prikazan je na slici 1. Najviše koncentracije ukupnih fenola određene su u uzorcima kontrolnog vina te tretiranog vina sa standardnom koncentracijom SO₂. S druge strane, značajno niže koncentracije ukupnih fenola utvrđene su u tretiranim uzorcima sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona, kao i u vinu sa sniženom koncentracijom SO₂ bez dodatka glutaciona. Dobiveni rezultati upućuju na važnost koncentracije antioksidansa (SO₂ i glutaciona) tijekom starenja vina, a posebice kod vina tretiranih ultrazvukom visokih snaga. Naime, tretman ultrazvukom visokih snaga može efektom otplinjavanja utjecati na smanjenje SO₂ u vinu, i to uglavnom slobodnog te time uzrokovati povećanje stupnja oksidacije vina, budući da SO₂ ima antioksidacijska svojstva te štiti vino kako od enzimske tako od kemijske oksidacije (Garcia i sur., 2016). Nadalje, usporedbom dobivenih koncentracija fenola u tretiranim uzorcima sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona te uzorkom sa sniženom koncentracijom SO₂ vidljiv je utjecaj dodatka antioksidansa glutaciona u vino. Antioksidans ima značajnu ulogu u redukciji slobodnih radikala čime se sprječava oksidacija polifenolnih spojeva.



Slika 1. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih fenola u vinu Graševina

Prema Yildirim i Dundar (2017) kontrolirani i optimalni parametri ultrazvučnog tretmana mogu pozitivno utjecati na odvijanje kemijskih reakcija u vinu. Zhang i sur. (2015a) u svom istraživanju su zaključili da se neke reakcije tipične za starenje mogu pospješiti ultrazvukom, ali isto tako se mogu pojaviti neki neželjeni efekti i reakcije. Stoga, vrlo je važno definirati glavne parametre ultrazvučnog tretmana ovisno o fizikalno kemijskim svojstvima i kvaliteti pojedinog vina. To su: ultrazvučna snaga, frekvencija, temperatura i trajanje tretmana.

Recamales i sur. (2006) su proveli ispitivanje o utjecaju različitih uvjeta starenja bijelog vina Zalema u bocama na polifenolni sastav. Utvrđeno je kako količina svjetlosti, temperatura, kao i položaj boce utječu na koncentraciju ukupnih fenola, te da je tijekom 12 mjeseci starenja u bocama došlo do smanjenja koncentracije ukupnih fenola (Recamales i sur., 2006). Rezultati prikazani na slici 1 pokazali su da je tretman ultrazvukom visokih snaga nakon jednogodišnjeg starenja u bocama rezultirao smanjenjem koncentracije ukupnih fenola u bijelom vinu, odnosno da je ubrao smanjenje koncentracije ukupnih fenola koje se prirodno odvija tijekom starenja vina.

Utjecaj ultrazvuka visokih snaga na koncentraciju fenolnih kiselina i flavanola bijelog vina Graševina (tretiranog u ultrazvučnoj kupelji) nakon 12 mjeseci starenja u bocama prikazan je u tablici 4. U svim uzorcima vina, neovisno o samom tretmanu i dodatku antioksidansa, hidroksicimetne kiseline bile su najzastupljenija skupina pojedinačnih polifenolnih spojeva, a potom flavan-3-ol monomeri, hidroksibenzojeve kiseline te flavan-3-ol dimeri. Ukupna koncentracija hidroksibenzojevih kiselina te flavan-3-ol monomera u ultrazvučno tretiranim uzorcima vina bila je manja u odnosu na kontrolu. Suprotno tome, tretman ultrazvukom visokih snaga nije utjecao na smanjenje koncentracije tretiranog vina sa standardnom koncentracijom SO₂ kao ni kod svih varijanti tretmana i antioksidansa u slučaju flavan-3-ol dimera. Naime, ukupna koncentracija flavan-3-ol dimera (suma koncentracija procijanidina B1 i B2) u tretiranim uzorcima bila je veća za 0,89-1,48 mg L⁻¹ od koncentracije određene u netretiranom kontrolnom uzorku. Najviše koncentracije flavan-3-ol dimera analizirane su u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona (tablica 4), što upućuje na zaštitno djelovanje glutaciona na sastav flavan-3-ol dimera tijekom starenja.

Najviše koncentracije ukupnih hidroksibenzojevih kiselina utvrđene su u kontrolnom uzorku te uzorku sa standardnom koncentracijom SO₂.

Tablica 4. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na koncentraciju fenolnih kiselina i flavanola u vinu Graševina

	UZORCI			
	kontrola	standardni SO ₂	sniženi SO ₂ i glutation	sniženi SO ₂
HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE				
Galna kiselina	4,19 ± 0,09	4,12 ± 0,00	4,01 ± 0,00	4,05 ± 0,02
Protokatehinska kiselina	4,75 ± 0,11	4,30 ± 0,00	4,04 ± 0,28	3,52 ± 0,01
Vanilinska kiselina	4,25 ± 0,10	4,11 ± 0,00	3,87 ± 0,06	3,91 ± 0,05
Siringinska kiselina	2,27 ± 0,05	2,22 ± 0,00	2,11 ± 0,01	2,13 ± 0,03
Ukupne hidroksibenzojeve kiseline	15,46 ± 0,07	14,76 ± 0,00	14,03 ± 0,20	13,62 ± 0,07
HIDROKSICIMETNE KISELINE				
Kafeinska kiselina	3,97 ± 0,05	4,04 ± 0,00	4,02 ± 0,01	4,02 ± 0,01
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	2,39 ± 0,02	2,17 ± 0,00	1,88 ± 0,00	1,90 ± 0,00
Ferulinska kiselina	2,53 ± 0,06	2,52 ± 0,00	2,56 ± 0,02	2,59 ± 0,00
Kaftarinska kiselina	40,59 ± 0,52	41,09 ± 0,00	39,18 ± 0,11	38,98 ± 0,05
Ukupne hidroksicimetne kiseline	49,49 ± 0,39	49,82 ± 0,00	47,64 ± 0,09	47,49 ± 0,03
FLAVAN-3-OL MONOMERI				
(+)-Katehin	7,20 ± 0,08	6,80 ± 0,00	5,43 ± 0,03	5,28 ± 0,08
(-)-Epikatehin	11,42 ± 0,34	10,94 ± 0,00	9,73 ± 0,06	9,51 ± 0,28
Ukupni flavan-3-ol monomeri	18,62 ± 0,42	17,74 ± 0,00	15,17 ± 0,03	14,79 ± 0,20
FLAVAN-3-OL DIMERI				
Procijanidin B1	2,56 ± 0,06	2,82 ± 0,00	2,87 ± 0,01	2,65 ± 0,20
Procijanidin B2	3,29 ± 0,86	3,92 ± 0,00	4,48 ± 0,21	4,10 ± 0,04
Ukupni flavan-3-ol dimeri	5,86 ± 0,79	6,75 ± 0,00	7,34 ± 0,22	6,75 ± 0,24

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija. Koncentracija spoja izražena je u mg L⁻¹.

Međutim, koncentracije ukupnih hidroksibenzojevih kiselina u tretiranom uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutationa te u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ bez dodatka antioksidansa u odnosu na kontrolu bile su niže redom 1,43 – 1,84 mg L⁻¹. Identičan trend zamijećen je i u sastavu hidroksicimetnih kiselina, čije su koncentracije u tretiranim uzorcima sa sniženom koncentracijom SO₂ bile redom 1,85 – 2,00 mg L⁻¹ niže u odnosu na kontrolu. Također, najveću koncentraciju među svim uzorcima imala je kaftarinska kiselina u tretiranom uzorku sa standardnom koncentracijom SO₂ (tablica 4), dok je najmanjoj koncentraciji bila prisutna *p*-kumarinska kiselina u tretiranom uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutationa (tablica 4).

Identičan utjecaj ultrazvuka visokih snaga uočen je u sastavu flavan-3-ol monomera kao i kod prethodno navedenih skupina spojeva. Najviše koncentracije ukupnih flavan-3-ol monomera određene su u kontrolnom uzorku te u uzorku sa standardnom koncentracijom SO₂. S druge strane, utvrđene su niže koncentracije flavan-3-ol monomera u uzorcima tretiranih uzoraka sa sniženim udjelom SO₂ sa i bez dodatka glutaciona. U usporedbi sa kontrolnim uzorkom vina, koncentracije ukupnih flavan-3-ol monomera u navedenim uzorcima bile su redom 3,45 – 3,83 mg L⁻¹ niže.

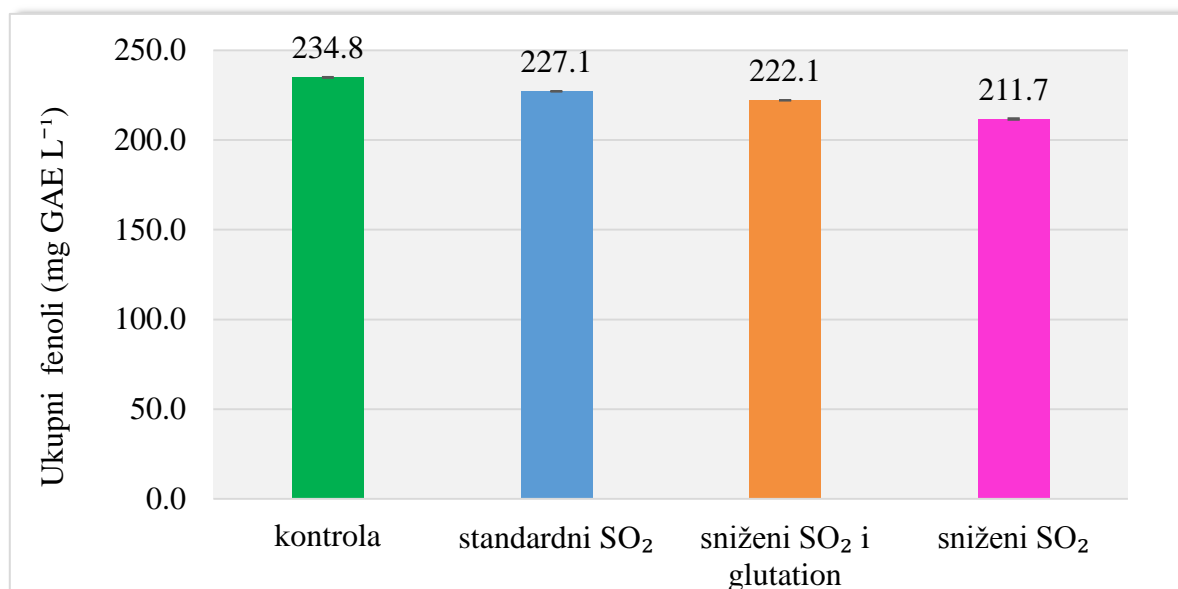
Gledajući dobivene ukupne koncentracije kvantificiranih skupina spojeva u tablici 4 može se vidjeti da je uzorak sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona imao veće vrijednosti analiziranih spojeva od uzorka sa sniženom koncentracijom SO₂, uslijed antioksidacijskog (zaštitnog) djelovanja glutaciona. Nadalje, uspoređujući ukupne koncentracije analiziranih spojeva u tretiranim uzorcima sa standardnom koncentracijom SO₂ i tretiranim uzorcima sa sniženom koncentracijom SO₂, vidljivo je kako su veće koncentracije određene u uzorcima sa standardnom koncentracijom SO₂, uslijed antioksidacijskog djelovanja sumporovog dioksida.

Tchabo i sur. (2017) istražili su utjecaj tretmana ultrazvukom na dudovom vinu bez dodanog sumporovog dioksida te je količina fenolnih kiselina u tretiranom vinu bila veća u odnosu na kontrolu. Ukupna koncentracija fenolnih kiselina iznosila je u kontroli $341,11 \pm 3,63$ mg L⁻¹ a u tretiranom uzorku $364,79 \pm 5,39$ mg L⁻¹, što se djelomično podudara sa rezultatima ovog diplomskog rada budući da je izmjerena koncentracija hidroksibenzojevih kiselina bila veća u kontroli nego u tretiranim uzorcima a koncentracija hidroksicimetnih kiselina bila je veća u tretiranom uzorku u usporedbi sa kontrolom (tablica 4). Stoga, primjena ultrazvuka u vinu može pospješiti kemijske i strukturne promjene koje podsjećaju na one koje se prirodnim starenjem događaju nakon mnogo godina, pri čemu akustična kavitacija igra važnu ulogu (Martin i Sun, 2013).

Kallithraka i sur. (2009) proučavali su promjene u fenolnom sastavu bijelog vina koje je starilo 9 mjeseci u boci pri 15 °C. Dobiveni rezultati su pokazali pad koncentracija većine fenolnih spojeva uz iznimku kafeinske, *p*-kumarinske i ferulinske kiseline čije su koncentracije porasle u odnosu na početne vrijednosti u vinu. Nakon 6 mjeseca starenja u bocama došlo je do signifikantnog smanjenja koncentracija estera vinske kiseline, galne kiseline, katehina i epikatehina (Kallithraka i sur., 2009).

4.1.2. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na sastav polifenola crnog vina Cabernet Sauvignon

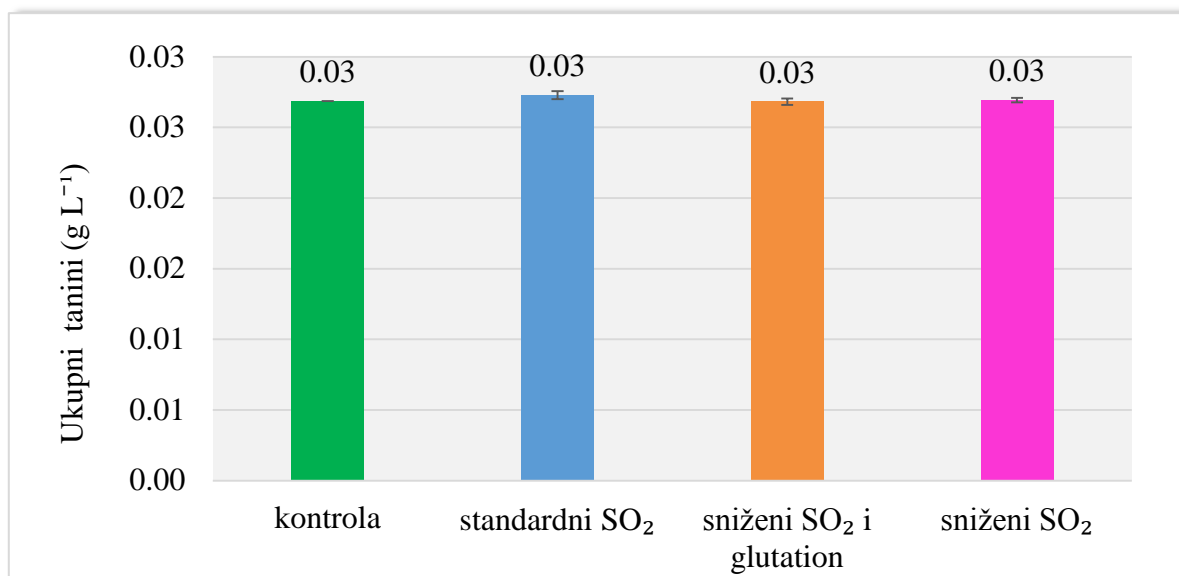
Utjecaj ultrazvuka visokih snaga na koncentraciju ukupnih fenola crnog vina Cabernet Sauvignon (tretiranog ultrazvučnom sondom) nakon 12 mjeseci starenja u bocama prikazan je na slici 2. Najviša koncentracija ukupnih fenola određena je u kontrolnom vinu i u uzorku sa standardnom koncentracijom SO₂. S nešto nižim koncentracijama slijede ih uzorci sa sniženom koncentracijom SO₂ sa i bez dodatka glutaciona. U navedenim uzorcima vina, u odnosu na kontrolu došlo je do značajnog smanjenja u koncentraciji ukupnih fenola i to za 127,0 – 231,6 mg L⁻¹. Dobiveni rezultati impliciraju na važnost dodanih antioksidansa u vinu. Naime, usporedbom koncentracija ukupnih fenola u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona te uzorkom sa sniženom koncentracijom SO₂ bez dodatka spomenutog antioksidansa uočava se važnost dodanog glutaciona, obzirom da razlika u koncentraciji u navedenim uzorcima iznosi 104,6 mg L⁻¹. Nadalje, usporedbom koncentracija ukupnih fenola u tretiranom uzorku sa standardnom koncentracijom SO₂ i uzorkom sa sniženom koncentracijom SO₂ uočena je važnost dodanog sumporovog dioksida u očuvanju fenolnih spojeva tijekom starenja vina u bocama. Također, kao kod s bijelog vina, najniža koncentracija ukupnih polifenolnih spojeva određena je u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂.



Slika 2. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih fenola u vinu Cabernet Sauvignon

Dobiveni rezultati u ovom istraživanju podudaraju se sa istraživanjem Garcia i sur. (2016) gdje je koncentracija ukupnih fenola u ultrazvučno tretiranom uzorku vina Cabernet Sauvignon bila niža od koncentracije u netretiranom uzorku. Također, navedeni autori zaključili su kako trajanje tretmana ima da najveći utjecaj na koncentraciju ukupnih fenola vina. Nadalje, Zhang i sur. (2015a) su određivali utjecaj ultrazvuka na ukupne fenole u vinu Cabernet Sauvignon, berba 2012. godine (Danfeng Winery Ltd., Shaanxi Province, Kina), mijenjajući parametre tretmana. PCA analiza pokazala je da su frekvencija i vrijeme tretmana imali najveći utjecaj na ukupnu koncentraciju fenola u crnom vinu. U kontroli je određeno $1309,09 \pm 3,3 \text{ mg L}^{-1}$ ukupnih fenola a u tretiranom uzorku $1295,4 \pm 12,5 \text{ mg L}^{-1}$ pri ultrazvučnoj snazi od 120 W, frekvenciji od 100 kHz, 20 °C i 20 min. Na temelju provedenog istraživanja, znanstvenici su zaključili da su najbolji parametri tretmana s obzirom na fenolni sadržaj sljedeći: 240 W, 80 kHz, 20 °C i 80 min (Zhang i sur., 2015a). U usporedbi sa kontrolom, svi ultrazvučno tretirani uzorci imali su niže koncentracije ukupnih fenola što se podudara sa rezultatima eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada. Također, Zhang i sur. (2015b) su zaključili da tretman ultrazvukom visokih snaga može potaknuti degradaciju fenola u crnom vinu. Hlapivost etanola tijekom ultrazvučnog tretmana utječe na njegovu koncentraciju u kavitacijskim mjehurićima, što bi značilo da se smanjuje koncentracija etanola u mjehurićima. Tijekom tretmana, formira se više slobodnih radikala kada implodira mjehurić u visoko hlapivom otapalu s malom toplinom isparavanja što dovodi do degradacije fenolnih spojeva (Zhang i sur., 2015b). Prema istraživanju Martin i Sun (2013) korištenje ultrazvuka ubrzava proces starenja vina te ima obećavajući potencijal kao relativno jeftina, netoplinska i efikasna metoda u vinarstvu.

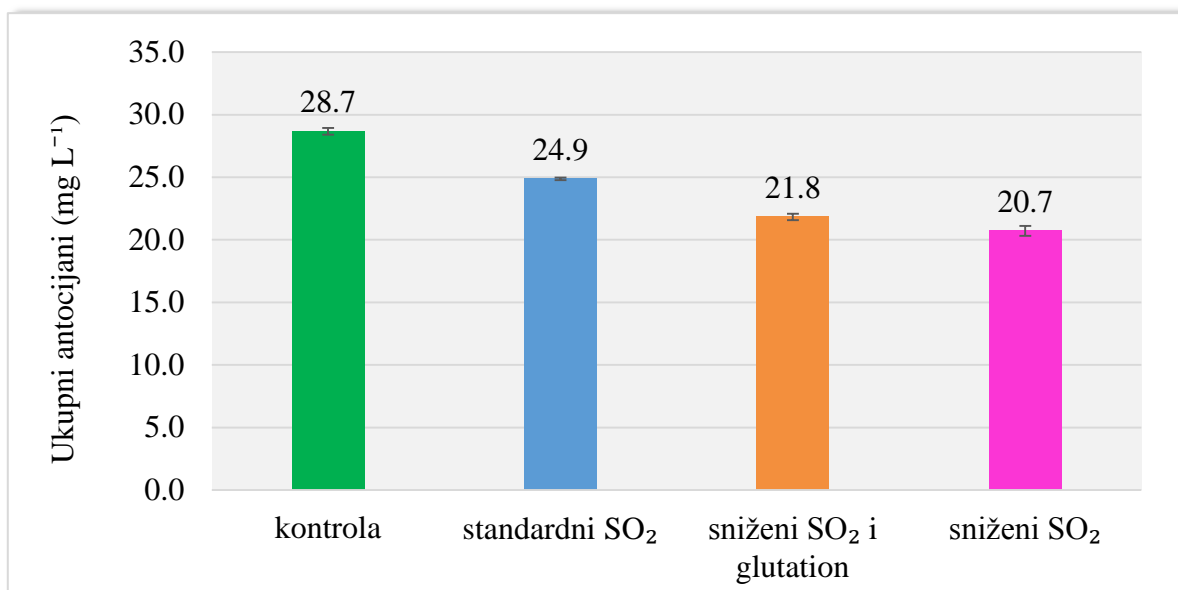
Utjecaj ultrazvuka visokih snaga na koncentraciju ukupnih tanina crnog vina Cabernet Sauvignon (tretiranog ultrazvučnom sondom) nakon 12 mjeseci starenja u bocama prikazan je na slici 3. Vidljivo je kako tretman ultrazvukom visokih snaga nije utjecao na koncentraciju tanina, a također promjene u koncentraciji ovih spojeva nisu uočene ni nakon 12 mjeseci starenja bez obzira na različiti sastav antioksidansa u vinu. Promjene u sastavu ukupnih tanina imaju važan utjecaj na senzorske karakteristike vina tijekom starenja. Prema Boulton (2001) tijekom starenja jedna od najvažnijih promjena u vinu jest povećanje i stabilizacija boje zbog kopigmentacije i stvaranja antocijan-tanin kompleksa, stvaranja novih pigmenata kao i stvaranja tanin-tanin kompleksa.



Slika 3. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih tanina u vinu Cabernet Sauvignon

Masuzawa i sur. (2000) proveli su tretman ultrazvukom frekvencije 30 kHz sa različitim snagama uređaja od 1,8 kPa, 5,8 kPa, 10 kPa te 20 kPa (ultrazvučni tlak) na crnom vinu (Beaujolais Nouveau, Aujoux Co., Francuska) u trajanju od 10 dana. Nakon tretmana, odredili su koncentraciju ukupnih tanina i antocijana te je usporedili s kontrolom. Znanstvenici su odredili veću koncentraciju tanina u kontroli i to u iznosu od 3,4 g L⁻¹ dok je u tretiranom uzorku (1,8 kPa) određeno 2,3 g L⁻¹ tanina. Ostali uzorci koji su bili pod tretmanom veće ultrazvučne snage imali su još niže koncentracije tanina. Nadalje, Marquez i sur. (2014) su ustanovili porast koncentracije tanina u crnim vinima Merlot, Syrahi i Tempranillo tijekom prvih 6 mjeseci starenja te pad koncentracije nakon navedenog perioda. Međutim, nakon 12 mjeseci starenja ukupna koncentracija tanina je bila niža od početne koncentracije prije starenja (Marquez i sur., 2014). Prema Tao i sur. (2013) nakon određenog perioda starenja vino postiže maksimalnu točku starenja i tada ima najveću aromatsku kompleksnost, punoću okusa i mekoću tanina. Nakon toga kvaliteta vina ireverzibilno opada. Zaključili su da vino koje je podvrgnuto tretmanu ultrazvukom visokih snaga prije dosegne maksimalnu točku starenja te da se takva kvaliteta zadrži kroz duži period, čime se produljuje trajnost vina na policama.

Utjecaj ultrazvuka visokih snaga na koncentraciju ukupnih antocijana crnog vina Cabernet Sauvignon (tretiranog ultrazvučnom sondom) nakon 12 mjeseci starenja u bocama prikazan je na slici 4.



Slika 4. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih antocijana u vinu Cabernet Sauvignon

Najviša koncentracija ukupnih antocijana određena u kontroli, a slijedi je uzorak sa standardnom koncentracijom SO₂, uzorak sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona te uzorak sa sniženom koncentracijom SO₂. Smanjenje koncentracije ukupnih antocijana u odnosu na kontrolni uzorak iznosilo je 38,1 mg L⁻¹ u uzorku sa standardnom koncentracijom SO₂ te 68,3 mg L⁻¹ i 79,5 mg L⁻¹ redom u uzorcima sa sniženom koncentracijom SO₂ sa i bez dodatka glutaciona. Dobiveni rezultati upućuju na važnost prisutnosti antioksidansa (sumporov dioksid te glutation) tijekom starenja vina. Utvrđen je pozitivan utjecaj dodatka glutaciona u vino s obzirom na razlike u koncentraciji ukupnih antocijana između uzoraka sa sniženom koncentracijom SO₂ sa i bez i dodatka glutaciona. Nadalje, uzorak sa sniženom koncentracijom SO₂ imao je 41,4 mg L⁻¹ manje ukupnih antocijana u odnosu na uzorak sa standardnom koncentracijom SO₂ što pokazuje na značajan utjecaj koncentracije sumporovog dioksida. Ferraretto i Celotti (2016b) proveli su istraživanje o utjecaju ultrazvuka na polifenolni sastav crnog vina Cabernet Sauvignon mijenjajući parametre tretmana. Koristili su ultrazvuk visoke snage frekvencije 20 kHz, amplituda ultrazvučnog vala iznosila je 30 %, 60 %, 90 % (51 μm, 102 μm, 153 μm) u trajanju od 1 min, 3 min i 5 min. Najniža koncentracija antocijana određena je u kontroli i iznosila je 441 mg L⁻¹. Najveća koncentracija antocijana u iznosu od 462 mg L⁻¹ izmjerena je pri parametrima tretmana od 1 min i amplitudi ultrazvučnog vala od 60 % (102 μm).

Rezultati prikazani na slici 4 ne podudaraju se s rezultatima Ferraretto i Celotti (2016b), vjerojatno uslijed primjene različitih procesnih parametara, kako i činjenice da su navedene promjene u sastavu antocijana utvrđene nakon 12 mjeseci starenja. Smanjenje koncentracije ukupnih antocijana u tretiranim uzorcima u skladu je s promjenama u koncentraciji ovih spojeva tijekom dozrijevanja i starenja vina. Naime, tijekom starenja u crnom vinu, dolazi do povećanja ljubičasto plavih tonova kao rezultat kopigmentacije antocijana. Kopigmentacija jest hidrofobna interakcija između monomernih antocijana i drugih fenola poput flavanola i flavonola (Jackson, 2000). Stoga, s obzirom da je koncentracija ukupnih antocijana u tretiranim uzorcima bila manja u odnosu na kontrolu, može se pretpostaviti kako je tretman ultrazvukom visokih snaga utjecao na povećanje brzine kopigmentacije (tablica 5). Ranija istraživanja također su pokazala kako ultrazvuk utječe na brzinu reakcija izomerizacije, polimerizacije i depolimerizacije polifenolnih spojeva u vinu (Masuzawa i sur., 2000; Tchabo i sur. 2017; Ferraretto i Celotti, 2016a). Naime, prema Garcia i sur. (2016) utjecaj ultrazvuka visokih snaga na vino zbog otplinjavanja može izazvati neočekivane rezultate u reakcijama oksidacije, kondenzacije i polimerizacije polifenola. Jedan od glavnih utjecaja ultrazvuka na vino je ubrzavanje reakcije kondenzacije između antocijana i ostalih fenola (uglavnom tanina) te polimerizacija polifenola, što smanjuje vrijeme dozrijevanja i starenja vina.

Utjecaj ultrazvuka visokih snaga na koncentraciju slobodnih antocijana crnog vina Cabernet Sauvignon (tretiranog ultrazvučnom sondom) nakon 12 mjeseci starenja u bocama prikazan je u tablici 5. Iz dobivenih rezultata u tablici 5 vidljivo je da je najzastupljenija skupina slobodnih antocijana bila antocijan-3-*O*-glukozidi, a u padajućem nizu slijede antocijan-3-*O*-glukozid acetati te najmanje zastupljeni antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarati. Tretman ultrazvukom visokih snaga je značajno utjecao na smanjenje koncentracije ukupnih antocijan-3-*O*-glukozida pa su koncentracije u tretiranim uzorcima bile su redom 15,41 mg L⁻¹, 31,88 mg L⁻¹, 34,88 mg L⁻¹ niže u usporedbi sa kontrolom. Nadalje, usporedbom dobivenih ukupnih koncentracija antocijan-3-*O*-glukozid acetata u tretiranim uzorcima bile su redom 5,79 mg L⁻¹, 8,66 mg L⁻¹, 9,63 mg L⁻¹ niže u usporedbi sa kontrolnim vinom. Tretman ultrazvukom visokih snaga najblaže je utjecao na smanjenje koncentracije ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata, čije koncentracije u tretiranim uzorcima bile su redom 1,29 mg L⁻¹, 2,43 mg L⁻¹, 2,51 mg L⁻¹ niže u usporedbi sa kontrolom (tablica 5). Nadalje, usporedbom koncentracija slobodnih antocijana u uzorcima sa sniženom koncentracijom SO₂ sa i bez dodatka glutaciona jasno je vidljiv antioksidacijski utjecaj glutaciona.

Tablica 5. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na koncentraciju slobodnih antocijana u vinu Cabernet Sauvignon

	UZORCI			
	kontrola	standardni SO₂	sniženi SO₂ i glutation	sniženi SO₂
ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZIDI				
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	6,59 ± 0,19	4,78 ± 0,56	4,21 ± 0,68	3,21 ± 0,04
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,91 ± 0,52	1,46 ± 0,62	1,30 ± 0,72	0,56 ± 0,22
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	6,13 ± 0,38	5,77 ± 0,57	3,86 ± 1,06	3,47 ± 0,33
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	4,54 ± 0,29	4,67 ± 0,03	3,77 ± 0,94	3,20 ± 0,62
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	58,04 ± 0,30	45,12 ± 1,04	32,67 ± 0,01	31,89 ± 0,72
Ukupni antocijan-3- <i>O</i> -glukozidi	77,21 ± 1,68	61,80 ± 2,83	45,83 ± 3,41	42,33 ± 1,93
ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZID ACETATI				
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat	2,05 ± 0,12	1,40 ± 0,09	1,31 ± 0,57	1,13 ± 0,23
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat	17,55 ± 1,17	12,42 ± 0,16	9,36 ± 0,97	8,83 ± 0,11
Ukupni antocijan-3- <i>O</i> -glukozid acetati	19,60 ± 1,29	13,81 ± 0,25	10,94 ± 1,54	9,97 ± 0,34
ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZID <i>p</i>-KUMARATI				
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	1,11 ± 0,37	0,78 ± 0,12	0,66 ± 0,02	0,70 ± 0,08
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	4,61 ± 0,06	3,65 ± 0,05	2,63 ± 0,11	2,51 ± 0,20
Ukupni antocijan-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarati	5,72 ± 0,44	4,43 ± 0,16	3,29 ± 0,13	3,21 ± 0,28

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija. Koncentracija spoja izražena je u mg L⁻¹.

Također, uzorak sa standardnom koncentracijom SO₂ naspram uzorka sa sniženom koncentracijom SO₂ nakon tretmana ultrazvukom visokih snaga rezultirao je većom koncentracijom svih analiziranih slobodnih antocijana zbog većeg antioksidacijskog djelovanja sumporovog dioksida. Generalno gledajući, dobiveni rezultati pokazuju kako tretman ultrazvukom visokih snaga značajno utječe na smanjenje koncentracije slobodnih antocijana tokom starenja vina u bocama kao i na važnost koncentracije antioksidansa prilikom starenja.

Znanstvenici Zhang i Wang (2017) proveli su istraživanje o utjecaju ultrazvuka visokih snaga na polifenolni sastav vina Cabernet Sauvignon (Shaanxi Province, Kina) tijekom starenja u bocama. Ultrazvučni uređaj (950 W, 20 kHz) korišten je pri tretmanu uzoraka vina u trajanju od 14 min i 28 min. Uzorci su u bocama uskladišteni pri kontroliranim uvjetima, a nakon 70 dana starenja provedeno je određivanje fenolnog sastava primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Tijekom starenja utvrđen je pad koncentracije malvidin-3-*O*-glukozida, pri čemu je nakon 70 dana starenja najviša koncentracija određena u kontroli, a zatim u uzorku koji je tretiran 14 min, dok je najmanja koncentracija određena u uzorku koji je podvrgnut tretmanu od 28 min. Drugim riječima, dulje vrijeme tretmana ubrzalo je pad koncentracije malvidin-3-*O*-glukozida (Martin i Sun, 2013). Rezultati ovog istraživanja (tablica 5) također su pokazali veću koncentraciju malvidin-*O*-glukozida u kontroli nego u tretiranim uzorcima. Rezultat smanjenja navedenog spoja rezultat je formiranja kompleksa antocijan-tanin i kopigmentacije malvidin-3-*O*-glukozida sa ostalim fenolima (Zhang i Wang, 2017).

Prema istraživanju Marquez i sur. (2014) u crnim vinima Merlot, Syrahi i Tempranillo između 6. i 9. mjeseca starenja u bocama došlo je do najveće degradacije monomernih antocijana. Smanjenje monomernih antocijana rezultat je različitih postupnih reakcija koje su rezultirale stvaranjem stabilnih pigmenata. Nadalje, navedene reakcije uzrokovale su da mlada crna vina poprime smeđe nijanse kako je vrijeme starenja prolazilo, što je naročito bio slučaj kod vina Tempranillo. Nakon godinu dana starenja vina u bocama, u navedenim vinima utvrđeno je smanjenje koncentracije antocijan glukozida redom sa 63 %, 58 % i 60 % na 20 %, 17 % i 14 %, kao i smanjenje koncentracije acetata, kumarata i kafeinata u svim uzorcima (Marquez i sur., 2014). Također, Zafrilla i sur. (2003) u svom istraživanju pratili su promjene u sastavu polifenolih spojeva tijekom 7 mjeseci starenja u ekološkim i konvencionalnim crnim (Monastrell) i bijelim vinima (Airen). Tijekom starenja vina uočene su promjene u sastavu flavonola i pojedinih hidroksicimetnih kiselina, međutim najveće promjene uočene su u sastavu antocijana, čija se koncentracija smanjila za čak 88 - 91 %.

4.2. UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKIH SNAGA I DODATKA ANTIOKSIDANSA NA AROMU VINA

4.2.1. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na aromu bijelog vina Graševina

Utjecaj ultrazvuka visokih snaga na spojeve arome bijelog vina Graševina (tretiranog u ultrazvučnoj kupelji) nakon 12 mjeseci starenja u bocama prikazan je u tablici 6. S obzirom na kontrolu, koncentracija ukupnih norizoprenoida u uzorku sa standardnom koncentracijom SO₂ se povećala za 9,42 µg L⁻¹, u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutationa se povisila za 2,90 µg L⁻¹ dok je u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ utvrđeno 3,20 µg L⁻¹ manje ukupnih spojeva.

Nadalje, usporedbom rezultata prikazanih u tablici 6, u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ utvrđeno je povećanje koncentracije ukupnih etilnih estera od 1,40 mg L⁻¹ u usporedbi sa kontrolom. U ostalim uzorcima utvrđena je niža ukupna koncentracija ukupnih etilnih estera u odnosu na kontrolu, odnosno ustanovljeno je da je tretman ultrazvukom visokih snaga rezultirao smanjenjem koncentracije. Najzastupljenija skupina estera bili su acetatni esteri, obzirom na visoku koncentraciju etil acetata. Najveća koncentracija ukupnih acetatnih estera određena je u kontroli, zatim u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂. Utvrđen je utjecaj tretmana ultrazvukom visokih snaga na smanjenje koncentracije ukupnih acetatnih estera i u ostalim uzorcima. Također, prema tablici 6 najmanje zastupljena skupina estera, ostali esteri, imala je najveću koncentraciju u uzorku sa sniženim SO₂. U navedenom uzorku, utvrđeno je da je tretman ultrazvukom visokih snaga utjecao na povećanje koncentracije ukupnih ostalih estera za 45,67 µg L⁻¹ u odnosu na kontrolni uzorak.

Aromi bijelog vina pridonijela je i skupina viših alkohola, osobito spoj *i*-amil alkohol koji je bio određen u najvećoj koncentraciji u kontrolnom uzorku. Tretman ultrazvukom visokih snaga, u odnosu na kontrolu, utjecao je na smanjenje koncentracije ukupnih viših alkohola u rasponu od 4,39 - 7,55 mg L⁻¹ u navedenim uzorcima (tablica 6).

Kod ukupnih hlapivih masnih kiselina najviša koncentracija određena je u uzorku sa standardnom koncentracijom SO₂. Tretman ultrazvukom visokih snaga utjecao je na povećanje koncentracije ukupnih hlapivih masnih kiselina u iznosu od 1,21 mg L⁻¹ u odnosu na kontrolu. Kaprilna kiselina je bila dominantna u navedenoj skupini spojeva u svim uzorcima.

Tablica 6. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na koncentraciju spojeva arome u vinu Graševina

	UZORCI			
	kontrola	standardni SO ₂	sniženi SO ₂ i glutation	sniženi SO ₂
NORIZOPRENOIDI				
1,1,6-Trimetil-1,2-dihidronaftalen ^{**}	8,85 ± 0,38	13,51 ± 1,65	7,74 ± 0,91	4,17 ± 0,47
β -Damaskenon ^{**}	1,17 ± 0,10	5,93 ± 0,21	5,18 ± 0,06	2,65 ± 0,16
Ukupni norizoprenoidi ^{**}	10,02 ± 0,48	19,44 ± 1,86	12,92 ± 0,97	6,82 ± 0,62
ETILNI ESTERI				
Etil butanoat [*]	1,29 ± 0,02	1,17 ± 0,01	1,08 ± 0,01	1,22 ± 0,04
Etil heksanoat [*]	1,97 ± 0,08	2,02 ± 0,06	1,99 ± 0,03	2,40 ± 0,22
Etil oktanoat [*]	1,56 ± 0,11	1,28 ± 0,08	1,36 ± 0,07	2,06 ± 0,28
Etil dekanoat [*]	1,12 ± 0,03	0,51 ± 0,03	0,73 ± 0,06	1,25 ± 0,08
Dietil sukcinat [*]	1,79 ± 0,04	2,02 ± 0,04	2,05 ± 0,04	2,19 ± 0,04
Ukupni etilni esteri [*]	7,71 ± 0,27	6,99 ± 0,21	7,21 ± 0,21	9,11 ± 0,66
ACETATNI ESTERI				
Etil acetat [*]	27,63 ± 0,47	24,27 ± 0,49	24,00 ± 0,04	27,07 ± 0,29
<i>i</i> -Butil acetat ^{**}	24,80 ± 2,48	19,29 ± 1,36	14,08 ± 2,01	21,30 ± 2,64
<i>i</i> -Amil acetat [*]	1,17 ± 0,03	1,07 ± 0,02	0,91 ± 0,00	1,12 ± 0,06
Heksil acetat [*]	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,09 ± 0,01
2-Feniletal acetat [*]	0,10 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,10 ± 0,01
Ukupni acetatni esteri [*]	29,01 ± 0,50	25,54 ± 0,52	25,06 ± 0,04	28,39 ± 0,36
OSTALI ESTERI				
Metil oktanoat ^{**}	255,79 ± 21,87	231,09 ± 12,16	223,94 ± 3,61	299,64 ± 43,24
Metil dekanoat ^{**}	11,76 ± 0,42	6,29 ± 0,40	7,83 ± 0,47	13,58 ± 1,55
Ukupni ostali esteri ^{**}	267,54 ± 22,29	237,37 ± 12,56	231,76 ± 4,09	313,21 ± 44,79
VIŠI ALKOHOLI				
<i>i</i> -Amil alkohol [*]	93,02 ± 1,73	85,50 ± 1,46	84,86 ± 0,27	87,99 ± 0,13
1-Heksanol [*]	1,57 ± 0,04	1,51 ± 0,04	1,42 ± 0,01	1,55 ± 0,01
<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol ^{**}	153,64 ± 8,06	158,32 ± 6,68	146,71 ± 3,80	156,47 ± 0,00
2-Fenil etanol [*]	5,31 ± 0,49	6,32 ± 0,23	6,08 ± 0,26	5,97 ± 0,18
Ukupni viši alkoholi [*]	100,05 ± 2,28	93,48 ± 1,75	92,50 ± 0,55	95,66 ± 0,32
HLAPIVE MASNE KISELINE				
Kaprnska kiselina [*]	3,55 ± 0,06	3,87 ± 0,17	3,56 ± 0,08	3,84 ± 0,06
Kaprilna kiselina [*]	9,00 ± 0,24	9,91 ± 0,08	8,82 ± 0,14	9,50 ± 0,66
Kaprinska kiselina [*]	1,70 ± 0,42	1,68 ± 0,04	1,65 ± 0,11	1,81 ± 0,11
Ukupne hlapive masne kiseline [*]	14,25 ± 0,73	15,46 ± 0,30	14,03 ± 0,33	15,15 ± 0,83

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija. * Koncentracija spoja izražena u mg L⁻¹. ** Koncentracija spoja izražena u µg L⁻¹.

Prema dobivenim podacima u tablici 6, tretman ultrazvukom visokih snaga utjecao je na blago povećanje koncentracije ukupnih hlapivih masnih kiselina uz iznimku uzorka sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona. Vidljivo je kako je utjecaj tretmana ultrazvukom visokih snaga na sastav arome bijelog vina Graševina bio vrlo različit, pri čemu je potrebno istaknuti i važnost koncentracije antioksidansa u vinu tijekom starenja u bocama.

Roussis i sur. (2007) proveli su istraživanje o utjecaju sniženog udjela SO₂ u bijelom vinu Debina (berba 2004, Grčka) na hlapive spojeve bijelog vina nakon 7 mjeseci starenja pri 20 °C. Imali su uzorak sa smanjenom koncentracijom SO₂ (slobodni SO₂ 35 mg L⁻¹), uzorak sa standardnom koncentracijom slobodnog SO₂ (slobodni SO₂ 55 mg L⁻¹), uzorak sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom kafeinske kiseline (60 mg L⁻¹), uzorak sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona (20 mg L⁻¹), uzorak sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom mješavine kafeinske kiseline i glutaciona (30 mg L⁻¹ + 10 mg L⁻¹). U svim uzorcima koncentracije acetatnih estera, etil estera, terpena i hlapivih masnih kiselina su se značajno smanjile tijekom starenja vina, dok su promjene u koncentraciji viših alkohola bile neznatne. Nakon 7 mjeseci starenja, najviša koncentracija ukupnih acetatnih estera u iznosu od 11,79 ± 0,66 mg L⁻¹ te ukupnih etilnih estera u iznosu od 188,13 ± 11,74 mg L⁻¹ određena je u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom kafeinske kiseline i glutaciona (Roussis i sur., 2007), dok je ovom diplomskom radu najviša koncentracija ukupnih acetatnih estera nakon starenja određena je u kontroli, a ukupnih etilnih estera u tretiranom uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂. Nadalje, najviša koncentracija ukupnih viših alkohola nakon starenja bijelog vina Debina utvrđena je u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona u iznosu od 79,45 ± 3,55 mg L⁻¹ a u provedenom istraživanju na bijelom vinu Graševini određena je u kontroli (standardna koncentracija SO₂). Što se tiče koncentracije ukupnih hlapivih masnih kiselina znanstvenici su utvrdili da je najviša koncentracija određena u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ a u diplomskom radu u uzorku sa standardnim udjelom SO₂. Nakon starenja, najviše koncentracije etil acetata, *i*-amil acetata, 2-feniletal acetata određene su u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom mješavine antioksidansa. Usporedbom uzorka sa sniženom i standardnom koncentracijom SO₂ koncentracije hlapivih spojeva su bile statistički jednake tijekom starenja uz iznimku etil acetata koji je bio u većoj koncentraciji u uzorku sa standardnom koncentracijom SO₂. Kafeinska kiselina, glutation i njihova mješavina usporili su tijekom starenja smanjenje acetatnih estera, etilnih estera i terpena, kao što su etil acetat, *i*-amil acetat, linalol, dok nisu imali učinka na ukupnu koncentraciju viših alkohola niti hlapivih masnih kiselina.

Rezultati upućuju na to da sumporov dioksid daje ograničenu zaštitu hlapivih spojeva u vinu dok kafeinska kiselina, glutation i njihova mješavina štiti nekoliko aromatskih hlapivih spojeva u vinu sa sniženom koncentracijom SO₂ (Roussis i sur., 2007).

4.2.2. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na aromu crnog vina Cabernet Sauvignon

Utjecaj ultrazvuka visokih snaga na koncentraciju spojeva arome crnog vina Cabernet Sauvignon (tretiranog ultrazvučnom sondom) nakon 12 mjeseci starenja u bocama prikazan je u tablici 7. Uočen je pozitivan utjecaj tretmana ultrazvukom visokih snaga, budući da su u svim tretiranim uzorcima vina u odnosu na kontrolu zabilježene više koncentracije ukupnih norizoprenoida od 0,43 – 0,12 µg L⁻¹, a posebno u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂.

Dietil sukcinat bio je najzastupljeniji etilni ester u crnom vinu. U svim tretiranim uzorcima primijećene su blago veće koncentracije etilnih estera. U usporedbi sa kontrolnim vinom, najveća koncentracija ukupnih etilnih estera utvrđena je u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂, čije povećanje je iznosilo 0,75 mg L⁻¹. Etil acetat je kvantificiran kao najzastupljeniji spoj u skupini acetatnih estera. Najviša koncentracija ukupnih acetatnih estera, određena je u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona te potom u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂. U usporedbi sa kontrolom, koncentracije ukupnih acetatnih estera u navedenim uzorcima bila su redom više za 4,87 – 4,72 mg L⁻¹ (tablica 7). Nadalje, u odnosu na kontrolu samo su u uzorku sa standardnom koncentracijom SO₂ utvrđene niže koncentracije ukupnih acetatnih estera. Što se tiče ukupnih ostalih estera najviše koncentracije ovih spojeva određene su u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ pa potom u kontroli, dok su najniže koncentracije analizirane u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i dodatkom glutaciona.

i-amil alkohol bio je najzastupljeniji spoj u skupini viših alkohola. Iz tablice 7 vidljiva je veća koncentracija ukupnih viših alkohola u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ sa i bez dodatka glutaciona nego u kontrolnom uzorkom, što nije bio slučaj kod uzorka sa standardnom koncentracijom SO₂ gdje je uočeno smanjenje ukupnih viših alkohola u odnosu na kontrolu. Kaprilna kiselina bila je najzastupljenija hlapiva masna kiselina u crnom kao i u bijelom vinu. Uočen je pozitivan utjecaj ultrazvuka visokih snaga u svim tretiranim uzorcima budući da su u kontrolnom uzorku kvantificirane najniže koncentracije navedenih spojeva. Najviše koncentracije ovih spojeva određene su u uzorku sa sniženom koncentracijom SO₂ i to za 0,79 mg L⁻¹ više u odnosu na kontrolni uzorak.

Tablica 7. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na koncentraciju spojeva arome u vinu Cabernet Sauvignon

	UZORCI			
	kontrola	standardni SO ₂	sniženi SO ₂ i glutation	sniženi SO ₂
NORIZOPRENOIDI				
1,1,6-Trimetil-1,2-dihidronaftalen**	0,19 ± 0,02	0,13 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,22 ± 0,01
β-Damaskenon**	2,23 ± 0,43	2,41 ± 0,13	2,23 ± 0,20	2,62 ± 0,12
Ukupni norizoprenoidi**	2,41 ± 0,45	2,53 ± 0,16	2,36 ± 0,24	2,84 ± 0,13
ETILNI ESTERI				
Etil butanoat*	0,32 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,32 ± 0,04	0,34 ± 0,01
Etil heksanoat*	0,38 ± 0,04	0,37 ± 0,02	0,35 ± 0,06	0,45 ± 0,07
Etil oktanoat*	0,24 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,21 ± 0,06	0,32 ± 0,06
Etil dekanooat*	0,11 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,12 ± 0,00
Dietil sukcinat*	1,16 ± 0,13	1,54 ± 0,21	1,54 ± 0,19	1,73 ± 0,56
Ukupni etilni esteri*	2,20 ± 0,21	2,47 ± 0,28	2,48 ± 0,37	2,95 ± 0,69
ACETATNI ESTERI				
Etil acetat*	32,22 ± 0,95	31,17 ± 1,19	37,10 ± 3,31	36,89 ± 0,55
<i>i</i> -Butil acetat**	29,69 ± 2,43	20,49 ± 3,39	21,78 ± 5,78	24,39 ± 2,96
<i>i</i> -Amil acetat*	0,37 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,36 ± 0,05	0,41 ± 0,02
Heksil acetat*	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01
2-Feniletil acetat*	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01
Ukupni acetatni esteri*	32,63 ± 0,97	31,56 ± 1,21	37,50 ± 3,36	37,35 ± 0,59
OSTALI ESTERI				
Metil oktanoat**	182,99 ± 20,13	180,75 ± 13,17	175,14 ± 26,81	251,13 ± 45,00
Metil dekanooat**	5,97 ± 0,83	4,26 ± 0,47	4,31 ± 1,98	7,22 ± 0,46
Ukupni ostali esteri**	188,96 ± 20,97	185,00 ± 13,65	179,45 ± 28,79	258,35 ± 45,46
VIŠI ALKOHOLI				
<i>i</i> -Amil alkohol*	218,20 ± 10,44	200,61 ± 0,52	226,80 ± 9,36	227,73 ± 21,31
1-Heksanol*	2,39 ± 0,12	2,22 ± 0,01	2,34 ± 0,02	2,41 ± 0,16
<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol**	114,22 ± 2,96	105,14 ± 4,26	109,6 ± 8,50	112,63 ± 0,82
2-Fenil etanol*	13,91 ± 2,13	17,65 ± 3,78	15,93 ± 1,99	19,53 ± 5,48
Ukupni viši alkoholi*	234,60 ± 12,69	220,58 ± 4,31	257,17 ± 11,38	249,77 ± 26,94
HLAPIVE MASNE KISELINE				
Kaprnska kiselina*	0,66 ± 0,12	0,82 ± 0,12	0,77 ± 0,14	0,85 ± 0,20
Kaprilna kiselina*	1,12 ± 0,18	1,46 ± 0,26	1,45 ± 0,18	1,63 ± 0,12
Kaprinska kiselina*	0,15 ± 0,05	0,17 ± 0,04	0,20 ± 0,00	0,23 ± 0,32
Ukupne hlapive masne kiseline*	1,92 ± 0,35	2,44 ± 0,42	2,42 ± 0,32	2,71 ± 0,33

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija. * Koncentracija spoja izražena u mg L⁻¹. ** Koncentracija spoja izražena u µg L⁻¹.

Prema rezultatima u tablici 7, gledajući koncentracije ukupnih skupina spojeva vidljiv je utjecaj tretmana ultrazvukom visokih snaga na blago više koncentracije etilnih estera i hlapivih masnih kiselina u svim tretiranim uzorcima, kao i blago više koncentracije acetatnih estera i viših alkohola, međutim samo u tretiranim uzorcima sa nižom koncentracijom SO₂.

Hui-Juan i sur. (2014) proveli su istraživanje o utjecaju tretmana ultrazvuka visokih snaga na polifenolni sastav i sastav arome vina Cabernet Sauvignona. Utvrdili su kako tretirani uzorci u odnosu na netretirane imaju niže koncentracije sljedećih spojeva: *i*-amil alkohol, 1-propanol te *i*-butanol. S druge strane, tretirani uzorci u odnosu na kontrolu imali su više koncentracije etil acetata i 2-fenil etanola. Dio rezultata prikazanih u tablici 7 podudara se s rezultatima istraživanjem Hui-Juan i sur. (2014). U usporedbi s kontrolom, tretirani uzorci vina imali su veću koncentraciju 2-fenil etanola i etil acetata (iznimka uzorak sa standardnom koncentracijom SO₂) kao i u istraživanju Hui-Juan i sur. Što se tiče *i*-amil alkohola, u usporedbi sa kontrolnim uzorkom niža koncentracija određena je samo u uzorku sa standardnim udjelom SO₂, slično kao u istraživanju Hui-Juan i sur. (2014) te Yun i sur. (2008), dok su u ostalim uzorcima određene više koncentracije navedenog spoja.

Yun i sur. (2008) proveli su istraživanje o utjecaju ultrazvuka na stabilnost spojeva arome u nekoliko suhih crnih vina. Tretman ultrazvukom visokih snaga trajao je 18 min. Nakon analize i kvantifikacije utvrdili su da je ukupna koncentracija estera porasla u rasponu od 19,61 % do 31,19 % u tretiranim uzorcima vina u odnosu na kontrolu. Rezultati navedenog istraživanja Yun i sur. se podudaraju s provedenim istraživanjem u diplomskom radu jer je u odnosu na netretirani uzorak došlo do povećanja količine ukupnih estera u svim tretiranim uzorcima osim u uzorku sa standardnom koncentracijom SO₂.

Chang (2004) je ispitivao utjecaj različitih tehnika za ubrzavanje starenja kukuruznog vina, pri čemu su uzorci tretirani ultrazvukom od 20 kHz, ultrazvukom od 1,6 MHz te gama zračenjem nakon čega je uslijedilo 12 mjeseci starenja. U usporedbi sa netretiranim vinom, sva tretirana vina su brže ostarila. Rezultati su pokazali da uzorci koji su tretirani ultrazvukom od 20 kHz i 1,6 MHz nisu postigli očekivanu kvalitetu nakon godine dana starenja. U uzorku koji je tretiran ultrazvukom od 20 kHz koncentracije etil acetata i 2-fenil etanola su se smanjile, dok je u netretiranom vinu njihova koncentracija bila viša (Chang, 2004). Iako je tretman na bijelom vinu Graševina rezultirao nižim koncentracijama etil acetata, kao i u istraživanju Chang (2004), niži udio etil acetata u crnom vinu određen je samo u uzorku sa standardnom koncentracijom SO₂, dok je svim ostalim tretiranim uzorcima crnog vina koncentracija etil acetata i 2-fenil etanola bila viša u odnosu na kontrolni uzorak.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata o utjecaju tretmana ultrazvukom visokih snaga i dodatka antioksidansa može se zaključiti sljedeće:

1. Tretman ultrazvukom visokih snaga (100 %, 80 kHz, 27 °C, 30 min) utjecao je na blago smanjenje koncentracije ukupnih fenola, hidroksibenzojevih kiselina i flavan-3-ol monomera u bijelom vinu Graševina, pri čemu je viša koncentracija dodanih antioksidansa rezultirala i višom koncentracijom analiziranih spojeva.
2. Koncentracija ukupnih fenola u crnom vinu Cabernet Sauvignon tretiranom ultrazvukom visokih snaga (100 %, 20 kHz, 25 °C, 3 min) blago je smanjena, pri čemu su najviše koncentracije (kao i kod bijelog vina) utvrđene u vinu s višom koncentracijom SO₂ i glutaciona.
3. Tretman ultrazvukom visokih snaga nije utjecao na koncentraciju ukupnih tanina, ali je značajno utjecao na smanjenje koncentracije ukupnih i slobodnih antocijana u crnom vinu, posebice u vinima sa sniženom koncentracijom SO₂ te bez dodatka glutaciona.
4. Primjena ultrazvuka visokih snaga na bijelom vinu rezultirala je blagim smanjenjem koncentracije spojeva arome u prvom redu estera i viših alkohola, dok je u crnom vinu utvrđeno blago povećanje koncentracije etilnih estera i hlapivih masnih kiselina, kao i nešto više koncentracije acetatnih estera i viših alkohola međutim samo u vinima s nižom koncentracijom SO₂.
5. Kemijske promjene u sastavu polifenola i arome uočene djelovanjem ultrazvuka visokih snaga na vino, identične su onima koje se u vinu odvijaju tijekom prirodnog starenja te upućuju na mogućnost primjene ove tehnologije kao jeftine i efikasne metode za ubrzavanje starenja vina.

6. LITERATURA

- Arnous, A., Makris, D. M., Kefalas, P. (2001) Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5736-5742.
- Badea, G. A., Antoce, A. O. (2015) Glutathione as a possible replacement of sulfur dioxide in winemaking technologies: a review. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **59**, 123-140.
- Bates, D., Patist, A. (2011) Industrial applications of high power ultrasonics. U: *Ultrasound Technologies For Food and Bioprocessing*, (Feng, H., Barbosa-Canovas, G., Weiss, J., ured.), Springer, New York, str. 599-616.
- Boulton, R. (2001) The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* **52**, 67-87.
- Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009a) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Food Technol. Biotech.* **4**, 32-37.
- Brnčić, M., Markučić, D., Omelić, M., Tripalo, B., Ježek, D. (2009b) Primjena ultrazvuka niskog intenziteta pri otkrivanju stranih tijela u prehrambenim sustavima. *Food Technol. Biotech.* **4**, 18-22.
- Chang, A. C. (2004) The effects of different accelerating techniques on maize wine maturation. *Food Chem.* **86**, 61-68.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N. (2006) Phenols, Polyphenols and Tannins: An Overview. U: *Plant Secondary Metabolites*, (Crozier, A., Clifford, M. N., Ashihara, H., ured.), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, str. 1-19.
- El Hosry, L., Auezova, L., Sakr, A., Hajj-Moussa, E. (2009) Browning susceptibility of white wine and antioxidant effect of glutathione. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **44**, 2459-2463.
- Farrer-Gallego, R., Puxeu, M., Martin, L., Nart, E., Hidalgo, C., Andorra, I. (2018) Microbiological, physical and chemical procedures to elaborate high-quality SO₂ free wines. U: *Grapes and Wines - Advances in Production, Processing, Analysis and Valorization*, (Jordao, A.M., Cosme, F., ured.), IntechOpen, London, str. 171-173.

- Ferraretto, P., Celotti, E. (2016a) Ultrasound application in winemaking for a low impact enology. U: Application of Ultrasound in the Beverage Industry, (Martin, J. F. G., ured.), Nova Science Publishers, Inc., New York, str. 115-145.
- Ferraretto, P., Celotti, E. (2016b) Preliminary study of the effects of ultrasound on red wine polyphenols. *CyTA - J. Food*. **14**, 529-535.
- Francis, I. L., Newton, J. L. (2005) Determining wine aroma from compositional data. *Aust J. Grape Wine Res.* **11**, 114-126.
- Garcia, J.F., Zhang, Q.-A., Feng, C.-H. (2016) Ultrasound for accelerating the wine ageing process from physicochemical point of view. U: Application of Ultrasound in the Beverage Industry, (Martin, J.F.G, ured.), Nova Science Publishers, Inc., New York, str. 89-111.
- Herceg, Z., Brnčić, M., Režek Jambrak, A., Rimac Brnčić, S., Badanjak, M., Sokolić, I. (2009) Mogućnost primjene ultrazvuka visokog intenziteta u mljekarskoj industriji. *Mljekarstvo*. **59**, 65-69.
- Hui-Juan, L., Cong, N., Ying, M., Sheng, L., Wen, T. (2014) Influence of ultrasonic wave on quality of Cabernet Sauvignon wine, *The Food Industry*. [online] **11**, <http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-SPGY201411006.htm>. Pristupljeno 13. ožujka 2019.
- Jackson R. S. (2000) Wine science: Principles, practice, perception. 2 izd. Academic Press, San Diego.
- Jiranek, V., Grbin, P., Yap, A., Barnes, M., Bates, D. (2008) High power ultrasonics as a novel tool offering new opportunities for managing wine microbiology. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1-6.
- Kallithraka, S., Salacha, M.I., Tzourou, I. (2009) Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chem.* **113**, 500-505.
- Lorrain, B., Chira, K., Teissedre, P. L. (2011) Phenolic composition of Merlot and Cabernet - Sauvignon grapes from Bordeaux vineyard for the 2009 - vintage: Comparison to 2006, 2007 and 2008 vintages. *Food Chem.* **126**, 1991-1999.
- McClements, D. J. (1995) Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 293-299.

- Marquez, A., Serratosa, M.P., Merida, J. (2014) Influence of bottle storage time on colour, phenolic composition and sensory properties of sweet red wines. *Food Chem.* **146**, 507-514.
- Martin, J. F. G., Sun, D. W. (2013) Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-the-art research. *Trends Food Sci. Technol.* **33**, 40-53.
- Masuzawa, N., Ohidaira, E., Ide, M. (2000) Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Jpn. J. Appl. Phys.* **39**, 2978-2979.
- Mason, T. J. (1998) Power ultrasound in food processing - the way forward. U: Ultrasound in Food Processing, (Povey, M. J. W., Mason, T. J., ured.), Blackie Academic & Professional, London.
- Pravilnik o kategorijama proizvoda od grožđa i vina, enološkim postupcima i ograničenjima (2010) *Narodne novine* **114**, Zagreb.
- Recamales, A. F., Sayago, A., Gonzales-Miret, M. L., Hernanz, D. (2006) The effect of time and storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Res. Int.* **39**, 220-229.
- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1965) Determination of Anthocyanins in Red Wine. *B. Soc. Chim. Fr.* **9**, 2649-2652.
- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.-Paris.* **48**, 188-196.
- Ribéreau-Gayon, P., Giores, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006) Handbook of Enology: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2. izd., John Wiley & Sons, New Jersey, str. 76-146.
- Roussis, I. G., Lambropoulos, I., Tzimas, P. (2007) Protection of volatiles in a wine with low sulfur dioxide by caffeic acid or glutathione. *Am. J. Enol. Vitic.* **58**, 274-278.
- Roussis, I.G., Patrianakou, M., Drossiasdis, A. (2013) Protection of aroma volatiles in a red wine with low sulphur dioxide by mixture of glutathione, caffeic acid and gallic acid. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **34**, 262-265.
- Saterlay, A.J., Compton, R.G. (2000) Sono-electroanalysis – An overview. *Fresen. J. Anal. Chem.* **367**, 308–313.

- Santos, M.C., Nunes, C., Saraiva, J.A., Coimbra, M. A. (2011) Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 1-12.
- Sonni, F., Clark, A.C., Prenzler, P.D., Riponi, C., Scollary, G.R. (2011) Antioxidant action of glutathione and the ascorbic acid/glutathione pair in a model white wine. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 3940-3949.
- Tao, Y., Gracia, J. F., Sun, D. W. (2013) Acceleration of wine ageing with physical methods. U: *Advances in Wine Ageing Technologies for Enhancing Wine Quality and Accelerating Wine Ageing Process*, Taylor & Francis, London, str. 30-39.
- Tchabo, W., Ma, Y., Kwaw, E., Zhang, H., Li, X., Afoakwa, N. (2017) Effects of ultrasound, high pressure, and manosonication processes on phenolic profile and antioxidant properties of a sulfur dioxide-free mulberry (*Morus nigra*) wine. *Food Bioprocess Technol.* **10**, 1210-1223.
- Ugliano, M. (2013) Oxygen contribution to wine aroma evolution during bottle aging. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 6125-6136.
- Waterhouse, A. L. (2002) The phenolic wine antioxidants. U: *Handbook of Antioxidants*, 2.izd. (Cadenas, E., Packer, L., ured.), Marcel Dekker, Inc., New York, str. 405-420.
- Yildirim, H. K., Dundar, E. (2017) New techniques for wine aging, Proceedings of the 40 th World Congress of Vine and Wine. BIO Web of Conferences 9, Sofia, str. 1-4.
- Yun, Z., Jie, W., Dan, Li, Feng, Li.,Li-Qiang, X. (2008) GC/MS Analysis of Wine after Treated by Ultrasonic, Northern Horticulture. [online] **11**, <http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-BFY200811077.htm>. Pristupljeno 15. ožujka 2019.
- Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Cayuela, J.M., Martinez-Cacha, A., Pardo, F., Lopez Nicolas, J.M. (2003) Changes during storage in conventional and ecological wine: phenolic content and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4694-4700.
- Zhang, Q.-A., Shen, Y., Fan, X.-H., Martin, J.F.G. (2015a) Preliminary study of the effect of ultrasound on physicochemical properties of red wine. *CyTA - J. Food.* **14**, 55-64.
- Zhang, Q.-A., Shen, H., Fan, X.-H., Shen, Y., Wang, X., Song, Y. (2015b) Changes of gallic acid mediated by ultrasound in a model extraction solution. *Ultrason. Sonochem.* **22**, 149-154.

Zhang, Q.-A, Wang, T.-T. (2017) Effect of ultrasound irradiation on the evolution of color properties and major phenolic compounds in wine during storage. *Food Chem.* **234**, 372–380.

Izjava o izvornosti

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

Izjava o izvornosti

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

Gpulrić Andreja
