

Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na sastav polifenola i kromatske karakteristike vina Cabernet Sauvignon

Ružman, Edi

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:159:506285>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

Edi Ružman
914/PI

**UTJECAJ VISOKOG
HIDROSTATSKOG TLAKA NA
SASTAV POLIFENOLA I
KROMATSKE KARAKTERISTIKE
VINA CABERNET SAUVIGNON**

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 (HZZZ).

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo te u Laboratoriju za tehnološke operacije na Zavodu za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Natke Ćurko, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć asistentice doc. dr. sc. Marine Tomašević.

ZAHVALA

Iskrene zahvale mentorici doc. dr. sc. Natki Ćurko, doc. dr. sc. Marini Tomašević i prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić na pomoći i savjetima pri izradi ovog diplomskog rada. Hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj potpori i strpljenju.

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 tehnološke operacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA NA SASTAV POLIFENOLA I KROMATSKE KARAKTERISTIKE VINA CABERNET SAUVIGNON

Edi Ružman, 914/PI

Sažetak: Visoki hidrostatski tlak netoplinska je metoda obrade hrane, a potencijal ove tehnologije kao enološke prakse je nedovoljno istražen. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj visokog hidrostatskog tlaka od 200, 400 i 600 MPa u trajanju od 5, 15 i 25 minuta na sastav polifenola i kromatske karakteristike vina Cabernet Sauvignon. Koncentracija ukupnih fenola, tanina, antocijana i kromatske karakteristike (svjetlina, akromatske osi a i b, kromatičnost i kut tona boje) određene su primjenom spektrofotometrijskih metoda. Koncentracija slobodnih antocijana određena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Dobiveni rezultati pokazali su kako je utjecaj tretmana visokim hidrostatskim tlakom ovisio o primijenjenom tlaku te duljini tretiranja. Primjena tretmana od 200 MPa tijekom 5 minuta nije rezultirala značajnijim promjenama u sastavu polifenola i kromatskih karakteristika. S druge strane, primjena viših tlakova kroz dulje vrijeme, a posebice 600 MPa tijekom 15 i 25 minuta uzrokovala je značajan pad koncentracije ukupnih fenola, ukupnih i slobodnih antocijana, kao i porast kromatskih parametara.

Ključne riječi: vino, visoki hidrostatski tlak, polifenoli, kromatske karakteristike, Cabernet Sauvignon

Rad sadrži: 45 stranice, 14 slika, 6 tablica, 40 literaturnih navoda

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: *doc. dr. sc. Marina Tomašević*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof. dr. sc. *Karin Kovačević Ganić*
2. Doc. dr. sc. *Natka Ćurko*
3. Doc. dr. sc. *Sven Karlović*
4. Prof. dr. sc. *Damir Ježek* (zamjena)

Datum obrane: 23. 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 Unit Operations

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

IMPACT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON COMPOSITION OF POLYPHENOLS AND CHROMATIC CHARACTERISTICS OF WINE CABERNET SAUVIGNON

Edi Ružman, 914/PI

Abstract: High hydrostatic pressure is a non-thermal food processing method. However, potential of this technology as enological practice has not been profoundly studied. The aim of this study was to investigate the influence of high hydrostatic pressure of 200, 400 and 600 MPa after treatment of 5, 15 and 25 minutes on the polyphenolic and the chromatic characteristics of wine Cabernet Sauvignon. Analysis of total phenols, tannins, anthocyanins and chromatic characteristics (lightness, a value, b value, chroma, hue angle) was performed using spectrophotometric methods. Analysis of free anthocyanins was conducted by high performance liquid chromatography (HPLC). The results obtained showed that the effect of high hydrostatic treatment was depended on the applied pressure and treatment duration. The application of 200 MPa treatment for 5 minutes did not result in significant changes of polyphenolic and chromatic characteristics. Application of higher pressures over a long period of time, and in particular 600 MPa, during 15 and 25 minutes, caused a significant decrease in the concentration of total phenols, total and free anthocyanins, as well as the increase of chromatic parameters.

Keywords: wine, high hydrostatic pressure, polyphenols, chromatic characteristics, Cabernet Sauvignon

Thesis contains: 45 pages, 14 figures, 6 tables, 40 references

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. Marina Tomašević, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. *Karin Kovačević Ganić*, Full professor
2. PhD. *Natka Ćurko*, Assistant professor
3. PhD. *Sven Karlović*, Assistant professor
4. PhD. *Damir Ježek*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 23th July 2019

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Polifenolni spojevi vina.....	2
2.1.1. Flavonoidi	2
2.1.1.1. <i>Flavanoli</i>	3
2.1.1.2. <i>Antocijani</i>	4
2.1.1.3. <i>Flavonoli</i>	5
2.1.2. Ne flavonoidi.....	6
2.1.2.1. <i>Fenolne kiseline</i>	6
2.1.2.2. <i>Stilbeni</i>	6
2.2. Kemijske promjene u sastavu polifenolnih spojeva tijekom proizvodnje vina	7
2.3. Visoki hidrostatski tlak	8
2.3.1. Princip djelovanja visokog hidrostatskog tlaka	8
2.3.2. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na vino.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. Materijal.....	13
3.1.1. Uzorci vina.....	13
3.1.2. Kemikalije.....	13
3.1.3. Aparatura i pribor.....	14
3.2. Metode	15
3.2.1. Tretiranje vina visokim hidrostatskim tlakom.....	15
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola.....	16
3.2.3. Određivanje ukupnih tanina	17
3.2.4. Određivanje ukupnih antocijana.....	18
3.2.5. Određivanje slobodnih antocijana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)..	19
3.2.6. Određivanje kromatskih karakteristika CIELab metodom	20
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	22
4.1. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na sastav polifenola.....	23
4.2. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na kromatske karakteristike.....	31
4.3. PCA analiza polifenola i kromatskih karakteristika	38
5. ZAKLJUČCI.....	40
6. LITERATURA	41

1. UVOD

Polifenolni spojevi su izrazito kompleksna skupina spojeva odgovorna ne samo za antioksidacijske karakteristike vina i njegov pozitivan utjecaj na zdravlje, već također za senzorske karakteristike vina kao što su boja, trpkoca i gorčina vina. Sastav ovih spojeva u vinu ovisi o različitim činiteljima kao što su sastav grožđa, uvjeti maceracije i vinifikacije, primjeni različitih enoloških postupaka te postupcima tijekom dozrijevanja i skladištenja, međutim također i primjeni novih tehnika kao što je visoki hidrostatski tlak.

Naime, povećana potražnja potrošača za hranom i pićem s najvećom dodanom vrijednosti doveli su do razvoja i implementacije novih netermalnih tehnika proizvodnje, među kojima je i visoki hidrostatski tlak. Ova tehnologija ima potencijal za proizvodnju visokokvalitetne hrane koja je mikrobiološki sigurna za konzumaciju, a istovremeno ima karakteristike svježeg proizvoda. Uporaba visokog hidrostatskog tlaka kao netermalne tehnologije za konzerviranje hrane znatno se povećala posljednjih godina, dok je njena primjena u vinarstvu još uvijek nedovoljno istražena. Dosadašnja istraživanja pokazala su pozitivan utjecaj primjene visokog tlaka u ekstrakciji polifenolnih spojeva kako grožđa tako i organskog otpada u proizvodnji vina. Primjena visokog hidrostatskog tlaka u vinarstvu proučavana je kao alternativni način očuvanja vina, koji bi omogućio mikrobiološku stabilnost i proizvodnju vina s manjim količinama sumporovog dioksida. Također, trenutno dostupna istraživanja pokazuju i moguću primjenu visokog hidrostatskog tlaka u vinarstvu kao metode ubrzanog starenja vina, a time i potrebu za daljnjim razumijevanjem utjecaja ove tehnike na sastav polifenolnih spojeva vina i njegove kromatske karakteristike, a time i ukupnu kvalitetu.

U ovom radu istražit će se učinak visokog hidrostatskog tlaka različitog intenziteta i vremena trajanja na polifenolni sastav i kromatske karakteristike crnog vina Cabernet Sauvignon. Uzorci vina Cabernet Sauvignon tretirat će se hidrostatskim tlakovima od 200, 400 i 600 MPa, u trajanju od 5, 15 i 25 minuta. Analiza kromatskih karakteristika i polifenolnih spojeva provest će se primjenom spektrofotometrijskih metoda te tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI VINA

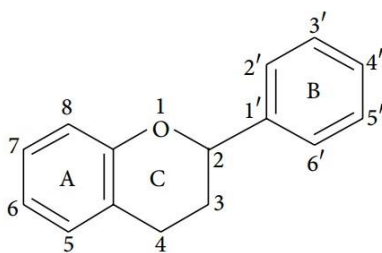
Polifenolni spojevi jedan su od najznačajnijih parametara kakvoće vina. Razlog tome je njihov veliki utjecaj na senzorske karakteristike vina, kao što su boja, trpkoca i gorčina (Hernanz i sur., 2007). Polifenolni sastav vina uvjetovan je sortom vinove loze i drugim faktorima koji utječu na razvoj bobice grožđa poput tla, geografske lokacije i klimatskih uvjeta. Također, duljina maceracije (kontakt s kožicom i sjemenkama) i fermentacije/vinifikacije ima važnu ulogu u ekstrakciji polifenola iz grožđa. Nadalje, na sastav ovih spojeva i njihovu daljnju stabilnost utječu i postupak prešanja, bistrenja te dozrijevanja i starenja u boci.

Također, ovi spojevi povezani su s pozitivnim djelovanjem vina u prevenciji kardiovaskularnih i degenerativnih bolesti. Građeni su od aromatskog prstena na kojemu se nalazi jedna ili više hidroksilnih skupina. Antioksidacijska sposobnost polifenola ovisi o položaju i broju ovih skupina, kao i o prisutnosti elektron-donorskih i elektron-akceptorskih supstituenata na prstenu (Kinsella i sur., 1993). Osnovno djelovanje zasniva se na sprječavanju nastajanja reaktivnih slobodnih radikala, što ostvaruju doniranjem jednog elektrona ili vodikovog atoma, a da pri tome sami ne postanu nestabilni.

Osnovna podjela polifenola u vinu odnosi se na podjelu ovisno o samoj strukturi spoja i to na flavonoide i neflavonoide.

2.1.1. Flavonoidi

Flavonoidi su najraširenija skupina prirodnih polifenola. Nalaze se najviše u crnim vinima i čine 85% ukupnih fenola, dok u bijelim vinima prevladavaju neflavonoidi. Mogu biti slobodni ili vezani s drugim flavonoidima i/ili šećerima (glikozidi). Nalaze se u sjemenci, pokožici i peteljci, dok ih u soku ima vrlo malo. Prema kemijskoj strukturi, flavonoidi su izgrađeni od 15 ugljikovih atoma, odnosno dva aromatska prstena koji su međusobno povezani jednim heterocikličkim prstenom. Osnovna struktura flavonoida prikazana je na slici 1. Najzastupljeniji flavonoidi u crnom vinu su: flavanoli, antocijani i flavonoli.



Slika 1. Struktura flavonoida C6-C3-C6 (Farkas i sur., 2004).

2.1.1.1. Flavanoli

Flavanoli (flavan-3-oli) druga su najveća skupina polifenola, uglavnom odgovorna za trpkocu, gorčinu i strukturu vina. Smješteni su u hipodermalnom sloju pokožice i u vanjskom parenhimskom sloju sjemenke grožđa, a mogu se nalaziti u formi monomera, oligomera ili polimera.

Flavan-3-ol monomeri u grožđu i vinu prisutni su većinom u formi (+)-katehina, (-)-epikatehina i (-)-epikatehin galata; a čine 46-56 % ukupnih fenola bijelog te između 13 % i 30 % ukupnih fenola crnog grožđa (Georgiev i sur., 2014).

Flavan-3-ol polimeri (kondenzirani tanini ili proantocijanidini) najzastupljeniji su polifenolni spojevi u grožđu, koji čine 25-50 % ukupnih fenola (Somers, 1971). Građeni su od podjedinica flava-3-ola, koji tvore lance različite duljine, odnosno stupnja polimerizacije. Tanini karakteristični za grožđe i vino su procijanidini B tipa u kojima dolazi do povezivanja C-4 položaja piranskog prstena gornjeg flavonoida s C-8 položajem na A prstenu donjeg flavonoida. Povezivanje flavonoida između C-4 i C-6 položaja omogućava grananje inače linearnog procijanidinskog polimera. S druge strane, procijanidini A tipa su znatno rjeđe zastupljeni, a nastaju povezivanjem C-4 i C-8 položaja ili povezivanjem C-2 položaja sa hidroksilnom grupom na C-7 položaju (Jackson, 2008). Također, tanini pokožice imaju veći stupanj polimerizacije od tanina sjemenke te u prosjeku sadrže oko 30 podjedinica, dok oni u sjemenki sadrže oko 10 podjedinica (Fulcrand i sur., 2006). Tijekom proizvodnje vina tanini neprestano mijenjaju svoju duljinu i strukturu. Imaju iznimno važnu uloga u reakcijama kopigmentacije i kopolimerizacije s antocijanima, kao i u brojnim kondenzacijskim reakcijama tijekom dozrijevanja i starenja vina pri čemu dolazi do formiranja stabilnih kompleksa. Sudjeluju

u kemijskim i enzimskim reakcijama oksidacije vina, odnosno reakcijama posmeđivanja vina, kao i reakcijama s proteinima čime utječu i na bistroću vina (Peleg i sur., 1999).

2.1.1.2. Antocijani

Antocijani su flavonoidni pigmenti topivi u vodi. Smatraju se skupinom glavnih prirodnih pigmenata u hrani biljnog podrijetla, čija boja (crvena, ljubičasta i plava) ovisni o pH i u nekim slučajevima, kompleksirajućem agensu. Ovi pigmenti i njihovi derivati odgovorni su za crvenu boje kod crnih vina, a nalaze se u pokožici grožđa i to najčešće su formi glukozida. Ekstrahiraju se iz pokožice bobica crnog grožđa tijekom procesa maceracije. Sastav antocijana u vinu ovisi o sorti grožđa, vremenskom periodu i uvjetima dozrijevanja vina, kao i o uvjetima rasta grožđa, poput klimatskih uvjeta, rezidbe i gnojidbe (Cheynier i sur., 2010).

Tablica 1. Udio antocijana u vinu sorti Cabernet Sauvignon, Merlot i Syrah (Tang i sur., 2016; Gutierrez i sur., 2005; Romero i sur., 2005)

Parametar	Cabernet Sauvignon (mg L⁻¹)	Merlot (mg L⁻¹)	Syrah (mg L⁻¹)
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	25,4 ± 11,8	16,93 ± 11,93	16,9 ± 9,6
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,0 ± 0,2	1,59 ± 0,4	2,35 ± 0,5
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	20,87 ± 10,2	13,03 ± 2,6	33,70 ± 17,1
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	9,1 ± 5,1	8,7 ± 3,5	15,08 ± 8,9
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	213,8 ± 74,2	137,4 ± 12,9	310,9 ± 126,1
Ukupni antocijani	354,2 ± 9,5	225,4 ± 5,6	350,8 ± 16,4

U grožđu i vinu razlikujemo pet osnovnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida, koji se međusobno se razlikuju po broju hidroksilnih i metilnih grupa na molekuli antocijana: cijanidin, delfinidin, malvidin, peonidin i petunidin. Koncentracije slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida i ukupnih antocijana u vinu za sorte cabernet sauvignon, merlot i syrah prikazane su u tablici 1. Pri nižim pH vrijednostima nalaze se u formi flavilijeveg kationa kada su crveno obojeni, dok su pri višim pH vrijednostima u kinoidalnoj formi plavo-ljubičaste boje. Količina slobodnog sumpornog dioksida najvažniji je čimbenik koji utječe na boju mladih vina. Može izazvati snažno izbjeljivanje slobodnih antocijana nukleofilnim dodavanjem na položaj C4 u C prstenu

antocijana u flavijevom kationu crnih vina (He i sur., 2012). Malvidin-3-*O*-glukozid najzastupljeniji je monomerni antocijan te glavni izvor crvene boje mladih vina čija zastupljenost u grožđu varira od 170,9 do 548,9 mg kg⁻¹. Ostali monomerni antocijani zastupljeni su u nižoj koncentraciji od malvidin-3-*O*-glukozida. Koncentracija peonidin-3-*O*-glukozida varira ovisno o sorti od 32,4 do 101,1 mg kg⁻¹ grožđa, petunidin-3-*O*-glukozida od 13,4 do 73,8 mg kg⁻¹ grožđa, cijanidin-3-*O*-glukozida od 3,7 do 18,2 mg kg⁻¹ grožđa, delphinidin-3-*O*-glukozida od 9,3 do 65 mg kg⁻¹ grožđa (Dimitrovska i sur., 2011). Profil antocijana može se koristiti kao kemotaksonomijski kriterij za utvrđivanje razlika između sorti. Odnos između pojedinačnih ili ukupnih koncentracija različitih antocijana predložen je za karakterizaciju kultivara. Taj je odnos povezan s enzimskom aktivnošću flavonoid-3-hidroksilaze i *o*-dihidrobifenol-*o*-metiltransferaze. Druga vrsta klasifikacije temeljena je na prisutnosti i relativnoj zastupljenosti antocijana aciliranih s octenom i *p*-kumarinskom kiselinom (Nunez i sur., 2004).

Iako antocijani direktno ne doprinose okusu vina, mogu stupati u kemijske reakcije s drugim polifenolnim spojevima (u prvom redu taninima) i tako utjecati na okus vina. Tijekom fermentacije, a posebno u prvoj i drugoj godini dozrijevanja vina, dolazi do kopigmentacije, odnosno hidrofobne interakcije između monomernih antocijana i drugih fenolnih spojeva vina. Posljedica kemijskih reakcija kopigmentacije i polimerizacije je pojava crvenkasto-ciglastih tonova u crnom vinu i povećanje stabilnosti boje tijekom dozrijevanja i starenja (Wrolstad i sur., 2005).

2.1.1.3. Flavonoli

Spojevi žute boje koji se nalaze u pokožici grožđa i manjim dijelom u sjemenci. U pokožici grožđa zastupljeni su: monoglukozid kempferol i miricetin, kao i monoglukuronozid kvercetin i izoramnetin. Ovi spojevi imaju značajnu ulogu u zaštiti biljke od UV svjetlosti, koja značajno utječe na povećanja njihove koncentracije. Udio flavonola u crnom grožđu (4-78 mg kg⁻¹) nešto je veći od udjela u bijelom grožđu (2-30 mg kg⁻¹). S druge strane, obzirom da tijekom procesa maceracije dolazi do ekstrakcije ovih spojeva u vino, njihov udio u bijelim vinima značajno je niži od udjela u crnim vinima (Cheynier i sur., 2010).

2.1.2. Neflavonoidi

U neflavonoidne spojeve u vinu ubrajamo fenolne kiseline i stilbene. Iako direktno ne doprinose boji vina, mogu pridonijeti stabilizaciji boje crnih vina putem intramolekularnih i intermolekularnih reakcija (formiranje piranoatocijana). Nadalje, neki neflavonoidni spojevi mogu pridonijeti okusu vina, dok pak drugi pokazuju snažnu biološku aktivnost (Rentsch i sur., 2009).

2.1.2.1. Fenolne kiseline

Najzastupljenije fenolne kiseline u grožđu i vinu su hidroksibenzojeva i hidroksicimetna kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline nalaze se u peteljka, sjemenkama i pokožici grožđa od kojih je najzastupljenija galna kiselina, koja se nalazi u slobodnom obliku i kao acilni supstituent flavan-3-ola (Cheynier i sur., 2010). Hidroksicimetne kiseline nalaze se u vakuolama pokožice i pulpe u obliku estera. Najzastupljenije hidroksicimetne kiseline u grožđu su *p*-kumarinska, ferulinska i kafeinska kiselina, koje se u grožđu većinom nalaze kao *trans* izomeri (Riedel i sur., 2012).

2.1.2.2. Stilbeni

Stilbeni su fitoaleksini koji se sintetiziraju u biljnim tkivima kao odgovor na napad gljivicama, ali i u slučajevima abiotičkog stresa, poput povećanog UV zračenja. Ističu se po iznimno pozitivnom učinku na ljudsko zdravlje zbog antioksidacijskih i antikancerogenih svojstava. Najzastupljeniji stilben u grožđu je resveratol, dok su u manjim količinama zastupljeni piceatanol i astringin. Mogu se nalaziti i u formi oligomera, nastalih oksidacijom resveratola, od kojih je najzastupljeniji ϵ -viniferin.

2.2. KEMIJSKE PROMJENE U SASTAVU POLIFENOLNIH SPOJEVA TIJEKOM PROIZVODNJE VINA

Polifenolni spojevi odgovori su za važna senzorska svojstva vina, kao što su boja i okus, a time i za ukupnu kvalitetu vinu. Ovi izrazito reaktivni spojevi sadrže nekoliko fenolnih prstenova koji mogu biti različito supstituirani te stupati u različite reakcije. Naime, tijekom prerade grožđa i proizvodnje vina, a kasnije i tijekom samog dozrijevanja i starenja vina, dolazi do neprestanih promjena u sastavu ovih spojeva, koji podliježu različitim kemijskim promjenama, poput polimerizacije, oksidacije i kondenzacije. Reakcije u sastavu flavanola vode do smanjenja trpkocće, dok reakcije u sastavu antocijana vode do promjene boje, od ljubičaste nijanse mladih vina, prema crveno-narančastoj boji zrelih vina.

Pigmenti dobiveni reakcijom kopigmentacije acetaldehida s jednim flavan-3-olom i jednim antocijanom pri kojoj nastaju polimerni pigmenti prvi put su opisani 1970-tih. Nastajanjem polimernih pigmenata postiže se bolja stabilnost boje crnih vina. U ovim spojevima dvije jedinice flavonoida povezane su s acetaldehidom kao sponom. Njihovo formiranje uključuje elektrofilnu aromatsku supstituciju protoniranog oblika acetaldehida na nukleofilni A prsten flavonoida, nakon čega slijedi protonizacija dobivenog spoja uz gubitak vode i nastanak karbokationa te nukleofilna adicija A prstena drugog flavonoida na karbokation. Flavan-3-oli, uključujući monomere i oligomere te slobodni antocijani, mogu sudjelovati u ovim reakcijama. Produkti ovih reakcija su polimeri flavan-3-ola i antocijana te kopolimeri antocijana i flavan-3-ola. Moguće su i direktne kondenzacije antocijana i flavan-3-ola. U ovom slučaju antocijan reagira kao elektrofil u svom obliku flavilijevog kationa te podliježe nukleofilnoj adiciji flavan-3-ola (Cheynier i sur., 2010).

S druge strane, cikloadicijske reakcije uzrokuju transformaciju antocijana i formiranje novog piranskog prstena u strukturi vezanjem različitih polifenolnih spojeva (pirogroždana kiselina, glioksilna kiselina, acetaldehid, 4-etilfenol, 4-etilgvajakol, dimerni i monomerni procijanidini) prisutnih u vinu na ugljik na položaju C4 i hidroksilnu grupu na položaju C5. Nastali spojevi nazivaju se piroantocijani.

Reakcije antocijana s taninima i drugim molekulama rezultiraju spojevima različite strukture i molekularne mase, koji mogu biti pigmentirani ili bezbojni. Konverzija antocijana (75 % do 95 % bezbojni, 5 % do 25 % crvene boje pri standardnom pH vina) u flavanol-

antocijan polimere nema učinka na boju, ali formiranje piroantocijanina (100 % obojeni) i etil povezanih derivata (> 50 % obojeni) pomiče boju vina iz crvene u narančastu ili ljubičastu, povećava intenzitet boje, otpornost na promjene pH i sulfitno izbjeljivanje (Fulcrand i sur., 2006).

2.3. VISOKI HIDROSTATSKI TLAK

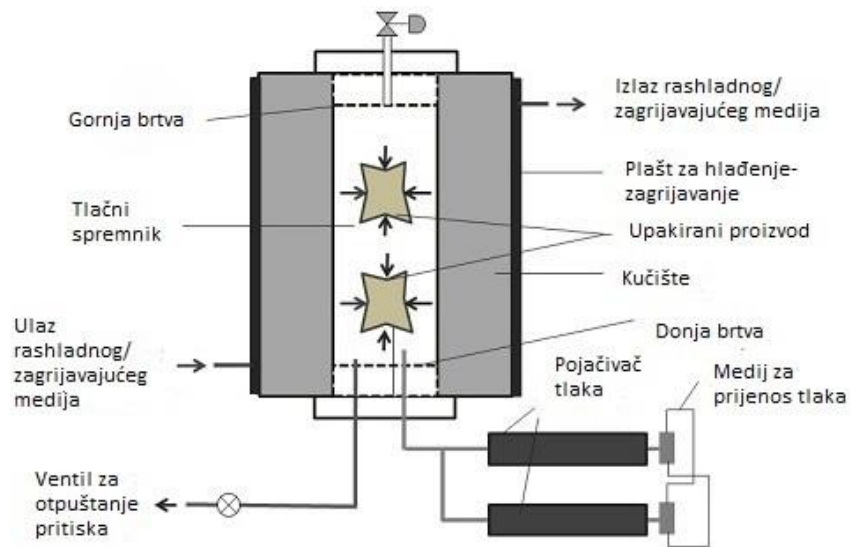
Konzervirajući učinak visokog hidrostatskog tlaka otkriven je 1899. godine. Međutim, visoka cijena i nedostatak odgovarajuće opreme obustavili su daljnja istraživanja. Tek krajem 20. stoljeća započelo je intenzivnije istraživanje i primjena ove tehnologije. Prvi komercijalno dostupni prehrambeni proizvodi obrađeni visokim tlakom pojavili su se u Japanu 1990. godine. Ova tehnologija ima potencijal za proizvodnju visokokvalitetne hrane koja ima karakteristike svježeg proizvoda te je mikrobiološki sigurna za konzumaciju. Zahvaljujući specifičnom principu djelovanja, ova tehnologija je komercijalno jednako primjenjiva za tekuće i za čvrste namirnice, uz ispunjavanje važnog preduvjeta da namirnica koja se obrađuje sadrži određenu količinu vode. Premda je tehnologija visokog hidrostatskog tlaka danas skuplja i do pet puta u usporedbi s tradicionalnom termičkom obradom (npr. sterilizacijom ili drugim postupcima termičke obrade), svoju primjenu nalazi za proizvode koji, zahvaljujući dodanoj vrijednosti, predstavljaju posebnu tržišnu nišu (Krešić i sur., 2011).

2.3.1. Princip djelovanja visokog hidrostatskog tlaka

Postupci obrade hrane visokim hidrostatskim tlakom podrazumijevaju podvrgavanje tekuće ili čvrste hrane, s ambalažom ili bez nje, djelovanju tlaka od 100 do 800 MPa. Temperatura obrade može se kretati od ispod 0 °C do iznad 100 °C, a vrijeme izloženosti djelovanju tlaka može varirati od nekoliko sekundi do preko 20 minuta. Kao posljedica djelovanja visokog tlaka, dolazi do smanjenja obujma sustava na koji se tlak primjenjuje. Sukladno Le Chatelier-Braunovom zakonu, u uvjetima ravnoteže, zbog djelovanja povišenog tlaka na zatvoreni sustav, biti će pospješene one reakcije koje vode smanjenju obujma, dok će nasuprot tome one reakcije koje vode povećanju obujma sustava biti potisnute. Posljedično, komponente hrane velike molekulske mase u kojima je tercijska struktura od presudne važnosti za izražavanje funkcionalnih svojstava (npr. bjelančevine, enzimi i polisaharidi) podložne su promjenama konformacije i funkcionalnih svojstava zbog tretiranja visokim tlakom. Nasuprot

tome, kao glavna prednost djelovanja visokog tlaka ističe se činjenica da su komponente hrane koje su odgovorne za specifičnu nutritivnu vrijednost i organoleptičke značajke hrane (npr. vitamini i komponente arome), zahvaljujući malom udjelu sekundarne, tercijarne i kvarterne strukture, gotovo neosjetljive na djelovanje visokog tlaka (Balc i Wilbey, 1999). Zbog djelovanja visokog tlaka, tijekom faze kompresije dolazi do povišenja temperature unutar tretiranog uzorka. Ta se pojava naziva adijabatsko zagrijavanje. Intenzitet povišenja temperature ovisi o sastavu uzorka. Za vodu i namirnice koje sadrže zamjetan udio vode iznosi približno 3 °C/100 MPa, dok za uzorke koji sadrže veću količinu masti, povišenje temperature tijekom tretiranja može biti tri puta veće. Namirnice koje se obrađuje visokim tlakom trebaju u pravilu biti pakirane u fleksibilnu ambalažu (vrećice ili plastične boce), koja mora imati mogućnost podnošenja otprilike 15 % smanjenja obujma u fazi kompresije te povratka u prvobitno stanje u fazi dekompresije (Krešić i sur., 2011). Tretiranjem proizvoda koji se već nalazi u ambalaži, eliminira se mogućnost kontaminacije proizvoda nakon provedenog tretmana. Samo tretiranje visokim tlakom nije dovoljno za značajno smanjenje broja spora. Spore određenih vrsta bakterija mogu preživjeti tlakove do 1200 MPa na sobnoj temperaturi. Kako bi se uništile potreban je porast temperature i pritiska, duže vrijeme tretmana, pritisak i snižavanje pH proizvoda, dodatak antimikrobni agenasa. Koristi se za prezervaciju različite hrane, kao što su mlijeko, riba, mliječni proizvodi, povrće, gotova jela, ali i za neke fermentirane proizvode, kao što su pivo i vino (Stoica, 2013).

Uređaj za tretiranje visokim tlakom sastoji se od tlačnog spremnika, uređaja za generiranje tlaka, uređaja za kontrolu postupka i rukovanja s uzorkom. Najvažniji dio uređaja je spremnik koji je obično monolitni, cilindričnog oblika izrađen od legiranog čelika koji može izdržati velika naprezanja. Debljina stijenke cilindra ujedno određuje i maksimalni radni tlak. Ovisno o unutarnjem promjeru spremnika, obično su spremnici u jednom bloku prikladni za postizanje tlakova od 400 do 900 MPa. Visoki tlak može se generirati na dva načina: izravnom i posrednom kompresijom. U uređajima s izravnom kompresijom, medij za prijenos tlaka u spremniku komprimira se pomoću klipa pokretanog niskotlačnom pumpom. Pri posrednoj kompresiji upotrebljava se pojačivač tlaka, koji pumpa medij za prijenos tlaka iz rezervoara u zatvoreni visokotlačni spremnik (iz kojeg je prethodno uklonjen zrak), sve do postizanja željenog tlaka.



Slika 2. Uređaj za tretiranje visokim tlakom posrednom kompresijom (Anonymous, 2018)

Većina industrijskih hladnih, toplih i vrućih izostatičnih sustava primjenjuje metodu posredne kompresije (shema uređaja prikazana na slici 2). U postupcima obrade hrane visoki tlak može se primijeniti kao šaržni (konvencionalni), polukontinuirani i kontinuirani sustav. Šaržni sustav primjenjuje se za tekuće i čvrste namirnice koje su pakirane u odgovarajuću ambalažu. Cjelokupno trajanje obrade čini zbroj trajanja sljedećih faza: punjenje spremnika tlačnim medijem i materijalom koji se tretira, zatvaranje, kompresija, zadržavanje postignutog tlaka, dekompresija, otvaranje spremnika i vađenje tretiranog materijala iz spremnika. Polukontinuirani i kontinuirani sustavi primjenjuju se za namirnice koje se mogu pumpati. U takvim sustavima uzorak se pumpa u visokotlačni spremnik i komprimira upotrebom plutajućeg klipa koji odvaja proizvod od medija za prijenos tlaka. Nakon tretiranja proizvod se mora aseptično puniti u ambalažu (Krešić i sur., 2011).

2.3.2. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na vino

Tijekom posljednjeg desetljeća, uporaba visokog hidrostatskog tlaka kao netermalne tehnologije za konzerviranje i modifikaciju hrane znatno se povećala. Hrana može biti podvrgnuta visokim tlakovima u rasponu od 400 do 600 MPa, kako bi se uništili mikroorganizmi i inaktivirali enzimi s minimalnim učinkom na njihova senzorička i nutritivna svojstva. Primjena visokog hidrostatskog tlaka u vinarstvu proučavana je kao alternativni način očuvanja vina, koji bi omogućio proizvodnju vina s manjim količinama sumporovog dioksida. Sumporov dioksid je zbog svojih jakih antiseptičkih i antioksidacijskih svojstava najčešće korišten aditiv u vinarstvu. Međutim, navedeni aditiv kod osjetljivih pojedinaca može izazivati alergijske reakcije te imati negativan učinak na zdravlje, zbog čega se upotreba sumporovog dioksida nastoji smanjiti (Santos i sur., 2015). Neke studije, koristeći tlakove između 200 i 500 MPa u trajanju od 1 do 20 minuta, pokazale su inaktivaciju kvasaca i bakterija mliječne kiseline u vinima bez značajnog utjecaja na senzorske karakteristike vina (Buzrul, 2012). Međutim, istraživanja su pokazala kako intenzivni tretmani visokim tlakom (650 MPa tijekom 1 do 2 sata) uzrokuju značajne fizikalno-kemijske i senzorske promjene. Kod crnog vina dolazi do smanjenja intenziteta boje, sadržaja polifenolnih spojeva i voćnog mirisa vina uz povećanje intenziteta trpkocće i gorčine (Tao i sur., 2012). Nedavne studije pokazale su kako umjereni tretmani visokim tlakom (425 i 500 MPa tijekom 5 minuta) mogu dugoročno utjecati na fizikalno-kemijska svojstva crnih i bijelih vina, doprinoseći izraženijoj crvenoj-narančasto boji, smanjenju antioksidacijske aktivnosti i ukupnog sadržaja fenola. Ovi učinci tretmana vidljivi su tek nakon 6 mjeseci adekvatnog skladištenja tretiranog vina (Santos i sur., 2015).

Nekoliko istraživanja pokazalo je kako visoki tlak može osigurati aktivacijsku energiju za pokretanje kemijskih reakcija u vinu i time skratiti vrijeme starenja vina. Na taj način potiču se reakcije polimerizacije, esterifikacije i oksidacije koje potencijalno mogu poboljšati boju, aromu i cjelokupni okus vina (Sun i sur., 2015; Sencer, 2012). Tretman visokim hidrostatskim tlakom, u rasponu od 80 MPa do 120 MPa unutar 2 sata, pokazao je značajno poboljšanje punoće okusa vina, dok bi vino podvrgnuto klasičnom starenju 3 do 6 mjeseci te nakon toga tretirano visokim tlakom, moglo imati značajne koristi od takvog tretmana (Tao i sur., 2014). Također, Li i sur. (2005) otkrili su da tretman tlakom od 300 MPa u trajanju od 2 sata doprinosi boljem okusu vina. Navedeni tretman također je uzrokovao promjenu točke vrenja, gustoću, redoks potencijal, električnu vodljivost i ukupnu kiselost vina (Li i sur., 2005).

Tijekom proteklih godina provedeno je nekoliko istraživanja vezanih uz primjenu visokog hidrostatskog tlaka u vinarstvu. Santos i sur. (2013) proučavali su utjecaj visokog tlaka na bijelo vino koje nije tretirano sumporovim dioksidom. Vino je bilo podvrgnuto tlaku od 500 MPa i 425 MPa kroz 5 minuta. Nakon jedne godine starenja, vina podvrgnuta tretmanu visokim tlakom i koja nisu tretirana sumporovim dioksidom imala su jače izraženu smeđu nijansu (više vrijednosti na akromatskim osima a i b, nižu L vrijednost) i nešto nižu antioksidacijsku aktivnost te ukupni sadržaj fenola, u usporedbi s vinom koje nije tretirano i koje je sadržavalo sumporov dioksid. Ovi rezultati, zajedno s nižim sadržajem slobodnih aminokiselina i višim sadržajem furana, ukazuju na ubrzanje Maillardovih reakcija kod vina tretiranih visokim tlakom, čime se postižu slična fizičko-kemijska i senzorska svojstva kao kod vina koja su starila duži vremenski period bez tretmana visokim tlakom (Santos i sur., 2013). Ovi rezultati u skladu su s njihovim prijašnjim istraživanjem provedenim na crnom vinu, koje je pokazalo da tretmani vina visokim tlakom ne mijenjaju fizičko-kemijska i senzorska svojstva vina neposredno nakon tretmana visokim tlakom. Tretiranje visokim tlakom ubrzava starenje vina, što dovodi do značajnih promjena u vinu tek prilikom skladištenja određeni vremenski period (Sanots i sur. 2012). U njihovim novijim istraživanjima, uspoređivali su polifenolni sastav crnog vina koje je bilo tretirano visokim tlakom (500 MPa kroz 5 minuta) s vinom koje je starilo konvencionalnim metodama, poput starenja u hrastovoj bačvi, uz dodatak hrastovog čipsa sa i bez mikro-oksigenacije. Nakon 5 mjeseci, sadržaj monomernih antocijana, fenolnih kiselina i flavonola bio je niži kod vina tretiranih visokim tlakom, u usporedbi s drugim vinarskim tretmanima. Štoviše, pokazala su sličan stupanj polimerizacije tanina, sadržaj proantocijanidina i postotak prodelfinidina kao vino koje je tretirano mikrooksigenacijom i hrastovim čipsom (Santos i sur., 2019).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci vina

Za izradu ovog diplomskog rada korišteno je vino sorte Cabernet Sauvignon (berba 2016, Erdutski vinogradi d.o.o.) u kojem je ispitan utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na sastav polifenola i kromtske karakteristike. Fizikalno-kemijski sastav vina prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Osnovni fizikalno-kemijski sastav vina Cabernet Sauvignon

Parametar	Cabernet Sauvignon
Alkohol (vol %)	13,1
Ukupna kiselost (g L ⁻¹ vinske kiseline)	5,3
Hlapiva kiselost(g L ⁻¹ octene kiseline)	0,61
Reducirajući šećeri (g L ⁻¹)	4,1
Ukupni ekstrakt (g L ⁻¹)	31,7
pH	3,46
Jabučna kiselina (g L ⁻¹)	0,1
Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	1,3
Ukupni sumporov dioksid (mg L ⁻¹)	20
Slobodni sumporov dioksid (mg L ⁻¹)	10

3.1.2. Kemikalije

- Natrijev karbonat, bezvodni, p.a. Gram-mol, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogen sulfit, p.a. Acros, Geel, Belgija
- Folin-Ciocalteu reagens, Reagecon, Shannon, Irska
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Mravlja kiselina (98-100 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Etanol (96 %), Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska
- Metanol (100 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska

- Acetonitril (100 %), HPLC čistoće, J.T.Baker, Deventer, Nizozemska
- Malvidin-3-*O*-glukozid klorid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Uređaj za visoki tlak: FPG7100 Stansted Fluid Power Iso-lab High Pressure System; Stansted Fluid Power Ltd., Harlow, Essex, UK
- Uređaj za vakuumiranje, Besser Vacuum SRL, Dignano, Italija
- Spektrofotometar (Specord 50 Plus), AnalytikJena, Jena, Njemačka
- Analitička vaga, Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD
- HPLC Agilent Technologies 1200 Series, Santa Clara, CA, SAD sastavljen iz sljedećih komponenti:
 - Binarna Pumpa (Bin Pump SL) G1312B
 - Degazer G1379B
 - Autosampler (HiP-ALS) G1367B
 - Termostat Autosampler-a (FC/ALS Term) G1330B
 - Temostatirani odjeljak za kolonu (TCC SL) G1316B
 - Diode Array Detector (DAD SL) G1315C
 - Agilent Chemstation Softver

Pribor:

- Plastične vrećice za vakuumiranje, Jarden Consumer Solutions, Chesire, UK
- Plastične bočice volumena 100 mL
- Mikropipete od 100 i 1000 μ L, Eppendorf, Hauppauge, NY, SAD
- Staklene tube za hidrolizu, Pirex, Corning, NY, SAD
- Pipete volumena 10, 20, 25 mL
- Odmjerne tikvice volumena 10, 25, 50, 100, 250, 500 i 1000 mL
- Staklene epruvete
- Plastična ladica za vaganje
- Laboratorijske čaše volumena 100, 150, 250 mL
- Staklene kivete od 1 cm

3.2. METODE

3.2.1. Tretiranje vina visokim hidrostatskim tlakom

Tretiranje vina visokim hidrostatskim tlakom provedeno je na uređaju Stansted Fluid Power Ltd, koji radi šaržno, a maksimalni tlak koji može generirati je 1000 MPa. Princip metode baziran je na tlaku koji djeluje na materijal istom silom u svim točkama, a prenosi se u kućištu uređaja, volumena 2000 mL, kroz tlačno-prijenosni medij, propilen glikol. Uzorci vina Cabernet Sauvignon tretirani su hidrostatskim tlakovima od 200, 400 i 600 MPa, u trajanju od 5, 15 i 25 minuta (tablica 3), a svaki navedeni tretman proveden je u tri paralele. Kontrolni uzorak je uzorak vina Cabernet Sauvignon koji nije bio tretiran visokim tlakom.

Postupak tretiranja:

U plastičnu bočicu otpipetirati 100 mL uzorka vina. Bočicu zatvoriti navojnim čepom i staviti u plastičnu vrećicu te vakimirati. Tako pripremljen uzorak dalje staviti u cilindar uređaja za tretman visokim hidrostatskim tlakom. Tretiranje započeti nakon postizanja željenog tlaka (tablica 3).

Tablica 3. Parametri tretiranja visokim hidrostatskim tlakom

Sorta vina	Tlak (MPa)	Vrijeme (min)
Cabernet Sauvignon	200	5
Cabernet Sauvignon	200	15
Cabernet Sauvignon	200	25
Cabernet Sauvignon	400	5
Cabernet Sauvignon	400	15
Cabernet Sauvignon	400	25
Cabernet Sauvignon	600	5
Cabernet Sauvignon	600	15
Cabernet Sauvignon	600	25

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

Određivanje ukupnih polifenola temeljeno je na reakciji fenolnih spojeva sa Folin-Ciocalteu reagensom, kojeg čine smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline (Singleton i Rossi, 1965). Intenzitet nastalog plavog obojenja izmjeren je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 765 nm. Rezultat je izražen kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u mg L⁻¹.

Postupak određivanja:

U tikvicu od 100 mL otpipetirati 1 mL uzorka (razrijeđenog 1:9), 5 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog 1:2) i 60 mL vode. Sve promiješati i nakon 30 sekundi dodati 15 mL 20 % otopine natrijevog karbonata. Tikvicu je zatim potrebno nadopuniti do oznake s destiliranom vodom i ostaviti 2 sata na sobnoj temperaturi. Slijepu probu pripremiti na isti način, ali umjesto uzorka uzeti 1 mL destilirane vode. Nakon 2 sata izmjeriti apsorbanciju pri valnoj duljini od 765 nm.

Izrada baždarnog pravca:

Otopine galne kiseline pripremiti u 100 % metanolu sljedećih koncentracija: 50, 200, 400 i 600 mgL⁻¹. U tikvicu od 100 mL otpipetirati 1 mL otopine određene koncentracije, te dalje primijeniti propis za određivanje ukupnih fenola. Izraditi baždarni pravac, pri čemu se na apscisu nanose koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije kod 765 nm.

Račun:

Pomoću programa Microsoft Excel dobivena je jednačba pravca, prema kojoj je izračunata koncentracija ukupnih fenola.

Izračunata jednačba pravca:

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

$$R^2 = 0,999$$

gdje je:

y - apsorbancija pri 765 nm

x - koncentracija galne kiseline (mg L⁻¹)

R² - koeficijent determinacije

3.2.3. Određivanje ukupnih tanina

Princip određivanja:

Ukupni tanini određeni su Bate-Smith metodom temeljenoj na kiselinskoj hidrolizi proantocijanidina, tzv. kondenziranih tanina na temperaturi od 100 °C pri čemu dolazi do formiranja obojenih antocijanidina (Ribereau-Gayon i Stonestreet, 1966).

Razlika obojenja između zagrijanog, hidroliziranog i nehidroliziranog uzorka držanog na sobnoj temperaturi određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini 550 nm, a pokazuje količinu ukupnih tanina u uzorku.

Postupak određivanja:

U dvije tube za hidrolizu otpipetirati po 2 mL uzorka (razrijeđenog 49:1), 1 mL destilirane vode te 3 mL koncentrirane klorovodične kiseline te tube hermetički zatvoriti . Jednu tubu ostaviti na sobnoj temperaturi, a drugu staviti u vodenu kupelj na 100 °C. Nakon 30 minuta, tubu izvaditi iz vodene kupelji te ohladiti ledom kako bi se što prije zaustavila daljnja reakcija kiselinske hidrolize. U svaku od tuba potom dodati 0,5 mL etanola. Izmjeriti optičku gustoću pri 550 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

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

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

gdje je:

19,33- faktor preračunavanja

D₁- optička gustoća hidroliziranog uzorka

D₂-optička gustoća nehidroliziranog uzorka

3.2.4. Određivanje ukupnih antocijana

Princip određivanja:

Ukupna količina antocijana u uzorku vina određena je pomoću metode bazirane na dodatku otopine natrij hidrogensulfita u uzorak te činjenici da se HSO_3^- ion veže na 2' položaj obojene molekule antocijana te ju tako prevodi iz obojenog kationa u njen bezbojni leuko oblik. Istovremeno, paralelni uzorak vina tretiran je destiliranom vodom pri čemu ne dolazi ni do kakve promjene na strukturi molekula antocijana. Količinu prisutnih antocijana pokazuje razlika spektrofotometrijski određenih apsorbancija u oba uzorka (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1965).

Postupak određivanja:

U tikvicu od 25 mL otpipetirati 1 mL uzorka, 1 mL 0,1 (v/v) klorovodičnom kiselinom zakiseljenog 96 % etanola i 20 mL 2 % vodene otopine klorovodične kiseline. Po 10 mL napravljene smjese otpipetirati u dvije tikvice nakon čega u prvu tikvicu dodati 4 mL destilirane vode, a u drugu 4 mL 15 % otopine natrij hidrogensulfita. Nakon 15 minuta izmjeriti apsorbancija oba uzorka na 520 nm nasuprot destiliranoj 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:

$A_c (\text{mg L}^{-1})$ – količina antocijana u ispitivanom uzorku

875 – faktor preračunavanja

D_1 - apsorbancija uzorka kojemu je dodana voda

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

3.2.5. Određivanje slobodnih antocijana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Princip određivanja:

Sastav ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata, antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata u uzorcima vina određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Identifikacija se provodi usporedbom retencijskog vremena spoja i standarda. Kvantifikacija analiziranih spojeva provodi se primjenom metode vanjskog standarda malvidin-3-glukozid klorida kao najzastupljenijeg slobodnog antocijana, a dobivene koncentracije izražene su u mg L⁻¹.

Postupak određivanja:

Kromatografske analize povedene su na Agilent1200 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) HPLC uređaju uz module binarne pumpe, degazera, autosampler-a, modula kolone te uz detekciju na DAD detektoru. Priprema uzorka za HPLC analizu sastojala se od filtriranja uzorka vina kroz celuloza acetat filtar promjera 25 mm i veličine pora 0,45 μm (Filter-Bio, Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20 μL ovako pripremljenog uzorka.

Tablica 4. Gradijent korišten za razdvajanje slobodnih antocijana.

t (min)	A (%)	B (%)	Protok (mLmin⁻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

Kromatografsko razdvajanje izvršeno je na koloni Nucleosil C18, dimenzija 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Phenomenex Inc., Torrance, CA, SAD), 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). Pripremljene mobilne faze su filtrirane i odzračene. Razdvajanje slobodnih antocijana provedeno je primjenom gradijenta prikazanog u tablici 4 uz protok mobilne faze od 1 mL min⁻¹. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu.

Detekcija slobodnih antocijana provedena je pomoću DAD detektora snimanjem spektra od 280 do 600 nm. Identifikacija i kvantifikacija slobodnih antocijana provedena je na 520 nm 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). Ukupni slobodni antocijan-3-*O*-glukozidi izračunati su kao suma koncentracija delfinidin-3-*O*-glukozida, cijanidin-3-*O*-glukozida, petunidin-3-*O*-glukozida, peonidin-3-*O*-glukozida i malvidin-3-*O*-glukozida. Ukupni antocijan-3-*O*-glukozid acetati izračunati su kao suma koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid acetata i malvidin-3-*O*-glukozid acetata. Ukupni antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarati izračunati su kao suma koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata.

3.2.6. Određivanje kromatskih karakteristika CIELab metodom

Princip određivanja:

CIELab prostorni model boja trodimenzionalni je sustav boja koji se temelji na percepciji standardnog promatrača kojeg predstavlja statistički podatak dobiven nizom mjerenja i najbliži je vizualnoj percepciji (CIE, 1986). Koordinate CIELab sustava boja temelje se na Heringovoj teoriji suprotnih parova boja, koje ujedno predstavljaju i osi sustava. Kromatske karakteristike vina prema CIELab sustavu opisuju sljedeći parametri: akromatska os L (svjetlina) sa vrijednostima u rasponu od 0 % do 100 %, pri čemu je 0 % crna, a 100 % bijela; raspon boja crveno-zeleno za os a (vrijednost a); raspon boja žuto-plavo za os b (vrijednost b), C_{ab} (kromatičnost) te h_{ab} (kut tona boje).

Postupak određivanja:

Mjerenje transmisije provesti skeniranjem valnih duljina od 380 do 780 nm, svakih 5 nm, uz D65 iluminant i kut promatrača 10°, u kiveti od 1 cm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Ukupna promjena boje između referentnog (netretiranog) uzorka odnosno standarda i ostalih uzoraka prema CIE Lab sustavu izračunava se sljedećom formulom:

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

$$\Delta L^* = L_1^* - L_2^* \quad (2)$$

$$\Delta a^* = a_1^* - a_2^* \quad (3)$$

$$\Delta b^* = b_1^* - b_2^* \quad (4)$$

gdje se veličine L_1^* , a_1^* i b_1^* odnose na boju kojoj se mjeri odstupanje (uzorak), a veličine L_2^* , a_2^* i b_2^* na referentnu boju (standard), pri čemu pozitivne vrijednosti pojedinih razlika (ΔL^* , Δa^* , Δb^*) znače da uzorak ima više te varijable u odnosu na standard. Na primjer, ako je razlika u svjetlini pozitivna vrijednost ($\Delta L^* > 0$), to znači da je uzorak svjetliji od standarda, i obrnuto. Ovisno o izmjerenim vrijednostima parametra ΔE u odnosu na standard moguće su sljedeće mogućnosti (Schläpfer, 1993):

$\Delta E^* < 1$	razlika boja se ne vidi golim okom
$\Delta E^* = (1 - 3)$	razlika boja uočljiva je temeljitim promatranjem
$\Delta E^* = (3 - 6)$	razlika boja se dobro vidi
$\Delta E^* > 6$	očigledna odstupanja boja

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitan je utjecaj tretmana visokim hidrostatskim tlakom od 200, 400 i 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta tretiranja na sastav polifenola i kromatskih karakteristika vina Cabernet Sauvignon.

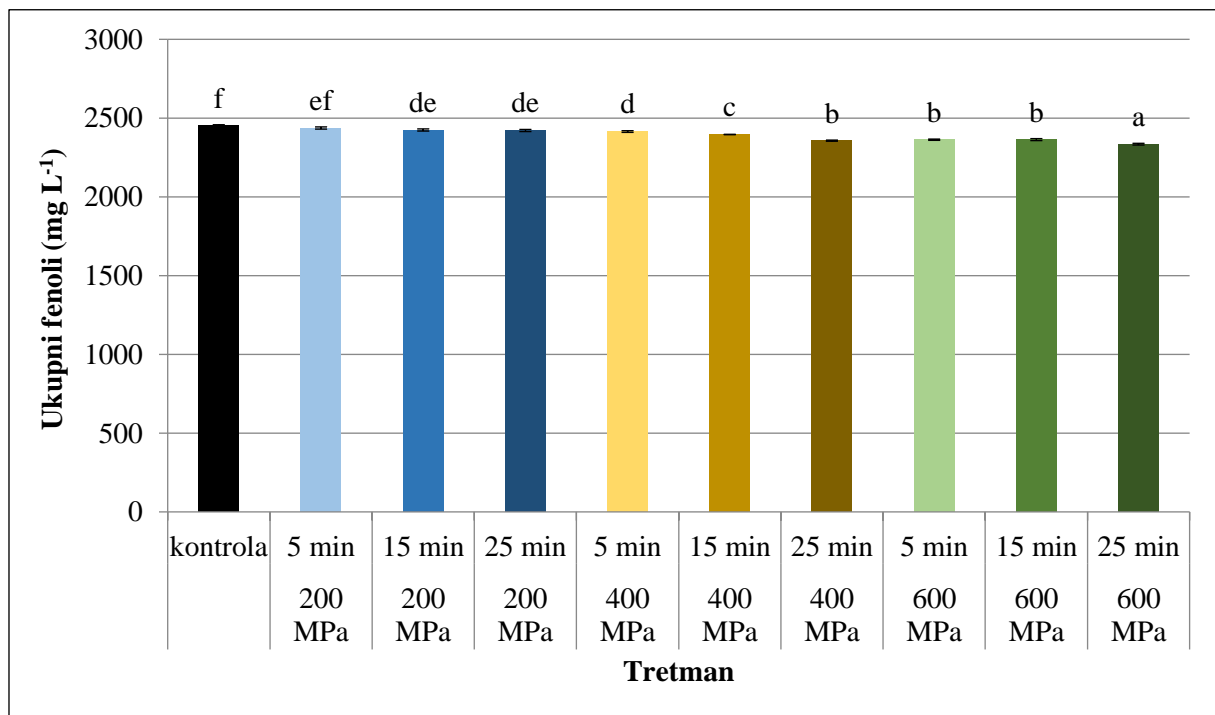
Dobiveni rezultati o utjecaju visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju ukupnih fenola, tanina, antocijana, antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata prikazani su grafički na slikama 3-8 za svaki pojedini spoj i to kao srednja vrijednost koncentracije tri repeticije uz standardnu devijaciju ($n=3$). Vrijednosti označene različitim slovima unutar svake slike predstavljaju uzorke koji su signifikantno različiti (ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$).

Dobiveni rezultati utjecaja visokog hidrostatskog tlaka na svjetlinu (L), akromatske osi a (crveno-zeleno) i b (žuto-plavo), kromatičnosti (C_{ab}) i kut tona boje (h_{ab}) prikazani su grafički na slikama 9-13 za svaki pojedini spoj i to kao srednja vrijednost koncentracije tri repeticije uz standardnu devijaciju ($n=3$) te u tablici 5. Vrijednosti označene različitim slovima unutar svake slike predstavljaju uzorke koji su signifikantno različiti (ANOVA, Tukey test, $p < 0.05$).

Međusobna povezanost polifenolnih i kromatskih karakteristika vina s različitim tretmanima visokim hidrostatskim tlakom utvrđena je analizom glavnih komponenti (PCA) i prikazana u tablici 6 i slici 14.

4.1. UTJECAJ VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA NA SASTAV POLIFENOLA

Koncentracije ukupnih fenola u kontrolnom (netretiranom) vinu te u uzorcima vina tretiranim visokim hidrostatskim tlakom (200, 400, 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta) prikazane su na slici 3.

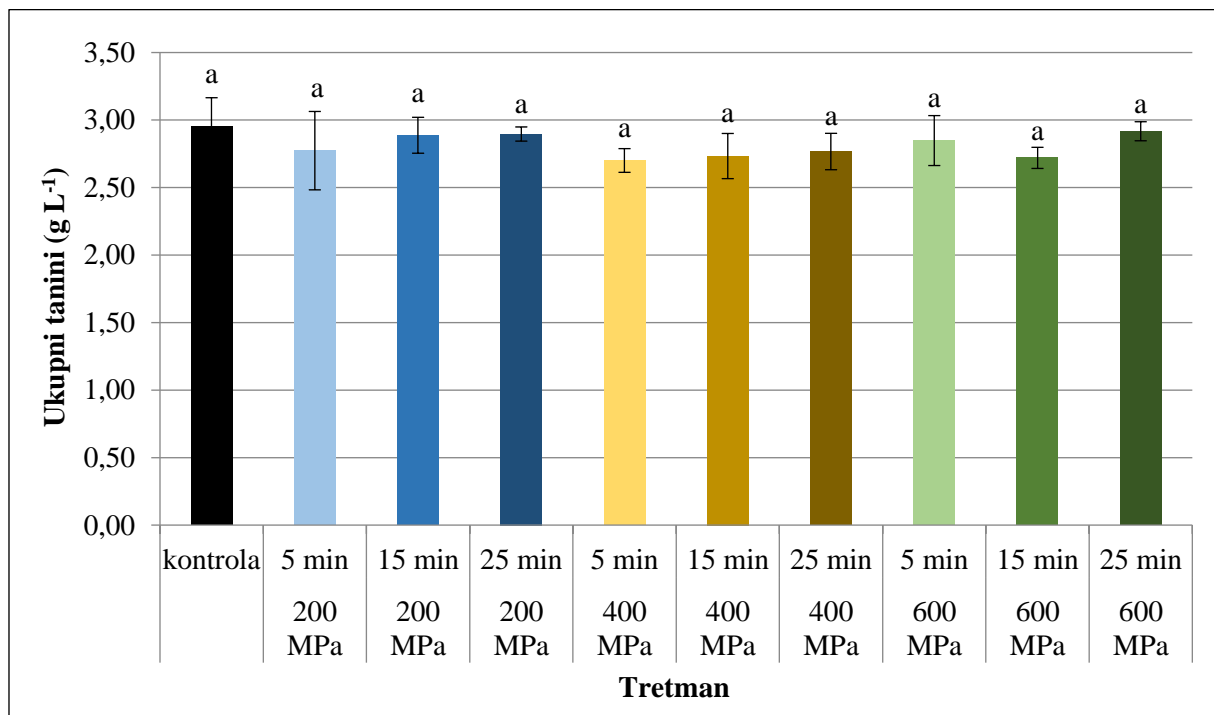


Slika 3. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na sastav ukupnih fenola

Usporedbom koncentracija ukupnih fenola kontrolnog netretiranog vina i tretiranih uzoraka, vidljiv je blagi pad koncentracije ukupnih fenola već prilikom tretmana visokim hidrostatskim tlakom od 200 MPa u trajanju od 5 minuta. S porastom vremena trajanja i intenziteta tretmana zabilježena je niža koncentracija ukupnih fenola. Sukladno tome, najniža koncentracija ukupnih fenola izmjerena je u vinu tretiranom visokim hidrostatskim tlakom od 600 MPa u trajanju od 25 minuta. Najizraženiji pad u koncentraciji utvrđen je između tretmana od 400 MPa u trajanju 15 i 25 minuta, kao i kod tretmana od 600 MPa u trajanju od 15 do 25 minuta (slika 3). Sniženje koncentracije ukupnih fenola s porastom vremena tretiranja

neposredno nakon tretmana zabilježeno je u radu Tao i sur. (2012) prilikom tretmana visokim hidrostatskim tlakom od 650 MPa u trajanju od 15, 30, 60 i 120 minuta. Također, identični rezultati dobiveni su u nedavno provedenom istraživanju Santos i sur. (2019), gdje je pad koncentracije ukupnih fenola utvrđen nakon tretmana visokim tlakom, kao i skladištenja u trajanju od 5 mjeseci. Dobiveni rezultati prikazani na slici 3 u skladu su s navedenim literaturnim podacima.

Koncentracije ukupnih tanina određenih Bate-Smith metodom u kontrolnom (netretiranom) vinu te u uzorcima vina tretiranim visokim hidrostatskim tlakom (200, 400, 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta) prikazane su na slici 4.

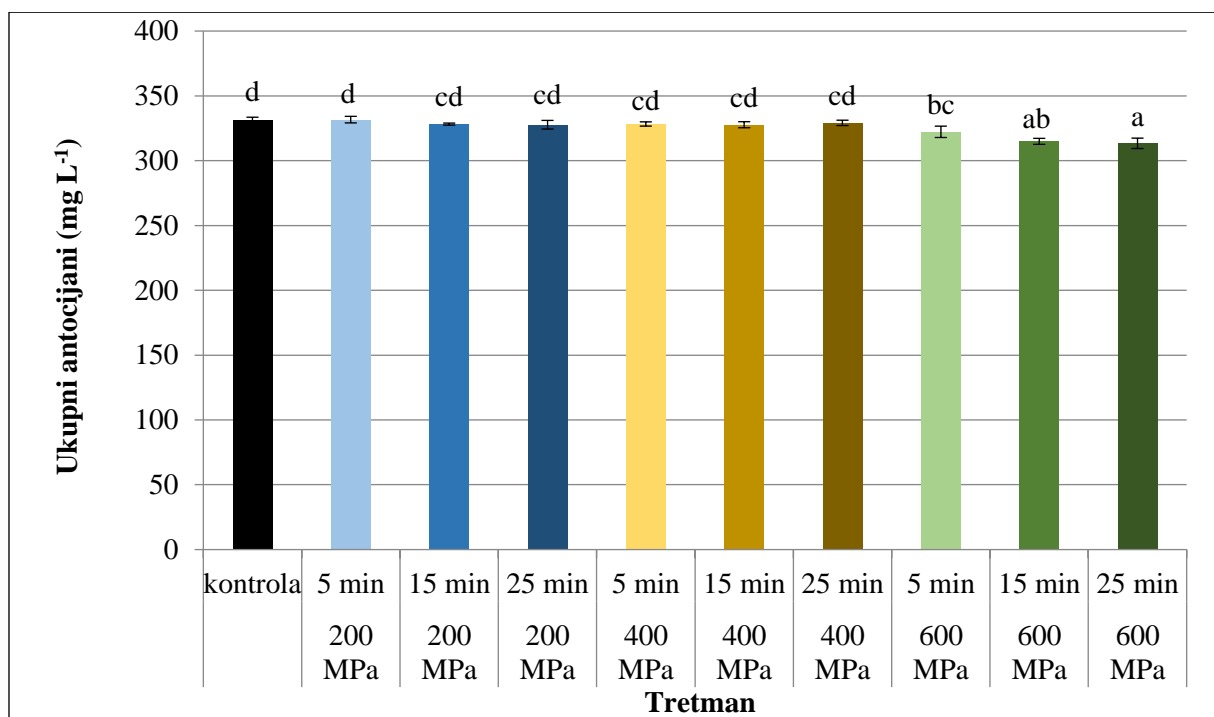


Slika 4. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na sastav ukupnih tanina

Rezultati istraživanja prikazani na slici 4 pokazuju kako tretman visokim hidrostatskim tlakom nije značajnije utjecao na promjenu koncentracije ukupnih tanina u tretiranim uzorcima. Tek neznatno niža koncentracija ukupnih tanina u odnosu na kontrolni uzorak utvrđena je u

svim uzorcima vina tretiranim visokim hidrostatskim tlakom. Dobiveni rezultati upućuju na stabilnost ukupnih tanina na djelovanje visokog hidrostatskog tlaka.

Koncentracije ukupnih antocijana u kontrolnom (netretiranom) vinu te u uzorcima vina tretiranim visokim hidrostatskim tlakom (200, 400, 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta) prikazane su na slici 5. Visoki hidrostatski tlak pokazao je značajno veći utjecaj na sastav ukupnih antocijana nego ukupnih tanina, a također utvrđene su i razlike u ovisnosti o primijenjenom tlaku, kao i duljini tretiranja.

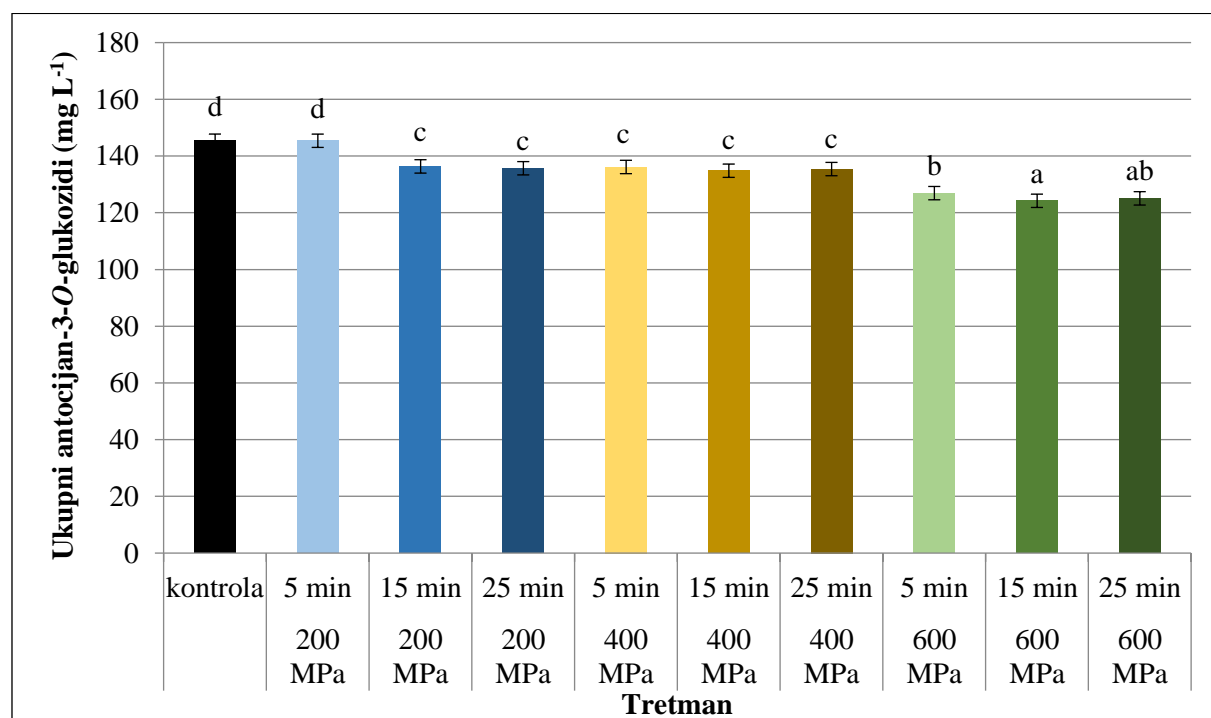


Slika 5. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na sastav ukupnih antocijana

Najblaži tretman od 200 MPa u trajanju 5 minuta nije uzrokovao značajnu promjenu u koncentraciji ukupnih antocijana. Porastom vremena tretiranja (15 i 25 min) pri tlaku od 200 MPa dolazi do blagog smanjenja koncentracije ukupnih antocijana. Prilikom tretmana od 400 MPa zabilježena je niža koncentracija antocijana nego u kontrolnom uzorku, ali također bez značajne razlike s obzirom na dužinu trajanja tretmana. Najniže koncentracije ukupnih antocijana zabilježene su primjenom tretmana od 600 MPa, pri čemu je značajan pad

koncentracije ukupnih antocijana utvrđen povećanjem duljine tretiranje (nakon 15 i 25 min). Niža koncentracija ukupnih antocijana u vinu tretiranom visokim hidrostatskim tlakom može biti rezultat reakcija kondenzacije antocijana i tanina i formiranja polimernih pigmenata (Santos i sur. 2019).

Koncentracije ukupnih antocijan-3-*O*-glukozida određenih primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) u kontrolnom (netretiranom) vinu te u uzorcima vina tretiranim visokim hidrostatskim tlakom (200, 400, 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta) prikazane su na slici 6. Ukupni slobodni antocijan-3-*O*-glukozidi izračunati su kao suma koncentracija delfinidin-3-*O*-glukozida, cijanidin-3-*O*-glukozida, petunidin-3-*O*-glukozida, peonidin-3-*O*-glukozida i malvidin-3-*O*-glukozida.

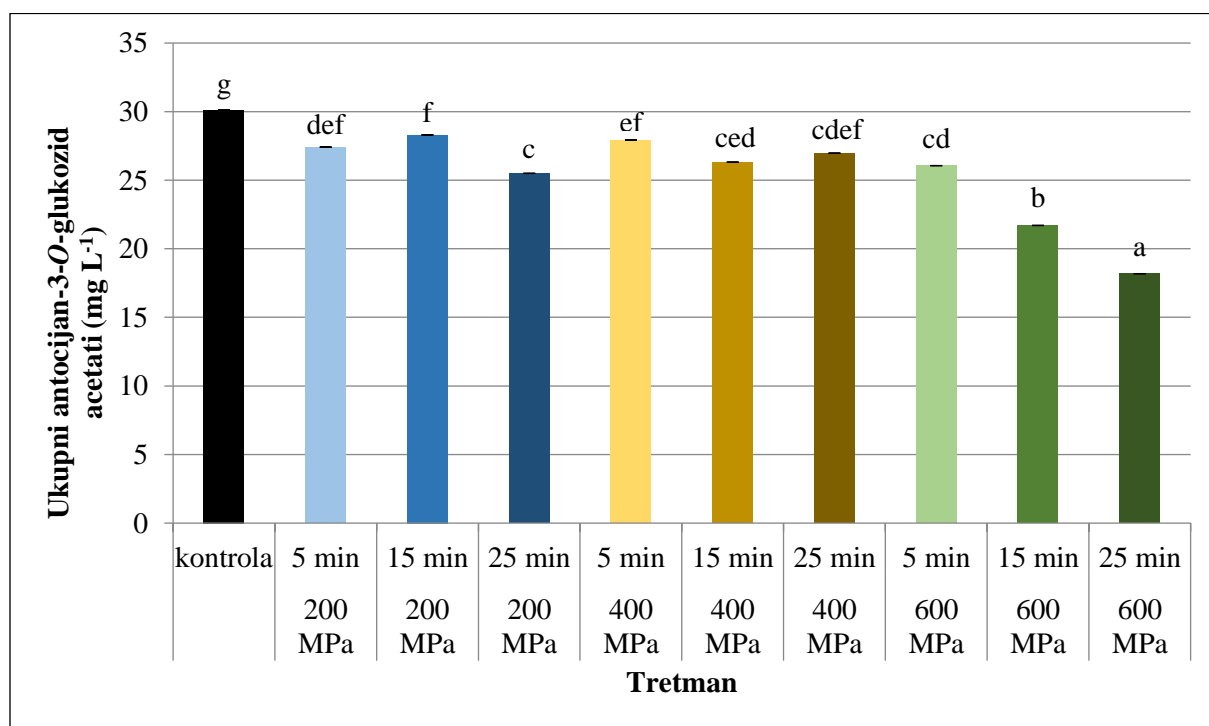


Slika 6. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na sastav antocijan-3-*O*-glukozida

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako tretman visokim hidrostatskim tlakom uzrokovao promjene u koncentraciji antocijan-3-*O*-glukozida, ovisno o primijenjenim parametrima tretmana. Prilikom tretmana od 200 MPa u trajanju od 5 minuta, nisu utvrđene značajne

promjene u koncentracije u usporedbi s netretiranim vinom. Porastom vremena tretiranja (15 i 25 min) pri tlaku od 200 MPa i prilikom tretmana na višim tlakovima dolazi do značajnog pada koncentracije antocijan-3-*O*-glukozida. Najniže vrijednosti izmjerene su prilikom najintenzivnijeg tretmana od 600 MPa, prilikom čega su tretmani u trajanju od 15 i 25 minuta pri navedenom tlaku uzrokovali najveću promjenu koncentracije antocijan-3-*O*-glukozida. Sniženje koncentracije ukupnih antocijan-3-*O*-glukozida prikazanih na slici 6 korespondira sniženju ukupnih antocijana prikazanih na slici 5, a dobiveni rezultati su u skladu s ranijim istraživanjima (Tao i sur., 2012).

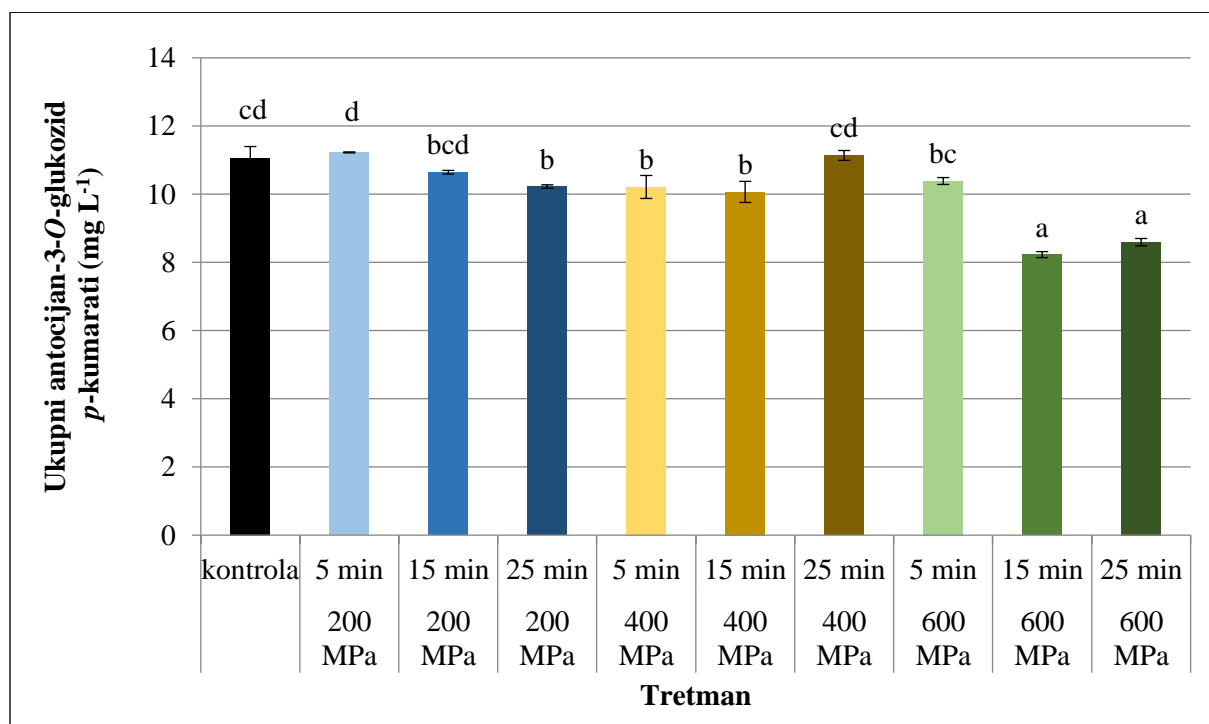
Koncentracije ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid acetata određenih primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) u kontrolnom (netretiranom) vinu te u uzorcima vina tretiranim visokim hidrostatskim tlakom (200, 400, 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta) prikazane su na slici 7. Ukupni antocijan-3-*O*-glukozid acetati izračunati su kao suma koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid acetata i malvidin-3-*O*-glukozid acetata.



Slika 7. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na sastav antocijan-3-*O*-glukozid acetata

Tretman visokim hidrostatskim tlakom prikazan na slici 7. uzrokovao je značajno sniženje koncentracije ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid acetata već prilikom najblažeg tretmana od 200 MPa. Kao i kod ukupnih antocijana te antocijan-3-*O*-glukozida, najniže koncentracije antocijan-3-*O*-glukozid acetata izmjerene su kod vina tretiranih tlakom 600 MPa. Porast dužine trajanja tretmana pri navedenom tlaku uzrokovao je drastičan pad koncentracije antocijan-3-*O*-glukozid acetata. Njihova koncentracija se nakon tretmana od 600 MPa, 25 minuta reducirala na gotovo polovinu koncentracije izmjerene u netretiranom uzorku. Promjene u koncentraciji peonidin-3-*O*-glukozid acetata i malvidin-3-*O*-glukozid acetata nakon tretmana visokim tlakom u skladu su s istraživanjem Santosa i sur. (2013) u kojemu je također zamijećen drastičan pad koncentracije malvidin-3-*O*-glukozid acetata prilikom tretmana od 425 i 500 MPa te manji pad koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid acetata pri navedenim tlakovima u usporedbi s netretiranim uzorkom.

Koncentracije ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata određenih primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) u kontrolnom (netretiranom) vinu te u uzorcima vina tretiranim visokim hidrostatskim tlakom (200, 400, 600 MPa tijekom 5, 15 i 25



Slika 8. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na sastav antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata

minuta) prikazane su na slici 8. Ukupni antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarati izračunati su kao suma koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata.

Dobiveni rezultati u tablici 8 prikazuju kako tretman visokim hidrostatskim tlakom od 200 MPa tijekom 5 i 15 minuta nije značajnije utjecao na koncentraciju antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata. Daljnjim produljenjem vremena trajanja (25 minuta) pri navedenom tlaku dolazi do sniženja koncentracije s obzirom na kontrolni uzorak. Trend blagog sniženja koncentracije ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata nastavlja se i prilikom tretmana od 400 MPa, izuzimajući pritom tretman u trajanju od 25 minuta prilikom kojega se koncentracija ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata nije značajno razlikovala od koncentracije kontrolnog uzorka. Kao i kod antocijan-3-*O*-glukozida te antocijan-3-*O*-glukozid acetata (slike 6 i 7) najniže koncentracije antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata izmjerene su kod uzoraka tretiranih tlakom od 600 MPa u trajanju od 15 i 25 minuta. U istraživanju Santosa i sur. (2013) zabilježen je blagi porast koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata u usporedbi s netretiranim uzorkom neposredno nakon tretmana. Međutim, nakon skladištenja i starenja u trajanju od 5 mjeseci izmjerene su značajno niže koncentracije navedenih spojeva u usporedbi s netretiranim uzorkom, koji je bio skladišten jednaki vremenski period (Santos i sur., 2013).

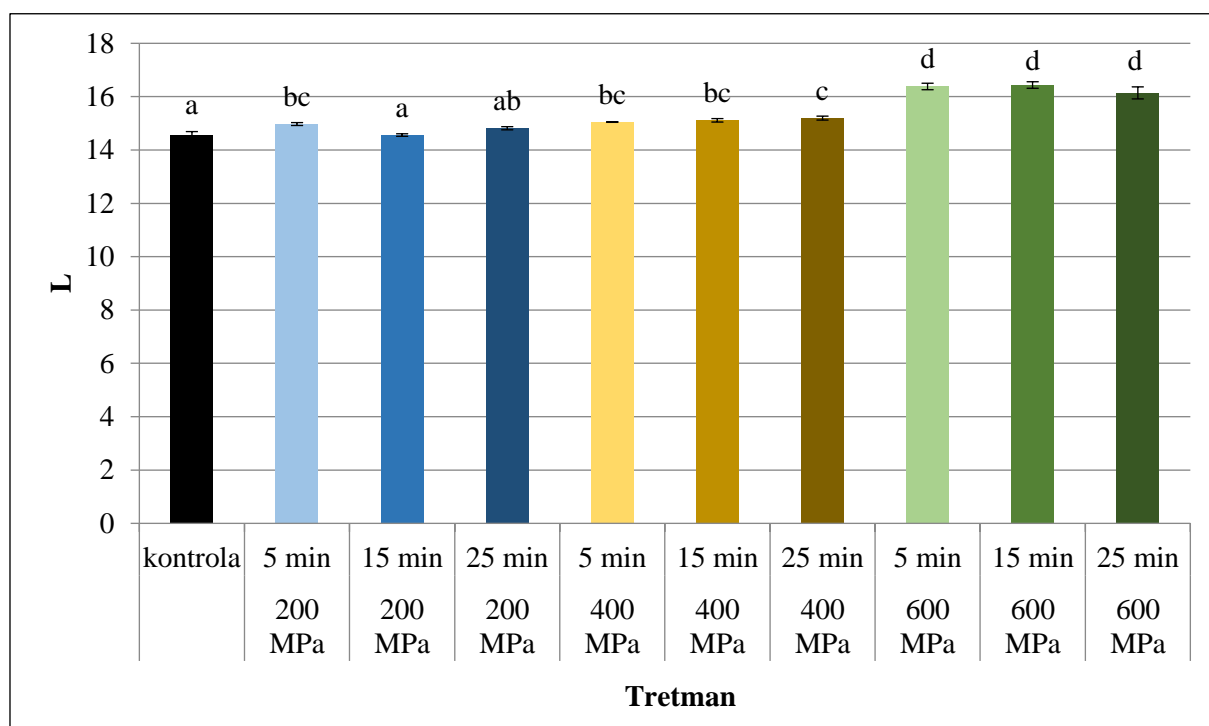
Na osnovu obrađenih rezultata (slike 3-8) vidljivo je kako je tretman visokim hidrostatskim tlakom značajno utjecao na pad koncentracije ukupnih fenola i antocijana, ali ne i tanina. Niže koncentracije polifenola i antocijana određene su nakon primjene intenzivnijih tretmana, odnosno pri višim tlakovima, kao i prilikom dužeg vremena tretiranja. Sličan pad koncentracije polifenola i antocijana karakterističan je za vina koja su starila konvencionalnim metodama. Naime, tijekom starenja vina uslijed reakcija polimerizacije, kondenzacije i precipitacije polifenolnih spojeva, dolazi do sniženja koncentracije ukupnih fenola i antocijana. Iako visoki hidrostatski tlak u sastavu polifenolnih spojeva uzrokuje kemijske promjene slične onima koje se odvijaju tijekom dozrijevanja vina, određene kemijske reakcije mogu se odvijati i različitim mehanizama od onih tijekom starenja konvencionalnim metodama (Tao i sur., 2012). Također, tretiranje visokim hidrostatskim tlakom uzrokovalo je slične promjene u koncentraciji antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata kao i kod koncentracije ukupnih antocijana. Tretman visokim hidrostatskim tlakom od 200 MPa tijekom 5 minuta nije uzrokovao značajne promjene. Pad koncentracije zabilježen je prilikom tretmana od 200 MPa, 15 i 25 minuta, te 400 MPa, 5, 15 i

25 minuta .Također, najniže koncentracije ukupnih antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata izmjerene su kod vina tretiranih visokim hidrostatskim tlakom od 600 MPa, 15 i 25 minuta. Navedeni tretmani uzrokovali su najznačajnije promjene u koncentraciji antocijan-3-*O*-glukozid acetata. Njihova koncentracija se nakon tretmana od 600 MPa, 25 minuta reducirala na gotovo polovinu koncentracije izmjerene u netretiranom uzorku.

Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima iz literature (Tao i sur., 2012; Santos i sur., 2015). Također, novija istraživanja pokazala su sličnosti između kemijskih promjena polifenolnih spojeva uzrokovanih primjenom visokog hidrostatskog tlaka i onih uzrokovanih mikro-oksigenacijom, budući da više koncentracije O₂ u vinu također dovode do ubrzavanja kemijskih reakcija dozrijevanja vina (Santos i sur., 2019).

4.2. UTJECAJ VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA NA KROMATSKE KARAKTERISTIKE

Utjecaj tretmana visokim hidrostatskim tlakom (200, 400, 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta) na L vrijednost (svjetlina) u rasponu od 0 % do 100 % (pri čemu je 0 % crna, a 100 % bijela) prikazana je na slici 9.



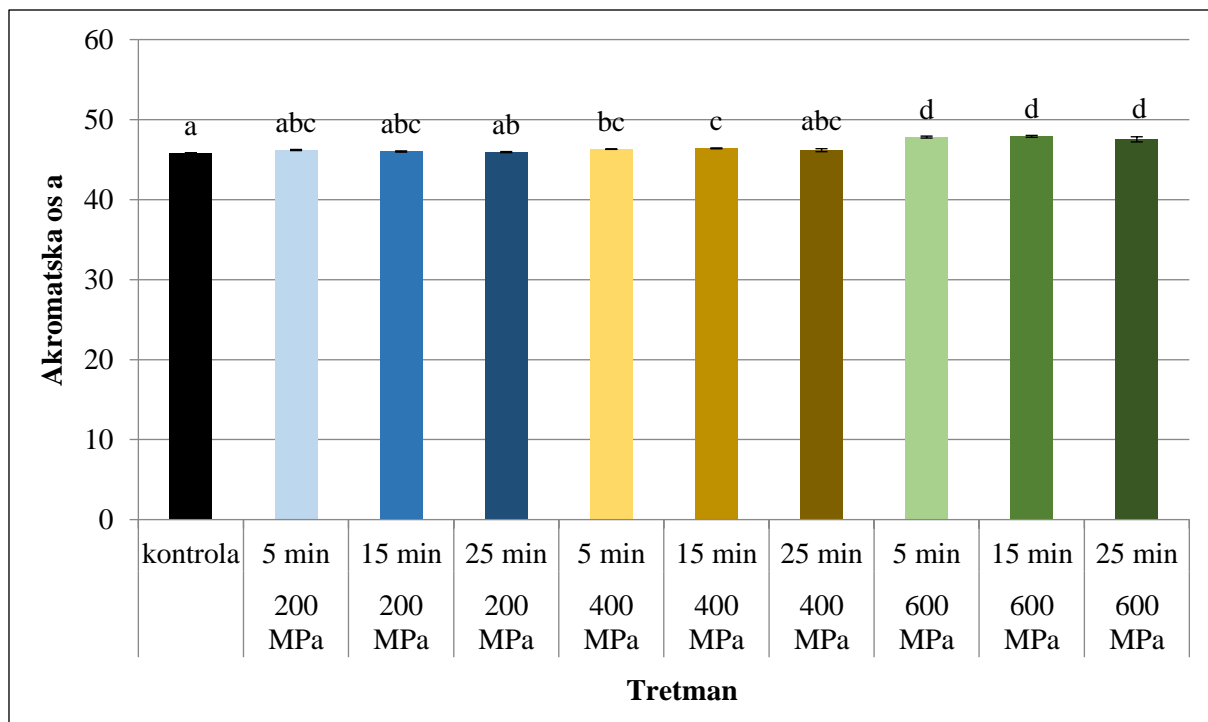
Slika 9. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na svjetlinu

Tretiranje vina visokim hidrostatskim tlakom utjecalo je na povećanje L vrijednosti, odnosno svjetline, pri čemu su vina tretirana višim hidrostatskim tlakom bila svjetlija od vina tretiranih nižim tlakom. Tretman visokim hidrostatskim tlakom od 200 MPa utjecao je blagi porast svjetline. Najmanja razlika, s obzirom na kontrolni uzorak, zabilježena je prilikom tretmana 200 MPa, 15 minuta. Porast svjetline, s obzirom na kontrolni uzorak, nastavlja se i kod tretmana visokim hidrostatskim tlakom od 400 MPa, gdje je zabilježen postepeni porast svjetline s produljenjem trajanja tretmana. Najviše vrijednosti L izmjerene su u vinima tretiranim tlakom od 600 MPa, međutim nisu utvrđene značajne razlike između uzoraka tretiranih 5, 15 i 25 minuta (slika 9).

Također, niže L vrijednosti karakteristične su za mlada vina, budući da prilikom starenja dolazi do opadanja koncentracije antocijana što uzrokuje smanjenje intenziteta boje, a time i porast vrijednosti kromatske karakteristike L (Carvalho i sur. 2015). Iz rezultata prikazanih na slikama 5 i 9 vidljiv je porast svjetline u uzorcima s nižim udjelom antocijana. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Tao i sur. (2012) u kojemu je zabilježen značajan porast svjetline prilikom tretmana visokim hidrostatskim tlakom od 600 MPa u trajanju od 15, 30, 60 i 120 minuta, pri čemu je porast svjetline bio izraženiji s produljenjem vremena tretiranja.

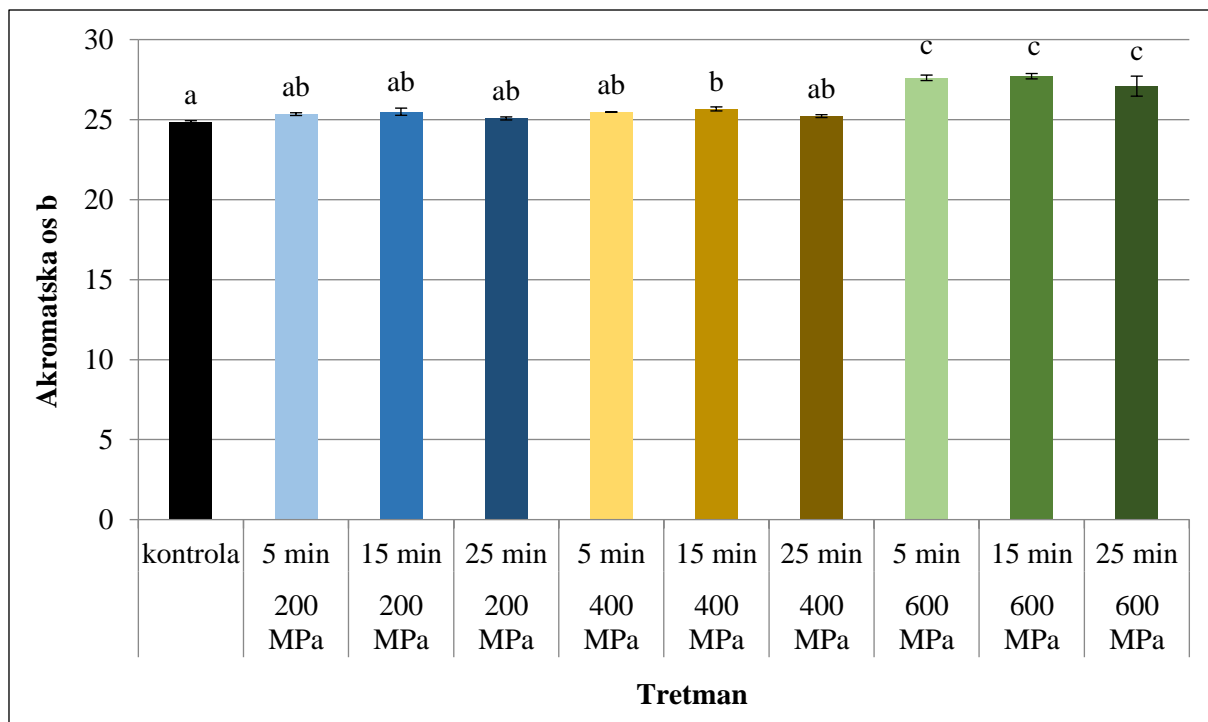
Utjecaj tretmana visokim hidrostatskim tlakom (200, 400, 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta) na akromatsku os a, prikazana je na slici 10. Akromatska os a ima orijentaciju crveno-zeleno. Pozitivna a os usmjerena je u smjeru crvenog stimulusa, a negativna a os usmjerena je u smjeru zelenog stimulusa.

Već nakon tretmana od 200 MPa zamijećen je značajan porast vrijednosti akromatske osi a, s obzirom na netretirani kontrolni uzorak. Vrijednost najbliža kontrolnom uzorku zabilježena je prilikom tretmana 200 MPa, 5 minuta. Tretiranjem tlakom od 400 MPa dobivene su veće vrijednosti, nego tretmanom od 200 MPa. Najviše vrijednosti izmjerene su kod najintenzivnijeg tretmana od 600 MPa, dok značajne razlike između različitih vremenski tretiranih uzoraka nisu utvrđene (slika 10).



Slika 10. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na akromatsku os a

Utjecaj tretmana visokim hidrostatskim tlakom (200, 400, 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta) na akromatsku os b prikazana je na slici 11. Akromatska os b ima orijentaciju žuto - plavo. Pozitivna b os usmjerena je u smjeru žutog stimulusa, a negativna b os usmjerena je u smjeru plavog stimulusa.



Slika 11. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na akromatsku os b

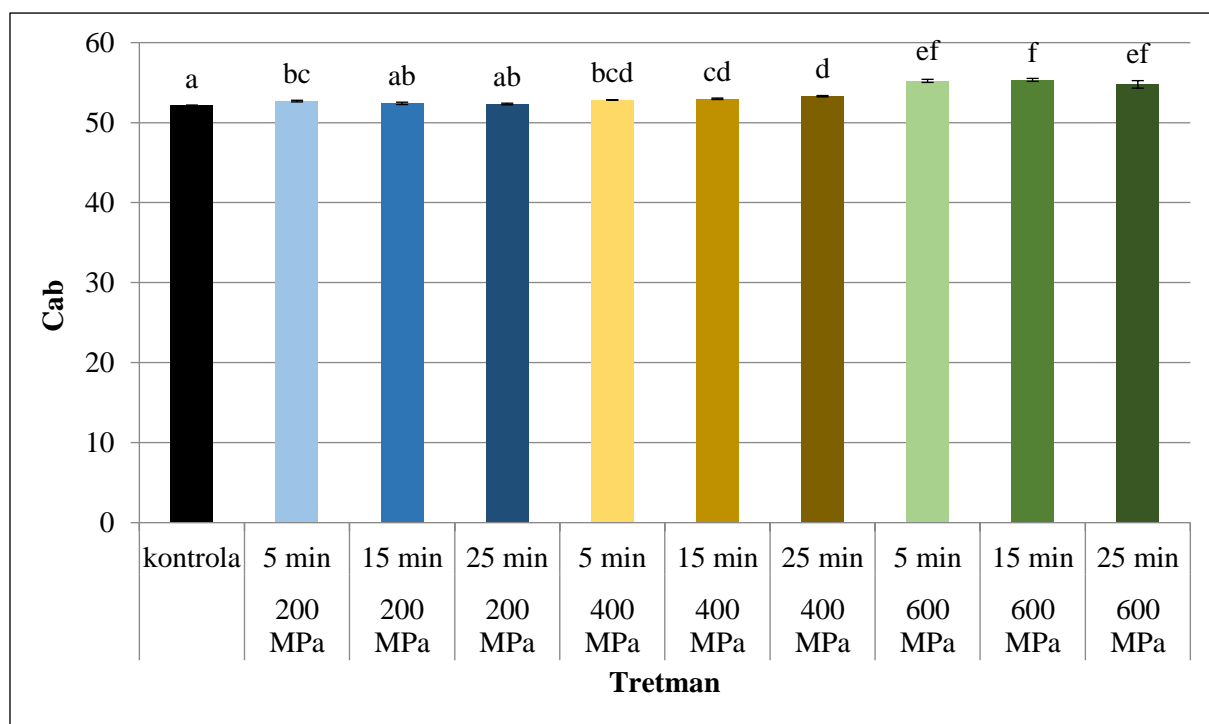
Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na akromatsku os b bio je identičan onom ranije opisanom za akromatsku na os a. Naime, prilikom tretmana od 200 MPa i 400 MPa utvrđen je blagi porast vrijednosti b. Najniže vrijednosti prilikom tretmana na navedenim tlakovima izmjerene su kod najdužeg tretmana od 25 minuta. Zapažen je izrazito visok skok prilikom tretmana od 600 MPa. Kraći tretmani od 5 i 15 minuta prilikom tretmana od 600 MPa rezultirali su nešto višim vrijednostima od tretmana 600 MPa, 25 minuta, međutim bez značajnih razlika među navedenim uzorcima (slika 11).

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako su vrijednosti kromatskih parametara a i b također, povezane s koncentracijom antocijana, budući da su pri višim koncentracijama antocijana utvrđene i više vrijednosti za akromatsku os a i b. Ranija istraživanja su pokazala kako starenjem vina dolazi do smanjenja vrijednosti a i povećanja vrijednosti b, u prvom redu uslijed opadanja koncentracije antocijana, kao i uslijed formiranja piranoantocijana i precipitacije netopivih polimernih pigmenata nastalih kondenzacijom antocijana i tanina ili oksidativne degradacije slobodnih antocijana (Liu i sur., 2015). Porast a vrijednosti kod najintenzivnijih tretmana upućuje na mogućnost intenzivnijeg formiranja direktno vezanih

antocijan-tanin produkata, kao i piranoantocijana (Fulcrand i sur. 2006), međutim navedene mehanizme utjecaja visokog hidrostatskog tlaka potrebno je dalje istražiti

Utjecaj tretmana visokim hidrostatskim tlakom (200, 400, 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta) na C_{ab} vrijednost (kromatičnost) prikazan je na slici 12. Kromatičnost ukazuje na doprinos akromatskih osi a i b ukupnoj boji vina. Kod crnih vina kromatičnost ukazuje na doprinos crvene (akromatska os a) i žute boje (akromatska os b) na ukupnu boju vina.

Trend ranije zamijećen kod akromatske osi a i b, vidljiv je i kod kromatičnosti. Već prilikom tretmana najmanjeg intenziteta 200 MPa, 5 minuta zabilježen je značajan porast kromatičnosti, u usporedbi s kontrolnim uzorkom, a slično je zamijećeno i kod tretmana od 15 i 25 minuta. Primjenom intenzivnijih tretmana (viši tlak i duljina tretiranja)



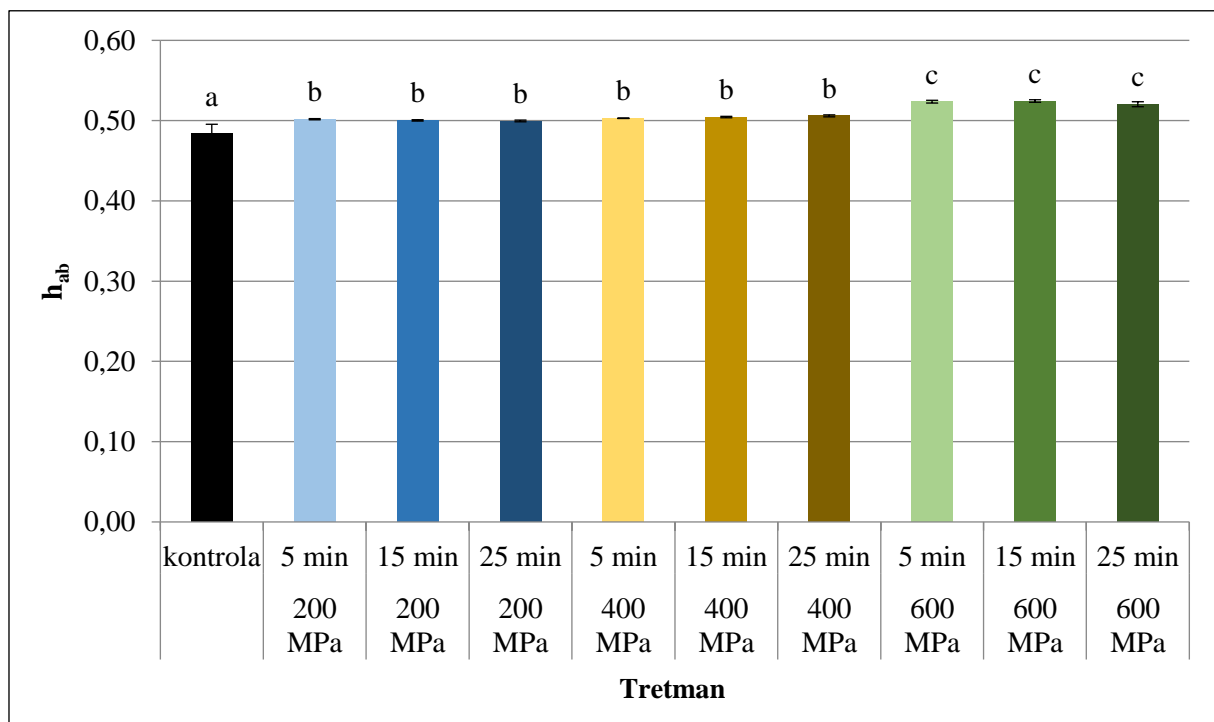
Slika 12. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na kromatičnost

utvrđen je daljnji porast kromatičnosti. Prilikom tretmana od 400 MPa vrijednost C_{ab} raste s porastom vremena tretmana. Najviše C_{ab} vrijednosti izmjerene su kod uzoraka tretiranih visokim hidrostatskim tlakom od 600 MPa, prilikom čega je tretman od 15 minuta uzrokovao

najveću razliku i porast ove kromatske vrijednosti, međutim bez značajnih razlika obzirom na vrijeme tretiranja (slika 12).

Utjecaj tretmana visokim hidrostatskim tlakom (200, 400, 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta) na kut tona boje prikazana je na slici 13. Vrijednost h_{ab} označava nijansu boje u stupnjevima, pri čemu je 0° crvena (pozitivna vrijednost akromatske osi a), 90° žuta (pozitivna vrijednost akromatske osi b), 180° zelena (negativna vrijednost akromatske osi a) te 270° plava (negativna vrijednost akromatske osi b).

Tretman od 200 MPa uzrokovao je značajan porast vrijednosti kuta tona boje, s obzirom na kontrolni uzorak. Nije izmjerena značajna razlika između vrijednosti h_{ab} kod vina tretiranih tlakom od 200 i 400 MPa, kao ni prilikom tretmana različitih vremena trajanja na navedenim tlakovima. Najviše vrijednosti kuta tona boje izmjerene su kod najintenzivnijeg tretmana od 600 MPa, bez značajnih razlika u vremenu trajanja tretmana (slika 13).



Slika 13. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na kut tona boje

Na osnovu obrađenih rezultata (slike 9-13) vidljivo je kako tretman visokim hidrostatskim tlakom značajno utjecao na kromatske karakteristike (povećanje L, a, b, C_{ab} i h_{ab} vrijednosti); prilikom čega je tretman tlakom od 600 MPa pokazao najveće promjene u usporedbi s netretiranim kontrolnim uzorkom. Dobiveni rezultati su očekivani, obzirom na činjenicu da su antocijani nositelji boje crnih vina (Nunez i sur., 2004; Lorrain i sur. 2011), a tretman visokim hidrostatskim tlakom značajno je utjecao je promjene u njihovom sastavu (Tao i sur., 2012).

U tablici 5 nalazi se prikaz ukupne razlike boja izračunate prema jednadžbi 1. Na temelju vrijednosti za ΔE možemo zaključiti da kromatske promjene u uzorcima vina tretiranih visokim hidrostatskim tlakom od 200 u trajanju 5, 15 i 25 minuta, i 400 MPa u trajanju od 5 i 25 minuta nije moguće zamjetiti ljudskim okom, odnosno da nije došlo do značajne vidljive promjene u boji. Kod vina tretiranog tlakom od 400 MPa, 15 minuta razlika u boji je jedva uočljiva. Vino tretirano tlakom od 600 MPa, 5, 15 i 25 minuta značajno je promijenilo boju u usporedbi s vinom koje nije tretirano visokim hidrostatskim tlakom (Schläpfer, 1993).

Promjene kromatskih karakteristika uzrokovane djelovanjem visokog hidrostatskog tlaka u skladu su s promjenama koje se zbivaju tijekom dozrijevanja i starenja vina. Naime,

Tablica 5. Prikaz ukupne razlike boja između kontrolnog uzorka i uzoraka vina tretiranih visokim hidrostatskim tlakom (200, 400, 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta)

Kolorimetrijska razlika	ΔL	Δa	Δb	ΔE
Usporedba kontrole i tretmana od 200MPa, 5min	0,42	0,38	0,51	0,76
Usporedba kontrole i tretmana od 200MPa, 15min	0,01	0,19	0,66	0,69
Usporedba kontrole i tretmana od 200MPa, 25min	0,26	0,11	0,24	0,37
Usporedba kontrole i tretmana od 400MPa, 5min	0,49	0,48	0,64	0,94
Usporedba kontrole i tretmana od 400MPa, 15min	0,56	0,58	0,83	1,16
Usporedba kontrole i tretmana od 400MPa, 25min	0,64	0,35	0,39	0,83
Usporedba kontrole i tretmana od 600MPa, 5min	1,83	2,00	2,78	3,88
Usporedba kontrole i tretmana od 600MPa, 15min	1,88	2,08	2,88	4,02
Usporedba kontrole i tretmana od 600MPa, 25min	1,58	1,71	2,26	3,25

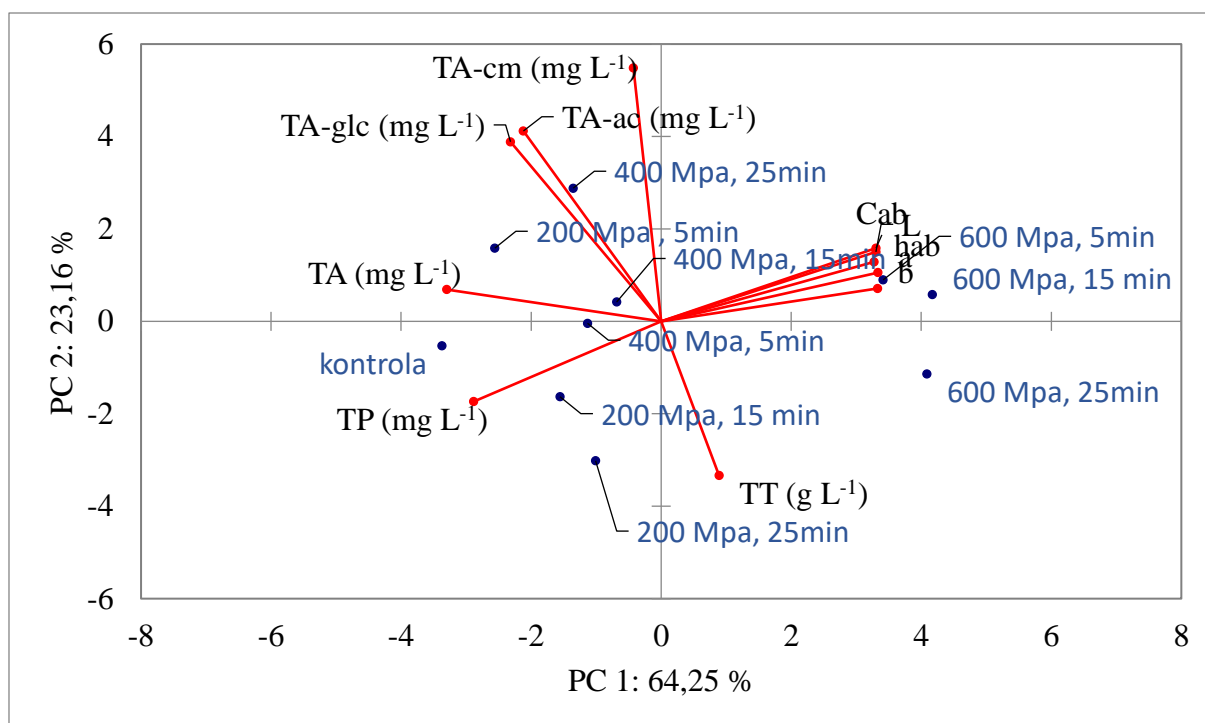
starenjem vino poprima crvenkasto-narančastu (svjetliju) boju. Takve promjene korespondiraju s povećanju kromatskih karakteristika b , L i h_{ab} (Gutierrez i sur. 2005), koje su zabilježene u ovome istraživanju. Rezultati provedenog istraživanja su u skladu s literaturnim podacima. Naime, Santos i sur. (2013) su u svom istraživanju zabilježili blagi porast vrijednosti parametra a prilikom tretmana od 425 MPa tijekom 5 minuta dok je prilikom tretmana od 500 MPa tijekom 5 minuta ta vrijednost bila viša od kontrole. Sukladno s rezultatima prikazanim u ovom radu, vrijednosti b , C_{ab} i h_{ab} bile su značajno veće nakon intenzivnijih tretmana (Santos i sur., 2013). U istraživanju Tao i sur. (2012) nakon tretmana visokim hidrostatskim tlakom od 650 MPa u trajanju 15 i 30 minuta zabilježene su veće vrijednosti za parametre b , L i h_{ab} , dok su za parametre a i C_{ab} izmjerene manje vrijednosti nego u kontrolnom netretiranom uzorku (Tao i sur., 2012).

4.3. PCA ANALIZA POLIFENOLA I KROMATSKIH KARAKTERISTIKA

Analizom glavnih komponenti (PCA) dobiven je uvid o međusobnoj povezanosti uzoraka (kontrolna i uzorci tretirani visokim hidrostatskim tlakom) u 2 D grafičkom prikazu obzirom na sastav polifenola i kromatske karakteristike (tablica 6 i slika 14).

Tablica 6. Vrijednosti glavnih komponenti

Parametar	PC 1	PC 2
Ukupni fenoli (mg L^{-1})	-0,694	-0,091
Ukupni tanini (mg L^{-1})	-0,066	-0,334
Ukupni antocijani (mg L^{-1})	-0,908	0,014
Ukupni antocijan-3- <i>O</i> -glukozidi (mg L^{-1})	-0,447	0,454
Ukupni antocijan-3- <i>O</i> -glukozid acetati (mg L^{-1})	-0,374	0,510
Ukupni antocijan-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarati (mg L^{-1})	-0,015	0,903
L (svjetlina)	0,909	0,068
Akromatska os a	0,927	0,033
Akromatska os b	0,924	0,015
C_{ab} (kromatičnost)	0,910	0,076
h_{ab} (kut tona boje)	0,892	0,050



Slika 14. PCA analiza kromatskih karakteristika i polifenola nakon tretiranja visokim tlakom

PCA je pokazala da prve dvije komponente objašnjavaju 87,41 % ukupne varijance. Nadalje, iz tablice 6 vidljivo je kako prva komponenta (PC 1) snažno negativno korelira sa koncentracijom ukupnih antocijana (-0,908) te snažno pozitivno korelira sa kromatskim karakteristikama: akromatska os a (0,927), akromatska os b (0,924), kromatičnost (0,910), svjetlina (0,909) te kut tona boje (0,892). Druga komponenta (PC 2) snažno pozitivno korelira sa koncentracijom antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (0,903). Nadalje, slika 14 prikazuje projekciju svih uzoraka u prostoru osnovnih komponenata (PC 1 i PC 2) sastava polifenola i kromatskih karakteristika, gdje je vidljivo stvaranja koncentriranih grupa uzoraka obzirom na tretman visokim hidrtostatskim tlakom. Najznačajniji trend može se uočiti među uzorcima tretiranim tlakom od 600 MPa, koji su smješteni desno od osi PC 1, a u svom sastavu imaju najveće vrijednosti parametara koji pozitivno koreliraju s PC 1, odnosno kromatskih karakteristika (*L*, *a*, *b*, *C_{ab}*, *h_{ab}*) te najnižu vrijednost parametara koji negativno koreliraju s PC 1, odnosno ukupnih antocijana. Iz PCA analize vidljivo je kako su tretmani od 600MPa uzrokovali najveće promjene u sastavu polifenolnih spojeva i kromatskih karakteristika vina u usporedbi s kontrolom. Suprotno, tretmani od 200 MPa 5 i 15 minuta te 400 MPa, 5 minuta uzrokovali su najmanje promjene u sastavu navedenih parametara.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Utjecaj tretmana visokim hidrostatskim tlakom na sastav polifenola i kromatske karakteristike vina Cabernet Sauvignon ovisio je o primijenjenom tlaku te duljini tretiranja.
2. Primjena viših tlakova kroz duže vrijeme tretiranja uzrokovala je značajan pad koncentracija ukupnih fenola i antocijana.
3. Tretman visokim hidrostatskim tlakom nije značajno utjecao na ukupnu koncentraciju tanina.
4. Tretman visokim hidrostatskim tlakom od 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta uzrokovao je najznačajniji pad koncentracije ukupnih antocijan-3-*O*-glukozida, antocijan-3-*O*-glukozid acetata i antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata. Sniženje koncentracije navedenih spojeva zamijećeno je i prilikom tretmana od 200 MPa tijekom 15 i 25 minuta te 400 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta.
5. Primjena viših tlakova kroz duže vrijeme tretiranja uzrokovala je značajan porast svjetline (*L*) te vrijednosti akromatske osi *a*, akromatske osi *b*, kromatičnosti (C_{ab}) i kuta tona boje (H_{ab}).
6. Tretmani visokim hidrostatskim tlakom od 600 MPa tijekom 5, 15 i 25 minuta značajno su utjecali na vidljivu promjenu boje vina.
7. Tretmani od 600MPa uzrokovali najveće promjene u sastavu polifenolnih spojeva i kromatskih karakteristika vina u usporedbi s kontrolom, dok su tretmani od 200 MPa 5 i 15 minuta te 400 MPa, 5 minuta uzrokovali su najmanje promjene u sastavu navedenih parametara.
8. Kemijske promjene u sastavu polifenolnih spojeva i kromatskih karakteristike uzrokovane visokim hidrostatskim tlakom identične su onima koje se odvijaju tijekom dozrijevanja i starenja.
9. Dobiveni rezultati upućuju na mogućnost korištenja visokog hidrostatsko tlaka kao tehnike za ubrzavanje dozrijevanja vina, uz obaveznu primjenu tlakova ispod 600 MPa.

6. LITERATURA

Anonymous (2018) Uređaj za obradu hrane visokim hidrostatskim tlakom, <<https://foodprocessinghub.pbf.hr/visoki-hidrostatski-tlak/>>. Pristupljeno 12 ožujka 2019.

Balc, A. T., Wilbey, R. A. (1999) High pressure processing of milk the first 100 years in the development of a new technology. *Int. J. Dairy Technol.* **52**, 149-155.

Buzrul, S. (2012) High hydrostatic pressure treatment of beer and wine. *Innov. Food Sci. Emerg.* **13**, 1–12.

Carvalho, M. J., Pereira, V., Pereira, A. C., Pinto, J. L., Marques, J. C. (2015) Evaluation of Wine Colour Under Accelerated and Oak-Cask Ageing Using CIELab and Chemometric Approaches. *Food Bioprocess Technol.* **8**, 2309-2318.

Cheynier, V., Schneider, R., Salmon, J.M., Fulcrand, H. (2010) Chemistry of wine. *Chem. Biol.* **3**, 1119-1172.

CIE, Central Bureau of the Commission Internationale de L'Ectarge (1986) Colorimetry, Publication CIE No. 15.2., Vienna, Austria.

Dimitrovska, M., Bocevska, M., Dimitrovski, D., Murkovic, M. (2011) Anthocyanin composition of Vranec, Cabernet Sauvignon, Merlot and Pinot Noir grapes as indicator of their varietal differentiation. *Eur. Food Res. Technol.* **232**, 591-600.

Farkas, O., Jakus, J., Héberger K. (2004) Quantitative structure: antioxidant activity relationships of flavonoid structures. *Molecules.* **9**, 1079-1088.

Fei, H., Na-Na, L., Lin, M., Qiu, P., Jun, W., Malcom, J. R., Chang, Q. D., (2012) Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. *Molecules.* **17**, 1571-1601.

Fulcrand, H., Duenas, M., Salas, E., Cheynier, V. (2006) Phenolic Reactions during winemaking and Ageing. *Am. J. Enol. Viticult.* **57**, 289-297.

Georgiev, V., Ananga, A., Tsoлова, V. (2014) Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. *Nutrients.* **6**, 391-415.

Gutierrez, I. H., Lorenzo, E. S., Espinosa, A. V. (2005) Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chem.* **92**, 269-283.

He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., Duan, C. Q. (2012) Anthocyanins and their variation in red wines I. monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules.* **17**, 1571-1601.

Hernanz, D., Recamales A. F., Gonzales-Miret, M. L., Gomez-Miguez, M. J., Vicario, I. M., Heredia, F. J. (2007). Phenolic composition of white wines with a prefermentative maceration at experimental and industrial scale. *J. Food Eng.* **80**, 327-335

Jackson, R. S. (2008) Wine science, 3.izd., Elsevier Academic Press, Boston.

Kinsella, J. E., Frankel, E., German, B., Kanner, J. (1993) Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.* **47**, 85–89

Krešić, G., Lelas, V., Režek Jambrak, A., Herceg, Z. (2011) Primjena visokog tlaka u postupcima obrade hrane. *Kem. Ind.* **60**, 11–19.

Li, S., Duan, X., Liu, S., Yang, G. (2005) Ultraviolet-visible spectrum analysis of fresh dry red wine treated by ultra-high pressure. *Food Res. Dev.* **26**, 160-163.

Li, S., Yang, H., Li, S., Zhang, J., Li, T., Zhu, B., Zhang, B. (2015) Polyphenolic Compositions and Chromatic Characteristics of Bog Bilberry Syrup Wines. *Molecules.* **20**, 19865–19877.

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.

Nunez, V., Monagas, M., Cordoves, C. G., Bartolome, B. (2004) *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biol. Technol.* **31**, 69-79.

Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., Noble, A. C. (1999) Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food Agr.* **79**, 1123-1128.

Rentzsch, M., Wilkens, A., Winterhalter, P. (2009) Non-flavonoid phenolic compounds. U: Wine chemistry and biochemistry, (Moreno, M.V., Polo, M.C., ured.), Springer, Madrid, str. 509-527.

Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1965) Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bull. Soc. Chim.* **9**, 2649–2652.

Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Le dosage des tanins dans le vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal.* **48**, 188–192.

Riedel, H., Saw, N.M.M.T., Akumo, D.N., Kütük, O., Smetanska, I. (2012) Wine as Food and Medicine. U: Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry (Valdez, B., ured.), InTech, Rijeka, Croatia, str. 399–418.

Romero, C., Ortega, A., Lopez, M. J., Fernandez, J. I., Gomez, E. (2005) Differences in Anthocyanin Extractability from Grapes to Wines According to Variety. *Am. J. Enol. Viticult.* **56**, 212-219.

Santos, M., Nunes, C., Cappelle, J., Gonçalves, F., Rodrigues, A., Saraiva, J. (2012) Effect of high pressure treatments on the physicochemical and sensorial properties of a sulphur dioxide-free red wine. *Food Chem.* **141**, 2558–2566.

Santos, M. C., Nunes, C., Angelica, M., Rocha, M., Rodrigues, A., Rocha, S. M., Saravia, J. A., Coimbra, M. A. (2013) Impact of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free white wine during bottle storage: Evidence for Maillard reaction acceleration. *Inov. Food Sci. Emerg.* **20**, 51–58.

Santos, M. C., Nunes, C., Ferreira, F., Jourdes, M., Teissedre, P.L., Rodrigues, A., Osvaldo, A., Saravia, J. A., Coimbra, M. A. (2015) High pressure treatments accelerate changes in volatile composition of sulphur dioxide-free wine during bottle storage. *Food Chem.* **188**, 406–414.

Santos, M. C., Nunes, C., Angelica, M., Rocha, M., Rodrigues, A., Rocha, S. M., Saravia, J. A., Coimbra, M. A. (2019) Comparison of high pressure treatment with conventional red wine aging processes: impact on phenolic composition. *Food Res. Int.* **116**, 223–231.

Schläpfer, K. (1993) *Farbmetrik in der Reproduktionstechnik und im Mehrfarbendruck*, 2. izd., UGRA, St. Gallen.

Sencer, B. (2012) High hydrostatic pressure treatment of beer and wine: A review. *Innov. Food Sci. Emerg.* **13**, 1-12.

Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* **16**, 144-158.

Somers, T. C. (1971) The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry.* **10**, 2175-2186.

Stoica, M., Mihalcea, L., Borda, D., Alexe, P. (2013) Non-thermal novel food processing technologies. *J. Agroaliment. Proc. Technol.* **19**, 212-217.

Sun, X., Chen, X., Li, L., Ma, T., Zhao, F., Huang, W., Zhan, J. (2015) Effect of ultra-high pressure treatment on the chemical properties, colour and sensory quality of young red wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **36**, 393-401.

Tang, K., Liu, T., Han, Y., Xu, Y., Li, M. J. (2016) The importance of monomeric anthocyanins in the definition of wine colour properties. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **38**, 2-10.

Tao, Y., Sun, D. W., Górecki, A., Błaszczak, W., Lamparski, G., Amarowicz, R., Jeliński, T. (2012) Effects of high hydrostatic pressure processing on the physicochemical and sensorial properties of a red wine. *Innov. Food Sci. Emerg.* **16**, 409–416.

Tao, Y., Garcia, J. F., Sun, D. W. (2014) Advances in wine aging technologies for enhancing wine quality and accelerating wine aging process. *Crc. Cr. Rev. Food Sci.* **56**, 817-835.

Wrolstad, R.E., Durst, R.W., Lee, J. (2005) Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. *Trends Food Sci. Tech.* **16**, 423–428.

Izjava o izvornosti

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

Edi Ružman