

Utjecaj ultrazvuka i dodatka antioksidansa na stabilnost polifenolnih spojeva i arome vina Cabernet Sauvignon

Kraljević, Rahela

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:159:662149>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

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, rujan 2019.

Rahela Kraljević
1084/PI

**UTJECAJ ULTRAZVUKA I
DODATKA ANTIOKSIDANSA NA
STABILNOST POLIFENOLNIH
SPOJEVA I AROME 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 (HRZZ).

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo i Laboratoriju za tehničku termodinamiku 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 Katarine Lukić, mag. inž.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju i analitiku vina i Laboratorija za tehničku termodinamiku koji su pomogli prilikom izrade ovog rada. Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Natki Ćurko na strpljenju, trudu, izdvojenom vremenu i znanju koje je prenijela prilikom izrade ovog rada. Veliko hvala asistentici Katarini Lukić mag. inž. na nesebičnoj pomoći i pristupačnosti.

Hvala mojim prijateljicama na podršci i strpljenju, jer najbitnije je imati prijatelje kroz život, uvijek i u svemu!

Posebno hvala mome dečku na bezuvjetnoj podršci i ljubavi!

Najveća hvala mojoj obitelji, roditeljima Pavlu i Snježani, braći i sestrama, na bezuvjetnoj ljubavi i podršci kroz sve ove godine. Ovo je na neki način i moj poklon njima, koji me prihvaćaju kakva jesam, koji me vole i podržavaju bez obzira na sve. Zbog svih vas ja sam danas ovo što jesam i takva sigurna, sa stečenim znanjem, životnim iskustvima i lijepim uspomnama, spremna sam zakoračiti u novo poglavlje svog života, suočavati se s novim izazovima, učiti i skupljati nove uspomene.

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 I DODATKA ANTIOKSIDANSA NA STABILNOST POLIFENOLNIH SPOJEVA I AROME VINA CABERNET SAUVIGNON

Rahela Kraljević, 1084/PI

Sažetak: U ovom radu ispitan je utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatak antioksidansa (sumporov dioksid i glutation) na stabilnost polifenolnih spojeva i arome vina Cabernet Sauvignon. Za tretiranje vina korištena je ultrazvučna sonda promjera 25,4 mm i ultrazvučni procesor snage 700 W i 20 kHz. Tretiranja su izvršena pri amplitudi ultrazvučnog vala od 25 % i trajanju od 6 minuta. Nakon tretiranja provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola, tanina te ukupnih antocijana. Sastav slobodnih antocijana analiziran je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Određivanje arome vina provedeno je primjenom plinske kromatografije s masenom detekcijom (GC/MS) uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME). Tretman ultrazvukom utjecao je blago na promjene u sastavu polifenolnih spojeva (ukupni polifenoli, ukupni i slobodni antocijani) i arome vina (norizoprenoidi, esteri i hlapive masne kiseline), pri su čemu su koncentracije SO₂ i dodatak glutatona pokazali zaštitno djelovanje.

Ključne riječi: vino, ultrazvuk visokih snaga, antioksidansi, aroma, polifenoli spojevi

Rad sadrži: 43 stranice, 12 slika, 4 tablice, 67 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: *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: 25. rujna 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

INFLUENCE OF ULTRASOUND AND ANTIOXIDANTS ADDITION ON THE STABILITY OF POLYPHENOL COMPOUNDS AND AROMA OF CABERNET SAUVIGNON WINE

Rahela Kraljević, 1084/PI

Abstract: In this paper, the impact of high power ultrasound and the addition of antioxidants (sulfur dioxide and glutathione) on the stability of polyphenolic compounds and aromas of Cabernet Sauvignon was examined. Treatment was performed with an ultrasonic probe with a diameter of 25.4 mm and ultrasonic processor with a power of 700 W and 20 kHz, with ultrasound wave amplitude of 25% and treatment duration of 6 minutes. Total phenols, tannins and anthocyanins were analyzed by spectrophotometric methods, while free anthocyanins were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). The determination of the aroma of the wine was carried out using gas chromatography with mass detection (GC/MS) with previous solid-phase microextraction (SPME). Application of high power ultrasound induced slight changes in the composition of polyphenolic compounds (total phenols, total and free anthocyanins) and aroma (norisoprenoids, esters and volatile fatty acids), where SO₂ concentration and glutathione showed protective effect.

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

Thesis contains: 43 pages, 12 figures, 4 tables, 67 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: *doc. dr. sc. Natka Ćurko*

Technical support and assistance: *Katarina Lukić, mag. ing.*

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: 25th September 2019

Sadržaj	stranica
1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Polifenolni spojevi u vinu	2
2.1.1. Neflavonoidi.....	2
2.1.2. Flavonoidi	3
2.2. Aroma vina.....	5
2.2.1. Primarna ili sortna aroma	5
2.2.2. Fermentacijska aroma	5
2.2.3. Tercijarna aroma - aroma starenja.....	6
2.3. Dodatak antioksidansa u vina.....	7
2.3.1. Sumporov dioksid	7
2.3.2. Glutation.....	8
2.4. Ultrazvuk.....	10
2.4.1. Primjena ultrazvuka u vinarstvu.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	13
3.1. Materijal	13
3.1.1. Uzorci vina Cabernet Sauvignon.....	13
3.1.2. Kemikalije	13
3.1.3. Aparatura i pribor	14
3.2. Metode	16
3.2.1. Priprema vina za tretiranje	16
3.2.2. Tretman vina ultrazvukom visokih snaga (HPU).....	16
3.2.3. Određivanje ukupnih fenola u crnom vinu	16
3.2.4. Određivanje ukupnih tanina u crnom vinu	17
3.2.6. Određivanje slobodnih antocijana u crnom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....	19
3.2.7. Određivanje spojeva sorte i fermentacijske arome crnog vina plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME–GC/MS).....	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na sastav polifenolih spojeva vina.....	24
4.2. Utjecaj ultrazvuka visokog inteziteta i dodataka antioksidansa na sastav hlapivih spojeva vina	30
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

Ultrazvuk je inovativna netoplinaska tehnologija, koja obzirom na relativno nisku cijenu i ekološku prihvatljivost ima široku primjenu u prehrambenoj industriji. Ovom tehnologijom poboljšava se učinkovitost obrade te omogućava proizvodnja visokokvalitetne i sigurne hrane. Primjena ultrazvuka visokih snaga u prehrambenoj industriji je brojna i uključuje ekstrakciju, otplinjavanje, inaktivaciju enzima i nukleaciju za procese kristalizacije, početak redoks reakcija, čišćenje organskih i anorganskih površina i struktura poroznih unutrašnjosti, smanjenje veličine čestica itd.

Također, ova tehnologija se koristi i u proizvodnji vina. Dosadašnja istraživanja pokazala su mogućnost uspješne primjene ultrazvuka visokih snaga u proizvodnji vina sa smanjenom koncentracijom sumporovog dioksida. Stoga, uslijed antimikrobnog djelovanja ultrazvuka, novija istraživanja u enologiji usmjerena su na mogućnost primjene ultrazvuka kao tehnologije alternativne dodatku sumporovog dioksida uz istovremeno očuvanje senzorskih svojstava vina. Naime, zbog antioksidacijskog i antimikrobnog djelovanja, sumporov dioksid je najzastupljeniji aditiv u vinarstvu, čiju zamjenu je teško pronaći. Također, utvrđeno je kako dodatak antioksidansa poput glutationa ima zaštitno djelovanje, posebice u očuvanju arome. Stoga, kombinacija ultrazvuka visokih snaga s dodatkom antioksidansa (niži SO₂ i glutation) bi mogla biti prikladna enološka praksa, a posebice za postizanje stabilnosti vina tijekom starenja.

Cilj ovog rada je istražiti djelovanje ultrazvuka visokih snaga na kvalitetu crnog vina Cabernet Sauvignon s različitim udjelima antioksidansa (glutation i SO₂), pri čemu će se stabilnost polifenolnih spojeva i spojeva arome ispitati u tretiranom vinu sa standardnom koncentracijom sumporovog dioksida, sniženom koncentracijom sumporovog dioksida, kao i vinu s dodatkom antioksidansa glutationa i sniženom koncentracijom sumporovog dioksida.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. POLIFENOLNI SPOJEVI U VINU

Polifenolni spojevi su nositelji senzorskih karakteristika vina, u prvom redu boje i okusa, zbog čega je polifenolni sastav vina izrazito važan za njegovu kvalitetu. Također, polifenolni spojevi grožđa i vina uslijed antioksidacijskog djelovanja poznati su po svom pozitivnom utjecaju na zdravlje (Carrieri i sur., 2013). Sastav polifenolnih spojeva u vinu ovisi u prvom redu o sastavu grožđa, a zatim o tehnologiji proizvodnje, kao i o kemijskim reakcijama koje se događaju tijekom dozrijevanja i starenja (Paixão i sur., 2007). Poznato je kako crna vina sadrže veće koncentracije polifenolnih spojeva od bijelih vina, a jedan od razloga je upravo sam proces proizvodnje. Naime, kod proizvodnje crnih vina tijekom maceracije dolazi do kontakta pokožice sa sokom, što dovodi do ekstrakcije polifenolnih spojeva iz vakuole u sok bobice. S druge strane, bijela vina najčešće dobivamo direktnim prešanjem grožđa (bez postupka maceracije) uslijed čega je koncentracije polifenolnih spojeva u bijelim vinima niža (Villaño i sur., 2006).

Prema strukturi, polifenolni spojevi vina mogu se podijeliti na flavonoide i neflavonoide. Neflavonidi imaju jednostavniju građu, koju karakterizira jedan fenolni (benzenov) prsten, dok flavonoidi imaju dva fenolna prstena povezana lancem od tri ugljikova atoma. Stilbeni i fenolne kiseline (hidroksicimetna i hidroksibenzojeva) su predstavnici neflavonoida u vinu, a flavan-3-oli, flavonoli, flavanonoli i antocijani su predstavnici flavonida (Ribéreau-Gayon i sur., 2000). U grožđu i vinu od pet najvažnijih skupina, četiri su flavonoidi, dok su samo fenolne kiseline neflavonoidi. Svaka skupina flavonoida ima svoju jedinstvenu aktivnost, ali u svakoj skupini, između spojeva postoje jedinstvene razlike (Kennedy, 2008).

2.1.1. Neflavonoidi

Neflavonidi dospijevaju u vino ekstrakcijom iz grožđa tijekom procesa muljanja ili mogu potjecati iz drvenih bačvi. U vinima koja se ne čuvaju u drvenim bačvama, većinu neflavonoidnih struktura uglavnom čine: hidroksibenzojeve kiseline (C6-C1), hidroksicimetne kiseline (C6-C9) i njihovi derivati, stilbeni. Stupanj hidroksilacije i metilacija aromatskog prstena čini razliku u strukturi između hidroksicimetnih i hidroksibenzojevih kiselina (Macheix i sur., 1990). Neflavonidi se uglavnom nalaze u mesu bobice, te im se koncentracija tijekom dozrijevanja grožđa smanjuje. Nisu obojeni, ali imaju ulogu stabilizatora boje crnih vina pomoću međumolekulskih i unutarmolekulskih reakcija (Minussi i sur., 2003).

Hidroksicimetne kiseline u grožđu su vezane u estere s vinskom kiselinom, a mogu se još vezati s različitim organskim kiselinama i šećerima (Ribéreau-Gayon i sur., 2006; Jackson, 2008). Ferulinska, kafeinska i kumarinska su najzastupljenije hidroksicimetne kiseline u vinu (Jackson, 2008). Kafeinska kiselina je najzastupljenija u vinu. Uvjeti uzgoja, klimatske prilike te sorte grožđa određuju sadržaj ovih kiselina u vinu. Tijekom dozrijevanja i starenja vina sudjeluju u velikom nizu reakcija. U alkoholnoj otopini su bezbojne, a imaju veliku ulogu u oksidativnim procesima te tijekom njih mogu postati žuto obojene (Fernández-Pachón i sur., 2006).

Hidroksibenzojeve kiseline u vinu su nalaze u znatno manjim koncentracijama u odnosu na hidroksicimetne kiseline, obično su prisutne kao slobodne kiseline i nastaju direktno iz benzojeve kiseline. Vanilinska, galna, protokatehinska, *p*-hidroksibenzojeva, salicilna, gentizinska i siringinska kiselina spadaju u skupinu hidroksibenzojevih kiselina. Konjugirane šećerima ili organskim kiselinama najčešće su prisutne u topljivom obliku (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Stilbeni nastaju kao posljedica izloženosti stresu u biljkama, kao što su infekcije, prejaka izloženost UV zračenju itd. Sinteza stilbena se događa velikim dijelom u stanicama pokožice, dok su koncentracije u ostalim dijelovima bobice grožđa jako male (Ribereau-Gayon i sur., 2006). Imaju izrazito antioksidativno, antimutageno i antikancerogeno djelovanje, te su posljednjih godina provedena mnoga istraživanja o njihovom pozitivnom učinku (Gatto i sur., 2008).

2.1.2. Flavonoidi

Antocijani su crveni pigmenti u grožđu, koji se uglavnom nalaze u pokožici i u mesu bobice grožđa. Oni su također prisutni u manjim količinama u lišću, uglavnom na kraju vegetacije. Strukturno, antocijani se sastoje od aglikona, odnosno antocijanidina na kojeg mogu biti vezane organske kiseline ili šećeri (Konczak i Zhang, 2004; Mazza i Miniati, 1993; Monagas i sur., 2005). Razlikujemo pet antocijana ovisno o sastavu grožđa, vina, te o vrsti i broju supstituiranih metilnih i hidroksilnih skupina, a to su: cijanidin, peonidin, petunidin, delfidin i malvidin. Antocijani su nestabilni i lako oksidiraju (Mazza i Miniati, 1993). Pri višim vrijednostima pH nalaze se u kinoidalnoj formi plavo ljubičaste boje, a pri nižim vrijednostima u formi flavijevog kationa te su tada crveno obojeni (Garrido i Borges, 2013; Montealegre i sur., 2006). Ove molekule su mnogo stabilnije u glikozidu (antocijana) nego u obliku aglikona

(antocijanidina). Boja ovih pigmenata ovisi o uvjetima u mediju (pH, SO₂), kao i o molekularnoj strukturi (Ribéreau-Gayon, 2006).

Tanini su fenolne tvari koje se nalaze u peteljci, sjemenkama grožđa i pokožici bobice, u vinima su odgovorni za gorčinu i trpkocu. Koncentracija tanina u vinu iznosi od 1 do 4,5 g L⁻¹ (Joscelyne Louise, 2009). Dijelimo ih na hidrolizirajuće i kondenzirajuće. Hidrolizirajući tanini su esteri i nastaju od neflavoidnih tanina, to su najčešće galna i elaginska kiselina. Kondenzirani tanini (proantocijanidini) su polimeri flavonoida, najčešće flavan-3-ola i flavan-3,4-diola (Minussi i sur., 2003). Najveći dio kondenziranih tanina (58,8 %) se nalazi u sjemenci bobice, 21 % se nalazi u peljeci, 16 % u listu dok se u pokožici bobice nalazi 4 % (Fernández-Pachón i sur., 2006). Tanini nisu obojeni jer ne posjeduju potpuno konjugirane aromatske sustave antocijana, ali imaju reaktivnost prema mjestima s nedostatkom elektrona i stoga mogu sudjelovati u reakcijama polimerizacije. U vinu, tanini mogu postati crveno pigmentirani djelujući kao kopolimeri s molekulama antocijana, čime vino dobiva boju (Somers i Evan, 1979, Herderich i Smith, 2005). Tanini su odgovorni za osjet trpkocce zbog njihove sposobnosti da precipitiraju proteine koji su uključeni u osjećaj trpkocce u ustima te imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala, tako da njihova prisutnost u vinu štiti od oksidacije (Piljac i sur., 2005).

2.2. AROMA VINA

Aroma vina rezultat međudjelovanja velikog broja mirisnih spojeva. Tvari arome čine vino prepoznatljivim, daju mu sortni karakter te su odgovorni za njegovu kakvoću (Bayonove i sur., 1998). Sorta grožđa, tehnologija i proizvodnja vina imaju najveći utjecaj na formiranje arome (Ugliano i sur., 2006). Aroma se klasificira prema izvorima različitih spojeva koji joj doprinose, a mogu dolaziti iz sirovine, grožđa ili su proizvod metabolizma kvasaca (De Barros Lopes i sur., 2005). Kada se govori o aromi vina najjednostavnija podjela spojeva arome je sljedeća: (i) primarna ili sortna aroma (aroma koja potječe od grožđa i promjena uzrokovanih tijekom procesa prerade grožđa), (ii) sekundarna ili fermentacijska aroma (aroma nastala tijekom procesa fermentacije) te (iii) tercijarna ili aroma starenja (spojevi nastali tijekom starenja vina).

2.2.1. Primarna ili sortna aroma

Mirisni spojevi koji u vino dolaze iz grožđa, a karakteristika su sorte, najvažniji su za kvalitetu i karakter vina. Neki do njih postoje u slobodnom stanju u grožđu, drugi se preradom grožđa formiraju iz nehlapivih i nemirisnih prekursora koji iz grožđa prelaze u mošt, dok se jedan dio aromatičnih spojeva formira iz prekursora tijekom fermentacije kao rezultat djelovanja enzima kvasaca. Ovi spojevi nosioci su takozvane sorte arome vina, a glavni predstavnici su terpeni (cvjetna i voćna aroma), norizoprenoidi (slatka i voćna aroma), C₆ spojevi (vegetativna aroma), metoksipirazini (aroma po zelenom, vegetativna) te sortni tioli (aroma po grejpu, marakuji, šimširu) (Álvarez-Pérez i sur., 2012). Koncentracija spojeva sorte arome ovisi o samoj sorti i to je jedna od važnijih sortnih karakteristika, zatim o zdravstvenom stanju grožđa, agroklimatskim uvjetima (svjetlo, temperatura, padaline, vrsta tla, položaj vinograda) te zrelosti grožđa (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Na njihovu koncentraciju u vinu, pored navedenog, utječe i tehnološki proces prerade i njege vina.

2.2.2. Fermentacijska aroma

Tijekom alkoholne fermentacije nastaje najvažniji dio arome. Alkoholnom fermentacijom povećava se senzorska i kemijska kompleksnost vina, što omogućuje lakšu ekstrakciju tvari koje se nalaze u čvrstim dijelovima grožđa te sintetiziraju značajne koncentracije kvašćevih metabolita i transformiraju se spojevi dobiveni iz grožđa (Swiegers i sur., 2005). Brojni čimbenici utječu na formiranje spojeva fermentacijske arome, a najvažniji su: uvjeti maceracije (temperatura i trajanje), temperatura fermentacije, pH vrijednost mošta,

soj kvasca koji provodi fermentaciju, udio dušika u moštu, dodatak sumporovog dioksida i koncentracija kisika (Swiegers i sur., 2005). Najznačajniji spojevi nastali metabolizmom kvasaca su: viši alkoholi, esteri, hlapive masne kiseline, karbonilni spojevi i hlapivi fenoli. U ranoj fazi fermentacije sintetiziraju se viši alkoholi i esteri paralelno sa rastom kvaščeve biomase. Utvrđeno je da su na početku fermentacije udjeli alkohola 47 %, acetatnih estera 37 % te etilnih estera 13 %. Prema završetku fermentacije udjeli hlapivih spojeva se smanjuju zbog povećanja udjela alkohola (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Aromi mladih vina značajno pridonose esteri, formirani tijekom fermentacije kvasca. Iako su prisutni u malim količinama u grožđu, većina acetatnih estera i etilnih estera masnih kiselina paralelna je s formiranjem etanola. Najzastupljeniji ester je etil acetat. Esteri alkohola i masnih kiselina kratkog lanca, nazivaju se „voćni esteri“ zbog svoje ugodne arome (Rapp i Mandery, 1986).

U bijelim vinima posebno su važni su etilni esteri masnih kiselina (etil butanoat, kaproat, kaprilat, kaprat, laurat). Njihova koncentracija je ispod 10 mg L^{-1} , ali je ta vrijednost približno 10 puta veća od osjetilnog praga. Miris etil kaproata je voćnog karaktera. Kako se broj kiselinskog ugljika povećava, mirisi estera postaju mekani, zatim sapunasti i konačno stearični. Soj kvasca ima veliki utjecaj na proizvodnju estera, ali još važniji utjecaj imaju uvjeti fermentacije. Postoji veliki pozitivan učinak niskih temperatura fermentacije na ukupnu količinu viših estera. Aroma takvih vina je karakteristično obilježena voćnim mirisom, tipičnim za ove estere (Rapp i Mandery, 1986). Prema Avakyan i sur. (1981) za osnovni miris vina odgovorna su četiri estera (etil acetat, *i*-amil acetat, etil kaproat i kaprilat), dva alkohola (*i*-butil, *i*-amil) i acetaldehid, dok drugi spojevi modificiraju osnovni miris.

2.2.3. Tercijarna aroma - aroma starenja

Tercijarna aroma je aroma koja se stvara tijekom odležavanja vina ili tijekom starenja vina u hrastovim bačvama. Biokemijskim i kemijskim transformacijama (oksidacijom, hidrolizom, esterifikacijom) aromatskih spojeva formira se tercijarna aroma za vrijeme dozrijevanja i starenja vina (Pichler, 2017). Tijekom dozrijevanja, aroma vina značajno se mijenja, a kontrola kisika je izrazito je važna, kako bi se izbjegle negativne oksidacijske promjene vina. Među navedenim promjenama je promjena boje, odnosno posmeđivanje. Međutim, vrlo često je kvaliteta vina narušena i prije promjene boje, zbog nastajanja nepoželjnih mirisa usko vezanih uz proces oksidacije, prvenstveno 2-nonenala, eugenola,

benzaldehida i furfurala, spojeva odgovornih za aromu starih, oksidiranih vina (Escudero i sur., 2002).

2.3. DODATAK ANTIOKSIDANSA U VINA

2.3.1. Sumporov dioksid

Sumporov dioksid (SO_2) je zbog svojeg antioksidacijskog i antimikrobnog djelovanja najčešće korišten konzervans u vinarstvu. U vinu ga nalazimo kao vezani SO_2 (primjerice za karbonilne spojeve, kao što je acetaldehid) te kao slobodni SO_2 (uglavnom u obliku bisulfitnog iona (HSO_3^-)), dok je samo mali udio identificiran kao molekularni SO_2 (Abramovic i sur., 2015).

Dodatkom sumporovog dioksida u vino ograničava se negativno djelovanje kisika na vino, odnosno sprječava njegova oksidacija budući da ovaj spoj ima sposobnost uklanjanja vodikovog peroksida, ali i *o*-kinona (Adachi i sur., 1979; Danilewicz i Wallbridge, 2010). Naime, Vivas i sur. (1997) pokazali su inhibicijsko djelovanje sumporovog dioksida u reakcijama oksidacije polifenola, gdje se oksidacija polifenola koji sadrže katehol događala mnogo brže i s većom potrošnjom SO_2 , ali s minimalnom oksidacijom etanola. S druge strane, SO_2 nije djelovao kao „hvatač“ superoksidnog iona, koje je zapravo učinkovito uklonjen askorbinskom kiselinom i polifenolima (Vivas i sur., 1997). Također, sumporov dioksid ima važnu ulogu u brznoj redukciji oksidiranih polifenola (Cheynier i sur., 1989; Cheynier i sur., 1993), a utvrđeno je i sinergističko djelovanje SO_2 i polifenola (katehina) (Saucier i Waterhouse, 1999) odnosno sposobnost SO_2 da vrati kinon u oblik katehola. Nadalje, istraživanja provedena u model otopini vina pokazala su kako SO_2 povećava antiksidacijsku sposobnost kafeinske kiseline i galne kiseline u zaštiti estera i terpena od oksidativne degradacije (Lambropoulosom i Roussisom, 2006).

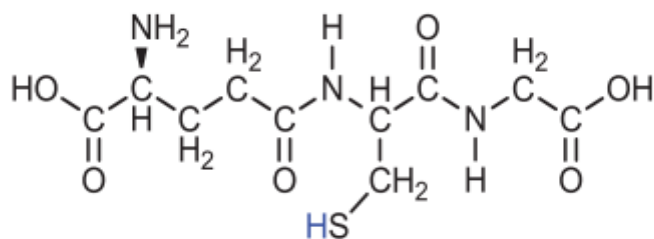
Obzirom na njegovu važnost i višestruko djelovanje (inhibicija rasta neželjenih mikroorganizama te sprječavanje enzimske oksidacije mošta i vina), proizvodnja vina bez dodatka SO_2 nije prihvatljiva za mnoge enologe. Međutim, iako nije dokazano da SO_2 u koncentraciji prisutnoj u vinu uzrokuje kancerogene ili genetske mutacije, ovaj aditiv ipak može negativno utjecati na zdravlje osjetljivih potrošača te uzrokovati pseudoalergije (Walker, 1985; Garde-Cerdán i Ancín-Azpilicueta, 2007). Obzirom na navedeno, pronalaženje alternativa i mehanizama za smanjenje koncentracije SO_2 u vinu jedan je najvećih enoloških izazova.

2.3.2. Glutation

Glutation (GSH, γ -L-glutamyl-L-cistein glicin) je antioksidans endogenog podrijetla, kojeg proizvode biljke i životinje. Glavna uloga glutaciona je eliminacija slobodnih radikala te zaštita reaktivnih spojeva koji brzo reagiraju s kisikom. Također, glutacion osigurava zaštitu u reakciji s teškim metalima koji ometaju procese staničnog starenja.

Pompella i sur. (2003) definiraju glutacion (GSH) kao važan antioksidans u biljkama, životinjama, gljivama, i nekim bakterijama koji sprječava oštećenje važnih staničnih komponenti uzrokovanim reaktivnim vrstama kisika kao što su slobodni radikali i peroksidi.

Zapravo, glutacion (slika 1) je tripeptid s peptidnom vezom između karboksilne skupine glutamatnog bočnog lanca i aminske skupine cisteina (koji je vezan normalnim peptidom na glicin). Zbog svoje kemijske strukture, glutacion štiti od oksidacija (Badea i Antoce, 2015).



Slika 1. Struktura glutaciona

Osim što se nalazi u biljkama, glutacion se nalazi u plodovima, među kojima je važan izvor grožđe. Prisutnost u grožđu osigurava antioksidacijsku zaštitu mošta, jer njegova kemijska struktura omogućuje oksidaciju svoje tiolne skupine u disulfurnu skupinu, štiteći tako druge molekule od napada reaktivnih vrsta kisika. Visokim afinitetom za kisik čuva voćne aromatične note mladih vina i sprječava prerano starenje vina. Glutacion također ima ulogu u sprječavanju stvaranja *o*-kinona, koji vinima daju smeđu boju, reducirajući ih da uklanjaju fenolne spojeve. Nedavna istraživanja pokazala su blagotvoran utjecaj dodavanja glutaciona u tehnologiji proizvodnje vina, posebno za očuvanje sortnog karaktera vina dobivenog iz aromatičnog grožđa te izravnu vezu između oksidacijske stabilnosti vina, vrijednosti pH, ukupnih fenola i ukupnog SO₂ i GSH dodanih moštu ili vinu tijekom punjenja (Badea i Antoce, 2015). GSH može poboljšati stabilnost vina i spriječiti pojavu atipičnih oksidativnih nota

tijekom starenja vina. S obzirom da ima sličnu ulogu antioksidativne zaštite u svim živim bićima, logična je pretpostavka da glutathion može funkcionirati na sličan način u procesiranoj hrani i da može pridonijeti smanjenju doze sumporovog dioksida koji se koristi kao antioksidans u zaštiti vina. Iako je zbog višestrukih funkcija sumporovog dioksida teško predvidjeti njegovu potpunu zamjenu, u budućnosti glutathion bi mogao biti dobar kandidat za djelomičnu zamjenu (Badea i Antoce, 2015).

2.4. ULTRAZVUK

Ultrazvuk podrazumijeva ultrazvučne valove čija je frekvencija viša od 16 kHz. Frekvencija u rasponu od 16 Hz do 16 kHz je frekvencija koje ljudsko uho može čuti, dok je za ljudsko slušno područje frekvencija ultrazvuka previsoka (McClements 1995; Mason 1998).

Primjena ultrazvuka zadnjih dvadesetak godina u znanosti, tehnologiji i prehrambenoj industriji je sve veća. Obzirom na frekvenciju, zvučni valovi mogu se podijeliti u više područja koja određuju njihovu potencijalnu primjenu. U prehrambenoj industriji razlikujemo ultrazvuk niske snage i ultrazvuk visoke snage.

Ultrazvuk niske snage obuhvaća visoke frekvencije od 2 do 20 MHz te niske intenzitete (manje od 1 W cm^{-2}). To je neinvazivna tehnika koja nema utjecaja na fizikalne i kemijske promjene u svojstvima materijala kroz koje prolazi ultrazvučni val (Leadley i Williams, 2006). Neke od primjena su određivanje stranih tijela (Brnčić i sur., 2009b), određivanje koncentracije tvari u hrani (McClements, 1995), određivanje razine kapljevina, mjerenje brzine protoka tekućina (Choi i sur., 2002), određivanje reologije namirnica (Brnčić, 2006).

Ultrazvuk visoke snage obuhvaća niske frekvencije od 20 do 100 kHz te visoke intenzitete (u rasponu od 10 do 1000 Wcm^{-2}) (McClements, 1995.; Mason, 1998.). Ultrazvuk visoke snage može uzrokovati određene kemijske i fizikalne promjene u materijalima na kojima se primjenjuje. Naime, širenjem ultrazvučnih valova visokog intenziteta frekvencije više od 20 kHz kroz namirnicu unosi se velika količina energije koja može imati različite mehaničke, kemijske i biokemijske učinke i na taj način utjecati na kvalitetu namirnica tijekom i nakon prerade. Istraživanja se većinom temelje na frekvencijskom području od 20 kHz do 40 kHz, jer ima najučinkovitije djelovanje u smislu djelovanja kavitacije (Patist i Bates, 2008). Najčešće se koristi za sušenje, homogenizaciju, ekstrakciju, odzračivanje tekućina, čišćenje, destilaciju te uklanjanje nepoželjnih mikroorganizama.

Kada se ultrazvuk visoke snage primjeni na neki sustav (namirnicu), odnosno kada zvučni val prođe kroz tretirani medij, stvaraju se longitudinalni valovi te dolazi do naizmjeničnih ciklusa ekspanzije i kompresije (Bosiljkov i sur., 2009), tj. u tretiranom mediju dolazi do tlačnih promjena i nastaju kavitacije gdje se formiraju mjehurići plina (Patist i Bates, 2008). Postoje dvije vrste kavitacija, stabilne kavitacije, bez implozije, gdje se kavitacijski mjehurići sudaraju, te prijelazne gdje kavitacijski mjehurići implodiraju, pri čemu prenose energiju u okolni medij (Dolatowski i sur. 2007; Brnčić i sur., 2009a). Tijekom ekspanzijskog

ciklusa kavitacijski mjehurići imaju veću površinu, pri čemu dolazi do povećanja difuzije plina u mjehurić, što uzrokuje ekspanziju mjehurića. Nakon što kavitacijski mjehurić postigne maksimalnu veličinu i kada procesi postanu kritični unutar kavitacijskog mjehurića, dolazi do kolapsa mjehurića i širenja energije u okolinu. Prilikom pucanja kavitacijskih mjehurića nastaju vrlo visoke temperature (do 5500 K) i tlakovi (do 100 MPa) u mediju. Karakteristike ultrazvuka (intenzitet, frekvencija), okolni uvjeti (temperatura, vlažnost, tlak) i svojstva proizvoda (viskoznost, površinska napetost i gustoća) utječu na sposobnost ultrazvuka da izazove kavitacije (Dolatowski i sur. 2007; Brnčić i sur., 2009a).

2.4.1. Primjena ultrazvuka u vinarstvu

Jedan od pozitivnih učinaka ultrazvuka koristan za ubrzavanje procesa proizvodnje vina je njegova sposobnost poboljšavanja prijenos tvari iz stanice. Naime, ultrazvuk pospešuje otpuštanje intrastaničnih tvari iz staničnih membrana te značajno smanjuje njezinu selektivnost, dok mehanička aktivnost ultrazvuka potpomaže difuziju otapala u tkivo.

Ferraretto i sur. (2013) istražili su mogućnost primjene ultrazvuka u industriji vina s ciljem ubrzanja pojedinih reakcija (koje su termodinamički moguće, ali kinetički spore) i cjelokupnog procesa proizvodnje vina. Naime, utvrdili su kako djelovanjem ultrazvuka dolazi do poboljšanja ekstrakcije fenolnih spojeva iz grožđa, razbijanjem stanične stjenke zbog alternativnog pritiska i kavitacije (vrijeme tretmana od 1 do 5 minuta na tri različite razine amplitude - 30, 60 i 90 %), uz smanjenje trajanja maceracije. Također, utvrđeno je kako primjena ultrazvuka tijekom dozrijevanje vina na talogu (1, 3 i 5 min na 30, 60 i 90 % amplitude, s 3 ponavljanja testa na 60 % za 3 min) pozitivno utječe na procese autolize kvasca te ubrzava starenja vina na talogu (Ferraretto i sur., 2013).

Cacciola i sur. (2013) ispitali su djelovanje ultrazvuka (vrijeme tretmana od 1 do 5 min na tri različite razine amplitude 30, 60 i 90 %) na vinu koje odležava na talogu, kako bi provjerili mogućnost ubrzanja oslobađanja zaštitnih koloida (tj. polisaharida). Učinci navedenog tretmana uspoređeni su s uobičajenim procesom starenja vina na talogu i enzimskim tretiranjem taloga pomoću β -glukanaze koja je u stanju razgraditi glukane i olakšati oslobađanje intrastaničnih komponenti. Ultrazvučni tretman vina na talogu rezultirao je povećanjem ukupnih koloida, proteina i polisaharida iz kvasca u mediju sa smanjenjem promjera čestica koloida te je time otkriven značajan učinak ultrazvuka na ekstrakciju staničnih komponenti u usporedbi s klasičnim odležavanjem vina na talogu (Cacciola i sur., 2013).

Zheng i sur. (2014) ispitivali su niskofrekventne ultrazvučne valove od 28 i 45 kHz s ciljem ubrzavanja procesa starenja vina. Rezultati su pokazali da je tretman ultrazvukom vina na 45 kHz i 360 W u trajanju od 30 minuta djelotvorno ubrzao proces starenja, pri čemu utvrđeno značajno smanjenje koncentracije viših alkohola te značajno povećanje koncentracije estera.

Ultrazvučni tretmani utječu na povećanje koncentracije fenolnih spojeva u crnom vinu (Tudose-Sandu-Ville i sur., 2012; Coletta i sur., 2013) i ubrzavanje njegovog starenja induciranjem reakcija polimerizacije i kopolimerizacije antocijana i tanina. Ipak, potrebno je izbjegavati tretman visokim zvučnim pritiscima, budući bi oni mogli uzrokovati usporavanje navedenih reakcije (Masuzawa i sur., 2000). Naime, za fenolnu kvalitetu vina obično su odgovorna tri parametra: ukupni fenolni spojevi, koji su odgovorni za senzorska svojstva i stabilnost vina, antocijani koji su odgovorni za boju u crnim vinima, i ukupni tanini koji daju trpkoću vinu te su uključeni u kopigmentacijske i kopolimerizacijske reakcije s antocijanima (Dipalmo i sur., 2016).

Tedjo i sur. (2002) istražili su svojstva kvalitete soka od grožđa za proizvodnju vina netoplinskim tehnikama, uključujući i ultrazvuk, a analiza kvalitete (šećeri, antocijani, minerali, kiselost, boja) pokazale su da ultrazvučno tretirani sokovi imaju poboljšanu kvalitetu u odnosu na netretirane uzorke.

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Uzorci vina Cabernet Sauvignon

Vino korišteno u ovom radu bilo je crno vino Cabernet Sauvignon (Erdutski vinogradi d.o.o., Erdut, Hrvatska), proizvedeno 2017. godine sa sniženim udjelom sumporovog dioksida. U tablici 1. prikazan je fizikalno-kemijski sastav crnog vina Cabernet Sauvignon.

Tablica 1. 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
pH	3,46
Jabučna kiselina (g L ⁻¹)	0,1
Mliječna kiselina (g L ⁻¹)	1,3
Ukupni sumporov dioksid (mg L ⁻¹)	25
Slobodni sumporov dioksid (mg L ⁻¹)	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.

- Natrijev klorid - Carlo Erba, Vale de Reuil, Francuska
- *n*-Amil alkohol- Fluka, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- 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

3.1.3. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Ultrazvučni procesor Qsonica Sonicators 700 W, Qsonica 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:

- Mikropipete od 100 i 1000 μ L, Eppendorf, Hauppauge, NY, SAD
- Staklena čaša od 400 mL
- 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
- SPME vlakno: 100 μ m PDMS, 23 Ga, Supelco, Bellefonte, PA, SAD
- Magnet
- HSS bočice, 20 mL, Restek, Bellefonte, PA, USA
- Silikonski čepovi za HSS bočice, Düren, Njemačka

3.2. METODE

3.2.1. Priprema vina za tretiranje

Tretmani vina uključivala su nekoliko varijanti antioksidansa, a pritom su korišteni antioksidansi glutation i sumporov dioksid. Varijante tretiranih vina obuhvatile su: (i) vino sa sniženom koncentracijom SO₂ (15 mg L⁻¹ slobodnog SO₂); (ii) vino sa sniženom koncentracijom SO₂ i glutationom (15 mg L⁻¹ slobodnog SO₂ uz dodatak 20 mg L⁻¹ glutaciona te (iii) vino sa standardnim SO₂ (30 mg L⁻¹ slobodnog SO₂) Kontrolno vino je vino sa standardnim udjelom SO₂.

3.2.2. Tretman vina ultrazvukom visokih snaga (HPU)

Za tretman vina ultrazvukom visokih snaga korištena je ultrazvučna sonda promjera 25,4 mm i ultrazvučni procesor snage 700 W i 20 kHz (Qsonica Sonicators, Newtown, SAD). Tretiranja su izvršena pri amplitudi ultrazvučnog vala od 25 % i trajanju tretmana od 6 minuta. Postupak HPU tretiranja vina bio je sljedeći: 300 mL vina stavljeno je u staklenu čašu od 400 mL. Zatim je ultrazvučna sonda uronjena u uzorak (oko 2 cm) i centrirana u sredinu čaše. Tijekom HPU tretmana temperatura je održavana na 25 °C hlađenjem ledom. Analiza vina povedena je odmah nakon primijenjenog tretmana.

3.2.3. Određivanje ukupnih fenola u crnom vinu

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 bijelog vina ili razrijeđenog (1:9) uzorka crnog vina, 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. Tikvica zatim nadopuniti do oznake s destiliranom vodom i ostaviti 2 sata na sobnoj temperaturi. Slijepu probu pripremiti na isti način, ali je 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 mg L⁻¹. U tikvicu od 100 mL otpipetirati 1 mL otopine određene koncentracije, te se dalje primijeniti propis za određivanje ukupnih fenola. Izraditi baždarni pravac pri čemu se na apscisu nanijeti koncentracije galne kiseline (mg L⁻¹), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije kod 765 nm.

Račun:

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

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)

R²- koeficijent determinacije

3.2.4. Određivanje ukupnih tanina u crnom vinu

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 je 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

3.2.5. Određivanje ukupnih antocijana u crnom vinu

Princip određivanja:

Ukupna količina antocijana u uzorku vina određena je pomoću metode bazirane na dodatku otopine natrij hidrogensulfita u uzorak te činjenici da se HSO₃⁻ ion veže na 2' položaj obojene molekule antocijana te ju tako prevodi iz obojenog kationa u njen bezbojni leuko oblik. Istovremeno, paralelni uzorak ekstrakta pokožice grožđa tretiran je destiliranom vodom pri čemu ne dolazi do nikakve 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 natrijevog hidrogensulfita. Nakon 15 minuta izmjeriti apsorbancija oba uzorka na 520 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Udio antocijana u ispitivanom uzorku ekstrakta pokožice grožđa 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

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

Sastav ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida (delfinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3-*O*-glukozid), antocijan-3-*O*-glukozid acetata (peonidin-3-*O*-glukozid acetat i malvidin-3-*O*-glukozid acetat), antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata (peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat) u uzorcima vina određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Kromatografske analize povedene su na Agilent1260 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) HPLC uređaju uz module kvarterne pumpe, autosamplera, modula kolone te uz detekciju na DAD detektoru.

Priprema uzorka za HPLC analizu sastojala se filtriranja uzorka vina kroz celuloza acetat filter promjera 25 mm i veličine pora 0,45 μm (Filter-Bio, Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20 μL ovako pripremljenog uzorka. 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 2 uz protok mobilne faze od 1 mL min^{-1} .

Tablica 2. Gradijent korišten 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 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. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a 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*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid 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. Ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarati izračunati su kao suma koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata.

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

Određivanje spojeva arome provedeno je primjenom plinske kromatografije s masenom detekcijom (GC/MS) uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME) prema metodi Tomašević i sur. (2016). Određeni su sljedeći spojevi arome: norizoprenoidi [β -damaskenon i 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftalen (TDN)], esteri [etilni esteri (etil butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanoat i dietil sukcinat), acetatni esteri (etil acetat, *i*-butil acetat, *i*-amil acetat, heksil acetat i 2-feniletal acetat), viši alkoholi (*i*-amil alkohol, 1-heksanol, *cis*-3-heksen-1-ol i 2-fenil etanol) i hlapive masne kiseline (kapronska, kaprilna i kaprinska kiselina).

Princip GC/MS analize baziran je na razdvajanju spojeva arome u uzorku koji se strujom inertnog plina nosioca unosi na kromatografsku kolonu. Na koloni dolazi do razdvajanja sastojaka između nepokretne faze - adsorbensa i pokretne faze – plina nosioca. Vrijeme zadržavanja pojedinog spoja na kromatografskoj koloni pri zadanim uvjetima naziva se retencijsko vrijeme. Na izlazu iz kolone nalazi se maseni detektor u kojem se određuje prisutnost odijeljenih sastojaka uzorka u pokretnoj fazi. U masenom detektoru dolazi do ionizacije spojeva te svaki spoj karakterizira određeni omjer mase i naboja (m/z). Detektor redom detektira količinu eluiranih sastojaka kao funkciju vremena te na računalo dobivamo kromatogram. Svaki pik na kromatogramu karakterističan je za pojedini spoj, a površina ispod pika proporcionalna je koncentraciji pojedinog spoja u uzorku. Integracijom površine dobiva se točna koncentracija u mg L^{-1} .

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 → 200 °C, 3 °C min⁻¹ → 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 volumena 50 mL dodati dio uzorka vina i interni standard – *n*-amil alkohol u koncentraciji od 20 mg L^{-1} te nadopuniti tikvicu uzorkom vina do oznake. Pripremljeni uzorak staviti u termostat na temperaturu od 20 °C. Izvagati 2 +/- 0,05 g NaCl-a na analitičkoj vagi u HSS bočicu i dodati 10 mL pripremljenog uzorka s internim standardom. Svrha dodavanja natrijevog klorida je povećati ionsku jakost, odnosno povećati učinkovitost same ekstrakcije. U HSS bočicu s uzorkom dodati magnet, a potom bočicu zatvoriti i postaviti u termoblok s magnetskom miješalicom prethodno zagrijan na 40 °C. Postaviti SPME iglu na adsorpciju uz konstantnu temperaturu i miješanje kroz 30 minuta. Nakon adsorpcije vlakno prenijeti u injektor plinskog kromatografa i postaviti na desorpciju u trajanju od pet minuta.

Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome:

Identifikacija spojeva arome provedena je usporedbom retencijskih vremena spojeva s retencijskim vremenima standarda te usporedbom masenih spektara spojeva s masenim spektrima u Nist05 knjižnici masenih spektara. Kvantifikacija navedenih spojeva arome provedena primjenom baždarnih krivulja pripadajućih standarda. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su u mg L^{-1} . Ukupni norizoprenoidi izračunati su kao suma koncentracija β -damaskenona i TDN-a. 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. Ukupni viši alkoholi izračunati su kao suma *i*-amil alkohola, 1-heksanola, *cis*-3-hexen-1-ola, 2-fenil etanola. Ukupne hlapive masne kiseline izračunate su kao suma kapronske, kaprilea i kaprinske kiseline. Računalna brada dobivenih kromatograma provedena je u programu Enhanced ChemStation (Agilent Technologies), a analiza rezultata u programu Microsoft Excel 2016.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovoga rada bio je utvrditi utjecaj ultrazvuka i dodataka antioksidansa na stabilnost polifenolnih spojeva i arome, odnosno istražiti utjecaj ove netoplinske tehnike na kvalitetu vina prilikom proizvodnje vina sa sniženim udjelom sumporovog dioksida.

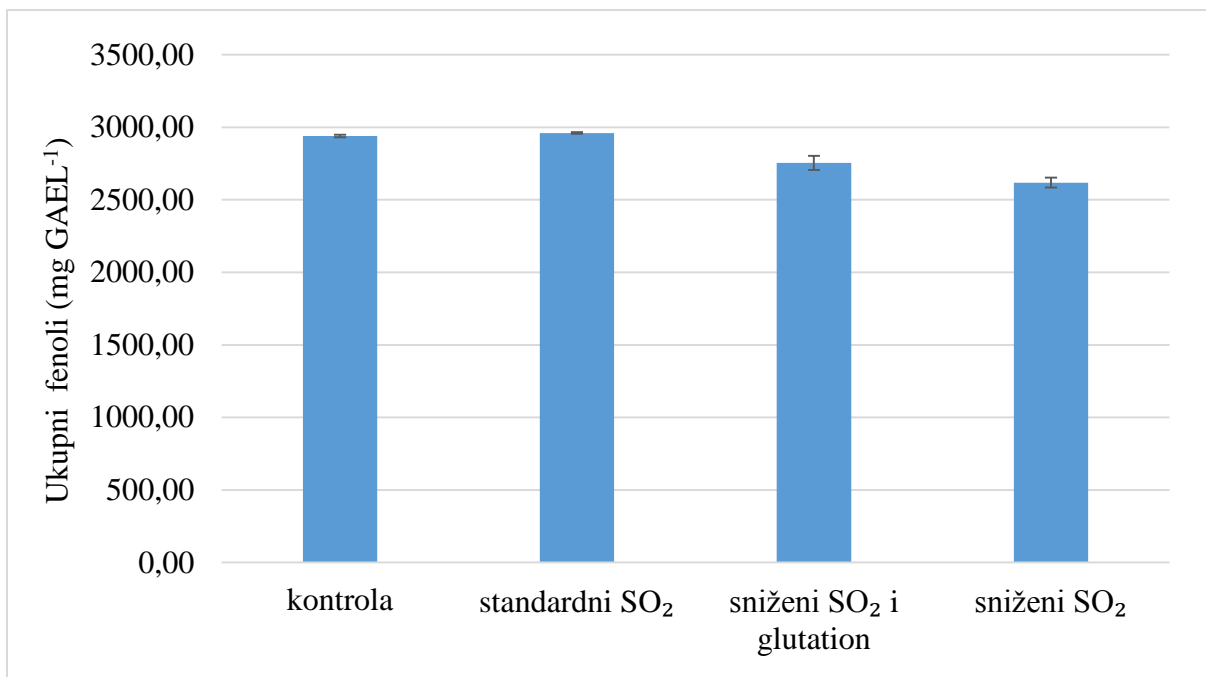
Crno vino Cabernet Sauvignon tretirano je ultrazvukom visokih snaga uz dodatak različitih koncentracija antioksidansa (sumporovog dioksida i glutaciona). Za tretman vina ultrazvukom korištena je ultrazvučna sonda promjera 25,4 mm i ultrazvučni procesor snage 700 W i 20 kHz (Qsonica Sonicators, Newtown, SAD). Tretiranja su izvršena pri amplitudi ultrazvučnog vala od 25 % i trajanju tretmana od 6 minuta. Na uzorcima je provedena spektrofotometrijska analiza koncentracije ukupnih fenola, tanina i antocijana, a dobiveni rezultati prikazani su na slikama 2-4. Sastav slobodnih antocijana određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i prikazan u tablici 3 i slikama 5-7. Analiza sastava arome provedena je plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME–GC/MS), a dobiveni rezultati prikazani su u tablici 3 te na slikama 8-12.

4.1. UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKIH SNAGA I DODATAKA ANTIOKSIDANSA NA SASTAV POLIFENOLIH SPOJEVA VINA

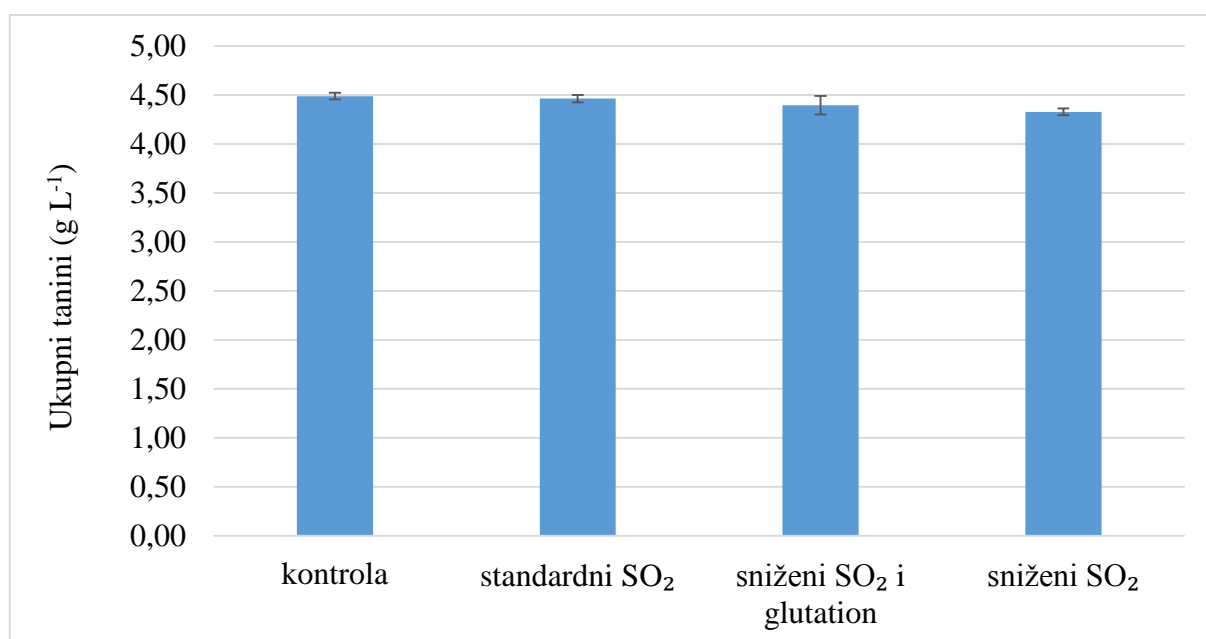
Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na sastav ukupnih fenola prikazan je na slici 2. Tretiranje ultrazvukom vina sa standardnom koncentracijom SO₂ nije utjecalo na promjene u sastavu ukupnih fenola, budući da usporedbom kontrolnog uzorka s navedenim tretiranim uzorkom nisu utvrđene značajne razlike. Nadalje, vino tretirano ultrazvukom sa sniženom koncentracijom SO₂ uz dodatak glutaciona pokazalo je tek neznatno nižu koncentraciju ukupnih fenola od kontrolnog uzorka, kao i tretiranog uzorka s standardnom koncentracijom SO₂, vjerojatno zbog činjenice da glutaciona ima sposobnost zaštite lako oksidiranih spojeva poput fenola smanjenjem potrošnje kisika (Kritzinger i sur., 2012). S druge strane, najniža koncentracija ukupnih fenola zapažena je u tretiranom vinu sa sniženom koncentracijom SO₂. Iz dobivenih rezultata jasno je vidljivo kako koncentracija SO₂ i glutaciona igra važnu ulogu prilikom tretiranja vina ultrazvukom pri čemu su dodani antioksidansi pokazali zaštitno djelovanje na sastav ukupnih fenola. Ranija istraživanja Tudose-Sandu-Ville i sur. (2012) te Coletta i sur. (2013) pokazala su kako ultrazvučni tretmani utječu na sastav fenolnih spojeva u crnom vinu i ubrzanje njegova starenja.

Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na sastav ukupnih tanina prikazan je na slici 3. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako nije došlo do značajnih razlika u koncentraciji kontrolnog uzorka s uzorkom sa standardnim SO₂, uzorkom sa sniženim SO₂ i glutationom i uzorkom sa sniženim SO₂. Ferraretto i Celotti (2016) u svom istraživanju postigli su najzanimljivije rezultate u sastavu flavanola. Analiza katehina pokazala je povećanje vrijednosti na svim uzorcima, jer je tretman potaknuo oslobađanje monomernih katehina iz tanina s različitim učincima na njihovu reaktivnost.

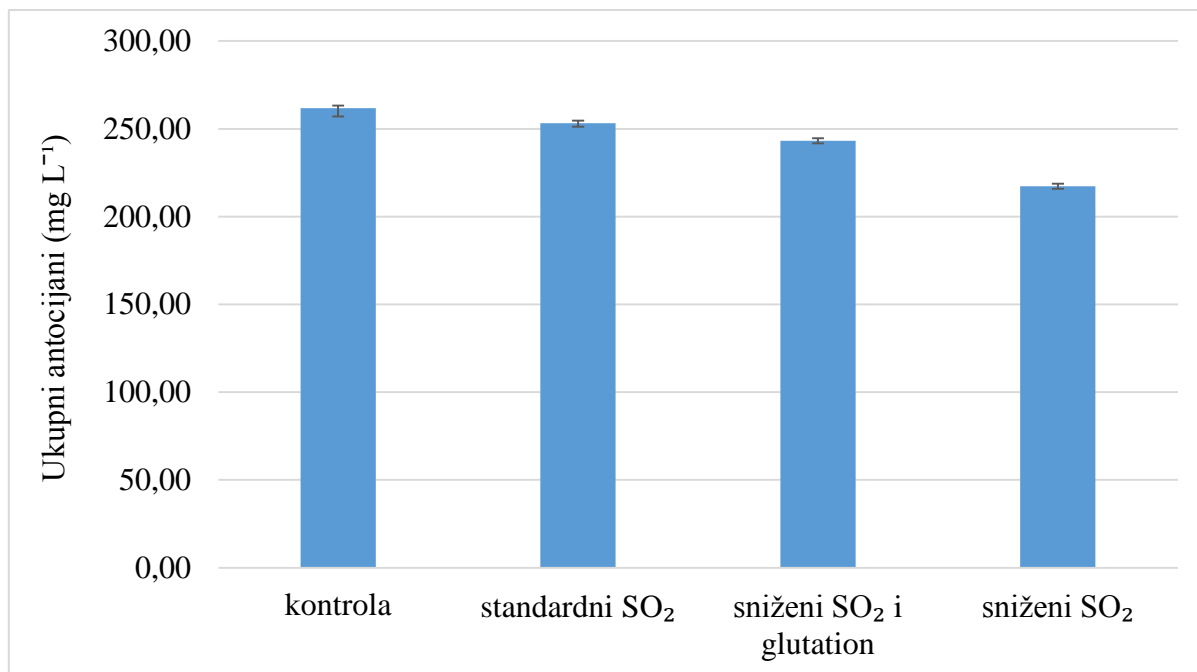
Na slici 4 prikazan je utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na sastav ukupnih antocijana, iz koje je vidljivo kako nije došlo do značajnog smanjenja koncentracije ukupnih antocijana. Usporedbom kontrolnog uzorka s uzorkom sa standardnim SO₂ pokazalo je neznatno nižu koncentraciju, dok uzorak sa sniženim SO₂ i glutationom, kao i uzorak sa sniženim SO₂ pokazuje malo veće odstupanje u koncentraciji u odnosu na kontrolni uzorak, što se slaže s ranijim istraživanjima Zhang i sur. (2016) te Ferraretto i Celotti (2016), gdje nije zabilježeno značajno smanjenje koncentracije antocijana, osim u tretmanima koji koriste visoku temperaturu.



Slika 2. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih fenola



Slika 3. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih tanina

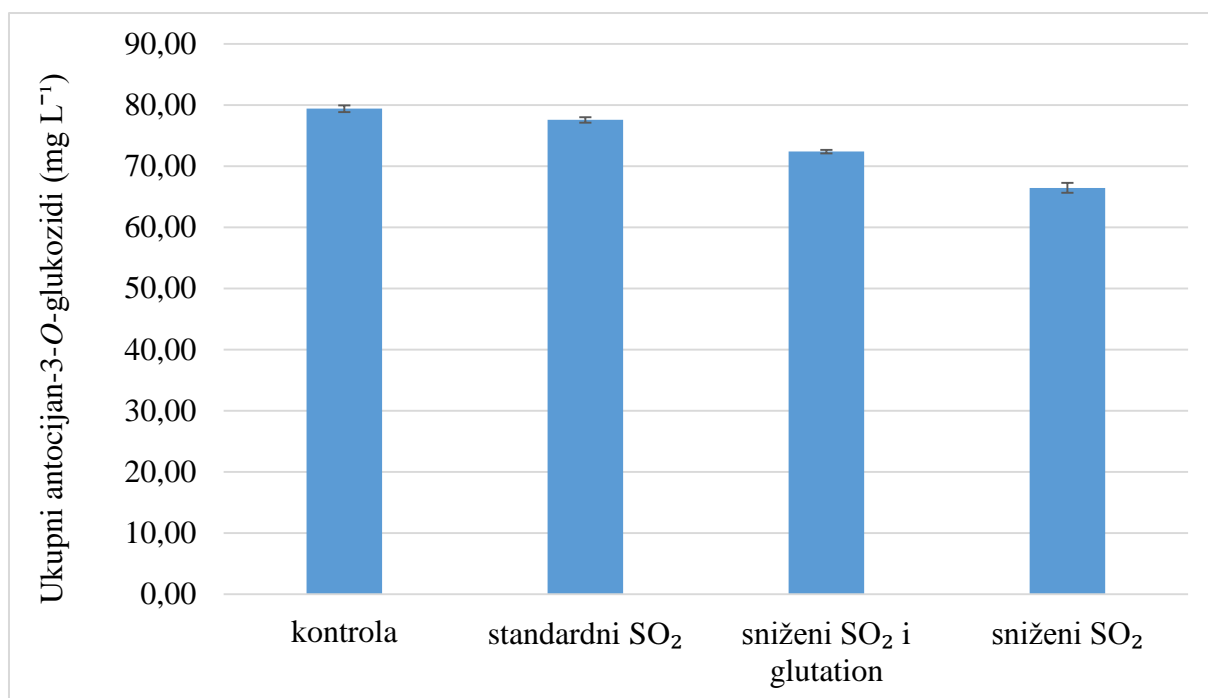


Slika 4. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih antocijana

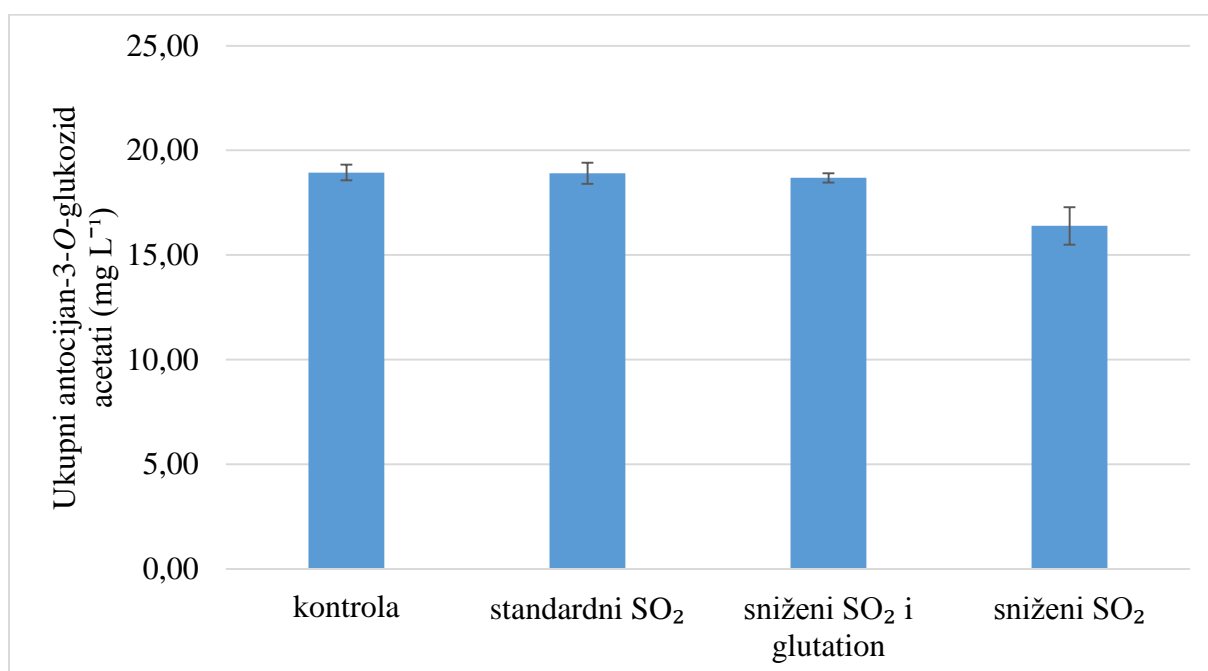
Tablica 3. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na koncentraciju slobodnih antocijana u vinu Cabernet Sauvignon

	UZORCI			
	kontrola	standardni SO ₂	sniženi SO ₂ i glutation	sniženi SO ₂
ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZIDI				
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	6,76 ± 0,40	6,61 ± 0,40	6,34 ± 0,55	4,10 ± 0,04
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,82 ± 0,24	1,52 ± 0,39	1,34 ± 0,13	1,09 ± 0,23
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	7,69 ± 0,99	6,24 ± 0,18	5,60 ± 0,72	3,89 ± 0,10
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	5,57 ± 0,28	5,43 ± 0,57	4,48 ± 0,89	3,66 ± 0,51
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	57,58 ± 0,13	57,80 ± 0,67	54,65 ± 0,00	53,73 ± 0,61
ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZID ACETATI				
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat	1,82 ± 0,01	1,79 ± 0,04	1,71 ± 0,07	1,13 ± 0,04
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat	17,12 ± 0,39	17,12 ± 0,46	16,99 ± 1,15	15,26 ± 0,86
ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZID <i>p</i>-KUMURATI				
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	2,92 ± 0,07	2,85 ± 0,07	2,80 ± 0,29	2,08 ± 0,37
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	5,22 ± 0,72	5,03 ± 0,86	4,76 ± 0,36	4,19 ± 0,21

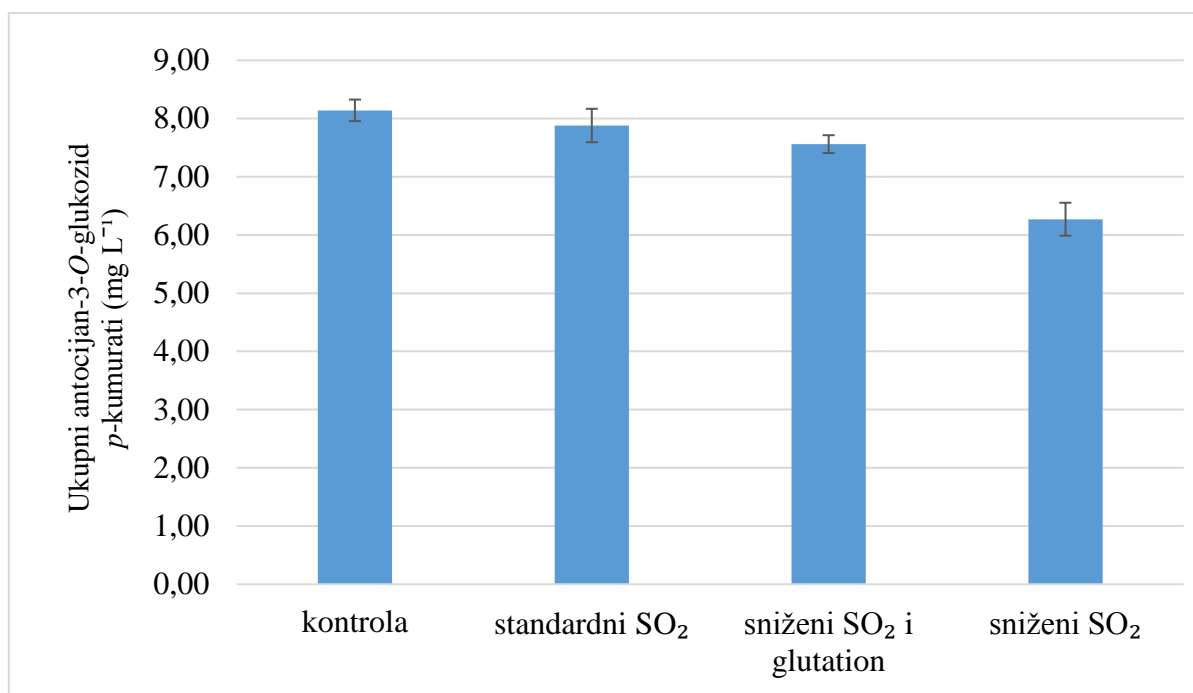
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija. Koncentracija spoja izražena je u mg L⁻¹.



Slika 5. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih antocijan-3-O-glukozida



Slika 6. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih antocijan-3-O-glukozid acetata



Slika 7. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih antocijan-3-O-glukozid *p*-kumurata

U tablici 3 prikazani su pojedinačni spojevi antocijan-3-O-glukozida, gdje je uočeno da delfinidin-3-O-glukozid, u odnosu na kontrolni uzorak koji iznosi $6,76 \pm 0,40$ ne pokazuje značajne promjene u koncentraciji u odnosu na uzorak sa standardnim SO₂ i uzorak sa sniženim SO₂ i glutationom, dok je u uzorku sa sniženim SO₂ uočen nešto veći pad, te njegova koncentracija iznosi $4,10 \pm 0,04$. Cijanidin-3-O-glukozid u odnosu na kontrolni uzorak ne pokazuje veliko odstupanje u uzorku sa standardnim SO₂, ali je u uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom te uzorku sa sniženim SO₂ uočen pad koncentracije. Petunidin-3-O-glukozid kao jedan od spojeva antocijan-3-O-glukozida pokazuje najveći pad koncentracije u odnosu na kontrolni uzorak koji iznosi $7,69 \pm 0,99$, a najveći pad uočen je kod uzorka sa sniženim SO₂ koji iznosi $3,89 \pm 0,10$. Peonidin-3-O-glukozid i malvidin-3-O-glukozid su slično reagirali na djelovanje ultrazvukom visokih snaga i dodatkom antioksidansa, jer se u oba spoja koncentracija u odnosu na kontrolni uzorak neznačajno promijenila u uzorku sa standardnim SO₂, dok se u uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom i uzorku sa sniženim SO₂ blago smanjila. Također, uočavamo da je i malvidin-3-O-glukozid najdominantniji slobodni antocijani, što se slaže sa istraživanjem Čurko i sur. (2017) gdje su tretirali tri uzorka crnog vina: Cabernet Sauvignon, Merlot i Plavac mali. Rezultati su kao i u našem istraživanju potvrdili da je

najzastupljeniji slobodni antocijan malvidin-3-*O*-glukozid u svim uzorcima vina (Ćurko i sur., 2017).

Na slici 5 koja prikazuje utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih slobodnih antocijan-3-*O*-glukozida. Koncentracija slična onoj kod kontrolnog uzorka utvrđena je u tretiranom uzorku sa standardnim SO₂, dok se kod uzorka sa sniženim SO₂ i glutacionom te uzorka sa sniženim SO₂ koncentracija blago smanjila.

Nadalje, sastav peonidin-3-*O*-glukozid acetata (tablica 3) pokazuje neznačajno odstupanje u koncentraciji u uzorku sa standardnim SO₂ i uzorku sa sniženim SO₂ i glutacionom u usporedbi sa kontrolnim uzorkom, dok je kod uzorka sa sniženim SO₂ uočen pad. S druge strane, kod malvidin-3-*O*-glukozid acetata uočena je slična koncentracija kontrolnog uzorka i uzorka sa standardnim SO₂, dok je kod uzorka sa sniženim SO₂ i glutacionom i uzorka sa sniženim SO₂ uočen blagi pad u koncentraciji u odnosu na kontrolni uzorak.

Na slici 6 koja prikazuje utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid acetata vidljivo je da uzorak sa standardnim SO₂ i uzorak sa sniženim SO₂ i glutacionom ne pokazuje značajne promjene u koncentraciji u odnosu na kontrolni uzorak, dok je pad koncentracije vidljiv kod uzorka sa sniženim SO₂.

Pojedinačni antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarati: peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat prikazani su u tablici 3. Peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat u odnosu na kontrolni uzorak nije pokazao velike promjene u koncentraciji kod uzorka sa standardnim SO₂, dok je kod uzorka sa sniženim SO₂ i glutacionom i uzorka sa sniženim SO₂ uočen blagi pad. Malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarat nije pokazao značajno velike promjene u koncentraciji u uzorku sa standardnim SO₂ u odnosu na kontrolni uzorak, ali kod uzorka sa sniženim SO₂ i glutacionom i uzorku sa sniženim SO₂ vidljiv je blagi pad koncentracije.

Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarata grafički je prikazan na slici 7, gdje je od uzorka sa sniženim SO₂ i glutacionom i uzorka sa sniženim SO₂ uočen pad koncentracije u odnosu na kontrolni uzorak, dok je koncentracija uzorka sa standardnim SO₂ slična kontrolnom uzorku. Slične rezultate dobili su Ferraretto i Celotti, u njihovom istraživanju nakon tretmana nije utvrđen negativan utjecaj na sastav na slobodnih antocijane, čime je potvrđena njihova kemijska stabilnost u uvjetima primjene tretmana. Stabilnost slobodnih antocijana vrlo je važna jer mogu djelovati kao kopolimeri s taninima (Ferraretto i Celotti, 2016).

4.2. UTJECAJ ULTRAZVUKA VISOKOG INTEZITETA I DODATAKA ANTIOKSIDANSA NA SASTAV HLAPIVIH SPOJEVA VINA

Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na koncentraciju hlapivih spojeva u vinu Cabernet Sauvignon prikazan je u tablici 4.

U sastavu norizoprenoida TDN-a, u odnosu na kontrolni uzorak utvrđen je pad koncentracije u uzorku sa standardnim SO₂, uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom te uzorku sa sniženim SO₂. Također, u sastavu drugog analiziranog norizoprenoida β-damaskenona u odnosu na kontrolni uzorak utvrđena je neznatno niža koncentracija u sva tri tretirana uzorka, odnosno redom u uzorku sa standardnim SO₂, kao i kod uzorka sa sniženim SO₂ i glutationom i uzorka sa sniženim SO₂.

Na slici 8 koja prikazuje utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih norizoprenoida vidljiv je pad koncentracije kod sva tri uzorka u odnosu na kontrolni, gdje uočavamo najveći pad kod uzorka sa sniženim SO₂.

Etil butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat te etil dekanoat kao pojedinačni spojevi etilnih estera slično su reagirali na tretman ultrazvukom visokih snaga i dodatkom antioksidansa, kod sva četiri spoja, koncentracija u odnosu na kontrolni uzorak kod uzorka sa standardnim SO₂ ostala je ista, neznčajno se promijenila u uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom, te se blago smanjila u uzorku sa sniženim SO₂. S druge strane, u sastavu dietil sukcinata u odnosu na kontrolni uzorak uočen je izraženiji pad koncentracije kod sva tri tretirana uzorka, a najviše u uzorku sa sniženim SO₂.

Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih etilnih estera prikazan je grafički na slici 9. Sniženje koncentracije u odnosu na kontrolni uzorak utvrđeno je u uzorku sa standardnim SO₂, uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom, a najveći pad je uočen kod uzorka sa sniženim SO₂.

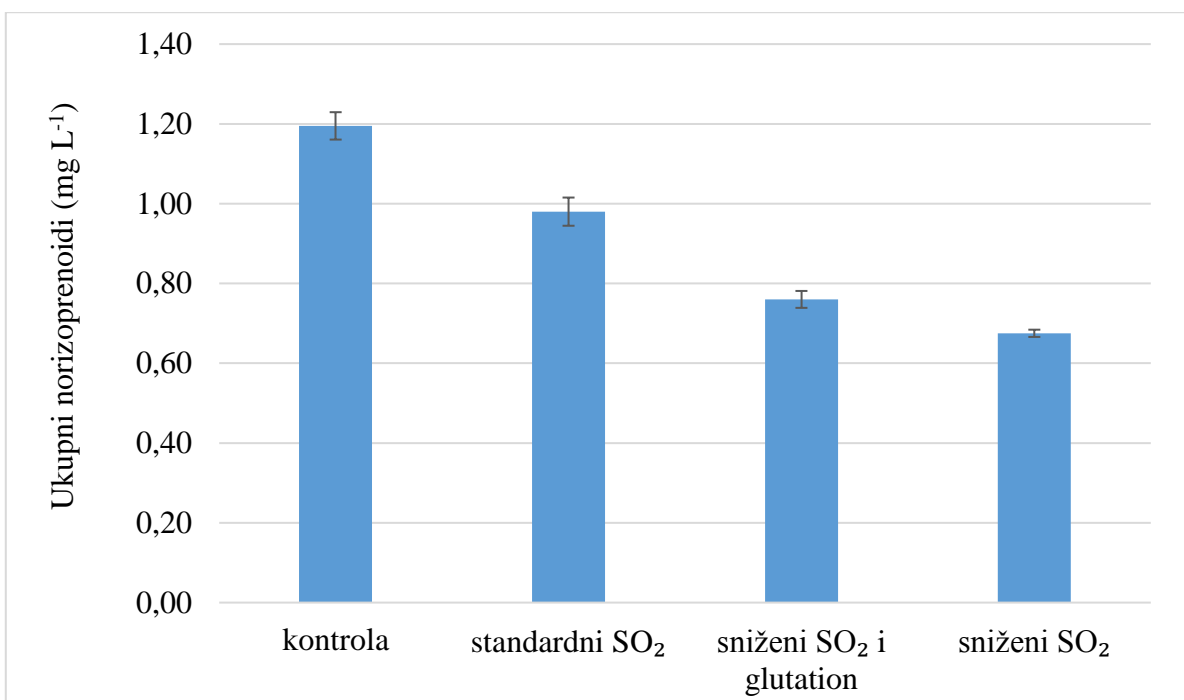
Sličan trend ranije zamijećen u sastavu etilnih estera utvrđen je i u sastavu pojedinačnih acetatnih estera: etil acetat, *i*-butil acetat, *i*-amil acetat. Naime, kod navedenih spojeva uočeno je sniženje u uzorku sa standardnim SO₂, uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom te uzorku sa sniženim SO₂ u odnosu na kontrolni uzorak. S druge strane, u sastavu 2-feniletil acetata, u odnosu na kontrolni uzorak nisu uočene promjene u koncentraciji u sva tri tretirana uzorka.

Slika 10 prikazuje utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih acetatnih estera, gdje je, u odnosu na kontrolni uzorak, vidljiv pad koncentracije u tretiranom uzorku sa standardnim SO₂, uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom te uzorka sa sniženim SO₂. Dobiveni rezultati u skladu su s ranijim istraživanjem Ćurko i sur. (2017).

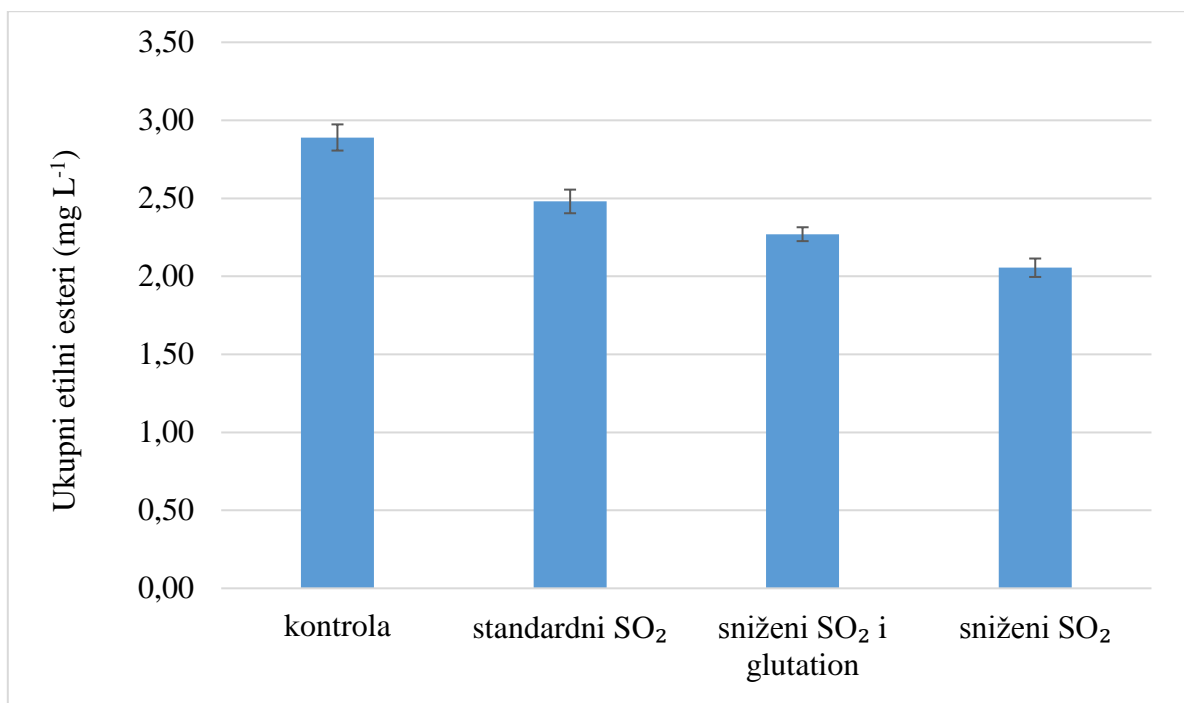
Tablica 4. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodatka antioksidansa na koncentraciju hlapivih spojeva u vinu Cabernet Sauvignon

	UZORCI			
	kontrola	standardni SO₂	sniženi SO₂ i glutation	sniženi SO₂
NORIZOPRENOIDI				
TDN**	0,50 ± 0,04	0,36 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,13 ± 0,01
β-Damaskenon**	0,70 ± 0,01	0,62 ± 0,02	0,55 ± 0,00	0,55 ± 0,00
ETILNI ESTERI				
Etil butanoat*	0,38 ± 0,04	0,38 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,27 ± 0,03
Etil heksanoat*	0,37 ± 0,01	0,35 ± 0,03	0,29 ± 0,00	0,20 ± 0,01
Etil oktanoat*	0,16 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Etil dekanat*	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Dietil sukcinat*	1,95 ± 0,03	1,60 ± 0,03	1,54 ± 0,01	1,52 ± 0,00
ACETATNI ESTERI				
Etil acetat*	53,05 ± 0,13	47,41 ± 0,62	44,51 ± 0,51	41,97 ± 0,52
<i>i</i> -Butil acetat**	37,00 ± 0,67	32,24 ± 0,29	31,96 ± 1,09	28,07 ± 1,06
<i>i</i> -Amil acetat*	0,39 ± 0,03	0,37 ± 0,06	0,32 ± 0,01	0,25 ± 0,02
2-Feniletal acetat*	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
VIŠI ALKOHOLI				
<i>i</i> -Amil alkohol*	253,11 ± 2,18	250,61 ± 0,18	246,62 ± 1,95	241,04 ± 3,68
1-Heksanol*	2,42 ± 0,06	2,27 ± 0,08	2,25 ± 0,13	2,13 ± 0,01
<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol**	123,16 ± 0,55	116,58 ± 2,39	107,74 ± 1,35	106,05 ± 0,98
2-Fenil etanol*	20,14 ± 2,95	17,72 ± 0,70	15,02 ± 1,00	13,85 ± 0,04
HLAPIVE MASNE KISELINE				
Kaprinska kiselina*	0,82 ± 0,04	0,80 ± 0,02	0,71 ± 0,02	0,64 ± 0,04
Kaprilna kiselina*	1,12 ± 0,08	1,05 ± 0,01	0,90 ± 0,02	0,84 ± 0,03
Kaprinska kiselina*	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01

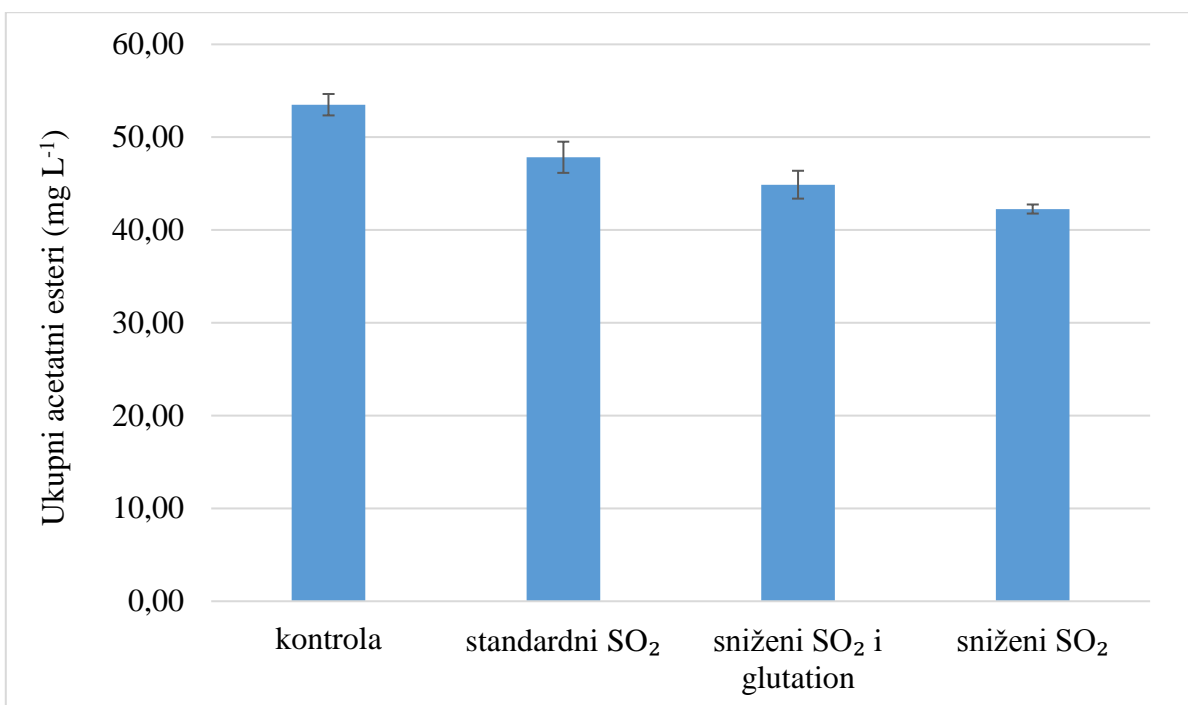
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija.
* Koncentracija spoja izražena u mg L⁻¹. ** Koncentracija spoja izražena u µg L⁻¹.



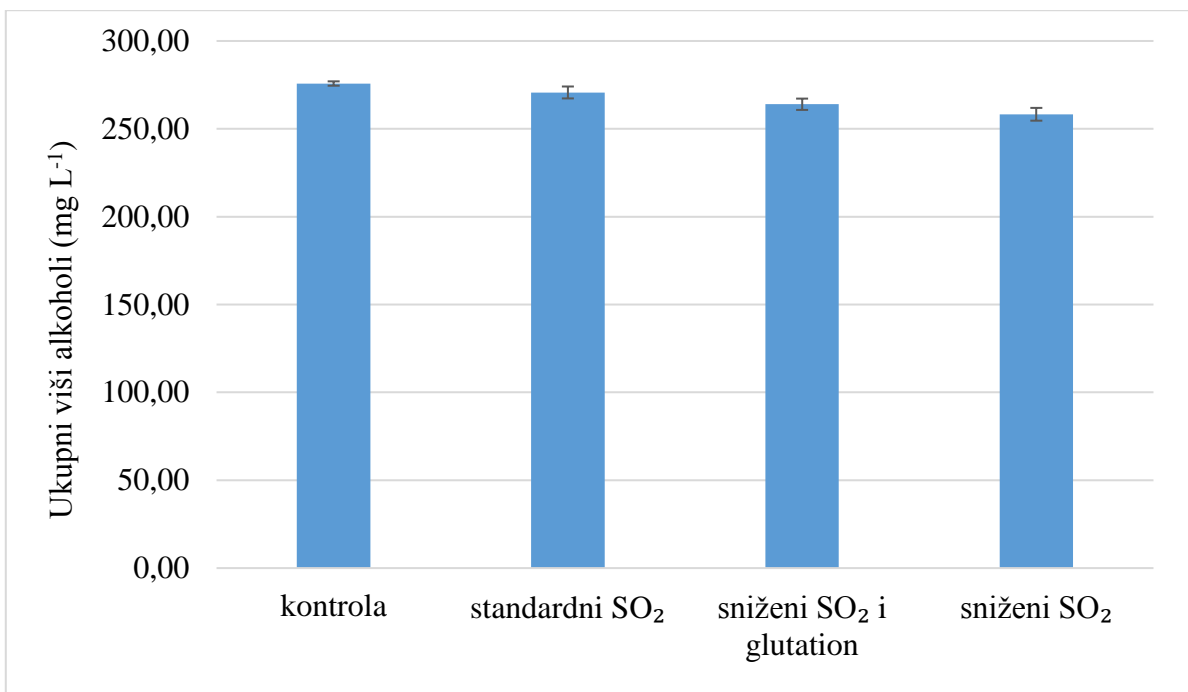
Slika 8. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih norizoprenoida



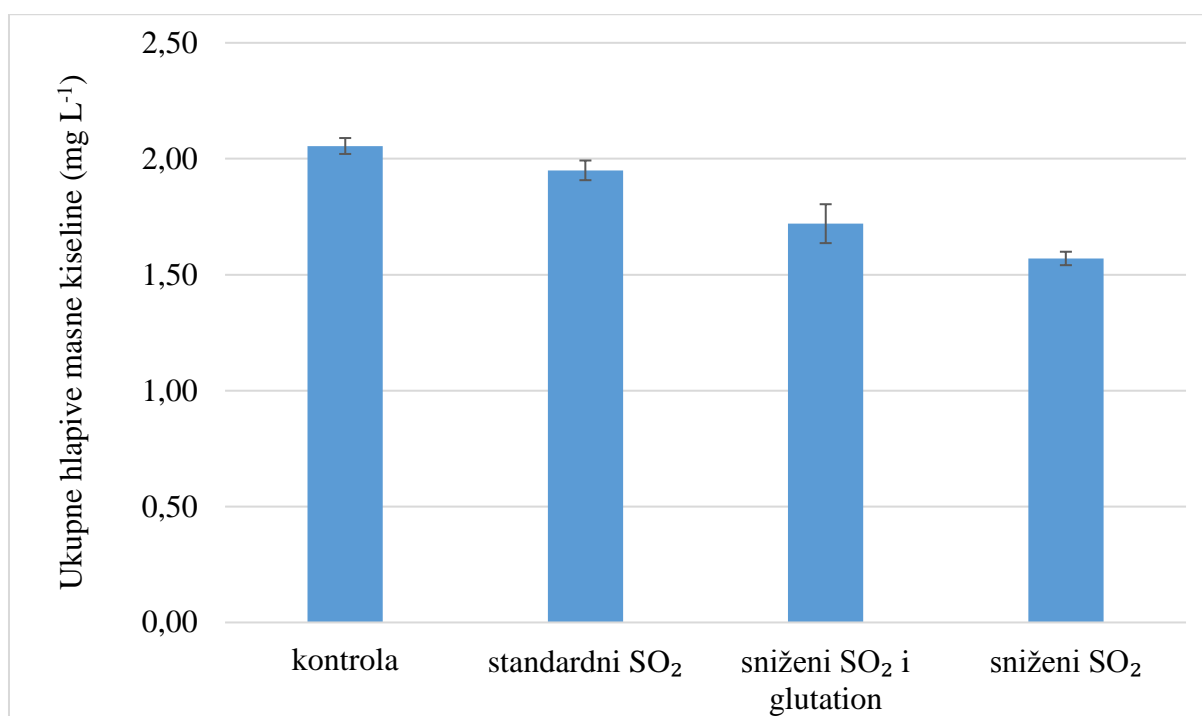
Slika 9. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih etilnih estera



Slika 10. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih acetatnih estera



Slika 11. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih viših alkohola



Slika 12. Utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih hlapivih masnih kiselina

U sastavu viših alkohola kod *i*-amil alkohola u odnosu na kontrolni uzorak utvrđen je neznačajan pad koncentracije u uzorku sa standardnim SO₂, uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom te uzorku sa sniženim SO₂. Također kod ostala tri viša alkohola: 1-heksanol, *cis*-3-heksen-1-ol i 2-fenil etanol došlo je do blagog pada koncentracije u odnosu na kontrolni uzorak, dok je najveći pad u odnosu na kontrolni uzorak uočen kod uzorka sa sniženim SO₂.

Na slici 11 prikazan je utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih viših alkohola, gdje je u odnosu na kontrolni uzorak utvrđen neznačajan pad koncentracije uzorka sa standardnim SO₂, uzorka sa sniženim SO₂ i glutationom i uzorka sa sniženim SO₂.

U sastavu hlapivih masnih kiselina, kod kapronske kiseline i kaprilne kiseline uočeni su slični trendovi. Naime, oba spoja u odnosu na kontrolni uzorak pokazuje blagi pad koncentracije u uzorku sa standardnim SO₂, uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom i uzorku sa sniženim SO₂. Suprotno, u sastavu kaprinske kiseline nisu utvrđene značajnije razlike između kontrolnog uzorka i tretiranih uzoraka.

Na slici 12 prikazan je utjecaj ultrazvuka visokih snaga i dodataka antioksidansa na koncentraciju ukupnih hlapivih masnih kiselina, gdje su u odnosu na kontrolni uzorak uočene blago niže koncentracije u uzorku sa standardnim SO₂, dok je sniženje koncentracije bilo izraženije u uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom, kao i u uzorku sa sniženim SO₂.

Iz svih navedenih rezultata može se zaključiti da su u usporedbi sa kontrolnim uzorcima, najmanje promjene u sastavu hlapivih spojeva utvrđene u tretiranim uzorcima sa standardnim udjelom SO₂. S druge strane, nešto niže koncentracije analiziranih spojeva utvrđene su u uzorcima sa sniženim SO₂ i glutationom, dok su u uzorcima sa sniženim udjelom SO₂ utvrđene najniže koncentracije. Dobiveni rezultati pokazuje kako dodatak antioksidansa tijekom tretiranja vina igra ključnu ulogu na sastav hlapivih spojeva vina.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1. Tretman ultrazvukom visokih snaga (20 %, 20 kHz, 25 °C, 6 min) u crnom vinu blago je utjecao je smanjenje koncentracije ukupnih fenola, ukupnih i slobodnih antocijana, pri čemu je najveća promjena uočena kod uzorka sa sniženim SO₂ i uzorka sa sniženim SO₂ uz dodatak glutaciona, dok između kontrolnog uzorka i uzorka sa standardnim SO₂ nisu utvrđene značajne razlike.
2. Primjena ultrazvuka visokih snaga nije značajnije utjecala na promjene u sastavu ukupnih tanina.
3. Tretman ultrazvukom visokih snaga u crnom vinu utjecao je na smanjenje koncentracije ukupnih norizoprenoida, etilnih i acetatnih estera te hlapivih masnih kiselina, gdje je u usporedbi s kontrolnim uzorkom utvrđeno smanjenje koncentracije u uzorku sa standardnim SO₂, a posebice u uzorku sa sniženim SO₂ i glutationom, kao i u uzorku sa sniženim SO₂.
4. Primjena ultrazvuka visokih snaga nije značajnije utjecala na promjene u sastavu ukupnih viših alkohola.
5. Koncentracija SO₂ i glutaciona igra važnu ulogu prilikom tretiranja vina ultrazvukom pri čemu su dodani antioksidansi pokazali zaštitno djelovanje na polifenolni sastav i aromu vina.

6. LITERATURA

Abramovic, H., Košmerl, T., Poklar Ulrih, N., Cigic, B. (2015) Contribution of SO₂ to antioxidant potential of white wine. *Food Chem.* **174**, 147–153.

Adachi, T., Nonogi, H., Fuke, T., Ikuzawa, M., Fujita, K., Izumi, T. (1979) On the combination of sulphite with food ingredients (aldehydes, ketones and sugars). *Z. Lebensm. Unters. For.* **168**, 200–205.

Álvarez-Pérez, J. M., Campo, E., San-Juan, F., Coque, J. J. R., Ferreira, V., Hernández-Orte, P. (2012) Sensory and chemical characterisation of the aroma of Prieto Picudo rosé wines: The differential role of autochthonous yeast strains on aroma profiles. *Food Chem.* **133**, 284-292.

Avakyants, S. P., Rastyannikov, E. G., Chernyaga, B. S. (1981) Khromato-mass spektrometricheskoe issledovanie. *Letuch. Vesnch. Vina.* **41**, 50-53.

Badea, G. A., Antoce, A. O. (2015) Glutathione as possible replacement of sulfur dioxide in winemaking technologies: a review. *Horticulture* **59**, 123-140.

Bayonove, C., Baumes, R., Crouzet, J., Gunata, Z. (1998) Aromes. U: Oenologie: Fondaments Scientifiques at technologiques, (Flanzy, C., ured.), Lavoisier, Paris, str. 163-235.

Bosiljkov T., Brnčić M., Tripalo B., Karlović S., Ukrainczyk M., Ježek D., Rimac Brnčić S. (2009) Impact of ultrasound-enhanced homogenization on physical properties of soybean milk. Proceedings of the 9th International Conference on Chemical & Process Engineering ICHEAP 9, Rome, str. 1029-1034

Brnčić M. (2006) Influence of ultrasound on properties of raw material for extrusion and finished extruded product. Doctoral thesis, University of Zagreb, Zagreb.

Brnčić M., Herceg Ljubić I., Šubarić D., Badanjak M., Rimac Brnčić S., Tripalo B., Ježek D., Cerovec P., Herceg Z. (2009a) Influence of power ultrasound on textural properties of corn starch gels. Proceedings of the 5th ISFRS-International Symposium on Food Rheology and Structure, Zürich, Switzerland.

Brnčić M., Markučić D., Omelić M., Tripalo B., Ježek D. (2009b) Use of low-intensity ultrasound for foreign bodies determination in food systems. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam.* **4**, 18-22.

- Cacciola, V., Batllò, I. F., Ferraretto, P., Vincenzi, S., Celotti, E. (2013) Study of the ultrasound effects on yeast lees lysis in winemaking. *Eur. Food Res. Technol.* **236**, 311-317.
- Carrieri, C., Milella, R. A., Incampo, F., Crupi, P., Antonacci, D., Semeraro, N., Colucci, M. (2013) Antithrombotic activity of twelve table grape varieties. Relationship with polyphenolic profile. *Food Chem.* **140**, 647–653.
- Cheyrier, V., Basire, N., Rigaud, J. (1989) Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 1069–1071.
- Cheyrier, V., Masson, G., Rigaud, J., Moutounet, M. (1993) Estimation of must oxidation during pressing in Champagne. *Amer. J. Enol. Vitic.* **44**, 393.
- Choi Y. J., McCharty K. L., McCharty M. J. (2002) Tomographic techniques for measuring fluid flow properties. *J. Food Sci.* **67**, 2718-2724.
- Coletta, A., Trani, A., Faccia, M., Punzi, R., Dipalmo, T., Crupi, P., Antonacci, D., Gambacorta, G. (2013). Influence of viticultural practices and winemaking technologies on phenolic composition and sensory characteristics of Negroamaro red wines. *Int. J. Food Sci. Tech.* **48**, 2215-2227.
- Ćurko, N., Kelšin, K., Režek Jambrak, A., Tomašević, M., Gracin, L., Poturica, V., Ružman, E., Kovačević Ganić, K. (2017) The effect of high power ultrasound on phenolic composition, chromatic characteristics, and aroma compounds of red wines. *Croat. J. Food Sci. Technol.* **9**, 136–144.
- Danilewicz, J. C., Wallbridge, P. J. (2010) Further studies on the mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfite in wine. *Amer. J. Enol. Vitic.* **61**, 166–175.
- De Barros Lopes, M. A., Braowsky, E. J., Preoris, I. S. (2005) The application of gene technology in the wine industry. U: Handbook of Food Science (Hui, H. Y., ured.) Marcel Dekker Inc., New York, str. 40.1-40.21.
- Dipalmo, T., Crupi, P., Pati, S., Clodoveo, M.L., Di Luccia, A. (2016) Studying the evolution of anthocyanin-derived pigments in a typical red wine of Southern Italy to assess its resistance to aging. *LWT – Food Sci. Tech.* **71**, 1-9.

Dolatowski Z. J., Stadnik J., Stasiak D. (2007) Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **6**, 89-99.

Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J., Ferreira, V. (2002) Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chem.* **77**, 325-331.

Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C. (2006) Determination of the phenolic composition of sherry and table white wines by liquid chromatography and their relation with antioxidant activity. *Anal. Chim. Acta.* **563**, 101-108.

Ferraretto, P., Cacciola, V., Ferran Batllò, I., Celotti, E. (2013) Ultrasounds application in winemaking: grape maceration and yeast lysis, *Ital. J. Food Sci.* **25**, 160–168.

Ferraretto, P., Celotti, E. (2016) Preliminary study of the effects of ultrasound on red wine polyphenols. *Cyta J. Food* **14**, 55–64.

Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C. (2007) Effect of SO₂ on the formation and evolution of volatile compounds in wines, *Food Control* **18**, 1501–1506.

Garrido, J., Borges, F. (2013) Wine and grape polyphenols-A chemical perspective. *Food Res. Int.* **54**, 1844–1858.

Gatto, P., Vrovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., Mattivi, F. Velasco, R. (2008) Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 11773-11785.

Herderich, M. i Smith, P. (2005) Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Aust. J. Grape Wine Res.* **11**, 205-214.

Jackson, R. S. (2008) Wine science: Principals and applications, 3. izd., Academic press Elsevier, Burlington.

Joscelyne-Louise, J. (2009) Consequences of extended maceration for red wine colour and phenolics. Doctoral thesis, The University of Adelaide, Adelaide.

Kennedy, J. A. (2008) Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Cien. Inv. Agr.* **35**, 107-120.

- Konczak, I., Zhang, W. (2004) Anthocyanins-more than nature colours. *J. Biomed. Biotech.* **5**, 239–240.
- Kritzinger, E. C., Bauer, F. F., Du Toit, W. J. (2012) Role of glutathione in winemaking: a review. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 269–277.
- Lambropoulos, I., Roussis, I. G. (2006) Inhibition of the decrease of volatile esters and terpenes during storage of a white wine and a model wine medium by caffeic acid and gallic acid. *Food Res. Int.* **40**, 176–181.
- Leadley, C. E., Williams, A. (2006) Pulsed electric field processing, power ultrasound and other emerging technologies. U: Food processing handbook, (Brennan, J.G., ured.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 214-232.
- 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.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990) Fruit Phenolics, 1. izd., CRC Press, Boca Raton.
- 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.
- Masuzawa, N., Ohdaira, E., Ide, M. (2000) Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Jpn. J. App.Phys.* **39**, 2978– 2979.
- Mazza, G., Miniati, E. (1993) Anthocyanins in fruits, vegetables and grains, 2. izd., CRC Press, Boca Raton.
- McClements, D. J. (1995) Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing, *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 293-299.
- Minussi, R. C., Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., Durán, N. (2003) Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem.* **82**, 409-416.

- Monagas, M., Bartolome', B., Gomez-Cordoves, C. (2005) Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **45**, 85-118.
- Montealegre, P. R., Peces, R. R., Vozmediano, J. L. C., Gascueña, J. M., Romero, G. (2006) Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Comp. Anal.* **19**, 687–693.
- Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J.C., Câmara, J.S. (2007) Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chem.* **105**, 204-214.
- Patist, A., Bates D. (2008) Ultrasonics innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **9**, 147-154.
- Pichler, A. (2017) Osnove tehnologije vina. *Nastavni materijali*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.
- Piljac, J., Martinez, S., Valek, L., Stipčević, T., Ganić, K. K. (2005) A comparison of methods used to define the phenolic content and antioxidant activity of Croatian wines. *Food Technol. Biotech.* **42**, 271-276.
- Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., Tata V., Casini, A.F., (2003) The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1499-1503.
- Rapp, A., Mandery, H. (1986) Wine aroma. *Experientia* **42**, 873-884.
- Ribéreau-Gayon, P. and Stonestreet, E. (1965) Determination of Anthocyanins in Red Wine. *Bulletin de la Societe Chimique de France* **9**, 2649-2652.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdiou, D. (2006) Handbook of Enology Volume 2, The Chemistry of wine stabilization and treatments, 2. izd., John Wiley & Sons, Chichester.
- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Le dosage des tannins du vin rouge et la détermination de leur structure. *Chim. Anal.* **48**, 188-196.
- Saucier, C. T., Waterhouse, A. L. (1999) Synergetic activity of catechin and other antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 4491–4494.

- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144–158.
- Somers, T. C., Evans, M. E. (1979) Grape pigment phenomena: interpretation of major colour losses during vinification. *J. Sci. Food Agr.* **30**, 623-633.
- Swiegers, J., Bartowsky, E., Henschke, P., Pretorius, I. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J Grape Wine Res.* **11**, 139-173.
- Tedjo, W., Taiwo, K. A., Eshtiaghi, M. N., Knorr, D. (2002). Comparison of pretreatment methods on water and solid diffusion kinetics of osmotically dehydrated mangos. *J. Food Eng.* **53**, 133-142.
- Tomašević, M., Gracin, L., Čurko, N., Kovačević Ganić, K. (2017) Impact of pre-fermentative maceration and yeast strain along with glutathione and SO₂ additions on the aroma of *Vitis vinifera* L. Pošip wine and its evaluation during bottle aging. *LWT - Food Sci. Technol.* **81**, 67-76.
- Tudose-Sandu-Ville, Ș., Cotea, V. V., Colibaba, C., Nechita, B., Niculaua, M., Codreanu, M. (2012) Phenolic Compounds in Merlot Wines Obtained Through Different Technologies in Iași Vineyard, Romania. *Cercetari agronomice in Moldova* **45**, 89-98.
- Ugliano, M., Bratowsky, E. J., McCarthy, J., Moio, L., Henschke, P. A. (2006) Hydrolysis and transformation of grape glycosidically bound volatile compounds during fermentation with three *Saccharomyces* yeast strains. *J Agri. Food Chem.* **54**, 6322-6331.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C. (2006) The antioxidant activity of wines determined by the ABTS method: influence of sample dilution and time. *Talanta* **64**, 501-509.
- Vivas, N., Saint Cricq De Gaulejac, N., Glories, Y. (1997) Influence of SO₂ and ascorbic acid on the scavenger effect of tannins, measured on superoxide anion. Application to red wines. *Vitis* **36**, 91–96.
- Walker, R. (1985) Sulphiting agents in foods: Some risk/benefit considerations. *Food Addit. Contam.* **2**, 5–24.

Zhang, Q. A., Shen, Y., Fan, X.-H., García Martín, J. F. (2016) Preliminary study of the effect of ultrasound on physicochemical properties of red wine. *CyTA – J. Food* **14**, 55-64.

Zheng, X., Zhang, M., Fang, Z., Liu, Y. (2014) Effects of low frequency ultrasonic treatment on the maturation of steeped greengage wine. *Food Chem.* **162**, 264-269.

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.

Rahela Krajenić
