

# Antioksidacijska svojstva i stabilnost boje crvenog piva, ružičastog vina i ružičastog pjenušca

---

Šipalo, Toni

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

*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:159:693824>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-01**



*Repository / Repozitorij:*

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija

TONI ŠIPALO  
6507/BT

ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA I STABILNOST BOJE  
CRVENOG PIVA, RUŽIČASTOG VINA I RUŽIČASTOG  
PJENUŠCA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Biotehnologija 2  
Mentor: izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan

Zagreb, 2016.

Završni rad je izrađen u Laboratoriju za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sunčice Beluhan

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Biotehnologija  
Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo,  
industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva

### ANTIOKSIDACIJSKA SVOJSTVA I STABILNOST BOJE CRVENOG PIVA, RUŽIČASTOG VINA I RUŽIČASTOG PJENUŠCA

TONI ŠIPALO, 6507/BT

**Sažetak:** Biološki aktivne supstancije u pivu i vinu, posebice fenoli, zbog antioksidacijske aktivnosti smanjuju rizik za oboljenje od sve učestalijih kroničnih bolesti. Udjel fenolnih spojeva jedan je od najvažnijih parametara sastava, kako piva, tako i vina, budući da doprinose njihovim organoleptičkim svojstvima, kao što su boja, trpkost i gorčina. U ovom su radu uspoređena antioksidacijska svojstva Istarskog crvenog piva, ružičastog vina i ružičastog pjenušca primjenom različitih testova: određivanja udjela polifenola, sposobnosti vezanja slobodnih radikala (DPPH), redukcijske snage i određivanja stabilnosti boje piva, vina i pjenušca. Udjel ukupnih polifenola bio je veći u pivu nego u ružičastom vinu i pjenušcu. Veća koncentracija galne kiseline i (+)-katehina u pivu objašnjava bolji izbor piva kao dodatka prehrani zbog veće antioksidacijske aktivnosti nego što ju ima ružičasto vino. Nadalje, dokazana je razlika u kromatskim svojstvima između crvenog piva, ružičastog vina i ružičastog pjenušca tijekom osam tjedana skladištenja.

**Ključne riječi:** antioksidacijska aktivnost, ukupni polifenoli, pivo, ružičasto vino, pjenušac, parametri boje

**Rad sadrži:** 41 stranicu, 9 slika, 9 tablica, 53 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *Izv. prof. dr. sc. Sunčica Beluhan*

**Završni rad predan:** lipanj 2016.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Final work**

**University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
Undergraduate studies Biotechnology  
Department of Biochemical engineering  
Laboratory for Biochemical Engineering,  
Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology**

### **ANTIOXIDATIVE PROPERTIES AND COLOR STABILITY IN RED BEER, ROŠE WINE AND ROŠE SPARKLING WINE**

**TONI ŠIPALO, 6507 /BT**

**Abstract:** The biologically active compounds in beer and wine, especially phenolics, are responsible for reduced risk of developing chronic diseases due to their antioxidant activities. Phenolic compounds content are one of the most important quality parameters both of beers and wines, since they contribute to organoleptic characteristics such as colour, astringency, and bitterness. In this work, the antioxidant properties of Istrian red beer, roše wine and rošè sparkling wine have been compared using a range of assays: total polyphenol content, free radical scavenging ability (DPPH), reducing power and beer or wine colour stability. The content of total polyphenols was higher in beer than in roše wine and sparkling wine. The higher content of gallic acid and (+)-catechin in beer is a possible explanation of the marked antioxidant activity of diets supplemented with this beverage rather than with roše wine. The red beer, roše wine and rošè sparkling wine also showed differences in their chromatic characteristics according to the duration of their ageing in eight weeks.

**Keywords:** antioxidant activity, total polyphenols, beer, roše wine, sparkling wine, colour indexes

**Thesis contains:** 41 pages, 9 figures, 9 tables, 53 references

Original in: Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kaciceva 23, Zagreb

**Mentor:** *Sunčica Beluhan, PhD, Associate Professor*

**Final work delivered:** June, 2016

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO.....</b>	<b>2</b>
2.1. Pivo.....	2
2.2. Bioaktivni sastojci piva .....	2
2.3. Vino.....	5
2.4. Polifenoli u vinu .....	5
2.3 Utjecaj fenolnih sastojaka na boju vina.....	7
2.5. Francuski paradoks.....	8
2.6. Pjenušava vina.....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>11</b>
3.1. Ciljevi i tijek istraživanja .....	11
3.2. Materijali .....	14
3.2.1. Uzorci piva i vina .....	14
3.2.2. Reagensi za određivanje ukupnih polifenola.....	14
3.2.3. Reagensi za određivanje sposobnosti vezanja slobodnih radikala .....	14
3.2.4. Reagensi za određivanje reducirajuće snage .....	14
3.3. Aparati.....	15
3.4. Metode istraživanja .....	16
3.4.1. Određivanje kakvoće piva i vina .....	16
3.4.1.1. Kemijska određivanja kakvoće piva.....	16
3.4.1.1.1. Određivanje alkohola kemijskom metodom.....	16
3.4.1.1.2. Određivanje pravog ekstrakta.....	16
3.4.1.1.3. Određivanje sadržaja CO <sub>2</sub> .....	17
3.4.1.1.4. Određivanje udjela ukupnih kiselina .....	17
3.4.1.2. Kemijska određivanja kakvoće vina.....	18
3.4.1.2.1. Određivanje specifične gustoće vina .....	18
3.4.1.2.2. Određivanje udjela alkohola u vinu.....	18
3.4.1.2.3. Određivanje udjela ekstrakta u vinu .....	19
3.4.1.2.4. Određivanje ukupnih kiselina.....	19
3.4.1.2.5. Određivanje koncentracije šećera RS- metodom.....	20
3.4.1.2.6. Određivanje udjela SO <sub>2</sub> .....	21
3.4.2. Analitičke metode.....	22
3.4.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola .....	22

3.4.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom .....	22
3.4.2.3. Određivanje redukcijske snage .....	23
3.4.2.4. Određivanje intenziteta boje crvenog piva .....	23
3.4.2.5. Određivanje intenziteta boje ružičastog vina i pjenušca.....	24
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>26</b>
4.1. Kemijske analize piva .....	26
4.2. Kemijske analize vina i pjenušca .....	26
4.3. Antioksidacijska svojstva crvenog piva, ružičastog vina i pjenušca.....	27
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>33</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>36</b>
<b>7. LITERATURNI NAVODI.....</b>	<b>37</b>

## **1. UVOD**



## 1. Uvod

U javnosti je općenito mišljenje potrošača alkoholnih pića, uz naputke nutricionista, da je vino zdravije konzumirati nego pivo, zbog pozitivnog utjecaja na zdravlje, ukoliko se konzumira u razumnim količinama tijekom ili nakon obroka. Blagotvoran utjecaj na kardiovaskularni sustav te pretpostavljena antikancerogena svojstva vinu daju reputaciju čudotvornog pića (Wright i sur., 2008). Unatoč toj činjenici, istraživanja su pokazala da, u usporedbi s vinom, pivo sadrži puno više hranjivih sastojaka; vlakna, vitamine B kompleksa, izvrstan je izvor fitoestrogena i drugih sastojaka ekstrahiranih iz hmelja, a dobar je izvor spojeva s antioksidacijskim svojstvima (Bamforth, 2008).

Vina, posebice crvena i ružičasta, bogata su polifenolima, posebice flavan-3-olima, flavonolima, antocijanima, fenolnim kiselinama stilbenima i mnogim drugim polifenolima. Dokazano je da mnogi od ovih spojeva imaju višestruko povoljno djelovanje na ljudski organizam, a među njima su kardioprotektivna, protuupalna, antikancerogena, antiviralna i antibakterijska aktivnost (Santos-Buelga i Scalbert, 2000).

Pjenušava vina, proizvedena tradicionalnom metodom, imaju svoja specifična svojstva kao rezultat dvostruke fermentacije i dozrijevanju zajedno s kvascem u boci. Posebni postupci proizvodnje pjenušavih vina rezultiraju cijelom paletom različitih i jedinstvenih svojstava koja su zanimljiva sa znanstvenog, tehnološkog i ekonomskog gledišta. Svako od ovih vina ima različiti fizikalno-kemijski sastav, koji se odnosi i na fenolni profil. (Pozo-Bayón i sur., 2009).

Cilj ovog rada bio je, po prvi put, usporediti „neusporedivo“; antioksidacijska svojstva tri različita pića: crvenog piva, ružičastog vina i ružičastog pjenušca, jer je vino poznato kao izvrstan izvor sastojaka s antioksidacijskim svojstvima, pjenušac piće Bogova koje se ispija uz slane i slatke delicije, a pivo samo kao „piće uz roštilj i nogomet“, pa su stoga napravljena sljedeća određivanja:

- kemijskog sastava crvenog piva,
- kemijskog sastava ružičastog vina i pjenušca,
- stabilnosti i intenziteta boje piva tijekom skladištenja,
- udjela ukupnih polifenola u pivu, vinu i pjenušcu
- antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom,
- redukcijske snage istraživanih piva, vina i pjenušca.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## **2.1. Pivo**

Pivo je prvi put, vjerojatno slučajno, nastalo prije 8000 godina i od tada ga ljudi konzumiraju. Stoljećima je imalo važnu ulogu u različitim kulturama, kao sigurno piće u doba kada je čistoća vode bila upitna, a pića poput kave i čaja su bila još nepoznanica. Od uvijek je bilo prihvaćeno, ne samo kao osvježavajuće piće, već i kao tekući kruh, hranjivi izvor energije i piće koje poboljšava opće stanje organizma (Bamforth, 2000; Nelson, 2005). Različite studije dale su znanstvene potvrde da je pivo puno više od pića s niskim udjelom alkohola za ublažavanje žeđi. Objavljeni podaci upućuju na to da pivo sadrži širok sastav nutrijenata s bioaktivnim svojstvima. Ukoliko je konzumacija umjerena i odgovorna, može biti koristan dio prehrane, umanjiti rizik različitih bolesti i poboljšati opće stanje organizma. Međutim, pivo kao i svako alkoholno piće također može sadržavati neke sastojke sa potencijalno štetnim utjecajem. U slučaju piva, ti sastojci su biogeni amini, nitroamini, purini, gluten i sumporov dioksid. Oni mogu uzrokovati probleme, pogotovo kod pojedinaca s intolerancijom na gluten i gihtom. Kada govorimo o pivu kao dijelu prehrane, na nekoliko činjenica treba ukazati, a to su: korisno djelovanje piva, značenje umjerenosti u ispijanju, vrijednost piva u odnosu na druga alkoholna pića, potencijalne štetne tvari, i na kraju, perspektiva novih vrsta piva s novim organoleptičkim i funkcionalnim svojstvima.

## **2.2. Bioaktivni sastojci piva**

Pivo je veoma kompleksno piće. Osim vode, koja obično čini 90 % piva i oko 5% v/v etanola, pivo sadrži oko 800 organskih sastojaka, i mnogi od njih su biološki aktivni. Potencijalno korisni učinci na ljudsko tijelo dolaze od dva čimbenika; malog udjela alkohola i prisutnosti ostalih sastojaka, poput vitamina, minerala, elemenata u tragovima i antioksidanta. Najvažniji vitamini u pivu su vitamini B kompleksa. Mnoge studije (Van der Gaag i sur., 2000; Mennen i sur., 2003) su potvrdile da umjerena konzumacija piva može uzrokovati zamjetan porast koncentracije B vitamina u ljudskom tijelu (Tablica 1) (Bamforth, 2002).

**Tablica 1.** Sastav piva u usporedbi sa preporučenim dnevnim potrebama vitamina kod odraslih osoba (Bamforth, 2002)

Parametar	Dnevne potrebe odraslih osoba (25-50 godina starosti)		
	Muškarci	Žene	Količina u pivu (L)
Energija (kcal)	2550	1940	150-1100
Proteini (g)	63	50	3-5
Tiamin (mg)	1.5	1.1	0.003-0.08
Riboflavin (mg)	1.7	1.3	0.02-0.8
Niacin (mg)	19	15	3-8
Vitamin B <sub>6</sub> (mg)	2	1.6	0.07-1.7
Vitamin B <sub>9</sub> (μg)	200	180	40-600
Vitamin B <sub>12</sub> (μg)	2	2	3-30
Biotin (μg)	30-100	20-100	2-15

S nutricionističkog gledišta i stava da je pivo dio prehrane, najvažniji minerali su kalij, magnezij, natrij i fosfor (Buiatti, 2009; Leskošek-Čukalović, 2009). Bogato je kalijem i magnezijem, s niskim koncentracijama natrija i kalcija, te može biti bitan izvor fosfora, pa čak selena i silicija (Tablica 2).

**Tablica 2.** Mineralni sastav piva (Buiatti, 2009)

Mineral	Pivo (mg/L)	Mineral	Pivo (mg/L)
Kalij	200-600	Silikat	40-120
Natrij	10-100	Fosfat	260-995
Magnezij	60-250	Sulfat	60-300
Kalcij	20-160	Klorid	150-400
Željezo	0.01-0.3	Selenij	<0.0004–0.0072
Bakar	0.02-0.4	Olovo	<0.01–0.1
Cink	0.02-4.5	Fluor	0.09-0.2
Mangan	0.03-0.2	Kobalt	0.01-0.11

Pivo sadrži fenolne kiseline i flavonoide koji uglavnom potječu iz ječma i hmelja (*Humulus lupulus* L.). Postoje mnogi literaturni navodi koji određuju njihov udio u pivu.

Identificirano je 78 različitih fenolnih sastojaka uključujući jednostavne fenole, aromatske karboksilne i fenol karboksilne, poput antocijanina, kalkona, flavonola, flavan-3-ola, procijadina i izoflavona (Shahidi i Naczk, 2004; Gerhäuser i Becker, 2009; Mayer, 2009; Gorjanović i sur., 2010; Piazzon i sur., 2010). Antioksidacijski kapacitet piva ovisi o vrsti piva (Lugasi i Hóvári, 2003; Saura-Calixto i Goñi, 2006; Saura-Calixto i sur., 2009). Tamno pivo je inferiornije u svom antioksidacijskom kapacitetu prema kavi, crnom vinu i čaju, ali se može usporediti s ružičastim vinom (Tablica 3).

**Tablica 3.** Antioksidacijski kapacitet različitih pića (Saura-Calixto i sur., 2009)

Piće	FRAP ( $\mu\text{mol Trolox}/100 \text{ mL}$ )	ABTS ( $\mu\text{mol Trolox}/100 \text{ mL}$ )
Kava	2267 $\pm$ 18.9	1328 $\pm$ 5.1
Čaj	601 $\pm$ 5.5	631 $\pm$ 8.0
Crveno vino	1214 $\pm$ 24.5	1093 $\pm$ 54.2
Ružičasto vino	286 $\pm$ 39.2	261 $\pm$ 23.7
Bijelo vino	154 $\pm$ 36.8	181 $\pm$ 22.2
Narančin sok	515 $\pm$ 41.5	249 $\pm$ 3.4
Coca cola	20.7 $\pm$ 0.7	$\leq 10$
Lager pivo	139.6–149.5	220.0–305.6
Tamno pivo	278.8	259.0–536.5
Bezalkoholno pivo	75.6–91.2	155.8–175.3

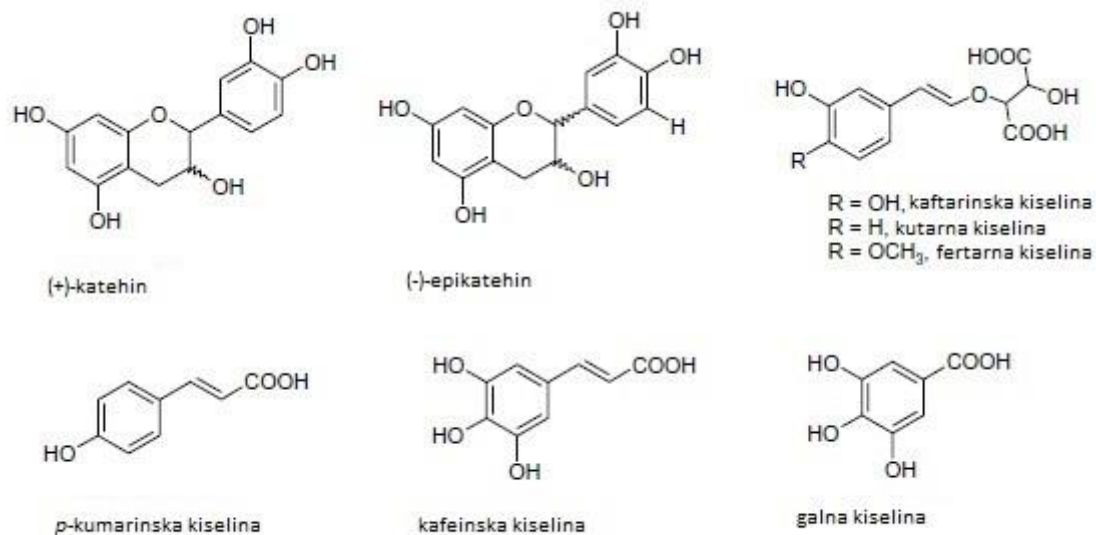
### 2.3. Vino

Tradicija uzgoja vinove loze i spravljanje njezinih plodova u vino poznata je već nekoliko tisuća godina, a pretpostavlja se da potječe iz Male Azije, kolijevke najstarijih civilizacija. I prije toga na našem ozemlju nailazimo na fosilne tragove koji su preteča loze, starosti više od 12 milijuna godina (Radoboj kod Krapine), i za koju se drži da pripada izumrlom rodu *Cissetes*, srodniku roda *Vitis*, kojem pripada vrsta *Vinifera*, tj. plemenita vinova loza. Slična otkrića pronalazimo u Istri, kao i nekim drugim mjestima u Hrvatskoj, pa je tako u Podvršju kraj Zadra nađeno više vrsta sjemenki grožđa starijih više od 3800 godina (Gašparec-Skočić, 2015).

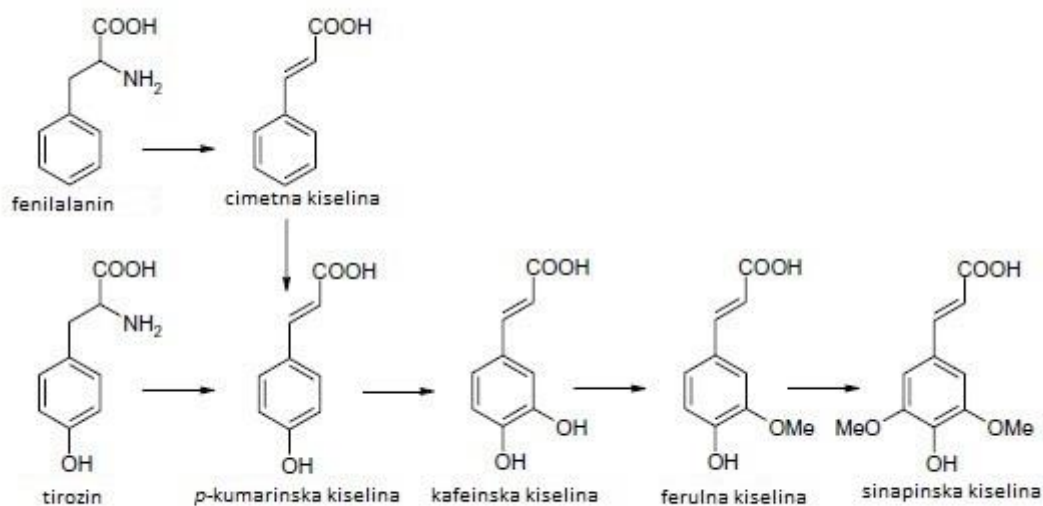
Tijekom brojnih srednjovjekovnih vojnih pohoda mnoge su poljoprivredne kulture bivale uništene te je po uspostavi mira valjalo krenuti iz početka, a posebno se to odnosilo upravo na uzgoj vinove loze. Proizvodnju su vina na sebe preuzeli redovnici, posebice od šestog stoljeća nadalje, kada su vinogradi uživali i kraljevsku zaštitu te je bilo protuzakonito uništavati nasade. Koliko je vinogradarstvo i vinarstvo bilo važno pokazuje primjer Luja XI, koji je zabranio uzgoj onih vrsta vinove loze koje daju loše vino. Vjerojatno je najznačajniji doprinos redovnika proizvodnji vina Dom Perignon, prvi šampanjac, nazvan po Benediktincu koji ga je proizveo. Redovnici su proizvodnjom vina dominirali gotovo tisuću godina, opravdavajući to činjenicom da je vino, uz kruh, ključni element euharistije, koji svoje podrijetlo vuče iz biblijskog opisa Kristove Posljednje večere ().

### 2.4. Polifenoli u vinu

Fenolni spojevi ili polifenoli predstavljaju jednu od najbrojnijih i najrasprostranjenijih skupina tvari u biljnom carstvu sa više od 8000 trenutno poznatih različitih vrsta fenolnih struktura (Harbone, 1980). Čajevi, uglavnom zeleni, crna vina, piva, i ostale prehrambene namirnice mogu imati vrlo kompleksni fenolni sastav (Haslam, 1996). Najčešće zastupljeni fenolni spojevi u biljkama pripadaju hidroksicimetnim kiselinama – *p*-kumarinska, kafeinska i ferulinska (Slika 1). Proizvod su sekundarnog metabolizma biljaka i nastaju biogenetički iz dva glavna primarna biosintetska puta: put shikiminske kiseline (Slika 2) i acetatnog puta. Njihova reaktivnost je posljedica kiselih svojstava fenola i nukleofilnih svojstava benzenskog prstena. Ovisno o njihovoj strukturi, polifenoli se dijele na neflavonoidne spojeve (stilbeni, hidroksicimetne kiseline i benzojeve kiseline) i flavonoidne spojeve (flavonoli, flavoni, flavanoli i izoflavoni).



**Slika 1.** Najčešće zastupljeni fenolni spojevi u biljkama (Paixao, 2007)



**Slika 2.** Biosintetski put fenolnih spojeva (put shikiminske kiseline) (Paixao i sur., 2007).

Pulpa grožđa sadrži uglavnom ne flavonoidne spojeve, dok se flavonoidni spojevi nalaze u kožici, sjemenkama i peteljka. Udjel fenolnih spojeva u vinima prvenstveno ovisi o sorti grožđa i čimbenicima koji utječu na dozrijevanje bobica, kao što su tlo, lokacija i vremenski uvjeti. Pojava ovih tvari u vinima nije samo posljedica njihove ekstrakcije iz grožđa tijekom proizvodnje vina. Prije početka alkoholne fermentacije kada se grožđe gnječi, dolazi do nekoliko kondenzacijskih reakcija koje obuhvaćaju neke od ovih molekula

(pogotovo antocijanine, katehine i procijadinine), rezultirajući stvaranjem novih polimernih pigmenata koji su odgovorni za promjenu boje vina.

Masena spektrometrija ima veoma važnu ulogu u istraživanjima i kontroli kvalitete na području vinogradarstva i enologije. Analitička sposobnost MS-a je relevantna za strukturalna istraživanja aroma i polifenolnih sastojaka. LC-MS omogućava karakterizaciju kompleksnih struktura polifenola iz grožđa, poput procijanidina, proantocijanidina, prodelfina, tanina, i daje eksperimentalni dokaz za strukture koje su prethodno samo hipotetski razmatrane. LC-MS-MS metoda je vrlo učinkovit i moćni alat za istraživanja antocijanina i omogućava karakterizaciju aglikonskog i šećernog dijela molekule (Flamini, 2003).

S druge strane, načini proizvodnje vina igraju važnu ulogu u ekstrakciji polifenola iz grožđa i njihovoj budućoj stabilnosti u vinima; vrijeme maceracije, fermentacije, kontakta s kožom i sjemenkama bobice, prešanja, dozrijevanja, bistrenja i sazrijevanja u bocama su čimbenici koji utječu na sastav i udjel fenolnih spojeva u vinima. Ovi su spojevi jedan od najvažnijih parametara kakvoće vina, budući da doprinose organoleptičkim odlikama vina, kao što su boja, trpkost, gorčina ili, onome što u posljednje vrijeme zaokuplja pažnju znanstvenika, antioksidacijskim svojstvima vina.

### **2.3 Utjecaj fenolnih sastojaka na boju vina**

Jedno od najvažnijih vizualnih svojstava vina je njegova boja koja potencijalno može pružiti dostatnu količinu informacija. Boja je osjet koji percipiramo vizualno zbog loma ili refleksije svjetlosti na površini objekata. Strogo je vezana uz svjetlo i ovisi o tipu upadnog svjetla (osvjetljavajućeg ili svjetlosnog podražaja) (Somers, 1998).

Vino apsorbira dio svjetlosnog zračenja, a dio reflektira prema oku promatrača, što uzrokuje pojavu percipiranja boje. Primjerice, osjet koji nastaje kod vrlo tamnih vina je gotovo potpuno zaslužan činjenici da skoro sve ulazno zračenje biva apsorbirano od strane vina (OIV, 2013).

Boja vina je jedno od osjetilnih svojstava koje se može opisati objektivno, dok je percipirana boja uzrokovana osjetilnom detekcijom selektivne transmisije svjetla u vidljivom spektru, mnogo se više informacija može dobiti instrumentalnom analizom u UV-Vis spektru. Za instrumentalnu analizu vina uglavnom se uzima spektar od 220 do 1100 nm. Mnogi molekularni sastojci nađeni u vinu apsorbiraju svjetlo valne duljine između 220 i 250 nm, dok se apsorbancija vidljivog svjetla od 400 do 700 nm koristi u analizi kompozicije vina, ali i za opisivanje parametara boje. Bitno je znati da je više od 95,5% sastojaka vina potpuno



transparentno za zračenje od 250 do 700 nm. Sastojci koji su transparentni za takvo zračenje jesu voda, glicerol, zaostali šećer, organske kiseline, mineralne soli, većina zaostalih aminokiselina i peptida, i većina hlapljivih sastojaka (Somers, 1998). Većina apsorpcije u odabranom UV-Vis području potječe od fenolnih pigmenta i ostalih fenola. Prava boja crnog vina je rezultat kompleksnih fizikalnih i kemijskih interakcija koji većinom uključuju antocijanine. Među tim procesima su transfer protona i hidratacija antocijanina, ko-pigmentacijski kompleksi između antocijanina i ostalih (uglavnom nebojenih) fenolnih sastojaka, i pigmenti nastali iz antocijanina (Gómez Gallego i sur., 2012).

Tablica 1. Maksimalna apsorpcija različitih sastojaka u vinu (Marquez i sur., 2012)

Valna duljina / nm	Apsorbirajuće komponente
280	Kompleksi flavan-3-ola i antocijanina
315	Esteri hidrocimernih kiselina( ci-kaftarna, trans-kaftarna, cis-kutarna, trans-kutarna, cis-fertarna i trans-fertarna kiselina)
360	Flavonoli poput 3-glukuronidnih i 3-glukozidnih derivata kvercetina and kampferola, 3-glukozidnih derivata laricitrina, isorhamnetina, siringetina, i miricetina, kampferola i isorhamnetina.
369	C-15 fenola povezanih sa flavan-3-olima
500-600	Antocijanini i pigmenti iz antocijanina

## 2.5. Francuski paradoks

Umjerena konzumacija vina, posebice crnog, zadnjih se nekoliko desetljeća veže uz smanjenje smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti, a u znanstvenim je krugovima popularno nazvana „Francuski paradoks“. Ovaj su pojam u znanstveni i popularni svijet uveli Renaud i De Lorgeril, 1992. godine. U svojim su istraživanjima pokušali zaključiti zašto je uočena manja smrtnost od srčanih bolesti u Francuskoj u usporedbi s drugim Europskim zemljama, a posebice u usporedbi sa smrtnošću u Velikoj Britaniji, bez obzira na približno istu konzumaciju visoko zasićenih masnih kiselina, jednakim pušačkim navikama i nedostatnoj

tjelovježbi. Autori su objasnili paradoks mediteranskom prehranom, bogatom povrćem, voćem, maslinovim uljem i, posebice konzumacijom crvenog vina.

Polifenolni spojevi su učinkoviti hvatači slobodnih radikala kisika i pri lipidnoj peroksidaciji, što je određeno njihovom reaktivnošću s vodikovim ili elektron donirajućim reagensima, razlog tome je stabilnost antioksidant-derived radical i njihovim svojstvima keliranja metala. Također, pokazali su antibakterijska, antimutagena, protuupalna i vazodilatacijska svojstva (Estruch, 2000). Zaštitna uloga može biti povezana sa polifenolnim sastojcima sa antioksidacijskim svojstvima.

Polifenolni spojevi, prisutni u vinu, za koje se zna da imaju jaki antioksidacijski kapacitet, prepoznati su kao supstancije koje imaju preventivnu ulogu protiv srčanih bolesti. Prema istraživanjima koja su proveli Cao i Prior (2000), blagotvorno djelovanje vina posljedica je antioksidacijskih svojstava flavonoidne frakcije, koja je zaslužna i za vezanje slobodnih radikala i za vezanje prijelaznih metalnih iona. Međutim, zbog korištenja različitih sorti grožđa i različitih metoda proizvodnje, postoje neke osnovne i definirajuće razlike u sastavu bijelog, ružičastog i crnog vinu u vidu kvantitete i izvora polifenola (Psarra i sur., 2002).

Nekoliko je istraživanja pokazalo utemeljenu i statistički značajnu korist od umjerene konzumacije i piva i vina kod oboljelih od krvožilnih bolesti (konzumacija 150 ml crvenog vina ili do 20 g alkohola dnevno), no ukazala su na bolje rezultate nakon konzumacije vina (32 % smanjenja rizika), nego piva (22 % smanjenja rizika). Druga su istraživanja, kao rezultat metaboličkih studija, pokazala da su i vino i pivo jednako učinkoviti kod smanjenja mogućnosti oboljenja od krvožilnih bolesti (Paixao i sur., 2007). Udjel etanola u vinu i pivu je podjednak (približno: 150 ml vina ili 330 ml piva, ovisno o koncentraciji alkohola), te je logično da je učinak ovih pića na organizam podjednak.

## **2.6. Pjenušava vina**

Zbog posebne vrste obrade, pjenušava vina pripadaju kategoriji “specijalnih vina”, poput desertnih i aromatičnih vina. Dobivaju se sekundarnom fermentacijom baznog vina. Ovisno o tehnologiji proizvodnje, mogu se klasificirati u pjenušava vina dobivena tradicionalnom refermentacijom u boci i pjenušava vina proizvedena pomoću sekundarne fermentacije u hermetički zatvorenim posudama. Iako je proizvodnja pjenušavih vina manja od proizvodnje mirnih vina, ekonomski utjecaj ovog proizvoda je veoma važan zbog njegove

visoke dodane vrijednosti. Iz tog razloga, potrošači sve veću pažnju usmjeravaju na kakvoću fermentiranih pića, dok su vinari u potrazi za stalnim usavršavanjem svojih proizvoda.

Postoji mnogo čimbenika koji utječu na kemijski sastav pjenušavih vina, poput sorte grožđa (Anderson i sur., 2008), prinosa vinograda (Pozo-Bayon i sur., 2003), kakvoće baznog vina (Girbau-Sola i sur., 2002), soja kvasaca za sekundarnu fermentaciju (Torrens i sur., 2008). Nedvojbeno je da su sekundarna fermentacija i starenje vina s kvascem ključni čimbenici kojima se može objasniti kakvoća pjenušavog vina, i čine karakterističnu razliku između pjenušavih i mirnih vina. Prilikom starenja događa se autoliza kvasca. S enološke točke gledišta, proces autolize se odnosi na hidrolizu biopolimera pomoću hidrolitičkih enzima koji oslobađaju citoplazmatske sastojke (peptide, aminokiseline, masne kiseline i nukleotide) i sastojke stanične stijenke (glukane i manoproteine) u vino.

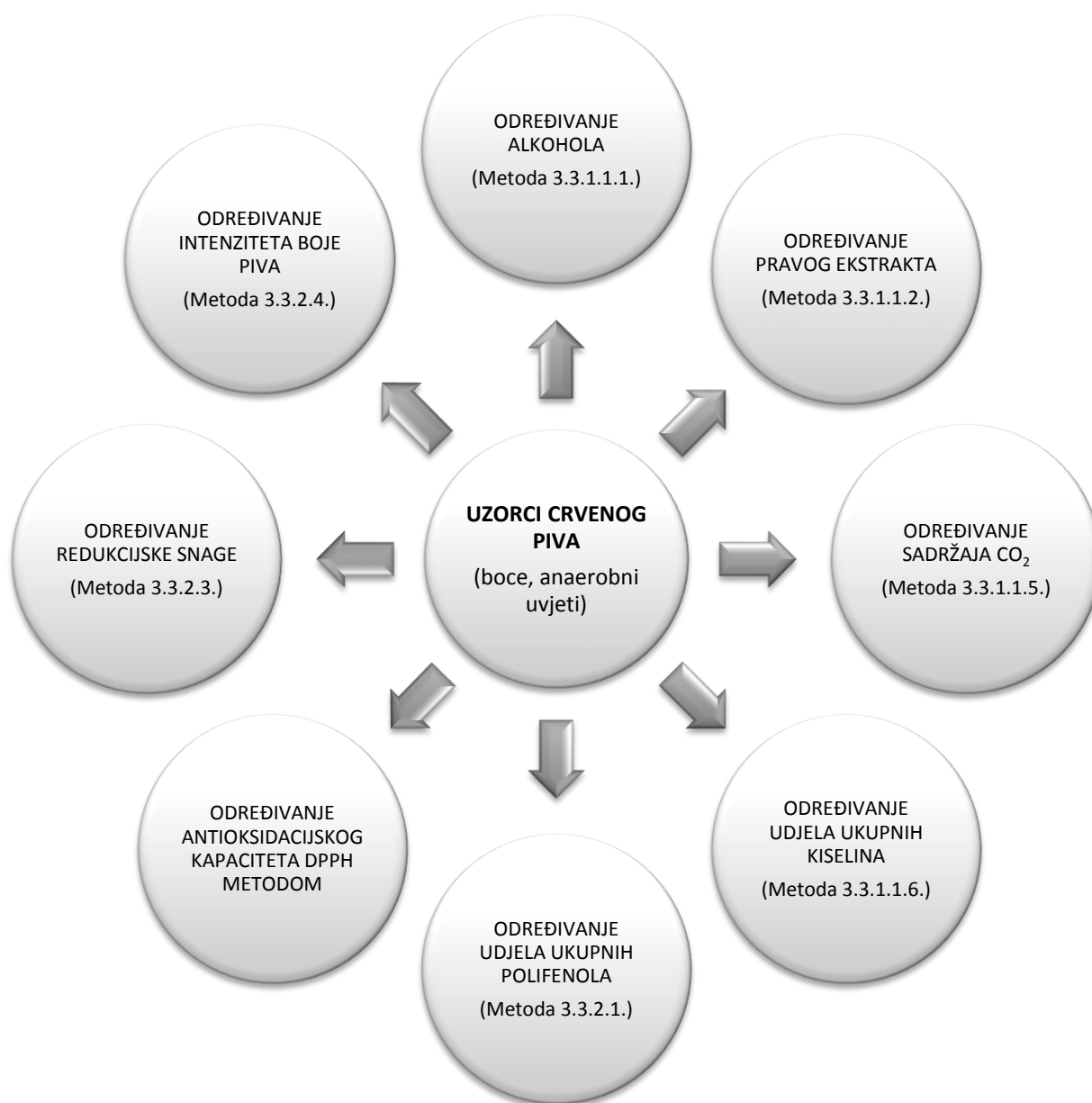
### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Ciljevi i tijek istraživanja

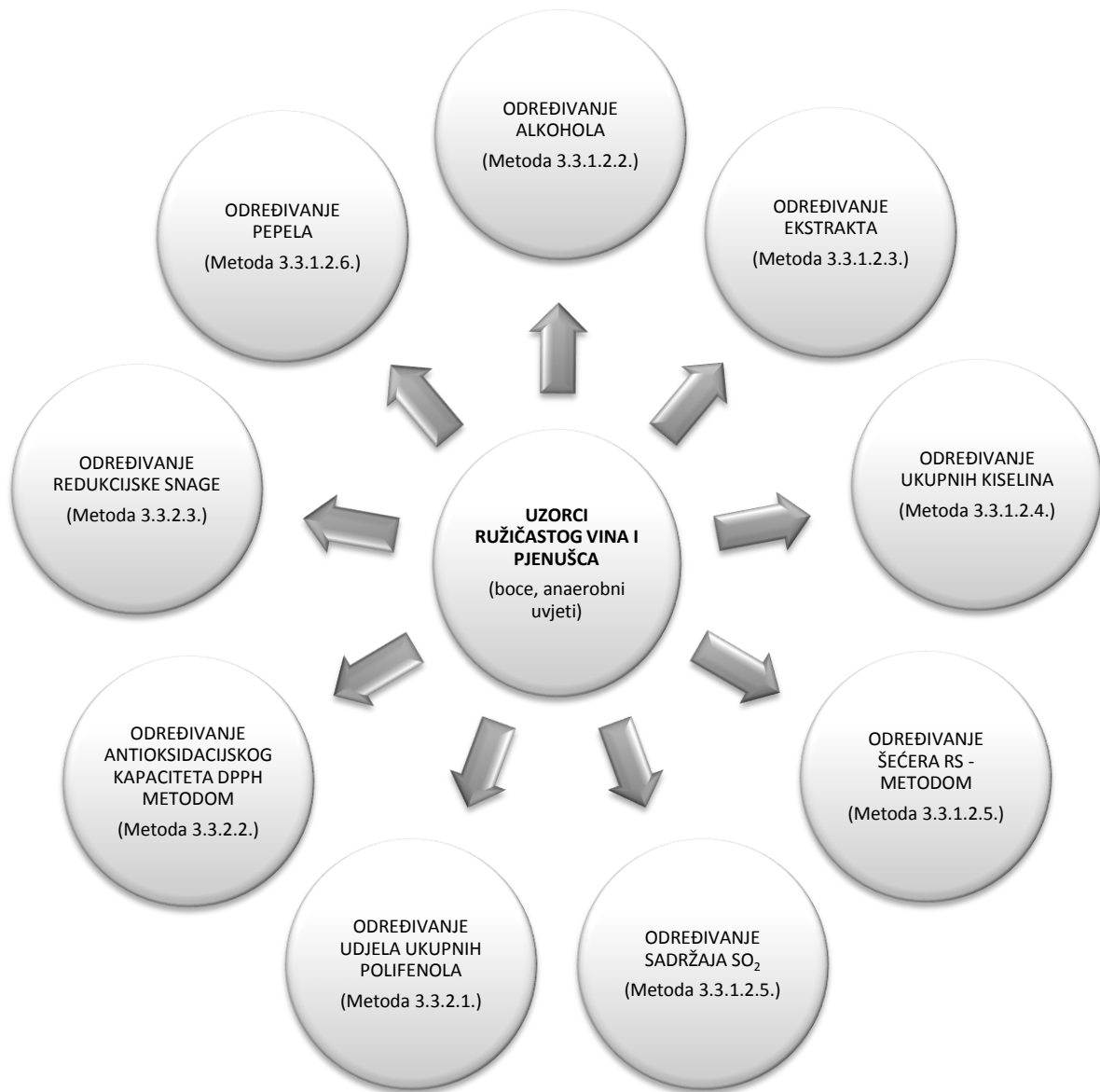
U ovom su radu uspoređena kemijska i antioksidacijska svojstva crvenog piva, ružičastog vina i ružičastog pjenušca s područja Istre.

Istraživanja su obuhvatila određivanja (Slike 3 i 4):

- kemijskog sastava piva: udjela alkohola (vol. %), pravog ekstrakta (g/l), udjela ukupnih kiselina (g/l) i sadržaja CO<sub>2</sub> (g/l)
- kemijskog sastava vina: udjela alkohola (vol. %), pravog ekstrakta (g/l), udjela ukupnih kiselina (g/l), šećera RS-metodom (g/l) i sadržaja SO<sub>2</sub> (g/l)
- udjela ukupnih polifenola u pivu i vinu
- antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom
- redukcijske snage istraživanog piva i vina
- intenziteta boje piva, vina i pjenušca



**Slika 3.** Shematski prikaz istraživanja na uzorcima crvenog piva



**Slika 4.** Shematski prikaz istraživanja ružičastog vina i pjenušca

## **3.2. Materijali**

### **3.2.1. Uzorci piva i vina**

Istraživani uzorci Istarskog crvenog piva, ružičastog vina i pjenušca nabavljani su u trgovinama u Zagrebu i čuvani i na sobnoj temperaturi i na 4 °C u hladnjaku do provođenja pokusa.

#### Pivo:

- crveno – San Servolo, Bujska pivovara d.o.o., Buje, proizvodnja 2016.

#### Vino:

- ružičasto – Cabernet Sauvignon Rozé, Vina Agrolaguna, Poreč, kvalitetno suho vino, berba 2014.

#### Pjenušac:

- ružičasto – Misal Rozé, Pjenušci Peršurić d.o.o, Poreč.

### **3.2.2. Reagensi za određivanje ukupnih polifenola**

1. otapalo: destilirana voda, H<sub>2</sub>O
2. Folin-Ciocalteu reagens (Fluka)
3. 7,5 %-tna otopina natrijeva karbonata, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Kemika)
4. galna kiselina (Sigma)
5. (+)-katehin (Sigma)

### **3.2.3. Reagensi za određivanje sposobnosti vezanja slobodnih radikala**

1. otapalo: metanol (Fluka)
2. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Sigma)
3. Trolox (Sigma)

### **3.2.4. Reagensi za određivanje reducirajuće snage**

1. 0,2 M fosfatni pufer
2. kalijev fericijanid (1 %)
3. trikloroetena kiselina (10 %)
4. otopina FeCl<sub>3</sub> (0,1 %)



### 3.3. Aparati

#### - pH-metar

Pri radu je korišten pH-metar "Methrom", model 744, Švicarska.

#### - Vage

Analitička vaga "Mettler", Švicarska

Digitalna analitička vaga "Shimadzu", Japan

Tehnička vaga "Tehtnica", ET 1211, 0-1200 g, Slovenija

#### - Vibro mikser

Za homogenizaciju uzoraka korišten je vibrirajući mikser "Tehtnica" model EV-102, Železniki, Slovenija.

#### - Spektrofotometar

Za mjerenje apsorbancije pri 420 i 520 nm korišten je spektrofotometar Unicam Helios ε, USA.

Za mjerenje kinetike vezanja DPPH\* radikala u bijelom, ružičastom i crnom vinu korišten je spektrofotometar Cary 3, Varian, Australia.

### 3.4. Metode istraživanja

#### 3.4.1. Određivanje kakvoće piva i vina

##### 3.4.1.1. Kemijska određivanja kakvoće piva

###### 3.4.1.1.1. *Određivanje alkohola kemijskom metodom*

Udjel alkohola u uzorcima piva je određivan kemijskom metodom koja se zasniva na oksidaciji alkohola s kalijevim bikromatom ( $K_2Cr_2O_7$ ) u kiselom okolišu.

#### Postupak:

U odmjernu tikvicu od 50 mL je stavljeno 5 mL uzorka koji je razrijeđen s demineraliziranom vodom do 50 mL (odnos uzorka i vode je 1:10). Uzorak je prebačen u tikvicu kruškastog oblika od 50 mL i neutraliziran s 0.1 M NaOH. U Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, u koju će se hvatati destilat, stavljeno je 10 mL otopine kalijevog bikromata i 5 mL koncentrirane  $H_2SO_4$ . Destilat se preko hladila i lule uvodi u otopinu kalijevog bikromata u Erlenmeyer tikvicu od 100 mL, koja mora biti u rashlađenoj vodi. Destilacija mora biti polagana i postupna i trajala je dok se sadržaj u tikvici za destilaciju nije smanjio na približno 3 mL (za to vrijeme je alkohol predestilirao). Sadržaj tikvice je promućkan, začepljen gumenim čepom i ostavljen stajati 5 minuta radi potpune oksidacije alkohola. Zatim je sadržaj kvantitativno prebačen u Erlenmeyer tikvicu od 500 mL uz ispiranje, dodano mu je 200 mL destilirane vode radi razrjeđenja i 10 mL 20 %-tne otopine KI i ostavljeno začepljeno 5 minuta. Nakon 5 minuta, uzorci su titrirani s 0,1 M otopinom natrijevog tiosulfata ( $Na_2S_2O_3$ ). Kad je boja postala svjetlija, dodano je 5 mL 1 %-tne otopine škroba i titrirano do pojave tirkizno-zelene boje. Koncentracija (vol %) alkohola je izračunata prema jednadžbi:

$$\text{alkohol (vol \%)} = \left(10 - \frac{a}{6,9}\right) \cdot 2$$

a = utrošak 0.1 M otopine  $Na_2S_2O_3$  (mL)

###### 3.4.1.1.2. *Određivanje pravog ekstrakta*

Ostatak u tikvici nakon određivanja alkohola je ohlađen i na vagi dopunjen destiliranom vodom do prvobitne težine od 100 g. Sadržaj tikvice je dobro izmiješan i određena je gustoća tekućine piknometrom termostatiranjem pri 20 °C. Pravi ekstrakt (n) je očitao iz tablice i izražen kao % mase.

### 3.4.1.1.3. Određivanje sadržaja CO<sub>2</sub>

U menzuru od 25 ml dodano je 15 ml 0,1 M NaOH i 10 ml ohlađenog piva (0–5 °C), nakon čega je sadržaj preliven u čašu od 50 ml, ispran deioniziranom vodom i titriran s 0,1 M HCl do pH 8,3 (provjera pH vrijednosti pH metrom).

Utrošak HCl za 10 ml piva = a = ml HCl · f<sub>HCl</sub>

Pivu zagrijanom na 15 – 20 °C uklonjen je CO<sub>2</sub> stresanjem, nakon čega je otpipetirano 50 ml piva, koje je titrira s 0,1 M NaOH do pH 8,3.

Utrošak NaOH za 10 ml piva:

$$b = \frac{\text{ml NaOH} \cdot f_{\text{NaOH}}}{5}$$

Koncentracija CO<sub>2</sub> (g/l) je izračunata prema jednadžbi:

$$\text{CO}_2 = 0,44 \cdot [15 - (a - b)]$$

### 3.4.1.1.4. Određivanje udjela ukupnih kiselina

Udjel ukupnih kiselina određen je titracijom s 0,1 M NaOH, uz fenolftalein kao indikator. 50 ml piva je oslobođeno CO<sub>2</sub> povremenim mućkanjem u vodenoj kupelji pri 40 °C tijekom pola sata. Svijetlo piva je razrijeđeno istim volumenom vode, a tamno dvostrukim volumenom. Svijetlo titrirano se izravno uz dodatak 5-6 kapi fenolftaleina, dok je tamno titrirano bez indikatora, a kraj titracije je određuje fenolftaleinskim papirom do ružičaste boje. Udjel kiselina je izražen u ml 0,1 M NaOH na 10 ml piva. Utrošeni ml 0,1 M NaOH za titraciju piva je pomnožen s faktorom 0,1 M NaOH i podijeljen s 5.

### 3.4.1.2. Kemijska određivanja kakvoće vina

#### 3.4.1.2.1. Određivanje specifične gustoće vina

Prije određivanja udjela alkohola i ekstrakta, u uzorcima vina je određivana specifična gustoća, koja je prvi pokazatelj kakvoće vina.

##### Postupak:

Piknometar je 2-3 puta ispran s malo vina koje je analizirano, a zatim je napunjen vinom do iznad oznake, te stavljen na termostatiranje pri 20 °C oko 20 minuta. Nakon termostatiranja, filter papir je pažljivo uklonjen višak uzorka (do oznake), te je piknometar izvagan na analitičkoj vagi (pet decimala).

Specifična gustoća vina je izračunata prema jednadžbi i očitana iz tablica (Prilog 1):

$$\rho_{20/20}^* = (m_{pv} - m_{pp}) / m_{pv}$$

$\rho_{20/20}^*$  – specifična gustoća vina

$m_{pv}$  – masa piknometra s vinom (g)

$m_{pp}$  – masa praznog piknometra (g)

$m_{pv}$  – masa piknometra s vodom (g)

Za posebnu točnost, specifična gustoća je korigirana zbog prisutnog SO<sub>2</sub> prema jednadžbi (OIV, 2016):

$$\rho_{20/20} = \rho_{20/20}^* - 0.0006 \cdot S$$

$\rho_{20/20}$  – korigirana specifična gustoća

$\rho_{20/20}^*$  – izmjerena specifična gustoća

S = ukupni SO<sub>2</sub> (g/L)

#### 3.4.1.2.2. Određivanje udjela alkohola u vinu

Udjel alkohola u ispitivanim uzorcima vina je određivan istom metodom kao i kod uzoraka piva (Metoda 3.4.1.1.1.).

### 3.4.1.2.3. Određivanje udjela ekstrakta u vinu

Nakon provedene destilacije, u destilacijskoj tikvici je ostala tekućina koja se naziva ekstrakt, a predstavljaju ga ne hlapljivi sastojci, pa je taj ostatak vina korišten za određivanje udjela ekstrakta u vinu izražen u g/l.

#### Postupak:

Ekstrakt iz tikvice za destilaciju je kvantitativno prenesen u piknometar koji je nadopunjen do ispod oznake s deioniziranom vodom kojom je tikvica 2-3 puta isprana. Piknometar s ekstraktom je termostatiran pri 20 °C tijekom 30 minuta, nakon čega je nadopunjen deioniziranom vodom do oznake i izvagan.

Specifična gustoća ekstrakta je izračunata na isti način kao kod određivanja udjela alkohola u vinu (OIV, 2016):

$$\rho_{\text{ekstrakta}} = (m_{\text{pe}} - m_{\text{pp}}) / m_{\text{pv}}$$

$\rho_{\text{ekstrakta}}$  – specifična gustoća ekstrakta ( $\rho_{20/20}$ )

$m_{\text{pe}}$  – masa piknometra s ekstraktom (g)

$m_{\text{pp}}$  – masa praznog piknometra (g)

$m_{\text{pv}}$  – masa piknometra s vodom (g)

Iz izračunate specifične gustoće ekstrakta je iz tablica po Windischu (Prilog 2) očitana udjel ekstrakta (g/l) u vinu.

### 3.4.1.2.4. Određivanje ukupnih kiselina

Sve slobodne organske i anorganske kiseline i njihove kisele soli, kao i druge kisele tvari neutraliziraju se otopinom natrijevog hidroksida, iz čijeg se utroška izračuna udjel ukupnih kiselina. Ukupna kiselost se u vinima izražava kao udjel vinske kiseline (g/l).

#### Postupak:

25 ml vina je preneseno u čašu od 200 ml i zagrijano do vrenja da se ukloni CO<sub>2</sub>, nakon čega je uzorak ohlađen i titriran s 0,1 M NaOH uz pH-metar do pH 7,0.

Masena koncentracija ukupnih kiselina je izračunata preko jednadžbe:

$$\gamma = V \cdot 0,3 \cdot f$$

$\gamma$  - masena koncentracija ukupnih kiselina, izraženih kao vinska kiselina (g/l)

V – utrošeni volumen 0,1 M NaOH (ml)

f – faktor 0,1 M NaOH (f = 1,0000)

#### 3.4.1.2.5. *Određivanje koncentracije šećera RS- metodom*

##### Postupak:

- 1) 5 mL uzorka je dodano 20 ml destilirane vode.
- 2) Uzorku (25 ml) je zatim dodano 10 ml otopine A (Fehling I) i 10 ml otopine B (Fehling II).
- 3) Kuhano je točno 2 minute u tikvici s okruglim dnom od 250 ml uz povratno hladilo, ohlađeno pod mlazom vode i dodano 10 ml otopine C (30%-tni KJ) i doda 10 ml otopine D (26 %-tne H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).
- 4) Sve je dobro izmiješano i uzorku je dodano 2 ml škroba (1 %-tna otopina), te je titriran s 0.1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> do prijelaza plave boje u boju puti (treba se zadržati jednu minutu).

Glukoza test (kontrola): 5 mL otopine glukoze (10 g/l) + 20 ml destilirane vode (ukupan volumen 25 ml) i ponovljen prethodno opisan postupak.

Slijepa proba: 25 mL destilirane vode i ponovljen prethodno opisan postupak.

Masena koncentracija šećera je izračunata preko jednadžbe:

$$\gamma = [50 (a - b) / [(a - c) \cdot d]$$

$\gamma$  - masena koncentracija reducirajućih šećera, RS (g/l)

a – volumen 0.1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utrošen za slijepu probu (ml)

b - volumen 0.1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utrošen za uzorak (ml)

c - volumen 0.1 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> utrošen za kontrolu (glukoza test) (ml)

d - volumen uzorka uzet za analizu (5 ml)

#### 3.4.1.2.6. Određivanje udjela $SO_2$

##### Postupak:

##### *Slobodni $SO_2$ :*

U tikvicu za kuhanje je otpipetirano, preko lijevka, 10 ml uzorka vina i 5 ml fosforne kiseline (25 %). U manju, apsorpcijsku tikvicu dodan je već pripremljeni indikator (2-3 ml, metilno crvenilo + metilno modrilo 1:0.15), te 2 ml  $H_2O_2$ . Nakon destilacije, uzorak je titriran s 0.01 M NaOH. Utrošeni ml 0,01 M NaOH su pomnoženi s 32 da bi se dobili mg slobodnog  $SO_2/l$  vina.

##### *Vežani $SO_2$ :*

Nakon određivanja slobodnog  $SO_2$  u tikvici je ostao određeni volumen vina. U čistu apsorpcijsku tikvicu je ponovno stavljen pripremljeni indikator (2-3 ml, metilno crvenilo + metilno modrilo 1:0.15), te 2 ml  $H_2O_2$ , te je pod tikvicu stavljen plamenik sa što manjim plamenom i uzorak je grijan, uz lagano vrenje točno 10 minuta. Nakon titracije uzorka s 0,01 M NaOH, utrošeni mililitri su pomnoženi s 32 i da bi se dobili mg vezanog  $SO_2/l$  vina.

##### *Ukupni $SO_2$ :*

Izračunat je kao zbroj vrijednosti slobodnog i vezanog  $SO_2/l$  vina.

### 3.4.2. Analitičke metode

#### 3.4.2.1. Određivanje udjela ukupnih polifenola

Koncentracija ukupnih polifenola je određivana spektrofotometrijski s Folin-Ciocalteu reagensom (Singleton i Rossi, 1965).

##### Postupak:

U odmjernu tikvicu od 25 ml otpipetirano je 2 ml uzorka, 9 ml destilirane vode i 1 ml Folin-Ciocalteu reagensa. Reakcijska smjesa je promiješana na vibromikseru i ostavljena da stoji 3 minute, nakon čega je uzorku dodano 8 ml 7,5 %-tne otopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Tako pripremljeni uzorak ostavljen je stajati 2 h na sobnoj temperaturi, nakon čega je mjerena apsorbancija razvijenog plavog obojenja na 765 nm u odnosu na slijepu probu. Slijepa proba pripremana je na isti način kao i uzorci, samo je umjesto 2 ml uzorka, reakcijska smjesa sadržavala isti volumen destilirane vode. Svaki uzorak pripreman je u dvije usporedne probe (n=2), a rezultat je izražen kao srednja vrijednost dobivenih rezultata. Koncentracija ukupnih fenola je izračunata preko baždarnog dijagrama za određivanje ukupnih fenola i izražena kao ekvivalent galne kiseline (mg GAE/l).

Udjeli fenolnih spojeva (galna kiselina i (+)-katehin) su izračunati prema baždarnim krivuljama (Prilozi 3 i 4).

#### 3.4.2.2. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta DPPH metodom

Antioksidacijski kapacitet je određivan s 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikalom prema metodi koju je opisao Molyneux (2004).

##### Postupak za uzorke piva:

Pripremljena je 250 μM metanolna otopina DPPH. U epruvetu je otpipetirano 0,1 ml uzorka piva i dodano mu je 2,9 ml metanolne otopine DPPH. Odmah po dodatku otopine DPPH mjerena je apsorbancija pri 515 nm u razmaku od 1 minute, sve do uspostavljanja konstantne vrijednosti apsorbancije (ravnotežno stanje). U drugu epruvetu, koja predstavlja slijepu probu, umjesto uzorka je dodano 2 ml metanola te 2 ml otopine DPPH.

##### Postupak za uzorke vina:

Antioksidacijski kapacitet istraživanih uzoraka vina je određivan metodom koju su predložili Makris i sur. (2003). 0,1 ml razrijeđenih uzoraka vina (1:10 u 12 %-tnoj otopini etanola i 0,2 M KCl-HCl pufera, pH 2,0, je dodan u 0,975 ml metanolne otopine DPPH (0,06 mM u



metanolu) i promiješano na vibromikseru. Nakon 60 minuta reakcije proveden je isti postupak kao i kod uzoraka piva.

Antioksidacijski kapacitet vina ( $A_{kv}$ ) je izračunat prema jednadžbi (Makris i sur., 2003):

$$A_{kv} = 0,699 \cdot \ln (\% \Delta A_{515}) - 7,023$$

pri čemu je:

$$\% \Delta A_{515} = [(A_{515(t=0)} - A_{515(t=60)}) / A_{515(t=0)}] \cdot 100.$$

Postotak preostalog DPPH (% DPPH<sub>pr</sub>) je izračunat prema jednadžbi:

$$\% \text{DPPH}_{pr} = [\text{DPPH}]_{t=60} / [\text{DPPH}]_{t=0}$$

Antioksidacijski kapacitet je izražen kao ekvivalent koncentracije Troloxa ( $\mu\text{M}$ ) (Prilog 5).

### 3.4.2.3. Određivanje reduksijske snage

Reduksijska snaga određivana je metodom po Lugasiju i Hovariju (2003).

#### Postupak:

1 ml uzorka je pomiješan (vibracijska mješalica) s 2,5 ml fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6) i 1 %-tnim kalijevim fericijanidom,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (2,5 ml). Reakcijska smjesa je inkubirana na 50 °C tijekom 20 min i nakon toga je dodano 2,5 ml trikloroetene kiseline (10 %-tne). Iz ove smjese je izuzeto 2,5 ml kojima je dodano 2,5 ml destilirane vode i 0,5 ml 0,1 %-tne otopine  $\text{FeCl}_3$  i očitana je apsorbancija na 700 nm. Reduksijska snaga je izražena kao ekvivalent askorbinske kiseline/ml (Prilog 6). Ovako izražen rezultat znači da 1 ml uzorka ima jednaku reducirajuću snagu kao određena količina katehina, izražena u  $\mu\text{mol}$ .

### 3.4.2.4. Određivanje intenziteta boje crvenog piva

Boja piva mjerena je standardnom referentnom metodom (SRM), kojom se spektrofotometrijski očitava apsorbancija na 430 nm. Očitana apsorbancija je množena s faktorom 12,7 za SRM ili 25 za određivanje boje u EBC jedinicama (Tablica 3):







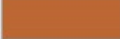


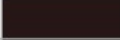




$$SRM = 12,7 \cdot D \cdot A_{430},$$

gdje je D faktor razrijeđenja.

Ako se intenzitet boje želi izraziti u EBC jedinicama, tada se koristi jednadžba:

$$EBC = SRM \cdot 1,97$$

**Tablica 4.** Tablica za izračunavanje boje piva tijekom istraživanja (DeLange, 2008)

SRM/Lovibond	Primjer	Boja	EBC
2	svijetli lager		4
3	Pilsner		6
4	Pilsner Uguell		8
6			12
8	pšenično		16
10	svijetli ale		20
13			26
17	tamni lager		33
20			39
24			47
29	Porter		57
35	Stout		69
40			79
70	vrhunski Stout		138

#### 3.4.2.5. Određivanje intenziteta boje ružičastog vina i pjenušca

S povećanjem starosti vina ili promjenom uvjeta čuvanja dolazi do promjena u njihovim apsorpcijskim spektrima. Sudraud (1958) je proučavao apsorpcijske spektre vina ovisno o njihovoj starosti. Na temelju tih istraživanja, predložio je uvođenje dva pokazatelja kakvoće boje obojenih (ružičastih i crvenih) vina prema njihovoj gustoći i nijansi. Gustoća (G) je definirana kao zbroj apsorbanacija na 420 i 520 nm:

$$G = A_{420} + A_{520}$$

Nijansa boje (N) predstavlja odnos između apsorbancija vina na 420 i 520 nm:

$$N = A_{420}/A_{520}$$

Glories (1984) je modificirao Saudrandovu metodu i uveo pojam intenziteta boje vina. Intenzitet boje (I) predstavlja zbroj apsorbancija vina na 420, 520 i 620 nm:

$$I = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

Kerenyi i Kampis (1984) su predložili još jedan parametar, a to je vizualni dojam (VD), a izračunava se prema jednadžbi:

$$VD = \log (A_{420} + A_{520})$$

Osnovna kromatska svojstva vina, koja se određuju kao udjel obojenja, odnosno crvene (% R), žute (% Y) i plave boje (% B) boje u vinu izračunat je prema jednadžbama:

$$\% R = (A_{520} \cdot 100) / I$$

$$\% Y = (A_{420} \cdot 100) / I$$

$$\% B = (A_{620} \cdot 100) / I$$

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Kemijske analize piva

U radu su istraživana kemijska i antioksidacijska svojstva crvenog piva donjeg vrenja. Kemijski sastav piva koje je uporabljeno za istraživanja prikazan je u Tablici 5.

**Tablica 5.** Kemijski sastav uzorka crvenog piva

Vrsta uzorka	Alkohol (vol.%)	Ekstrakt (g/l)	CO <sub>2</sub> (g/l)	Ukupne kiseline (g/l)	pH
crveno pivo	5,22	32,7	5.58	1,4	4,57

#### 4.2. Kemijske analize vina i pjenušca

Rezultati istraživanja kemijskog sastava ružičastog kvalitetnog suhog vina (Roze) i vrhunskog ružičastog pjenušca (Misal Rose) prikazani su u Tablici 6.

**Tablica 6.** Kemijski sastav istraživanih uzoraka ružičastog vina i pjenušca

Analiza	ružičasto vino	ružičasti pjenušac
Specifična gustoća	0,993518	0,995248
Korigirana sp. gustoća	0,993455	0,994648
Alkohol (vol.%)	11,33	12,00
Ekstrakt (g/l)	22,70	30,50
Ukupne kiseline (g/l)	5,28	5,43
Reducirajući šećeri (g/L)	5,67	10,92
SO <sub>2</sub>		
slobodni	25,6	9,6
vezani	80,0	64,0
ukupni	105,6	73,6
pH	3,44	3,3

### 4.3. Antioksidacijska svojstva crvenog piva, ružičastog vina i pjenušca

U nastavku istraživanja, određivana je promjena udjela polifenolnih spojeva, te antioksidacijski kapacitet i redukcijska snaga uzoraka crvenog piva, ružičastog vina i pjenušca (izraženi kao ekvivalenti Troloxa i askorbinske kiseline) (Tablica 7).

**Tablica 7.** Udjel polifenola i antioksidacijska svojstva crvenog piva, ružičastog vina i pjenušca

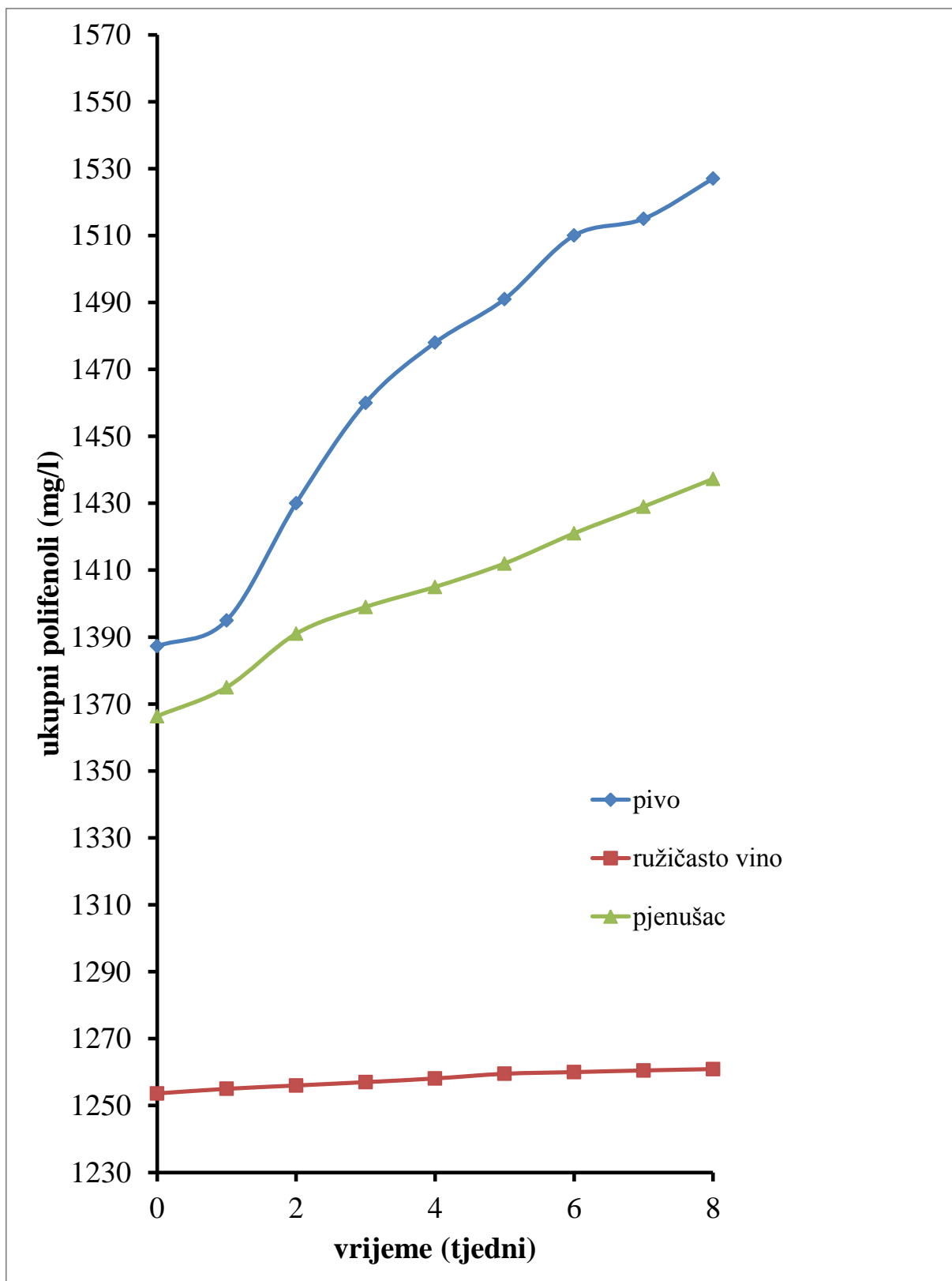
Određivanje	Crveno pivo	Ružičasto vino	Ružičasti pjenušac
Ukupni polifenoli (mg/l)	1387,27	1253,63	1366,36
Ukupni katehini (mg/l)	95,73	62,69	90,56
Galna kiselina (mg/l)	1291,54	1190,94	1275,80
DPPH*	0,158	0,55	0,51
Redukcijska snaga**	0,691	0,539	0,662

\*vrijednosti su izražene kao mM Trolox ekvivalenta

\*\*vrijednosti su izražene kao mM askorbinske kiseline

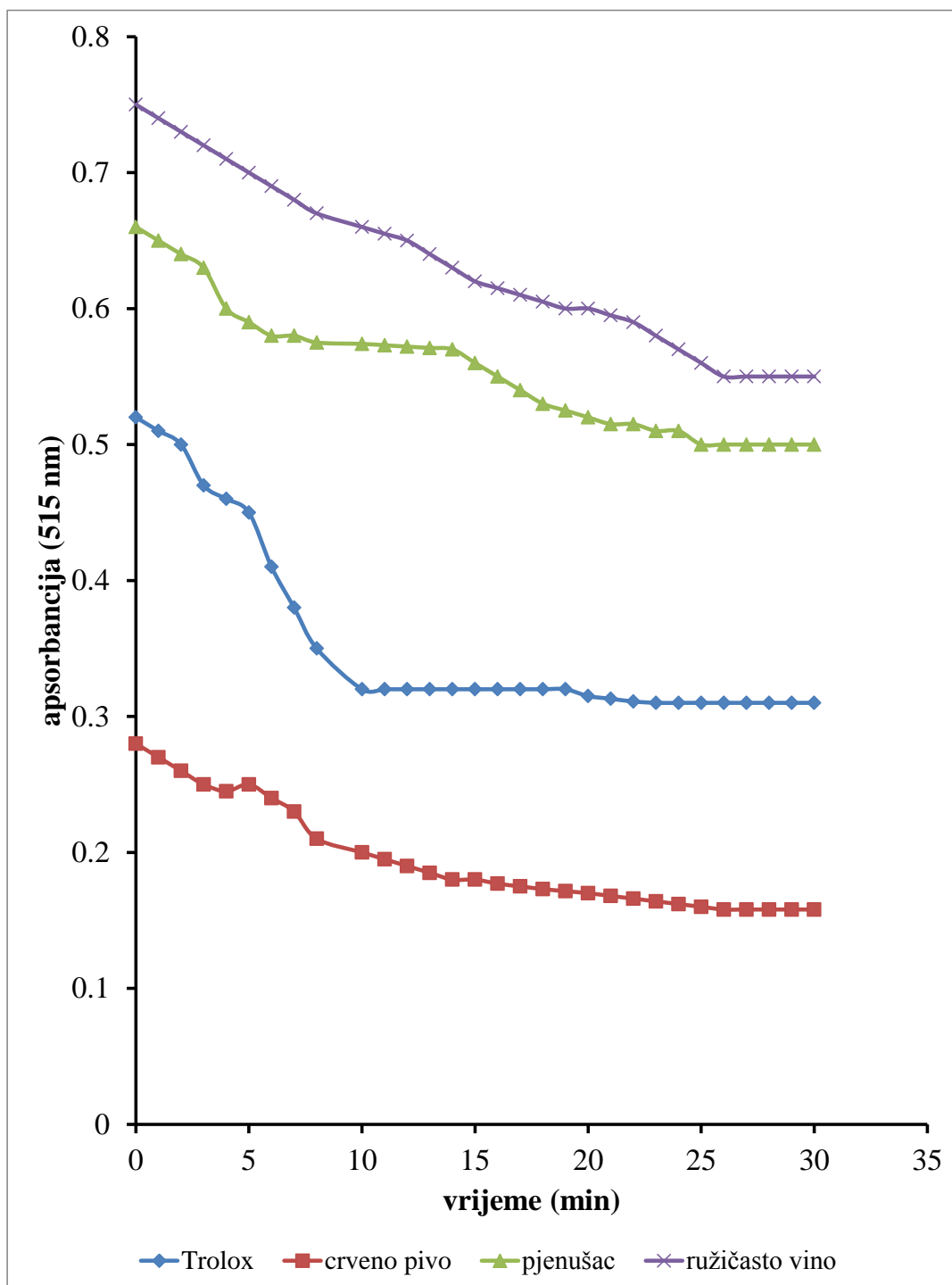
Polifenolni sastojci su važni antioksidansi, koji mogu na sebe vezati slobodne radikale. Tijekom skladištenja piva, fenolni spojevi reagiraju s proteinima i tvore visoko molekulske spojeve koji mogu biti uzrok zamućenja konačnog proizvoda.

Promjena koncentracije ukupnih polifenola u crvenom pivu, ružičastom vinu i pjenušcu praćena je skladištenjem uzoraka pri +4 °C tijekom 8 tjedana (Slika 5). Može se uočiti da je najveće povećanje udjela fenolnih spojeva izmjereno u crvenom pivu (26 %), malo manje u pjenušcu (16 %), a u ružičastom vinu je zabilježena promjena koncentracije polifenola od samo 2 %.



**Slika 5.** Promjena koncentracije ukupnih polifenola tijekom 8 tjedana skladištenja crvenog piva, ružičastog vina i pjenušca pri +4 °C

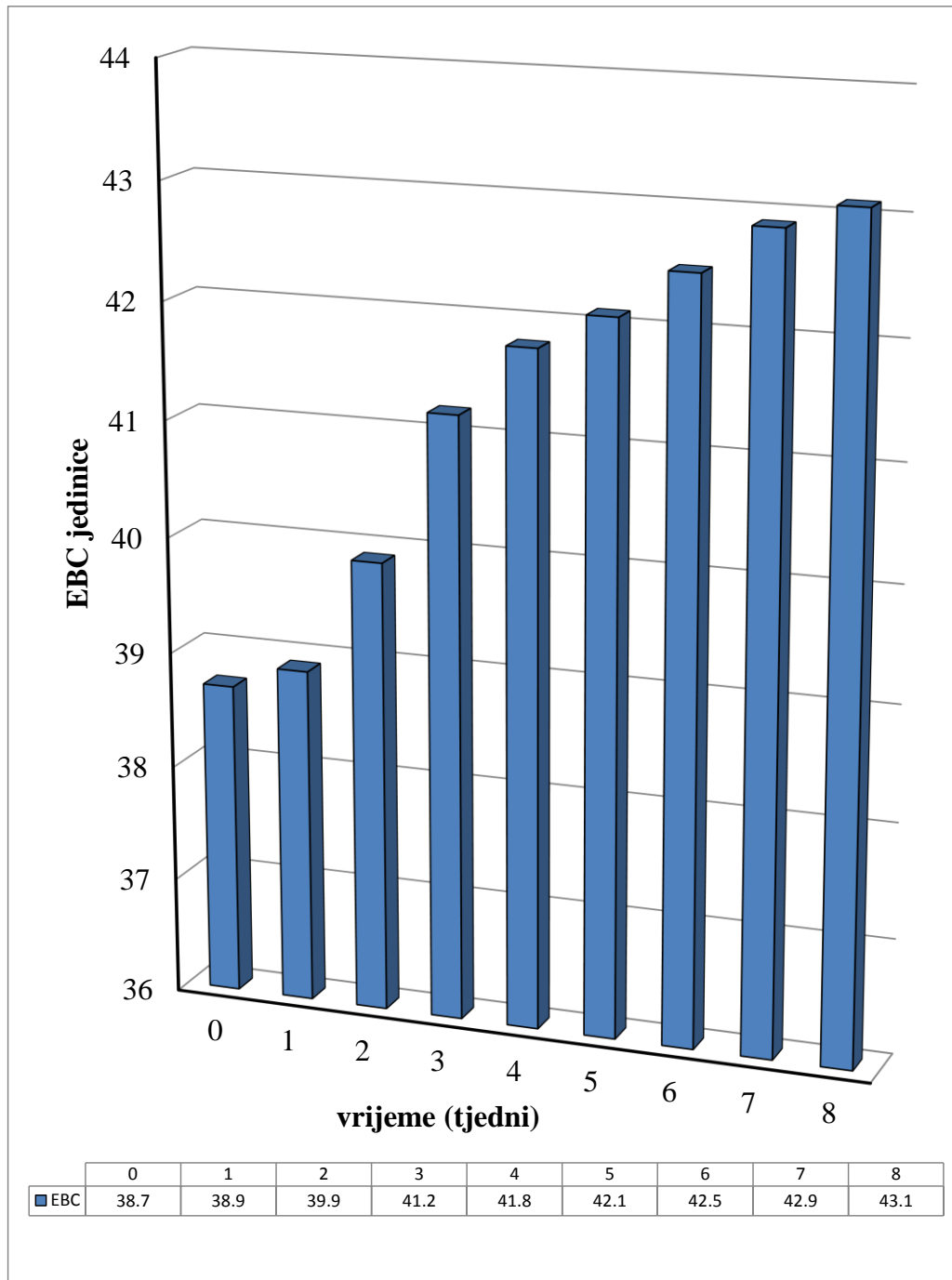
Kinetika vezanja DPPH\* radikala dodatkom otopine 0,025 mM Troloxa kao standarda i uzoraka ispitivanih uzoraka prikazana je na Slici 6. Iz slike je vidljivo da je najbolji antioksidacijski kapacitet pokazalo crveno pivo, a u pola slabije ružičasto vino i pjenušac.



**Slika 6.** Kinetika vezanja DPPH\* radikala u uzorcima crvenog piva, ružičastog vina, ružičastog pjenušca i Troloxa



U literaturi postoji vrlo malo podataka koji se odnose na promjenu boje tijekom skladištenja piva, a posebice se to odnosi na crveno pivo, koje je relativno novo na tržištu. Rezultati dobiveni u ovim istraživanjima pokazali su da se boja istraživanog crvenog piva gotovo linearno mijenjala tijekom skladištenja pri + 4 °C u hladnjaku (Slika 7).



**Slika 7.** Promjena boje crvenog piva (EBC jedinice) tijekom 8 tjedana skladištenja pri +4 °C

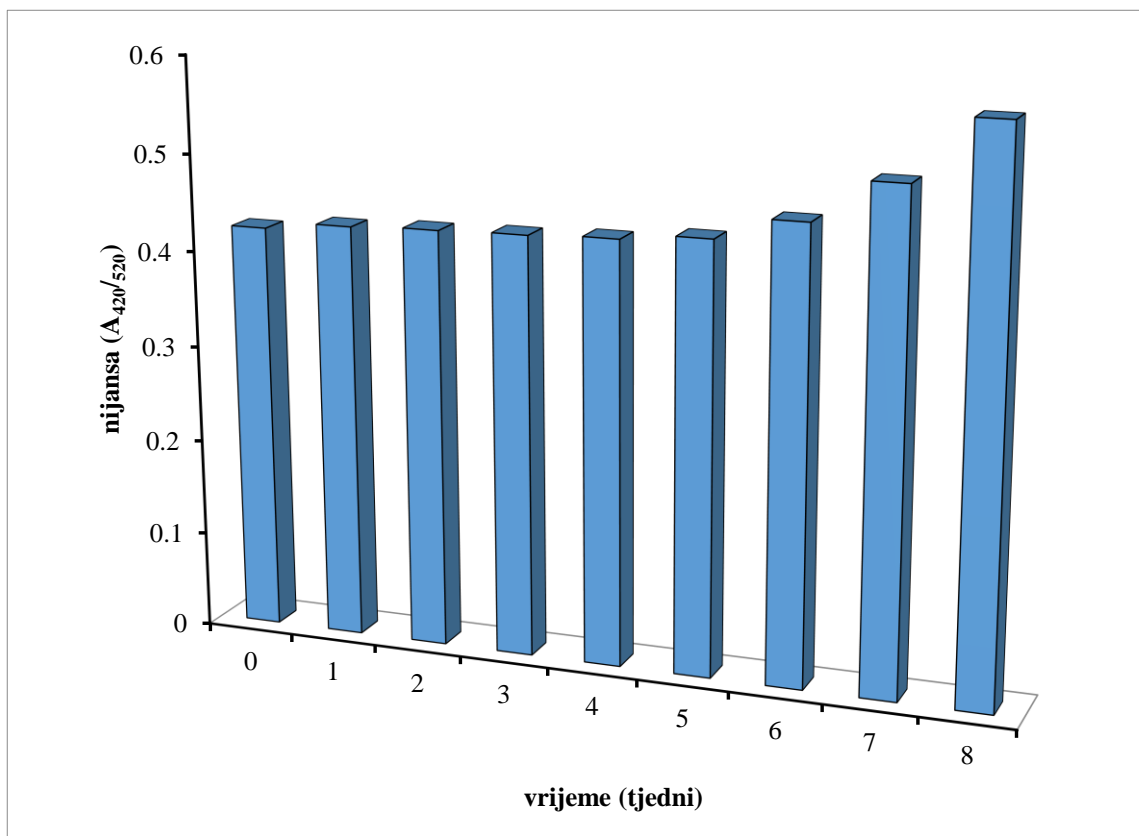
Boja je karakteristično i važno svojstvo ne samo hrane, nego i svih pića i napitaka, a na nju utječu brojni čimbenici. Kod procjene boje vina, važnu ulogu imaju načini vinifikacije, vrijeme starenja ili oksidacijski procesi koji mogu izazvati značajne varijacije u kromatskim svojstvima vina (Yildirim, 2006). Kod procjene boje vina, bez obzira radi li se o bijelom, ružičastom ili crvenom vinu, kakvoća boje se određuje preko niza parametara (gustoća boje, nijansa, intenzitet boje, vizualni dojam, udjel crvene, žute i plave boje) (Tablice 8 i 9, Slike 8 i 9).

**Tablica 8.** Rezultati dobiveni mjerenjem parametara za određivanje boje ružičastog vina i pjenušca na početku istraživanja

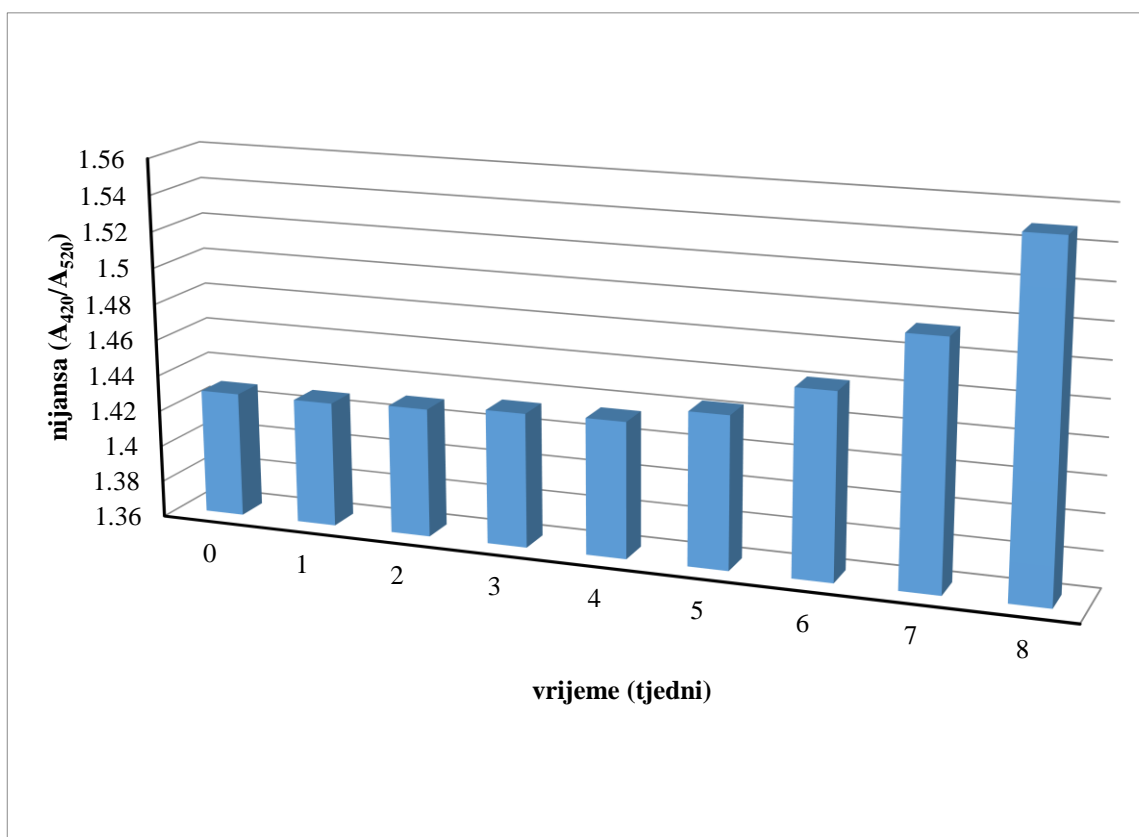
Parametri	Ružičasto vino	Ružičasti pjenušac
gustoća boje	0,414	1,303
intenzitet boje	0,446	1,437
nijansa	1,978	1,784
vizualni dojam	-0,383	0,115
udjel crvene boje (%)	31,17	46,80
udjel žute boje (%)	27,50	83,50
udjel plave boje (%)	3,20	9,32

**Tablica 9.** Rezultati dobiveni mjerenjem parametara za određivanje boje ružičastog vina i pjenušca nakon 8 tjedana skladištenja uzoraka ružičastog vina i pjenušca

Parametri	Ružičasto vino	Ružičasti pjenušac
gustoća boje	0,521	1,418
intenzitet boje	0,577	1,550
nijansa	2,250	1,972
vizualni dojam	-0,284	0,152
udjel crvene boje (%)	62,39	60,71
udjel žute boje (%)	27,73	30,77
udjel plave boje (%)	9,88	8,52



**Slika 8.** Promjena nijanse ružičastog vina tijekom 8 tjedana skladištenja pri +4 °C



**Slika 9.** Promjena nijanse ružičastog pjenušca tijekom 8 tjedana skladištenja pri +4 °C

## **5. RASPRAVA**

S obzirom na ritam današnjeg života, sve više uočavamo važnost kakvoće obroka i pića koje konzumiramo, te obraćamo pozornost na njihove zdravstvene učinke (O'Brien i Davies, 2007). Funkcionalna hrana sadrži fiziološki aktivne sastojke koji čine dobro našem tijelu, no mnogi će se zapitati je li konzumiranje pića, primjerice piva, vina ili pjenušca zdravo, predstavljaju li funkcionalni dio hrane i što to unosimo u organizam ispijanjem tih pića? Sa željom da se nađu odgovori na ova pitanja i znanstvenim pristupom, u ovom su radu istraživana i uspoređivana antioksidacijska svojstva i stabilnost boje autohtonog Istarskog crvenog piva, ružičastog vina i ružičastog pjenušca.

U cijelom je svijetu, među pićima koje konzumiramo, osim gaziranih pića, pivo najčešći izbor. Iako se smatra pićem „niže vrijednosti“ jer se konzumira nakon „teške ili brze“ hrane, pivo sadrži vrlo vrijedne sastojke; izvrstan je izvor vitamina, proteina, organskih kiselina, minerala i polifenola (Kalušević i sur., 2011). Polifenoli su jedan od najvažnijih sastojaka sa antioksidacijskim svojstvima u pivu. Oko 30 % ukupnih polifenola u pivu potječe od hmelja, a 70 % od ječmenog slada i to u obliku (+)-katehina, (-)-epikatehina, procijanidina B3 i prodelfinidina (Gerhäuser i Becker, 2009). Fenolni spojevi imaju nekoliko multifunkcionalnih uloga u pivu; važni su za koloidnu stabilnost, okus, ublažavaju gorčinu, te utječu na starenje i boju piva (Fumi i sur., 2011).

Tijekom prirodnog starenja, udjel ukupnih polifenola se mijenja ovisno o uvjetima u kojima je određeno piće ili napitak skladišteno. U ovom se radu udjel polifenola vidljivo povećavao već nakon prvog tjedna skladištenja pri +4 °C, te nakon toga linearno rastao sve do kraja testiranja (Slika 5). Najveće povećanje udjela fenolnih spojeva izmjereno je u crvenom pivu (26 %), malo manje u pjenušcu (16 %), a u ružičastom vinu je zabilježena promjena koncentracije polifenola od samo 2 %.

Sposobnost vezanja slobodnih radikala, mjerena redukcijom slobodnog radikala DPPH nije se značajnije promijenila tijekom testiranja ubrzanog starenja piva (Slika 6). To znači da su pri kraju skladištenja uzoraka analizom dokazane manje sposobnosti vezanja slobodnih radikala. Rezultati u uzorcima crvenog piva su u suglasju s rezultatima koje su dobili Siqueira i suradnici na uzorcima Brazilskih piva (2011).

Boja piva ovisi o žitaricama koje su uporabljene kao sirovine, načinu njihova sušenja i dosušivanja, kao i o načinu ukomljanja. Spojevi koji su odgovorni za boju piva su rezultat Maillardove reakcije, a djelomično i zbog oksidativnih procesa polifenola iz ječmene pljevice (Shellhammer, 2009). Istraživanjem promjene boje crvenog piva, uočena je najintenzivnija promjena od 3. tjedna skladištenja za 2,5 EBC jedinica boje, dok je ukupna promjena boje tijekom skladištenja 4,5 EBC jedinica (Slika 7). Promjena boje crvenog piva može se objasniti

oksidacijom polifenola, no i posljedicom sekundarne fermentacije u boci (Shellhammer i Bamforth, 2011).

Načini proizvodnje vina imaju važnu ulogu u učinkovitosti ekstrakcije polifenola iz grožđa, kao i njihovoj ulozi u naknadnoj stabilizaciji vina: vremenu maceracije i fermentacije u kontaktu s kožom i sjemenkama bobice, prešanju, dozrijevanju, bistrenju i sazrijevanju u bocama. Fenolni spojevi u vinima podliježu transformacijama, koje se zbivaju od početka vrenja pa sve do kraja skladištenja. Istraživanja su pokazala da uvjeti skladištenja uvelike utječu na promjenu udjela fenolnih spojeva (Recamales i sur., 2006).

Udjel ukupnih polifenola određivan je jednostavnom spektrofotometrijskom metodom s Folin-Ciocalteu reagensom (Singleton i Rossi, 1965). Prije skladištenja u tamnom prostoru, taj je udjel bio oko 1253 mg/l i u ružičastom vinu i 1366 mg/l u ružičastom pjenušcu i linearno je rastao tijekom perioda skladištenja (Tablica 7, Slika 6).

Kinetika vezanja DPPH\*radikala u crvenom pivu, ružičastom vinu i pjenušcu mjerena je spektrofotometrijski, praćenjem promjene boje alkoholne otopine DPPH\* od ljubičaste (početna boja), preko zelene, pa u konačnici do žute (obezbojenje), što je rezultiralo smanjenjem apsorbancije na 515 nm. Kinetika „vezanja“ ili nestajanja slobodnog radikala u dodatku Troloxa, kao standarda, prikazana je na Slici 6. Brzina reakcije karakterizirala je reaktivnost uzoraka, što je vidljivo iz linearnom padu krivulja tijekom 30 minuta praćenja reakcije. Iako nije bilo očekivano, crveno pivo je pokazalo najveći, ružičasti pjenušac malo slabiji, a ružičasto vino najslabiji antioksidacijski kapacitet, što se može usporediti s rezultatima koje su u svojim istraživanjima dobili Paixao i suradnici (2007).

Boja je karakteristično i važno svojstvo vina, a na nju utječu brojni čimbenici. Tehnike vinifikacije, vrijeme starenja ili oksidacijski procesi mogu izazvati značajne varijacije u kromatskim svojstvima vina (Yildirim, 2006). Većina ljudi koji konzumiraju vina, donose mišljenje o njemu na osnovu vizualnog dojma. Nadalje, postoji hipoteza da svi imamo vrlo čvrsto mentalno stajalište o tome koju kategoriju vina konzumiramo (bijelo, ružičasto ili crveno). No, znanstvena je činjenica da većina eksperata i amatera kušača mogu izvrsno ili korektno raspoznati i ocijeniti bijela i crvena vina, no ne i ružičasta (Ballester i sur., 2008).

Istraživanja su pokazala da tijekom skladištenja vina u dužem vremenskom periodu dolazi do promjena, ne samo u udjelu i sastavu polifenolnih sastojaka, nego i boji. Čimbenici, kao što su svjetlost i temperatura, utječu na reakcije hidrolize, oksidacije i kondenzacije, koje se najčešće događaju tijekom skladištenja boca vina (Recamales i sur., 2006).

Prema rezultatima prikazanim u Tablicama 8 i 9, te na Slikama 8 i 9, vidljivo je povećanje gustoće i intenziteta boje i ružičastog vina i ružičastog pjenušca. Posebice je

uočljivo povećanje vrijednosti nijanse i vizualnog dojma obaju vina, što se može objasniti povećanjem udjela crvene boje u ukupnom kromatskom spektru boja.

Ružičasta vina i pjenušci su posebno delikatni u svojim nijansama, a ta nijansiranost ovisi o sorti grožđa i dužini maceracije, te rezultira različitim udjelima crvene, žute ili plave boje (Ballester i sur., 2009).

U uzorcima ružičastog vina uočeno je znatnije povećanje nijanse nakon 8 tjedana skladištenja nego u pjenušcu (Tablice 8 i 9). Vidljivo je povećanje udjela crvene boje za 50%, te blagi porast udjela plave boje, dok je udjel žute ostao nepromijenjen (Slika 8). Ružičasti pjenušac je tijekom skladištenja, kao i vino, promijenio nijansu (Slika 9), pri čemu je udjel crvene boje bio pojačan, a žute boje smanjen, dok je udjel plave boje ostao približno isti (Tablica 9).

## **6. ZAKLJUČCI**



## **Prema rezultatima postignutim u ovom radu, može se zaključiti:**

- 1) Antioksidacijska svojstva i stabilnost boje crvenog piva, ružičastog vina i ružičastog pjenušca ispitivana su tijekom 8 tjedana skladištenja pri +4 °C.
- 2) Udjeli ukupnih polifenola u svim ispitivanim uzorcima, ključni su za antioksidacijski kapacitet piva, vina i pjenušca. Najveći udjel ukupnih polifenola dokazan je u crvenom pivu, 1387,27 mg/l, dok je ružičasto vino sadržavalo 1253,63 mg/l, a ružičasti pjenušac 1366,36 mg/l.
- 3) Praćenjem kinetike vezanja DPPH\* radikala, dokazano je da crveno pivo posjeduje najjača antioksidacijska svojstva, dok je ružičasti pjenušac pokazao nešto slabija, a ružičasto vino najslabija antioksidacijska svojstva.
- 4) Budućnost piva nije u poboljšanju njegova sastava, nego u boljem poznavanju vrijednosti njegovih sastojaka, te konačnom priznanju da je visokovrijedno piće koje zaslužuje biti sastavni dio funkcionalne hrane.

## **7. LITERATURNI NAVODI**

- Anderson, M. M., Smith, R. J., Williams, M. A., & Wolpert, J. A. (2008). Viticultural evaluation of French and California Pinot noir clones grown for production of sparkling wine. *Am. J. En. Vitic.* **59**(2), 188-193.
- Ballester, J., Patris, B., Symoneaux, R., Valentin, D. (2008) Conceptual vs. perceptual wine spaces: does expertise matter? *Food Qual. Prefer.* **19**, 267–276.
- Ballester, J., Abdi, H., Langois, J., Peyron, D., Valentin, D. (2009) The odor of colors: Can wine experts and novices distinguish the odors of white, red and rose wines? *Chem. Percept.* **2**, 203-213.
- Bamforth, C. W. (2000) A brief history of beer. U: Proceedings of the 26th Convention of the Institute of Brewing, Asia-Pacific Section, Singapore, str. 5–12.
- Bamforth, C. W. (2002) Nutritional aspects of beer-a review. *Nutr. Res.* **22**(1), 227–237.
- Bamforth, C. W. (2008) Beer and health. U: Beer: A Quality Perspective. Elsevier: Burlington MA. str. 229-253.
- Buiatti, S. (2009) Beer composition: an overview. U: Preedy, V. (ed) Beer in health and disease prevention. Elsevier, London, str. 213–222.
- Cao, G., Prior, R. L. (2000) Red wine in moderation: Potential health benefits independent of alcohol. *Nutr. Clinical Care*, **3**, 76-82.
- DeLange, A. J. (2008) The Standard Reference Method of Beer Color Specification as the Basis for a New Method of Beer Color Reporting. *J.Am.Soc. Brew. Chem* **66**(3), 143-150.
- Estruch, R. (2000) Wine and cardiovascular diseases. *Food Reserch.*, **33**, 219-226.
- Flamini, R. (2003). Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass Spect. Rev.* **22**, 218–250.

Fumi M. D., Galli R., Lambri M., Donadini G., Marco De Faveri D. (2011) Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers, *J. Food Comp. Analysis* **24**, 568-573.

Gašparec-Skočić, Lj. (2015) Descriptio Croatiae: Vinova loza i vino u povijesti, sadašnjosti i budućnosti Hrvata. *Hrvatska revija* **4**. www. matica.hr. Preuzeto 15. lipnja 2016.

Gerhäuser C, Becker H (2009) Phenolic compounds in beer. U: Preedy V (ed) Beer in health and disease prevention. Elsevier, London, str. 124–144.

Gómez Gallego, M.A., Gómez García-Carpintero, E., Sánchez-Palomo, E., González Viñas, M.A., Hermosín-Gutiérrez, I. (2012) Oenological potential, phenolic composition, chromatic characteristics and antioxidant activity of red single-cultivar wines from Castilla-La Mancha. *Food Res. Int.* **48**, 7-15.

Gorjanović, S., Novaković, M., Potkonjak, N., Leskošek-Čukalović, I. (2010) Application of a novel antioxidative assay in beer analysis and brewing process monitoring. *J. Agric. Food Chem.* **58**(2), 744–751.

Girbau-Sola, T., Lopez-Barajas, M., Lopez-Tamames, E., Buxaderas, S. (2002) Foam aptitude of Trepát and Monastrell red varieties in Cava elaboration 2 second fermentation and aging. *J. Agric. Food Chem.* **50**(20), 5600-5604.

Glories Y. (1984) La couleur des vins rouges. 20 Partie. *ConnVigne Vin* **18**,253-271.

Harbone, J. B. (1980) Plant phenolics. U: E. A. Bell & B. V. Charlwood (Eds.). Encyclopedia of plant physiology, secondary plant products. New York: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Vol. 8, str. 329–395.

Harrar, V., Smith, B., Deroy, O., Spence, C. (2013) Grape expectations: how to proportion of white grape in Champagne affects the ratings of experts and social drinkers in a blind testing. *Flavour* **2**, 25-35.

Haslam, E. (1996) Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicine: Possible modes of action. *J. Natural Prod.* **59**, 205–215.

Kalušević A., Uzelac G., Veljović M., Despotović S., Milutinović M., Leskošek-Čukalović I., Nedović V. (2011) The antioxidant properties of honey beer. U: Food Process Engineering a Changing World, Proceedings of the 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11) VOLUME III, Greece, str. 2057-2058.

Kerenyi Z, Kampis A. (1984) Comparison between the sensorial established and instrumentally measured colour of red wine. *Acta Aliment.* **13**(4), 325-342.

Leskošek-Čukalović, I. (2009) Beer as a source of biologically important minerals: mineral balanced food? U: Gašperlin L, Žlender B (ur.) Role of minerals in food technology and nutrition. Biotechnology Faculty, Ljubljana, str. 131–141.

Lugasi A, Hóvári J (2003) Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Nahrung* **47**(2), 79–86.

Makris, D. P., Kallithraka, S., Kefalas, P. (2006) Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *J. Food Composite Analysis* **19**, 396–404.

Marquez, A., Serratos, M. P., Lopez-Toledano, A., & Merida, J. (2012). Colour and phenolic compounds in sweet red wines from Merlot and Tempranillo grapes dried under controlled conditions. *Food Chem.* **130**, 111-120.

Mayer, J. (2009) Flavonoids in beer and their potential benefit on the risk of cardiovascular disease. U: Preedy V (ured.) Beer in health and disease prevention. Elsevier, London, str. 831–841.

Mennen, G., de Courcy, P., Guillard, J. (2003) Relation between homocysteine concentrations and the consumption of different types of alcoholic beverages: the French Supplementation with Antioxidant Vitamins and Minerals Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **78**(2), 334–338.

Nelson M (2005) *The Barbarian's beverage—a history of beer in ancient Europe*. Routledge/Taylor & Francis, New York.

O'Brien, G., Davies, M., 2007, Nutrition knowledge and body mass index, *Health Educ. Res.* **22**, 571–575.

OIV (2013) Determination of chromatic characteristics according to CIELab according to CIELab. Compendium of international analysis of methods, Chromatic characteristics, Method OIV-MA-AS2-11 Method OIV-MA-AS2-11.

OIV (2016) Density and Specific Gravity at 20°C. Compendium of international analysis of methods. Physical Analysis. Method OIV-MA-AS2-01B.

Paixao, N., Perestrelo, R., Marques, J. C., Camara, J. S. (2007) Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rose and white wines. *Food Chem.* **105**, 204-214.

Piazzon, A., Forte, M., Nardini, M. (2010) Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *J. Agric. Food Chem.* **58**(19), 10677–10683.

Pozo-Bayon, M. Á., Martínez-Rodríguez, A., Pueyo, E., & Moreno-Arribas, M. V. (2009) Chemical and biochemical features involved in sparkling wine production: from a traditional to an improved winemaking technology. *Trends Food Sci. Tech.* **20**, 289–299.

Psarra, E., Makris, D. M., Kallithraka, S., & Kefalas, P. (2002) Evaluation of the antiradical and reducing properties of selected Greek white wines: Correlation with polyphenolic composition. *J. Sci. Food Agric.* **82**(9), 1014–1020.

Recamales, A., Sayago, A., Gonzales-Miret, M. L., Hernanz, D. (2006) The effect of storage conditions on the phenolic composition and colour of white wine. *Food Res. Int.*, **39**, 220-229.

Renaud, S., De Lorgeril, M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, **339**, 1523-1526.

Saura-Calixto, F., Goñi, I. (2006) Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chem.* **94**(3), 442–447.

Saura-Calixto, F., Serrano, J., Perez-Jimenez, J. (2009) What contribution is beer to the intake of antioxidants in the diet? U: Beer in health and disease prevention. Elsevier Inc., str. 441-448.

Santos-Buelga, C., Scalbert, A. (2000) Proanthocyanidins and tanin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 1094-1117.

Shahidi, F., Naczk, M. (2004) Phenolics in foods and nutraceuticals. CRC, Boca Raton.

Shellhammer T.H. (2009) Beer color, U: Bamforth, C. W, Russell, I., Stewart, G. Beer: A Quality Perspective A volume in Handbook of Alcoholic Beverages, str. 213-227.

Shellhammer, T. H., Bamforth, C. W. (2008) Assessing color quality of beer. U: Culver, C., Wolstad, R. (ur.) Color quality of fresh and processed foods. ACS Symposium Serie, vol 863. American Chemical Society, Washington DC, str. 192-202.

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

Siqueira, P. B., Bolini, H. M. A., Macedo, G. A. (2011) Polyphenols and antioxidant properties in forced and naturally aged Brazilian beer. *J. Brew. Distilling* **2**(3), 45-50.

Somers, C. (1998) The Wine Spectrum. An Approach towards Objective Definition of Wine Quality. Adelaide: Winetitles.

Sudraud, P. (1958) Interpretation of red wines absorption curves. *Ann. Tech. Agri.* **7**, 203-208.

Torrens, J., Urpi, P., Riu-Aurnatell, M., Vichi, S., Lopez-Tamames, E., Buxaderas, S. (2008) Different commercial yeast strains affecting the volatile and sensory profile of cava base wine. *Int. J. Food Microb.* **124**(1), 48-57.

Van der Gaag, M., Ubbink, J., Sillanaukee, P. (2000) Effect of consumption of red wine, spirits, and beer on serum homocysteine. *Lancet* **355**, 1522-1527.

Wright, C. A., Bruhn, C. M., Hey,ann, H., Bamforth, C. W. (2008) Beer consumers' perceptions of the health aspects of alcoholic beverages. *J. Food Sci.* **73**, H12-H17.

Yildirim, H. K. (2006) Evaluation of colour parameters and antioxidant activities of fruit wines. *I. J. Food Sci. Nutr.* **57**(1/2), 47-63.



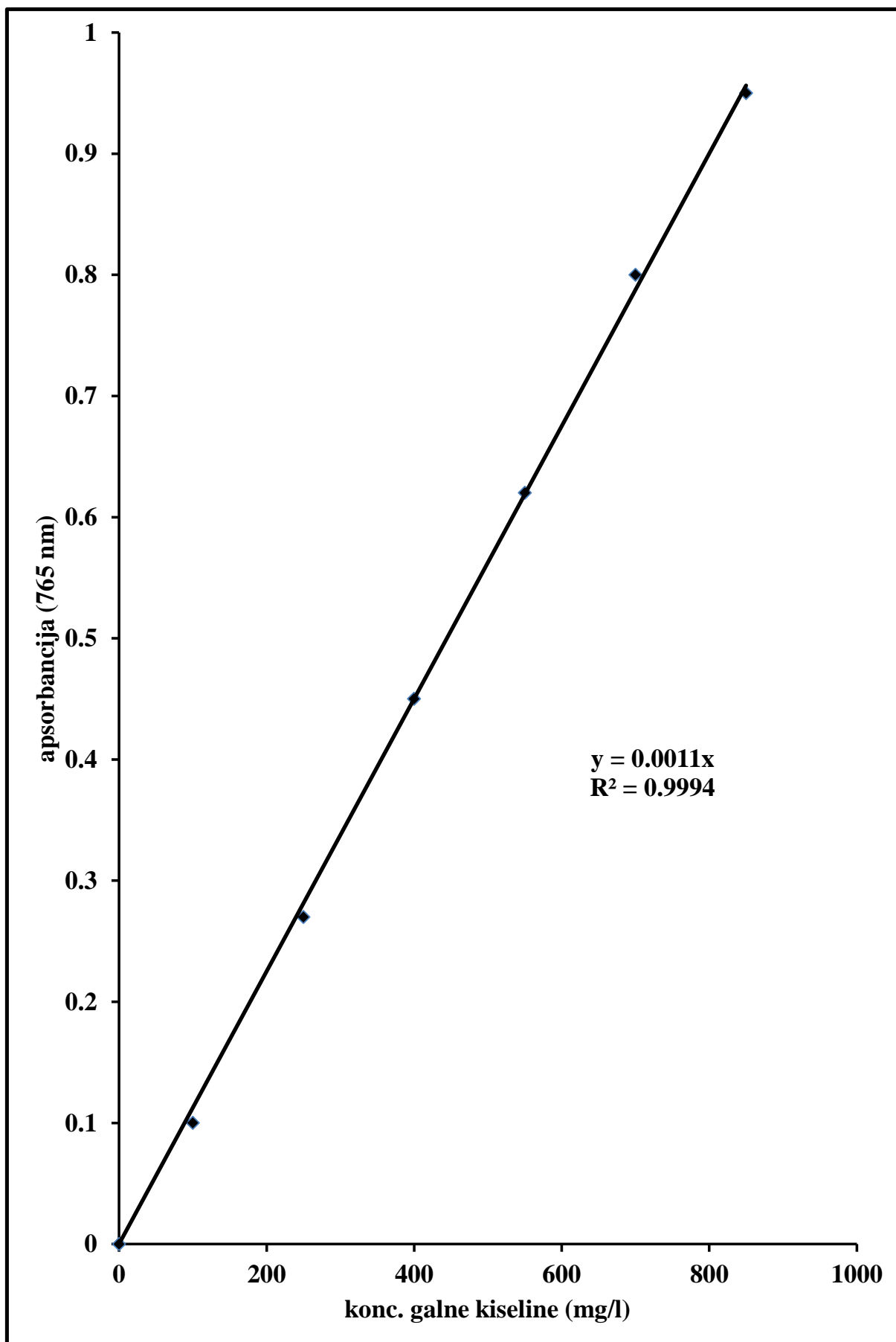
## **8. PRILOZI**

## Prilog 1. Specifična gustoća ekstrakta u vinu

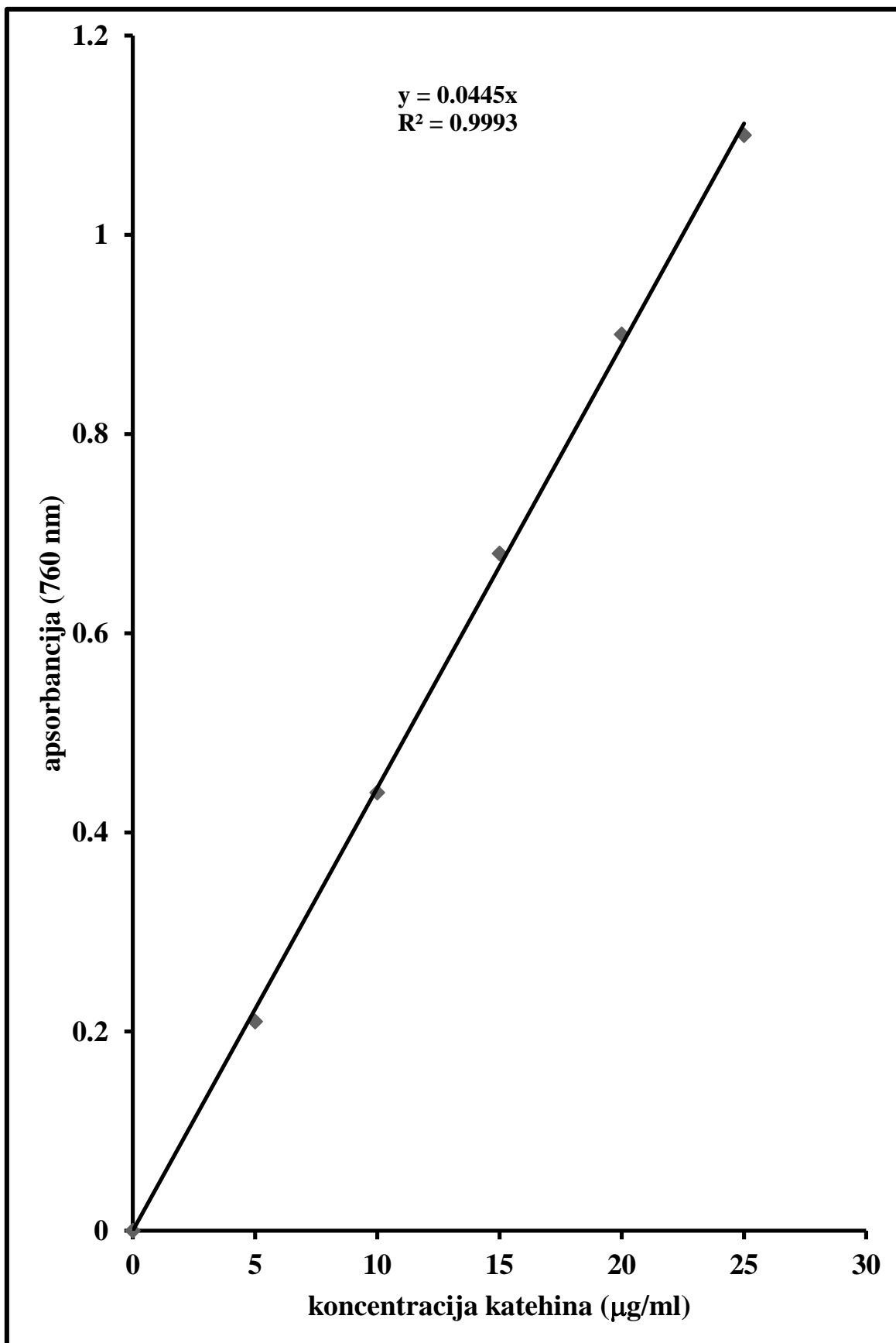
Relativna gustoća do 2. decimale	Treće decimalno mjesto u brojčanom izrazu za relativnu gustoću									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	g ekstrakta/l vina									
0,99										
1,00	4,6	7,1	9,7	12,3	14,9	17,5	20,1	22,7	25,3	27,9
1,01	30,5	33,1	35,7	38,3	40,9	43,5	46,1	48,7	51,3	53,9
1,02	56,5	59,1	61,7	64,3	66,9	69,5	72,1	74,7	77,3	79,9
1,03	82,6	85,2	87,8	90,4	93,0	95,6	98,2	100,8	103,4	106,1
1,04	108,7	111,3	113,9	116,5	119,1	121,8	124,4	127,0	129,6	132,2
1,05	134,9	137,5	140,1	142,7	145,3	147,9	150,6	153,2	155,8	158,4
1,06	161,1	163,7	166,3	168,9	171,6	174,2	176,8	179,4	182,1	184,7
1,07	187,3	190,0	192,6	195,2	197,9	200,5	203,1	205,8	208,4	211,0
1,08	213,7	216,3	218,9	221,6	224,2	226,9	229,5	232,1	234,8	237,4
1,09	240,0	242,7	245,3	248,0	250,6	253,3	255,9	258,5	261,2	263,8
1,10	266,5	269,1	271,8	274,4	277,1	279,7	282,4	285,0	287,7	290,3
1,11	293,0	295,6	298,3	300,9	303,6	306,2	308,9	311,5	314,2	316,9
1,12	319,5	322,2	324,8	327,5	330,2	332,8	335,5	338,1	340,8	343,5
1,13	346,1	348,8	351,5	354,1	356,8	359,4	362,1	364,8	367,5	370,1
1,14	372,8	375,5	378,1	380,8	383,5	386,2	388,8	391,5	394,2	396,9
1,15	399,5	402,2	404,9	407,6	410,3	412,9	415,6	418,3	421,0	423,7

**Prilog 2.** Tablica prema Windisch-u za preračunavanje koncentracije alkohola

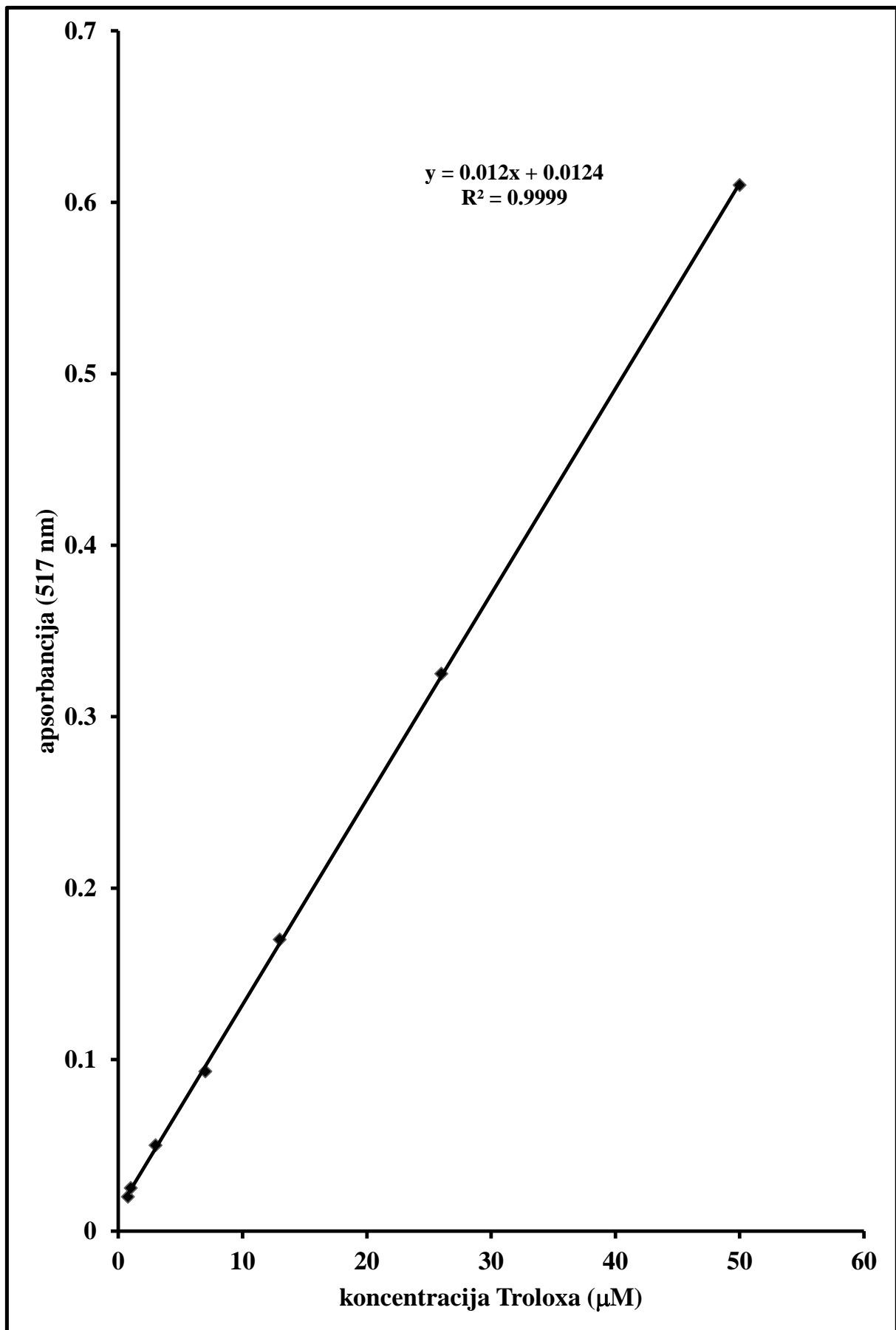
Relativna gustoća (20/20)	Čvrto decimalno mjesto relativne gustoće destilata									
	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
	g alkohola / destilata									
0,999	0,5	1,1	1,6	2,1	2,7	3,2	3,7	4,3	4,8	5,3
0,998	5,8	6,4	6,9	7,4	8	8,5	9,0	9,6	10,1	10,6
0,997	11,2	11,7	12,3	12,8	13,4	13,9	14,5	15,0	15,5	16,1
0,996	16,6	17,2	17,7	18,3	18,8	19,4	19,9	20,5	21,0	21,6
0,995	22,1	22,7	23,3	23,8	24,4	24,9	25,5	26,1	26,6	27,2
0,994	27,8	28,3	28,9	29,4	30,0	30,6	34,2	31,8	32,4	32,9
0,993	33,4	34,1	34,7	35,3	35,9	36,5	37,1	37,6	38,2	38,8
0,992	39,4	39,9	40,5	41,1	41,7	42,3	42,9	43,5	44,1	44,7
0,991	45,3	45,9	46,5	47,1	47,7	48,3	48,9	49,5	50,1	57,0
0,990	51,3	52,0	52,6	53,2	53,8	54,4	55,0	55,6	56,2	56,9
0,989	57,5	58,1	58,7	59,3	59,9	60,6	61,2	61,8	62,5	63,1
0,988	63,7	64,4	65,0	65,6	66,3	66,9	67,5	68,2	68,8	69,4
0,987	70,1	70,7	71,4	72,0	72,7	73,3	74,0	74,6	75,3	75,9
0,986	76,6	77,2	77,9	78,5	79,1	79,8	80,4	81,1	81,8	82,5
0,985	83,1	83,8	84,5	85,1	85,8	86,5	87,2	87,8	88,5	89,2
0,984	89,9	90,6	91,2	91,9	92,6	93,3	94,0	94,7	95,4	96,0
0,983	96,7	97,4	98,1	98,8	99,5	102,2	100,9	101,6	102,3	103,0
0,982	103,6	104,3	105,0	105,7	106,4	107,1	107,8	108,5	109,2	109,9
0,981	110,7	111,4	112,1	112,8	113,5	114,2	114,9	115,7	116,4	117,1
0,980	117,8	118,5	119,3	120,8	120,7	121,5	122,2	122,9	123,6	124,4
0,979	125,1	125,8	126,6	127,3	128,0	128,8	129,5	130,2	130,9	131,6
0,978	132,4	133,1	133,8	134,5	135,3	136,0	136,7	137,4	138,2	138,9
0,977	139,7	140,4	141,2	141,9	142,7	143,4	144,2	144,9	145,7	146,4
0,976	147,1	147,9	148,6	149,3	150,1	150,8	151,5	152,2	153,0	153,7
0,975	154,5	155,2	155,9	156,6	157,4	158,1	158,8	159,6	160,3	161,0
0,974	161,7	162,5	163,2	163,9	164,7	165,4	166,1	166,9	167,6	168,3
0,973	169,1	169,8	170,5	171,2	172,0	172,7	173,4	174,2	174,9	175,6
0,972	176,3	177,0	177,8	178,5	179,2	179,9	180,6	181,3	182,1	182,8
0,971	183,5	184,2	184,9	185,6	186,3	187,0	187,7	188,4	189,1	189,8
0,970	190,5	191,2	191,9	192,6	193,3	194,0	194,7	195,4	196,1	196,8
0,969	197,5	198,2	198,8	199,5	202,2	200,9	201,6	202,3	203,0	203,7
0,968	204,3	205,0	205,7	206,4	207,0	207,7	208,4	209,0	209,7	210,4
0,967	211,1	211,7	212,4	213,1	213,7	214,4	215,1	215,7	216,4	217,1
0,966	217,7	218,4	219,0	219,7	220,4	221,0	221,7	222,3	223,0	223,6
0,965	224,3	224,9	225,6	226,2	226,9	227,5	228,2	228,8	229,5	230,1



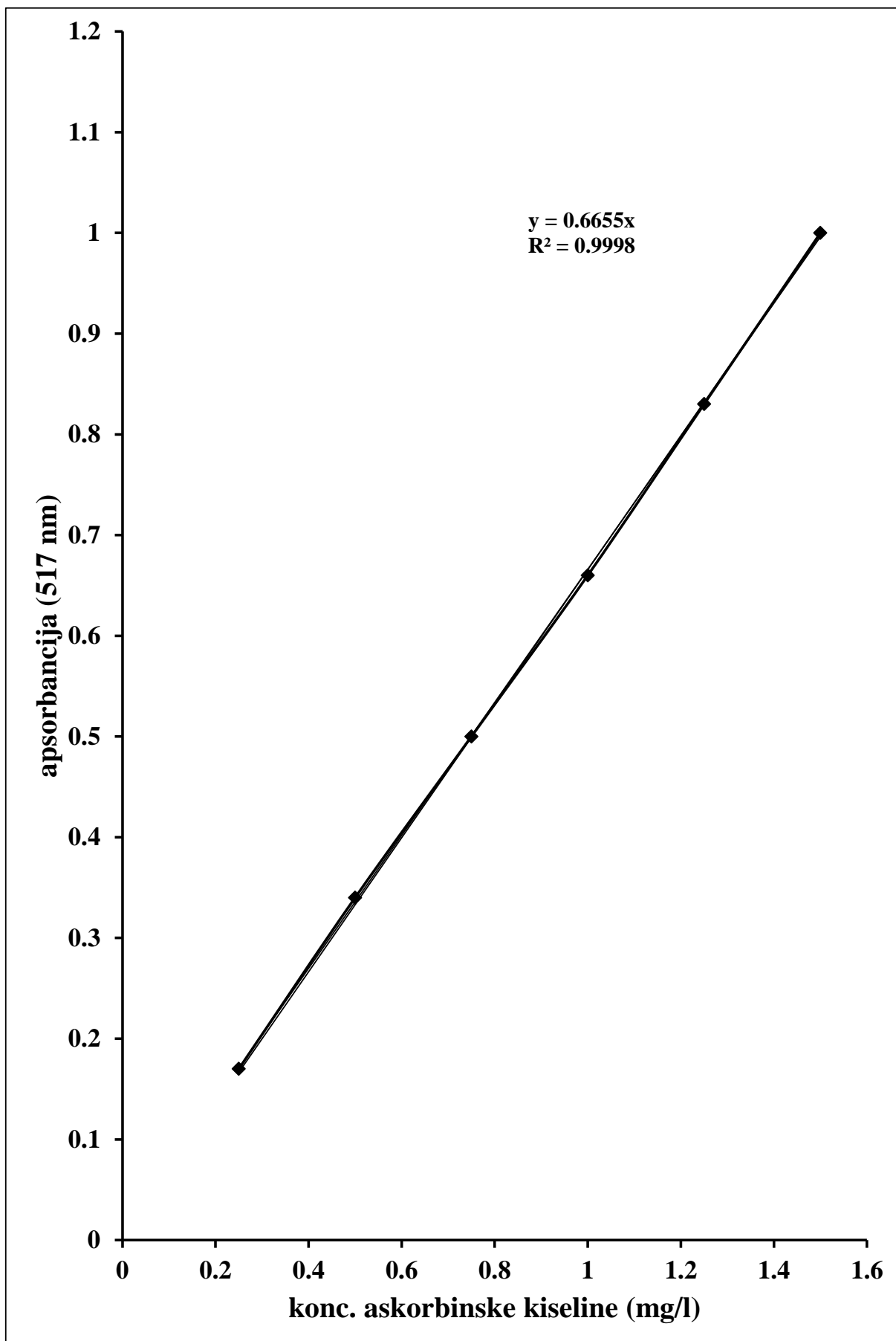
Prilog 3. Baždarni pravac koncentracije galne kiseline (mg/l)



Prilog 4. Baždarni pravac koncentracije katehina (µg/ml)



Prilog 5. Baždarni pravac koncentracije Troloxa (µM)



Prilog 6. Baždarni pravac koncentracije askorbinske kiseline (mg/l)