

# Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na aromu vina Graševina

---

Poturica, Vlatka

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:159:641166>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

Vlatka Poturica

912/PI

**UTJECAJ VISOKOG  
HIDROSTATSKOG TLAKA NA  
AROMU VINA GRAŠEVINA**

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

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

## **ZAHVALA**

Iskrene zahvale mentorici doc. dr. sc. Natki Ćurko i asistentici dr. sc. Marini Tomašević na bezuvjetnoj pomoći i savjetima pri izradi ovog diplomskog rada. Vaše strpljenje i ustrajnost naučili su me da je u svim situacijama moguće doći do rješenja, iako se ponekad čini nemoguće.

Veliko hvala upućujem svojoj obitelji i prijateljima, koji su uvijek bili uz mene.

Hvala Davidu na pruženoj ljubavi i vjeri u moj uspjeh, te na svakoj lijepoj riječi kada mi je trebala.

Na kraju, posebnu zahvalnost iskazujem svojim roditeljima, Mariji i Vladimiru, bez čije pomoći ne bih uspjela ostvariti sve što jesam. Hvala Vam na svakoj riječi podrške i na svakom odricanju, koje ste zbog mene učinili. I najveća hvala što nikada niste sumnjali u mene. Ovaj rad posvećujem Vama.

## 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: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ VISOKOG HIDROSTATSKOG TLAKA NA AROMU VINA GRAŠEVINA

*Vlatka Poturica 912/PI*

**Sažetak:** Visoki hidrostatski tlak netopljiva je metoda obrade hrane, čija primjena u enologiju te potencijal ove tehnologije kao enološke prakse su nedovoljno istraženi. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj visokog hidrostatskog tlaka od 200, 400 i 600 MPa u trajanju od 5 i 25 minuta na sastav arome mladog vina Graševina. Neposredno nakon tretiranja spojevi arome identificirani su i kvantificirani plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME – GC/MS). Dobiveni rezultati pokazali su kako tretiranje vina tlakom od 200 i 400 MPa u vremenu od 5 i 25 minuta nije uzrokovalo značajne promjene u sastavu arome, koje su kod primjene višeg tlaka i veće duljine tretiranja bile blago izraženije. S druge strane, tretiranje tlakom od 600 MPa značajno je utjecalo na smanjenje koncentracije terpena, estera i karbonilnih spojeva te blago povećanje koncentracija viših alkohola, a navedene promjene bile su izraženije nakon 25 minuta tretiranja.

**Ključne riječi:** vino, spojevi arome, visoki hidrostatski tlak, plinska kromatografija (GC/MS), Graševina

**Rad sadrži:** 44 stranice, 17 slika, 2 tablice, 34 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

**Mentor:** *doc. dr. sc. Natka Ćurko*

**Pomoć pri izradi:** *dr. sc. Marina Tomašević*

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

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

**Datum obrane:** 27. rujna 2018.

## 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:** Food Technology

### IMPACT OF HIGH HYDROSTATIC PRESSURE ON THE AROMA OF WINE GRAŠEVINA

*Vlatka Poturica 912/PI*

**Abstract:** High hydrostatic pressure is a non-thermal food processing method. However, application and potential of this technology as enological practice has not been profoundly studied. The aim of this study was to investigate the influence of high hydrostatic pressure of 200, 400 and 600 MPa after treatment of 5 and 25 minutes on the aroma composition of the young wine Graševina. Aroma compounds were identified and quantified by gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase microextraction (SPME - GC/MS) immediately after the treatment. The obtained results showed that the treatment of 200 and 400 MPa after 5 and 25 minutes did not significantly influence the composition of aroma compounds, although changes induced by higher pressure and longer duration were slightly more pronounced. On the other hand, treatment of 600 MPa influenced significant decrease in concentrations of terpene, ester and carbonyl compounds as well as slight increase in concentrations of higher alcohols, that were more pronounced for 25-minute treatment.

**Keywords:** wine, aroma compounds, high hydrostatic pressure, gas chromatography (GC/MS), Graševina

**Thesis contains:** 44 pages, 17 figures, 2 tables, 34 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** *PhD. Natka Ćurko, Assistant professor*

**Technical support and assistance:** *PhD. Marina Tomašević*

**Reviewers:**

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

**Thesis defended:** 27<sup>th</sup> September, 2018.

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. AROMA VINA.....	2
2.1.1. Sortna aroma.....	3
2.1.1.1. Terpeni.....	3
2.1.1.2. Norizoprenoidi.....	4
2.1.1.3. Metoksipirazini.....	4
2.1.1.4. C6 aldehidi.....	4
2.1.1.5. Hlapivi tioli.....	4
2.1.2. Aroma fermentacije.....	5
2.1.2.1. Karbonilni spojevi.....	5
2.1.2.2. Esteri.....	6
2.1.2.3. Viši alkoholi.....	8
2.1.2.4. Hlapivi fenoli.....	9
2.1.3. Aroma starenja.....	9
2.2. VISOKI HIDROSTATSKI TLAK.....	10
2.2.1. Princip visokog hidrostatskog tlaka.....	10
2.2.2. Djelovanje visokog hidrostatskog tlaka na hranu.....	11
2.2.3. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na vino.....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	15
3.1. MATERIJALI.....	15
3.1.1. Uzorci vina.....	15
3.1.2. Kemikalije.....	15
3.1.3. Oprema i aparatura.....	16
3.2. METODE.....	17
3.2.1. Tretiranje vina visokim hidrostatskim tlakom (HPP).....	17
3.2.2. Određivanje spojeva primarne i fermentacijske arome vina plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME – GC/MS).....	18
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	21
4.1. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju terpena.....	22
4.2. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju karbonilnih spojeva.....	23
4.3. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju estera.....	24
4.4. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju viših alkohola.....	35
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	40
<b>6. LITERATURA</b> .....	41



# 1. UVOD

Aromu vina čini nekoliko stotina različitih kemijskih spojeva, senzorskih pragova detekcije u rasponu od  $10^{-4}$  do  $10^{-12}$  g L<sup>-1</sup>. Jedna je od najvažnijih karakteristika vina, a konačna percepcija ovisi o mnoštvu kemijskih i fizikalnih reakcija prilikom same konzumacije. Sastav arome vina ovisi o različitim parametrima kao što su sorta grožđa, tehnologija proizvodnje te način čuvanja i dozrijevanja, a ovisno o fazama nastanka spojeve arome možemo podijeliti u tri velike skupine. Sortnu aromu čine aromatski spojevi porijeklom iz bobice grožđa kao i prekursori arome te produkti kemijskih i enzimatsko-biokemijskih reakcija nastali tijekom primarne obrade, a u najvećoj mjeri karakteristika je same sorte grožđa. Aromu fermentacije predstavljaju sekundarni produkti metabolizma kvasca i bakterija, dok se aroma starenja formira kroz razne enzimatske i fizikalne reakcije tijekom dozrijevanja i skladištenja vina u drvenoj bačvi ili boci.

Visoki hidrostatski tlak, kao netoplinska metoda obrade hrane, uslijed jednostavnosti izvedbe, posljednjih se godina sve više primjenjuje u prehrambenoj industriji. Dosadašnja istraživanja pokazala su kako je primjena visokog hidrostatskog tlaka od 400 – 600 MPa u proizvodnji visokokvalitetnih vina učinkovita tehnika za redukciju nepoželjnih mikroorganizama te može pridonijeti smanjenju upotrebe sumporovog dioksida kao antimikrobnog sredstva, a također i stabilizaciji proteina (bistrenjem) i bržem dozrijevanju vina u drvetu ili bocama. Međutim, paralelno djelovanje tlaka na fizikalno-kemijske te senzorske karakteristike vina znatno je slabije istraženo, a posebice dugoročni učinak i potencijal ove tehnologije kao eneloške prakse. Optimiziranje parametera tretmana visokim hidrostatskim tlakom ključno je kako bi se optimalnom kombinacijom duljine tretiranja i jačine tlaka očuvala kvaliteta vina i smanjio gubitak aromatskih tvari u odnosu na gubitak pri korištenju konvencionalnih metoda stabilizacije vina, prvenstveno zbog puno niže temperature rada.

Stoga će se u ovom diplomskom radu istražiti djelovanje visokog hidrostatskog tlaka od 200, 400 i 600 MPa kroz vremenski period od 5 i 25 minuta, na aromatski sastav mladog bijelog vina Graševina. Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome provest će se metodom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME – GC/MS).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. AROMA VINA

Aroma je rezultat interakcije između kemijskog sastava i osjećaja okusa i mirisa kod pojedinca. Aromu vina čini više stotina različitih hlapivih spojeva, u rasponu koncentracija od nekoliko  $\text{ng L}^{-1}$  do nekoliko  $\text{mg L}^{-1}$ . Udisajem kroz nos, ili retro-nazalno iz stražnjeg dijela grla hlapivi spojevi dolaze direktno do mirisnog epitela (Jackson, 2014), a upravo tim podražajem stvara se živčani impuls, koji putuje njušnim živcem do centra za nastajanje mirisa u velikom mozgu.

Udio svih hlapivih spojeva arome u vinu iznosi od 0,8 do 1,2  $\text{g L}^{-1}$ , od čega preko 50 % otpada na više alkohole (Jackson, 2014). Senzorski pragovi detekcije pojedinih spojeva arome međusobno se razlikuju i u rasponu su između  $10^{-4}$  do  $10^{-12}$   $\text{g L}^{-1}$ , stoga neki spojevi niske koncentracije mogu imati vrlo važnu ulogu u percepciji arome, dok drugi spojevi visoke koncentracije daju mali doprinos (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Kompleksnost arome vina rezultat je različitih mehanizama uključenih u njen razvoj, od metabolizma grožđa, biokemijskih fenomena prije fermentacije (hidroliza i oksidacija) do metabolizma kvasca te kemijskih i enzimatskih reakcija tijekom starenja vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Fizikalni parametri, kao što su polarnost, topljivost i pH, također utječu na razvoj arome, s obzirom da o njima ovisi stabilnost i struktura aromatskih tvari (Ortega-Heras i sur., 2002). Potrebno je naglasiti da na samu aromu pojedinog vina velik utjecaj ima regionalni karakter, klima i tlo, koji primarno utječu na sortnu aromu.

Općeprihvaćena podjela spojeva arome s obzirom na faze nastajanja je: (i) sortna aroma (aromatični spojevi u grožđu i prekursori arome, produkti kemijskih i enzimatsko-biokemijskih reakcija tijekom primarne obrade: ruljanje, muljanje, prešanje, maceracija); (ii) aroma fermentacije (produkti metabolizama kvasaca i bakterija: alkoholna i jabučno mliječna fermentacija) te (iii) aroma starenja (enzimatske i fizikalne reakcije tijekom dozrijevanja i skladištenja u drvenoj bačvi ili boci).

### 2.1.1. Sortna aroma

Sortnu aromu čine spojevi koji se formiraju još u samoj bobici grožđa te prelaze u mošt. Dio tih spojeva nalazi se u slobodnom stanju u grožđu, a dio se formira tijekom vinifikacije iz nehlapivih i nemirisnih prekursora koji prelaze u mošt (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Osim sorte, ostali čimbenici koji utječu na sortnu aromu su agroklimatski uvjeti, stupanj zrelosti grožđa u trenutku berbe, prinos te udio prekursora, odnosno spojeva s dušikom. Glavni predstavnici sortne arome su: terpeni – voćna i cvjetna aroma, norizoprenoidi – slatka i voćna aroma, metoksipirazini - zeljasta ili biljna aroma, miris na papriku, zemlju i krumpir, C6 aldehidi – miris po zelenom i travi te hlapivi tioli – cvjetni miris, banana, tropsko voće, šimšir (Álvarez-Pérez i sur., 2012).

#### 2.1.1.1. Terpeni

Terpeni su važna skupina aromatskih spojeva koji su nositelji cvjetnih i voćnih nota. Osnovna jedinica svih terpena je izopren (2-metilbuta-1,3-dien), koji se sastoji od 5 C atoma (Jackson, 2014). Ovi spojevi uglavnom pripadaju dvjema velikim skupinama, monoterpenima (10 C atoma), ili seskviterpenima (15 C atoma) (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Postoje još diterpeni (20 C atoma) i triterpeni (30 C atoma) (Jackson, 2014). Iz vina je izolirano oko 50 monoterpenskih spojeva (Jackson, 2014). Terpeni se akumuliraju u pokožici bobice grožđa, ali i u mesu (Hardie i sur., 1996). Većina ih sadrži neku funkcionalnu skupinu, od kojih prevladava hidrosilna skupina, što ih čini alkoholima, dok su ostali ketoni. Tu su još i terpenski oksidi, cikličke strukture, koji uz osnovnu izoprensku jedinicu sadrže molekulu kisika, čime nastaje C-O-C veza, to jest ciklički eter (Jackson, 2014). Najizraženiji miris ima linalool, monoterpenski alkohol, nositelj muškatne i cvjetne arome po irisu (Jackson, 2014). Od ostalih monoterpenskih alkohola značajni su nerol, geraniol, citronelol, hotrineol te  $\alpha$ -terpineol. Djeluju sinergistički s drugim tvarima arome, čime pojačavaju njihov učinak te su glavni nositelji arome u vinu i grožđu muškatnih sorti (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Podjela bijelih sorti grožđa s obzirom na udio terpena je sljedeća: aromatične muškatne sorte do 6 mg L<sup>-1</sup> monoterpena, nemuškatne aromatične sorte 1 – 4 mg L<sup>-1</sup> monoterpena te nearomatične sorte, koje sadrže zanemariv udio monoterpena. Senzorski prag detekcije terpena iznosi 50 do 400 µg L<sup>-1</sup> (Ribéreau-Gayon i sur., 2006), dok je senzorski prag osjetljivosti linaloola svega 25 µg L<sup>-1</sup> (Gomez-Miguez i sur., 2007).

#### 2.1.1.2. *Norizoprenoidi*

Oksidativnom degradacijom karotenoida, terpena od 40 C atoma, nastaju derivati od 9, 10, 11, ili 13 C atoma. Derivati s 13 C atoma, takozvani C<sub>13</sub>-norizoprenoidi imaju izražena mirisna svojstva (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Ti sekundarni metaboliti formirani u grožđu i akumulirani u obliku glikozida, oslobađaju se tijekom različitih faza proizvodnje i skladištenja vina (Swiegers i sur., 2005). Udio norizoprenoida u grožđu povećava se zrenjem. Senzorski prag detekcije iznosi od 40 – 60 ng L<sup>-1</sup> do čak 800 ng L<sup>-1</sup> (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

#### 2.1.1.3. *Metoksipirazini*

Metoksipirazini su heterociklički spojevi s dušikom proizvedeni metabolizmom aminokiselina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Na udio metoksipirazina u grožđu utječe niz faktora, kao što su sunčeva svjetlost, temperatura i stupanj zrelosti, ali najveći utjecaj na konačan udio ima stupanj sinteze u listu te stupanj prelaska u bobicu kao i stupanj raspada pod djelovanjem svjetlosti i temperature. Najznačajnije predstavnike karakterizira miris zelene paprike, šparoge i zemljanih tonova. Senzorski prag detekcije vrlo je nizak, od 1 do 2 ng L<sup>-1</sup> (Jackson, 2014).

#### 2.1.1.4. *C6 aldehidi*

U grožđu se stvara nekoliko vrsta aldehida važnih za sortnu aromu, a mogu nastati i tijekom alkoholne fermentacije. Međutim za sortnu aromu značajni su heksanali i heksenali, prirodno prisutni u grožđu i lišću vinove loze (Jackson, 2014). Tijekom alkoholne fermentacije većina ih se reducira do heksanola. Povezuju se s travnatim i biljnim aromama (Ribéreau-Gayon i sur., 2006), a senzorski prag osjetljivosti im je oko 1 mg L<sup>-1</sup>, što znači da nemaju značajan utjecaj na aromu.

#### 2.1.1.5. *Hlapivi tioli*

Tioli su organski spojevi koji sadrže tiolnu, odnosno sulfhidrilnu -SH skupinu vezanu za atom ugljika. Dodijeljen je im je i naziv merkaptani, zbog sposobnosti vezanja žive i tvorbe netopivih živinih soli. Nositelji su arome citrusa i grejpa tipične za Sauvignon (Jackson, 2014). Prisutni su u grožđu u obliku cisteinskih i glutationskih konjugata, a otpuštaju se tijekom alkoholne fermentacije djelovanjem enzima kvasaca (Swiegers i sur., 2005). Senzorski pragovi detekcije ovih spojeva su u rasponu od 3 do 60 ng L<sup>-1</sup> (Tominaga i sur., 1998).

## 2.1.2. Aroma fermentacije

Glavnina arome vina formira se tijekom alkoholne fermentacije šećera djelovanjem kvasaca. Za razliku od spojeva sorte arome, koji se nalaze u istom obliku i u grožđu i u vinu, nositelji arome fermentacije nastaju kao sporedni produkti primarnog metabolizma kvasca, ovisno o uvjetima u kojima se fermentacija odvija (Swiegers i sur., 2005). Naime, kvasci metaboliziraju šećer pri čemu dolazi do nastajanja etanola, CO<sub>2</sub> te sekundarnih produkata (glicerol, viši alkoholi, esteri, organske kiseline, acetaldehid, itd.). Aroma fermentacije ovisi o brojnim čimbenicima kao što su soj kvasca, temperatura fermentacije i maceracije, duljina i tip maceracije, metoda vinifikacije, dodatak sumporovog dioksida i koncentracija kisika. U konačnici, fermentacija olakšava ekstrakciju prekursora iz krutih dijelova grožđa zaostalih u moštu te metabolizmom kvasca dolazi do značajnog povećanja kompleksnosti ukupne arome vina (Swiegers i sur., 2005). Primjerice, na samom početku fermentacije udjeli viših alkohola, acetata i etilnih estera iznose redom 47 %, 37 % i 13 %, dok se uslijed povećanja koncentracije alkohola i smanjenja aktivnosti kvasca, ukupan udio hlapivih spjeva na kraju fermentacije smanjuje (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

### 2.1.2.1. Karbonilni spojevi

Acetaldehid (aldehid) nastaje oksidacijom alkohola, razgradnjom aminokiselina, ili autooksidacijom masnih kiselina te čini preko 90 % ukupnih aldehida u vinu. Koncentracija ovog spoja je u rasponu od 10 mg L<sup>-1</sup> do 300 mg L<sup>-1</sup>, a senzorski prag osjetljivosti je 100 mg L<sup>-1</sup> (Swiegers i sur., 2005). Aroma hlapivih aldehida opisuje se kao miris trule jabuke, citrusa i orašastih plodova (Swiegers i sur., 2005). Acetaldehid je glavni sporedni proizvod alkoholne fermentacije. Budući da se može transportirati natrag u stanice kvasca i reducirati u etanol, koncentracija ovog spoja pri kraju fermentacije opada (Jackson, 2014). S druge strane, tijekom dozrijevanja količina acetaldehida se povećava kao rezultat oksidacije etanola, a smatra se da i temperatura može utjecati na akumulaciju tijekom starenja (Swiegers i sur., 2005). Nadalje, benzaldehid je aldehid bademastog ili orašastog mirisa, koji sudjeluje u formiranju „bouqueta“ vina. Može nastati razgradnjom lignina iz drveta hrastovih bačvi, oksidacijom benzil alkohola, ili putem metaboličkog djelovanja nekih sojeva kvasca i *Botrytis cinerea* (Jackson, 2014). Sljedeći važan karbonilni spoj u vinu je diacetil (keton), koji nastaje jabučno-mliječnom fermentacijom pomoću bakterija mliječne kiseline, kao sporedni proizvod pri razgradnji šećera (heksoza i pentoza) pri čemu nastaje piruvat i acetolaktat – prekursor diacetila, ili pri razgradnji citrata pri čemu nastaje octena kiselina i

oksaloctena kiselina – drugi prekursor diacetila. Međutim, diacetil nije stabilan spoj i kvasac *S. cerevisiae* metabolizira ga do 2,3-butandiola i intermedijera acetoina. Stoga konačan udio u vinu ovisi o ravnoteži brzine nastajanja i brzine degradacije diacetila (Swiegers i sur., 2005). Čimbenici koji utječu na nastanak su pH, kisik, temperatura i koncentracija jabučne kiseline, ali i soj bakterija mliječne kiseline (Swiegers i sur., 2005). Karakteristična aroma diacetila je aroma maslaca. Pri koncentracijama nižim od 5 mg L<sup>-1</sup> aroma se opisuje kao orašasta i pržena, dok u koncentracijama značajno iznad senzorskog praga poprima miris pokvarenog mlijeka, što je posljedica kvarenja uzrokovanog bakterijama mliječne kiseline (Jackson, 2014).

#### 2.1.2.2. Esteri

Esteri su spojevi koji nastaju reakcijom karboksilne skupine organske kiseline i hidroksilne skupine alkohola. Od svih funkcionalnih spojeva u vinu, esteri su najzastupljeniji, a otkriveno je više od 160 spojeva. Ovi spojevi odgovorni su za svježiu, voćnu aromu vina. Esteri mogu biti prisutni već u samom grožđu, međutim većina nastaje tijekom fermentacije djelovanjem kvasca (Swiegers i sur., 2005). Obzirom na strukturu razlikujemo jednolančane (alifatske) i cikličke (polifenolne) estere (Jackson, 2014). Većina estera u vinu se nalazi tek u tragovima, pa stoga nemaju značajan učinak na aromu, osim etilnih i acetatnih estera (alifatski esteri), koji se nalaze na ili iznad granice osjetljivosti (Jackson, 2014). Koncentracije estera u vinima kreću se od ispod 0,1 mg L<sup>-1</sup> do nekoliko mg L<sup>-1</sup>.

Etilni esteri masnih kiselina nastaju esterifikacijom etanola s acetil-CoA, uz enzim aciltransferazu te imaju vrlo ugodan miris voska i meda, čime doprinose finoći bijelih vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Neki kratkolančani etilni esteri razgranatih masnih kiselina, kao što je *i*-butanoat, mogu se direktno sintetizirati, ili nastati deaminacijom aminokiselina (Miller i sur., 2007). Nasuprot acetatnim esterima, etil esteri zadržavaju se u stanicama kvasca pa je na kraju fermentacije koncentracija u vinu ispod ravnotežne konstante. Međutim, zahvaljujući većoj količini etanola i prisutnosti različitih kiselina u vinu, dolazi do polagane sinteze etil estera tijekom starenja (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Zajedno s acetatnim esterima, doprinose tipičnoj cvjetnoj i voćnoj aromi mladih vina (Jackson, 2014).

Etil butanoat karakterizira ugodan voćni mirisa po jabukama i breskvama. Senzorski prag osjetljivosti ovog spoja iznosi 20 µg L<sup>-1</sup> (Escudero i sur., 2007), a koncentracija u suhim vinima je oko 0,41 ± 0,05 mg L<sup>-1</sup> (Swiegers i sur., 2005). Nadalje, jedan od najpoželjnijih estera u vinu, etil heksanoat (Cheng i sur., 2015), nositelj je cvjetno-voćne i arome po anisu,

ali i arome po jabuci i banani (Lambrechts i Pretorius, 2000). Senzorski prag osjetljivosti etil heksanoata je  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (Cheng i sur., 2015), a udio u suhim vinima oko  $1,06 \pm 0,19 \text{ mg L}^{-1}$  (Swiegers i sur., 2005). Sljedeći važan spoj iz skupine etilnih estera je etil oktanoat, a osim drugih cvjetno-voćnih aroma ovaj spoj posebno karakterizira miris kruške (Jackson, 2014). Koncentracija u suhim vinima iznosi  $2,11 \pm 0,49 \text{ mg L}^{-1}$  (Swiegers i sur., 2005), a senzorski prag osjetljivosti iznosi  $580 \mu\text{g L}^{-1}$  (Escudero i sur., 2007), iz čega je vidljivo da ima veliku ulogu u formiranju ukupne arome vina. Etil dekanat ester je cvjetno-voćne, slatkaste arome. Senzorski prag osjetljivosti iznosi  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  (Cheng i sur., 2015). Udio u suhim vinima svega je  $0,56 \pm 0,06 \text{ mg L}^{-1}$  (Swiegers, 2005). Dietil sukcinat posljednji je važan spoj iz skupine etilnih estera, a nositelj je voćno-cvjetne arome i arome po dinji (Lambrechts i Pretorius, 2000). Senzorski prag osjetljivosti je  $200 \text{ mg L}^{-1}$  (Escudero i sur., 2007), a udio u vinima od  $0,13$  do  $31,5 \text{ mg L}^{-1}$  (Escudero i sur., 2007).

Acetatni esteri nastaju esterifikacijom octene kiseline i etanola ili viših alkohola. Karakterizira ih miris banane i jabuke pa se nazivaju još i voćni esteri. Koncentracija acetatnih estera u vinu pri kraju fermentacije veća je od njihovih ravnotežnih konstanti, stoga dolazi do pomaka reakcije u smjeru produkata, odnosno do hidrolize acetatnih estera na alkohole i octenu kiselinu, a reakciju pospješuje viša temperatura i nizak pH (Ramey i Ough, 1980). Starenjem u bocama također dolazi do sniženja koncentracije estera pa se preporuča skladištenje pri nižim temperaturama (Jackson, 2014).

Jedan od najznačajnijih spojeva iz skupine acetatnih estera je etil acetat, a ovisno o koncentraciji može utjecati pozitivno, ili negativno na ukupnu aromu vina. Primjerice, ukoliko je prisutan u koncentraciji od  $50 - 100 \text{ mg L}^{-1}$  doprinosi kompleksnosti arome, dok u koncentracijama većim od  $150 \text{ mg L}^{-1}$  ima nepoželjan miris po laku za nokte (Jackson, 2014). Manja količina nastaje fermentacijom, dok glavina nastaje djelovanjem aerobnih octenih bakterija starenjem u bačvama (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Senzorski prag osjetljivosti je oko  $160 \text{ mg L}^{-1}$  (Ribéreau-Gayon i sur., 2006), dok je udio u suhim vinima uglavnom oko  $85 \pm 13 \text{ mg L}^{-1}$  (Swiegers i sur., 2005). Nadalje, sljedeći predstavnik ove skupine je *i*-butil acetat. Nositelj je voćne arome i arome po banani i jabuci, čiji senzorski prag detekcije iznosi  $1,6 \text{ mg L}^{-1}$  (Peinado i sur., 2004), a udio u suhim vinima oko  $0,07 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$  (Swiegers i sur., 2005). Nadalje, *i*-amil acetat, jedan je od najznačajnijih acetatnih estera koji značajno pridonosi aromatskom profilu vina. Specifičnog je voćnog mirisa po banani (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Senzorski prag osjetljivosti vrlo je nizak i iznosi  $0,03 \text{ mg L}^{-1}$  (Escudero i sur., 2007), zbog čega ima važnu ulogu u formiranju arome. Udio u suhim vinima nalazi se u

rasponu od  $2,37 \pm 0,62 \text{ mg L}^{-1}$  (Swiegers i sur., 2005). Heksil acetat nositelj je arome po jabuci, trešnji i kruški. Senzorski prag osjetljivosti iznosi  $670 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (Cheng i sur., 2015), dok je udio u suhim vinima oko  $0,14 \pm 0,14 \text{ mg L}^{-1}$  (Swiegers i sur., 2005), čime ne doprinosi značajnije ukupnoj aromi vina. Posljednji važan spoj iz ove skupine je 2-feniletil acetat, čija se slatka nota posebno ističe u mladim bijelim vinima (Campo i sur., 2005). Navedeni ester daje cvjetno-voćnu aromu po ruži i medu (Gomez-Miguez i sur., 2007). Senzorski prag osjetljivosti ovog spoja je  $250 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  (Gomez-Miguez i sur., 2007), a udio u suhim vinima oko  $0,21 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$  (Swiegers i sur., 2005).

### 2.1.2.3. Viši alkoholi

Viši alkoholi su alkoholi s više od dva ugljikova atoma. Mogu nastati anaboličkim putem, pretvorbom iz ugljikohidrata preko piruvata i acetil-CoA kao prekursora ili kataboličkim putem transformacijom aminokiselina prisutnih u vinu. Ova reakcija odvija se djelovanjem  $\text{FAD}^+$  dehidrogenaze, koja oksidira aminokiseline u iminokiseline. Slijedi hidroliza nastalih iminokiselina u  $\alpha$ -ketokiseline, a zatim dolazi do aktivacije dekarboksilaze uz koenzim tiamin-pirofosfat (TPP). Na taj način iz leucina nastaje *i*-amil alkohol, a iz *i*-leucina optički aktivan amil alkohol s asimetričnim ugljikom (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Niz čimbenika kao što su soj kvasca, udio aminokiselina, koncentracija etanola, temperatura fermentacije, pH mošta, aeracija, udio krutih dijelova, sorta grožđa, stupanj zrelosti i maceracija, utječu na njihovu koncentraciju u vinu (Swiegers i sur., 2005). Viši alkoholi imaju snažan miris i okus, koji značajno utječe na karakter i okus vina. Pri koncentracijama nižim od  $300 \text{ mg L}^{-1}$  pridonose aromatičnosti vina, dok koncentracije iznad  $400 \text{ mg L}^{-1}$  utječu negativno na kvalitetu vina (Swiegers i sur., 2005). Veći sadržaj u vinima može biti i rezultat mikrobiološkog kvarenja posredstvom kvasaca i bakterija, ali tada amil alkohol poprima preizražen miris (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Tijekom dozrijevanja, reagirajući s organskim kiselinama pridonose formiranju estera u vinu (Rapp i Güntert, 1986). Generalno gledajući, viši alkoholi čine 50 % ukupnih aromatskih spojeva vina, isključujući etanol. Najznačajniji su ravnolančani alkoholi: 1-propanol, *i*-butanol (2-metil-1-propanol), *i*-amil alkohol (2-metil-1-propanol), amil alkohol (2-metil-1-butanol), 1-heksanol i ciklički: 2-fenil etanol (najvažniji fenolni alkohol) (Jackson, 2014).

Najvažniji viši alkohol u vinima je već spomenuti *i*-amil alkohol. Udio je općenito u rasponu od 45 do  $490 \text{ mg L}^{-1}$  (Lambrechts i Pretorius, 2000), a senzorski prag osjetljivosti



iznosi 30 mg L<sup>-1</sup> (Escudero i sur., 2007). U nižim koncentracijama (< 300 mg L<sup>-1</sup>) ima slatkastu aromu (Gomez-Miguez i sur., 2007) i aromu na marcipan. 1-heksanol viši je alkohol koji daje vinima miris po travi i zelenom (Jackson, 2014). Udio u vinima iznosi 0,3 – 12 mg L<sup>-1</sup>, dok je senzorski prag detekcije 5,2 mg L<sup>-1</sup> (Swiegers i sur., 2005). 2-fenil etanol posljednji je važan spoj iz skupine viših alkohola. Karakterizira ga aroma ruže, meda, i ljiljana. Zbog svog mirisa po ruži, smatra se jedinim uvijek poželjnim višim alkoholom za aromu vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Koncentracije 2-fenil etanola u vinima su 10 – 100 mg L<sup>-1</sup> (Lambrechts i Pretorius, 2000), a senzorski prag osjetljivosti je 14 mg L<sup>-1</sup> (Gomez-Miguez i sur., 2007).

#### 2.1.2.4. Hlapivi fenoli

Tijekom alkoholne fermentacije može doći do dekarboksilacije fenolnih kiselina posredstvom kvasca roda *Brettanomyces/Dekkera* pri čemu nastaju hlapivi fenoli (Lambrechts i Pretorius, 2000). Esteri hidroksicimene kiseline, naročito kumarinske i ferulinske, glavni su prekursori hlapivih fenola (Jackson, 2014). Vinil fenoli i etil fenoli najznačajniji su predstavnici. Povezuje ih se s neugodnim mirisima kao što su medicinski, miris po štali, konjskom znoju te mišjem urinu (Swiegers i sur., 2005).

#### 2.1.3. Aroma starenja

Dozrijevanjem i skladištenjem vina, u boci ili hrastovim bačvama, stvara se „bouquet“ vina, ili aroma starenja, kroz razne enzimatske i fizikalne reakcije. Naime, „bouquet“ vina nastaje oksidacijom spojeva sorte arome ili kemijskom i fizikalnom ekstrakcijom komponenti drveta. Prema tome, razlikujemo oksidativnu aromu i aromu drveta. U hrastovim „barrique“ bačvama vino poprima miris drveta, vanilije, dima ili začina. Za aromu vanilije zaslužan je aldehid vanilin (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Također, specifičnim kemijskim reakcijama između aminokiselina i šećera nastaju spojevi melanoidi i viši aldehidi (furfural i oksimetilfurfural). Dio nastalih aldehida ulazi u reakcije s određenim alkoholima pri čemu nastaju acetali, hlapivi spojevi vrlo ugodnog mirisa. Primjerice, dimetil sulfid (DMS) je važan spoj vrlo pozitivnog utjecaja na aromu bijelih vina skladištenih u bocama, a manjeg na aromu crnih vina, čiji senzorski prag iznosi 0,04 – 0,06 mg L<sup>-1</sup> (Jackson, 2014).

## 2.2. VISOKI HIDROSTATSKI TLAK

Prva komercijalna upotreba visokog hidrostatskog tlaka započela je u Japanu 1990-ih godina, a danas je jedna od najvažnijih netoplinskih metoda procesiranja hrane. Visoki hidrostatski tlak alternativna je metoda toplinskom konzerviranju hrane, čija primjena omogućava smanjenje broja mikroorganizama uz minimalni utjecaj na kvalitetu hrane. Primjerice, djelovanjem visokog tlaka moguće je inaktivirati bakterije *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* i *Listeria monocytogenes* kao najčešće uzročnike mikrobiološkog kvarenja tekućih i polutekućih proizvoda (Koutchma, 2014.). Glavne prednosti ove tehnologije su trenutačno i homogeno djelovanje te mogućnost vrlo široke primjene netoplinske obrade (Koutchma, 2014.).

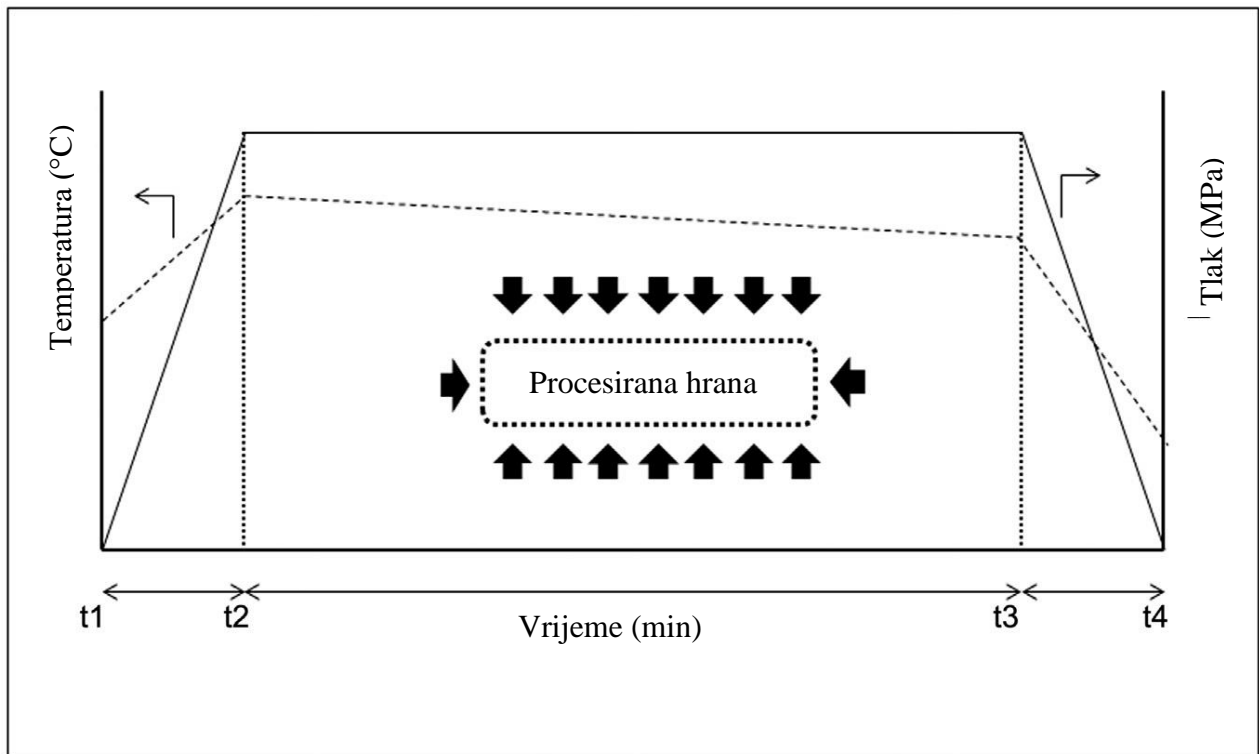
### 2.2.1. Princip visokog hidrostatskog tlaka

Obrada visokim hidrostatskim tlakom uključuje tlakove od 100 do 1000 MPa, s ili bez uvođenja topline izvana, a proces se sastoji od tretiranja pakirane ili nepakirane hrane tlakom u kućištu uređaja (Koutchma, 2014.).

Princip djelovanja visokog hidrostatskog tlaka temelji se na izostatskom pravilu – tlak djeluje u svim točkama istovremeno i istom silom, neovisno o veličini i obliku. Sukladno tome, tlak se prenosi trenutačno i jednolično kroz uzorak bez obzira jesu li tlak i uzorak u direktnom ili indirektnom kontaktu (uzorak u ambalaži). Vrijeme rada ne ovisi o volumenu uzorka (Koutchma, 2014.). Kao tlačno-prijenosni mediji koriste se obična voda, etanol ili propilen-glikol (Koutchma, 2014.).

Zrak, voda i hrana podliježu adijabatskom zagrijavanju tijekom kompresije, odnosno hlađenju tijekom dekompresije. Adijabatska toplina kompresije je trenutna volumetrijska temperaturna promjena materijala tijekom kompresije ili dekompresije. Voda ima najniži stupanj porasta temperature tijekom kompresije, oko 3 °C za 100 MPa pri 25 °C (Koutchma, 2014). Pretpostavka je da većina hrane visokog sadržaja vlage ima termodinamička svojstva slična onima vode. Slika 1 prikazuje očekivani profil tlaka i temperature tijekom procesiranja hrane visokim hidrostatskim tlakom. Vrijeme potrebno za dostizanje tlaka od 600 MPa je oko 2 min. Uslijed adijabatskog zagrijavanja u kućištu uređaja dolazi i do zagrijavanja hrane. No tijekom procesa temperatura unutar kućišta uređaja uravnotežuje se sa zadanom temperaturom

rada. Po završetku rada dolazi do adijabatskog hlađenja, također stopom od 3 °C za svakih 100 MPa (Augusto i sur., 2018).



Slika 1. Očekivani profil tlaka i temperature tijekom obrade hrane visokim hidrostatskim tlakom (Augusto i sur., 2018)

### 2.2.2. Djelovanje visokog hidrostatskog tlaka na hranu

Učinak visokog hidrostatskog tlaka na hranu slijedi Le Chatelierovo načelo: svaki sustav pod djelovanjem neke sile teži umanjiti silu koja na njega djeluje. Tako su u sustavu hrane promjene kao što su mijenjanje molekulske konfiguracije ili faze, odnosno odvijanje neke kemijske reakcije, popraćene smanjenjem volumena, proporcionalno s povećanjem tlaka (Gupta i Balasubramaniam, 2012). Volumen vode i hrane bazirane na vodi pri 600 MPa može se smanjiti do 15 %, zbog čega se koristi fleksibilna ambalaža.

Visoki hidrostatski tlak uzrokuje pucanje ionskih veza, što dovodi do smanjenja volumena, a istovremeno pridonosi stabilizaciji vodikovih veza (Koutchma, 2014.). Važno je istaknuti kako kovalentne veze ne podliježu promjenama (Linton i Patterson, 2000). Dakle, visoki hidrostatski tlak remeti trodimenzionalnu strukturu većih molekula ili staničnih

struktura (proteini, enzimi, lipidi, stanične membrane), ali nema efekt na male kovalentno vezane molekule (vitamini, pigmenti, tvari arome) (Linton i Patterson, 2000). Strukturalne promjene često su povezane s promjenom teksture i ključne su za inaktivaciju mikroorganizama i enzima. Inaktivacijom enzima sprečava se oksidacija peroksida i enzimatsko posmeđivanje hrane (Augusto i sur., 2018).

### 2.2.3. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na vino

Upotreba visokog hidrostatskog tlaka u enologiji relativno je nova metoda, dok je utjecaj, a posebice dugoročni potencijal ove tehnologije kao enološke prakse potrebno ispitati. Visoki hidrostatski tlak u najvećoj mjeri koristi se za inaktivaciju nepoželjnih mikroorganizama u vinu te inaktivaciju enzima i to najčešće pri tlakovima od 400 – 600 MPa. Tako je primjerice primjenom tlaka od 200 – 500 MPa moguće inaktivirati bakterije i kvasce u crnom i bijelom vinu i to bez značajnog utjecaja na senzorske karakteristike vina (Buzrul, 2012; Mok i sur., 2006).

Obzirom na antimikrobno djelovanje, novija istraživanja sugeriraju mogućnost primjene visokog hidrostatskog tlaka kao alternativnog postupka dodatku sumporovog dioksida. Naime, sumporov dioksid je zbog svojih jakih antiseptičkih i antioksidativnih svojstava najčešće korišten aditiv u vinarstvu. Međutim, navedeni aditiv kod osjetljivih pojedinaca može izazivati alergijske reakcije te imati negativan učinak na zdravlje, zbog čega se upotreba sumporovog dioksida nastoji smanjiti. Ranija istraživanja sugeriraju mogućnost primjene visokog hidrostatskog tlaka s optimalnom kombinacijom tlaka, vremena i temperature kao alternativne tehnologije dodatku sumporovog dioksida (Delfini i sur., 1995; Santos i sur., 2013), međutim utjecaj ove tehnologije na fizikalno-kemijske te senzorske karakteristike vina je vrlo slabo istražen.

Visoki hidrostatski tlak pokazao se i kao dobra alternativa tradicionalnim tehnikama mikrobiološke stabilizacije kao što je filtracija ili pasterizacija (visoka temperatura, kratko vrijeme) u kontroli *Brettanomyces/Dekkera spp.* u crnim vinima (Morata i sur., 2012). Naime, *Brettanomyces/Dekkera spp.* stvaraju hlapive fenole negativnih mirisa, a smatra se da primjena visokog hidrostatskog tlaka, za razliku od navedenih tradicionalnih tehnika nema negativan utjecaj na senzorska svojstva vina.

Odabir tlaka, vremena tretiranja te duljine dozrijevanja vina nakon tretiranja imaju ključnu ulogu u definiranju fizikalno-kemijskih te senzorskih karakteristika tretiranih vina (Santos i sur., 2013; Santos i sur., 2016). Studija o zajedničkom utjecaju visokog hidrostatskog tlaka i „čipsa“ (komadići tostiranog hrasta) pokazala je kako duljina tretmana ima značajniju ulogu od visine primijenjenog tlaka (Tao i sur., 2016). Nadalje, utvrđeno je da tretman visokim tlakom od 400 – 500 MPa tijekom 5 minuta na crnom vinu utječe na fizikalno-kemijske i senzorske karakteristike vina tijekom dozrijevanja, a u prvom redu na formiranje pigmenata narančastog obojenja te smanjenje ukupnog udjela polifenola i antocijana uslijed intenzivnih reakcija polimerizacije (Santos i sur., 2012). Drugim riječima, tretman visokim hidrostatskim tlakom potiče, odnosno ubrzava kemijske reakcije dozrijevanja vina, a intenzitet navedenih promjena postaje sve izraženiji s duljinom dozrijevanja (Santos i sur., 2013). Istraživanje provedeno na nesulfitiranom bijelom vinu tretiranom tlakovima od 425 i 500 MPa tijekom 5 min, tijekom godine dana skladištenja u boci pokazalo je kako je pravi utjecaj tretmana visokog tlaka vidljiv tek nakon 6 mjeseci skladištenja, pri čemu je u tretiranim vinima nakon godinu dana skladištenja došlo do intenziviranja reakcija posmeđivanja, smanjenja udjela polifenola te formiranja arome „kuhanog voća“. Također, smanjenje udjela slobodnih aminokiselina te povećanje udjela furana u tretiranim uzorcima pokazalo je kako tretman visokim hidrostatskim tlakom ubrzava Maillardove reakcije tijekom perioda dozrijevanja i skladištenja vina (Santos i sur., 2013).

Tao i sur. (2012) utvrdili su kako tretman visokim hidrostatskim tlakom od 650 MPa već nakon 15 minuta ima utjecaj na kromatske karakteristike i polifenolni sastav vina Syrah, dok je tretman u trajanju od dva sata značajno utjecao na smanjenje intenziteta boje i udjela ukupnih polifenola, antocijana, tanina i flavonola. Također, senzorskom analizom utvrđeno je kako tretman od 659 MPa tijekom dva sata može utjecati na smanjenje kiselosti, trpkocē i gorčine, ali istodobno i na smanjenje voćnosti crnog vina, iako značajniji utjecaj na ukupnu kvalitetu vina nije utvrđen. Ipak, obzirom na navedeno ne preporuča se primjena visokih tlakova ( $\geq 600$  MPa) kroz dugo vrijeme ( $\geq 1$  h) (Tao i sur., 2012).

Istraživanje Tabilo-Manizaga i sur. (2014) provedeno na bijelom vinu Sauvignon blanc pokazalo je kako primjena visokog hidrostatskog tlaka osim mikrobiološke kontrole i stabilnosti, ima pozitivan utjecaj na stabilnost proteina vina. Proteini su u vinu prisutni u obliku koloida i imaju važnu ulogu u koloidnoj stabilizaciji i bistroći bijelih vina (Sauvage i sur., 2010). Mutnoća i talog formiran uslijed denaturacije proteina nepoželjne su mane vina,

koje se uklanjaju postupcima stabilizacije kao što su: dodatak bentonita, povišenje (80 °C / 8 h) ili sniženje temperature (do točke smrzavanja), dodatak tanina ili ultrafiltracija. Visoki hidrostatski tlak pokazao se kao dobra alternativa navedenim postupcima. Utvrđeno je kako tretman visokim hidrostatskim tlakom ne djeluje na kovalentne veze, uslijed čega primarna struktura ostaje nepromijenjena, dok sekundarna, tercijarna i kvartarna struktura podliježu promjenama (Tabilo-Manizaga i sur., 2014). Strukturne promjene proteina vina uzrokovane tretmanom od 450 MPa u trajanju od 3 i 5 minuta rezultirale su poboljšanjem termalne stabilnosti vina te sprječavanjem pojave mutnoće vina tijekom dozrijevanja i skladištenja.

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJAL

#### 3.1.1 Uzorci vina

Za izradu ovog diplomskog rada korišteno je vino sorte Graševina, berba 2016, Erdutski vinogradi d.o.o., u kojem je ispitan utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na sastav arome. Fizikalno-kemijski sastav vina prikazan je u tablici 1.

Tablica 1. Osnovni fizikalno-kemijski sastav vina Graševina

Parametar	Graševina
Alkohol (vol %)	11,4
Ukupna kiselost (g L <sup>-1</sup> vinske kiseline)	5,1
Hlapiva kiselost(g L <sup>-1</sup> octene kiseline)	0,31
Reducirajući šećeri (g L <sup>-1</sup> )	2,8
pH	3,37
Jabučna kiselina (g L <sup>-1</sup> )	1,2
Mliječna kiselina (g L <sup>-1</sup> )	0,3
Ukupni sumporov dioksid (mg L <sup>-1</sup> )	19
Slobodni sumporov dioksid (mg L <sup>-1</sup> )	78

#### 3.1.2. Kemikalije

Za analizu spojeva arome korišteni standardi i reagensi bili su *pro chromatography* stupnja čistoće.

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

### 3.1.3. Oprema i aparatura

- Uređaj za visoki tlak: FPG7100 Stansted Fluid Power Iso-lab High Pressure System; Stansted Fluid Power Ltd., Harlow, Essex, UK
- Plastične bočice volumena 100 mL
- Plastične vrećice za vakuumiranje, Jarden Consumer Solutions, Chesire, UK
- Uređaj za vakuumiranje, Besser Vacuum SRL, Dignano, Italija
- Analitička vaga, Metler Toledo ( $\pm 0,0001$  g), Columbus, OH, SAD
- Termostat, Inkolab, Zagreb, Hrvatska
- Plinski kromatograf (GC), Agilent Technologies 6890 Network GC System, Santa Clara, CA, SAD
- Maseni spektrometar, Agilent Technologies 5973 *Inert* Mass Selective Detector, Santa Clara, CA, SAD
- SPME vlakno: 100  $\mu$ m PDMS, 23 Ga, Supelco, Bellefonte, PA, SAD
- Termoblok s magnetskom miješalicom, Pierce, Reacti-Therm, Heating/Stirring module, No. 18971, Rockford, IL, SAD
- Magnet
- Mikropipeta, 10-100  $\mu$ L, Eppendorf, Hauppauge, NY, SAD
- HSS bočice, 20 mL, Restek, Bellefonte, PA, USA
- Silikonski čepovi za HSS bočice, Düren, Njemačka



## 3.2. METODE

### 3.2.1. Tretiranje vina visokim hidrostatskim tlakom

Tretiranje vina visokim hidrostatskim tlakom provedeno je na uređaju Stansted Fluid Power Ltd, koji radi šaržno, a maksimalni tlak koji može generirati je 1000 MPa. Princip metode baziran je na tlaku koji djeluje na materijal istom silom u svim točkama, a prenosi se u kućištu uređaja, volumena 2000 mL, kroz tlačno-prijenosni medij, propilen glikol. Uzorci vina Graševina tretirani su hidrostatskim tlakovima od 200, 400 i 600 MPa, u trajanju od 5 i 25 min (tablica 2), a svaki navedeni tretman proveden je u tri paralele. Kontrolni uzorak je uzorak vina Graševina koji nije bio tretiran visokim tlakom.

#### Postupak:

U plastičnu bočicu otpipetirati 100 mL uzorka vina. Bočicu zatvoriti navojnim čepom i staviti u plastičnu vrećicu te vakimirati. Tako pripremljen uzorak dalje staviti u cilindar uređaja za tretman visokim hidrostatskim tlakom. Tretiranje započeti nakon postizanja željenog tlaka (tablica 2).

Tablica 2. Parametri tretiranja visokim hidrostatskim tlakom

<b>Sorta vina</b>	<b>Tlak (MPa)</b>	<b>Vrijeme (min)</b>
Graševina	200	5
Graševina	200	25
Graševina	400	5
Graševina	400	25
Graševina	600	5
Graševina	600	25

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

Određivanje spojeva arome [terpeni (linalool), karbonilni spojevi (benzaldehyd), etilni esteri (etil butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanat, dietil sukcinat), acetatni esteri (etil acetat, *i*-butil acetat, *i*-amil acetat, heksil acetat, 2-feniletil acetat) i viši alkoholi (1-heksanol, *i*-amil alkohol, 2-fenil etanol)] provedeno je primjenom plinske kromatografije s masenom detekcijom (GC/MS) uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME).

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

#### GC/MS analiza:

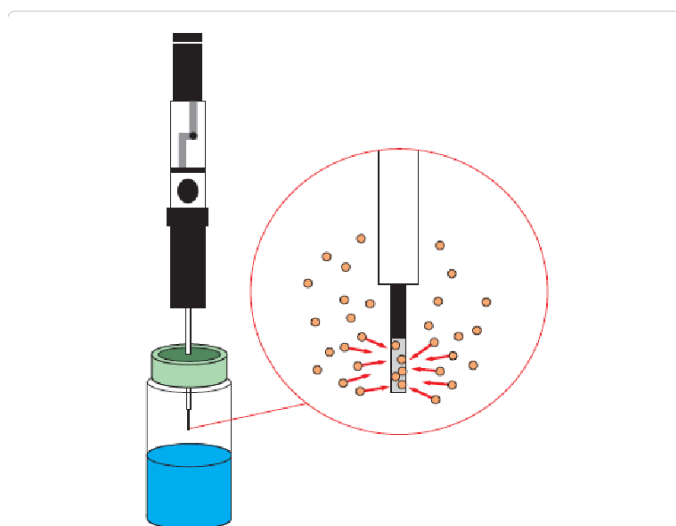
Kromatografska kolona: BP20 (50 m x 220  $\mu\text{m}$  x 0,25  $\mu\text{m}$ ), SGE Analytical Science, Victoria, Australija

Uvjeti rada plinskog kromatografa (GC / MS):

- Temperatura injektora: 250 °C
- Temperatura detektora: 280 °C
- Temperaturni program: 40 °C, 5 min → 200 °C, 3 °C/min → 240 °C, 30 °C min<sup>-1</sup>
- Pokretna faza: Helij
- Protok pokretne faze: 1,2 mL min<sup>-1</sup>
- Mode injektiranja: „Splitless“

### Priprema uzorka za mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME):

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



Slika 2. Princip mikroekstrakcije na čvrstoj fazi – SPME vlakno (Kataoka i sur. 2000)

### Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome:

Identifikacija spojeva arome [terpeni (linalool), karbonilni spojevi (benzaldehyd), etilni esteri (etil butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanat, dietil sukcinat), acetatni esteri (etil acetat, i-butil acetat, i-amil acetat, heksil acetat, 2-feniletil acetat) i viši alkoholi (1-heksanol, i-amil alkohol, 2-fenil etanol)] provedena je usporedbom retencijskih vremena

spojeva s retencijskim vremenima standarda te usporedbom masenih spektara spojeva s masenim spektrima u Nist05 knjižnici masenih spektara.

Kvantifikacija navedenih spojeva arome provedena primjenom baždarnih krivulja pripadajućih standarda. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su u  $\text{mg L}^{-1}$ . Računalna brada dobivenih kromatograma provedena je u programu Enhanced ChemStation (Agilent Technologies), a analiza rezultata u programu Microsoft Excel 2016.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

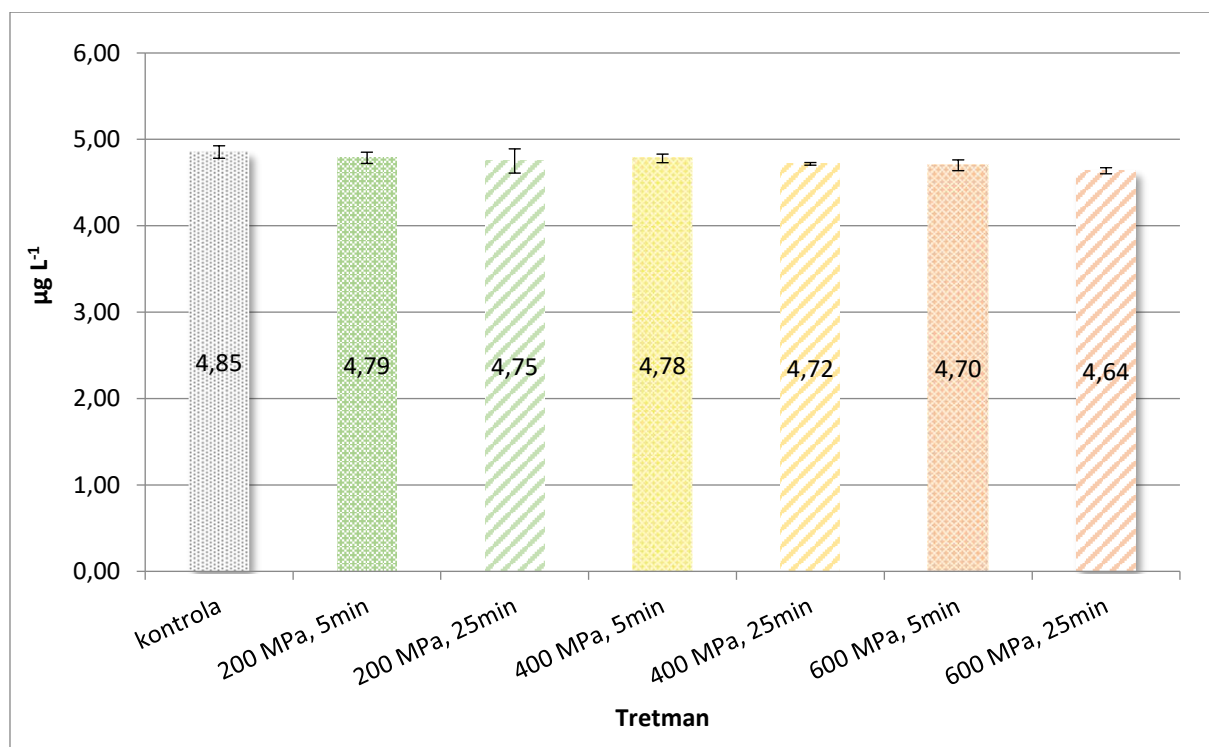
U ovom radu ispitan je utjecaj tretmana visokog hidrostatskog tlaka primjenom tlakova od 200, 400 i 600 MPa tijekom 5 i 25 minuta tretiranja na sastav arome mladog vina Graševina.

Analiza arome provedena je plinskom kromatografijom u kombinaciji s masenom spektrometrijom uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME – GC/MS), pri čemu je identificirano i kvantificirano 15 hlapivih spojeva arome [terpeni (linalool), karbonilni spojevi (benzaldehyd), etilni esteri (etil butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanat, dietil sukcinat), acetatni esteri (etil acetat, *i*-butil acetat, *i*-amil acetat, heksil acetat, 2-feniletal acetat) i viši alkoholi (1-heksanol, *i*-amil alkohol, 2-fenil etanol)].

Dobiveni rezultati su prikazani na slikama 3 – 17, u obliku grafova za svaki pojedini spoj i to kao srednja vrijednost koncentracije tri repeticije uz standardnu devijaciju ( $n=3$ ).

#### 4.1. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju terpena

Koncentracije najznačajnijeg monoterpenskog alkohola linaloola u kontrolnom (netratiranom) vinu te u uzorcima vina tretiranim visokim hidrostatskim tlakom (200, 400 i 600 MPa tijekom 5 i 25 minuta) prikazane su na slici 3.



Slika 3. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju linaloola u vinu Graševina

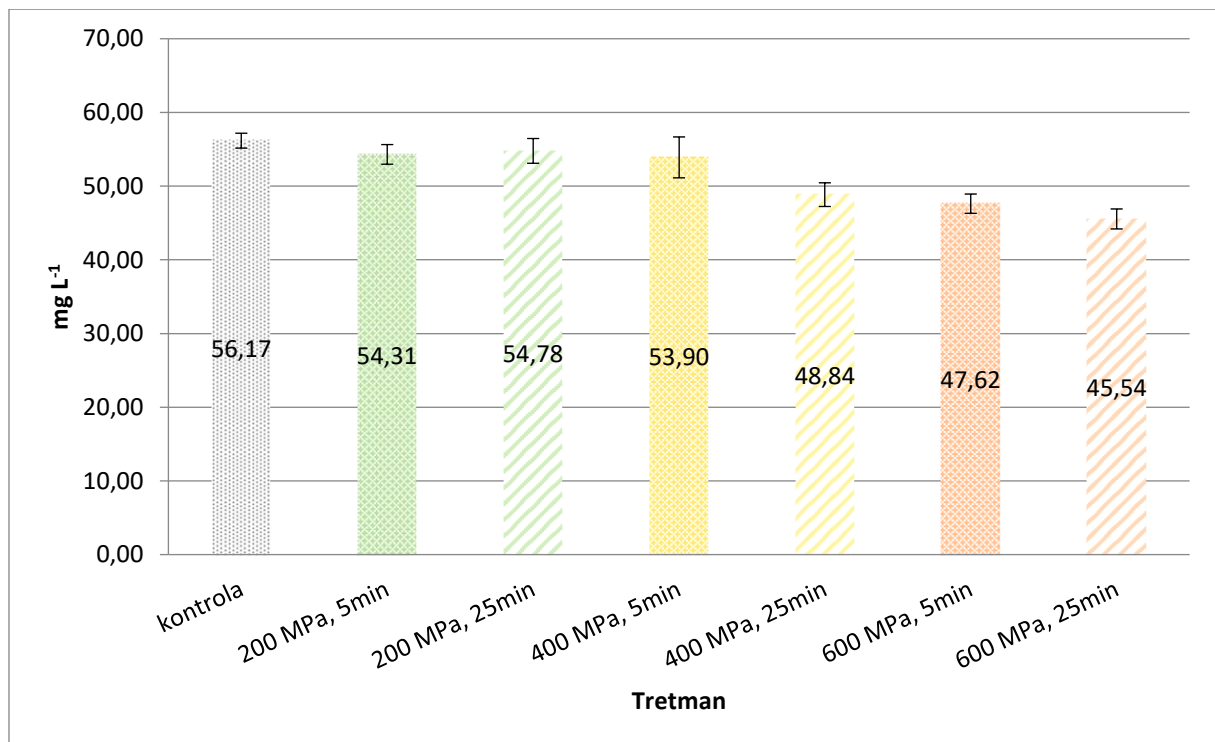
Usporedbom koncentracija kontrolnog netretiranog vina i tretiranih uzoraka, vidljivo je kako je tretman visokim hidrostatskim tlakom od 200 MPa u trajanju od 5 i 25 minuta pridonio blagom smanjenju koncentracije linaloola. Duljina tretiranja kod navedenog tretmana nije imala značajniji utjecaj, obzirom da su dobivene slične koncentracije nakon 5 i 25 minuta tretiranja, odnosno koncentracija linaloola nakon tretiranja pri 200 MPa tijekom 5 minuta bila je tek neznato viša od one utvrđene pri istom tlaku i duljini od 25 minuta tretiranja (slika 3). Identičan trend utvrđen je i kod vina tretiranog visokim hidrostatskim tlakom od 400

MPa u trajanju od 5 i 25 minuta, a dobivene koncentracije bile su tek neznato niže od vrijednosti dobivenih kod vina tretiranih nižim tlakom.

Značajniji pad koncentracije linaloola uočen je pri tretmanu od 600 MPa i to već pri duljini tretiranja od 5 minuta, dok su najizraženije promjene u koncentraciji linaloola uočene nakon 25 minuta tretiranja (slika 3). Dobiveni rezultati pokazuju kako primjena visokog hidrostatskog tlaka nije značajnije utjecala na koncentraciju terpena, odnosno linaloola u vinu Graševina, osim kod najviše vrijednosti primijenjenog tlaka (600 MPa). Dosadašnja istraživanja ne navode učinak visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju terpena u vinima.

#### 4.2. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju karbonilnih spojeva

U skupini karbonilnih spojeva, identificiran je i kvantificiran benzaldehid. Rezultati utjecaja različitih procesnih parametara visokog tlaka (200, 400 i 600 MPa tijekom 5 i 25 minuta) na koncentraciju ovog spoja prikazani su na slici 4.



Slika 4. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju benzaldehida u vinu Graševina

Tretman visokim hidrostatskim tlakom od 200 MPa nije značajnije utjecao na koncentraciju benzaldehida u usporedbi s kontrolnim netretiranim uzorkom, a također razlike među tretmanima od 5 i 25 minuta nisu utvrđene. Nadalje, koncentracije određene u vinu tretiranom tlakom od 400 MPa nešto su niže od onih u kontrolnom uzorku te u uzorcima tretiranim tlakom od 200 MPa. Kod tretmana od 400 MPa, duljina tretiranja pokazala je značajan utjecaj na koncentraciju benzaldehida. Naime, nakon 5 minuta tretiranja uočene su blago niže koncentracije ovog spoja, međutim nakon 25 minuta dobivene su značajne razlike između kontrolnog i tretiranog uzorka. Također, tretiranje vina visokim hidrostatskim tlakom od 600 MPa tijekom 5 i 25 minuta značajno je utjecalo na sniženje koncentracije benzaldehida u tretiranom vinu (slika 4).

U ovom istraživanju utvrđeno je trenutačno smanjenje koncentracija benzaldehida i to odmah po završetku samog tretmana. S druge strane, ranija istraživanja pokazala su kako tijekom vremena dozrijevanja dolazi do povećanja koncentracije ovoj spoja. Primjerice, povišenje koncentracije aldehida 10 – 15 puta utvrđeno je tijekom dozrijevanja u uzorcima tretiranim tlakom od 425 i 500 MPa u usporedbi s netretiranim vinima bez sumpora. Naime, tretiranje vina visokim hidrostatskim tlakom uzrokuje povećanje udjela aldehida te ubrzanje Maillardovih reakcija, a navedene promjene postaju izražene tijekom određenog vremena dozrijevanja (Santos i sur., 2015). Međutim, učinak visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju samog benzaldehida, ali i drugih karbonilnih spojeva, potrebno je još istražiti.

#### 4.3. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju estera

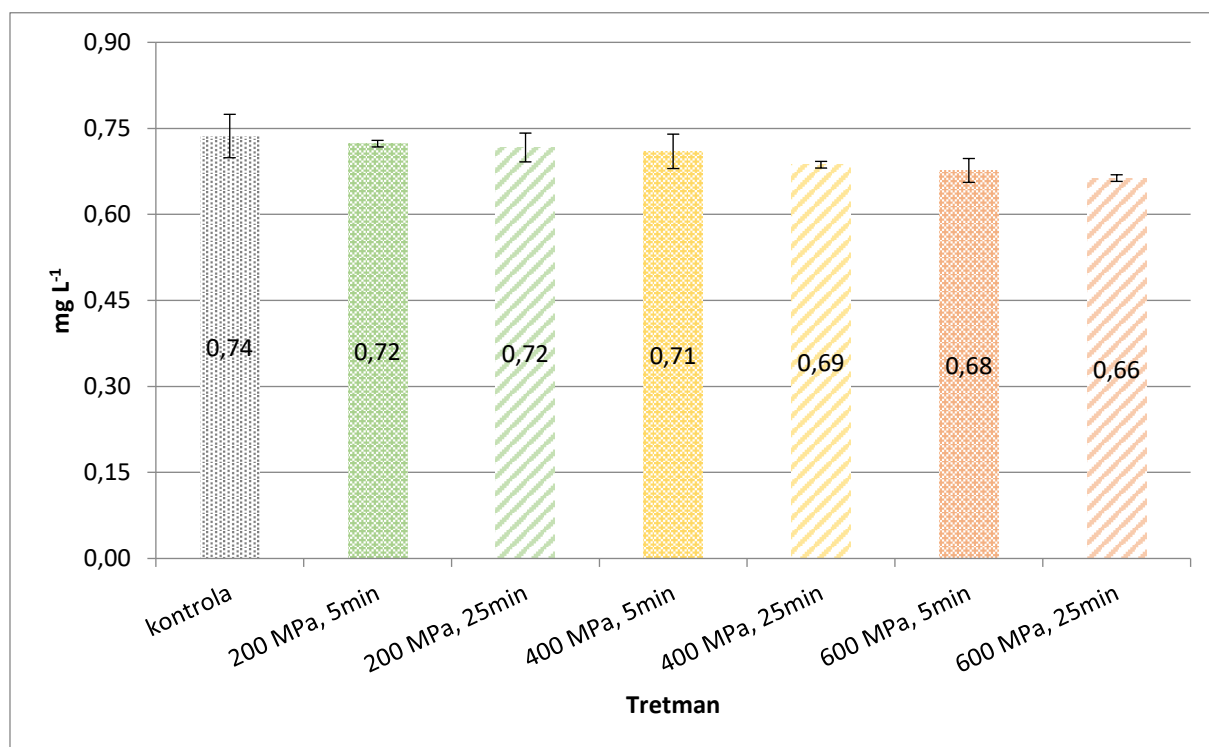
Esteri su najveća skupina aromatskih spojeva u vinu, a glavni su nositelji cvjetno-voćne arome vina nastale fermentacijom (Jackson, 2014).

Rezultati utjecaja različitih procesnih parametara visokog tlaka (200, 400 i 600 MPa tijekom 5 i 25 minuta) na koncentraciju etilnih estera prikazani su na slikama 5 – 9.

Od ukupno pet identificiranih i kvantificiranih etilnih estera (etil butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanoat i dietil sukcinat) u analiziranom uzorku vina Graševina, prvi je eluiran etil butanoat. Iz rezultata prikazanih na slici 5 vidljivo je da je visoki hidrostatski tlak inducirao blagi pad koncentracije etil butanoata, dok je intenzitet navedene promjene ovisio o intenzitetu procesnih parametara. Tako primjerice tretman visokog



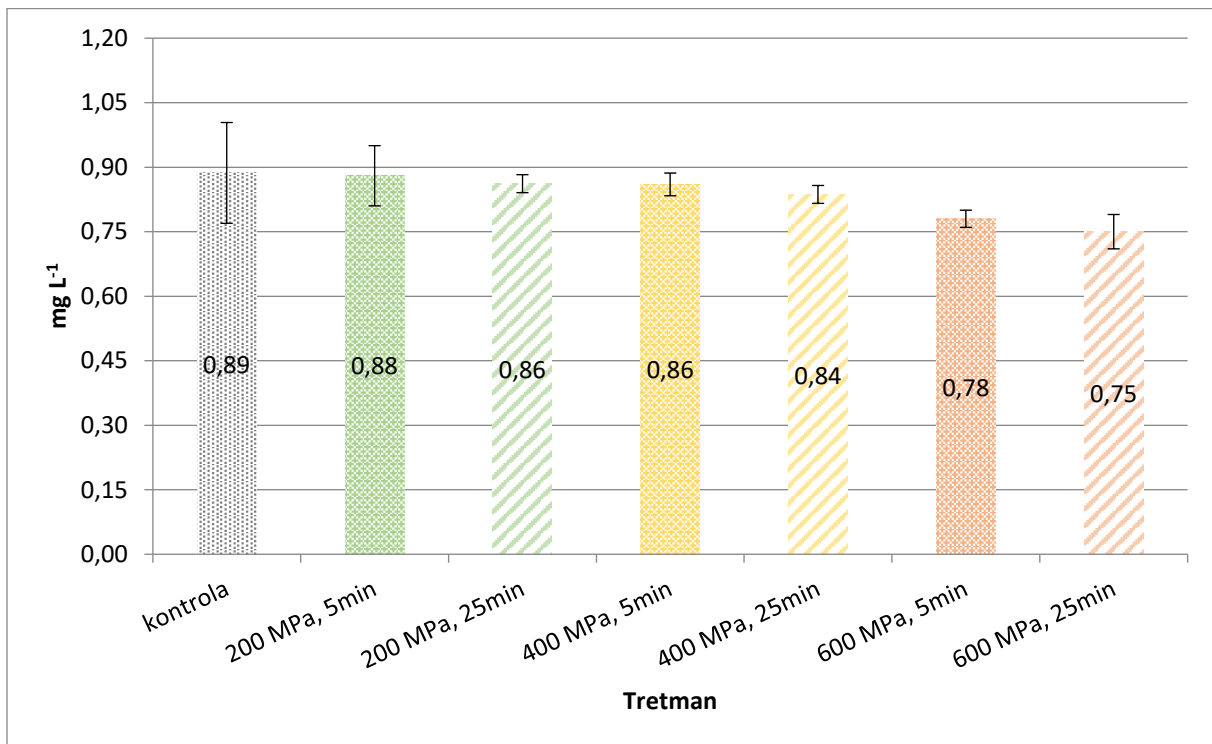
hidrostatskog tlaka od 200 MPa gotovo da nije imao utjecaj na smanjenje koncentracije, a rezultati analize nakon 5 i 25 minuta su identični. Učinak tlaka od 400 MPa ne razlikuje se od učinka tlaka od 200 MPa. Rezultat djelovanja visokog hidrostatskog tlaka kroz 5 minuta podudara se s rezultatima tretmana od 200 MPa, dok je rezultat pri 25 minuta zanemarivo niži u odnosu na prvi tretman od 5 minuta. Posljednji tretman s najvišim hidrostatskim tlakom od 600 MPa slijedi trend blagog sniženja koncentracije, pri čemu je navedena promjena u koncentraciji kod duljeg tretmana od 25 minuta bila nešto izraženija (slika 5). Etil butanoat u analiziranim uzorcima vina nalazi se znatno iznad senzorskog praga osjetljivosti te uvelike doprinosi cvjetnoj i voćnoj aromi estera, a visoki hidrostatski tlak nije uzrokovao promjene u koncentraciji ovog spoja, osim kod tretmana od 600 MPa i vremena tretiranja od 25 minuta.



Slika 5. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju etil butanoata u vinu Graševina

Koncentracije etil heksanoata u kontrolnom (netretiranom) vinu te u uzorcima vina tretiranim visokim hidrostatskim tlakom (200, 400 i 600 MPa tijekom 5 i 25 minuta) prikazane su na slici 6. Obzirom na kontrolu, visoki hidrostatski tlak od 200 MPa nije

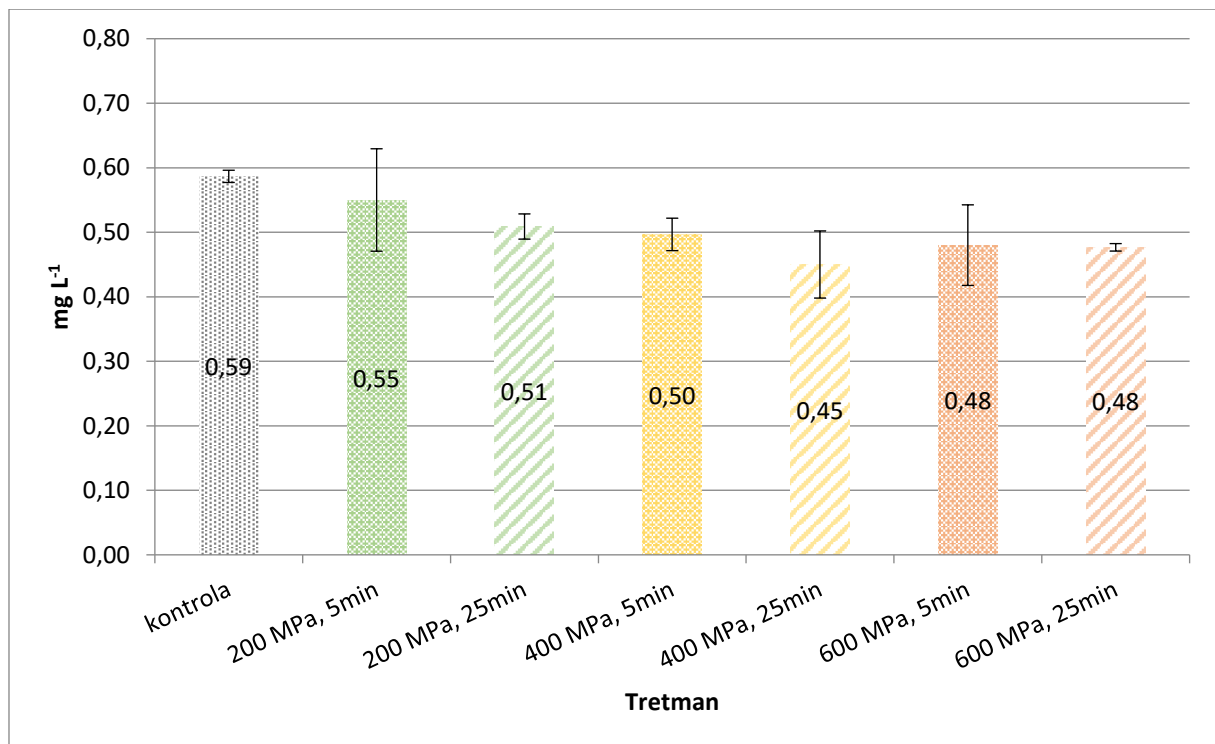
značajnije utjecao na smanjenje koncentracije etil heksanoata, iako je utvrđena vrlo mala razlika između tretmana od 5 i 25 minuta, i to u korist prvoga. Koncentracije određene nakon tretiranja tlakom od 400 MPa, također su zanemarivo manje u usporedbi s kontrolnim vinom. Nadalje, koncentracija etil heksanoata određena nakon primjene tlaka od 400 MPa u vremenu od 5 minuta bila je jednaka onoj određenoj nakon 25 minuta tretiranja pri uvjetima nižeg tlaka. Također, oba tretmana od 600 MPa utjecala su na blagi pad koncentracije, posebice tretman od 25 minuta. Etil heksanoat u analiziranim uzorcima vina nalazi se znatno iznad senzorskog praga osjetljivosti te stoga uvelike doprinosi cvjetnoj i voćnoj aromi estera, a visoki hidrostatski tlak nije uzrokovao značajnije promjene u koncentraciji ovog spoja.



Slika 6. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju etil heksanoata u vinu Graševina

U sastavu etil oktanoata (slika 7) nakon tretiranja visokim hidrostatskim tlakom uočeni su vrlo slični trendovi kao kod etil butanoata. Najblaži tretman od 200 MPa rezultirao je tek blagim smanjenjem koncentracije, pri čemu je vidljiva mala razlika između tretmana različite duljine. Djelovanjem tlaka od 400 MPa dobivene su nešto niže koncentracije, što je posebno

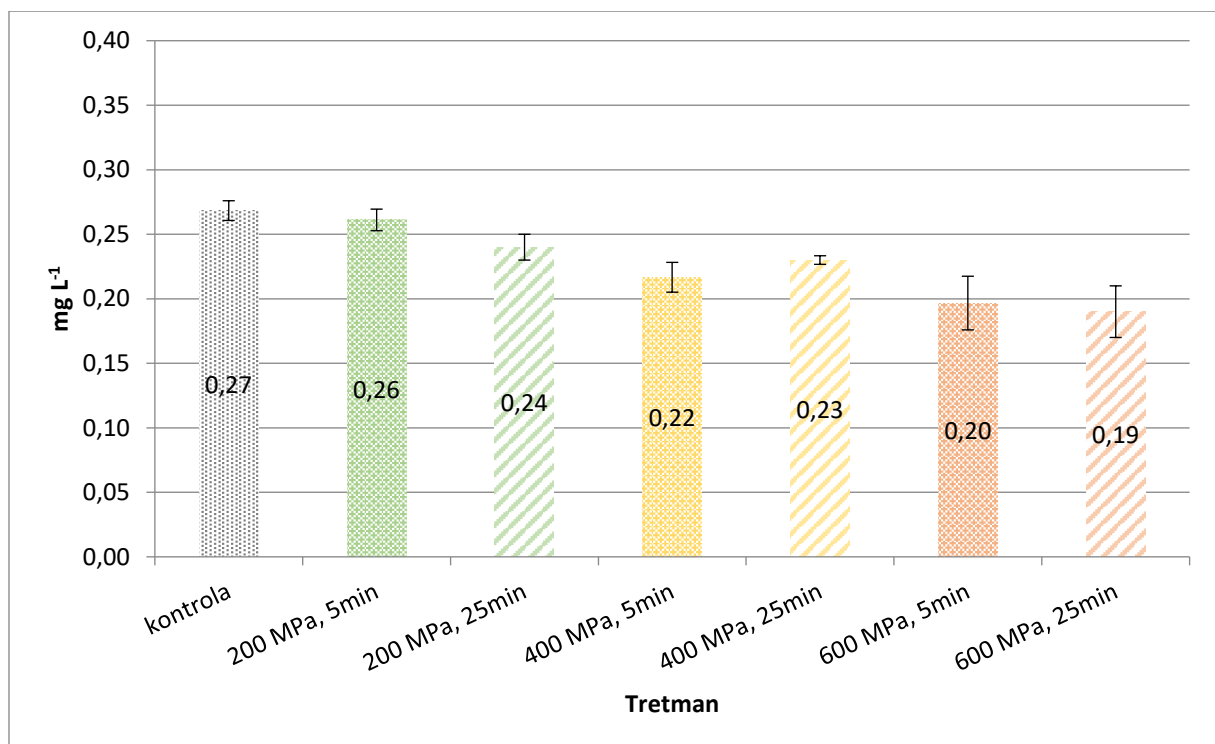
bilo izraženo nakon 25 minuta tretiranja. Santos i sur. (2015) utvrdili su kako se udio estera u bijelom vinu tretiranom visokim hidrostatskim tlakom nakon dva mjeseca skladištenja u bocama smanjio, gdje su određene 2 puta niže koncentracije etil oktanoata, odnosno 6 – 9 puta niže koncentracije etil dekanoata u odnosu na netretirano vino. Rezultati ovog diplomskog rada pokazuju vidljiv trend smanjenja koncentracije već pri tlaku od 400 MPa, dok tlak od 600 MPa rezultira značajnim padom koncentracije te su u skladu s navedenim istraživanjem (Santos i sur., 2015).



Slika 7. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju etil oktanoata u vinu Graševina

Koncentracije etil dekanoata u kontrolnom (netratriranom) vinu te u uzorcima vina tretiranim visokim hidrostatskim tlakom (200, 400 i 600 MPa tijekom 5 i 25 minuta) prikazane su na slici 8. Tretiranjem tlakom od 200 MPa nisu utvrđene značajnije promjene u koncentraciji ovog spoja, dok su vrijednosti određene nakon 25 minuta tretiranja bile tek neznatno niže u odnosu na vrijednosti dobivene nakon kraćeg tretman od 5 minuta. Nešto niže koncentracije od onih određenih kod uzoraka tretiranih tlakom od 200 MPa, dobivene su u

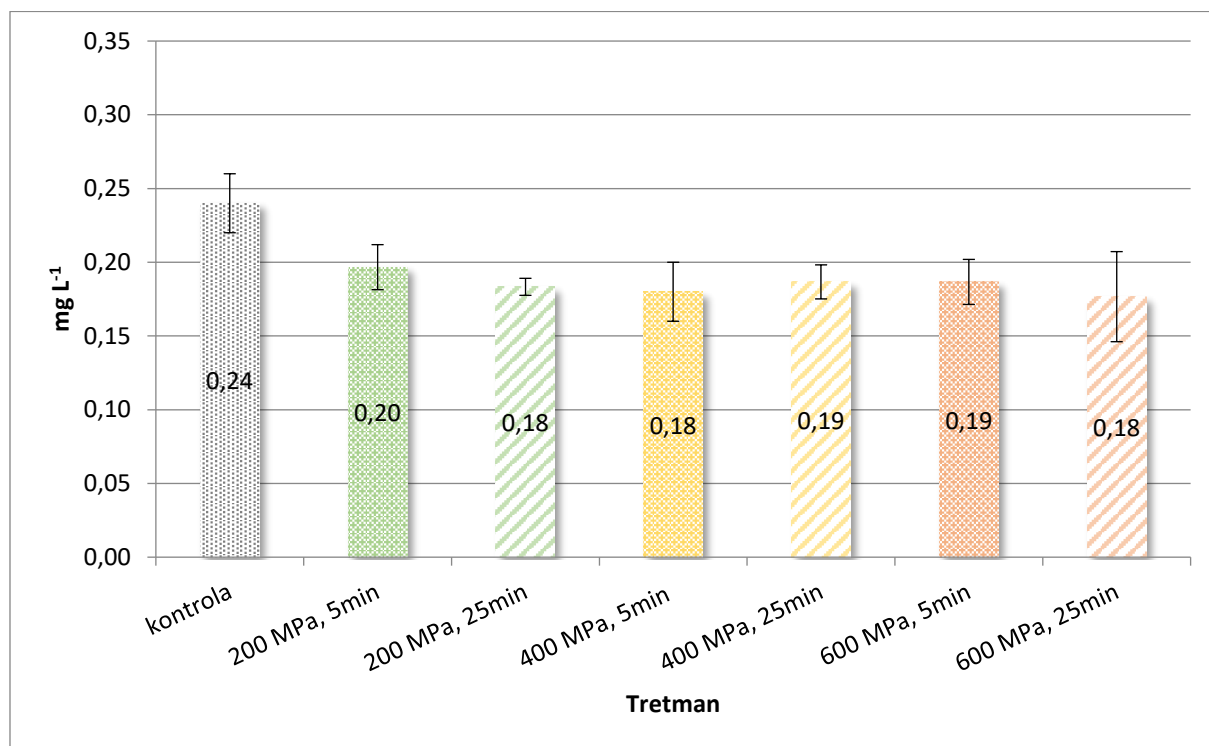
vinima tretiranim tlakom od 400 MPa i to bez razlike u koncentracijama između tretmana od 5 i 25 minuta. S druge strane, u vinima tretiranim tlakom od 600 MPa uočeno je značajno smanjenje u koncentraciji etil dekanoata, pri čemu su promjene u vinu tretiranom 25 minuta bile izraženije u odnosu na kraće (5 minuta) tretirano vino. Sniženje koncentracije etil dekanoata od 6 – 9 puta u vinima tretiranim visokim hidrostatskim tlakom nakon dva mjeseca skladištenja u bocama potvrđeno je u ranijim istraživanjima (Santos i sur., 2015), a dobiveni rezultati u skladu su s navedenim.



Slika 8. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju etil dekanoata u vinu Graševina

Posljednji etilni ester, identificiran i kvantificiran metodom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom na čvrstoj fazi (SPME – GC/MS), je dietil sukcinat. Iz prikazanih rezultata (slika 9) vidljivo je kako navedeni spoj prati trend sniženja koncentracije nakon tretiranja visokim hidrostatskim tlakom. Potrebno je pri tome napomenuti kako su već pri najblažim uvjetima tretiranja od 200 MPa kroz 5 minuta uočene promjene u koncentraciji ovog spoja. Naime, tretiranje vina visokim hidrostatskim tlakom neovisno o odabranim

procesnim parametrima tako je uzrokovalo sniženje koncentracije, dok razlike u koncentracijama između tretmana nisu utvrđene. Dobiveni rezultati pokazuju kako je među određenim etilnim esterima dietil sukcinat pokazao najveću osjetljivost pri tretiranju vina visokim hidrostatskim tlakom.



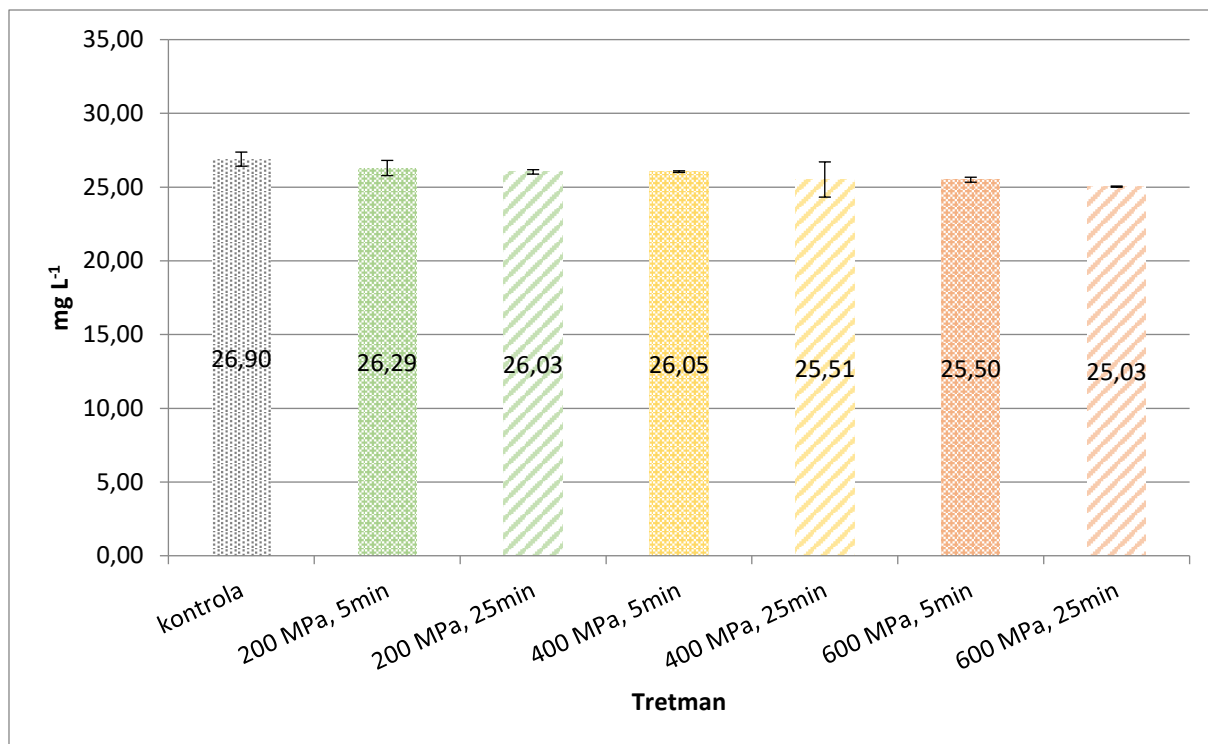
Slika 9. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju dietil sukcinata u vinu Graševina

Na osnovu obrađenih rezultata (slike 5 – 9) vidljivo je kako promjene u sastavu etilnih estera ovise o odabranim parametrima tretiranja visokim hidrostatskim tlakom. Primjena tlaka od 200 MPa uzrokovala je neznatne promjene u koncentraciji etilnih estera, bez većih razlika između vremenski različitih tretmana. Tlak od 400 MPa doveo je do nešto većeg smanjenja koncentracije, koji je uglavnom bio izraženiji kod duljeg vremena tretiranja. S druge strane značajan pad vidljiv je kod svih etilnih estera tek pri tretmanima od 600 MPa, a posebice pri tretmanu od 25 minuta. Generalno, glavnina etilnih estera nalazi se u koncentracijama znatno iznad senzorskog praga te visoki hidrostatski tlak u vinu Graševina čak i u uvjetima najvišeg

tlaka i duljine tretiranja (600 MPa / 25 minuta) nije utjecao na pad koncentracije ispod praga osjetljivosti.

U kontrolnom i tretiranim uzorcima vina Graševina metodom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom na čvrstoj fazi (SPME – GC/MS) identificirano je i kvantificirano pet acetatnih estera (etil acetat, *i*-butil acetat, *i*-amil acetat, heksil acetat, 2-feniletil acetat), a dobiveni rezultati prikazani su na slikama 10 – 14. Acetatni esteri zajedno s etilnim esterima doprinose cvjetno-voćnoj aromi vina, ali se za razliku od njih nalaze u vinu u nešto manjim koncentracijama, odnosno u koncentracijama koje su na ili neznatno iznad senzorskog praga osjetljivosti.

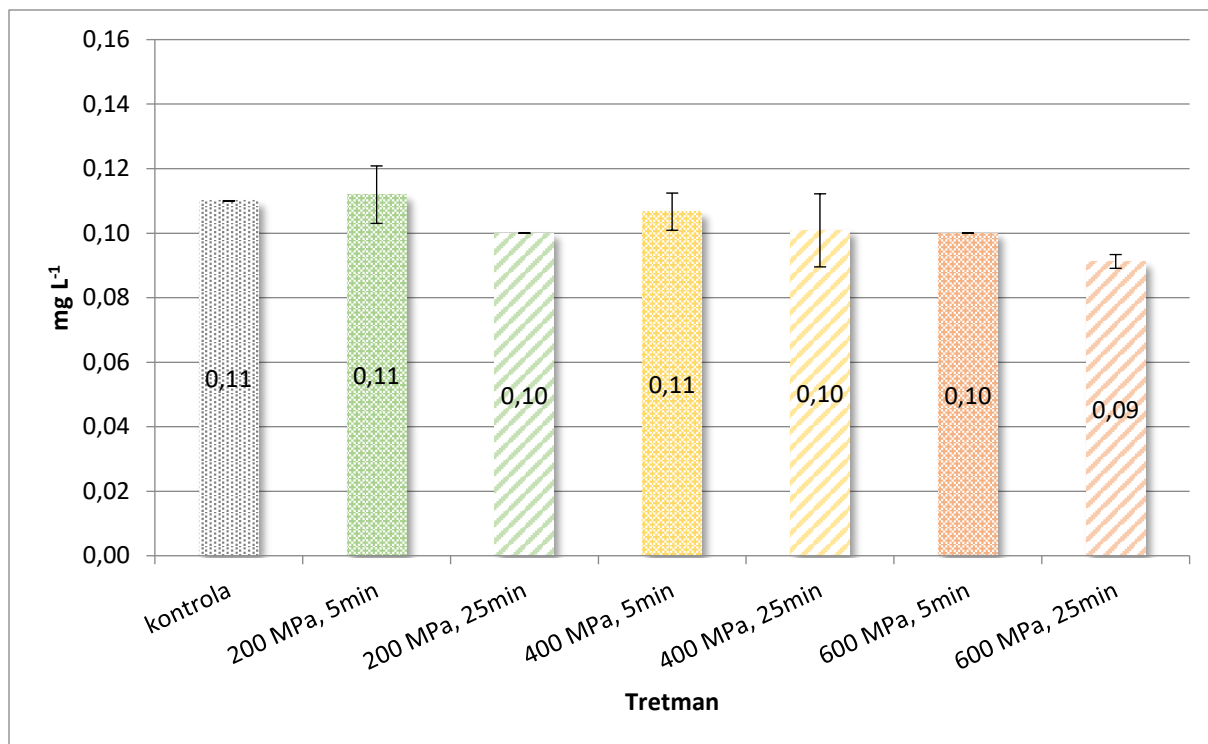
Najzastupljeniji ester među acetatnim esterima u vinu Graševina bio je etil acetat, koji je pozitivno utjecao na kompleksnost cvjetno-voćne arome svih (netretiranog i tretiranih) vina, budući da je bio zastupljen u koncentracijama ispod senzorskog praga osjetljivosti. Tretman tlakom od 200 MPa djelovao je vrlo malo na koncentraciju ovog spoja, dok su razlike između tretmana od 5 i 25 minuta bile neprimjetne. Nadalje, tretiranje tlakom od 400 MPa imalo je neznatno jači učinak od tretmana s nižim tlakom, s nešto izraženijim promjenama nakon duljeg tretmana, ali bez značajnih razlika obzirom na kontrolni netretirani uzorak vina. Također, koncentracija određena nakon tretiranja najvišim tlakom od 600 MPa tijekom 5 minuta nije se razlikovala od koncentracije određene pri prethodnom tretmanu od 400 MPa kroz 25 minuta. Međutim, nakon tretmana tlakom od 600 MPa u vremenu od 25 minuta, u analiziranom uzorku vina Graševina došlo je do značajnog pada koncentracije etil acetata (slika 10).



Slika 10. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju etil acetata u vinu Graševina

Tretiranje vina visokim hidrostatskim tlakom nije imalo značajan učinak na koncentraciju etil acetata, osim kod tretmana od 600 MPa tijekom 25 minuta. Dobiveni rezultati poklapaju se s istraživanjem Morata i sur. (2012) koji su također utvrdili izrazito male razlike u koncentraciji etil acetata između uzoraka tretiranih različitim parametrima visokog hidrostatskog tlaka i kontrolnog vina. Slične rezultate dobili su Briones-Labarca i sur. (2017) koji su proveli istraživanje o utjecaju visokog hidrostatskog tlaka na enološke karakteristike i karakteristike kvalitete mladih bijelih vina Sauvignon blanc. Navedena studija pokazala je kako tretiranje vina tlakovima od 300, 400 i 500 MPa kroz 5 i 10 minuta, ne utječe na značajne promjene u udjelu etil acetata.

*i*-butil acetat u samom kontrolnom uzorku pa tako i u tretiranim (200, 400 i 600 MPa tijekom 5 i 25 minuta) uzorcima je utvrđen u koncentracijama ispod senzorskog praga osjetljivosti, a utjecaj navedenih tretmana prikazan je na slici 11.

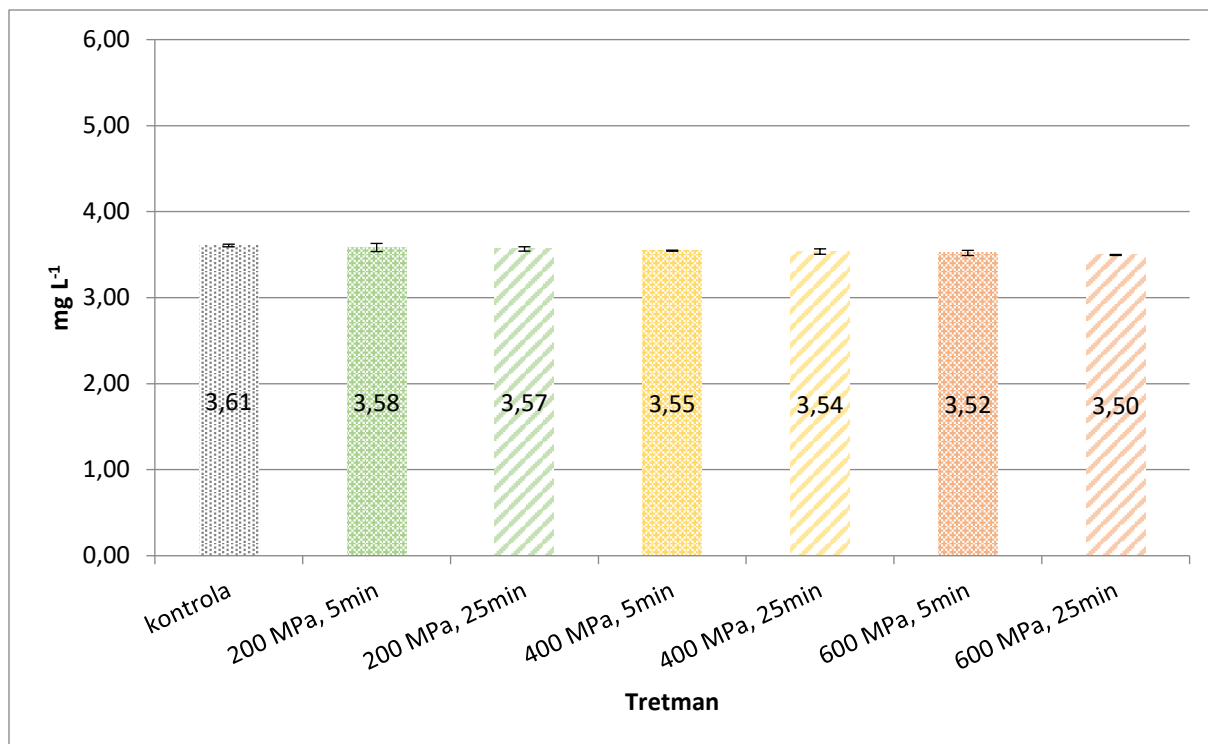


Slika 11. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju *i*-butil acetata u vinu Graševina

Tlak od 200 MPa u vremenu od 5 i 25 minuta nije imao nikakav učinak na koncentraciju spomenutog spoja u analiziranom vinu. Stoga, može se zaključiti kako tretiranje vina Graševina tlakom od 200 MPa ne utječe na promjenu koncentracije *i*-butil acetata. Rezultati dobiveni nakon primjene tlaka od 400 MPa podudaraju se s rezultatima dobivenim nakon tretiranja tlakom od 200 MPa i to u oba slučaja. Također, tretiranje tlakom od 600 MPa kroz 5 minuta nije utjecalo na promjenu koncentracije, međutim tretman od 600 MPa u vremenu od 25 minuta uzrokovao je pad koncentracije (slika 11).

*i*-amil acetat jedan je od najznačajnijih acetatnih estera s niskim senzorskim pragom detekcije, koji značajno pridonosi cjelokupnoj aromi vina. Stoga je utjecaj različitih tehnoloških tretmana na koncentraciju ovog spoja iznimno važan. Na slici 12 prikazan je utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju ovog spoja u vinu Graševina.



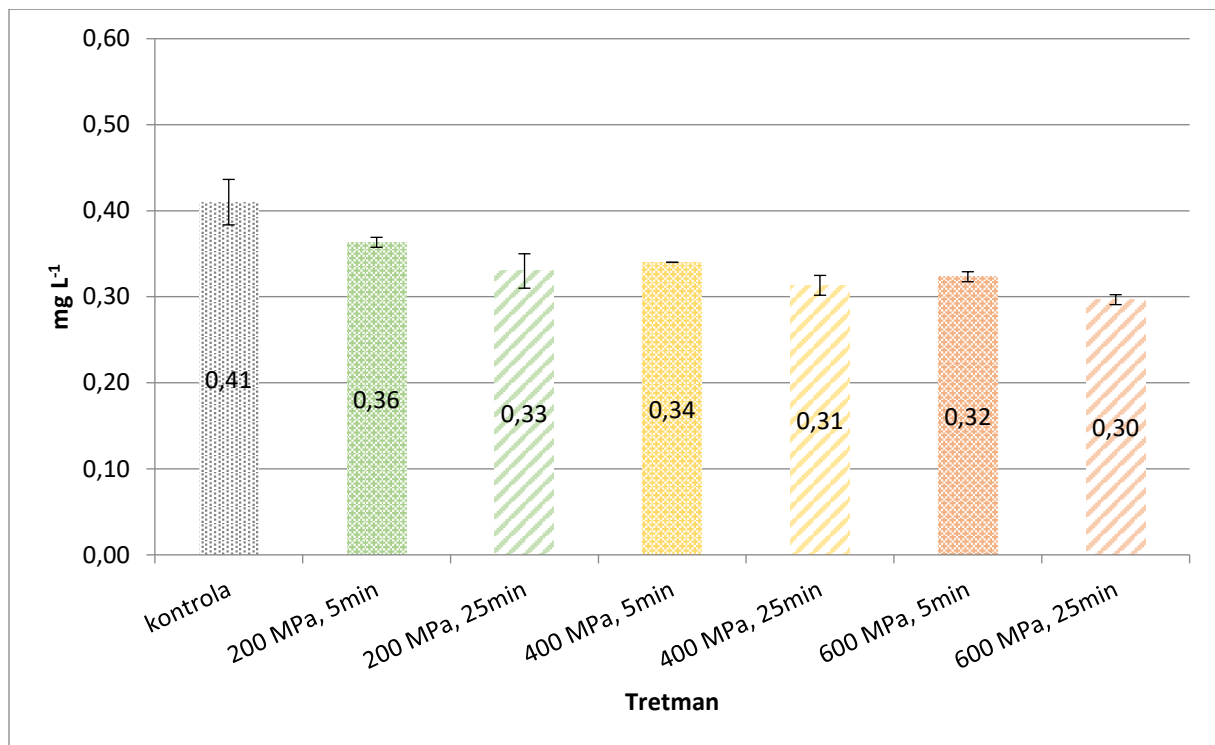


Slika 12. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju *i*-amil acetata u vinu Graševina

Koncentracija određena odmah nakon tretiranja visokim hidrostatskim tlakom od 200 MPa kroz 5 minuta bila je tek neznatno niža od one određene u kontrolnom uzorku. Također, tijekom 25 minuta tretiranja pri istom tlaku nije došlo do smanjenja koncentracije ovog spoja. Nadalje, djelovanje tlakom od 400 MPa rezultiralo je tek blagim padom koncentracije, a kao i pri nižem tlaku, razlike između tretmana od 5 i 25 minuta nisu utvrđene. Najniže koncentracije *i*-amil acetata dobivene su u uzorcima tretiranim tlakom od 600 MPa i to tijekom 25 minuta. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Briones-Labarca i sur. (2017) gdje je utvrđeno kako visoki hidrostatski tlak (300, 400 i 500 MPa kroz 5 i 10 minuta) nema značajan utjecaj na koncentraciju *i*-amil acetata u mladom bijelom vinu Sauvignon blanc.

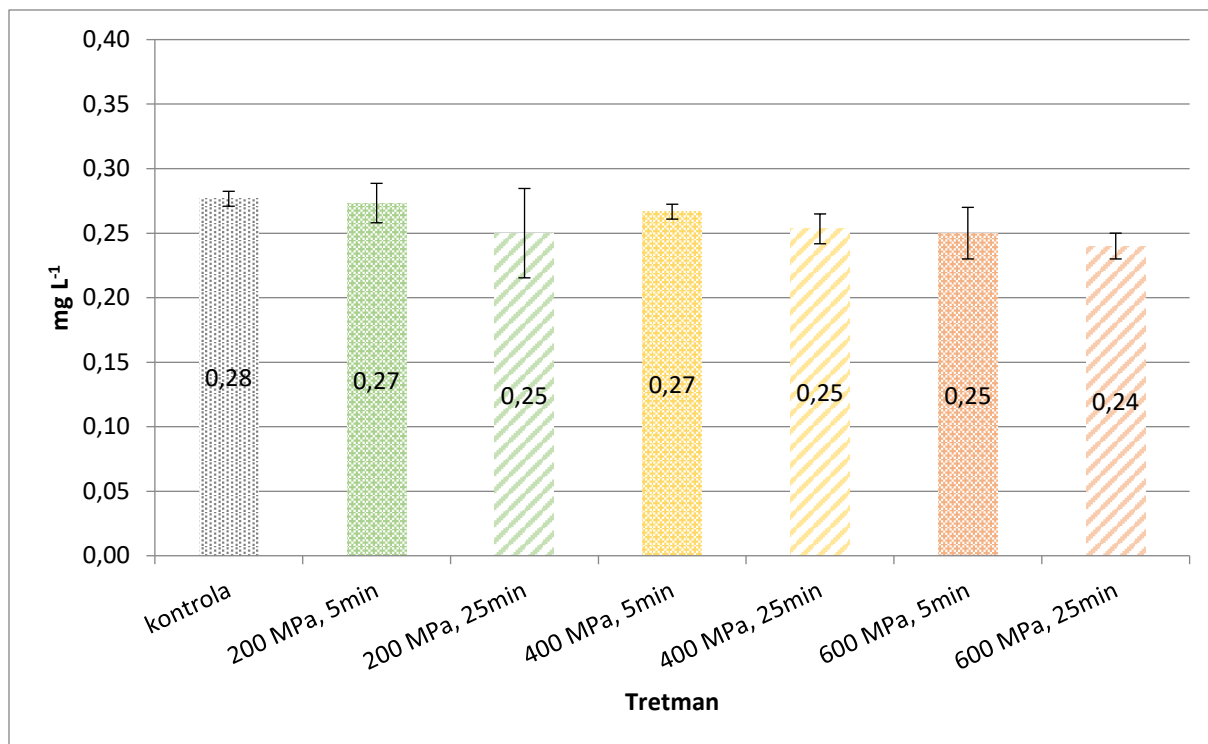
Koncentracije heksil acetata u kontrolnom (netratiranom) vinu te u uzorcima vina tretiranim visokim hidrostatskim tlakom (200, 400 i 600 MPa tijekom 5 i 25 minuta) prikazane su na slici 13. Rezultati dobiveni već nakon prvog tretmana od 200 MPa kroz 5 minuta pokazuju značajan pad koncentracije ovog spoja, a slične vrijednosti dobivene su i nakon 25 minuta tretiranja vina pri istom tlaku. Povišenjem tlaka kod tretmana od 400 MPa,

trend pada koncentracije se nastavlja, dok primjena tlaka od 600 MPa rezultira najznačajnijim padom koncentracije heksil acetata. Koncentracije određene u vinima tretiranim sa 600 MPa tijekom 5 i 25 minuta bile su značajno niže od vrijednosti određenih u kontrolnom uzorku vina Graševina.



Slika 13. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju heksil acetata u vinu Graševina

Rezultati utjecaja različitih procesnih parametara visokog hidrostatskog tlaka (200, 400 i 600 MPa tijekom 5 i 25 minuta) na koncentraciju 2-fenil acetata prikazani su na slici 14. Tretman tlakom od 200 MPa kroz 5 te 25 minuta kao i 400 MPa kroz 5 minuta nije utjecao na promjene u koncentraciji 2-fenil acetata. Blago niže koncentracije određene su u uzorcima tretiranim s 400 MPa kroz 25 minuta, kao i 600 MPa kroz 5 i 25 minuta. Iz priloženog je vidljivo kako navedeni tretmani visokim hidrostatskim tlakom nisu značajnije utjecali na promjene u koncentraciji 2-fenil acetata.



Slika 14. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju 2-fenil acetata u vinu Graševina

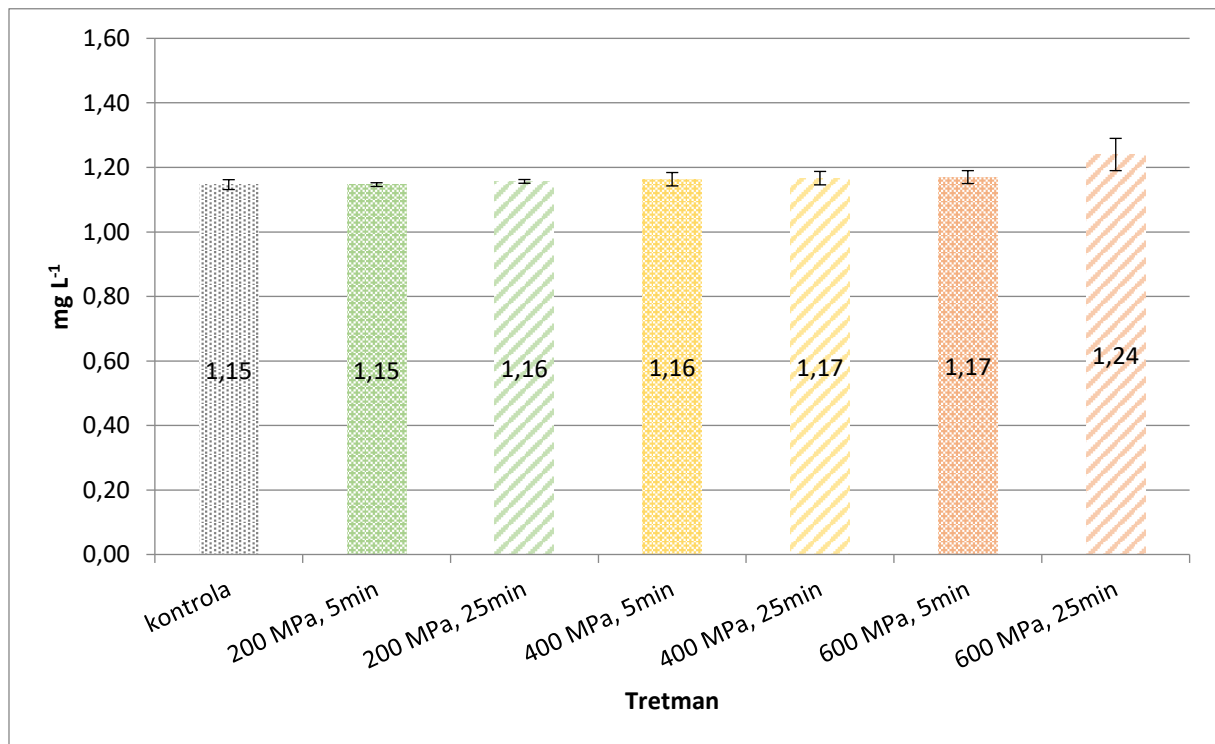
Na osnovu obrađenih rezultata (slike 10 – 14) vidljivo je kako promjene u sastavu acetatnih estera, slično ranije utvrđenom trendu za etilne estere, ovise o odabranim parametrima tretiranja visokim hidrostatskim tlakom. Tretiranje visokim hidrostatskim tlakom utjecalo je na blago sniženje koncentracije ovih spojeva, no ipak značajne promjene pojedinih acetatnih estera uočene su samo u vinima tretiranim tlakom od 600 MPa. Iz navedenog možemo zaključiti kako primjena nižih tlakova od 200 i 400 MPa ima veliki potencijal za upotrebu u različitim tehnološkim postupcima obrade vina.

#### 4.4. Utjecaj visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju viših alkohola

Viši alkoholi čine oko 50 % svih aromatskih spojeva u vinima i značajno doprinose ukupnoj aromi vina (Jackson, 2014). U ovom radu identificirana i kvantificirana su 3 viša alkohola (1-heksanol, *i*-amil alkohol, 2-fenil etanol). Rezultati utjecaja različitih procesnih

parametara visokog hidrostatskog tlaka (200, 400 i 600 MPa tijekom 5 i 25 minuta) na koncentraciju viših alkohola prikazani su na slikama 15 – 17.

Koncentracije 1-heksanola u kontrolnom (netretiranom) vinu te u uzorcima vina tretiranim visokim hidrostatskim tlakom prikazane su na slici 15. Za razliku od prethodno analiziranih spojeva, koncentracija 1-heksanola se pod utjecajem visokog hidrostatskog tlaka blago povećala. Tretiranje vina tlakom od 200 i 400 MPa tijekom 5 i 25 minuta nije značajnije utjecalo na povećanje koncentracije navedenog spoja. Također, tretiranjem tlakom od 600 MPa tijekom 5 minuta dobiven je sličan trend. S druge strane, tretiranje tlakom od 600 MPa tijekom 25 minuta utjecalo je na značajno povećanje koncentracije 1-heksanola u vinu Graševina.

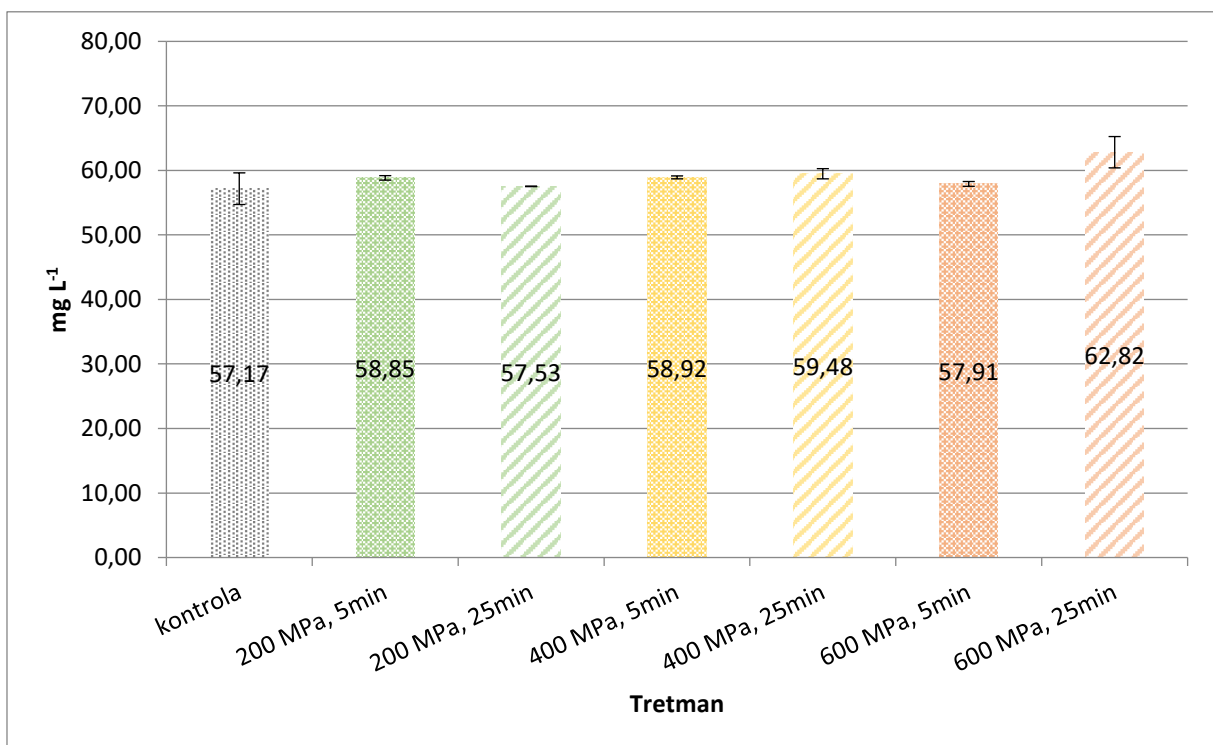


Slika 15. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju 1-heksanola u vinu Graševina

Fenomen povećanja udjela 1-heksanola objašnjava činjenica da tijekom starenja dolazi do redukcije heksanal i heksenal oblika u 1-heksanol, koja se počinje odvijati već tijekom

alkoholne fermentacije (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Pretpostavka je stoga da visoki hidrostatski tlak zapravo ubrzava te reakcije redukcije.

Rezultati utjecaja različitih procesnih parametara visokog hidrostatskog tlaka (200, 400 i 600 MPa tijekom 5 i 25 minuta) na koncentraciju *i*-amil alkohola prikazani su na slici 16. *i*-amil alkohol najzastupljeniji je viši alkohol u vinu Graševina, a u velikoj mjeri doprinosi kompleksnosti ukupne arome vina budući da je prisutan u koncentraciji iznad senzorskog praga osjetljivosti.

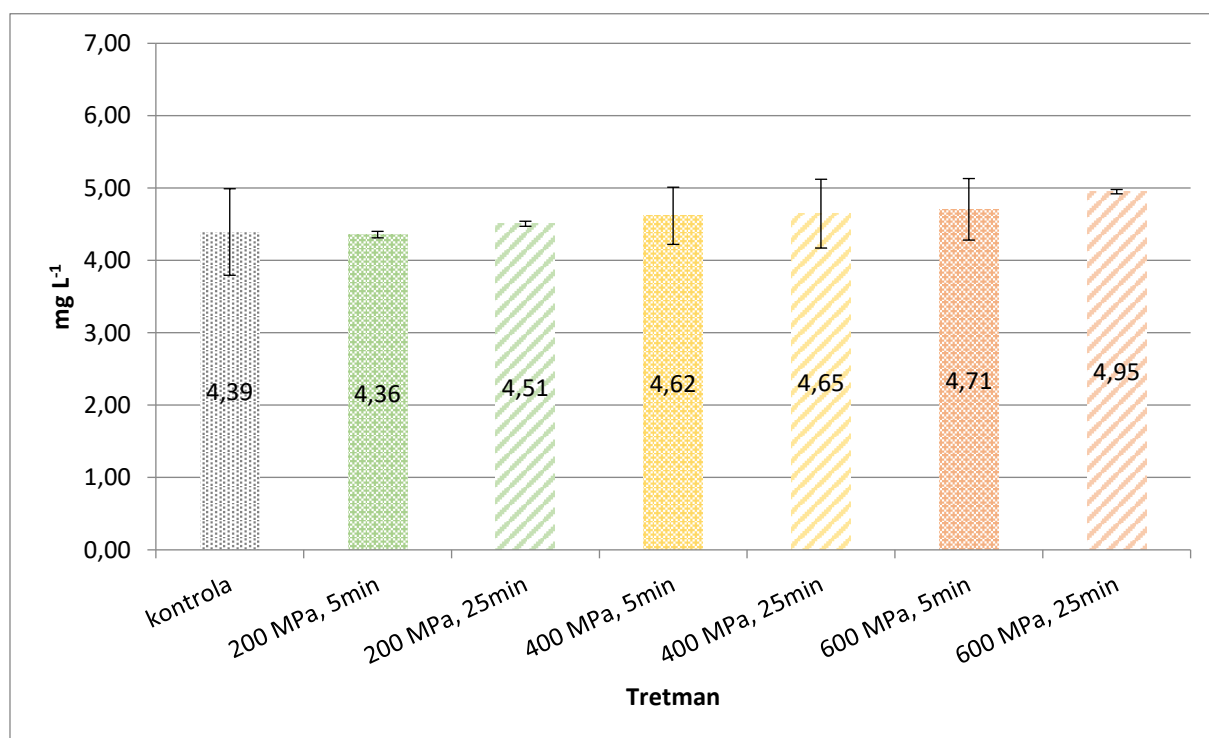


Slika 16. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju *i*-amil alkohola u vinu Graševina

Tretiranje vina visokim hidrostatskim tlakom, kao i kod 1-heksanola, djelovalo je na povećanje koncentracija *i*-amil alkohola. Najblaži tretmani od 200 MPa kroz 5 i 25 minuta rezultirali su tek blagim porastom koncentracije u tretiranom vinu u odnosu na kontrolu. Također, primjenom tlakova od 400 i 600 MPa došlo je do daljnjeg porasta koncentracije. Također, rezultati dobiveni nakon duljeg djelovanja navedenih tlakova u trajanju od 25

minuta bili su veći od onih nakon 5 minuta djelovanja. Najznačajnija promjena u koncentraciji *i*-amil alkohola u odnosu na kontrolno netretirano vino uočena je u vinu tretiranom sa 600 MPa tijekom 25 minuta. Obzirom da *i*-amil alkohol nastaje razgradnjom šećera i aminokiselina te je općepoznato da se starenjem povećava koncentracija viših alkohola u vinima, može se zaključiti da je visoki hidrostatski tlak djelovao pozitivno na ubrzanje tih reakcija.

Nadalje, na slici 17 vidljiv je trend porasta koncentracije 2-fenil etanola uslijed djelovanja visokog hidrostatskog tlaka, kao i kod prethodna dva viša alkohola. Visoki hidrostatski tlak od 200 MPa nije značajnije utjecao na koncentraciju 2-fenil etanola. Nadalje, tlak od 400 MPa doveo je do nešto većeg porasta koncentracije u odnosu na kontrolu i rezultate dobivene nakon tretiranja nižim tlakom, s minimalnim razlikama između tretmana od 5 i 25 minuta. Očekivano, primjena visokog hidrostatskog tlak od 600 MPa rezultirala je najintenzivnijim promjenama, odnosno porastom koncentracije navedenog spoja. Rezultat dobiven nakon djelovanja tog tlaka u vremenu od 5 minuta bliži je rezultatima izmjerenim nakon tretmana tlakom od 400 MPa, dok je primjena tlaka od 600 MPa tijekom 25 minuta značajno utjecala na povećanje koncentracije 2-fenil etanola.



Slika 17. Utjecaj različitih procesnih varijabli visokog hidrostatskog tlaka na koncentraciju 2-fenil etanola u vinu Graševina

Rezultati ovog istraživanja potvrđuju prethodna istraživanja o utjecaju visokog hidrostatskog tlaka na sastav viših alkohola. Briones-Labarca i sur. (2017) tretirali su vino Sauvignon Blanc tlakovima od 300, 400 i 500 MPa kroz 5 i 10 minuta te utvrdili kako navedeni tretmani nisu značajno utjecali na razlike u koncentraciji viših alkohola. Morata i sur. (2012) pokazali su kako su razlike između različito tretiranih uzoraka zapravo vrlo male i neprimjetne potrošačima.

Santos i sur. (2016) proveli su senzorsku analizu vina tretiranog visokim hidrostatskim tlakom te utvrdili kako aroma tretiranog vina ima izraženiji mirisa po kuhanom voću i miris sumpora te manji udio voćnih aroma nego netretirano vino. Tretmani tlakom od 600 MPa utjecali su na pojavu metalnog mirisa, dok tretmani pri nižim tlakovima nisu uzrokovali navedene negativne promjene. Navedeni rezultati slažu se s prethodnim rezultatima istraživanja skladištenja crnih (Santos i sur., 2013) i bijelih vina (Santos i sur., 2015), proizvedenih bez dodatka sumporovog dioksida, tretiranih tlakovima od 425 i 500 MPa kroz 5 minuta, koji su također pokazali veći udio arome po kuhanom voću u odnosu na netretirani kontrolni uzorak. Također, upotrebom nižih tlakova postignuta je mikrobiološka stabilnost i željeni učinak, a da pri tome nije došlo do promjena u sastavu arome. Stoga visoki hidrostatski tlak, kao metoda netoplinske obrade vina, ima velik potencijal za upotrebu u proizvodnji vina.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

- Utjecaj tretmana visokim hidrostatskim tlakom na sastav arome vina Graševina ovisio je o primijenjenim procesnim parametrima: tlaku te duljini tretiranja.
- Primjena viših tlakova kroz dulje vrijeme tretiranja imala je veći učinak na promjene u sastavu terpena, karbonilnih spojeva, etilnih i acetatnih estera te viših alkohola vina Graševina.
- Učinak djelovanja visokog hidrostatskog tlaka na sastav arome bio je sličan promjenama u sastavu arome tijekom dozrijevanja.
- Tretman visokim hidrostatskim tlakom od 200 MPa tijekom 5 i 25 min nije značajnije utjecao na promjene u sastavu arome (terpeni, karbonilni spojevi, etilni i acetatni esteri te viši alkoholi) vina Graševina.
- Tretman visokim hidrostatskim tlakom od 400 MPa tijekom 5 i 25 min utjecao je na blago smanjenje koncentracije terpena, karbonilnih spojeva, etilnih i acetatnih estera te na blago povećanje koncentracije viših alkohola vina Graševina.
- Tretman visokim hidrostatskim tlakom od 600 MPa tijekom 5 i 25 min značajno je utjecao na smanjenje koncentracije terpena, karbonilnih spojeva, etilnih i acetatnih estera te povećanje koncentracije viših alkohola vina Graševina, zbog čega se primjenu ovog tretmana preporuča izbjegavati.
- Visoki hidrostatski tlak pri optimalnim procesnim uvjetima ima veliki potencijal za primjenu u proizvodnji vina.



## 6. LITERATURA

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

Augusto, P. E. D., Tribst, A. A. L., Cristianini, M. (2018) High hydrostatic pressure and high pressure homogenization processing of fruit juices. U: *Fruit Juices: Extraction, Composition, Quality and Analysis*, (Rajauria, G. i Tiwari, B. K., ured.), Academic press, Cambridge, MA, str. 393-421.

Briones-Labarca, V., Perez-Wom, M., Habib, G., Giovagnoli-Vicuña, C., Cañas-Sarazua, R., Tabilo-Munizaga, G., Salazar, F. N. (2017) Oenological and Quality Characteristic on Young White Wines (Sauvignon Blanc): Effects of High Hydrostatic Pressure Processing. *Int. J. Food Quality* [online] **2017**, 1-12, <<https://doi.org/10.1155/2017/8524073>>. Pristupljeno 30. svibnja 2018.

Buzrul S. (2012) High hydrostatic pressure tretment of beer and wine: A review. *Innov. Food. Sci. Emerg. Technol.* **13**, 1-12.

Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Cacho, J. (2005) Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-olfactometry data. *J. Agr. Food Chem.* **53**, 5682–5690.

Cheng, G., Liu, Y., Yue, T.-X., Zhang, Z.-W. (2015) Comparison between aroma compounds in wines from four *Vitis vinifera* grape varieties grown in different shoot positions. *Food Sci. Technol.* **35**, 237-246.

Delfini, C., Conterno, L., Carpi, G., Rovere, P., Tabusso, A., Cocito, C., Amanti, A. (1995) Microbiological stabilisation of grape must and wines by high hydrostatic pressures. *J. Wine Res.* **6**, 143-151.

Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., Ferreira, V. (2007) Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4501-4510.

Gomez-Miguez, M. J., Cacho, J. F., Ferreira, V., Vicario, I. M., Heredia, F. J. (2007) Volatile components of Zalema white wines. *Food Chem.* **100**, 1464–1473.

Gupta, R., Balasubramaniam, V. M. (2012) High-Pressure Processing of Fluid Foods. U: Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods, (Cullen, P. J., Tiwari, B. K., Valdramidis V., ured.), Academic press, Cambridge, MA, str. 109-133.

Hardie, W. J., Aggenbach, S. J., Jaudzems, V. G. (1996) The plastids of the grape pericarp and their significance in isoprenoid synthesis. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2**, 144–154.

Jackson, R. S. (2014) Wine Science: Principles and applications, 4. izd., Academic press, Cambridge, MA, str. 347-426.

Kataoka, H., Lord, H. L., Pawliszyn, J. (2000) Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr. A* **880**, 35-62.

Koutchma, T. (2014) Adapting High Hydrostatic Pressure (HPP) for Food Processing operations, 1. izd., Academic press, Cambridge, MA.

Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 97-129.

Linton, M., Patterson, M. F. (2000) High pressure processing of foods for microbiological safety and quality. *Acta Microbiol. Imm. H.* **47**, 175-182.

Miller, A. C., Wolff, S. R., Bisson, L. F., Ebeler, S. E. (2007) Yeast strain and nitrogen supplementation: dynamics of volatile ester production in Chardonnay juice fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.* **58**, 470–483.

Mok, C., Song, K.-T., Park, Y. S., Lim, S., Ruan, R., Chen, P. (2006) High Hydrostatic Pressure Pasteurization of Red Wine. *J. Food Sci.* **71**, 265-269.

Morata, A., Benito, S., González, M., Palomero, F., Tesfaye, W., Suárez- Lepe, J. (2012) Cold pasteurisation of red wines with high hydrostatic pressure to control *Dekkera/ Brettanomyces*: Effect on both aromatic and chromatic quality of wine. *Eur. Food Res. Technol.* **235**, 147-154.

Ortega-Heras M., González-Sanjosé M. L., Beltrán S. (2002) Aroma composition of wine studied by different extraction methods. *Anal. Chim. Acta.* **458**, 85-93.

Peinado, R. A., Moreno, J., Bueno, J. E., Moreno, J. A., Mauricio, J. C. (2004) Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chem.* **84**, 585-590.

Ramey, D. D., Ough, C. S. (1980) Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines. *J. Agric. Food Chem.* **28**, 928–934.

Rapp, A., Güntert, M. (1986) Changes in aroma substances during the storage of white wines in bottles. U: The Shelf Life of Foods and Beverages, (Charalambous, G., ured.), Elsevier, New York, str. 141–167.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdiou, D. (2006) Handbook of Enology: The chemistry of wine stabilization and treatments, 2. izd. John Wiley & Sons eds., Chichester, str. 205-230.

Santos, M. C., Nunes, C., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2012) Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 1-12.

Santos, M. C., Nunes, C., Cappelle, J., Gonçalves, F. J., Rodrigues, A., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2013) Effect of high pressure treatments on the physicochemical properties of a sulphur dioxide-free red wine. *Food Chem.* **141**, 2558-2566.

Santos, M. C., Nunes, C., Angelica, M., Rocha, M., Rodrigues, A., Rocha, S. M., Saravia, J. A., Coimbra, M. A. (2015) High pressure treatments accelerate changes in volatile composition of sulphur dioxide-free wine during bottle storage. *Food Chem.* **188**, 406–414.

Santos, M. C., Nunes, C., Jourdes, M., Teissedre, P.-L., Rodrigues, A., Amado, O., Saraiva, J. A., Coimbra, M. A. (2016) Evaluation of the potential of high pressure technology as an enological practice for red wines. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **33**, 76–83.

Sauvage, F.-X., Bach, B., Moutounet, M., Vernhet, A. (2010) Proteins in white wines: Thermo-sensitivity and differential adsorption by bentonite. *Food Chem.* **118**, 26-34.

Swiegers, J. H., Bartowksy, E. J., Henschke, P. A., Pretorius, I. S. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine Res.* **11**, 127-138.

Tabilo-Manizaga, G., Gordon, T. A., Villaloboc-Carvajal, R., Moreno-Osorio, L., Salzar, F. N., Pérez-Won, M., Acuña, S. (2014) Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on the protein structure and thermal stability of Sauvignon blanc wine. *Food Chem.* **155**, 214-220.

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

Tao, Y., Sun, D.-W., Gorecki, A., Błaszczak, W., Lamparski, G., Amarowicz, R., Fornal, J., Jeliński, T. (2016) A preliminary study about the influence of high hydrostatic pressure processing in parallel with oak chip maceration on the physicochemical and sensory properties of a young red wine. *Food Chem.* **194**, 545–554.

Tominaga, T., Murat, M.-L., Dubourdieu, D. (1998) Development of a Method for Analyzing the Volatile Thiols Involved in the Characteristic Aroma of Wines Made from *Vitis vinifera* L. Cv. Sauvignon Blanc. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1044-1048.

## Izjava o izvornosti

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

Vlatka Poturica

Vlatka Poturica