

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2018.

Antonio Sivrić

936/PI

**ODREĐIVANJE POLIFENOLNOG
SASTAVA I KROMATSKIH
KARAKTERISTIKA VINA
CABERNET SAUVIGNON I
GRAŠEVINA NAKON TRETMANA
ULTRAZVUKOM VISOKIH
SNAGA**

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 kemiju i analitiku vina na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć mag. ing. Katarina Lukić.

Ovaj diplomski rad posvećujem svojim roditeljima, Željki i Bruni, djedovima Anđelku i Anti te sestrama. Hvala Vam što ste mi u današnjim teškim uvjetima omogućili školovanje i bili podrška. Zahvaljujem se svojoj djevojci Kristini, mojoj najvećoj savjetnici, na velikoj podršci, razumijevanju i ljubavi tijekom moga školovanja. Zahvaljujem se i svojim prijateljima koji su moje putovanje do diplome učinili zabavnim jer bi bez Vas sve ovo bilo teže.

Najljepše se zahvaljujem asistentici Katarini Lukić, mag. ing. na pomoći i nesebničnom angažmanu pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada.

Također se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Karin Kovačević Ganić na iznimnoj susretljivosti i nesebičnoj pomoći pri izradi ovog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

ODREĐIVANJE POLIFENOLNOG SASTAVA I KROMATSKIH KARAKTERISTIKA VINA CABERNET SAUVIGNON I GRAŠEVINA NAKON TRETMANA ULTRAZVUKOM VISOKIH SNAGA

Antonio Sivrić, 936/PI

Sažetak: Potencijalna upotreba ultrazvuka visoke snage za ubrzavanje procesa starenja vina je nedovoljno istražena. To onemogućava određivanje mogućnosti primjene ultrazvuka visoke snage u tehnologiji vina. Prirodno starenje vina je dugotrajan proces koji iziskuje mnogo truda i troškova. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj ultrazvuka visoke snage na kemijski sastav vina Graševina i Cabernet Sauvignon. Također je ispitivan i utjecaj ultrazvuka visoke snage na kromatske karakteristike ovih vina. Tretman je proveden uranjanjem ultrazvučne sonde različitih promjera (12,7, 19,1 i 25,4 mm) i amplituda (25, 50, 75 i 100 %) u trajanju od 6 minuta. Koncentracija ukupnih fenola određena je Folin-Ciocalteu metodom, ukupnih antocijana pomoću metode bazirane na dodatku otopine natrij hidrogensulfita, a ukupni tanini određeni su Bate-Smith metodom. Kromatske karakteristike vina određivale su se CIE $L^*a^*b^*$ metodom. Utvrđeno je da tretman ultrazvukom visoke snage uzrokuje smanjenje svih ispitivanih parametara. Najveći učinak postigao se pri korištenju manjih promjera sonde i većim amplitudama.

Ključne riječi: ultrazvuk visoke snage, fenoli, antocijani, tanini, kromatske karakteristike, vino

Rad sadrži: 52 stranica, 14 slika, 7 tablica, 89 literaturnih navoda, 0 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: *Katarina Lukić, mag. ing.*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Prof.dr.sc. *Mladen Brnčić*
2. Prof.dr.sc. *Karin Kovačević Ganić*
3. Doc.dr.sc. *Natka Ćurko*
4. Prof.dr.sc. *Ksenija Marković* (zamjena)

Datum obrane: 17. srpnja 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

DETERMINATION OF POLYPHENOLIC COMPOSITION AND CHROMATIC CHARACTERISTICS IN CABERNET SAUVIGNON AND GRAŠEVINA WINES AFTER HIGH INTENSITY ULTRASOUND TREATMENT

Antonio Sivrić, 936/PI

Abstract: The potential use of high power ultrasound to accelerate aging process of wine has been insufficiently explored. This prevents the possibility of determining the application of high power ultrasound in wine technology. Natural wine aging is a long-lasting process that requires a lot of effort and expenses. The aim of this thesis was to examine the effect of high power ultrasound on chemical composition of Graševina and Cabernet Sauvignon wines. Also, the effect of high power ultrasound on wine chromatic characteristics was examined. The treatment was performed by immersing ultrasonic probe with different diameters (12.7, 19.1 and 25.4 mm) and amplitudes (25, 50, 75 i 100 %) within 6 minutes. The concentration of total phenols are determined by the Folin-Ciocalte method, while concentration of total anthocyanins by the Bate-Smith method. Wine chromatic characteristics were determined by CIE L*a*b method. It was found that high power ultrasound treatment causes a decrease in all tested parameters. The greatest effect was achieved while using ultrasonic probe with smaller diameters and larger amplitudes.

Keywords: high power ultrasound, phenols, anthocyanins, tannin, chromatic characteristics, wine

Thesis contains: 52 pages, 14 figures, 7 tables, 89 references, 0 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: *Karin Kovačević Ganić, PhD. Full professor*

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

Reviewers:

1. PhD. *Mladen Brnčić*, Full professor
2. PhD. *Karin Kovačević Ganić*, Full professor
3. PhD. *Natka Ćurko*, Assistant professor
4. PhD. *Ksenija Marković*, Full professor (substitute)

Thesis defended: July 17, 2018.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. ULTRAZVUK.....	2
2.1.1. Mehanizam i utjecaj ultrazvuka	4
2.1.2. Podjela i primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji.....	5
2.1.3. Primjena ultrazvuka u vinarstvu.....	8
2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI VINA.....	10
2.2.1. Antocijani	12
2.2.2. Tanini	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI.....	15
3.1.1. Uzorci vina	15
3.1.2. Kemikalije	16
3.1.3. Instrumenti	16
3.1.4. Laboratorijsko posuđe i pribor	16
3.2. METODE.....	17
3.2.1. Tretiranje vina ultrazvukom visokih snaga	18
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola	19
3.2.3. Određivanje ukupnih antocijana.....	20
3.2.4. Određivanje ukupnih tanina	21

3.2.5. Određivanje kromatskih karakteristika CIE L*a*b* metodom.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	24
4.1 REZULTATI ODREĐIVANJA POLIFENOLNOG SASTAVA VINA	25
4.1.1.Utjecaj ultrazvuka visoke snage na koncentraciju ukupnih fenola u bijelom vinu	25
4.1.2.Utjecaj ultrazvuka visoke snage na koncentraciju ukupnih fenola u crnom vinu	27
4.1.3.Utjecaj ultrazvuka visoke snage na koncentraciju ukupnih antocijana u crnom vinu	29
4.1.4.Utjecaj ultrazvuka visoke snage na koncentraciju ukupnih tanina u crnom vinu	31
4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA KROMATSKIH KARAKTERISTIKA VINA	33
4.2.1. Utjecaj ultrazvuka visoke snage na kromatske karakteristike crnog vina.....	33
4.2.2. Utjecaj ultrazvuka visoke snage na kromatske karakteristike bijelog vina....	38
5. ZAKLJUČAK	43
6. LITERATURA	44

1. UVOD

Jedan od glavnih izazova suvremene znanosti je razvoj novih tehnologija koje nisu štetne za okoliš i kojima se postiže ušteda energije. U posljednje vrijeme mnoga su istraživanja usmjerena na razvoj novih postupaka obrade hrane sa ciljem dobivanja prehrambenih proizvoda visoke nutritivne kakvoće. Novi postupci koji se mogu upotrebljavati za obradu vina su pulsirajuće električno polje, visoki hidrostatski tlak te ultrazvuk visokog intenziteta. Svi ovi postupci obrade hrane odlikuju se manjom potrošnjom energije, kraćim trajanjem tehnološkog postupka te manje štetnim utjecajem na okoliš.

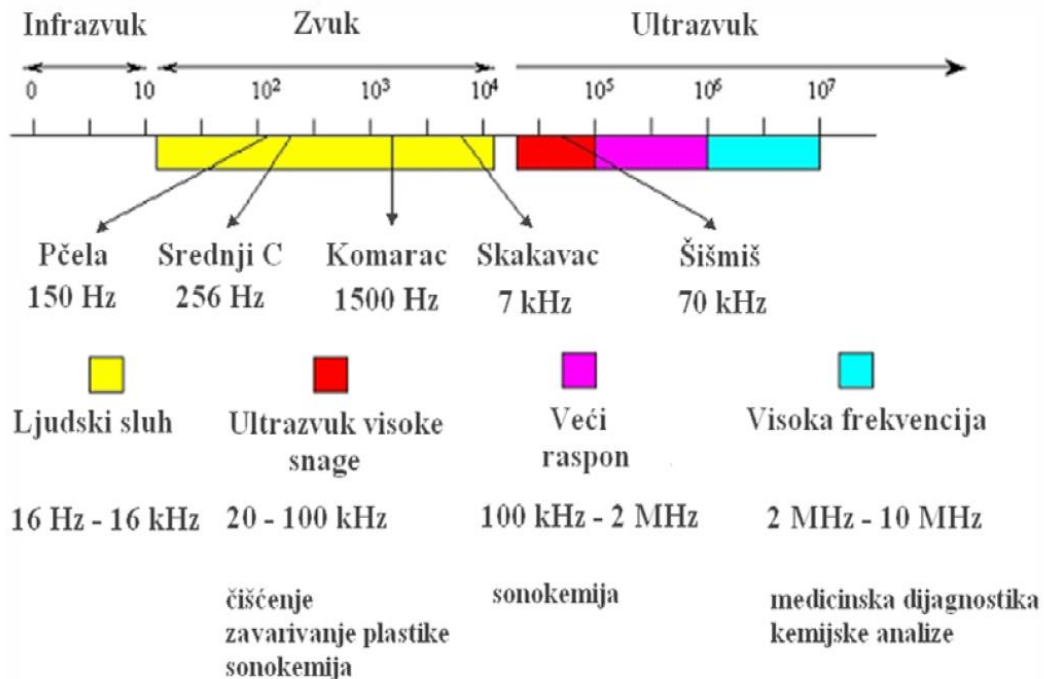
Akustična kavitacija (stvaranje i implozivno urušavanje nestabilnih, visokoenergetskih mjehurića), izazvanih ultrazvučnim zračenjem u tekućini, stvara mikrolokalne tlakove i temperaturne gradijente, inducirajući tako kemijske, fizičke te čak mehaničke učinke (García Martín i Sun, 2013). Ultrazvuk visoke snage predstavlja atraktivnu i obećavajuću zelenu alternativu koja može zamijeniti uporabu SO₂, kako bi se uklonili štetni mikroorganizmi koji su prisutni prije fermentacije ili kontrolirali mikrobnu aktivnost štetnih ili inokuliranih mikroorganizama tijekom primarne ili sekundarne fermentacije (Gracin i sur., 2016; Jiranek i sur., 2008). Njegova primjena bi bila dostojna zamjena za aditive ili dugotrajne procese filtracije vina uz moguću primjenu sa cjevovodnim sustavom za vrijeme transporta groždanog soka, mošta ili vina iz spremnika u spremnik ili alternativno izravnim tretiranjem spremnika ili bačvi. Ultrazvuk visokih snaga može nadopuniti ili u potpunosti zamijeniti klasične postupke obrade hrane pri čemu se dobivaju proizvodi veće nutritivne vrijednosti i boljih organoleptičkih svojstava. Ultrazvuk se već uspješno primjenjuje u raznim postupcima u prehrambenoj industriji i uskoro će se zbog svog potencijala koristiti i u vinarstvu, njegovom uporabom će se nastojati povećati kvaliteta vina, njegova stabilnost te samim time i smanjenje ukupnih troškova. Pravilna primjena ultrazvuka zahtijeva primjenu odgovarajuće snage, amplitude zvučnog vala i frekvencije ultrazvuka kako ne bi došlo do oksidacije, denaturacije proteina i uništavanja enzima (Režek Jambrak i sur., 2009). U ovom diplomskom radu istražiti će se utjecaj primijenjenih procesnih parametara (veličine sonde, amplitude, i vremena obrade) ultrazvuka visokih snaga na promjenu polifenolnog sastava vina sorte Graševina i Cabernet Sauvignon. Također će biti prikazan utjecaj ultrazvuka na kromatske karakteristike navedenih vina.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ULTRAZVUK

Ultrazvuk je zvuk frekvencije iznad 20 kHz. Budući da ljudsko uho može čuti zvukove čija je frekvencija u rasponu od 16 Hz do 16 kHz, frekvencija ultrazvuka je previsoka za ljudsko slušno područje (McClements, 1995; Mason, 1998). Ultrazvučni valovi putuju kroz masu materijala ili na njegovoj površini, brzinom koja je određena prirodom vala i materijalu kroz koji se širi (Knorr i sur, 2004). Donedavno, većina primjena ultrazvuka u prehrambenoj tehnologiji je uključivala nedestruktivne analize koje su se većinski odnosile na procjenu kvalitete. Takva primjena zahtijeva visoku frekvenciju (100 kHz – 1 MHz), malu snagu ($<1 \text{ W cm}^{-2}$). Ultrazvuk niskog intenziteta se najčešće primjenjuje u analitičkim tehnikama da pruži informacije o fizikalno-kemijskim svojstvima hrane kao što je zrelost, čvrstoća, udio šećera, kiselost (Demirdöven i Baysal, 2009). Upotreba ultrazvuka visokog intenziteta se preporuča u svrhu inaktivacije i redukcije broja mikroorganizama (Knorr i sur., 2004).

Zvučni valovi mogu se podijeliti s obzirom na frekvenciju u više područja koja određuju njihovu potencijalnu primjenu (Slika 1).

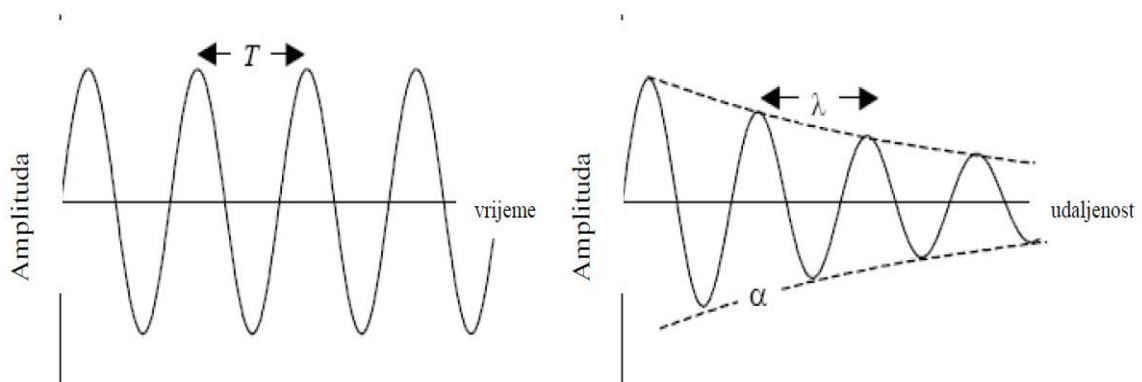


Slika 1. Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Mason, 1998)

Za primjenu u prehrambenoj industriji najznačajnije su frekvencije ultrazvuka više od 20 kHz. Zvučni val određen je svojom amplitudom [A] i frekvencijom [f], te valnom duljinom [λ] i koeficijentom prigušenja [α] koji je mjera smanjenja amplitude ultrazvučnog vala nakon njegova prolaska materijalom. Koeficijent prigušenja [α] materijala može se definirati sljedećim izrazom (1):

$$A = A_0 \cdot e^{-\alpha x} \quad (1)$$

gdje je A_0 početna amplituda zvučnog vala, a x je pređena udaljenost. Glavni uzroci prigušenja su adsorpcija i raspršivanje. Adsorpcija je uzrokovana fizikalnim mehanizmom koji pretvara ultrazvučnu energiju u toplinu. Raspršivanje se očituje u heterogenim materijalima, kao što su pjene, suspenzije i emulzije. Za razliku od adsorpcije, energija je uslijed raspršivanja još uvijek spremljena u obliku ultrazvučne energije, ali se ne registrira jer su njezin smjer i faza prenošenja promijenjeni (McClements, 1995).

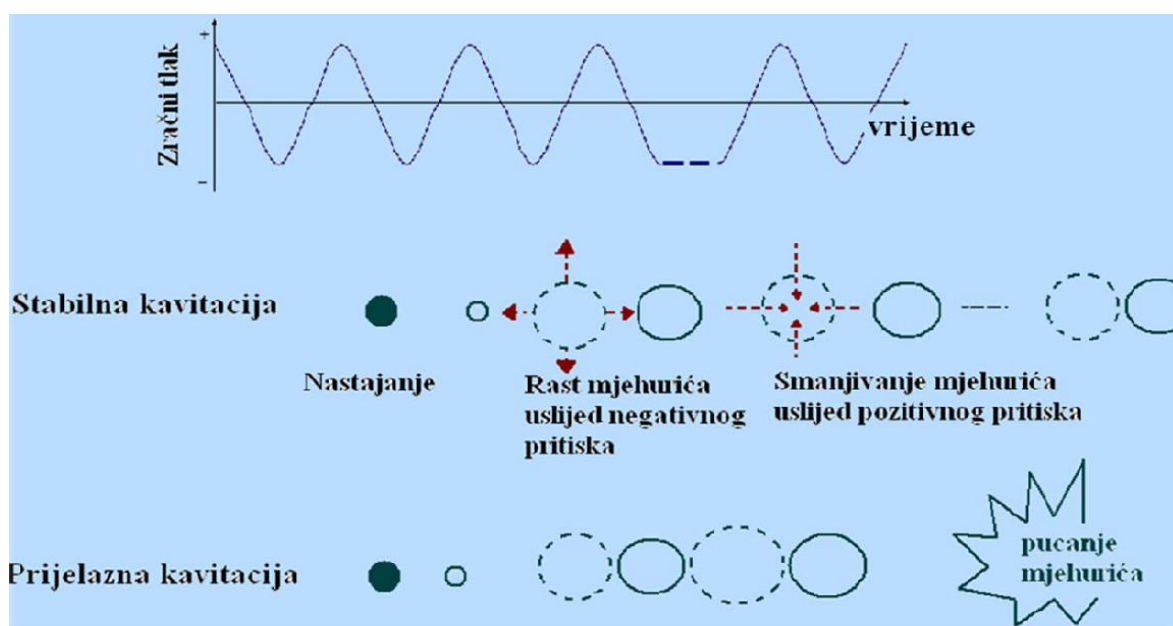


Slika 2. Promjene amplitude ultrazvuka kod određenih položaja u materijalu (lijevo), te kod određenog vremena (desno). T je udaljenost između susjednih maksimuma vala, λ je valna duljina i α je koeficijent atenuacije (McClements, 1995)

Na slici 2 prikazana je promjena amplitude ultrazvučnog vala kod određenih položaja u materijalu te vremena (T). Prolaskom vala kroz materijal te povećanjem udaljenosti smanjuje se i amplituda vala (A) zbog prigušenja (atenuacije). Koeficijent prigušenja (α) je mjera smanjenja amplitude ultrazvučnog vala nakon njegova prolaska materijalom. Definira se izrazom: $A = A_0 \cdot e^{-\alpha x}$; gdje je A_0 početna amplituda zvučnog vala, a x je prijeđena udaljenost.

2.1.1. Mehanizam i utjecaj ultrazvuka

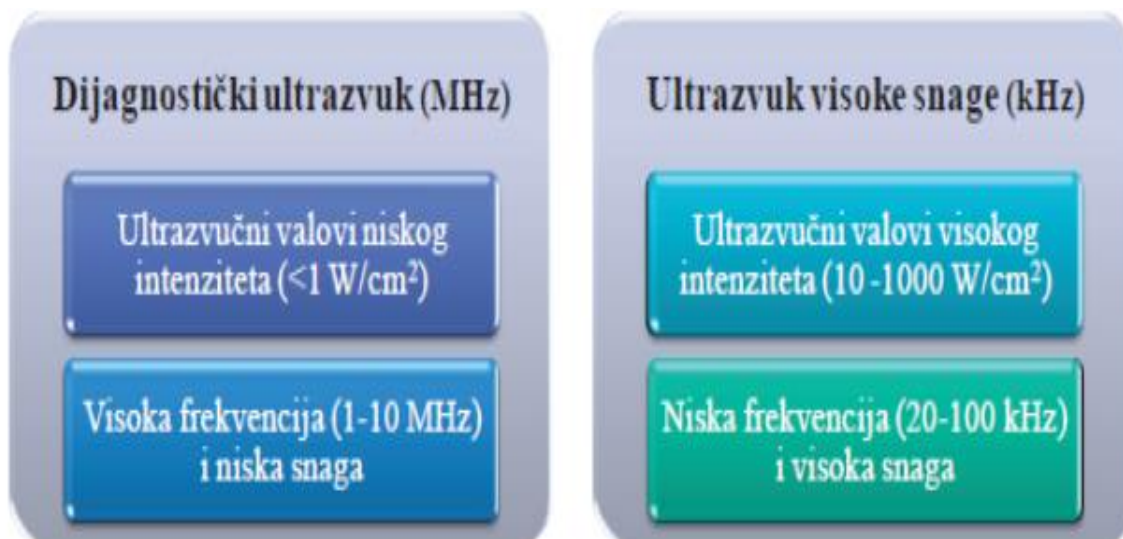
Širenje akustičnog vala kroz medij dovodi do različitih promjena od kojih se samo neke mogu objasniti pojedinim mehanizmima. Najznačajniji učinci ultrazvuka su: zagrijavanje, kompresija i širenje, kavitacija, turbulencija, strukturni učinci, čišćenje i drugi (Režek Jambrak, 2008). Tijekom prolaska akustičnog vala kroz medij stvaraju se područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka (Sala i sur., 1995) koji uzrokuju pojavu kavitacije i stvaranje mjehurića plina (Slika 3). Nadalje, veličina mjehurića raste dok ne dosegne kritičnu veličinu u kojoj energija ultrazvuka nije dovoljna da bi zadržala plinovitu fazu u mjehuriću te oni implodiraju. Svaka implozija mjehurića djeluje na mikrolokacijskoj razini pri čemu se razvijaju vrlo visoke temperature (iznad 5000 °C) i tlakovi (oko 50 MPa) (Cameron i sur., 2009). Ovaj fenomen poznat je kao prijelazna kavitacija i dugo se smatralo kako je upravo on glavni letalni učinak ultrazvuka (Slika 4) (Sala i sur., 1995). Štoviše, baktericidni učinak se temelji na stanjivanju i razaranju staničnih membrana, lokaliziranog grijanja te stvaranja slobodnih radikala (Butz i Tauscher, 2002). Vruće zone ili hotspotovi koji nastaju uslijed implozije mjehurića, djelovanjem kavitacije, mogu imati baktericidni učinak, ali su one limitirane te ne djeluju na veću površinu. Također, iznimno visoke temperature i tlakovi nastali implzijom mjehurića, kavitacijom, mogu izazvati disocijaciju vodene pare na OH^- radikale i H^+ ione (Suslick, 1989) za koje se pretpostavlja da mogu inaktivirati bakterijske stanice reakcijama oksidacije (Shin i sur., 1994).



Slika 3. Stabilna i prijelazna kavitacija (Kuijpers i sur., 2002)

2.1.2. Podjela i primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji

Uporaba i primjena ultrazvuka u prehrambenoj industriji predmet je sve većeg istraživanja i razvoja zadnjih petnaestak godina, a s obzirom na primjenu ultrazvuka u prehrambenoj industriji, on se može podijeliti u dva glavna polja (Slika 4).



Slika 4. Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Mason, 1998)

- *ULTRAZVUK NISKOG INTENZITETA*

Odnosi se na visoke frekvencije, obično od 2 do 20 MHz, čime se postižu niski intenziteti (snage), uglavnom manji od 1 W cm^{-2} (Leadley i Williams, 2006). To je neinvazivna tehnika pod čijim uvjetima ne dolazi do nikakvih fizičkih oštećenja materijala, kao ni do kemijskih promjena unutar ispitivanog sustava. U prehrambenoj industriji se koristi kao analitička metoda za određivanje stranih tijela, određivanje reologije namirnica, određivanje razine kapljevine u bačvama ili tankovima, određivanje koncentracije tvari u hrani, mjerenje brzine protoka tekućina (McClements, 1995; Brnčić, 2006; Brnčić i sur., 2009).

- *ULTRAZVUK VISOKOG INTENZITETA*

Karakteriziraju ga frekvencije od 20 do 100 kHz uz prošireno područje do 2 MHz (McClements, 1995.; Mason, 1998.) te visoki intenziteti (u rasponu od 1 do 1000 W cm^{-2}). Ultrazvuk visokog intenziteta (snage), stvara dovoljno energije da može uzrokovati razdvajanje intermolekularnih veza, dok intenziteti iznad 1 W cm^{-2} dovode do stabilnih kavitacija, što je ujedno i glavni uzrok nastajanja kemijskih i fizikalnih promjena u materijalima koji su podvrgnuti ultrazvučnom tretmanu. U frekvencijskom području od 20 kHz do 40 kHz ultrazvuk visokog intenziteta ima najučinkovitije djelovanje u smislu stvaranja i djelovanja kavitacija, te se ujedno iz navedenog razloga većina istraživanja temelji na tom frekvencijskom području (Patist i Bates, 2008) dok je njegova primjena u prehrambenoj industriji široka (Slika 5).

Koristi se za homogenizaciju i emulgiranje (Canselier i sur., 2002), sušenje voća i povrća (De la Fuente-Blanco i sur., 2006), ekstrakciju bioaktivnih tvari iz različitih vrsta proizvoda (Wambura i sur., 2010), čišćenje raznih površina (Fuchs, 1999), u procesima membranske separacije (Muthukumaran i sur., 2006), prilikom ozračivanja tekućina i za inaktivaciju mikroorganizama (Pitt i Ross, 2003). Dokazano je da je ultrazvuk visokog intenziteta koristan prilikom formiranja kristala leda tijekom zamrzavanja vode (Li i Sun, 2002). Mehanički učinci nastali djelovanjem ultrazvuka osiguravaju veće prodiranje otapala u stanične materijale te poboljšavaju prijenos mase (Kim i Zayas, 1991). Ispitivanja (Lima i Sastry, 1990; Sastry i sur., 1989) su pokazala da ultrazvuk visoke snage poboljšava prijenos topline. Ultrazvuk se koristi i u procesima filtracije gdje je moguće povećati stupanj protoka fluida kroz filter. Postoje dva specifična učinka djelovanja ultrazvuka koja se mogu upotrijebiti kako bi se poboljšala tehnika filtracije: (1) sonifikacija, čije djelovanje uzrokuje aglomeraciju finih čestica te samim time dovodi do brze filtracije; (2) sonifikacija, čije djelovanje može osigurati dovoljno vibracijske energije sustavu za održavanje djelomično suspendiranih čestica. Ovim putem se pomoću vibracijske energije koja nastaje djelovanjem ultrazvuka osigurava formiranje slobodnih „kanala“ za izlazak tekućine (Režek Jambrak, 2008). Kombinirani utjecaj ova dva specifična učinka uspješno se primjenjuje u poboljšanju vakuum filtracije industrijskih mješavina kao što su otpadne vode koja je dugotrajan i veoma težak proces (Senapati, 1991).

Također, ultrazvuk se može koristiti i u kombinaciji sa raznim metodama. Kombinacija ultrazvuka sa toplinom i tlakom, tehnika koja se naziva manotermosonifikacija, pokazala se

veoma učinkovito u pogledu inaktivacije enzima koji su otporni na toplinu (Vercet i sur., 1997). Dostupni su rezultati ispitivanja utjecaja ultrazvuka na inaktivaciju mikroorganizama u kombinaciji s kemijskim antimikrobioticima (Phull i sur., 1997), te u kombinaciji s toplinom i neznatno povišenim tlakom (Ciccolini i sur., 1997; Sala i sur., 1995; Villamiel i de Jong, 2000). McClements (1995) je potvrdio da je inaktivacija mikroba učinkovitija kada se ultrazvuk koristi u kombinaciji s drugim metodama dekontaminacije kao što su zagrijavanje, visoki pH ili klorifikacija. Sposobnost ultrazvuka da izazove kavitacije mjehurića ovisi o karakteristikama ultrazvuka (frekvenciji, intenzitetu), svojstvima proizvoda (viskoznosti, gustoći i površinskoj napetosti) te okolnim uvjetima (temperaturi, tlaku i vlažnosti) (Dolatowski i sur., 2007; Brnčić i sur., 2009).



Slika 5. Područje djelovanja ultrazvuka visokih intenziteta u prehrambenom i bioprocenom inženjerstvu (Brnčić i sur., 2009)

Ultrazvuk visokog intenziteta se smatra potencijalnim tehnološkim postupkom netoplinske obrade hrane, budući da može uzrokovati eliminaciju enzima i mikroorganizama te poboljšati stvaranje emulzija i disperzija ili promociju određenih kemijskih reakcija (Herceg, 2009).

2.1.3. Primjena ultrazvuka u vinarstvu

Pored svih konvencionalnih metoda koje se primjenjuju u procesima proizvodnje vina, a utječu na ukupnu kvalitetu finalnog proizvoda, svoje mjesto u tome pronalazi i ultrazvuk visokih snaga kao relativno nova, alternativna, netermalna tehnologija čija primjena može također utjecati na ukupnu kvalitetu nekih vina. Primjena ultrazvuka visokih snaga u vinarstvu usmjerena je na mikrobnu aktivnost tijekom fermentacije, ekstrakciju fenolnih i aromatskih spojeva iz grožđa u mošt te za ubrzavanje reakcija starenja i dozrijevanja u vinu.

Studije autora (Yap i sur., 2007) pokazale su da ultrazvuk inaktivira žive stanice kvasaca. U pokusima je korištena prijenosna ultrazvučna sonda i dobiveni rezultati su pokazali redukciju u rasponu od 88,8 % i 99,9 % populacije *Brettanomyces/Dekkera spp.* upotrebom snage od 10 i 50 W. Sljedeći pokus pokazao je visoku učinkovitost ultrazvučne sonde snage 1000 W, gdje je utvrđeno da nakon 5 i 7 minuta, na temperaturi od 40 °C inaktivirano 99,58 % odnosno 99,97 % živih stanica *Brettanomyces/Dekkera spp.* Isti autori su koristili inficirane nove, jednu i tri godine stare dužice kako bi usporedili metode sanitacije koje se trenutno koriste u vinarijama (pranje vrućom vodom pod visokim pritiskom) sa ultrazvukom visoke snage. Žive stanice su bile značajno reducirane na površini svih dužica pod utjecajem ultrazvuka visoke snage na temperaturi od 60 °C kroz 5 minuta. Rezultati ovih studija su pokazali da primjena ultrazvuka visoke snage za dezinfekciju bačava ima potencijala kako bi se eliminirala ili značajno reducirala populacija kvasaca *Brettanomyces/Dekkera spp.* ili ostalih nepoželjnih kvasaca i bakterija koji uzrokuju kvarenje vina te se samim time i osigurava znatno smanjenje troškova.

Povećanje temperature koje nastaje zbog fenomena kavitacije uzrokuje određenu promjenu pH vrijednosti koja može znatno utjecati na ukupni fenolni sastav, a s time i na oksidacijski potencijal (Chang i Chen, 2002). Ultrazvuk visokih snaga može ubrzati reakcije koje se događaju tijekom starenja i sazrijevanja vina kao i reakcije oksidacije i redukcije. Jedna od najvažnijih promjena koja se događa tijekom starenja i dozrijevanja vina je stabilizacija boje nastala kopigmentacijom antocijanidina, formiranje novih tvari boje i postepeno formiranje tanin-tanin i antocijanidin-tanin kompleksa (Boulton, 2001; Jackson, 2008).

Utjecaj ultrazvuka visokih snaga na ukupne fenolne spojeve u crnom vinu su ispitali autori (Masuzawa i sur., 2000; García Martín i Sun, 2013; Ćurko i sur., 2017). Rezultati koje su

autori dobili potvrđuju proces polimerizacije fenolnih spojeva u vinu koji su inicirani ultrazvučnim tretmanom.

Autori su također ispitali utjecaj ultrazvuka visokih snaga na fizikalno-kemijska svojstva crnih vina. Zaključili su da različiti uvjeti ultrazvučnog tretmana uvelike mijenjaju koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva i električne vodljivosti. S toga, ova fizikalna tehnologija koja mijenja karakteristike crnih vina je i potencijalna metoda za ubrzavanje reakcija starenja i sazrijevanja vina (García Martín i Sun, 2013).

Velika snaga ultrazvuka stvara visoke temperature i tlakove na mikrolokacijskoj razini koji uzrokuju modifikaciju kemijskih reakcija kao što su fragmentacija i lančana rekombinacija polimera (Chang, 2005). Kombinirani učinak tih faktora (temperatura, tlak i turbulencija) izazvani kavitacijom, ubrzavaju prijenos mase u kemijskim reakcijama, stvaraju nove reakcijske puteve, razgrađuju ili čak stvaraju različite spojeve od onih dobivenih pri konvencionalnim uvjetima (Patist i Batest, 2008).

Početak ovog desetljeća se počeo ispitivati utjecaj ultrazvuka visoke snage kako bi se procijenio mogući učinak na ekstrakciju boje i okusa u različitim fazama procesa proizvodnje vina (Ferraretto i sur., 2013). Crvena boja i aromatske komponente se nalaze u stanicama kože grožđa i njihovo otpuštanje je olakšano mehaničkim djelovanjem, razaranjem tkiva i stanica te temperaturom i alkoholom. Povećanje koncentracije tanina i antocijana, glavnih fenolnih spojeva koji su odgovorni za okus, boju i starenje, daju vinima povećani potencijal za dozrijevanje. Stoga bi primjena procesa ekstrakcije polifenola prije fermentacije mogla uvelike unaprijediti starenje i dozrijevanje vina, kako u bačvama tako i u bocama (García Martín i Sun, 2013).

Ultrazvuk visoke snage se također može koristiti kako bi ubrzao otpuštanje zaštitnih koloida iz taloga te samim time ubrzalo stabiliziranje vina u kratkom periodu (García Martín i sur., 2013). Ultrazvučna kavitacija bi mogla olakšati otpuštanje tih spojeva djelujući na rad staničnih stijenki i membrana.

Istraživanja raznih autora (García Martín i Sun, 2013; Zhang i sur., 2016) su dokazala da ultrazvuk visokih snaga nije značajno utjecao na osnovne enološke parametre vina poput pH, ukupnu i hlapljivu kiselost, sadržaj SO₂, etanol i šećere, koji pridonose ukupnoj kvaliteti vina.

2.2. POLIFENOLNI SPOJEVI VINA

Polifenoli su esencijalne molekule za fiziologiju biljaka zbog svoje uključenosti u različite funkcije poput rasta, pigmentacije, rezistencije na patogene. Polifenolni spojevi u crnom vinu imaju izrazito značajnu ulogu zbog svog utjecaja na senzorska svojstva kao što su gorčina, trpkoca i boja. Prisutnost u većoj ili manjoj količini također utječe na stabilnost i dozrijevanje vina, na njegov miris i okus te na hranjive vrijednosti vina.

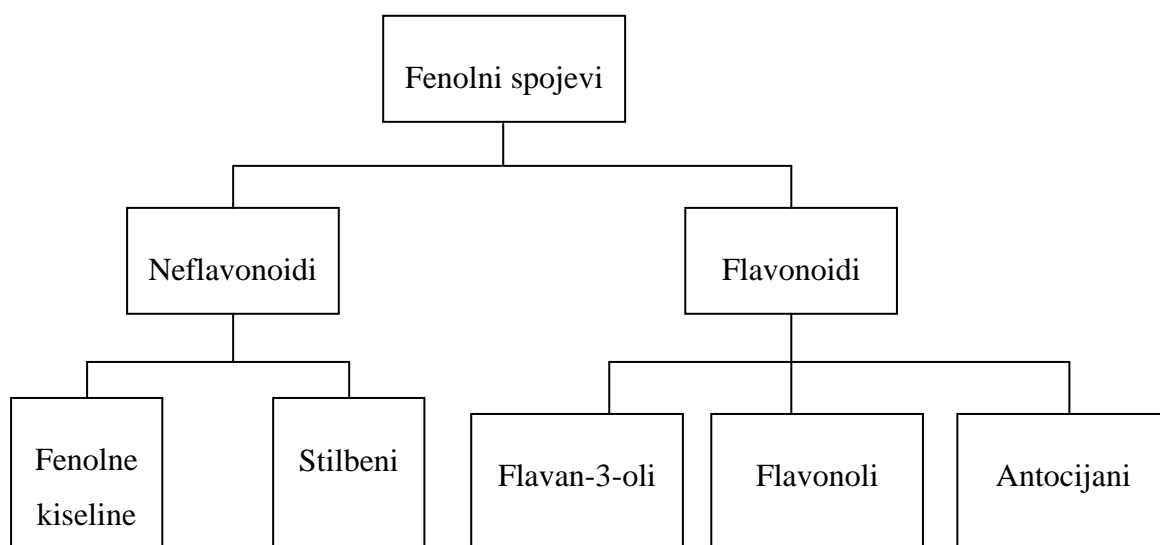
Sastav polifenolnih spojeva i njihov međusobni odnos je određen sortom grožđa, ali značajan utjecaj imaju i uvjeti uzgoja, klima te godina berbe. Zbog svojih svojstava mogu se koristiti pri određivanju autentičnosti vina. Veće ili manje količine polifenolnih spojeva u vinu ovise o sorti, stupnju zrelosti prilikom berbe, zdravstvenom stanju grožđa i nizu drugih čimbenika, a ponajviše o tehnološkom postupku prerade (Mazza i sur., 1999).

Polifenolni sastav vina ovisi kako o sortimentu prerađenom u postupku vinifikacije tako i o uvjetima vinifikacije i dozrijevanju vina (Cheynier i Rigaud, 1986). Crna vina sadrže od 800 do 4000 mgL⁻¹ polifenola i po udjelu su nakon alkohola, ukupnih kiselina i ugljikohidrata. Starenje vina također mijenja sastav polifenola zbog svojstva polifenola da podliježu različitim transformacijama kao što su oksidacija (Martinez i Whitaker, 1995), kondenzacija i polimerizacija (Bakker i sur., 1997) i ekstrakcija iz drveta (Chatonnet i Dubourdieu, 1998).

Polifenolni spojevi imaju antioksidacijska svojstva te se smatraju odgovornima za „francuski paradoks“ vina. Autori (Doll, 1990; Gey, 1990) su dokazali da umjereno konzumiranje crnih vina dovodi do smanjenja rizika pojave kardiovaskularnih bolesti. Osim toga, polifenolni spojevi su značajni zbog svog antikancerogenog, antivirusnog i baktericidnog djelovanja te imaju sposobnost hvatanja slobodnih radikala (Uchida i sur., 1987). Znanstvenim istraživanjima ustanovljeno je da se blagotvorno djelovanje vina može pripisati fenolnim spojevima. Neki polifenoli imaju značajan pozitivan utjecaj na razne bolesti kardiovaskularnog sustava, kao i antikancerogeno djelovanje (Yao i sur., 2004). Crno vino ima pozitivan, zaštitnički učinak na zdravlje u odnosu na druga alkoholna pića zbog toga što polifenoli koje sadrži vino pomažu u sprječavanju bolesti povezanih uz oksidacijski stres (Alén-Ruiz i sur., 2009).

S kemijskog gledišta, polifenoli su ciklički aromatski spojevi koji imaju hidroksilne skupine izravno vezane na prstenastu benzensku jezgru. Iako u svom kemijskom sastavu sadrže alkoholnu skupinu, polifenoli ne pokazuju svojstva alkohola.

Do danas je poznato približno 8000 polifenolnih molekula različite kemijske strukture, od najjednostavniji hidroksimetilnih kiselina i antocijana do složenih flavonoida i tanina. Polifenoli se dijele u 2 glavne skupine, neflavonoide i flavonoide, što je i prikazano na slici 6.



Slika 6. Polifenolni spojevi vina (De Beer i sur., 2002)

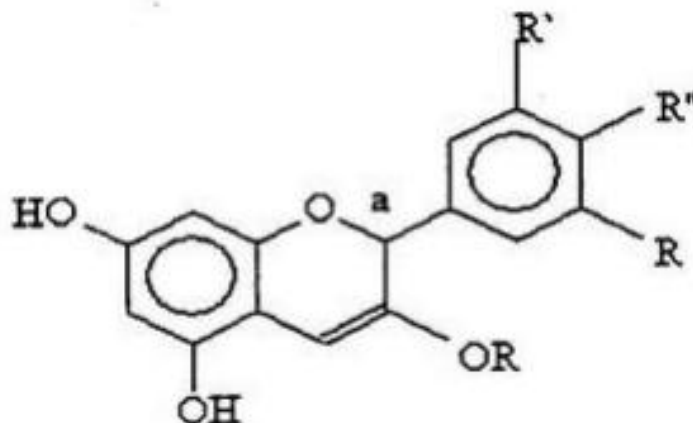
Flavonoide čine antocijani i tanini koji pridonose boji i okusu vina, dok neflavonoide čine hidroksibenzojeve kiseline, hidroksicimetne kiseline i njihovi derivati. U samom grožđu fenoli se nalaze u pokožici, stabljici i sjemenki, a za vrijeme rasta vinove loze njihova koncentracija se povećava utjecajem sunčeve svjetlosti (Boulton, 2001).

Neflavonoidi čine većinu polifenolnih spojeva u bijelim vinima (85 %), dok se flavonoidi oslobađaju uslijed maceracije i čine glavninu polifenolnih spojeva u crnim vinima.

2.2.1. Antocijani

Antocijani su komponente koje karakterizira sposobnost bojanja, smještene unutar mesa i kože grožđa te su odgovorne za crnu boju vina i pripadaju skupini flavonoida. S obzirom na činjenicu da je boja vina jedan od najvažnijih indikatora prihvatljivosti proizvoda, prema tome, antocijani su s kvalitativnog i kvantitativnog gledišta estetski i ekonomski važni (Sun i sur., 2011). Riječ antocijan dolazi od dvije grčke riječi: anthos (cvijet) i kyanos (plavo). Antocijani su specifični biljni pigmenti koji maceracijom u procesu vinifikacije prelaze iz kože bobice u sok i vino, ili se pak već nalaze i u soku, što je karakteristika nekih sorata, tzv. bojadisera. Raspodjela i koncentracija antocijana u grožđu ovisi o sorti, zrelosti, klimatskim uvjetima, geografskom području i prinosu (González-San José i sur., 1990; Vivas i sur., 2001).

Antocijani se razlikuju po broju i poziciji hidroksi i metoksi skupina u B-prstenu molekule (Slika 7). Najčešće spominjani antocijani su delfinidol i cijaninidol, koji u svojem sastavu ponekad imaju i jednu molekulu glukoze, pa se s toga nazivaju monoglukozidima, a ponekad i dvije i tada govorimo o diglukozidima. Ove su molekule potpuno odsutne u većini bijelih vina (Ribereau-Gayon i sur., 2003). Antocijani su slabo topivi u vodi i u staničnom soku, odnosno moštu grožđa, osobito pri nižim temperaturama, što se pokušava ostvariti noćnom berbom ili ranom zorom, odnosno hlađenjem grožđa, a samim time i mošta.



Slika 7. Strukturna formula antocijanidina (Moreno-Arribas i Polo, 2009)

Antocijani su najvažnija skupina pigmenata topljivih u vodi koje su vidljive ljudskom oku (Harborne, 1994). Na njihovu stabilnost utječe i njihova struktura, koncentracija u otopini, pH, temperatura, koncentracija kisika, svjetlo i prisutnost drugih tvari (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Postoje četiri različite strukture antocijana koje su međusobno u ravnoteži, u kiselom ili neutralnom mediju: flavilijev kation (crveni), kinonska baza (plava), hemiketal ili karbinol pseudo-baza (bezbojna) i halkon (blijedo žuti) (Brouillard, 1982). Boja antocijana, kao i njihova struktura, izravno je vezana uz pH vrijednost. U jako kiselim medijima su crveni, dok se s povećanjem pH vrijednosti boja gubi.

Većinom se nalaze u stanicama pokožice grožđa s koncentracijskim gradijentom od unutra prema van (Amrani-Joutei, 1993). U crnim sortama prisutni su u obliku slabih kompleksa koji su međusobno povezani hidrofobnim vezama, a nastaju procesima samopovezivanja i kopigmentacije (Somers i Vérette, 1988). Flavonoidi, esteri hidroksicimetine kiseline s polifenolima najčešće sudjeluju u stvaranju takvih kompleksa (Somers, 1982). Oba tipa kompleksa povećavaju apsorpciju svjetla i gustoću boje i općenito povećavaju stabilnost boje vina (Jackson, 2008).

Polimerizacija igra važnu ulogu u stabilizaciji boje vina, jer štiti molekule antocijanidina od oksidacije i drugih kemijskih modifikacija. Polimerizacija nastala između antocijanidina i procijanidina smanjuje taloženje tanina u vinu, a samim time i njihov gubitak. Kovalentnim vezanjem tanina sa molekulama antocijanidina se također povećava obojenost vina (Jackson, 2008).

2.2.2. Tanini

Tanini su skupina spojeva različitih struktura koji su topljivi u vodi te 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 (katehini), te u kiselim uvjetima pri povišenim temperaturama otpuštaju crveni pigment antocijanidina. 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).

Opće im je svojstvo da su trpkog i oporog okusa, dok s metalima čine obojene reakcije (crvene, plave i zelene). U crnim vinima prisutni su u većoj količini u odnosu na bijela. Pripadaju polifenolima, a dijele se na katehine i leukoantocijane. U kemijskom pogledu bliski su, ali među njima ima i razlike.

Proantocijanidini su polimeri flavan-3-ola, izgrađeni od katehina i epikatehina. Zbog svog polifenolnog karaktera smatraju se i pravim polifenolima. Najviše proantocijanidina ima u sjemenkama i kožici (Singleton, 1992). Ti spojevi su najvažnije komponente koje grožđu i vinu daju trpkost i gorčinu (Gawel, 1998). Dokazano je da su proantocijanidini također jaki antioksidansi, odgovorni za pozitivno djelovanje vina, jer usporavaju i sprječavaju aktivnosti slobodnih radikala u organizmu (Frenkel i sur., 1993; Rigo i sur., 2000).

Reakcija tanina i proteina sline može proizvesti mekanu balansiranu impresiju ili agresivnu koja se percipira kao trpkoca i koja nije poželjna karakteristika vina. Tanini se u vino ekstrahiraju iz pokožice i sjemenke grožđa tijekom fermentacije. Tanini iz sjemenke vinu daju tijelo i strukturu, dok tanini iz pokožice mu daju punoću, zaokruženost i boju (Ribéreau-Gayon i sur., 2004). Trpkoca je jedna od najvažnijih organoleptičkih svojstava crnog vina. To je važno svojstvo suhih crnih vina jer im daje na kompleksnosti i utječe na teksturu odnosno punoću vina (Gawel i sur., 2001.).

Za vrijeme vinifikacije i dozrijevanja vina, zbog svoje visoke reaktivnosti, proantocijanidini prolaze kroz razne strukturne transformacije koje uzrokuju karakteristične promjene boje i okusa vina, što ih određuje kao važan čimbenik kakvoće vina. Važno svojstvo proantocijanidina je reakcija s antocijanima i stvaranje pigmentiranih produkata pri čemu dolazi do stabilizacije boje vina (Somers, 1971) s jedne strane te do sprječavanja oksidacije proantocijanidina s druge strane (Haslam, 1998). U znanstvenoj i stručnoj terminologiji koristili su se razni nazivi za ovu skupinu spojeva.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJALI

3.1.1. Uzorci vina

U ovom istraživanju korišteno je mlado bijelo vino sorte Graševina i crno vino sorte Cabernet Sauvignon iz Slavonije, Hrvatska, proizvedeno 2016 godine. Osnovni fizikalno-kemijski parametri odabranih vina prikazani su u tablicama 1 i 2.

Tablica 1. Kemijski sastav tretiranog vina Graševina

Alkohol	11,5 %
Šećer	2 gL ⁻¹
Hlapiva kiselost (kao octena kiselina)	0,24 gL ⁻¹
Ukupna kiselost (kao vinska kiselina)	4,86 gL ⁻¹
pH	3,25

Tablica 2. Kemijski sastav tretiranog vina Cabernet Sauvignon

Alkohol	12,8 %
Šećer	5 gL ⁻¹
Hlapiva kiselost (kao octena kiselina)	0,43 gL ⁻¹
Ukupna kiselost (kao vinska kiselina)	5,63 gL ⁻¹
pH	3,54

3.1.2. Kemikalije

- Natrijev karbonat, bezvodni, p.a. T.T.T. d.o.o., Sveta Nedelja, Hrvatska
- Folin-Ciocalteu reagens, Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska
- Galna kiselina (97,5-102,5 %), Sigma-Aldrich, Hong Kong, Kina
- Natrijev hidrogen sulfit, p.a. Acros, Geel, Belgija
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Etanol (96 %), Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska

3.1.3. Instrumenti

- Ultrazvučni procesor QSONICA SONICATORS 700 W, Qsonica Sonicators, Newtown, SAD
- Spektrofotometar, Specord 50 Plus, AnalytikJena, Jena, Njemačka
- Analitička vaga, Mettler Toledo, Zürich, Švicarska

3.1.4. Laboratorijsko posuđe i pribor

- Laboratorijske čaše volumena 400 mL
- Kivete od 1 cm
- Mikropipete 100 i 1000 μ L
- Odmjerne tikvice volumena 25 mL
- Erlenmeyerove tikvice
- Tube za hidrolizu
- Staklene pipete (5 mL i 10 mL) i propipete
- Menzura
- Staklene epruvete
- Plastična lađica za vaganje

3.2 METODE

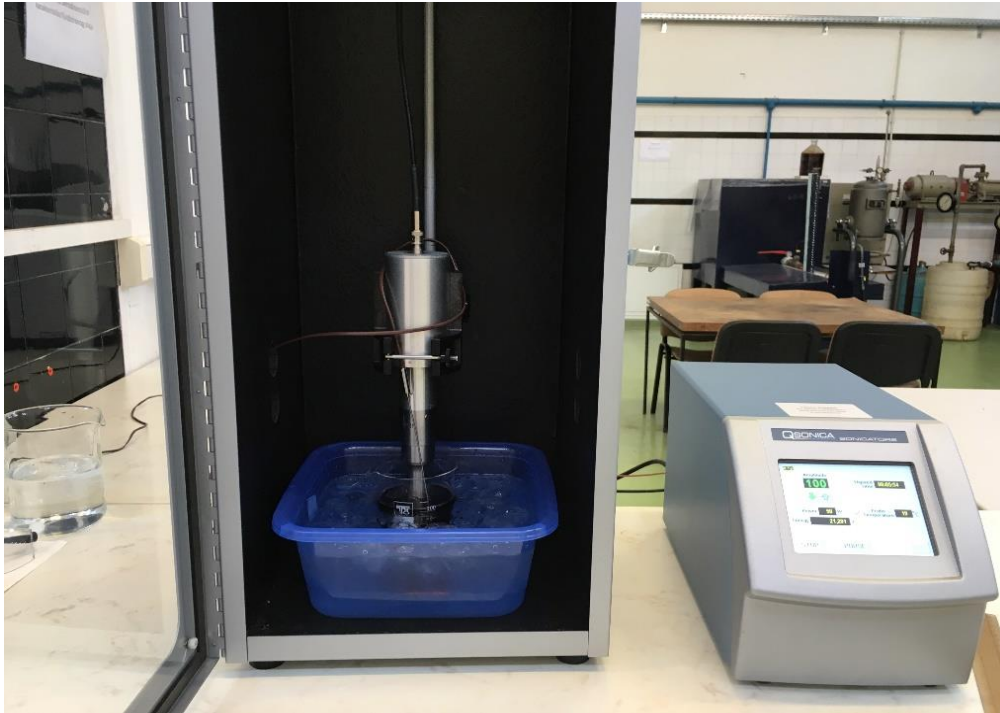
U ovom istraživanju ispitan je utjecaj ultrazvuka visokih snaga na polifenolne spojeve i kromatske karakteristike u vinima Graševina i Cabernet Sauvignon prema eksperimentalnom planu prikazanom u tablici 3.

Tablica 3. Eksperimentalni plan tretiranja vina Graševina (G) i Cabernet Sauvignon (CS) ultrazvukom visokih snaga uz zadane procesne parametre

Uzorak	Promjer sonde (mm)	Amplituda ultrazvuka (%)	Vrijeme obrade (min)
G ₁	12,7	25	6
G ₂	12,7	50	6
G ₃	12,7	75	6
G ₄	12,7	100	6
G ₅	19,1	25	6
G ₆	19,1	50	6
G ₇	19,1	75	6
G ₈	19,1	100	6
G ₉	25,4	25	6
G ₁₀	25,4	50	6
G ₁₁	25,4	75	6
G ₁₂	25,4	100	6
CS ₁	12,7	25	6
CS ₂	12,7	50	6
CS ₃	12,7	75	6
CS ₄	12,7	100	6
CS ₅	19,1	25	6
CS ₆	19,1	50	6
CS ₇	19,1	75	6
CS ₈	19,1	100	6
CS ₉	25,4	25	6
CS ₁₀	25,4	50	6
CS ₁₁	25,4	75	6
CS ₁₂	25,4	100	6

3.2.1. Tretiranje vina ultrazvukom visokih snaga

U svrhu tretiranja vina Graševina i Cabernet Sauvignon ultrazvukom visokih snaga korišten je ultrazvučni procesor QSONICA SONICATORS 700 W (Qsonica Sonicators, Newtown, SAD) (Slika 8). Karakteristike ultrazvučnog procesora su sljedeće: maksimalna izlazna snaga – 700 W i frekvencija ultrazvuka od 20 kHz.



Slika 8. Ultrazvučni procesor QSONICA SONICATORS 700 W (Qsonica Sonicators, Newtown, SAD)

Postupak tretiranja:

Postupak tretiranja vina ultrazvukom visokih snaga je sljedeći: u laboratorijsku čašu uliti 300 mL vina, uroniti ultrazvučnu sondu na visinu od 2 cm i centrirati na sredinu čaše. Tijekom ultrazvučnog tretmana temperaturu održavati na $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ hlađenjem ledom te istovremeno temperaturnom sondom pratiti temperaturu uzorka. Definirani parametri ultrazvučnog tretmana su sljedeći: promjer sonde 12,7, 19,1 i 25,4 mm, amplituda (25, 50, 75 i 100 %) te trajanje tretmana od 6 minuta. Dvanaest uzoraka bijelog vina Graševina (G_1 - G_{12}) i dvanaest uzoraka crnog vina Cabernet Sauvignon (CS_1 - CS_{12}) podvrgnuti su ultrazvučnom tretmanu prema eksperimentalnom planu prikazanom u tablici 3. Svaki pojedini tretman proveden je u duplikatu. Uzorak vina koji nije tretiran ultrazvukom nazvan je kontrolnim uzorkom. Analize pojedinih komponenti su provedene nakon tretmana ultrazvukom te u netretiranom uzorku.

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Princip određivanja:

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

Postupak određivanja:

Crno vino razrijediti u omjeru 1:9, v:v, s destiliranom vodom. U tikvicu od 25 mL otpipetirati 250 μL razrijeđenog uzorka, 1,25 mL FC reagensa (razrijeđenog 1:2) i 15 mL vode. Sve dobro promiješati i poslije 30 sekundi dodati 3,75 mL 20%-tnog natrij-karbonata. Nadopuniti do oznake s destiliranom vodom te ostaviti 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga izmjeriti apsorbanciju pri valnoj duljini od 765 nm nasuprot slijepoj probi koja se priprema na sljedeći način: 250 μL vode, 1,25 mL FC reagensa, 15 mL vode te nakon 30 sekundi dodati 3,75 mL 20 %-tnog natrij-karbonata i nadopuniti destiliranom vodom do oznake.

Izrada baždarnog pravca:

Otopine galne kiseline pripremiti u 12 % etanolu u sljedećim koncentracijama: 50, 100, 150, 250, 500 i 600 mgL^{-1} . Postupak određivanja isti je kao prethodno opisani za određivanje ukupnih fenola u vinima. Nakon toga izmjeriti apsorbanciju i izraditi baždarni pravac pri čemu na apscisu treba nanijeti koncentracije galne kiseline (mgL^{-1}), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije kod 765 nm.

Račun:

Pomoću programa Microsoft Excel izraditi jednadžbu pravca prema kojoj će se računati koncentracije ukupnih fenola.

U ovom radu izračunata jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,0012x + 0,0076$$

$$R^2 = 0,9994$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 765 nm

x- koncentracija galne kiseline (mgL^{-1})

R^2 - koeficijent determinacije

3.2.3. Određivanje ukupnih antocijana

Princip određivanja:

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

Postupak određivanja:

U tikvicu od 25 mL otpipetirati 1 mL vina, 1 mL 96 %-tnog etanol s 0,1 (v/v) HCl i 20 mL 2 %-tne vodene otopine HCl. Po 10 mL ove otopine otpipetirati u 2 tikvice. U prvu tikvicu dodati 4 mL vode, a u drugu 4 mL 15 %-tne otopine natrij hidrogensulfita. Nakon 15 minuta izmjeriti apsorbanciju u obje otopine na 520 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Udio antocijana u ispitivanom uzorku izračunati prema formuli:

$$A_c (\text{mgL}^{-1}) = 875 \times (D_1 - D_2)$$

gdje je:

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

875 – faktor preračunavanja

D_1 - apsorbancija uzorka kojemu je dodana voda

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

3.2.4. Određivanje ukupnih tanina

Princip određivanja:

Ukupni tanini određeni su Bate-Smith metodom temeljenoj na kiselinskoj hidrolizi proantocijanidina, tzv. kondenziranih tanina na temperaturi od 100 °C pri čemu dolazi do formiranja obojenih antocijanidina (Ribereau-Gayon i Stonestreet, 1966). Razlika obojenja između zagrijanog, hidroliziranog i nehidroliziranog uzorka držanog na sobnoj temperaturi određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini 550 nm, a pokazuje količinu ukupnih tanina u uzorku.

Postupak određivanja:

Uzorak vina razrijediti 50 puta. U dvije tube za hidrolizu otpipetirati po 2 mL razrijeđenog uzorka vina, 1 mL destilirane vode te 3 mL koncentrirane klorovodične kiseline te hermetički zatvoriti tube. Jednu tubu ostaviti pri sobnoj temperaturi, a drugu staviti u vodenu kupelj zagrijanu na 100 °C. Nakon 30 minuta, tubu izvaditi iz vodene kupelji te ohladiti tijekom 5 minuta ledom. U obje tube dodati po 500 µL etanola. Optičku gustoću izmjeriti pri 550 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Koncentraciju tanina u 50 puta razrijeđenom uzorku izračunati prema formuli:

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

gdje je:

19,33- faktor preračunavanja

D₁- optička gustoća hidroliziranog uzorka

D₂-optička gustoća nehidroliziranog uzorka

3.2.5. Određivanje kromatskih karakteristika CIE L*a*b* metodom

Princip određivanja:

CIE L*a*b* prostorni model boja je trodimenzionalni sustav boja koji se temelji na percepciji standardnog promatrača kojeg predstavlja statistički podatak dobiven nizom mjerenja i najbliži je vizualnoj percepciji (CIE, 1986). Koordinate CIE Lab sustava boja se temelji na Heringovoj teoriji suprotnih parova boja, koje ujedno predstavljaju i osi sustava. Kromatske karakteristike vina prema CIE Lab sustavu (Method OIV-MA-AS2-11, 2006) tako opisuju sljedeći parametri: akromatska os L (svjetlina) sa vrijednostima u rasponu od 0 % do 100 %, pri čemu je 0 % crna, a 100 % bijela; raspon boja crveno-zeleno za os a (vrijednost a); raspon boja žuto-plavo za os b (vrijednost b), C (kromatičnost) te H (kut tona boje).

Postupak određivanja:

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

Račun:

Ukupna promjena boje između referentnog (netretiranog) uzorka odnosno standarda i ostalih uzoraka prema CIE Lab sustavu (Method OIV-MA-AS2-11, 2006) izračunava se sljedećom formulom:

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

$$\Delta L^* = L_1^* - L_2^*$$

$$\Delta a^* = a_1^* - a_2^*$$

$$\Delta b^* = b_1^* - b_2^*$$

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

Ovisno o izmjerenim vrijednostima parametra ΔE u odnosu na standard moguće su sljedeće mogućnosti (Schläpfer, 1993):

$\Delta E^* < 0,2$	razlika boja se ne vidi
$\Delta E^* = (0,2 - 1)$	razlika boja se primjećuje
$\Delta E^* = (1 - 3)$	razlika boja se vidi
$\Delta E^* = (3 - 6)$	razlika boja se dobro vidi
$\Delta E^* > 6$	očigledna odstupanja boja

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitan je utjecaj ultrazvuka visokih snaga na kemijski sastav vina Graševina i Cabernet Sauvignon. Nakon tretmana provedene su kemijske analize na ukupno 12 uzoraka crnog vina Cabernet Sauvignon te 12 uzoraka bijelog vina Graševina, paralelno sa kontrolnim (netretiranim) vinima.

Dobiveni rezultati istraživanja prikazuju utjecaj primijenjenih procesnih parametara (veličina sonde, amplituda i vrijeme obrade) ultrazvuka visokih snaga na ključne parametre kvalitete vina (sastav polifenola i kromatske karakteristike).

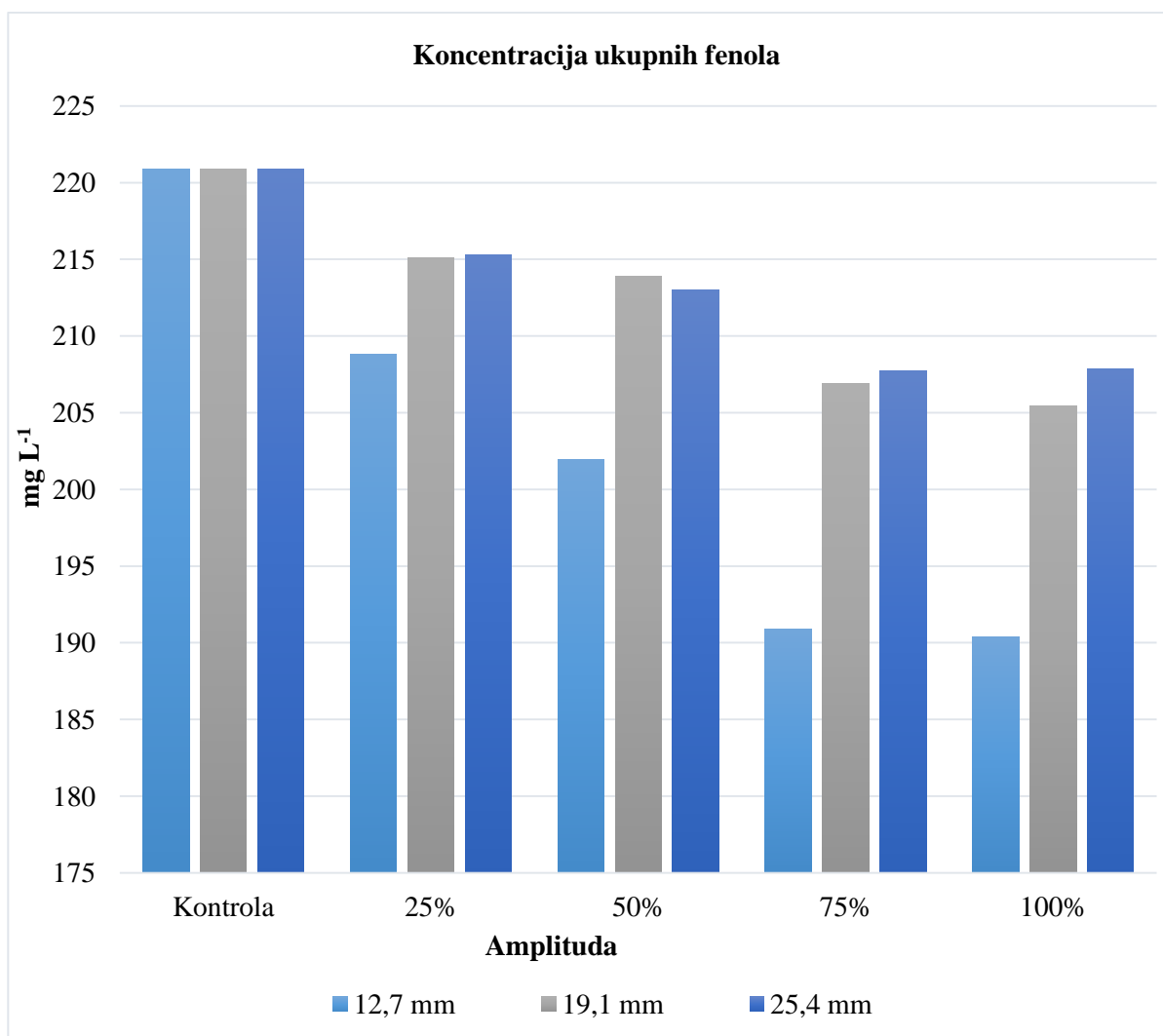
Kemijske analize vina obuhvatile su spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola u bijelom vinu Graševina čiji su rezultati prikazani na slici 9. Zatim određivanje ukupnih fenola, antocijana i tanina u crnom vinu Cabernet Sauvignon s rezultatima prikazanim na slikama 10, 11 i 12.

Također, određene su kromatske karakteristike u oba vina prema CIE L*a*b* metodi čiji su rezultati prikazani u tablicama 4 i 6, razlika parametara boje s rezultatima prikazanim u tablicama 5 i 7, te ukupna promjena boje s rezultatima prikazanim na slikama 13 i 14.

4.1 REZULTATI ODREĐIVANJA POLIFENOLNOG SASTAVA VINA

4.1.1. Utjecaj ultrazvuka visoke snage na koncentraciju ukupnih fenola u bijelom vinu

Rezultati određivanja ukupnih fenola kontrolnog vina sorte Graševina kao i vina tretiranog ultrazvukom visoke snage s različitim promjerom sonde i amplitude u trajanju od 6 minuta prikazani su na slici 9.



Slika 9. Koncentracija ukupnih fenola (mg L^{-1}) u bijelom vinu nakon tretmana ultrazvuka visoke snage različitih promjera sonde i amplituda

Kako bi se utvrdio trenutni utjecaj tretmana ultrazvuka visoke snage (25, 50, 75 i 100 % amplituda u trajanju od 6 minuta) sa različitim promjerima sonde (12,7, 19,1 i 25,4 mm) na koncentraciju ukupnih fenola u crnom (Cabernet Sauvignon) i bijelom (Graševina) vinu analize su napravljene odmah nakon tretmana. Praćenjem koncentracije ukupnih fenola odmah nakon tretmana uočeno je da dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih fenola u bijelom vinu (Graševina).

Iz slike 9 na kojoj su grafički prikazani rezultati određivanja koncentracije ukupnih fenola (mgL^{-1}) u bijelom (Graševina) vinu prije (kontrola) i nakon (25, 50, 75 i 100 %) tretmana ultrazvukom visoke snage u trajanju od 6 minuta, može se zaključiti da dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih fenola. Smanjenje je sve više izraženo kako povećanjem amplitude tako i smanjenjem promjera sonde.

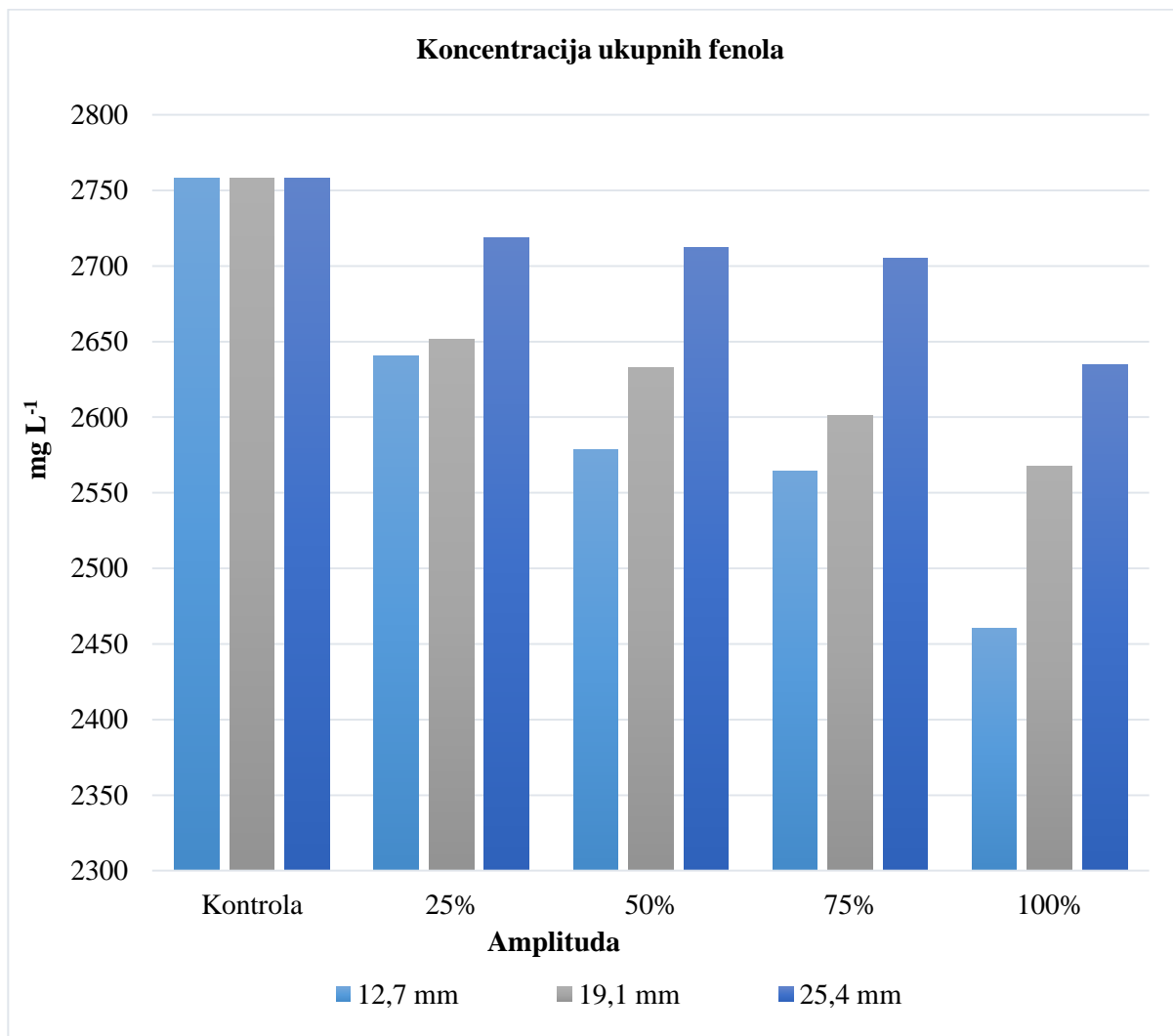
Najmanja koncentracija ukupnih fenola u bijelom vinu (Graševina) zabilježena je u uzorku G₁₀ (12,7 mm, 100 % amplituda, 6 minuta), dok najveću koncentraciju u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak bilježi G₃ (25,4 mm, 25% amplituda, 6 minuta).

Primijećen je najznačajniji učinak na smanjenje koncentracije ukupnih fenola u bijelom vinu Graševina koji smo dobili tretiranjem ultrazvukom visokih snaga koristeći sondu promjera 12,7 mm. Najmanje ukupno sniženje koncentracije ukupnih fenola dobili smo koristeći sondu 25,4 mm.

Uspoređujući koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva u ultrazvukom obrađenim uzorcima s kontrolom može se zaključiti da obrada ultrazvukom visokih snaga dovodi do smanjenja njihove koncentracije u gotovo svim uzorcima bijelog (Graševina) vina. Dobiveni rezultati u skladu su i s rezultatima drugih autora (Zhang i sur., 2016; Ćurko i sur., 2017) koji su proveli istraživanja o utjecaju ultrazvučne obrade pri različitim uvjetima na smanjenje ukupnih fenola u vinu. Trend smanjenja koncentracije ukupnih fenola u tretiranim vinima autori objašnjavaju svojstvom ultrazvuka visokih snaga da ubrza reakcije polimerizacije fenolnih komponenti u vinu, koja je inače prirodna posljedica procesa starenja vina (Zhang i sur., 2016; Ferraretto i Celotti, 2016). Također, dobiveni rezultati su u skladu sa istraživanjima autora (Başlar i Ertugay, 2013) koji su ispitivali utjecaj ultrazvuka visoke snage na kemijski sastav bistrog soka od jabuke. Autori objašnjavaju trend smanjenja koncentracije ukupnih fenola uslijed djelovanja slobodnih radikala nastalih kavitacijom pri utjecaju ultrazvuka visoke snage.

4.1.2. Utjecaj ultrazvuka visoke snage na koncentraciju ukupnih fenola u crnom vinu

Rezultati određivanja ukupnih fenola kontrolnog vina sorte Cabernet Sauvignon kao i vina tretiranog ultrazvukom visoke snage s različitim promjerom sonde i amplitude u trajanju od 6 minuta prikazan je na slici 10.



Slika 10. Koncentracija ukupnih fenola (mg L^{-1}) u crnom vinu nakon tretmana ultrazvuka visoke snage različitih promjera sonde i amplituda

Kako bi se utvrdio trenutni utjecaj tretmana ultrazvuka visoke snage (25, 50, 75 i 100 % amplituda u trajanju od 6 minuta) sa različitim promjerima sonde (12,7, 19,1 i 25,4 mm) na koncentraciju ukupnih fenola u crnom (Cabernet Sauvignon) vinu analize su napravljene odmah nakon tretmana. Praćenjem koncentracije ukupnih fenola odmah nakon tretmana uočeno je da dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih fenola u crnom vinu (Cabernet Sauvignon).

Iz slike 10 na kojoj su grafički prikazani rezultati određivanja koncentracije ukupnih fenola (mgL^{-1}) crnom (Cabernet Sauvignon) vinu prije (kontrola) i nakon (25, 50, 75 i 100 %) tretmana ultrazvukom visoke snage u trajanju od 6 minuta, može se zaključiti da dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih fenola. Smanjenje je sve više izraženo kako povećanjem amplitude tako i smanjenjem promjera sonde.

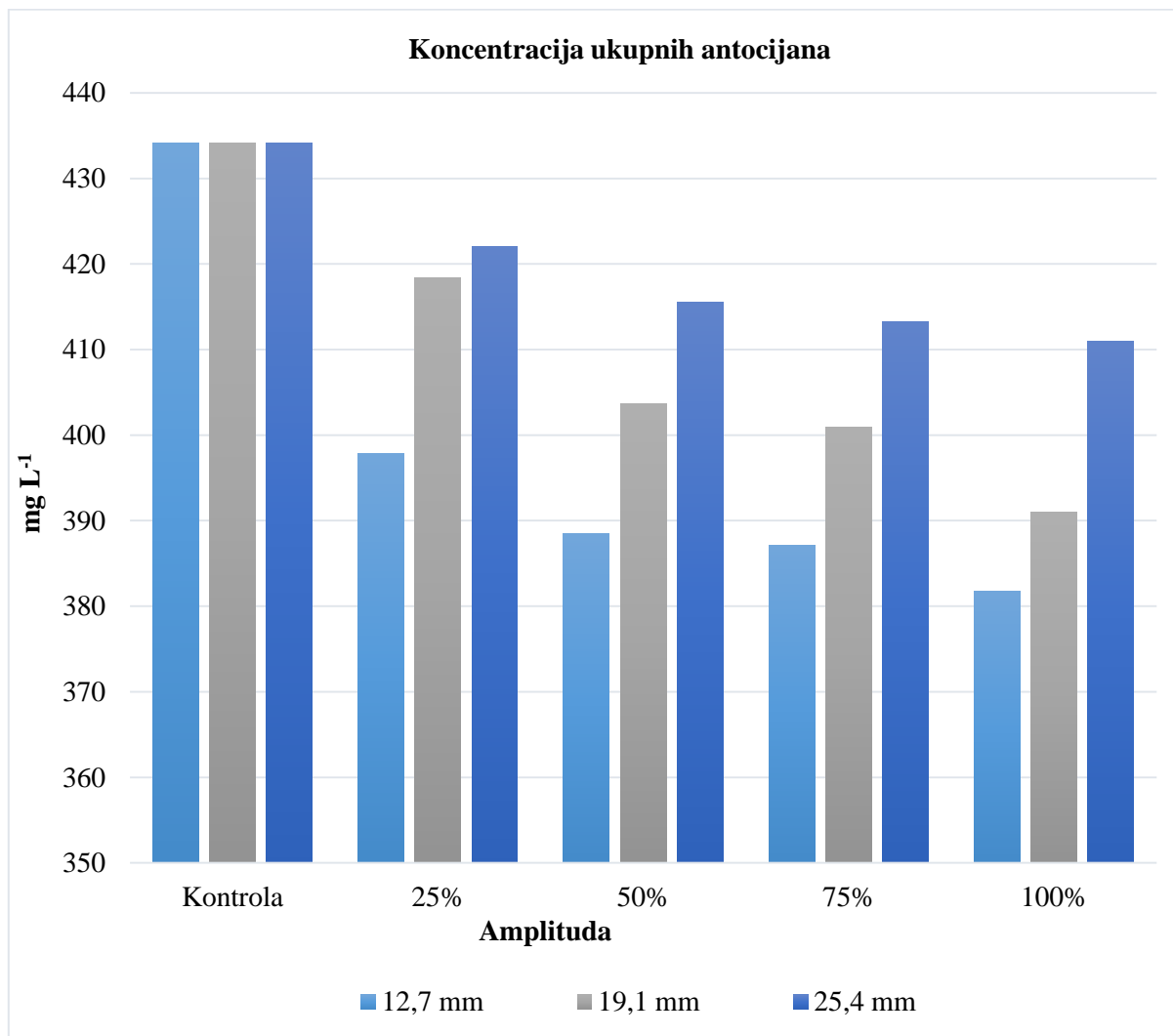
Najmanja koncentracija ukupnih fenola u crnom (Cabernet Sauvignon) zabilježena je u uzorku CS₁₀ (12,7 mm, 100 % amplituda, 6 minuta), dok najveću koncentraciju u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak bilježi CS₃ (25,4 mm, 25 % amplituda, 6 minuta).

Primijećen je najznačajniji učinak na smanjenje koncentracije ukupnih fenola u crnom (Cabernet Sauvignon) koji smo dobili tretiranjem ultrazvukom visokih snaga koristeći sondu promjera 12,7 mm. Najmanje ukupno sniženje koncentracije ukupnih fenola dobili smo koristeći sondu 25,4 mm.

Uspoređujući koncentraciju ukupnih fenolnih spojeva u ultrazvukom obrađenim uzorcima s kontrolom može se zaključiti da obrada ultrazvukom visokih snaga dovodi do smanjenja njihove koncentracije u gotovo svim uzorcima crnog (Cabernet Sauvignon) vina, naročito pri korištenju sonde manjeg promjera i većim amplitudama. Dobiveni rezultati u skladu su i s rezultatima drugih autora (Zhang i sur., 2016; Ćurko i sur., 2017) koji su proveli istraživanja o utjecaju ultrazvučne obrade pri različitim uvjetima na smanjenje ukupnih fenola u vinu. Trend smanjenja koncentracije ukupnih fenola u tretiranim vinima autori objašnjavaju svojstvom ultrazvuka visokih snaga da ubrza reakcije polimerizacije fenolnih komponenti u vinu, koje su inače prirodna posljedica procesa starenja vina te samim time i smanjuje proces dozrijevanja vina Cabernet Sauvignon (Zhang i sur., 2016; Ferraretto i Celotti, 2016).

4.1.3. Utjecaj ultrazvuka visoke snage na koncentraciju ukupnih antocijana u crnom vinu

Rezultati određivanja ukupnih antocijana kontrolnog vina sorte Cabernet Sauvignon kao i vina tretiranog ultrazvukom visoke snage s različitim promjerom sonde i amplitude u trajanju od 6 minuta prikazani su na slici 11.



Slika 11. Koncentracija ukupnih antocijana (mgL^{-1}) u crnom vinu nakon tretmana ultrazvuka visoke snage različitih promjera sonde i amplituda

Kako bi se utvrdio trenutni utjecaj tretmana ultrazvuka visoke snage (25, 50, 75 i 100% amplituda u trajanju od 6 minuta) sa različitim promjerima sonde (12,7, 19,1 i 25,4 mm) na koncentraciju ukupnih antocijana u crnom (Cabernet Sauvignon) vinu analize su napravljene odmah nakon tretmana. Praćenjem koncentracije ukupnih antocijana odmah nakon tretmana uočeno je da dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih fenola u crnom vinu (Cabernet Sauvignon).

Iz slike 11 na kojoj su grafički prikazani rezultati određivanja koncentracije ukupnih antocijana (mgL^{-1}) crnom (Cabernet Sauvignon) vinu prije (kontrola) i nakon (25, 50, 75 i 100 %) tretmana ultrazvukom visoke snage u trajanju od 6 minuta, može se zaključiti da dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih antocijana. Smanjenje je sve više izraženo kako povećanjem amplitude tako i smanjenjem promjera sonde.

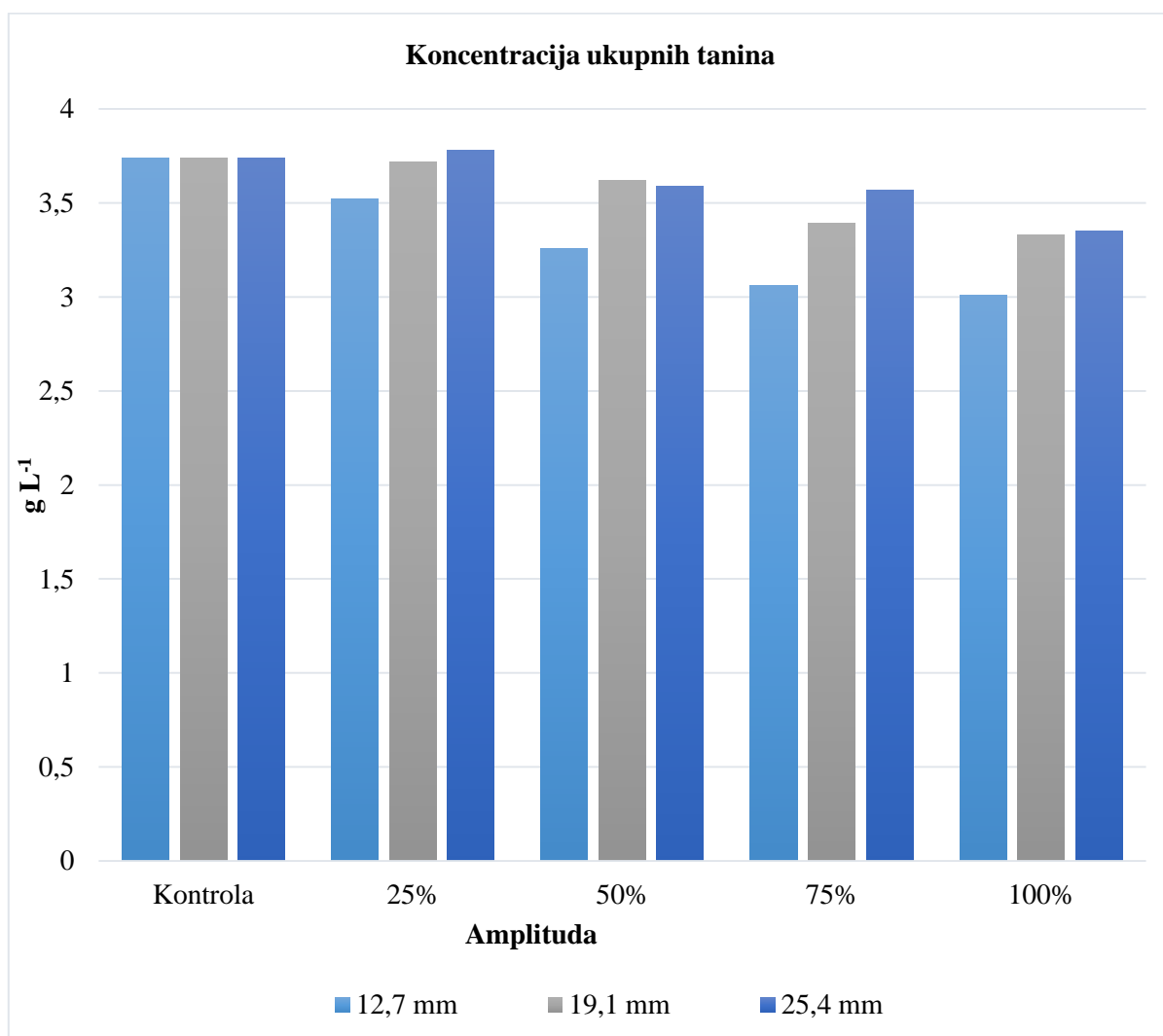
Najmanja koncentracija ukupnih antocijana u crnom (Cabernet Sauvignon) zabilježena je u uzorku CS₁₀ (12,7mm, 100 % amplituda, 6 minuta), dok najveću koncentraciju u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak bilježi CS₃ (25,4 mm, 25 % amplituda, 6 minuta).

Primijećen je najznačajniji učinak na smanjenje koncentracije ukupnih antocijana u crnom (Cabernet Sauvignon) koji smo dobili tretiranjem ultrazvukom visokih snaga koristeći sondu promjera 12,7 mm. Najmanje ukupno sniženje koncentracije ukupnih antocijana dobili smo koristeći sondu 25,4 mm.

Uspoređujući koncentraciju ukupnih antocijana spojeva u ultrazvukom obrađenim uzorcima s kontrolom može se zaključiti da obrada ultrazvukom visokih snaga dovodi do smanjenja njihove koncentracije u gotovo svim uzorcima crnog (Cabernet Sauvignon) vina. Smanjenje koncentracije ukupnih antocijana je izraženije kako pri manjem promjeru sonde tako i pri većim amplitudama. Dobiveni rezultati u skladu su i s rezultatima drugih autora (Zhang i sur., 2016; Ćurko i sur., 2017) koji su proveli istraživanja o utjecaju ultrazvučne obrade pri različitim uvjetima na smanjenje ukupnih antocijana u vinu. U vinima tretiranim ultrazvukom visoke snage dolazi do djelomične degradacije, polimerizacije i kopigmentacije antocijana što se pak očituje kroz smanjenje koncentracije ukupnih antocijana (Zhang i sur., 2016; Ferraretto i Celotti, 2016; Ćurko i sur., 2017). U vinima koja su podvrgnuta prirodnom procesu starenja, koja znaju biti dugotrajan i skup proces, također dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih antocijana što za posljedicu ima povećanje stabilnosti boje crnih vina.

4.1.4. Utjecaj ultrazvuka visoke snage na koncentraciju ukupnih tanina u crnom vinu

Rezultati određivanja koncentracije ukupnih tanina kontrolnog vina sorte Cabernet Sauvignon kao i vina tretiranog ultrazvukom visoke snage s različitim promjerom sonde i amplitude u trajanju od 6 minuta prikazani su na slici 12.



Slika 12. Koncentracija ukupnih tanina (gL^{-1}) u crnom vinu nakon tretmana ultrazvuka visoke snage različitih promjera sonde i amplituda

Kako bi se utvrdio trenutni utjecaj tretmana ultrazvuka visoke snage (25, 50, 75 i 100 % amplituda u trajanju od 6 minuta) sa različitim promjerima sonde (12,7, 19,1 i 25,4 mm) na koncentraciju ukupnih tanina u crnom (Cabernet Sauvignon) vinu analize su napravljene odmah nakon tretmana. Praćenjem koncentracije ukupnih tanina odmah nakon tretmana uočeno je da dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih tanina u crnom vinu (Cabernet Sauvignon).

Iz slike 12 na kojoj su grafički prikazani rezultati određivanja koncentracije ukupnih tanina (gL^{-1}) crnom (Cabernet Sauvignon) vinu prije (kontrola) i nakon (25, 50, 75 i 100 %) tretmana ultrazvukom visoke snage u trajanju od 6 minuta, može se zaključiti da dolazi do smanjenja koncentracije ukupnih tanina. Smanjenje je sve više izraženo kako povećanjem amplitude tako i smanjenjem promjera sonde.

Najmanja koncentracija ukupnih tanina u crnom (Cabernet Sauvignon) zabilježena je u uzorku CS₁₀ (12,7 mm, 100 % amplituda, 6 minuta), dok najveću koncentraciju ukupnih tanina bilježi uzorak CS₃ (25,4 mm, 25 % amplituda, 6 minuta) čija je koncentracija ukupnih tanina zanemarivo veća u odnosu na kontrolni uzorak.

Primijećen je najznačajniji učinak na smanjenje koncentracije ukupnih tanina u crnom (Cabernet Sauvignon) koji smo dobili tretiranjem ultrazvukom visokih snaga koristeći sondu promjera 12,7 mm. Najmanje ukupno sniženje koncentracije ukupnih tanina dobili smo koristeći sondu 25,4 mm.

Uspoređujući koncentraciju ukupnih tanina u ultrazvukom obrađenim uzorcima s kontrolom može se zaključiti da obrada ultrazvukom visokih snaga dovodi do primjetnog smanjenja njihove koncentracije u gotovo svim uzorcima crnog (Cabernet Sauvignon) vina. Dobiveni rezultati u skladu su i s rezultatima drugih autora (Zhang i sur., 2016; Ćurko i sur., 2017) koji su proveli istraživanja o utjecaju ultrazvučne obrade pri različitim uvjetima na smanjenje ukupnih tanina u vinu. Trend smanjenja koncentracije ukupnih tanina u tretiranim vinima autori objašnjavaju svojstvom ultrazvuka visokih snaga da ubrza reakcije polimerizacije fenolnih komponenti u vinu te postepeno formiranje tanin-tanin i antocijanidin-tanin kompleksa (Boulton, 2001; Jackson, 2008) koji su inače prirodna posljedica procesa starenja vina (Zhang i sur., 2016; Ferraretto i Celotti, 2016). Smanjenje koncentracije ukupnih tanina uzrokuje povećanje stabilnosti boje i smanjenje trpkooće crnih vina, što s obzirom na svoju važnost znatno utječe na konačnu kvalitetu vina.

4.2. REZULTATI ODREĐIVANJA KROMATSKIH KARAKTERISTIKA VINA

4.2.1. Utjecaj ultrazvuka visoke snage na kromatske karakteristike crnog vina

Kromatske karakteristike (L^* , a^* , b^* , C^* , H^*) određene u vinu Cabernet Sauvignon tretiranom ultrazvukom visoke snage s različitim promjerom sonde i amplitude u trajanju od 6 minuta kao i kontrolnog vina Cabernet Sauvignon su prikazane u tablici 4.

Tablica 4. Kromatske karakteristike (L^* , a^* , b^* , C^* , H^*) određene u vinu Cabernet Sauvignon tretiranom ultrazvukom visoke snage (srednja vrijednost \pm standardna devijacija)

Promjer sonde (mm)	Amplituda (%)	Vrijeme obrade (min)	L^*	a^*	b^*	C^*	H^*
	kontrola	kontrola	$18,15 \pm 0,54$	$49,79 \pm 0,82$	$29,49 \pm 0,84$	$57,87 \pm 1,13$	$0,53 \pm 0,00$
12,7	25	6	$16,69 \pm 0,05$	$48,14 \pm 0,06$	$27,40 \pm 0,08$	$55,39 \pm 0,10$	$0,52 \pm 0,00$
	50	6	$16,61 \pm 0,14$	$48,02 \pm 0,18$	$27,27 \pm 0,19$	$55,22 \pm 0,25$	$0,52 \pm 0,00$
	75	6	$16,59 \pm 0,18$	$48,00 \pm 0,25$	$27,25 \pm 0,28$	$55,20 \pm 0,36$	$0,52 \pm 0,00$
	100	6	$16,26 \pm 0,21$	$47,60 \pm 0,44$	$26,78 \pm 0,48$	$54,62 \pm 0,62$	$0,51 \pm 0,00$
19,1	25	6	$16,73 \pm 0,02$	$48,03 \pm 0,06$	$27,32 \pm 0,06$	$56,25 \pm 1,33$	$0,52 \pm 0,00$
	50	6	$16,72 \pm 0,08$	$48,10 \pm 0,17$	$27,40 \pm 0,16$	$55,36 \pm 0,23$	$0,52 \pm 0,00$
	75	6	$16,70 \pm 0,01$	$48,04 \pm 0,00$	$27,36 \pm 0,01$	$55,28 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,00$
	100	6	$16,46 \pm 0,25$	$47,67 \pm 0,41$	$26,96 \pm 0,44$	$54,76 \pm 0,58$	$0,51 \pm 0,00$
25,4	25	6	$18,25 \pm 0,19$	$49,92 \pm 0,26$	$29,63 \pm 0,29$	$58,05 \pm 0,38$	$0,54 \pm 0,00$
	50	6	$18,24 \pm 0,02$	$49,93 \pm 0,04$	$29,60 \pm 0,05$	$58,04 \pm 0,06$	$0,54 \pm 0,00$
	75	6	$18,18 \pm 0,09$	$49,80 \pm 0,12$	$29,45 \pm 0,12$	$57,86 \pm 0,17$	$0,53 \pm 0,00$
	100	6	$18,02 \pm 0,24$	$49,56 \pm 0,37$	$29,20 \pm 0,38$	$57,53 \pm 0,51$	$0,53 \pm 0,00$

L* vrijednost označava koliko je neki uzorak svjetliji (100) ili tamniji (0). Iz tablice 4 na kojoj su prikazane kromatske karakteristike određene u vinu (Cabernet Sauvignon) tretiranom ultrazvukom visoke snage vidljivo je da većina tretiranih uzoraka postaje „tamnija“ (L* vrijednost se smanjuje), naročito primjenom sonde promjera 12,7 i 19,1 mm i povećanjem amplitude. Primjenom sonde promjera 25,4 mm, L* vrijednost se neznatno povećava u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak što znači da tretirani uzorci postaju „svjetliji“. Međutim, sveukupna promjena kromatske karakteristike L* određena u uzorcima tretiranim ultrazvukom visokih snaga uporabom sonde promjera 25,4 mm je zanemariva u odnosu na kontrolni uzorak (netretirani) tj. ista je kao uzorak. Na osnovu toga možemo zaključiti da tretiranje ultrazvukom visoke snage sa primjenom sonde promjera 25,4 mm značajno ne utječe na promjenu parametra boje L*. Naprotiv, primjenom sonde promjera 12,7 i 19,1 mm utječe se na promjenu parametra boje L* i tretirani uzorci postaju statistički „tamniji“.

Parametar a* određuje koliko je neki uzorak nijansom bliže zelenoj (-) ili crvenoj (+) boji. Kod uzoraka tretiranih ultrazvukom visoke snage sa sondom promjera 12,7 i 19,1 mm, parametar a* se smanjuje u odnosu na kontrolni uzorak (netretirani) što znači da se nijansa tretiranog vina približava zelenoj boji. Međutim, sveukupna promjena kromatske karakteristike a* određena u uzorcima tretiranim ultrazvukom visoke snage uporabom sonde promjera 25,4 mm je zanemariva u odnosu na kontrolni uzorak (netretirani) tj. ista je kao uzorak. Na osnovu toga možemo zaključiti da tretiranje ultrazvukom visoke snage primjenom sonde promjera 25,4 mm značajno ne utječe na promjenu parametra boje a*. Naprotiv, primjenom sonde promjera 12,7 i 19,1 mm utječe se na promjenu parametra boje a* čime se nijansa tretiranih uzoraka približava zelenoj boji.

Parametar b* određuje da li je neki uzorak nijansom bliže žutoj (+) ili plavoj (-) boji. Kod uzoraka tretiranih ultrazvukom visoke snage, promjerom sonde 12,7 i 19,1 mm, parametar b* se smanjuje u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak što znači da se nijansa tretiranog vina približava plavoj boji. Međutim, sveukupna promjena kromatske karakteristike b* određena u uzorcima tretiranim ultrazvukom visoke snage uporabom sonde promjera 25,4 mm je zanemariva u odnosu na kontrolni uzorak (netretirani) tj. ista je kao uzorak. Na osnovu toga možemo zaključiti da tretiranje ultrazvukom visoke snage primjenom sonde promjera 25,4 mm značajno ne utječe na promjenu parametra boje b*. Naprotiv, primjenom sonde promjera 12,7 i 19,1 mm utječe se na promjenu parametra boje b* čime se nijansa tretiranih uzoraka približava plavoj boji.

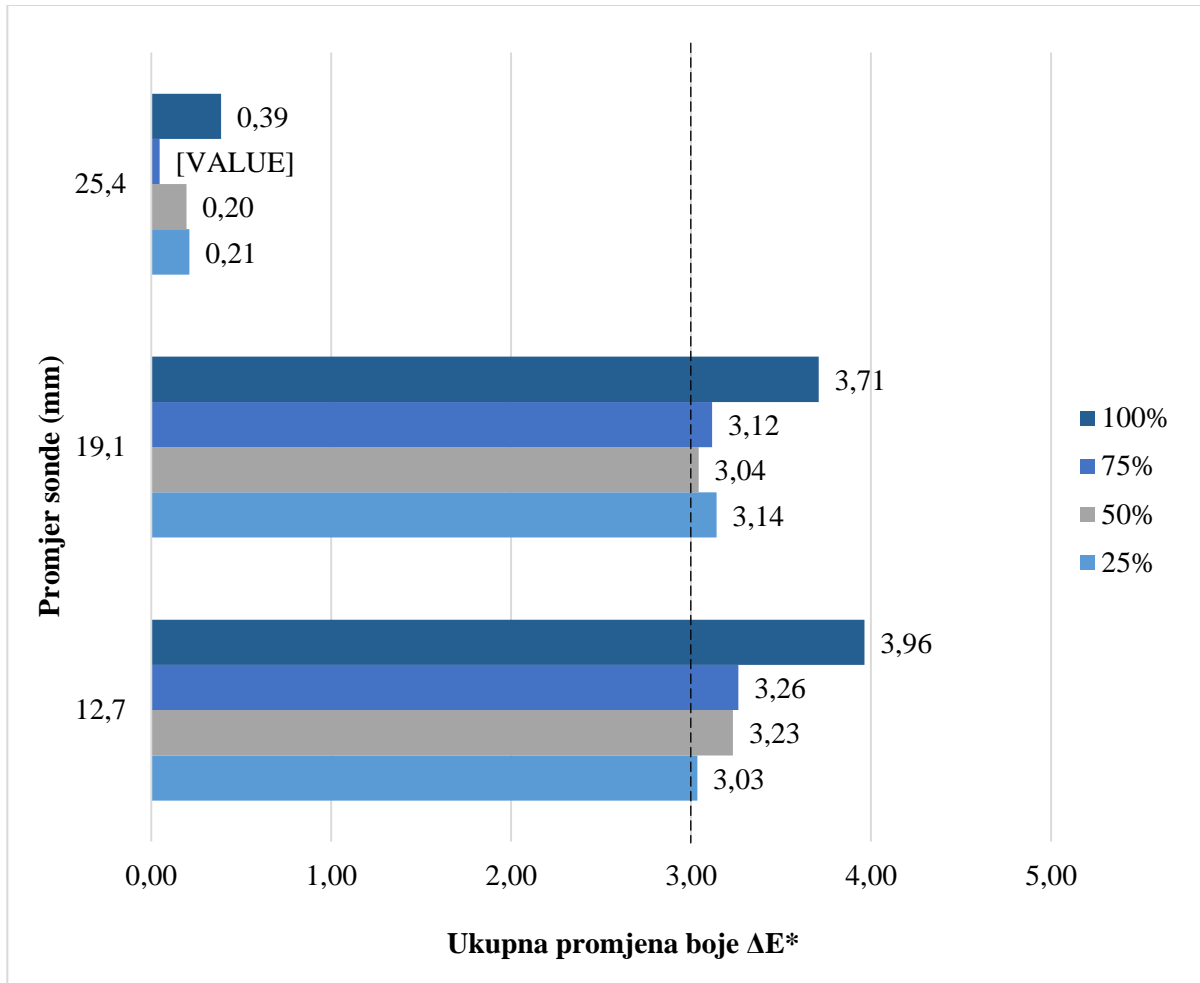
Od svih uzoraka crnog vina obrađenih ultrazvukom visoke snage (tablica 4) najmanje vrijednosti parametara L^* u odnosu na kontrolni uzorak (netretirani) ima uzorak CS₄ (12,7 mm, 100 % amplituda, 6 minuta) znači da je to ujedno i „najtamniji“ uzorak. Uzorak CS₄ također ima najmanje vrijednosti parametara a^* i b^* te s obzirom na vrijednosti i najmanje količine crvene i žute boje. „Najsvjetliji“ su uzorci obrađeni ultrazvukom visoke snage sa sondom promjera 25,4 mm (CS₉ – CS₁₂) te imaju najveće količine crvene (a^*) i žute (b^*) boje.

Iz tablice 4 vidljivo je da se povećanjem amplitude smanjuje kromatičnost (C^*), dok primjena ultrazvuka visoke snage nije pokazala značajniji utjecaj na kut tona boje (H^*) tj. vrijednost je ostala nepromijenjena u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak.

Tablica 5. Razlika parametara boje (ΔL^* , Δa^* , Δb^*) između kontrolnog (netretiranog) uzorka i uzoraka crnog vina (Cabernet Sauvignon) tretiranih ultrazvukom visoke snage

Promjer sonde (mm)	Amplituda (%)	Vrijeme obrade (min)	ΔL^*	Δa^*	Δb^*
12,7	25	6	-1,46	-1,65	-2,09
	50	6	-1,54	-1,77	-2,22
	75	6	-1,56	-1,79	-2,24
	100	6	-1,89	-2,19	-2,71
19,1	25	6	-1,42	-1,76	-2,18
	50	6	-1,43	-1,69	-2,09
	75	6	-1,45	-1,75	-2,13
	100	6	-1,69	-2,12	-2,53
25,4	25	6	0,10	0,13	0,13
	50	6	0,09	0,14	0,11
	75	6	0,03	0,01	-0,04
	100	6	-0,13	-0,23	-0,29

Većina uzoraka imala je negativnu razliku parametara boje ($-\Delta L$, $-\Delta a$, $-\Delta b$) što znači da su nakon obrade ultrazvukom uzorci vina bili tamniji te da imaju veće količine zelene i plave boje u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak. Jedino kod uzoraka vina tretiranih ultrazvukom visoke snage sa sondom promjera 25,4 mm promjena parametara boje bila je zanemariva ili je ista u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak (tablica 5).



Slika 13. Grafički prikaz ukupne promjene boje (ΔE^*) u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon tretmana ultrazvukom visoke snage, različitih amplituda i promjera sondi

Parametar ΔE^* označava ukupnu promjenu boje u uzorku, odnosno odstupanje boje od kontrolnog (netretiranog) uzorka. Iz grafičkog prikaza ukupne promjene boje (Slika 13) isčitavamo da najveću ukupnu promjenu boje imaju uzorci crnog vina ($CS_1 - CS_8$) koji su tretirani ultrazvukom visoke snage sa sondom promjera 12,7 i 19,1 mm od kojih se najviše ističe uzorak CS_4 (12,7 mm, 100 % amplituda, 6 minuta) koji ima najveću ukupnu promjenu boje. Te vrijednosti (>3) prema Schlöpferu (1995) predstavljaju razliku boja koja se dobro vidi. Također se očitava da najmanju ukupnu promjenu boje imaju uzorci crnog vina (Cabernet Sauvignon) tretirani ultrazvukom visoke snage sa sondom promjera 25,4 mm čija se, prema Schlöpferu (1995), razlika boja se ne vidi.

Sveukupno, možemo zaključiti da primjena ultrazvuka visoke snage uzrokuje statistički značajne promjene kromatskih karakteristika (L^* , a^* , b^*) u tretiranim uzorcima koje su se očitovale kroz smanjenje svake od navedenih karakteristika. Najznačajniji učinak ultrazvuka visoke snage postignut je primjenom sonde promjera 12,7 mm, naročito prvi većim amplitudama. Iako je dostupno malo informacija o utjecaju ultrazvuka visoke snage na kromatske karakteristike vina, dobiveni rezultati su u skladu s autorima (Masuzawa i sur., 2000; Zhang i sur., 2016; Ćurko i sur., 2017) koji su proveli istraživanja o utjecaju ultrazvuka visoke snage na kromatske karakteristike vina te pritom zabilježili značajne promjene koje se manifestiraju kroz smanjenje vrijednosti svake od kromatskih karakteristika (L^* , a^* , b^*). Ove promjene se mogu objasniti djelovanjem ultrazvuka visoke snage koji izaziva promjene unutar polifenolnog sastava vina te ubrzava reakcije kopigmentacije između antocijanidina, formirajući pritom nove tvari boje i postepeno nastajanje tanin-tanin i antocijanidin-tanin kompleksa (Boulton, 2001; Jackson, 2008), inače procese koji se manifestiraju u prirodnom procesu starenja i dozrijevanja vina.

U prirodnom procesu starenja vina postiže se određena dubina i stabilnost boje, te se nijansa vina pomiče prema crvenkasto-smećkastim tonovima. Tretiranjem ultrazvukom visoke snage uzrokuje smanjenje koncentracije ukupnih fenola, antocijana i tanina koji prolaze kroz razne i mnoge kemijske promjene nastale uslijed djelovanja kavitacija, što za posljedicu ima stvaranje novih obojenih spojeva koji utječu na percipiranu boju i njenu stabilnost, te samim time i ukupnu kvalitetu vina. Time možemo zaključiti da tretiranje ultrazvukom visoke snage može ubrzati procese starenja i samim time smanjiti potrebno vrijeme za dozrijevanje vina Cabernet Sauvignon.

4.2.2. Utjecaj ultrazvuka visoke snage na kromatske karakteristike bijelog vina

Kromatske karakteristike (L^* , a^* , b^* , C^* , H^*) određene u vinu Graševina tretiranom ultrazvukom visoke snage s različitim promjerom sonde i amplitude u trajanju od 6 minuta kao i kontrolnog vina Graševina su prikazane u tablici 6.

Tablica 6. Kromatske karakteristike (L^* , a^* , b^* , C^* , H^*) određene u vinu Graševina tretiranom ultrazvukom visoke snage (srednja vrijednost \pm standardna devijacija)

Promjer sonde (mm)	Amplituda (%)	Vrijeme obrade (min)	L^*	a^*	b^*	C^*	H^*
	kontrola	kontrola	100,54 \pm 0,32	-1,10 \pm 0,02	4,23 \pm 0,05	4,38 \pm 0,04	-1,32 \pm 0,01
12,7	25	6	98,68 \pm 0,28	-0,87 \pm 0,01	5,63 \pm 0,04	5,70 \pm 0,04	-1,42 \pm 0,00
	50	6	97,99 \pm 0,64	-0,79 \pm 0,06	5,93 \pm 0,11	5,98 \pm 0,10	-1,44 \pm 0,01
	75	6	97,85 \pm 1,92	-0,85 \pm 0,10	5,77 \pm 0,35	5,83 \pm 0,33	-1,42 \pm 0,03
	100	6	97,22 \pm 1,43	-0,80 \pm 0,06	5,88 \pm 0,23	5,93 \pm 0,22	-1,44 \pm 0,02
19,1	25	6	99,54 \pm 0,66	-0,92 \pm 0,05	5,53 \pm 0,25	5,61 \pm 0,23	-1,41 \pm 0,02
	50	6	98,34 \pm 0,16	-0,82 \pm 0,03	5,68 \pm 0,06	5,74 \pm 0,05	-1,43 \pm 0,01
	75	6	98,11 \pm 0,06	-0,84 \pm 0,00	5,82 \pm 0,11	5,63 \pm 0,46	-1,43 \pm 0,00
	100	6	97,92 \pm 0,12	-0,74 \pm 0,04	6,19 \pm 0,30	6,24 \pm 0,30	-1,45 \pm 0,00
25,4	25	6	100,83 \pm 0,14	-1,14 \pm 0,01	4,08 \pm 0,06	4,23 \pm 0,06	-1,30 \pm 0,01
	50	6	100,19 \pm 0,56	-1,12 \pm 0,01	4,22 \pm 0,02	4,36 \pm 0,02	-1,31 \pm 0,00
	75	6	99,21 \pm 1,41	-0,99 \pm 0,19	4,77 \pm 0,87	4,88 \pm 0,81	-1,36 \pm 0,08
	100	6	98,76 \pm 0,36	-0,96 \pm 0,01	5,06 \pm 0,22	5,15 \pm 0,22	-1,38 \pm 0,01

Isti trend smanjenja vrijednosti parametra L^* nastavio se i kod bijelog vina Graševina. Iz tablice 6 na kojoj su prikazane kromatske karakteristike određene u bijelom vinu tretiranom ultrazvukom visoke snage vidljivo je da većina tretiranih uzoraka postaje „tamnija“ naročito primjenom sonde promjera 12,7 i 19,1 mm te povećanjem amplitude. Primjenom sonde promjera 25,4 mm, L^* vrijednost se neznatno povećava ili je ista u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak. Međutim, jedino kod uzorka G_{12} (25,4 mm, 100 % amplituda, 6 minuta) je postignuta nešto značajnije smanjenje parametra L^* . Na osnovu toga možemo zaključiti da tretiranje ultrazvukom visoke snage pri većim amplitudama značajno utječe na promjenu parametra boje L^* te samim time tretirani uzorci postaju statistički „tamniji“.

Parametar a^* određuje koliko je neki uzorak nijansom bliže zelenoj (-) ili crvenoj (+) boji. Kod uzoraka tretiranih ultrazvukom visoke snage, parametar a^* se povećava u odnosu na kontrolni uzorak (netretirani) sa povećanjem amplitude, što znači da nijansa tretiranog vina gubi zelenu boju. Na osnovu toga možemo zaključiti da tretiranje ultrazvukom visoke snage pri većim amplitudama utječe na promjenu parametra boje a^* .

Također, i ovdje se primjenom ultrazvuka visoke snage prvi većim amplitudama, parametar b^* povećava u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak što znači da se nijansa tretiranog vina približava žutoj boji.

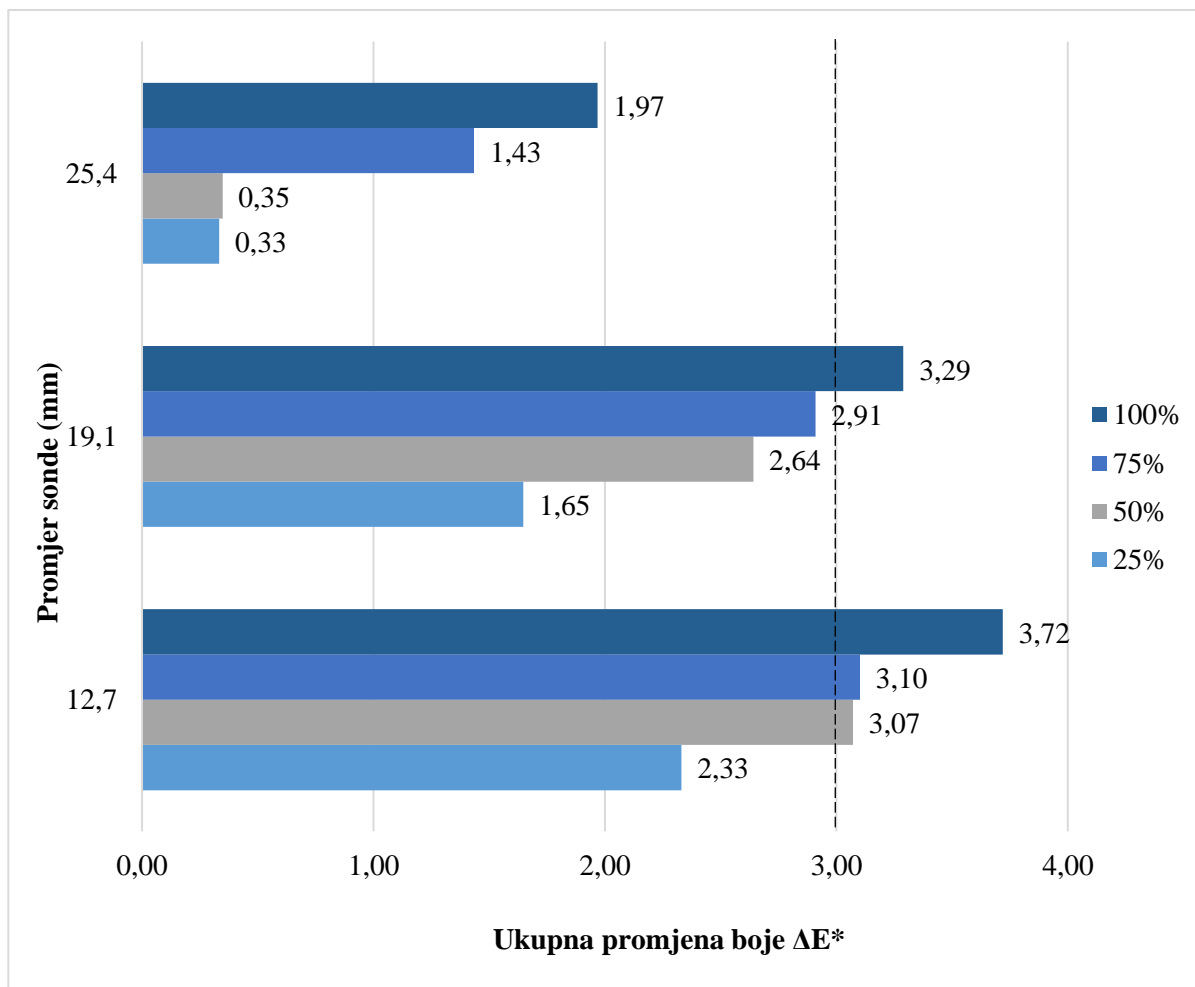
Od svih uzoraka bijelog vina obrađenih ultrazvukom visoke snage (tablica 5) najmanje vrijednosti parametara L^* u odnosu na kontrolni uzorak (netretirani) ima uzorak G_8 (12,7 mm, 100 % amplituda, 6 minuta) znači da je to ujedno i „najtamniji“ uzorak. Uzorak G_8 također ima veće vrijednosti parametara a^* i b^* u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak samim time i veće količine crvene (a^*) i žute (b^*) boje. „Najtamniji“ su uzorci obrađeni ultrazvukom visoke snage sa sondom promjera 19,1 mm ($G_5 - G_9$) te imaju najveće količine crvene (a^*) i žute (b^*) boje.

Iz tablice 6 vidljivo je da se povećanjem amplitude povećava kromatičnost (C^*). Primjena ultrazvuka visoke snage sa sondom promjera 12,7 i 19,1 mm pokazuje blago povećanje kuta tona boje (H^*) za razliku od primjene sonde promjera 25,4 mm gdje značajno ne utječe na promjenu te vrijednosti.

Tablica 7. Razlika parametara boje (ΔL^* , Δa^* , Δb^*) između kontrolnog (netretiranog) uzorka i uzoraka bijelog vina (Graševina) tretiranih ultrazvukom visoke snage

Promjer sonde (mm)	Amplituda (%)	Vrijeme obrade (min)	ΔL^*	Δa^*	Δb^*
12,7	25	6	-1,85	0,23	1,39
	50	6	-2,54	0,32	1,69
	75	6	-2,69	0,26	1,53
	100	6	-3,32	0,31	1,64
19,1	25	6	-1,00	0,19	1,30
	50	6	-2,19	0,28	1,44
	75	6	-2,43	0,27	1,58
	100	6	-2,62	0,37	1,96
25,4	25	6	0,29	-0,04	-0,16
	50	6	-0,35	-0,01	-0,02
	75	6	-1,33	0,11	0,53
	100	6	-1,78	0,14	0,82

Većina uzoraka imala je negativnu razliku parametara boje ($-\Delta L$) što znači da su nakon obrade ultrazvukom uzorci vina (Graševina) bili tamniji. Jedino kod uzoraka vina tretiranih ultrazvukom visoke snage sa sondom promjera 25,4 mm pri nižim amplitudama promjena parametara boje ($-\Delta L$, $-\Delta a$, $-\Delta b$) bila je zanemariva ili je ista u odnosu na kontrolni (netretirani) uzorak (tablica 7).



Slika 14. Grafički prikaz ukupne promjene boje (ΔE^*) u bijelom vinu Graševina nakon tretmana ultrazvukom visoke snage, različitih amplituda i promjera sondi

Parametar ΔE^* označava ukupnu promjenu boje u uzorku, odnosno odstupanje boje od kontrolnog (netretiranog) uzorka. Iz grafičkog prikaza ukupne promjene boje (Slika 14) uočavamo da najveću ukupnu promjenu boje imaju uzorci bijelog vina ($G_1 - G_4$) koji su tretirani ultrazvukom visoke snage sa sondom promjera 12.7 mm od kojih se najviše ističe uzorak G_4 (12,7 mm, 100 % amplituda, 6 minuta) koji ima najveću ukupnu promjenu boje. Te vrijednosti (>3) prema Schlöpferu (1995) predstavljaju razliku boja koja se dobro vidi. Također se uočava da najmanju ukupnu promjenu boje imaju uzorci bijelog vina ($G_9 - G_{12}$) tretirani ultrazvukom visoke snage sa sondom promjera 25,4 mm čija se, prema Schlöpferu (1995), razlika boja primjećuje i vidi.

Sveukupno, možemo zaključiti da primjena ultrazvuka visoke snage uzrokuje statistički značajne promjene kromatskih karakteristika (L^* , a^* , b^*) u tretiranim uzorcima koje su se očitovale kroz smanjenje parametara L^* i a^* te povećanje parametra b^* . Najznačajniji učinak ultrazvuka visoke snage postignut je primjenom sonde promjera 12,7 mm, naročito prvi većim amplitudama. Iako je dostupno malo informacija o utjecaja ultrazvuka visoke snage na kromatske karakteristike vina, dobiveni rezultati su u skladu s autorima (Masuzawa i sur., 2000; Zhang i sur., 2016; Ćurko i sur., 2017) koji su proveli istraživanja o utjecaju ultrazvuka visoke snage na kromatske karakteristike vina. Ove promjene se mogu objasniti djelovanjem ultrazvuka visoke snage ubrzavajući reakcije polimerizacije fenolnih spojeva koje se događaju prirodno u tradicionalnom procesu starenja i dozrijevanja vina. Također, uočena je razlika između utjecaja ultrazvuka s obzirom na promjer primijenjene sonde što naglašava važnost odabira sonde kao jednog od procesnih parametara pri tretiranju ultrazvukom visoke snage.

5. ZAKLJUČAK

Temeljem analize vina Cabernet Sauvignon i Graševina nakon tretmana ultrazvukom visokih snaga različitih promjera sonde (12,7, 19,1 i 25,4 mm) i amplitude (25, 50, 75 i 100 %) u trajanju od 6 minuta može se zaključiti:

1. Tretman ultrazvukom visokih snaga kod svih pokusnih varijanti rezultirao je smanjenjem koncentracije ukupnih fenola u crnom vinu (Cabernet Sauvignon) i bijelom vinu (Graševina)
2. Tretman ultrazvukom visokih snaga kod svih pokusnih varijanti rezultirao je smanjenjem koncentracije ukupnih antocijana i ukupnih tanina u crnom vinu (Cabernet Sauvignon), naročito pri većim amplitudama
3. Tretman ultrazvukom visokih snaga pri primijenjenim procesnim parametrima utjecao je na kromatske karakteristike crnog (Cabernet Sauvignon) i bijelog (Graševina) vina, naročito pri većim amplitudama
4. Tretman ultrazvukom visokih snaga utječe na kemijski sastav tretiranih vina induciranjem kemijskih reakcija koje doprinose starenju vina
5. Intenzitet kemijskih promjena izazvanih ultrazvukom visokih snaga ovisi o primijenjenim procesnim parametrima
6. Pri korištenju manjih promjera sonde i većih amplituda ultrazvuka visokih snaga povećava se intenzitet nastalih kemijskih promjena unutar ispitivanog sustava
7. Od svih procesnih parametara, najviše je utjecao odabir promjera sonde
8. Tretiranje ultrazvukom visokih snaga može pridonijeti ubrzavanju procesa starenja vina, ako se koriste optimalni procesni parametri

6. LITERATURA

Alén-Ruiz, F., García-Falcón, M.S., Pérez-Lamela, M.C., Martínez-Carballo, E., Simal Gándara, J. (2009) Influence of major polyphenols on antioxidant activity in Mencía and Brancellao red wines. *Food Chem.* **113**, 53-60.

Amrani-Joutei, K. (1993) Thèse de Doctorat Oenologie-Ampélogie, Université de Bordeaux II.

Bakker, J., Timberlake, C.F. (1997) Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *J. Agr. Food Chem.* **45** (1), 35-43.

Başlar, M., Ertugay, M.F. (2013) The effect of ultrasound and photosonation treatment on polyphenoloxidase (PPO) activity, total phenolic component and colour of apple juice. *Int. J. Food Sci. Tech.* **48**, 886-892.

Boulton, R. (2001) The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *Am. J. Enol. Viticult.* **52**, 67-87.

Brnčić, M., Tripalo, B., Penava, A., Karlović, D., Ježek, D., Vikić Topić, D., Karlović, S., Bosiljkov, T. (2009) Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, **4** (1-2), 32-37.

Brnčić, Mladen (2006) Utjecaj ultrazvuka na svojstva sirovine za ekstruziju i gotovog ekstrudiranog proizvoda. Doktorska disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Brouillard, R. (1982) Chemical structure of anthocyanins. U: Anthocyanins as Food Colors, (Markakis, P., ured.), Academic Press, New York, str. 1-38.

Butz, P., Tauscher, B. (2002) Emerging technologies: chemical aspects. *Food Res. Int.* **35** (2-3), 279-284.

Cameron, M., McMaster, L.D., Britz, T.J. (2009) Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. *Dairy Sci. Technol.* **1**, 83-89.

Canselier, J.P., Delmas, H., Wilhelm, A.M., Abismail, B. (2002) Ultrasound emulsification - an overview. *J. Disper. Sci. Technol.* **23** (1-3), 333-349.

Chang, A.C. (2005) Study of ultrasonic wave treatments for accelerating the aging process in a rice alcoholic beverage. *Food Chem.* **92**, 337–342.

Chang, A.C., Chen F.C. (2002) The application of 20 kHz ultrasonic waves to accelerate the aging of different wines. *Food Chem.* **79**, 501–506.

Chatonnet, P., Dubourdieu, D. (1998) Comparative study of the characteristic of American white oak and European oak for production of barrels used in barrel aging of wines. *Am. J. Enol. Viticult.* **49**, 79-85.

Cheynier, V., Rigaud, J. (1986) HPLC separation and characterization of flavonols in the skin of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *Am. J. Enol. Vitic.* **37**, 248-252

Ciccolini, L., Taillandier, P., Wilhem, A.M., Delmas, H., Strehaiano, P. (1997) Low frequency thermo-ultrasonication of *saccharomyces cerevisiae* suspensions: Effect of temperature and ultrasonic power. *Chem. Eng. J.* **65** (2), 145-149.

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

Ćurko, N., Kelšin, K., Režek Jambrak, A., Tomašević, M., Gracin, L., Poturica, V., Ružman, E., Kovačević Ganić, K. (2017) The effect of high power ultrasound on phenolic composition, chromatic characteristics, and aroma compounds of red wines. *Croatian journal of food science and technology.* **9**, 136-144.

De Beer, D., Joubert E., Gelderblom W.C.A., Manley M. (2002) Phenolic compounds: A review of their possible role as in vivo antioxidants of wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **23**, 48-71.

De la Fuente-Blanco, S., De Sarabia, E.R.F., Acosta-Aparicio, V.M., Blanco-Blanco, A., Gallego-Juárez, J.A. (2006) Food drying process by power ultrasound. *Ultrasonics*, **44**, 523-527.

Demirdöven, A., Baysal, T. (2009) The use of Ultrasound and Combined Technologies in Food Preservation, *Food Rev. Int.* **25**, 1-11.

Dolatowski, Z.J., Stadnik, J., Stasiak, D. (2007) Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **6** (3), 88-99.

Doll, R. (1990) An overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer, *Proc. Nutr. Soc.* **49**, 119-131.

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

Ferraretto, P., Celotti, E. (2016): Preliminary study of the effects of ultrasound on red wine polyphenols. *CyTA–J. Food*, **14** (4), 1-7.

Frenkel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E., Kinsella, J.E. (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*, **341**, 454-457.

Fuchs, F.J. (1999) Ultrasonic cleaning: fundamental theory and application. Applications Engineering, Blackstone-Ney Ultrasonics Inc., Jamestown, New York, USA.

García Martín, J.F., Sun, D-W. (2013) Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state-of-the-art research. *Trends Food Sci. Tech.* **33**, 40–53.

García Martín, J.F., Guillemet, L., Feng, C., Sun, D-W. (2013) Cell viability and proteins release during ultrasound-assisted yeast lysis of light lees in model wine. *Food Chem.* **141**, 934–939.

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

Gawel, R., Iland, P.G., Francis, I.L. (2001) Characterizing the astringency of red wine: a case study. *Food Qual. Prefer.* **12**, 83-94.

Gey, K. (1990) The antioxidant hypothesis of cardiovascular-disease: epidemiology and mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* **18**, 1041-1045.

González-San José, M., Santa María, G., Diez, C. (1990) Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region and wine-making methods. *J. Food Comp. Anal.* **3**, 54-66.

- 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.
- Gracin, L., Režek Jambrak, A., Juretić, H., Dobrović, S., Barukčić, I. Grozdanović, M., Smoljanić, G. (2016) Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Appl. Acoust.* **103**, 143-147.
- Harborne, J.B. (1994) The flavonoids. Advances in research since 1986. Chapman & Hall, London.
- Haslam, E. (1998) Practical polyphenols: from structure to molecular recognition and physiological action, Cambridge University Press, New York.
- Herceg, Z. (2009) Procesi konzerviranja hrane – novi postupci. Golden marketing – Tehnička knjiga, Zagreb, str. 53-60.
- Jackson, R.S. (2008) Wine science – principles, practice, perception, 2. izd., Academic Press, San Diego, USA.
- Jiranek, V., Grbin, P., Yap, A., Barnes, M., Bates, D. (2008) High power ultrasonics as a novel tool offering new opportunities for managing wine microbiology. *Biotechnol. Lett.* **30** (1), 1-6.
- Kim, S.M., Zayas, J.F. (1991) Effects of Ultrasound Treatment on the Properties of Chymosin. *J Food Sci.* **56**, 926-930.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., Lee, D.U. (2004) Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends Food Sci. Tech.* **15**, 261-266.
- Kuijpers, W.A., van Eck, D., Kemmere, M.F., Keurentjes, J.T.F. (2002) Cavitation-induced reactions in high-pressure carbon dioxide, *Science*, **298** (5600), 1969-1971.
- 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.

- Leadley, C.E., Williams, A. (2006) Pulsed electric field processing, power ultrasound and other emerging technologies. Food processing handbook, (Brennan, J.G., ured.), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 214-232.
- Li, B., Sun, D-W. (2002) Effect of power ultrasound on freezing rate during immersion freezing. *J. Food Eng.* **55** (3), 277-282.
- Lima, M., Sastry, S. K. (1990) Influence of fluid rheological properties and particle location on ultrasound-assisted heat transfer between liquids and particles. *J Food Sci.* **55**, 1112-1115.
- Martinez, M.V., Whitaker, J.R. (1995) The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 195-200.
- Mason, T.J. (1998) Power ultrasound in food processing – the way forward. U: Ultrasound in Food Processing. (Povey, M.J.W. i Mason, T.J. ured.), Blackie Academic & Professional: London.
- Masuzawa, N., Ohdaira, E., Ide, M. (2000) Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine. *Jpn. J. Appl. Phys.* **39**, 2978–2979.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis P., Girard B., Ewert B. (1999) Anthocyanins, phenolics and color of Cabernet Franc, Merlot and Pinot Noir wines from British Columbia. *J. Agric. Food. Chem.* **47** (10), 4009-4017.
- McClements, D.J., (1995) Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 293–299.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo M.C. (2009) Wine chemistry and biochemistry. Springer science, Business media, LLC, New York, USA.
- Muthukumar, S., Kentish, S.E., Stevens, G.W., Ashokkumar, M. (2006) Application of ultrasound in membrane separation processes: a review. *Rev. Chem. Eng.* **22** (3), 155-194.
- OIV, 2006, Method OIV-MA-AS2-11, Determination of chromatic characteristics according to CIELab. Compendium of International Analysis of Methods, R2006.

Patist, A., Bates, D. (2008) Ultrasonic innovations in the food industry: from the laboratory to commercial production. *Innov. Food Sci. Emerg.* **9**, 147–154.

Phull, S.S., Newman, A.P., Lormier, J.P., Pollet, B., Mason, T.J. (1997) The development and evaluation of ultrasound in the biocidal treatment of water. *Ultrason. Sonochem.* **4**, 157-164.

Pitt, W.G., Ross, S.A. (2003) Ultrasound increases the rate of bacterial cell growth. *Biotechnol. Progr.* **19** (3), 1038-1044.

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.

Režek Jambrak, Anet (2008) Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke. Doktorska disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Režek Jambrak, A., Lelas, V., Herceg, Z., Badanjak, M., Batur, V., Muža, M. (2009) Prednosti i nedostaci primjene ultrazvuka visoke snage u mljekarskoj industriji, *Mljekarstvo* **59** (4), 267-281.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A. (2003) Handbook of enology Volume 1- The microbiology of Wine and Vinifications, John & Sons, LTD, Chichester/New York/Weinheim/Brisbane/Singapore/Toronto, str. 129-183.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, J., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2006) Handbook of enology Vol. 2, The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments, 2. Izd., John Wiley & Sons, Chichester, England.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., (2004) Handbook of enology, The chemistry of wine, stabilization and treatments, John Wiley & sons, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.

Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1965) Determination of anthocyanins in red wine. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **9**, 2642–2659.

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

Rigo, A., Vianello F., Clementi G., Rossetto M., Scarpa M., Vrhovšek U., Mattivi F. (2000) Contribution of proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 1996-2002.

Sala, F.J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J. (1995) Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. U: *New Methods of Food Preservation*. (Could, G.W. ured.), Blackie Academic & Professional: London.

Sastry, S.K., Shen, G.Q., Blaisdell, J.L. (1989) Effect of ultrasonic vibration on fluid-to-particle convective heat transfer coefficients. *J. Food Sci.* **54**, 229.

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

Senapati, N. (1991) *Ultrasound in Chemical Processing. Advances in Sonochemistry 2*, JAI Press, London.

Shin, S.Y., Calvisi, E.G., Beaman, T.C., Pankratz, H.S., Gerhardt, P., Marquis, R. E. (1994) Microscopic and thermal characterisation of hydrogen peroxide killing and lysis of spores and protection by transition metal ions, chelators and antioxidants, *Appl. Environ. Microb.* **60**, 3192-3197.

Singleton, V.L. (1992) Tannins and the qualities of wines. U: *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance*, (Hamigway, R.W., Laks, P.E., ured.), Plenum press, New York, str. 859-880.

Singleton, V.L., Rossi, J. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-147.

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

Somers, T.C. (1982) Pigment phenomena - From grapes to wine. U: *Grape Wine Centennial Symposium Proceedings*, (Webb, A.D., ured.), University of California, Davis, str. 254-257.

Somers, T.C., Vérette, E. (1988) Phenolic composition of natural wine types. U: *Wine Analysis*, (Linskens, H.F., Jackson, J.F., ured.), Springer-Verlag, Berlin, str. 219-257.

- Sun, S.Y., Jiang, W.G., Zhao, Y.P. (2011) Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains on the profile of volatile compounds and polyphenols in cherry wines. *Food Chem.* **127**, 547-555.
- Suslick, K.S. (1989) The Chemical Effects of Ultrasound. *Sci. Am.* 80-86.
- Thakur, B.R., Nelson, P.E. (1997) Inactivation of lipoxygenase in whole soy flour suspension by ultrasonic cavitation. *Die Nahrung*, **41**, 299.
- Uchida, S., Edamatsu, R., Hiramatsu, M., Mori, A., Nonaka, G.I., Nishioka, I., Niwa, M., Ozaki, M. (1987) Condensed tannins scavenge active oxygen radicals. *Med. Sci. Res.* **15**, 831-832.
- Vercet, A., Lopez, P., Burgos, J. (1997) Inactivation of heat-resistant lipase and protease from *Pseudomonas fluorescens* by manothermosonication. *J. Dairy Sci.* **80**, 29.
- Vermerris, W., Nicholson, R. (2006) Phenolic compound biochemistry, Springer, Dordrecht.
- Villamiel, M., de Jong, P. (2000) Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins and native enzymes of milk. *Ag. Food Chem.* **48**, 472-478.
- Vivas, N.G., Nonier, M-F., Guerra, C., Vivas, N. (2001) Anthocyanin in grape skins during maturation of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon and Merlot Noir from different bordeaux terroirs. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **35**, 149-156.
- Wambura, P., Yang, W., Mwakatage, N., Herring, J.L. (2010) Removal of lipid from surfaces of roasted peanuts by sonication as assessed by fluorescence and scanning electron microscopy. *J. Food Process Eng.* **33** (5), 837-847.
- Yap, A., Jiranek, V., Grbin, P., Barnes, M., Bates, D. (2007) Studies on the application of high-power ultrasonics for barrel and plank cleaning and disinfection. *Aus. Wine Ind. J.* **22**, 96-104.
- Yao, L.H., Jiang, Y.M., Shi, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., and Chen, S.S. (2004) Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Food Hum. Nut.* **59**, 113-122.

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

IZJAVA O IZVORNOSTI

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

Ime i prezime studenta