

Razvoj i treniranje senzorskog panela za procjenu gorčine vina

Divjak, Carlo

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:159:005956>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-05**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Carlo Divjak

732/N

**RAZVOJ I TRENIRANJE
SENZORSKOG PANELA ZA
PROCJENU GORČINE VINA**

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

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić te uz pomoć doc.dr.sc. Natke Čurko.

Zahvaljujem svojim roditeljima, Lauri i Miljenku, koji su mi pružali bezuvjetnu podršku kroz sve godine mojeg obrazovanja te mojoj ljubavi, Jeleni, bez koje ovaj rad ne bi nikad bio dovršen.

Zahvaljujem mentorici prof.dr.sc. Karin Kovačević Ganić i doc. dr. sc. Natki Ćurko na neizmjernom strpljenju, razumijevanju i trudu kojeg su mi pružale pri izradi mojeg diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

RAZVOJ I TRENIRANJE SENZORSKOG PANELA ZA PROCJENU GORČINE VINA

Carlo Divjak, 732/N

Sažetak: Polifenolni spojevi su odgovorni za svojstva gorčine u vinu. U ovom radu proveden je odabir i trening senzorskog panela za procjenu intenziteta gorčine vina. Selekcija i trening ispitanika provedeni su primjenom testa propoznavanja otopina, triangl testom, ranking testovima te kvantitativnom deskriptivnom analizom. Za vrijeme treninga korišteni su kafein i enološki tanini kao referentni standardi u model otopini vina, dok je za procjenu intenziteta gorčine vina korišteno šest bijelih, jedno rose i četiri crna vina. Ukupni tanini u vinu određeni su spektrofotometrijski, dok ukupna kiselost i pH potenciomtrijski. Statističkom obradom podataka dobivenih tijekom treninga je zaključeno da ne postoji značajna razlika između kušača u senzorskom panelu ($p > 0,05$) što znači da su selekcija i trening uspješno provedeni. Utvrđena je i statistički značajna razlika između vina ($p < 0,01$) kao i dobra pozitivna korelacija između intenziteta gorčine i ukupnih tanina ($r = 0,8524$, $p < 0,001$).

Ključne riječi: senzorski panel, intenzitet gorčine, vino

Rad sadrži: 51 stranicu, 7 slika, 6 tablica, 69 literaturnih navoda, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: Prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić

Pomoć pri izradi: Doc. dr. sc. Natka Čurko

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. Leo Gracin
2. Prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić
3. Izv. prof. dr. sc. Ksenija Marković
4. Prof. dr. sc. Verica Dragović-Uzelac

Datum obrane: 11. Srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

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

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Nutrition

SELECTION AND TRAINING OF A PANEL FOR SENSORY EVALUATION OF WINE BITTERNESS INTENSITY

Carlo Divjak, 732/N

Abstract: Polyphenolic compounds are responsible for the bitterness elicited by wine. The aim of this study was to create and train a sensory panel for the determination of bitter intensity in wine. The selection and training was performed using a difference test, triangle test, ranking tests and quantitative descriptive analysis. For the training phase the following standards were used: caffeine and oenological tannins all dissolved in a model wine solution, while for the official evaluation of bitterness six white, one rose and four red wines were used. Total tannins were determined spectrophotometrically, while total acidity and pH potentiometrically. The statistical analysis of the results concluded that the selection and training of the sensory panel was successful ($p > 0,05$). Also there is a statistically significant difference between the selected wines ($p < 0,01$) as well as a strong positive correlation between the bitterness intensity and total tannins in wine ($r = 0,8524$, $p < 0,001$).

Keywords: sensory panel, bitterness intensity, wine

Thesis contains: 51 pages, 7 figures, 6 tables, 69 references, 2 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: PhD. Karin Kovačević Ganić, Full professor

Technical support and assistance: PhD. Natka Čurko, Assistant Professor

Reviewers:

1. PhD. Leo Gracin, Assistant professor
2. PhD. Karin Kovačević Ganić, Full professor
3. PhD. Ksenija Marković, Associate professor
4. PhD. Verica Dragović-Uzelac, Full professor (substitute)

Thesis defended: 11 July 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. OKUS I OSJET VINA	2
2.1.1. Definicija i karakteristike okusa.....	2
2.1.2. Jezik, vrste papila i okusne bradavice	3
2.1.3. Gorčina.....	4
2.1.3.1. Receptori za gorčinu.....	4
2.1.3.2. Sposobnost osjećanja gorčine	5
2.1.4. Definicija osjeta	6
2.1.4.1. Trpkoca	6
2.1.5. Čimbenici koji utječu na percepciju okusa i osjeta	7
2.1.6. Fenoli kao glavni nositelji gorčine i trpkoe vina	8
2.1.6.1. Monomerni flavan-3-oli	9
2.1.6.2. Tanini	9
2.1.6.3. Neftanonoidi	11
2.2. SENZORSKA ANALIZA VINA	12
2.2.1. Vrste senzorskih testova.....	12
2.2.1.1. Testovi razlika	12
2.2.1.2. Deskriptivne analize	13
2.2.1.3. Hedonistički testovi	13
2.2.2. Uvjeti provođenja senzorske analize.....	14
2.2.2.1. Prostorija	14
2.2.2.2. Vina	15
2.2.2.3. Ispitanici.....	16
2.2.3. Tehnika kušanja vina	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. MATERIJAL	18
3.1.1. Vina.....	18
3.1.2. Kemikalije.....	18
3.1.3. Aparatura	19
3.2. METODE	19
3.2.1. Odabir ispitanika i treniranje senzorskog panela	19
3.2.2. Senzorska procjena intenziteta gorčine vina	24
3.2.3. Određivanje pH vina	25
3.2.4. Određivanje kiselosti vina.....	26
3.2.5. Određivanje ukupnih tanina	27
3.2.6. Statistička obrada podataka.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. RAZVOJ I TRENIRANJE SENZORSKOG PANELA ZA PROCJENU GORČINE VINA	32
4.2. SENZORSKA PROCJENA INTENZITETA GORČINE VINA	36
4.3. KEMIJSKA ANALIZA UZORAKA VINA	38
4.4. KORELACIJA INTENZITETA GORČINE I KONCENTRACIJE UKUPNIH TANINA U VINU	43
5. ZAKLJUČCI	44

6. LITERATURA.....	45
7. PRILOZI.....	52

1. UVOD

Senzorska analiza je znanstvena disciplina koja se koristi kako bi se analizirale i interpretirale reakcije na one karakteristike hrane koje se percipiraju ljudskim osjetilima. U senzorskim analizama sudjeluje grupa educiranih i utreniranih ljudi kojih nazivamo senzorskim panelom. Procjena kvalitete vina se prvenstveno temelji na senzorskim svojstvima vina. Karakteristika kvalitetnog vina je harmonija okusa i osjeta koja se postiže međudjelovanjem senzorski aktivnih molekula. Testovi koji se koriste za senzorska istraživanja zahtijevaju specifične uvjete i odgovarajući dizajn istraživanja kako bi se kasnije mogla provesti legitimna statistička analiza. Rezultati senzorske analize moraju biti točni i ponovljivi. Kemijskom analizom se otkrivaju molekule koje su odgovorne za okuse i osjete percipirane tijekom senzorske analize. Jedna od ključnih zadaća istraživanja o vinu je otkrivanje odnosa između senzorske procjene i kemijskog sastava vina. Polifenolni spojevi su odgovorni za svojstva gorčine u vinu, a njihova svojstva daju prepoznatljivost vinima. Proantocijanidini ili kondenzirani tanini su polifenolni spojevi prisutni u vinu koji, s obzirom na to da njihov sastav i stupanj polimerizacije, značajno utječu na okus gorčine i osjet trpkocē.

Cilj ovog rada je selekcija i trening kandidata za provedbu senzorske analize intenziteta gorčine vina. Nakon završenog treninga, senzorski panel će procijeniti intenzitet gorčine šest bijelih, jednog rose i četiri crna vina. Uz senzorsku analizu, provest će se i fizikalno-kemijska analiza ocijenjenih vina. Statističkom obradom podataka istražīt će se povezanost intenziteta gorčine i količine ukupnih tanina u vinu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. OKUS I OSJET VINA

2.1.1. Definicija i karakteristike okusa

Sustav za percepciju okusa omogućuje percepciju različitih podražaja. Njegova funkcija je precizna interpretacija i kvantifikacija različitih okusa. Osjetljivost pojedinaca prema različitim okusima ovisi o genetskoj predispoziciji, okolišnim čimbenicima, dostupnim nutrijentima, prihvatljivosti okusa, osobnim preferencijama, dobi te zdravstvenom stanju (Kikut-Ligaj i Trzcielińska-Lorych, 2015). Primarna uloga percepcije okusa je identifikacija nutritivne vrijednosti hrane prije samog unosa i apsorpcije nutrijenata.

Općenito postoji pet osnovnih okusa: slatko, slano, kiselo, gorko i umami. Svaki od njih ima svoju ulogu pa tako okus slatkoće i umami ukazuju na kalorijsku vrijednost, slanost ukazuje na adekvatnu razinu elektrolita, kiselost ukazuje na nezrelost i pokvarenost namirnica, a gorčina na prisutnost otrovnih tvari (Behrens i Meyerhof, 2013; Jaggupilli i sur., 2016). Prethodno se tvrdilo kako pojedini dijelovi jezika osjećaju samo određene okuse, međutim rezultati nedavnih istraživanja ukazuju kako je takva raspodjela zastarjela. Trenutno se smatra da jezične papile prisutne po cijelom jeziku mogu prepoznati svaki od pet okusa pomoću specijaliziranih živčanih receptora (Sáenz-Navajas i sur., 2010a; Kikut-Ligaj i Trzcielińska-Lorych, 2015).

Karakteristike pojedinog okusa se razlikuju, a razlike su odraz biokemijskog mehanizma odgovornog za percepciju tog okusa. Percepciju okusa omogućuju okusne bradavice smještene u epitelu okusnih jezičnih papila, nepca i grla. Kod ljudi postoje individualne varijacije u raspodjeli i broju živčanih završetaka u jezičnim okusnim bradavicama što dovodi do razlika u percepciji okusa (Kikut-Ligaj i Trzcielińska-Lorych, 2015). Za razliku od njušnih receptora koji mogu detektirati mirise iz udaljenih izvora, okusni receptori su receptori uskog dosega. Okusni receptori imaju sposobnost identificirati spojeve u nutritivno i toksikološki značajnim koncentracijama. Receptori za okus slatkoće se aktiviraju već pri koncentracijama saharoze od 20 mM (6,8 g L⁻¹), dok je najniži prag detekcije gorkih spojeva *in vitro* u nanomolarnim vrijednostima (Reed i Knaapila, 2010; Behrens i Meyerhof, 2013).

2.1.2. Jezik, vrste papila i okusne bradavice

Uloga jezika je interpretacija kemijskog sastava hrane te miješanje i guranje prožvakane hrane prema grlu. Epitelni sloj stanica na dorzalnoj strani jezika tvori jezične papile koje se mogu podijeliti u dvije skupine: mehaničke papile čija je uloga mljevenje i pomicanje hrane te okusne papile u čijem se epitelu nalaze okusne bradavice. U mehaničke papile spadaju nitaste papile koje zauzimaju značajni udio jezika, dok u okusne papile ubrajamo gljivičaste, okružene i lisnate papile (Kikut-Ligaj i Trzcielińska-Lorych, 2015).

Gljivičaste papile su mukozne izbočine koje su ravnomjerno raspoređene između nitastih papila, a nalaze se kod vrha i na tijelu jezika. Na gornjoj površini epitela gljivičastih papila smještene su okusne bradavice sa živčanim završecima jezičnog živca koji je grana trigeminalnog živca. Uz primarnu funkciju detekcije slatkih i kiselih spojeva, ove okusne bradavice detektiraju osjet dodira i topline. Okružene papile su smještene pri korijenu jezika, a njihov broj varira između 8 i 15. Višeslojni pločasti epitel koji prekriva njihovu površinu sadrži okusne bradavice koje primarno detektiraju gorčinu. Lisnate papile su smještene na bočnim stranama jezika, a sastoje se od mukoznih nabora koji oblikuju brazde. Na otprilike polovici brazde nalaze se okusne bradavice koje primarno detektiraju kiselost, dok se na dnu nalaze otvori za sekreciju stražnjih seroznih žlijezda. Sekret ispire brazde te tako omogućuje brzu prilagodbu na promjenu stimulansa. Okusne bradavice koje nalazimo u okruženim, gljivičastim i lisnatim papilama reagiraju na slatke, slane, kisele, gorke i umami podražaje, međutim, osjetljivost pojedine okusne bradavice na određeni podražaj izrazito varira i ovisi o vrsti papila te regiji na kojoj se ona nalazi (Zhang i sur., 2003; Kikut-Ligaj i Trzcielińska-Lorych, 2015).

Kao što je već prije istaknuto, glavni organi za senzorsko prepoznavanje kemijskih podražaja su okusne bradavice. Procijenjeno je da svaka okusna papila sadrži od 2000 do 5000 okusnih bradavica te postoji značajna razlika u njihovoj zastupljenosti između pojedinaca. Broj okusnih bradavica mijenja se s vremenom te kako osoba stari tako njihov broj opada. Svaka okusna bradavica sadrži od 50 do 100 okusnih stanica. (Sainz i sur., 2007; Bajec i Pickering, 2008).

2.1.3. Gorčina

Biološki mehanizmi percepcije gorkog okusa nisu još potpuno razjašnjeni. Glavni izazov je pronaći objašnjenje kako tako veliki broj strukturno različitih spojeva može izazvati ujednačeni gorki okus. Gorčina je inducirana širokim spektrom molekula među kojima su aminokiseline, peptidi, sulfamidi, urea i tiouree, esteri, laktoni, terpenoidi, fenoli i polifenoli (Drewnowski i Gomez-Carneros, 2000). Dodatne informacije vezane za senzorske pragove za neke od ovih spojeva prikazane su u Prilogu 1. Iako se trenutno još istražuju odnosi između gorčine i molekularne strukture spojeva koji ju izazivaju, broj i vrsta tih molekula ukazuje na postojanje nekoliko mehanizama prijenosa signala povezanih s G proteinima uključenim u aktivaciju okusa gorčine (Drewnowski i Gomez-Carneros, 2000; Fontoin i sur., 2008; Chira i sur., 2009).

2.1.3.1. Receptori za gorčinu

Ljudski receptori za gorčinu su kompleksniji u odnosu na životinjske receptore. Nedavna istraživanja ukazuju da okus gorčine prepoznaje 30 receptorskih proteina (engl. *taste receptors*, TAS2R) smještenih na receptorskim stanicama za gorčinu (engl. bitter taste receptor cells, BTRC). Posljednjih su se godina brojna istraživanja posvetila karakteriziranju TAS2R receptora kod sisavaca, a prvenstveno u ljudi (Behrens i Meyerhof, 2013). Receptorski TAS2R su obitelj glikoproteinskih receptora sposobnih za formiranje homo i heterooligomera. U početku se smatralo da su TAS2R smješteni isključivo na jeziku gdje nam omogućuju percepciju gorčine, međutim, nedavna istraživanja su utvrdila da ove receptore nalazimo i izvan usne šupljine, uključujući dišni sustav, gastrointestinalni trakt, mozak te spolni sustav (Kikut-Ligaj i Trzcielińska-Lorych, 2015). Receptorski proteini za gorčinu (TAS2R) su najčešće izraženi na okruženim i lisnatim papilama te nepcu, međutim, ukoliko su izraženi i na gljivičastim papilama, tada su na njima prisutni i drugi receptorski proteini što upućuje na to da svaka stanica može raspoznati više gorkih molekula (Drewnowski i Gomez-Carneros, 2000).

Na osjetljivost pojedinih receptora značajno utječe i prisutnost blokatora, a do sada je identificirano 13 blokatora gorčine, međutim niti jedan od njih nije sposoban blokirati aktivnost svih TAS2R receptora. Blokatori gorčine se najviše koriste u industriji hrane i pića pri čemu se dodaju služe za smanjenje gorčine te tako povećavaju prihvatljivost proizvoda. Važnu ulogu imaju i u farmaceutskoj industriji gdje smanjuju gorčinu pojedinih lijekova, a posebno onih namijenjenih djeci (Jaggupilli i sur., 2016).

2.1.3.2. Sposobnost osjećanja gorčine

Senzorski prag detekcije gorčine izrazito je nizak. Ljudi mogu detektirati gorke spojeve, uključujući izrazito toksične otrove, u milimolarnim koncentracijama. U jednom istraživanju utvrđen je prag detekcije gorkog kinina već pri 25 mol L^{-1} što je izrazito nisko ako uzmemo u obzir da je prag detekcije saharoze $10\,000 \text{ mol L}^{-1}$. U odnosu na ostale okuse, okus gorčine često je intenzivniji i dugotrajniji u ustima (Drewnowski i Gomez-Carneros, 2000). Razlike u sposobnosti percepcije gorčine u ljudi su najbolje istražene na gorkim spojevima 6-n-propiltiouracil (PROP) i feniltiokarbamid (PTC). Sposobnost detekcije gorkog okusa je genetski uvjetovana pri čemu približno 30 % ljudi nije u stanju detektirati PROP i PTC (Gonzalo-Diago i sur., 2014). Utvrđene su fenotipske razlike povezane s polimorfizmom na genu za TAS2R38 receptor. Aleli osoba koji mogu detektirati te spojeve, u odnosu na alele osoba koje ne mogu, se razlikuju samo za tri aminokiseline: na poziciji broj 49 osobe koje ne mogu detektirati gorčinu imaju alanin umjesto prolina, na poziciji broj 262 valin umjesto alanina te na poziciji broj 296 izoleucin umjesto valina. Osobe koje su heterozigoti za taj alel mogu normalno prepoznati gorki okus PROP-a, PTR-a te srodnih spojeva, dok osobe koje su homozigoti ne mogu. Postoji još puno genetskih varijacija na ljudskim receptorima za gorčinu, međutim, niti jedna ne pokazuje ovako značajne razlike u sposobnosti detekcije gorkih spojeva (Behrens i Meyerhof, 2013). Sposobnost percepcije niskih koncentracija gorkih i slanih molekula se smanjuje s godinama, dok detekcija ostalih okusa ostaje relativno nepromijenjena. U testiranju intenziteta otopina pojedinih okusa, starije su osobe odabrale gorku otopinu kao najslabiju, dok kod mladih osoba to nije bio slučaj. Ovo je vjerojatno razlog zašto starije osobe češće odabiru gorku hranu i pića (Drewnowski, 2001).

2.1.4. Definicija osjeta

Osjet percipiramo prilikom aktivacije slobodnih živčanih završetaka trigeminalnog živca što rezultira pojavom trpkocé, punocé, topline, hladnocé, bockanja te boli. Živčani završeci raspodijeljeni po cijeloj usnoj šupljini stvaraju difuzni, slabo lokalizirani, osjet. Tipični osjeti koje percipiramo tijekom konzumacije vina su trpkocá, temperatura, bockanje, tijelo i grijanje. Ti osjeti rezultat su aktivacije jednog ili više trigeminalnih receptora među koje ubrajamo mehanoreceptore, termoreceptore, nocioreceptore te proprioreceptore (Sáenz-Navajas i sur., 2010a; Jackson, 2014).

2.1.4.1. Trpkocá

Tekstura i osjet su glavne odrednice kojima potrošači daju prednost prilikom odabira i prihvaćanja hrane i pića (Guinard i Mazzucchelli, 1996). Osjet trpkocé percipira se kao dugotrajni podražaj u usnoj šupljini, a može se opisati kao osjećaj suhocé, bockanja i grubosti. Trpkocá je najznačajniji osjet jer značajno doprinosi okusu crnih vina (Gawel, 1998; Hufnagel i Hofmann, 2008a). Percepcija trpkocé nije ograničena na specifičnu regiju jezika ili usta, već se difuzno širi cijelom usnom šupljinom, a za njezino potpuno razvijanje potrebno je više vremena (Fontoin i sur., 2008). Vrlo često se osjet trpkocé može zamijeniti za okus gorčine s obzirom na to da njihovu pojavu izazivaju srodni spojevi te jedan i drugi imaju slično vrijeme nastupanja. Oba podražaja nastupaju sporo (trpkocá je sporija od gorčine), a nakon nestanka podražaja za njih je karakteristično zaostajanje okusa u ustima (Brossaud i sur., 2001). Trpkocá može, pri visokim koncentracijama, prikriti okus gorčine, ali utrenirani kušači su i dalje sposobni razlikovati ta dva podražaja (Jackson, 2014).

Osjet trpkocé se pojačava prilikom učestale stimulacije, a stopa pojačavanja je veća što je vrijeme između unosa vina kraće. U jednom istraživanju je istražen utjecaj ponovljenog unosa vina, u koje je dodana umjerena količina tanina, a zaključeno je kako je percepcija intenziteta trpkocé povećana ukoliko vrijeme između dva kušanja nije bilo dovoljno za potupuno nestajanje podražaja. Intenzitet trpkocé u tom istraživanju ovisio je o koncentraciji tanina te o vremenu

između pojedinih kušanja. Ukoliko je ostavljeno dovoljno vremena da se podražaj potpuno smiri, intenzitet trpkocje je između ponovljenih kušanja ostao isti (Guinard i sur., 1986). Takva istraživanja ukazuju na važnost pažljivog planiranja kušanja vina s obzirom na to da postoji značajan utjecaj „carry-over“ efekta, a osobito za crna vina (Gawel, 1998).

2.1.5. Čimbenici koji utječu na percepciju okusa i osjeta

Različiti čimbenici utječu na sposobnost pojedinca da detektira i prepozna pojedini osjetilni podražaj. Od fizikalnih čimbenika najznačajnija je temperatura vina tijekom kušanja. Smatra se da je za idealnu percepciju optimalna sobna temperatura. Hlađenje vina smanjuje osjetljivost na šećere, međutim, poboljšava percepciju gorčine i trpkocje. Drugi fizikalni čimbenik koji značajno utječe na percepciju okusa je pH vrijednost. pH vrijednost utječe na percepciju kiselosti kao i na topljivost, oblik i biološku aktivnost proteina (Jackson, 2014). Razlike u koncentraciji vinske kiseline i šećera u pjenušavim vinima značajno utječu na percepciju kiselosti i slatkoće tih vina s obzirom na to da viša koncentracija šećera prekriva okus kiselosti (Sáenz-Navajas i sur., 2012). Sol u hrani te šećer u hrani i vinu utječu na percepciju trpkocje i gorčine. Kiselost ima svjostvo prekrivanja slatkoće, ali vrijedi i obrnuto ovisno o koncentracijama prisutnih molekula. Kiselost pojačava percepciju gorčine i trpkocje tanina (Jackson, 2014). Mnogo fizikalnih i kemijskih svojstava je uključeno u kompleksne mehanizme percepcije trpkocje i gorčine. Od fizikalnih čimbenika najviše utječu pH, koncentracija etanola, slatkoća te viskoznost. Akrolein nije gorka molekula, ali u interakciji s polifenolnim spojevima u crnim vinima doprinosi okusu gorčine vina. Bijela vina karakterizira niža koncentracija polifenola pa u njih taj utjecaj nije zabilježen. Već pri koncentraciji od 10 mg L⁻¹ akrolein daje blagi okus gorčine (Sáenz-Navajas i sur., 2012). Slatkoća prekriva okus gorčine i donekle osjet trpkocje. Nadalje, izražena voćna aroma u bijelim vinima također smanjuje percepciju trpkocje i gorčine. Ovaj utjecaj se povezuje s kognitivnim interakcijama između voćne arome i okusa slatkoće što posljedično umanjuje percepciju trpkocje i gorčine. Ove interakcije nazivaju se asocijativnim učenjem, a stvaraju se je s vremenom prilikom konzumacije raznog slatkog voća (Noble, 1994; Sáenz-Navajas i sur., 2012). Ukoliko postoji nesuglasnost između okusnog i

mirisnog podražaja, mozak daje mirisnom podražaju prioritet te djelomično prekriva okusni podražaj (Jackson, 2014).

Okusne molekule mogu imati više od jednog okusnog svojstva pa tako proantocijanidini mogu biti trpki i gorki, glukoza može biti slatka i blago kisela, kalijeve soli mogu biti slane i gorke, etanol može biti slatki i stvarati osjet topline (Jackson, 2014). Percepcija okusa prilikom kušanja vina vrlo je složen proces s obzirom na to da dolazi do raznih kemijskih interakcija između molekula u ustima. Sposobnost senzorske percepcije se smanjuje s godinama što je posljedica smanjenja broja okusnih stanica i broja okusnih receptora na svakoj stanici. Važno je naglasiti da takve promjene ne utječu znatno na sposobnost kušanja vina u pojedinaca (Jackson, 2014). Tijekom kušanja vina adaptacija na određeni okus može biti potpuna što može ometati daljnje kušanje, zato se između pojedinih kušanja preporuča čišćenje nepca (Lawless i Heymann, 2010). Smjesa dviju molekula čija je koncentracija malo ispod osjetilnog praga svejedno može biti detektirana, dok odvojene ne mogu. Što je broj molekula u smjesi veći to se njihov individualni prag detekcije smanjuje (Drewnowski, 2001). Boja vina može imati utjecaja na krivu procjenu kvalitete vina kao i na samu percepciju okusa. Kao što je prije objašnjeno za voćni miris vina i ovdje se radi o asocijativnom učenju (Jackson, 2014).

2.1.6. Fenoli kao glavni nositelji gorčine i trpkocé vina

Kvalitetu vina određuje odsustvo negativnih aroma i prisustvo nehlapivih molekula, prvenstveno fenolnih spojeva koji značajno utječu na kvalitetu samog vina (Gonzalo-Diago i sur., 2014). Mnogo je istraživanja provedeno u nastojanju povezivanja kemijskog sastava vina sa senzorskim opisima dobivenim tijekom kušanja vina kako bi se odgonetnule molekule odgovorne za percepciju trpkocé i gorčine u vinu (Hufnagel i Hofmann, 2008a). Polifenolni spojevi su odgovorni za svojstva trpkocé i gorčine u vinu koja daju prepoznatljivost crnim vinima (Gonzalo-Diago i sur., 2013). Količina fenolnih spojeva prisutnih u biljkama kao i njihovo svojstvo gorčine ovisi o genetskim i okolišnim čimbenicima, kultivaru, vremenu klijanja, stupnju zrelosti, stupnju procesiranja te uvjetima skladištenja (Goldman i sur., 1999). Koncentracija ukupnih fenola u vinima je od 200 do 3500 mg L⁻¹ ekvivalenta galne kiseline (engl. *gallic acid equivalents*, GAE) (Noble, 1999).

2.1.6.1. Monomerni flavan-3-oli

Monomerni i polimerni flavan-3-oli čine većinu fenolnih spojeva u vinu, a osim u vinu detektirani su i u voću kao što su jabuke te napicima poput čaja (Peleg i sur., 1999). Tijekom procesa fermentacije vina, flavan-3-oli se ekstrahiraju iz kožice i sjemenki grožđa, ali ne iz pulpe s obzirom na to da u njoj nisu prisutni (Gawel, 1998).

Katehin i epikatehin su flavan-3-ol monomeri koji se razlikuju stereomerski prema hidroksilnoj grupi na trećoj poziciji C prstena, a upravo ta razlika ispoljava različita senzorska svojstva (Gawel, 1998). Istraživanja provedena na vinima i model otopinama vina dokazala su da katehin utječe na okus gorčine i osjet trpkocē (Gonzalo-Diago i sur., 2014). U istraživanju Chira i suradnici (2009) istražena su svojstva fenolnih spojeva katehina i galne kiseline pri čemu je utvrđeno da su ove molekule više gorke nego trpkē. Prilikom povećavanja koncentracije katehina u bijelom vinu, došlo je do povećanja intenziteta i trajanja podražaja gorčine i trpkocē, međutim, percepcija okusa gorčine je bila značajno veća u odnosu na osjet trpkocē (Noble, 1994; Gawel, 1998). Epikatehin pokazuje veći maksimalni intenzitet i trajanje podražaja gorčine i trpkocē u odnosu na katehin (Ćurko i sur., 2014). U istim koncentracijama, epikatehin daje veći intenzitet gorčine i gorčina traje duže u odnosu na katehin (Thorngate i Noble, 1995; Peleg i sur., 1999). U model otopinama vina gorčina i trpkocā epikatehina postižu veći intenzitet i duže trajanje podražaja u odnosu na katehin, bilo to pri višim ili nižim koncentracijama (Gawel, 1998). Općenito, smatra se da je okus gorčine u crnom vinu rezultat prisutnosti sljedećih frakcija: monomeri kao što su katehin, epikatehin i epigalokatehin, fenolne kiseline kao što su kutarinska i kaftarinska kiselina te flavonoli kao što je miricetin (Gonzalo-Diago i sur., 2014).

2.1.6.2. Tanini

Tanini su grupa spojeva različitih struktura koji su topljivi u vodi, a imaju sposobnost vezanja i taloženja proteina (Vermerris i Nicholson, 2006; Landon i sur., 2008). Drugi naziv za kondenzirane tanine je proantocijanidini među koje spadaju oligomeri i polimeri flavan-3-ola. Proantocijanidini se u vino ekstrahiraju iz pokožice i sjemenki grožđa tijekom procesa

fermentacije i maceracije (Quijada-Morín i sur., 2012; Gonzalo-Diago i sur., 2013). Najzastupljeniji proantocijanidini u grožđu su dimeri i trimeri koji se uglavnom sastoje od katehina, epikatehina i epikatehin-3-*O*-galatnih podjedinica (Gawel, 1998). Stupanj polimerizacije proantocijanidina utječe na njihovo svojstvo taloženja proteina (Vermerris i Nicholson, 2006).

Procijantocijanidini se nalaze u krutim dijelovima grožđa, ali se njihov udio i struktura razlikuju ovisno o smještenosti u bobici (Fernández i sur., 2007). Proantocijanidini iz sjemenke grožđa sadrže katehin, epikatehin i epikatehin-3-*O*-galat podjedinice (Fernández i sur., 2007; Chira i sur., 2009; Quijada-Morín i sur., 2012). Veličina proantocijanidina sjemenke je između 2. i 17. stupnja polimerizacije. Proantocijanidini pokožice se razlikuju od proantocijanidina sjemenke s obzirom na to da sadrže prodelfinidine (McRae i Kennedy, 2011; Quijada-Morín i sur., 2012). Proantocijanidini pokožice grožđa sadrže i epigalokatehin kao i manje količine galokatehina (Fernández i sur., 2007; Ćurko i sur., 2014). Nadalje, razlika između pokožice i sjemenke je u količini, sastavu i stupnju polimerizacije proantocijanidina. Proantocijanidini pokožice imaju veći stupanj polimerizacije i manji udio galoiliranih podjedinica (3-6 %) u odnosu na proantocijanidine sjemenke (13-29 %)(Chira i sur., 2009; McRae i Kennedy, 2011; Ćurko i sur., 2014). Proantocijanidini pulpe imaju veću molekulsku masu od proantocijanidina sjemenke te sadrže epikatehin-3-*O*-galat i epigalokatehin. Proantocijanidini peteljke mogu utjecati na ukupnu koncentraciju fenolnih spojeva u vinu te potencijalno i na koncentraciju proantocijanidina. Proantocijanidini peteljke imaju stupanj polimerizacije od 4 do 28 podjedinica s manjim udjelom epigalokatehina u odnosu na epikatehin-3-*O*-galat (McRae i Kennedy, 2011). Istraživanja su pokazala kako stupanj polimerizacije i galoilacija proantocijanidina značajno utječu na njihovo svojstvo trpkocé i gorčine (Fernández i sur., 2007).

Manja molekulska masa proantocijanidina sjemenke utječe na okus gorčine vina (Landon i sur., 2008; McRae i Kennedy, 2011). Monomerni flavan-3-oli su više gorki od oligomera, a proantocijanidini manjeg stupnja polimerizacije su više gorki od proantocijanidina većeg stupnja polimerizacije (Vidal i sur., 2003; Gonzalo-Diago i sur., 2014). Proantocijanidini stupnja polimerizacije većeg od četiri uglavom pokazuju trpká svojstva (Gonzalo-Diago i sur., 2013). Kako se stupanj polimerizacije proantocijanidina povećava tako se senzorski prag detekcije

smanjuje (Gawel, 1998). Što se tiče osjeta trpkooće, veličina polimera se pokazala kao najznačajnija strukturna varijabla koja je pozitivno korelirana s percepcijom trpkooće, dok je koncentracija tanina u vinu korelirana s osjetom trpkooće i okusom gorčine (Chira i sur., 2009).

2.1.6.3. Neflavonoidi

Plijesni proizvode tirozol (*p*-hidroksifeniletanol) koji je jedan od predstavnika neflavonoida koji utječe na gorčinu vina. Prosječna koncentracija tirozola u vinu u rasponu je između 2 i 100 mg L⁻¹, dok je njegov senzorski prag osjetljivosti oko 25 mg L⁻¹ što upućuje da doprinosi gorčini vina (Nikfardjam i Pickering, 2008). Eskulin je gorki glikozid koji dospijeva u vino tijekom njegovog starenja u hrastovim bačvama, ali s obzirom na to da je njegov senzorski osjetilni prag 3200 mg L⁻¹, njegov doprinos gorčini vina je zanemariv (Noble, 1994). Najzastupljeniji fenolni spojevi u vakuolama grožđa su hidroksicimetne kiseline. Kafeinska (125 mg L⁻¹) i kumarinska (30 mg L⁻¹) kiselina su najčešći hidroksicinamati u vinu. S obzirom na to da hidroksicinamati mogu sačinjavati 15 % fenolnih spojeva u vinu, mogu značajno doprinijeti intenzitetu trpkooće i gorčine vina (Gawel, 1998). Nekoliko estera hidroksibezojevih (etil ester vanilinske kiseline i etil ester siringinske kiseline) i hidroksicimetnih kiselina (etil ester *p*-kumarinske kiseline i etil ester ferulinske kiseline), također, utječe prvenstveno na gorčinu, ali djelomično i na trpkooću i kiselost vina (Hufnagel i Hofmann, 2008a). Iako pojedinačni ne flavonoidni spojevi možda nemaju utjecaj na senzorske karakteristike vina, kombinacija dviju i više hidroksicimetnih i hidroksibezojevih kiselina vjerojatno ima s obzirom na to da je senzorski prag osjetljivosti smjese niži od praga pojedinačnih spojeva (Gawel, 1998). Koncentracija neflavonoida u crnom vinu je relativno niska (250 mg L⁻¹) u usporedbi s koncentracijom flavonoida (1500 mg L⁻¹), stoga je njihov utjecaj na percepciju gorčine i trpkooće vrlo ograničen. Nadalje, peptidi mogu doprinijeti okusu gorčine, a njihov senzorski prag osjetljivosti je od 1-2 mM. Koncentracija peptida u vinu je izrazito niska i zasigurno niža od njihovog senzorskog praga određenog u vodi, stoga je njihov doprinos gorčini vina ograničen (Gawel, 1998; Sáenz-Navajas i sur., 2012).

2.2. SENZORSKA ANALIZA VINA

Senzorska analiza definirana se kao znanstvena disciplina koja potiče, mjeri, analizira i interpretira svojstva proizvoda koji se zapažaju putem osjetila vida, njuha, opipa, okusa i sluha (Stone i Sidel, 1993). Testovi koji se koriste za enološka istraživanja zahtijevaju specifične uvjete i odgovarajući dizajn istraživanja kako bi se kasnije mogla provesti adekvatna statistička analiza. Statistička analiza može procijeniti stupanj značajnosti varijance kušača i otkriti neočekivane interakcije koje mogu utjecati na krajnji zaključak istraživanja (Jackson, 2014).

2.2.1. Vrste senzorskih testova

Za senzorsku analizu se uglavnom koriste tri vrste testova koji se razlikuju s prema njihovom cilju i načinu odabira sudionika: testovi razlika, deskriptivne analize i hedonistički testovi (Lawless i Heymann, 2010).

2.2.1.1. Testovi razlika

Najjednostavniji senzorski testovi nastoje otkriti postoji li primjetna razlika između dvije vrste proizvoda. Takvi testovi su testovi diskriminacija ili jednostavni testovi razlika. Analiza tih testova provodi se brojanjem točnih i netočnih odgovora odnosno korištenjem statističkih frekvencija i proporcija. Iz rezultata ovih testova zaključuju se razlike koje se temelje na postotku osoba koje su sposobne prepoznati točan proizvod u skupini sličnih proizvoda (Lawless i Heymann, 2010). Klasični primjer testova razlika je triangl test. U ovom testu dva proizvoda su ista, dok treći je različit. Prilikom provođenja triangl testa, sva tri proizvoda se istovremeno prezentiraju sudionicima. Svaki sudionik odabire proizvod koji se razlikuje ili dva proizvoda koja su po njegovom mišljenju ista. Istraživači pomoću triangl testa dobiju podatak o percipiranoj različitosti proizvoda, međutim, triangl test ne objašnjava u kolikoj mjeri se ti proizvodi razlikuju niti zbog kojeg svojstva se oni razlikuju (Lawless i Heymann, 2010).

2.2.1.2. Deskriptivne analize

Druga skupina senzorskih testova kvantificira percipirani intenzitet senzorskih karakteristika nekog proizvoda, a poznati su pod imenom deskriptivne analize. Deskriptivne senzorske analize predstavljaju najkompleksnije metode senzorske procjene. Ovi testovi daju znanstvenicima potpuni senzorski opis proizvoda, omogućuju identifikaciju temeljnih sastojaka i procesnih varijabli te određuju koje su senzorske karakteristike značajne za prihvaćanje proizvoda. U deskriptivnim analizama obično sudjeluje 8-12 panelista koji prolaze proces treniranja pomoću referentnih stadarda kako bi naučili prepoznati određeno senzorsko svojstvo proizvoda. U testovima se koristi numerička skala kojom se naznačuje intenzitet pojedinog svojstva, a koja u konačnici omogućuje statističku obradu podataka. Od panelista se ne traži njihovo hedonističko mišljenje o proizvodu. Podaci dobiveni ovim testovima mogu se povezati s informacijama o prihvaćanju potrošača ili analitičkim rezultatima pomoću statističkih metoda regresije ili korelacije (Lawless i Heymann, 2010).

U ranking testovima proizvodi se rangiraju od najslabijeg do najjačeg prema određenoj karakteristici proizvoda. Prednosti ranking testovi su sljedeće: jednostavno je objasniti upute ispitanicima, jednostavno je rukovati podacima, postupak ocjenjivanja je jednostavan s obzirom da se radi o cijelim brojevima. Ranking testovi se najčešće koriste u hedonističkim testovima, međutim, mogu se koristiti i kod određivanja intenziteta nekog senzorskog svojstva (Lawless i Heymann, 2010).

Tijekom kvantitativne deskriptivne analize (engl. *quantitative descriptive analysis*, QDA), 10-12 sudionika je izloženo različitim varijacijama proizvoda kako bi se što bolje upoznali s njegovim karakteristikama. U završnim fazama treninga, provodi se niz probnih testova što daje statistički uvid u napredak pojedinih kandidata i relativan napredak u odnosu na cijeli panel. Panelisti moraju ponavljati kušanja do čak šest puta što omogućava istraživačima uvid u dosljednost pojedinaca kao i cijelog panela. Rezultati kvantitativne deskriptivne analize se statistički obrađuju analizom varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA) i multivarijantnim statističkim metodama (engl. *multivariate analysis*) (Lawless i Heymann, 2010).

2.2.1.3. Hedonistički testovi

Treća skupina senzorskih testova nastoji kvantificirati stupanj prihvatljivosti ili ne prihvatljivosti određenog proizvoda, a nazivaju se hedonistički ili afektivni testovi. Najdirektniji pristup toj metodi je pružiti sudionicima izbor između nekoliko proizvoda, nakon čega se vidi ako postoji prednost prema određenom proizvodu. Problem takvog pristupa je da ne pruža dovoljno informacija o stupnju sviđanja ili ne sviđanja, zato je u hedonističkim testovima prisutna ljestvica od devet točaka. Svaka točka predstavlja određeni stupanj sviđanja koji može ili ne mora biti opisan riječima s tim da središnja točka predstavlja neutralno. Razmak između bilo kojih dviju susjednih točki je isti što znači da sviđanje raste uvijek istim omjerom. Uobičajeni hedonistički test uključuje 75-150 ispitanika koji redovno koriste taj proizvod. Tijekom testa ispitanici isprobavaju nekoliko verzija proizvoda i daju njihovo hedonističko mišljenje (Lawless i Heymann, 2010).

2.2.2. Uvjeti provođenja senzorske analize

2.2.2.1. *Prostorija*

Idealno osvjetljenje prostorije predstavlja prirodna svjetlost, međutim, tijekom većine testiranja to je nemoguće ostvariti. Bilo koji izvor žarke bijele svjetlosti je prihvatljiv, a poželjno je da bude fluorescentno svjetlo cijelog spektra valnih duljina. Ukoliko se istražuje raspoznavanje boja, poželjno je da se koriste bijeli stolovi ili radne plohe u neutralno obojenim prostorijama. Prostorija za kušanje mora imati odgovarajući protok zraka što je bitno za udobnost kušača te sprječavanje nakupljanja pozadinskih mirisa. Korištenje poklopaca za čaše usporava hlapljenje vina i nakupljanje mirisa u prostoriji. U idealnim uvjetima svaki kušač ima svoju odvojenu poziciju, međutim, ukoliko tako nešto nije moguće, redoslijed prezentiranja vina mora biti različit za svakog kušača ili raspored kušača mora biti takav da kušači ne vide jedan drugog kako bi se onemogućila bilo kakva interakcija između njih. Tišina u prostoriji olakšava koncentraciju, a ukoliko se kušanje provodi u tišini, vjerojatnost uspjeha se povećava. Temperatura prostorije mora biti 20-22 °C s relativnom vlažnosti zraka 50-55% čime se postiže optimalna udobnost za kušače (Lawless i Heymann, 2010; Jackson, 2014).

2.2.2.2. Vina

Broj vina koji se ocjenjuju tijekom jednog kušanja ovisi o zahtjevnosti senzorske procjene svakog uzorka. Ukoliko se od kušača zahtjeva odbacivanje pokvarenih uzoraka, tada je moguća procjena 20-50 vina, međutim, ukoliko se traži detaljna procjena sličnih vina, tada je moguća procjena 5-6 vina. Vina se moraju kušati umjerenom brzinom kako bi se izbjegla adaptacija mirisa i nakupljanje osjeta trpkocē. Za kritičku procjenu izrazito zahtjevnih uzoraka, preporučaju se češće i duže stanke između njih (Jackson, 2014).

Oblik čaše može utjecati na percepciju vina tijekom kušanja. Za kušanje bijelih i crnih vina preporučuje se korištenje čaša odobrenih od Međunarodne organizacije za normizaciju (engl. International Standard Organisation, ISO)(ISO 3591, 1977). Takve čaše ispunjavanju osnovne zahtjeve potrebne za optimalno kušanje vina; dno čaše je šire u odnosu na vrh čaše, staklo je čisto i bezbojno, zaobljene strane omogućuju intenzivnije miješanje. Za optimalno miješanje vina čaša ne bi smjela biti više od trećine puna. Ukoliko nije moguće korištenje takvih čaša, bitno je odabrati čaše istog oblika. Svaka čaša treba biti napunjena istom količinom vina što pruža iste uvjete kušanja za svaki uzorak. Optimalna količina vina u čaši je 30-50 mL. Takva količina omogućuje držanje čaše pod kutem prilikom procjene boje i bistroće vina, ekonomična je te omogućuje intenzivno miješanje što oslobađa aromatične spojeve. Nakon što kušanje završi, čaše se moraju temeljito oprati, isprati i spremiti u odgovarajuće kutije. Zaostala boja i mirisi mogu značajno utjecati na percepciju vina prilikom narednog kušanja (Jackson, 2014).

Opće-prihvaćena temperatura serviranja crnih vina je između 18 i 20 °C, dok za bijela vina ne postoji suglasnost. Neki znanstvenici predlažu temperaturu između 11-13 °C, dok drugi temperaturu od 16 °C. Optimalna temperatura serviranja pjenušavih vina je između 8 i 13 °C. Što je bijelo vino slađe, to bi njegova temperatura serviranja trebala biti niža. Temperatura serviranja slatkih fortificiranih vina je 16 °C, dok je za suha fortificirana vina između 8 i 14 °C (Jackson, 2014).

Ukoliko se procjenjuju različite skupine vina, preporuka je da redosljed serviranja bude sljedeći: bijelo prije crnog, suha prije slatkih te mlada prije starih. Svako sljedeće vino bi se trebalo razlikovati od prijašnjeg kako bi se zadržao interes kušača i smanjio osjetilni umor

(Jackson, 2014). Uzorci se moraju numerirati nasumičnim troznamenkastim brojevima kako bi se spriječile nepotrebne asocijacije. Redoslijed prezentiranja uzoraka bi isto trebao biti različiti između dva termina kušanja. U većini senzorskih analiza koje uključuju kušanje hrane ili pića, preporuča se pljuvanje uzorka čime se smanjuje utjecaj jednog uzorka na drugi i zaostajanje okusa u ustima (Lawless i Heymann, 2010).

2.2.2.3. Ispitanici

Prilikom odabira kandidata, voditelj senzorskog istraživanja mora detaljno i jasno objasniti sve što od njih očekuje. Osobito je važno obratiti pozornost na količinu vremena koje svaki sudionik treba uložiti. Sve informacije o vrsti proizvoda moraju biti dostupne potencijalnim kandidatima prije nego što se odluče pristati na istraživanje. Kandidati moraju znati ukoliko postoji određena nagrada na kraju istraživanja (Lawless i Heymann, 2010).

Voditelj senzorskog istraživanja treba provjeriti senzorske sposobnosti potencijalnih kandidata. Prilikom takvog testiranja, voditelj ne mora strogo gledati na moguće pogreške u odgovorima s obzirom na to da se prosječni ispitanik tijekom treninga znatno poboljša i upravo zbog toga nije potrebno odabrati samo najbolje kandidate na početku treninga. Za odabir poželjnih kandidata voditelj panela mora izraditi odgovarajuće testove koji su prikladni za vrstu proizvoda koji se ocjenjuje. Ukoliko se od panelista očekuje rješavanje samo testova razlika, onda početni testovi selekcije kandidata trebaju sadržavati samo testove razlika. Međutim, ukoliko se od panelista očekuje rješavanje ranking testova, onda početni testovi selekcije trebaju sadržavati testove razlika i ranking testove (Lawless i Heymann, 2010).

Senzorsku procjenu vina vrše utrenirani senzorski panelisti. Intenzitet i trajanje treninga ovisi o vrsti senzorskog testa kao i razini senzorskog raspoznavanja koje se želi postići. Za većinu deskriptivnih testova potreban je duži i kompleksniji period treniranja, dok je za testove razlika potreban znatno kraći i jednostavniji trening. Senzorski trening se sastoji od niza kušanja koja uključuju različite vrste vina. Senzorskim treningom povećava se dosljednost ispitanika u prepoznavanju i imenovanju karakteristika vina, međutim, treningom se nikada ne može potpuno ukloniti genetska predodređenost za određeno svojstvo. Za vrijeme treninga se uglavnom koriste

uzorci pripremljeni u vodi ili uzorku vina. Instrukcije za paneliste vezane za svako kušanje moraju biti sažete i jasne. Idealno je da se uputstva usmeno objasne panelistima prije ulaska u prostoriju kušanja te pismeno na papiru na kojem se nalazi senzorski test (Lawless i Heymann, 2010; Jackson, 2014).

2.2.3. Tehnika kušanja vina

U usta se uzme gutljaj od 6-8 mL vina. Volumen svakog gutljaja treba biti što sličniji kako bi se mogla napraviti dosljedna usporedba između uzoraka vina. Pomicanjem čeljusti i jezika, vino se dovodi u doticaj sa svim senzorkim regijama u ustima. Najprije dolaze do izražaja okus slatkoće i kiselosti. Okus slatkoće najviše dolazi do izražaja pri vrhu jezika. Okus kiselosti najviše dolazi do izražaja na bočnim stranama jezika i unutrašnjoj strani obraza. Okusu gorčine treba čak do 15 sekundi da postigne maksimalni intenzitet i to obično na stražnjoj strani jezika, zato je od izrazite važnosti da vino bude u ustima najmanje 15 sekundi. Za to vrijeme, kušač se mora usredotočiti na pojavu raznih osjeta kao što su trpkoca, bockanje, temperatura. Nijedan od osjeta nije lokaliziran, nego se pojavljuje po cijeloj površini usta. Na samom kraju, važan je dojam vina odnosno način na koji se svi navedeni podražaji zajedno uklapaju (Jackson, 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

3.1.1. Vina

Za vrijeme treninga kandidata za senzorski panel korištena su dva vina:

- Graševina, Belje, 2014
- Cabernet Sauvignon, Agrolaguna, 2014

Za vrijeme senzorske procjene i kemijske analize korišteno je jedanaest vina (sedam bijelih, jedan rose te četiri crnih):

- Chardonnay, Galić, 2014
- Graševina de Gotho, Kutjevo, 2014
- Malvazija, Kozlović, 2015
- Muškat žuti, Bolfan Libertin, 2015
- Sauvignon blanc, Korak, 2015
- Traminac, Trs vrh, 2015
- Rosé, Tomaz, 2015
- Cabernet Sauvignon, Castillo de Molina, 2013
- Merlot, Belje, 2011
- Pinot noir, Bolfan Libertin, 2013
- Teran, Degrassi, 2010

3.1.2. Kemikalije

Reagensi korišteni za pripremu standarda te za kemijsku analizu bili su najmanje pro analysis (p.a.) stupnja čistoće:

- 0,1 M natrijev hidroksid, p.a., Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Aluminijev sulfat, 99,9 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD
- Enološki tanini (TANIN VR GRAPE® - tanini grožđa), Laffort, Bordeaux, Francuska
- Etanol (96 %), p.a., Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska
- Kafein, 98,5 %, AcrosOrganics, Geel, Belgija
- Klorovodična kiselina (37 %), p.a., Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska
- L -(+)- vinska kiselina, p.a., Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidroksid, 97%, AcrosOrganics, Geel, Belgija

3.1.3. Aparatura

- Analitička vaga, MettlerToledo, Greifensee, Švicarska
- pH metar, inoLab 720, WTW GmbH, Weilheim, Njemačka
- UV/Vis spektrofotometar, SPECORD®50 PLUS, AnalytikJena, Jena, Njemačka

3.2. METODE

3.2.1. Odabir ispitanika i treniranje senzorskog panela

U ovom radu je sudjelovalo 27 ispitanika (15 muškaraca i 12 žena). Svi ispitanici su se dobrovoljno prijavili za istraživanje. Na početku istraživanja, ispitanicima je objašnjeno što se od njih očekuje te im je naglašeno da za sudionike nije planirana nikakva novčana nagrada. Svi sudionici su djelatnici i studenti Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Selekcija ispitanika je provedena pomoću dva testa, a za treniranje panela je korišteno devet

testova. Pregled svih testova te koncentracije korištenih standarda prikazani su u Prilogu 2. Cijeli proces odabira i treninga ispitanika je trajao šest tjedana, a sam trening proveden je na Prehrambeno biotehnološkom fakultetu. Referentni standardi, korišteni u ovom radu su vinska kiselina (kiselost), kafein (gorčina) te enološki tanini (gorčina i trpkoca) (ISO 8586, 1993). S obzirom na to da kiselost i trpkoca znatno utječu na gorčinu, određeni broj testova tijekom odabira i treninga panelista proveden je korištenjem otopina vinske kiseline i enoloških tanina.

Test prepoznavanja okusa/osjeta

Prva selekcija ispitanika provedena je testom prepoznavanja okusa/osjeta (Test 1). U ovom testu su pripremljene vodene otopine kafeina ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) i enoloških tanina (1 g L^{-1}). U vodenu otopinu je dodano i 2 % etanola radi poboljšanja topljivosti standarda. Svaka otopina je postavljena u zasebnu crnu čašu na koju je nalijepljen nasumično odabrani troznamenasti broj. Volumen uzorka u svakoj čaši iznosio je 30 mL. Ovaj volumen je korišten i u svim ostalim testovima. Prije samog početka kušanja, ispitanicima je detaljno objašnjena tehnika kušanja vina (2.2.3.) kako bi se od samog početka usredotočili na pravilno percipiranje okusa/osjeta tijekom kušanja. U ovom testu, zadatak kandidata bio je kušati uzorke i navesti prepoznati okus/osjet. Primjer testa je prikazan na Slici 1.

TEST PREPOZNAVANJA OKUSA/OSJETA					
Datum ispitivanja: _____					
Ime i prezime ocjenjivača: _____					
Kušajte uzorke navedenim redoslijedom.					
Broj uzorka	Da li osjećate okus/osjet?		Da li ga prepoznajete?		Naznačite prepoznati okus/osjet
	DA	NE	DA	NE	
000	DESTILIRANA VODA				
713					
492					

Slika 1. Test 1: Test prepoznavanja okusa/osjeta

Triangl test

Druga selekcija ispitanika provedena je triangl testom (Test 2). U ovom testu su pripremljene otopine kafeina ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) i enoloških tanina ($0,5 \text{ g L}^{-1}$) u model otopini vina. Model otopina vina pripremljena je na način da je u destiliranu vodu dodano 12 % etanola, 4 g L^{-1} vinske kiseline te je pH otopine podešen na 3,5 pomoću natrijeva hidroksida. U jednom terminu kušanja provedena su četiri triangl testa: dva s dodatkom kafeina u model otopini vina, a dva triangl testa s dodatkom enoloških tanina u model otopinu vina. Triangl testovi s kafeinom su provedeni prije testova s enološkim taninima te je između kušanja obavezno bilo napraviti pauzu kako bi se ublažio „carry-over“ efekt. U jednom triangl testu otopina koja se razlikovala bila je otopina standarda u model otopini vina, a druge dvije su bile model otopine vina, dok u drugom triangl testu otopina koja se razlikovala bila je model otopina vina, a druge dvije su bile otopine standarda u model otopini vina. Redoslijed postavljanja numeriranih crnih čaša prikazan je u Prilogu 2. U ovom testu, zadatak kandidata bio je kušati uzorke i naznačiti koji se uzorak razlikuje od preostala dva te navesti prepoznati okus/osjet. Primjer testa za jedan okus/osjet s paralelnim kušanjem prikazan je na Slici 2. Triangl testom završila je selekcija kušača te je prema rezultatima testova sastavljen senzorki panel.

TRIANGL TEST

Datum ispitivanja: _____

Ime i prezime ocjenjivača: _____

Kušajte uzorke s lijeve na desnu stranu i zaokružite uzorak koji se razlikuje od preostala dva te naznačite prepoznati okus/osjet.

Okus/Osjet:

815	430	164	_____
239	798	371	_____

Slika 2. Test 2: Triangl test

Ranking testovi

Ranking testovima (Test 3-9) započela je faza treniranja senzorskog panela. U ranking testovima referentni standardi su otopljeni u bijelom (Graševina, Belje, 2014) i crnom vinu (Cabernet Sauvignon, Agrolaguna, 2014). U trećem testu su pripravljene tri otopine kafeina (0-0,5-1 g L⁻¹) i tri otopine enoloških tanina (0-1-2 g L⁻¹) u bijelom vinu. U četvrtom testu su pripravljene tri otopine kafeina (0-0,5-1 g L⁻¹) i tri otopine enoloških tanina (0-1-2 g L⁻¹) u crnom vinu. U petom testu su pripravljene četiri otopine kafeina (0-0,5-1-2 g L⁻¹) u bijelom vinu. U šestom testu su pripravljene četiri otopine enoloških tanina (0-1-2-4 g L⁻¹) u crnom vinu. U sedmom testu su pripravljene četiri otopine kafeina (0-0,5-1-2 g L⁻¹) u crnom vinu. U osmom testu su pripravljene tri otopine, ali u ovom slučaju svaka se otopina sastoji od kombinacije triju standarda (vinska kiselina (0-1-0,5 g L⁻¹), kafein (0,5-1-0 g L⁻¹), enološki tanini (0-1-0,5 g L⁻¹)) otopljenih u bijelom vinu. U devetom testu su pripravljene tri otopine, ali u ovom slučaju svaka se otopina sastoji od kombinacije triju standarda (vinska kiselina (2-1-0 g L⁻¹), kafein (2-0,5-1 g L⁻¹), enološki tanini (2-1-0 g L⁻¹)) otopljenih u crnom vinu (Prilog 2). U ovim testovima, zadatak kušača bio je kušati uzorke i poredati ih prema intenzitetu okusa/osjeta počevši od najnižeg prema najvišem intenzitetu. Primjer ranking testa je prikazan na Slici 3.

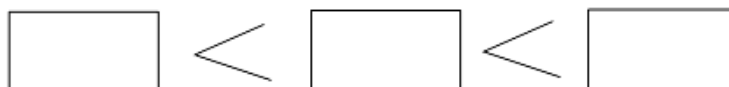
RANKING TEST

Datum ispitivanja: _____

Ime i prezime ocjenjivača: _____

INTENZITET GORČINE

Nakon što kušate sva tri uzorka poredajte ih prema intenzitetu gorčine počevši od najnižeg prema najvišem intenzitetu gorčine.



Slika 3. Test 3-9: Ranking test

Kvantitativna deskriptivna analiza

Kvantitativnim deskriptivnim analizama (Test 10-11) završava treniranje senzorskog panela. Kvantitativna deskriptivna analiza je provedena ocjenjivanjem uzoraka bijelog (Graševina, Belje, 2014) i crnog vina (Cabernet Sauvignon, Agrolaguna, 2014) u koje su dodani referentni standardi. U testovima je za procjenu intenziteta okusa/osjeta korištena numerička skala 0-7. Brojevi na skali predstavljaju sljedeće opise intenziteta: 0 = bez osjeta, 1 = vrlo slab, 2 = slab, 3 = srednji, 4 = snažni, 5 = vrlo snažni, 6 = intenzivni, 7 = vrlo intenzivni. U desetom testu su pripravljene dvije otopine pri čemu je svaka otopina pripravljena kombinacijom dva standarda (kafein ($0-1 \text{ g L}^{-1}$), enološki tanini ($0-1 \text{ g L}^{-1}$)) otopljenih u bijelom vinu. Za test je pripravljena i referentna otopina poznatog intenziteta (poznati intenzitet za gorčinu je postavljen na vrijednost 3) koja je također kombinacija dva standarda (kafein ($0,5 \text{ g L}^{-1}$), enološki tanini ($0,5 \text{ g L}^{-1}$)). U jedanaestom testu su pripravljene dvije otopine pri čemu je svaka otopina također kombinacija dva standarda (kafein ($2-0 \text{ g L}^{-1}$), enološki tanini ($0-2 \text{ g L}^{-1}$)). Slično prethodnom testu, pripravljena je i referentna otopina poznatog intenziteta (poznati intenzitet za gorčinu je postavljen na vrijednost 4) koja je također kombinacija dva standarda (kafein (1 g L^{-1}), enološki tanini (1 g L^{-1})) otopljenia u crnom vinu. Senzorskom panelu je u svakom testu bila dostupna čaša s vodom kako bi im se olakšalo i ubrzalo čišćenje nepca. Međutim, s obzirom na to da je kvantitativna deskriptivna analiza dosta zahtjevna, kušaćima je bio dostupan i bijeli kruh. U

ovim testovima, zadatak senzorskog panela bio je kušati referentni uzorak te u odnosu na njega ocijeniti intenzitet gorčine preostala dva numerirana uzorka koristeći skalu od 0-7. Primjer testa kvantitativne deskriptivne analize je prikazan na Slici 4.

TEST KVANTITATIVNE DESKRIPTIVNE ANALIZE

Datum ispitivanja: _____

Ime i prezime ocjenjivača: _____

Kušajte referentni uzorak (000) te u odnosu na njega ocijenite intenzitet gorčine preostala dva uzorka koristeći skalu od 0-7.

GORČINA		0	1	2	3	4	5	6	7
0 = bez osjeta									
1 = vrlo slaba									
2 = slaba	000	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3 = srednja	317	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4 = snažna									
5 = vrlo snažna	965	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6 = intenzivna									
7 = vrlo intenzivna									

Slika 4. Test 10-11: Kvantitativna deskriptivna analiza

3.2.2. Senzorska procjena intenziteta gorčine vina

Procjena intenziteta gorčine vina provedena je kvantitativnom deskriptivnom analizom u dva termina kušanja. U prvom terminu su ocijenjena bijela vina, dok u drugom rose i crna vina. Dan prije procjene, vina su stavljena na hlađenje te su tako bijela i rose vina postigla temperaturu od 12 °C, a crna vina 18 °C. U kvantitativnoj deskriptivnoj analizi referentni standardi su otopljeni u bijelom (Graševina, Belje, 2014) i crnom vinu (Cabernet Sauvignon, Agrolaguna, 2014). Za procjenu gorčine bijelih vina pripravljena je referentna otopina koja je kombinacija dva standarda (kafein (0,5 g L⁻¹), enološki tanini (0,5 g L⁻¹)) te je intenzitet gorčine za ovu otopinu označen s vrijednosti 3. Za procjenu gorčine rose i crnih vina pripravljena je referentna otopina koja je kombinacija dva standarda (kafein (1 g L⁻¹), enološki tanini (1 g L⁻¹)) što

predstavlja intenzitet gorčine za ovu otopinu u vrijednosti 4. Prije početka službene senzorske procjene, senzorskom panelu je još jedanput pojašnjena tehnika kušanja vina te opisan njihov zadatak. Zadatak senzorskog panela bio je kušati referentni uzorak te u odnosu na njega ocijeniti intenzitet gorčine preostalih uzoraka koristeći skalu od 0-7. Primjer testa senzorske procjene je prikazan na Slici 5.

TEST KVANTITATIVNE DESKRIPTIVNE ANALIZE									
Datum ispitivanja: _____									
Ime i prezime ocjenjivača: _____									
Kušajte referentni uzorak (000) te u odnosu na njega ocijenite intenzitet gorčine preostalih šest uzoraka koristeći skalu od 0-7.									
GORČINA									
0 = bez osjeta									
1 = vrlo slaba	000	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2 = slaba	137	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3 = srednja	260	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4 = snažna	442	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5 = vrlo snažna	785	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6 = intenzivna	909	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7 = vrlo intenzivna	961	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Slika 5. Kvantitativna deskriptivna analiza na dan ocjenjivanja

3.2.3. Određivanje pH vina

Princip određivanja

Princip određivanja pH vrijednosti se temelji na razlici potencijala između dviju elektroda uronjenih u vino. Jedna od tih elektroda ima potencijal koji je u ovisnosti o pH vina, dok druga elektroda je referentna elektroda koja ima poznati i stalni potencijal (OIV, 2015a).

Postupak određivanja

Prije samog mjerenja pH kalibrirati prema uputama za korištenje. Prilikom analize uzoraka, pH elektrodu uroniti u uzorak vina sobne temperature te direktno očitati pH vrijednost s uređaja.

3.2.4. Određivanje kiselosti vina

Princip određivanja

Princip određivanja kiselosti vina se temelji na potenciometrijskoj titraciji uzorka s otopinom natrijevog hidroksida. Sve slobodne organske i anorganske kiseline te njihove soli kao i druge kisele tvari neutraliziraju se otopinom natrijevog hidroksida. Iz ukupnog utroška natrijevog hidroksida izračuna se ukupna kiselost. Ukupna kiselost se izražava kao g L^{-1} vinske kiseline (OIV, 2015b).

Postupak određivanja

U laboratorijsku čašu otpipetirati 10 mL vina. Uz lagano miješanje titrirati s 0,1 M natrijevim hidroksidom sve do postizanja vrijednosti od pH 7.

Postupak izračunavanja

Ukupnu kiselost vina izračunati prema sljedećoj formuli:

$$\text{Ukupna kiselost (g L}^{-1}\text{)} = 0,75 \times a \times f, \text{ pri čemu je}$$

0,75: faktor za preračunavanja kiselosti na vinsku kiselinu

a: volumen (mL) 0,1 M natrijevog hidroksida utrošenog za neutralizaciju

f: faktor 0,1 M natrijevog hidroksida ($f = 1,000$)

3.2.5. Određivanje ukupnih tanina

Princip određivanja

Ukupni tanini određuju se prema Bate-Smith metodi, baziranoj na kiselinskoj hidrolizi proantocijanidina pri temperaturi od 100 °C pri čemu dolazi do formiranja obojenih antocijanidina (Ribereau-Gayon et Stonestreet, 1966). Spektrofotometrijski se određuje razlika obojenja pri 550 nm između hidroliziranog zagrijanog i nezagrijanog uzorka. Ta razlika pokazuje količinu tanina.

Postupak određivanja

Uzorak vina najprije razrijediti 50 puta. U dvije tube za hidrolizu otpipetirati 2 mL razrijeđenog uzorka vina, 1 mL destilirane vode i 3 mL klorovodične kiseline. Nakon toga tube hermetički zatvoriti. Jednu tubu ostaviti na sobnoj temperaturi, a drugu uroniti u vodenu kupelj zagrijanu na temperaturu od 100 °C. Tubu ostaviti u vodenoj kupelji u periodu od 30 minuta nakon čega ju je potrebno izvaditi i ohladiti u ledu u trajanju od 5 minuta. Nakon toga, u obje tube dodati 0,5 mL etanola te izmjeriti optičku gustoću pri valnoj duljini od 550 nm nastuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Postupak izračunavanja

Koncentraciju tanina u razrijeđenom uzorku izračunati prema sljedećoj formuli:

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

19,33: faktor preračunavanja

D1: optička gustoća hidroliziranog uzorka

D2: optička gustoća nehidroliziranog uzorka

3.2.6. Statistička obrada podataka

Test prepoznavanja okusa/osjeta i Triangl test

Analiza rezultata ovih testova je provedena izravnim brojenjem točnih i netočnih odgovora ispitanika iz čega je izračunat postotak osoba koje su uspješno riješile testove. Osobe koje su točno riješile testove su odabrane za sljedeću fazu treniranja (Lawless i Heymann, 2010).

Ranking testovi

Analiza rezultata ovih testova provedena je Pageovim testom koji je varijacija Friedmanovog testa. Ovim testom se utvrđuje sposobnost kušača u rangiranju proizvoda prema određenom svojstvu (gorčina, trpkocá). Postavljena je hipoteza da su kušači sposobni rangirati otopine prema njihovoj koncentraciji. Za ispitivanje ove hipoteze najprije je izračunati koeficijent L (ISO 8587, 2006).

$$L = R_1 + 2R_2 + 3R_3 + \dots + PR_P, \text{ pri čemu je}$$

R: rang koji je pridodan svakom uzorku

U ovoj formuli uzorci se uvrštavaju prema pravilnom rastućem redosljedu koncentracija uzoraka. Vrijednost koeficijenta L je veća što je sposobnost ispitanika u rangiranju uzoraka bolja, a maksimalna vrijednost se postiže ukoliko svi ispitanici pravilno rangiraju uzorke. Pomoću koeficijenta L možemo izračunati L' koji približno prati standardnu normalnu distribuciju.

$$L' = \frac{12L - 3J \times P(P+1)^2}{P(P+1) \sqrt{J(P-1)}}, \text{ pri čemu je}$$

J: broj kušača

P: broj uzoraka

Uspoređujući L' s graničnim vrijednostima možemo prihvatiti ili odbiti početnu hipotezu s određenom statističkom značajnošću. Početna hipoteza je prihvaćena ukoliko:

$$L' > 1,64 \text{ (} p < 0,05 \text{)}$$

$$L' > 2,33 \text{ (} p < 0,01 \text{)}$$

Kvantitativna deskriptivna analiza

Analiza rezultata QDA testova provedena je dvosmjernom analizom varijance. Analizom varijance, općenito, se utvrđuje postojanje zamjetnih razlika između dva ili više vina kao i postojanje razlika između kušača. Analiza varijance omogućava i procjenu značajnih interakcija između faktora. Rezultati ove analize interpretiraju se s razinom značajnosti od $p = 0,05$. Rezultati za vina razine značajnosti $p < 0,05$ ukazuju na postojanje statistički značajne razlike između analiziranih vina, dok razina značajnosti rezultata $p > 0,05$ ukazuje da ne postoji statistički značajna razlika između ocijenjenih vina. Isto vrijedi i za senzorski panel, rezultati razine značajnosti $p < 0,05$ ukazuju na postojanje statistički značajne razlike između kušača, dok razina značajnosti rezultata $p > 0,05$ ukazuje da ne postoji značajna razlika između kušača, tj. senzorski panel možemo smatrati homogenim. Ovom analizom moguće je odrediti samo postojanje razlika između kušača ili vina, ali ne i koje se vino ili kušač razlikuje od ostalih (Jackson, 2014).

Pearsonov koeficijent korelacije

Povezanost između intenziteta gorčine i koncentracije ukupnih tanina u vinu utvrđena je Pearsonovim koeficijentom korelacije. Pearsonovim koeficijentom korelacije utvrđuje se povezanost dviju varijabli koje su u linearnom odnosu. Kada su dvije varijable u linearnom odnosu, promjena jedne varijable dovodi do promjene druge varijable. Zavisnosti jedne varijable u odnosu na drugu mjeri se nagibom pravca tih dviju varijabli. Pearsonov koeficijent korelacije (r) izračunava se prema sljedećoj formuli (Lawless i Heymann, 2010):

$$r = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{\left[\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right] \left[\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right]}}, \text{ pri čemu je}$$

x: vrijednosti nezavisnih varijabli

y: vrijednosti zavisnih varijabli

n: broj varijabli

Vrijednost Pearsonovog koeficijenta korelacije je uvijek između -1 i +1. Vrijednosti koje su blizu 1 ukazuju na postojanje vrlo snažne linearne povezanosti između dvije varijable. Ukoliko je $r = 0$, tada nema linearne povezanosti između varijabli. Pozitivne vrijednosti r ukazuju na sklonost dviju varijabli da se zajedno povećavaju. Negativne vrijednosti r ukazuju na sklonost rasti jedne varijable, dok se druga varijabla istodobno smanjuje. Pearsonov koeficijent korelacije se obično prikazuje s njegovim stupnjom značajnosti.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je selekcija i trening senzorskog panela za analizu intenziteta gorčine u vinu. Uz senzorsku analizu provedena je i fizikalno-kemijska analiza ocijenjenih uzoraka vina. Selekcija kušača provedena je testom prepoznavanja okusa/osjeta te triangl testom, a rezultati su prikazani u Tablici 1. Trening senzorskog panela se sastojao od ranking testova i kvantitativne deskriptivne analize čiji su rezultati prikazani u Tablici 2 i Tablici 3. Rezultati senzorske procjene gorčine vina, utreniranim senzorskim panelom, primjenom kvantitativne deskriptivne analize prikazani su grafički na Slikama 6 i 7. Rezultati analitičkog određivanja prikazani su u Tablici 4 (određivanje ukupnih tanina Bate-Smith metodom) i Tablici 5 (potenciometrijsko određivanje ukupne kiselosti, određivanje pH vrijednosti, udio alkohola u vinu). Udio alkohola u vinu nije određivan analitički, već je očitano direktno s boce s obzirom na to da je ovaj podatak naveden na svakoj deklaraciji vina. U Tablici 6 prikazan je Pearsonov koeficijent korelacije između koncentracije ukupnih tanina i intenziteta gorčine.

4.1. RAZVOJ I TRENIRANJE SENZORSKOG PANELA ZA PROCJENU GORČINE VINA

Test prepoznavanja okusa/osjeta i Triangl test

Selekcija ispitanika provedena je testom prepoznavanja okusa/osjeta i triangl testom u kojima su korištene otopine standarda enoloških tanina i kafeina. Početni broj ispitanika koji je sudjelovao u ispitivanju iznosio je 27. U testu prepoznavanja okusa/osjeta svi ispitanici su prepoznali okus gorčine, dok je osjet trpkocē s gorčinom prepoznalo 24 od 27 ispitanika (88,89 %). Kako je ovaj test bio prvi susret s različitim otopinama okusa/osjeta, kandidatima je bilo teže prepoznati enološke tanine, s obzirom na to da su oni kombinacija okusa gorčine i osjeta trpkocē pa je zato njih prepoznao manji broj kušača. Za triangl test odabrano je 24 kandidata. Daljnja selekcija napravljena je primjenom triangl testova u kojima je utvrđena lošija uspješnost kandidata za prepoznavanje okusa/osjeta. Od 24 ispitanika, 18 (75 %) ih je točno riješilo triangl test za gorčinu, a samo 14 (58,33 %) ih je točno riješilo triangl test za osjet trpkocē s gorčinom. Triangl test je zahtjevnija vrsta testa u odnosu na test prepoznavanja okusa/osjeta što objašnjava lošiju uspješnost kandidata u ovom testu. Od početnog broja ispitanika, odabrano je 14 kandidata (51,85 %) koji su nastavili s fazom treninga senzorskog panela. Rezultati selekcije kušača su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1. Selekcija kušača na temelju testa prepoznavanja okusa/osjeta i triangl testa

Standardi	Ukupan broj kušača	Broj odabranih kušača	Postotak odabranih kušača
Test prepoznavanja okusa/osjeta (Test 1)			
gorčina (kafein)	27	27	100
gorčina i trpkocē (enološki tanini)	27	24	88,89
Triangl test (Test 2)			
gorčina (kafein)	24	18	75
gorčina i trpkocē (enološki tanini)	24	14	58,33
UKUPNO	27	14	51,85

Ranking testovi

Ranking testovima započela je faza treniranja senzorskog panela. Ranking testovi su česti oblik treninga senzorskog panela (Thorngate i Noble, 1995; Chira i Teissedre, 2013; Ćurko i sur., 2014). U ranking testovima kušači su imali zadatak da poredaju uzorke prema intenzitetu okusa/osjeta od najslabijeg prema najjačem. Svakom uzorku je dodijeljena odgovarajuća vrijednost intenziteta (1 = najslabiji, 2 = srednji, 3 = najjači). Rezultati svakog ranking testa statistički su obrađeni Pageovim testom, a rezultati su prikazani u Tablici 2. Iz rezultata ranking testova je vidljivo kako je senzorski panel sposoban rangirati otopine prema njihovom intenzitetu okusa/osjeta s obzirom na to da je početna hipoteza prihvaćena za sve ranking testove ($L' > 1,64$; $p < 0,05$). U sedam od devet ranking testova postignuta je još veća razina značajnosti ($L' > 2,33$; $p < 0,01$).

Tablica 2. Trening kušača primjenom ranking testova

Standardi	Broj kušača	Broj uzoraka	Koncentracija uzorka (g L ⁻¹)	L	L'	p vrijednost
Ranking test (Test 3)						
gorčina (kafein)	14	3	0-0,5-1	194	4,913538	< 0,01
gorčina i trpkoca (enološki tanini)	14	3	0-1-2	195	5,102520	< 0,01
Ranking test (Test 4)						
gorčina (kafein)	14	3	0-0,5-1	178	1,889882	< 0,05
gorčina i trpkoca (enološki tanini)	14	3	0-1-2	192	4,535574	< 0,01
Ranking test (Test 5)						
gorčina (kafein)	14	4	0-0,5-1-2	412	5,740085	< 0,01
Ranking test (Test 6)						
gorčina i trpkoca (enološki tanini)	14	4	0-1-2-4	418	6,295577	< 0,01
Ranking test (Test 7)						
gorčina (kafein)	14	4	0-0,5-1-2	405	5,092011	< 0,01
Ranking test (Test 8)						
kiselost (vinska kiselina) gorčina (kafein) gorčina i trpkoca (enološki tanini)	14	3	0-1-0,5 0,5-1-0 0-1-0,5	188	3,779645	< 0,01

Ranking test (Test 9)						
kiselost (vinska kiselina) gorčina (kafein) gorčina i trpkoca (enološki tanini)	14	3	2-1-0 2-0,5-1 2-1-0	180	2,267787	< 0,05

Kvantitativna deskriptivna analiza

Testovima kvantitativne deskriptivne analize završava treniranje senzorskog panela. U ovim testovima je korištena kombinacija dva standarda (kafein (gorčina) i enološki tanini (gorčina i trpkoca)) u vinu kako bi se stvorio kompleksniji doživljaj okusa gorčine te na taj način bolje izvježbao senzorski panel (Sokolowsky i Fischer, 2012), a rezultati su prikazani u Tablici 3. Vina su ocijenjena primjenom numeričke skale 0-7. U desetom testu procijenjena je prva otopina bijelog vina (kafein (0 g L^{-1}), enološki tanini (0 g L^{-1})) te je njezin intenzitet gorčine ocijenjen s vrijednošću 1,9, a to je i bilo za očekivati obzirom na to da je korištena koncentracija standarda u tom uzorku 0 g L^{-1} . Praktički, dobiveni rezultati predstavljaju intenzitet gorčine vina korištenog za pripremu standarda. Intenzitet gorčine druge otopine bijelog vina (kafein (1 g L^{-1}), enološki tanini (1 g L^{-1})) ocijenjen je s vrijednošću 4,1. Usredbom intenziteta gorčine prve (1,9) i druge otopine vina (4,1) može se vidjeti da je dodatak standarda u vino značajno utjecalo na intenzitet percipirane gorčine. Nakon što je provedena analiza varijance, utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između kušača senzorskog panela ($p = 0,8842$). U jedanaestom testu procijenjena je prva otopina bijelog vina (kafein (0 g L^{-1}), enološki tanini (2 g L^{-1})) te je njezin intenzitet gorčine ocijenjen s vrijednošću 2,9. Intenzitet gorčine druge otopine bijelog vina (kafein (2 g L^{-1}), enološki tanini (0 g L^{-1})) ocijenjen je s vrijednošću 4,1. Usporedbom intenziteta gorčine prve (2,9) i druge otopine vina (4,1) može se vidjeti da je senzorski panel sposoban raspoznati razliku između gorčine dobivene dodatkom kafeina te gorčine dobivene dodatkom enoloških tanina. Nakon što je provedena analiza varijance, utvrđeno je kako ne postoji statistički značajna razlika između kušača senzorskog panela ($p = 0,9675$). S obzirom na to da su rezultati koji se odnose na kušače u desetom i jedanaestom testu ($p > 0,05$), može se zaključiti da je ocjenjivanje intenziteta gorčine provedeno od strane

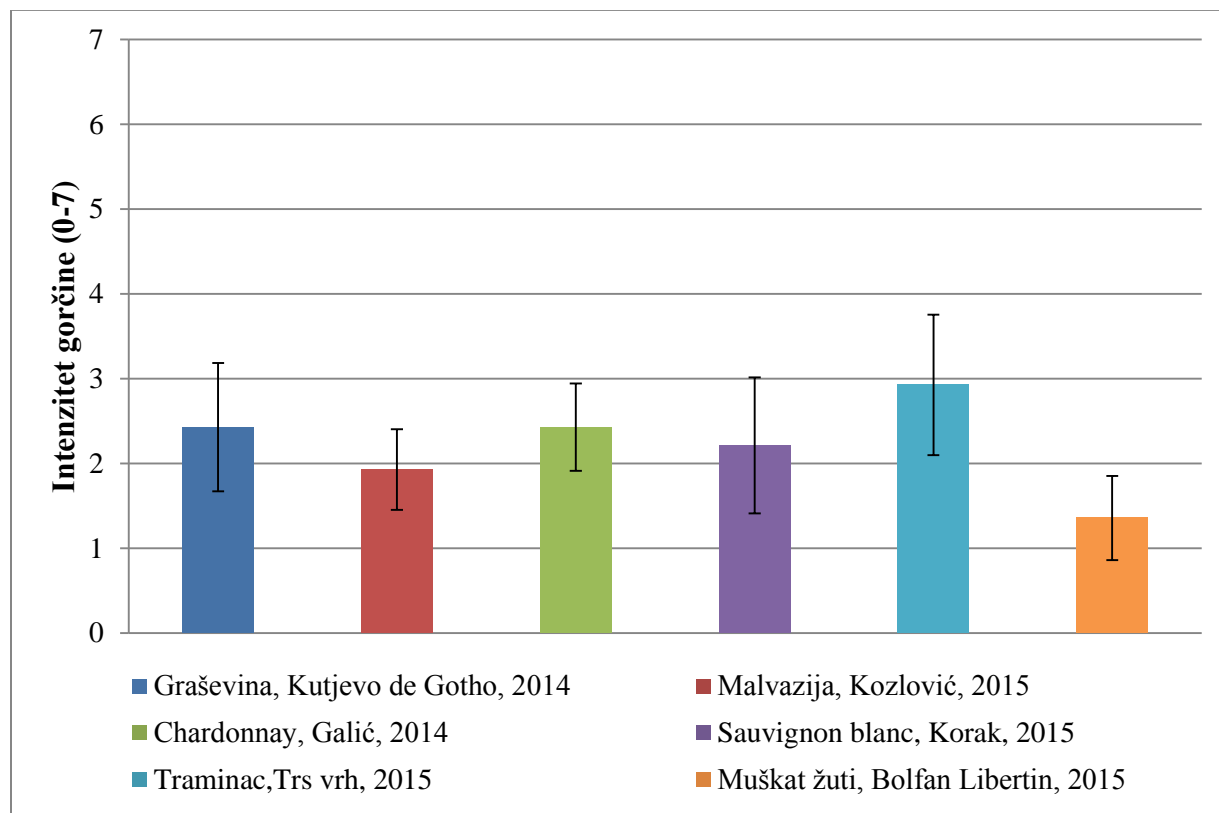
homogenog senzorskog panela. Ovakve rezultate su pokazala i prijašnja istraživanja (Chira i sur., 2011; Sokolowsky i Fischer, 2012).

Tablica 3. Trening kušača primjenom kvantitativne deskriptivne analize (QDA)

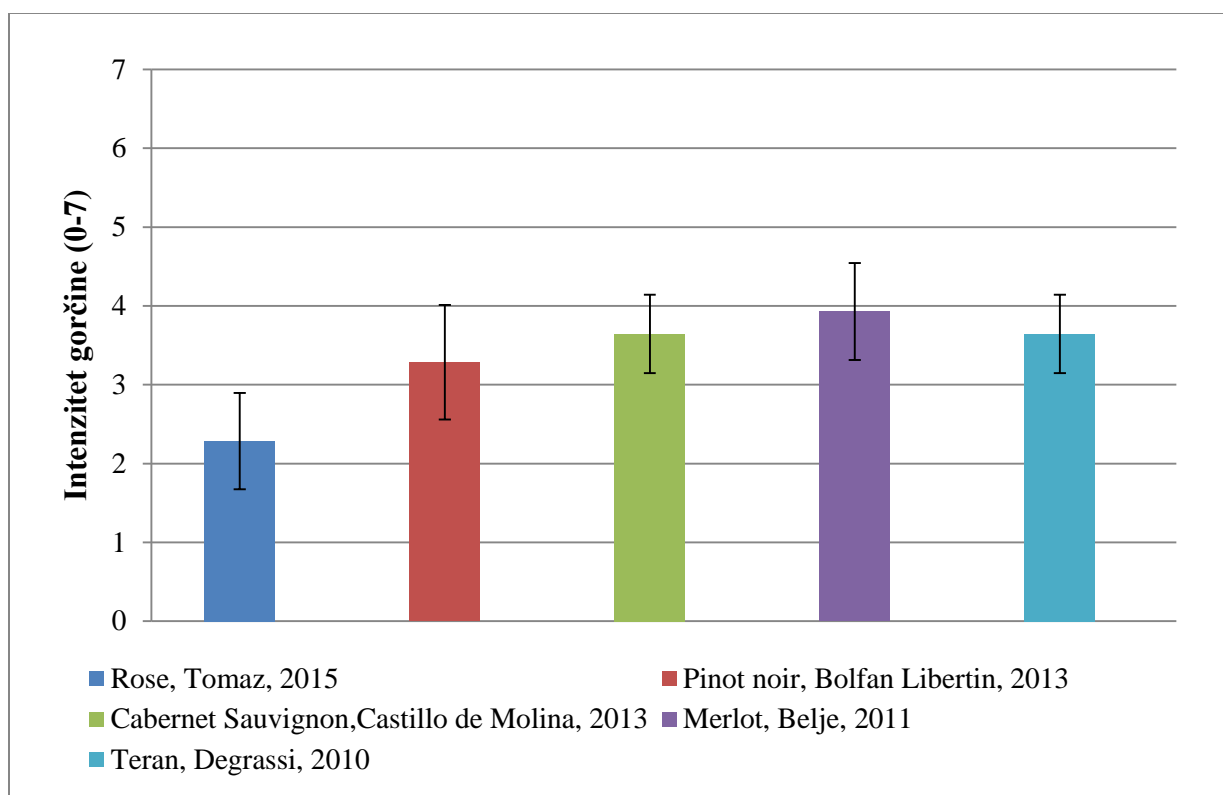
Standardi	Broj kušača	P vrijednost (kušači)	Koncentracija uzorka (g L⁻¹)	Intenzitet gorčine (0-7)
QDA1 (Test 10)				
gorčina (kafain)-K gorčina i trpkoca (enološki tanini)-T	14	0,8842	0K-0T	1,9
			1K-1T	4,1
QDA 2 (Test 11)				
gorčina (kafain)-K gorčina i trpkoca (enološki tanini)-T	14	0,9675	0K-2T	2,9
			2K-0T	4,1

4.2. SENZORSKA PROCJENA INTENZITETA GORČINE VINA

Procjena intenziteta gorčine vina provedena je kvantitativnom deskriptivnom analizom u dva termina kušanja. U prvom terminu kušanja senzorski panel (p kušači = 0,7280) je ocijenio intenzitet gorčine bijelih vina te su rezultati ocjenjivanja sljedeći: Muškat žuti ($1,4 \pm 0,5$), Malvazija ($1,9 \pm 0,5$), Sauvignon blanc ($2,2 \pm 0,8$), Chardonnay ($2,4 \pm 0,5$), Graševina ($2,4 \pm 0,8$), Traminac ($2,9 \pm 0,8$). Rezultati procjene bijelih vina su grafički prikazani na Slici 6. U drugom terminu kušanja senzorski panel (p kušači = 0,4442) je ocijenio intenzitet gorčine jednog rose i četiri crna vina te su rezultati ocjenjivanja sljedeći: Rosé ($2,3 \pm 0,6$), Pinot noir ($3,3 \pm 0,7$), Cabernet Sauvignon ($3,6 \pm 0,5$), Teran ($3,6 \pm 0,5$), Merlot ($3,9 \pm 0,6$). Statistička obrada podataka je pokazala da se sva vina značajno razlikuju ($p < 0,01$). Rezultati službene procjene rose i crnih vina su grafički prikazani na Slici 7.



Slika 6. Intenzitet gorčine bijelih vina



Slika 7. Intenzitet gorčine roze i crnih vina

Iz rezultata je vidljivo kako je senzorski panel crna vina ocijenio višim intenzitetom gorčine u odnosu na bijela vina. Intenzitet gorčine bijelih vina je u rasponu od (1,4-2,9) pri čemu je najnižim intenzitetom gorčine ocijenjen Muškat žuti (1,4), a najvišim Traminac (2,9). Muškat žuti je ocijenjen s najnižim intenzitetom gorčine što je vjerojatno posljedica koncentracije šećera u tom vinu koja smanjuje percipirani intenzitet gorčine (Reboredo-Rodríguez i sur., 2015) Rose vino je ocijenjeno s intenzitetom gorčine od (2,3) što je bliže vrijednostima bijelih u odnosu na crna vina. Tako nešto je bilo za očekivati s obzirom na to da rose vina imaju karakteristike bijelih vina (Wang i sur., 2016). Intenzitet gorčine crnih vina je u rasponu od (3,3-3,9) pri čemu je najnižim intenzitetom gorčine ocijenjen Pinot noir (3,3), a najvišim Merlot (3,9). Razlika u intenzitetu gorčine bijelih i crnih vina posljedica je razlike u koncentraciji polifenolnih spojeva. Koncentracija flavonoida u bijelim vinima je 0-200 mg L⁻¹ GAE, dok u crnim vinima je 800-1600 mg L⁻¹ GAE (Arnold i sur., 1980). U istraživanjima provedenim na bijelim vinima je

ustanovljeno da je intenzitet gorčine u korelaciji s većinom polifenolnih spojeva, a osobito s proantocijanidinima i polimernim fenolima (Arnold i sur., 1980; Oberholster i sur., 2009), dok je u istraživanjima provedenim na crnim vinima ustanovljeno da je intenzitet gorčine u korelaciji s katehinom, epigalokatehinom, fenolnim kiselinama, flavonolima i taninima (Fontoin i sur., 2008; Hufnagel i hofmann, 2008b; Sáenz-Navajas i sur., 2010a; Sáenz-Navajas i sur., 2010b). Struktura polifenolnih spojeva također utječe na intenzitet gorčine u vinima. Flavan-3-ol monomeri, dimeri, trimeri te polimerne frakcije kao što su tanini utječu na intenzitet gorčine u vinu pri čemu s porastom molekulske mase spoja intenzitet gorčine opada, a intenzitet trpkooće raste (Robichaud i Noble, 1990; Peleg i sur., 1999). U mladim vinima su prvenstveno prisutni flavonoidi u obliku monomera, dimera i trimera, dok starenjem dolazi do njihve polimerizacije u molekule veće molekulske mase. Reakcije između flavanola i antocijanina tijekom starenja vina dovode do stvaranja spojeva koji znatno manje utječu na intenzitet gorčine i trpkooće vina (Noble, 1994). Količina polifenolnih spojeva u vinu također ovisi o sorti grožđa, okolišnim čimbenicima (temperatura, svjetlost, vlaga), vremenu dozrijevanja, stupnju zrelosti te stupnju procesiranja (Goldman i sur., 1999).

4.3. KEMIJSKA ANALIZA UZORAKA VINA

Analiza ukupnih tanina provedena je Bate-Smith metodom, a rezultati su prikazani u Tablici 4. Vino s najnižom koncentracijom ukupnih tanina je Malvazija ($75,6 \text{ mg L}^{-1}$), dok je najviša koncentracija ukupnih tanina određena u vinu Cabernet Sauvignon ($3749,4 \text{ mg L}^{-1}$). U prethodnom istraživanju definirane su tipične vrijednosti ukupnih tanina za stolna vina: 45 mg L^{-1} za mlada i 40 mg L^{-1} za stara bijela vina te 1500 mg L^{-1} za mlada i 1365 mg L^{-1} stara crna vina. Pritom je „mlado“ vino definirano kao vino mlađe od šest mjeseci, dok je „staro“ definirano kao bijelo vino staro jednu godinu te crno vino staro dvije godine (Waterhouse, 2002). Proantocijanidini su uključeni u proces pigmentacije zajedno s antocijaninima što doprinosi stabilnosti vina te stvaranju karakteristične tamne crvene boje osobito tijekom starenja vina (Chira i sur., 2011; Quijada-Morín i sur., 2012). Tijekom procesa starenja vina molekule proantocijanidina nastavljaju polimerizaciju što dovodi do promjene svojstva vina. Starija vina

su manje gorka te uglavnom trpka u odnosu na mlađa vina koja imaju dodano svojstvo „oštrine“ uvjetovano gorčinom (Noble, 1994). U istraživanju provedenom u Australiji analizirano je 11 Merlota i 11 Cabernet Sauvignona različitih vinograda i godina proizvodnje (2002-2005. god.) te su utvrđene sljedeće koncentracije ukupnih tanina: Cabernet Sauvignon ($1058-2261 \text{ mg L}^{-1}$), Merlot ($789-1785 \text{ mg L}^{-1}$) (Ginjom i sur., 2010). Uzastopna analiza (2001. i 2002. god.) istih kultivara Cabernet Sauvignona i Merlota u Urugvaju rezultirala je sljedećim rezultatima: Cabernet Sauvignon (2001. god. = $1718,2 \text{ mg L}^{-1}$; 2002. god. = $2390,6 \text{ mg L}^{-1}$), Merlot (2001. god. = $1449,7 \text{ mg L}^{-1}$; 2002. god. = $1976,7 \text{ mg L}^{-1}$) (González-Neves i sur., 2004). Slični rezultati su dobiveni i u istraživanju u Rumunjskoj provedenom na 8 Cabernet Sauvignona i 8 Merlota različitih godišta (2006., 2007., 2008. god.) pri čemu su autori utvrdili sljedeće koncentracije ukupnih tanina: Cabernet Sauvignon (2006. god. = $1399-2022 \text{ mg L}^{-1}$; 2007. god. = $1420-2343 \text{ mg L}^{-1}$; 2008. god. = $1042-1549 \text{ mg L}^{-1}$), Merlot (2006. god. = $1420-1746 \text{ mg L}^{-1}$; 2007. god. = $1610-2355 \text{ mg L}^{-1}$; 2008. god. = $1180-2087 \text{ mg L}^{-1}$) (Hosu i sur., 2014). Slične koncentracije tanina utvrđene su analizom 27 Cabernet Sauvignona (1978.-2005. god.) i 7 Merlota (1979-2003. god.) iz francuske regije Bordeaux: Cabernet Sauvignon ($1170-2230 \text{ mg L}^{-1}$), Merlot ($1213-2090 \text{ mg L}^{-1}$) (Chira i sur., 2011). Koncentracije ukupnih tanina u crnim vinima, određene u ovom istraživanju, uglavnom su u skladu s rezultatima drugih istraživanja, pri čemu se donekle veća koncentracija ukupnih tanina u Cabernet Sauvignonu i Merlotu može pripisati različitim godinama berbe kao i različitom geografskom porijeklu vina (Goldman i sur., 1999). Što se tiče bijelih vina, dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima prethodnih istraživanja u kojima su utvrđene sljedeće koncentracije ukupnih tanina: Muškati žuti (1993. god., 113 mg L^{-1}), Chardonnay (1994. god., 170 mg L^{-1}), Traminac (1994. god., 40 mg L^{-1}) (Waters i sur., 1995). Dokazano je kako koncentracija tanina u vinu znatno utječe na intenzitet gorčine i trpkocće (Vidal i sur., 2003; McRae i Kennedy, 2011). Također, sastav proantocijanidina, veličina polimera te stupanj galoilacije, utječu na gorčinu vina (Fontoin i sur., 2008). Monomerni i polimerni flavan-3-oli izazivaju gorke i trpke podražaje u ustima pri čemu je utvrđeno da su monomeri više gorci nego trpkici (Peleg i sur., 1999; Ćurko i sur., 2014). Druga istraživanja razlika između monomera i polimera u odnosu na njihovu gorčinu i trpkocću, su utvrdila da kako njihova koncentracija raste, također raste i njihov maksimalni intenzitet te trajanje gorčine i trpkocće. Pri koncentracijama prisutnim u crnom vinu, monomeri postižu niži maksimalni intenzitet, a postižu ga brže te sam podražaj traje kraće u odnosu na polimere. Frakcije vina koje sadržavaju polimere

sa šest i više podjedinica su 25 do 30 puta više gorke i trpke u odnosu na frakcije koje sadrže samo monomere (Noble, 1994; Gawel, 1998).

Tablica 4. Koncentracija ukupnih tanina u analiziranim vinima

Vino	Ukupni tanini (mg L ⁻¹)
Graševina De Gotho Kutjevo, 2014	143,4
Malvazija, Kozlović, 2015	75,6
Chardonnay, Galić, 2014	155,7
Sauvignon blanc, Korak, 2015	76,9
Traminac, Trs vrh, 2015	163,6
Muškat žuti, Bolfan Libertin, 2015	136,1
Rosé, Tomaz, 2015	289,4
Pinot noir, Bolfan Libertin, 2013	2696,0
Cabernet Sauvignon, Castillo de Molina, 2013	3749,4
Merlot, Belje, 2011	3724,8
Teran, Degrassi, 2010	2661,2

Rezultati analize ukupnih kiselina, pH vrijednosti te udjela alkohola u analiziranim vinima su prikazani u Tablici 5. Najniža ukupna kiselost u vinu je određena u Malvaziji (4,6 g L⁻¹), dok je najviša izmjerena u Muškatu žutom (6,4 g L⁻¹). Dobiveni rezultati za ukupnu kiselost vina su u skladu s prethodnim istraživanjima u kojima ukupna kiselost iznosi 5-8 g L⁻¹ (Darias-Martin i sur., 2003; Moreno i Peinado, 2012). Rezultati fizikalno-kemijskih parametara za Chardonnay i Malvaziju su slični s prethodnim istraživanjem u kojem je ukupna kiselost iznosila: Chardonnay (5 g L⁻¹), Malvazija (5,6 g L⁻¹) (Kallithraka i sur., 2009). Ukupna kiselost ima blagi utjecaj na percepciju intenziteta gorčine pri čemu se uz povećanje kiselosti vina smanjuje intenzitet gorčine oligomernih tanina (Fontoin i sur., 2008). Najniža pH vrijednost vina izmjerena je u Muškatu žutom (3,25), a najviša u Graševini (3,72). Dokazano je da se povećanjem kiselosti smanjuje pH vrijednost vina (Fischer i Noble, 1994). Istraživanja su pokazala da pH ima neznatan utjecaj na intenzitet gorčine prilikom povećanja pH vrijednosti s 3,0 na 3,6; što predstavlja uobičajeni raspon pH vrijednosti vina (Fischer, 1990; Brannan i sur., 2001), dok druga istraživanja upućuju na to da porastom pH vrijednosti s 2,9 na 3,2 dolazi do

povećanja intenziteta gorčine u crnom vinu (Demiglio i Pickering, 2008) što je suprotno zaključcima dobivenim primjenom model otopina vina u kojima je pH povećan s 2,5 na 3,0, a pri čemu nije utvrđena razlika u percepciji okusa (Fontoin i sur., 2008). Isti rezultat je dobiven povećanjem pH vrijednosti s 3 na 4, pri čemu je sposobnost percepcije gorčine ostala nepromijenjena (Sáenz-Navajas i sur., 2012). U odnosu na crna vina, bijela vina su karakterizirana višim koncentracijama ukupne kiseline te nižim pH vrijednostima (Darias-Martin i sur., 2003). Udio etanola u analiziranim vinima u rasponu je od 10,5 % (Muškat žuti) do 14,5 % (Merlot). Dobiveni rezultati su u skladu s uobičajenim udjelom etanola u vinima (10-15 %) (Sokolowsky I Fischer, 2012; McRae i sur., 2015). Dokazano je kako porast udjela etanola u vinu ima statistički značajan utjecaj na pojačavanje intenziteta gorčine u model otopinama vina (Lesschaeve i Noble, 2005; Fontoin i sur., 2008; Jones i sur., 2008) te u samim uzorcima vina (Noble, 1994; Lesschaeve i Noble, 2005; Jones i sur., 2008). Tako nešto se može zaključiti i iz rezultata mojeg istraživanja gdje su vina s višim udjelom etanola dobila viši intenzitet gorčine. Etanol izaziva okus gorčine, ali ima i sposobnost pojačavanja percepcije gorčine drugih gorkih molekula (Noble, 1994; Sáenz-Navajas i sur., 2012), pri čemu doprinosi punoći kao i osjetu grijanja u bijelim vinima. Etanol u crnim vinima značajno utječe na pojačavanje gorčine polifenolnih spojeva, dok istovremeno prekriva njihovu trpkocu (Drewnowski i Gomez-Carneros, 2000; Jones i sur., 2008; Gonzalo-Diago i sur., 2014). Istraživanjem gorčine kinina, epikatehina i katehina u različitim medijima ustanovljeno je da je intenzitet gorčine ovih molekula značajno veći u 5 %-tnoj otopini etanola nego u vodi (Noble, 1994). Nadalje, utvrđeno je da povećanje volumnog udjela etanola u vinu za 3 % utječe na pojačanje intenziteta okusa gorčine za 50 %, dok je dodavanjem 1400 mg L⁻¹ katehina u isto vino pojačanje gorčine iznosilo samo 28 % (Gonzalo-Diago i sur., 2014). U drugom istraživanju je povećanje volumnog udjela etanola u vinu sa 8 na 14 % rezultiralo dvostrukim pojačanjem intenziteta gorčine, ali nije imalo utjecaja na osjet trpkocē (Chira i sur., 2009). Prema objavljenim rezultatima prethodnih istraživanja možemo zaključiti da od tri fizikalna čimbenika analizirana u ovom radu, jedino udio etanola ima značajan utjecaj na intenzitet percipirane gorčine vina pa tako vina koja imaju najviši udio alkohola su i ocjenjena s najvišim intenzitetom gorčine: za bijela vina je najviši intenzitet gorčine dobio Traminac (14 % etanola, 2,9), dok su za crna vina najviši intenzitet gorčine dobili Cabernet Sauvignon (14 % etanola, 3,6), Merlot (14,5 % etanola, 3,9).

Tablica 5. Sastav ukupnih kiselina, pH i udio alkohola u vinima

Vino	Ukupna kiselost* (g L⁻¹)	pH	Vol % alkohola
Graševina, Kutjevo de Gotho, 2014	5,7	3,72	13
Malvazija, Kozlović, 2015	4,6	3,44	13
Chardonnay, Galić, 2014	5,4	3,54	13
Sauvignon blanc, Korak, 2015	5,4	3,31	13
Traminac, Trs vrh, 2015	5,2	3,52	14
Muškat žuti, Bolfan Libertin, 2015	6,4	3,25	10,5
Rosé, Tomaz, 2015	6,4	3,44	12
Pinot noir, Bolfan Libertin, 2013	6,3	3,32	11,5
Cabernet Sauvignon, Castillo de Molina, 2013	5,3	3,54	14
Merlot, Belje, 2011	5,8	3,51	14,5
Teran, Degrassi, 2010	5,4	3,68	12,5

*Izražena kao vinska kiselina

4.4. KORELACIJA INTENZITETA GORČINE I KONCENTRACIJE UKUPNIH TANINA U VINU

Povezanost intenziteta percipirane gorčine i ukupnih tanina u vinu utvrđena je Pearsonovim koeficijentom korelacije (Tablica 6). Dobiveni koeficijent korelacije ($r = 0,8524$, $p < 0,001$) ukazuje na vrlo dobru povezanost intenziteta gorčine i koncentracije ukupnih tanina. Prema dobivenoj vrijednosti možemo zaključiti da koncentracija tanina u uzorcima analiziranih vina utječe na percepciju intenziteta gorčine. Slični rezultati su dobiveni i u ostalim istaživanjima (Robichaud i Noble, 1990; Vidal i sur., 2004; Landon i sur., 2008; Ma i sur., 2014). Važno je naglasiti da bez obzira što je koncentracija tanina u vinu značajan čimbenik pri percepciji gorčine vina, sam po sebi nije dovoljan za objasniti sve varijacije u percepciji gorčine koje su uvjetovane interakcijama ostalim fizikalnim (pH, temperatura, ukupna kiselost, vol % alkohola), kemijskim (proantocijanidini u ovisnosti o kemijskom sastavu mogu biti više trpki ili gorki; kiseli spojevi pojačava percepciju gorčine i trpkoće tanina; etanol smanjuje percepciju kiselosti pojedinih kiselina te percepciju trpkoće tanina...) i fiziološkim čimbenicima (dob, spol, starost, adaptacija okusa) (Fontoin i sur., 2008; Jackson, 2014).

Tablica 6. Koeficijent korelacije između ukupnih tanina i intenziteta gorčine

Ukupni tanini	Intenzitet gorčine	p vrijednost
	0,8524	< 0,001

5. ZAKLJUČCI

1. Selekcija kušača je provedena testom prepoznavanja okusa/osjeta te triangl testom pri čemu je od početnih 27 ispitanika odabrano 14 kandidata (51,85 %).
2. Senzorski panel je uspješno rangirao otopine prema rastućim koncentracijama.
3. Senzorska analiza intenziteta gorčine 6 bijelih, 1 rose i 4 crna vina provedena je kvantitativnom deskriptivnom analizom homogenom panel grupom, pri čemu su bijela vina percipirana kao znatno manje gorka (1,4-2,9) u odnosu na rosé (2,3) i crna vina (3,3-3,9).
4. Koncentracije ukupnih tanina u bijelim vinima bile su niže od onih u rosé vinu te značajno niže od onih u crnim vinima.
5. Iz dobivenih rezultata senzorske procjene intenziteta gorčine, Pearsonov koeficijent korelacije je ukazao na dobru povezanost intenziteta gorčine i ukupnih tanina u vinu ($r = 0,8524$, $p < 0,001$).

6. LITERATURA

Arnold, R. A., Noble, A. C., Singleton, V. L. (1980) Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine. *J. Agric. Food Chem.* **28**, 675-678.

Bajec, M. R., Pickering, G. J. (2008) Astringency: mechanisms and perception. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **48**, 858-875.

Behrens, M., Meyerhof, W. (2013) Bitter taste receptor research comes of age: From characterization to modulation of TAS2Rs. *Semin. Cell Dev. Biol.* **24**, 215-221.

Brannan, G. D., Setser, C. S., Kemp, K. E. (2001) Interaction of astringency and taste characteristics. *J. Sens. Stud.* **16**, 179-197.

Brossaud, F., Cheynier, V., Noble, A. C. (2001) Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Aust. J. Grape Wine Res.* **7**, 33-39.

Chira, K., Teissedre, P. L. (2013) Extraction of oak volatiles and ellagitannins compounds and sensory profile of wine aged with French winewoods subjected to different toasting methods: behaviour during storage. *Food Chem.* **140**, 168-177.

Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., Teissedre, P. L. (2011) Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chem.* **126**, 1971-1977.

Chira, K., Schmauch, G., Saucier, C., Fabre, S., Teissedre, P. L. (2009) Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *J. Agric. Food Chem.* **57**, 545-553.

Ćurko, N., Ganić, K. K., Gracin, L., Đapić, M., Jourdes, M., Teissedre, P. L. (2014) Characterization of seed and skin polyphenolic extracts of two red grape cultivars grown in Croatia and their sensory perception in a wine model medium. *Food Chem.* **145**, 15-22.

Darias-Martin, J., Socas-Hernandez, A., Diaz-Romero, C., Diaz-Diaz, E. (2003) Comparative study of methods for determination of titratable acidity in wine. *J. Food Comp. Anal.* **16**, 555–62.

Demiglio, P., Pickering, G. J. (2008) The influence of ethanol and pH on the taste and mouthfeel sensations elicited by red wine. *J. Food Agric. Environ.* **6**, 143-150.

Drewnowski, A. (2001) The science and complexity of bitter taste. *Nutr. Rev.* **59**, 163-169.

Drewnowski, A., Gomez-Carneros, C. (2000) Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *Am. J. Clin. Nutr.* **72**, 1424-1435.

Fernández, K., Kennedy, J. A., Agosin, E. (2007) Characterization of *Vitis vinifera* L. Cv. Carménère grape and wine proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3675-3680.

Fischer, U. (1990) The influence of ethanol, pH and phenolic composition on the temporal perception of bitterness and astringency and parotid salivation. M. S. Thesis, University of California, Davis, CA, 252.

Fischer, U., Noble, A. C. (1994) The effect of ethanol, catechin concentration, and pH on sourness and bitterness of wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **45**, 6-10.

Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P. L., Glories, Y. (2008) Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Qual. Prefer.* **19**, 286-291.

Gawel, R. (1998) Red wine astringency: a review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **4**, 74-95.

Ginjom, I. R., D'Arcy, B. R., Caffin, N. A., Gidley, M. J. (2010) Phenolic contents and antioxidant activities of major Australian red wines throughout the winemaking process. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 10133-10142.

Goldman, I. L., Kadar, A. A., Heintz, C. (1999) Influence of production, handling and storage on phytonutrient content of foods. *Nutr. Rev.* **9**, 46–52.

González-Neves, G., Charamelo, D., Balado, J., Barreiro, L., Bochicchio, R., Gatto, G., Gil, G., Tessore, A., Carbonneau, A., Moutounet, M. (2004) Phenolic potential of Tannat,

Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Anal. Chim. Acta* **513**, 191-196.

Gonzalo-Diago, A., Dizy, M., Fernández-Zurbano, P. (2013) Taste and mouthfeel properties of red wines proanthocyanidins and their relation to the chemical composition. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 8861-8870.

Gonzalo-Diago, A., Dizy, M., Fernández-Zurbano, P. (2014) Contribution of low molecular weight phenols to bitter taste and mouthfeel properties in red wines. *Food Chem.* **154**, 187-198.

Guinard, J. X., Mazzucchelli, R. (1996) The sensory perception of texture and mouthfeel. *Trends Food Sci. Tech.* **7**, 213-219.

Guinard, J. X., Pangborn, R. M., Lewis, M. J. (1986) Time course of astringency in wine upon repeated ingestion. *Am. J. Enol. Viticult.* **37**, 184-189.

Hosu, A., Cristea, V. M., Cimpoi, C. (2014) Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chem.* **150**, 113-118.

Hufnagel, J. C., Hofmann, T. (2008a) Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1376-1386.

Hufnagel, J. C., Hofmann, T. (2008b). Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 9190–9199.

ISO 3591: 1977, Sensory analysis - Apparatus - Wine-tasting glass.

ISO 8586: 1993, Sensory analysis: General guidance for the selection, training and monitoring of assessors.

ISO 8587: 2006, Sensory analysis-Methodology-Ranking.

Jackson, R. S. (2014) Wine science: principles and applications, 4. izd., Academic Press, London.

- Jaggupilli, A., Howard, R., Upadhyaya, J. D., Bhullar, R. P., Chelikani, P. (2016) Bitter taste receptors: Novel insights into the biochemistry and pharmacology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **77**, 184-196.
- Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I. L., Waters, E. J. (2008) The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Qual. Prefer.* **19**, 596-607.
- Kallithraka, S., Salacha, M. I., Tzourou, I. (2009) Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chem.* **113**, 500-505.
- Kikut-Ligaj, D., Trzcielińska-Lorych, J. (2015) How taste works: cells, receptors and gustatory perception. *Cell Mol. Biol. Lett.* **20**, 699-716.
- Landon, J. L., Weller, K., Harbertson, J. F., Ross, C. F. (2008) Chemical and sensory evaluation of astringency in Washington state red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **59**, 153-158.
- Lawless, H. T., Heymann, H. (2010) Sensory evaluation of food: principles and practices, 2. izd., Springer, New York.
- Lesschaeve, I., Noble, A. C. (2005) Polyphenols: Factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 330–335.
- Ma, W., Guo, A., Zhang, Y., Wang, H., Liu, Y., Li, H. (2014) A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends Food Sci. Tech.* **40**, 6-19.
- McRae, J. M., Kennedy, J. A. (2011) Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency: a review of current research. *Molecules* **16**, 2348-2364.
- McRae, J. M., Ziora, Z. M., Kassara, S., Cooper, M. A., Smith, P. A. (2015) Ethanol concentration influences the mechanisms of wine tannin interactions with poly(l-proline) in model wine. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 4345-4352.
- Moreno, J., Peinado, R. (2012) *Enological chemistry*, Academic Press. London.

- Nikfardjam, M. S. P., Pickering, G. J. (2008) Influence of variety and commercial yeast preparation on red wine made from autochthonous Hungarian and Canadian grapes. Part I: Phenolic composition. *Eur. Food. Res. Technol.* **227**, 1077–1083.
- Noble, A. C. (1994) Bitterness in wine. *Physiol. Behav.* **56**, 1251-1255.
- Oberholster, A., Francis, I. L., Iland, P. G., Waters, E. J. (2009) Mouthfeel of white wines made with and without pomace contact and added anthocyanins. *Aust. J. Grape Wine Res.* **15**, 59–69.
- OIV (2015a) Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts (2 vol.): OIV-MA-AS313-15, Paris.
- OIV (2015b) Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts (2 vol.): OIV-MA-AS313-01, Paris.
- Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., Noble, A. C. (1999) Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1123-1128.
- Quijada-Morín, N., Regueiro, J., Simal-Gándara, J., Tomás, E., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T. (2012) Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 12355-12361.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2015) Effects of sugar concentration processes in grapes and wine aging on aroma compounds of sweet wines-a review. *Crit. Rev. Food Sci.* **55**, 1053-1073.
- Reed, D. R., Knaapila, A. (2010) Genetics of taste and smell: poisons and pleasures. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **94**, 213–240.
- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Anal. Paris.* **48**, 188-196.
- Robichaud, J. L., Noble, A. C. (1990) Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *J. Sci. Food Agric.* **53**, 343–53.

- Sáenz-Navajas, M. P., Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V. (2012) Contribution of nonvolatile composition to wine flavor. *Food Rev. Int.* **28**, 389-411.
- Sáenz-Navajas, M. P., Ferreira, V., Dizy, M., Fernández-Zurbano, P. (2010a) Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta* **673**, 151-159.
- Sáenz-Navajas, M. P., Tao, Y. S., Dizy, M., Ferreira, V., Fernández-Zurbano, P. (2010b) Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of premium Spanish red wines and their correlation to quality perception. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 12407-12416.
- Sainz, E., Cavenagh, M. M., Gutierrez, J., Battey, J. F., Northup, J. K., Sullivan, S. L. (2007) Functional characterization of human bitter taste receptors. *Biochem. J.* **403**, 537-543.
- Sokolowsky, M., Fischer, U. (2012) Evaluation of bitterness in white wine applying descriptive analysis, time-intensity analysis, and temporal dominance of sensations analysis. *Anal. Chim. Acta* **732**, 46-52.
- Stone, S., Sidel, J. L. (1993) Sensory evaluation practices, 2. izd., Academic Press, London, str. 1-9.
- Thorngate, J. H., Noble, A. C. (1995) Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3R(-)-epicatechin and 3S(+)-catechin. *J. Sci. Food Agric.* **67**, 531-535.
- Vermerris, W., Nicholson, R. (2006) Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht.
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E. J. (2003) The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 564-573.
- Vidal, S., Francis, L., Noble, A. C., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E. (2004) Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Anal. Chim. Acta* **513**, 57-65.

Wang, J., Capone, D. L., Wilkinson, K. L., Jeffrey, D. W. (2016) Chemical and sensory profiles of rosé wines from Australia. *Food Chem.* **196**, 682-693.

Waterhouse, A. L. (2002) Wine phenolics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **957**, 21-36.

Waters, E. J., Peng, Z., Pocock, K. F., Williams, P. J. (1995) Proteins in white wine, I: Procyanidin occurrence in soluble proteins and insoluble protein hazes and its relationship to protein instability. *Aust. J. Grape Wine Res.* **1**, 86-93.

Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., Wu, D. (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* **112**, 293–301.

7. PRILOZI

Prilog 1: Senzorski pragovi i testovi za pojedine gorke spojeve prisutne u vinu (Sáenz-Navajas i sur., 2012)

Spoj	Senzorski prag (mg L⁻¹)	Senzorski test	Otopina
Flavanoli			
Katehin	290	Triangl test	Voda
Epikatehin	270	Triangl test	Voda
Epigalokatehin galat	87	Triangl test	Voda
Procijanidin C1	347	Triangl test	Voda
Procijanidin B1	231	Triangl test	Voda
Procijanidin B2	280	Triangl test	Voda
Procijanidin B3	289	Triangl test	Voda
Trimeri i tetrameri	4,1	Triangl test	Voda
Kondenzirani tanini	0,12	Test razlika	Voda
Kiseline			
Etil ester galne kiseline	438	Triangl test	5% etanol
Etil ester p-kumarinske kiseline	137	Triangl test	5% etanol
Etil ester siringinske kiseline	130	Triangl test	5% etanol
Etil ester vanilinske kiseline	294	Triangl test	Voda
Etil ester kafeinske kiseline	229	Triangl test	Voda
Etil ester ferulinske kiseline	158	Triangl test	Voda

Etil ester protokatehinske kiseline	182	Triangl test	Voda
Flavonoli			
Kvercetin	10	Triangl test	Voda
Kamferol	20	Parni test	Voda
Mircitin	10	Parni test	Voda
Kvercetin-3- <i>O</i> - ramnozid	8,9	Parni test	Voda
Elagitanini			
Grandinin	656	Triangl test	Voda
Roburin E	437	Triangl test	Voda
Veskalagin	1579	Triangl test	Voda
Kastalagin	1579	Triangl test	Voda
33-deoksi-33- karboksiveskalagin	640	Triangl test	Voda
Roburin A	1536	Triangl test	Voda
Roburin D	1373	Triangl test	Voda
Roburin B	1160	Triangl test	Voda
Roburin C	1199	Triangl test	Voda
Aminokiseline			
Histidin	6984	Triangl test	Voda
Valin	2344	Triangl test	Voda
Izoleucin	1312	Triangl test	Voda
Fenilalanin	7434	Triangl test	Voda
Leucin	1443	Triangl test	Voda
Tirozin	737	Triangl test	Voda
Arginin	13065	Triangl test	Voda
Lizin	11696	Triangl test	Voda

Prilog 2. Cjeloviti prikaz testova i koncentracija standarada korištenih za odabir i treniranje senzorskog panela

TEST 1	Prepoznavanje okusa/osjeta (vodena otopina)	0,5 g L ⁻¹ kafein (gorčina) 1 g L ⁻¹ enološki tanini (gorčina i trpkoca)
TEST 2	Triangl test (model otopina vina) K M M T T M K K M M T M	0,5 g L ⁻¹ kafein (gorčina) 0,5 g L ⁻¹ enološki tanini (gorčina i trpkoca)
TEST 3	Ranking test (bijelo vino) □ < □ < □	0-0,5-1 g L ⁻¹ kafein (gorčina) 0-1-2 g L ⁻¹ enološki tanini (gorčina i trpkoca)
TEST 4	Ranking test (crno vino) □ < □ < □	0-0,5-1 g L ⁻¹ kafein (gorčina) 0-1-2 g L ⁻¹ enološki tanini (gorčina i trpkoca)
TEST 5	Ranking test (bijelo vino) □ < □ < □ < □	0-0,5-1-2 g L ⁻¹ kafein (gorčina)
TEST 6	Ranking test (crno vino) □ < □ < □ < □	0-1-2-4 g L ⁻¹ enološki tanini (gorčina i trpkoca)

TEST 7	<p>Ranking test (crno vino)</p> <p><input type="text"/> < <input type="text"/> < <input type="text"/> < <input type="text"/></p>	0-0,5-1-2 g L ⁻¹ kafein (gorčina)
TEST 8	<p>Ranking test (bijelo vino)</p> <p><input type="text"/> < <input type="text"/> < <input type="text"/></p>	0-1-0,5 g L ⁻¹ vinska kiselina (kiselost) 0,5-1-0 g L ⁻¹ kafein (gorčina) 0-1-0,5 g L ⁻¹ enološki tanini (gorčina i trpkoca)
TEST 9	<p>Ranking test (crno vino)</p> <p><input type="text"/> < <input type="text"/> < <input type="text"/></p>	2-1-0 g L ⁻¹ vinska kiselina (kiselost) 2-0,5-1 g L ⁻¹ kafein (gorčina) 2-1-0 g L ⁻¹ enološki tanini (gorčina i trpkoca)
TEST 10	<p>QDA (bijelo vino)</p> <p>0-7 gorčina</p> <p>Referentni uzorak gorčine = 3</p>	0-1 g L ⁻¹ kafein (gorčina) 0-1 g L ⁻¹ enološki tanini (gorčina i trpkoca) Referentni uzorci: 0,5 g L ⁻¹ kafein (gorčina) 0,5 g L ⁻¹ enološki tanini (gorčina i trpkoca)
TEST 11	<p>QDA (crno vino)</p> <p>0-7 gorčina</p> <p>Referentni uzorak gorčine = 4</p>	2-0 g L ⁻¹ kafein (gorčina) 0-2 g L ⁻¹ enološki tanini (gorčina i trpkoca) Referentni uzorci: 1 g L ⁻¹ kafein (gorčina) 1 g L ⁻¹ enološki tanini (gorčina i trpkoca)
<p>TEST 2: K = kafein; T = enološki tanini; M = model otopina vina (12 % etanol, 4 g L⁻¹ vinska kiselina, pH = 3,5)</p> <p>TEST 8 i TEST 9: za razliku od ostalih ranking testova, ovdje su standardi zajedno pomiješani u tri otopine različitih koncentracija navedenih standarada</p> <p>TEST 10 i TEST 11: ovdje su standardi zajedno pomiješani u dvije otopine različitih koncentracija navedenih standarada te se uspoređuju s referentnim uzorkom; QDA = kvantitativna deskriptivna analiza</p>		