

# Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja na sastav polifenolnih i hlapivih spojeva vina tijekom starenja

---

**Jurković, Marija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:381327>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-19**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

Marija Jurković

1085/PI

**UTJECAJ VISOKONAPONSKOG  
ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA NA  
SASTAV POLIFENOLNIH I  
HLAPIVIH SPOJEVA VINA  
TIJEKOM STARENJA**

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

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

## **ZAHVALA**

*Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Natki Ćurko i asistentici Katarini Lukić mag. inž. na pomoći i strpljenju prilikom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem se svojim prijateljicama koje su uvijek bile tu, kad se plakalo i smijalo (C. N.∞).*

*Mom D. posebno hvala na velikoj podršci i ljubavi.*

*Ovaj rad posvećujem svojim roditeljima i ovim putem im posebno želim zahvaliti na bezuvjetnoj ljubavi i podršci.*

*Želim se zahvaliti cijeloj svojoj obitelji, mojoj sestri i braći i svima koji su bili uz mene i učinili ovo razdoblje moga života posebnim.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

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

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

### UTJECAJ VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNENJA NA SASTAV POLIFENOLNIH I HLAPIVIH SPOJEVA VINA TIJEKOM STARENJA

*Marija Jurković, 1085/PI*

**Sažetak:** Cilj ovog rada je bio utvrditi utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa (standardna koncentracija SO<sub>2</sub>, snižena koncentracija SO<sub>2</sub> uz dodatak glutaciona i snižena koncentracija SO<sub>2</sub>) na sastav polifenolnih i hlapivih spojeva nakon 12 mjeseci starenja bijelog vina Graševina i crnog vina Cabernet Sauvignon. Za tretman vina hladnom plazmom korištena je tekućinska hladna plazma generirana pulsним visokonaponskim generatorom uz upuhivanje mjehurića plina argona pri pozitivnom polaritetu. Koncentracija ukupnih fenola, tanina i antocijana određena je primjenom spektrofotometrijskih metoda. Sastav slobodnih antocijana, fenolnih kiselina i flavanola određen je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Sastav hlapivih spojeva vina određen je primjenom plinske kromatografije s masenom detekcijom (GC/MS) uz prethodnu mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME). Tretman visokonaponskim električnim pražnjenjem utjecao je na blago smanjenje koncentracije polifenolnih i hlapivih spojeva u bijelom vinu. S druge strane, navedeni tretman u crnom vinu utjecao je na značajno smanjenje polifenolnih spojeva te porast koncentracije hlapivih spojeva u vinima sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub>. Dodatak antioksidansa u vino utjecao je na stabilnost analiziranih polifenolnih spojeva.

**Ključne riječi:** vino, visokonaponsko električno pražnjenje, polifenolni spojevi, antioksidansi, aroma

**Rad sadrži:** 46 stranica, 5 slika, 7 tablica, 59 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:** doc. dr. sc. Natka Ćurko

**Pomoć pri izradi:** Katarina Lukić, mag. inž.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. Doc. dr. sc. Tomislava Vukušić
2. Doc. dr. sc. Natka Ćurko
3. Doc. dr. sc. Marina Tomašević
4. Prof. dr. sc. Zoran Herceg (zamjena)

**Datum obrane:** 30. rujna 2019.

## 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  
Laboratory for Process Food Engineering

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Food Technology

### INFLUENCE OF HIGH VOLTAGE ELECTRICAL DISCHARGE ON THE COMPOSITION OF POLYPHENOLIC AND VOLATILE COMPOUNDS OF WINE DURING AGING

*Marija Jurković, 1085/PI*

**Abstract:** The aim of this study was to determine the effect of high voltage electrical discharge and antioxidant addition (standard SO<sub>2</sub> concentration, reduced SO<sub>2</sub> concentration with glutathione addition and reduced SO<sub>2</sub> concentration) on the composition of polyphenolic and volatile compounds of Graševina and Cabernet Sauvignon wine after 12 months of aging. Liquid cold plasma generated by a pulse high-voltage generator was used for the treatment of cold plasma wine with blowing argon gas bubbles at positive polarity. The concentration of total phenols, tannins and anthocyanins was determined using spectrophotometric methods. The composition of free anthocyanins, phenolic acids and flavanols was determined using high performance liquid chromatography (HPLC). The composition of the volatile compounds of the wine was determined using gas chromatography with mass detection (GC/MS) with previous solid phase microextraction (SPME). Treatment with high voltage electrical discharge resulted in a slight decrease in the concentration of polyphenolic and volatile compounds in white wine. On the other hand, the mentioned treatment in red wine resulted in a significant decrease in polyphenolic compounds and an increase in the concentration of volatile compounds in wines with reduced SO<sub>2</sub> concentration. The addition of antioxidants to wine contributed to the stability of the analyzed polyphenolic compounds.

**Keywords:** wine, high voltage electrical discharge, polyphenols, antioxidants, aroma

**Thesis contains:** 46 pages, 5 figures, 7 tables, 59 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:** *PhD. Natka Ćurko, Assistant professor*

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

#### **Reviewers:**

1. PhD. *Tomislava Vukušić*, Assistant professor
2. PhD. *Natka Ćurko*, Assistant professor
3. PhD. *Marina Tomašević*, Assistant professor
4. PhD. *Zoran Herceg*, Full professor (substitute)

**Thesis defended:** 30<sup>th</sup> September 2019.

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
2.1. Fenolni spojevi .....	2
2.1.1. Podjela fenolnih spojeva .....	2
2.1.2. Neflavonoidi.....	3
2.1.3. Flavonoidi .....	4
2.1.4. Promjene polifenolnog sastava tijekom dozrijevanja i starenja vina.....	5
2.2. Aroma vina.....	6
2.2.1. Primarna aroma - sortna aroma .....	6
2.2.2. Sekundarna aroma - fermentacijska aroma .....	6
2.2.3. Tercijarna aroma - aroma starenja.....	8
2.3. Dodatak antioksidanasa u vino.....	9
2.3.1. Sumporov dioksid (SO <sub>2</sub> ) .....	9
2.3.2. Glutation.....	10
2.4. Visokonaponsko električno pražnjenje .....	12
2.4.1. Vrste sustava za proizvodnju plazme i podjela plazmi.....	13
2.4.2. Primjena visokonaponskog električnog pražnjenja – hladne plazme u prehrambenoj industriji.....	13
2.4.3. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja – hladne plazme na sokove .....	14
2.4.4. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja – hladne plazme na vino .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	16
3.1. Uzorci vina.....	16
3.1.1. Kemikalije.....	16
3.1.2. Aparatura i pribor .....	17
3.2. Metode .....	19
3.2.1. Priprema vina za tretiranje .....	19
3.2.2. Tretman vina hladnom plazmom (NTP) .....	19
3.2.3. Punjenje vina u boce i stavljanje na starenje .....	19
3.2.4. Određivanje ukupnih fenola u bijelom i crnom vinu.....	20
3.2.5. Određivanje ukupnih tanina u crnom vinu .....	21
3.2.6. Određivanje ukupnih antocijana u crnom vinu .....	22
3.2.7. Određivanja fenolnih kiselina i flavanola u bijelom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....	23
3.2.8. Određivanje slobodnih antocijana u crnom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....	24
3.2.9. Određivanje hlapivih spojeva u bijelom i crnom vinu plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME – GC/MS).....	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	28
4.1. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodataka antioksidansa na sastav polifenolnih spojeva vina.....	29
4.1.1. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodataka antioksidansa na sastav polifenolnih spojeva u bijelom vinu Graševina .....	29
4.1.2. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodataka antioksidansa na sastav polifenolnih spojeva u crnom vinu Cabernet Sauvignon.....	32
4.2. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodataka antioksidansa na sastav hlapivih spojeva vina .....	35
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	40
<b>6. LITERATURA</b> .....	41



# 1. UVOD

Visokonaponsko električno pražnjenje (hladna plazma) je jedna od modernih netoplinskih tehnika obrade hrane koja je privukla mnogo pozornosti tijekom posljednjeg desetljeća i čija je primjena postala sve popularnija. Plazma se uz krutine, tekućine i plinove smatra četvrtim agregatnim stanjem. Opisuje se kao djelomično ili potpuno ionizirani plin s karakterističnim električnim, kemijskim i fizikalnim svojstvima. Plazma se u laboratoriju najčešće dobiva visokonaponskim električnim pražnjenjem.

U samim počecima hladna plazma se pokazala iznimno učinkovitom za sterilizaciju osjetljivih materijala. Međutim ponašala je ubrzo svoju upotrebu u raznim aspektima prehrambene industrije. Koristi se za dezinfekciju vode pomoću ozona, osim toga pokazala se učinkovita za inaktiviranje enzima odgovornih za posmeđivanje, te za pripremu modificiranog škroba. Kao nova netoplinska tehnika koja je ekološki prihvatljiva pokazala je pozitivne učinke za pasterizaciju voćnih sokova i ekstrakciju fenolnih spojeva. Mogućnosti primjene visokonaponskog električnog pražnjenja u enologiji, te dugoročni učinci ove tehnologije na samu kvalitetu kako bijelih tako i crnih vina nisu istraženi.

Cilj ovog rada je ispitati dugoročni utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antoksidansa, sumporovog dioksida i glutaciona, na kvalitetu bijelog vina Graševina te crnog vina Cabernet Sauvignon. Promjene u sastavu fenolnih spojeva te hlapivih spojeva arome vina tretiranih optimalnim parametrima hladne plazme istražiti će se nakon 12 mjeseci starenja vina u bocama, pri čemu će se ispitati vino sa standardnom koncentracijom  $\text{SO}_2$ , sniženom koncentracijom  $\text{SO}_2$  i dodatkom glutaciona te sniženom koncentracijom  $\text{SO}_2$ . Rezultati ovog diplomskog rada dati će spoznaje o mogućnostima proizvodnje vina sa smanjenom koncentracijom  $\text{SO}_2$  uz što bolje očuvanje kvalitete vina djelovanjem visokonaponskog električnog pražnjenja.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi imaju veoma važnu ulogu u enologiji, obzirom da su ovi spojevi nositelji senzorskih svojstava, boje, okusa i trpkocće vina (Lee i Jaworsky, 1987). Ove molekule potječu iz različitih dijelova grožđa i ekstrahiraju se tijekom proizvodnje vina, a važne su i kao antioksidansi koji utječu pozitivno na ljudsko zdravlje i djeluju u prevenciji kardiovaskularnih bolesti (Ribéreau-Gayon i sur., 2000). Strukturu polifenolnih spojeva čine aromatske jezgre čija je reaktivnost najčešće posljedica položaja hidroksilnih skupina na njihovim aromatskim jezgrama. Primjerice, *o*-hidroksilne skupine potiču oksidaciju, dok *m*-hidroksilne skupine induciraju elektrofilnu aromatsku supstituciju (Fulcrand i sur., 2006).

Fenolni spojevi u vinu mogu biti različitog podrijetla (Ribéreau-Gayon i sur., 2006): (i) fenolni spojevi prirodno prisutni u grožđu; (ii) fenolni spojevi nastali enzimskim ili neenzimskim promjena tijekom proizvodnje vina; (iii) spojevi ekstrahirani iz neposredne okoline mošta i vina, a posebice u kontaktu s drvenom bačvom (gdje se male molekule, jednostavni fenoli - hlapivi ili nehlapivi te određeni flavonoidi i hidrolizirani tanini mogu postupno ekstrahirati iz drveta i izmijeniti početni sastav); (iv) spojevi nastali tijekom starenja vina gdje dolazi do progresivnog smanjenja koncentracije pojedinih polifenolnih spojeva (primjerice antocijana u crnim vinima) i stvaranja novih molekula (primjerice kompleksa antocijana i tanina) (Macheix i sur., 1990).

#### 2.1.1. Podjela fenolnih spojeva

Fenolni spojevi u vinu se dijele na dvije osnovne grupe: flavonoidi i neflavonoidi (Ribéreau-Gayon i sur., 2006). Neflavonoidi su strukturno mnogo jednostavniji od flavonoida te sadrže jedan fenolni prsten, ali je njihovo podrijetlo kompleksnije (Jackson, 2008). Neflavonoidni fenolni sastojci u vinu podijeljeni su na fenolne kiseline (hidroksibenzojevu i hidroksicimetnu kiselinu), hlapive fenole, stilbene i razne spojeve (npr. lignin). Flavonoidi su građeni od dva fenolna prstena međusobno povezana lancem od tri ugljikova atoma (Ribéreau-Gayon i sur., 2000; Jackson, 2008). Osnovni predstavnici flavonoida u grožđu i vinu su flavan-3-oli, antocijani i flavonoli (Ribéreau-Gayon i sur., 2000; Jackson, 2008).

### 2.1.2. Neflavonoidi

Iako nisu obojeni, poznato je da neflavonoidi pojačavaju i stabiliziraju boju crnih vina. Nadalje, mogu pridonijeti okusu vina, a neki od njih (npr. resveratrol) pokazuju snažne biološke aktivnosti (Rentzsch i sur., 2007). U vinu koje nije dozrijevalo u drvenim bačvama primarni neflavonoidi su derivati hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline. Ovi spojevi u grožđu su smješteni u staničnim vakuolama pokožice i pulpe, odakle se u vino ekstrahiraju maceracijom i prešanjem.

Hidroksibenzojeva kiselina nastaje iz benzojeve kiseline, te je karakterizira C6-C1 kostur. Kiseline kao što su galna, *p*-hidroksibenzojeva kiselina, protokatehinska, vanilinska, siringinska kiselina spadaju u skupinu hidroksibenzojevih kiselina, među kojima je u vinu najzastupljenija galna kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline pokazuju veliku varijabilnost ovisno o sorti grožđa i uvjetima rasta (Moreno-Arribas i Polo, 2009), tako je primjerice koncentracija derivata hidroksibenzojevih kiselina veća u vinima koja su dozrijevala u drvenim bačvama (Monagas i sur., 2005). U grožđu su prisutni u obliku glukozida i estera, dok su u vinu najčešće prisutni u slobodnom obliku (Ribéreau-Gayon i sur., 2000).

Hidroksicimetne kiseline najčešće nalazimo estetski vezane s vinskom kiselinom, međutim ovi spojevi mogu biti vezani sa šećerima i drugim kiselinama organskog podrijetla (Jackson, 2008). Nadalje, *p*-kumarinska, ferulinska i kafeinska kiselina su tri najzastupljenije hidroksicimetne kiseline u grožđu i vinu. Također, iako su hidroksicimetne kiseline u grožđu i vinu zastupljenije od hidroksibenzojevih kiselina, one su istovremeno i nestabilnije (Jackson, 2008). Koncentracija ukupnih hidroksicinamata u bijelom vinu obično iznosi oko 130 mg L<sup>-1</sup>, a u crnom 60 mg L<sup>-1</sup> (Waterhouse, 2002).

Stilbeni su neflavonoidi koji sadrže 1,2-difeniletan kao funkcionalnu skupinu. Najpoznatiji predstavnik ove skupine polifenola je resveratrol (3,5,4'-trihidroksistilben), koji postoji u dva stereoizomerna oblika: *cis*-(Z) i *trans*-(Z). Stilbeni imaju pozitivan učinak na ljudsko zdravlje zahvaljujući svom antikancerogenom, antimutagenom i antioksidativnom potencijalu (Moreno-Arribas i Polo, 2009). Hidroksilirani stilbeni pronađeni su kao glikozidi u grožđu i nekolicini drugih prehrambenih izvora. Proizvodi ih vinova loza u svim tkivima kao odgovor na stres, napad gljivica (poput *Botrytis cinera*) ili UV zračenje (Waterhouse, 2002). Njegova je koncentracija do deset puta veća u crnim (oko 5 mg L<sup>-1</sup>) u odnosu na bijela vina, te je odgovoran za smanjenje rizika raznovrsnih oboljenja, a ponajviše

kardiovaskularnih bolesti. Mehanizam djelovanja resveratrola nije još do kraja objašnjen (Wenzel i Somoza, 2005).

### 2.1.3. Flavonoidi

Flavonoidi karakteriziraju prvenstveno crna vina, za razliku od bijelih vina gdje dominiraju ne flavonoidi (Jackson, 2008). U crnim vinima flavonoidi čine više od 85 % fenolnih komponenti, dok u bijelim vinima čine manje od 20 % ukupnih fenola. U grožđu se flavonoidi primarno sintetiziraju u pokožici i sjemenkama, a također u malim količinama nalazimo ih i u stabljici (Bourzeix i sur., 1986). Koncentracija flavonoida u vinu ovisi u prvom redu o sastavu grožđa (sorta, klimatski uvjeti, zrelost), a također i samoj tehnologiji proizvodnje te brojnim čimbenicima kao što su pH, koncentraciji sumporovog dioksida, koncentracija etanola, kao i o trajanju i temperaturi fermentacije (Jackson, 2008).

Antocijani su pigmenti prisutni u crvenom, plavom i ljubičastom voću i cvijeću (Jackson, 2008). Glavni izvori crvene boje vina, a u grožđu se nalaze u pokožici, odakle se ekstrahiraju u vino (Monagas i Bartolome, 2009). Crvena boja antocijana potječe od malog dijela antocijana koji se nalaze u flavilijum formi (Jackson, 2008). Struktura flavilijum kationa uključuje dva benzenska prstena povezana s nezasićenim kationom, oksidirani heterocikl, izveden iz 2-fenil-benzopirilijeve jezgre. Antocijane klasificiramo prema poziciji hidroksilne i metilne grupe na B prstenu antocijana u 5 grupa: cijanidin, delfidin, malvidin, peonidin i petunidin (Jackson, 2008; Moreno-Arribas i Polo, 2009). Navedeni spojevi stabilniji su u obliku glikozida (antocijan) nego u obliku aglikona (antocijanidin) (Ribereau-Gayon i sur., 2006). Slobodni antocijani su izrazito reaktivni, a polimerizacija s taninima tijekom proizvodnje i dozrijevanja vina ključna je za stabilnost boje budući da štiti molekule antocijana od oksidacije i drugih kemijskih reakcija poput sulfidne dekoloracije (Jackson, 2008). Slobodni SO<sub>2</sub> i pH vrijednost imaju utjecaj na boju crnih vina (Jackson, 2008; Ribereau-Gayon i sur., 2006), kao i molekularna struktura te okolina (Ribereau-Gayon i sur., 2006). Najzastupljeniji slobodni antocijan u grožđu i vinu je malvidin monoglukozid, koji čini osnovu boje crnog grožđa i vina (Kennedy, 2008) te čija se koncentracija kreće od 90 % do nešto manje od 50 % ukupnih antocijana (Ribereau-Gayon i sur., 2006).

Tanini su po definiciji tvari sposobne za proizvodnju stabilnih kompleksa s proteinima i drugim biljnim polimerima kao što su polisaharidi. Tanini reagiraju s proteinima u brojnim slučajevima. U kemijskom smislu, tanini su relativno velike fenolne molekule, dobivene polimerizacijom osnovnih molekula, flavan-3-ola, čija molekulska masa tanina se kreće u

rasponu od 600 do 3500. Njihova konfiguracija utječe na njihovu reaktivnost. Osnovne strukturne jedinice su (+)-katehin i (-)-epikatehin (Ribereau-Gayon i sur., 2006). Tanini velike molekulske mase tvore stabilne komplekse s proteinima, ali veličina molekule utječe negativno na dostupnost njihovih aktivnih mjesta. Ovi spojevi u grožđu i vinu u prvom redu važni su kao nositelji senzorskog svojstva trpkooće te okusa gorčine (Jackson, 2008).

#### 2.1.4. Promjene polifenolnog sastava tijekom dozrijevanja i starenja vina

Tijekom dozrijevanja vina događaju se kvalitativne i kvantitativne promjene u fenolnom sastavu vina (Jackson, 2008). Reakcije oksidacije, polimerizacije i kondenzacije su karakteristične za fenolne spojeve tijekom starenja vina te su odgovorne za stabiliziranje boje vina, kao i smanjenje gorčine i trpkooće (Pèrez-Magariño i sur., 2006). Mogućnost vina da se poboljša tijekom starenja je jedno od njegovih najfascinantnijih svojstava.

Samo starenje možemo podijeliti u dvije faze. Prva faza naziva se dozrijevanje, a odnosi se na promjene koje nastaju unutar inoks tanka ili bačve i najčešće traje od 6 do 24 mjeseca. Dozrijevanje vina u hrastovoj bačvi jedna je od najčešćih metoda u proizvodnji vina s dugom tradicijom. Dozrijevanje uvelike utječe na kvalitetu vina, njegovu aromu i sastav polifenolnih spojeva (Del Alamo Sanza i sur., 2006). Vina koja su dozrijevala u hrastovim *barrique* bačvama uobičajeno sadržavaju elagainsku kiselinu i furfural (Matějiček i sur., 2005). Rezultati istraživanja od Gomez-Plaze i sur. (2000) su pokazali da nakon 12 mjeseci dozrijevanja dolazi do smanjenja udjela (+)-katehina i (-)-epikatehina za 26 % odnosno 20 % u odnosu na njihove početne vrijednosti. Druga faza se naziva starenje i započinje punjenjem vina u boce. Budući da se ova faza događa uglavnom bez prisutnosti kisika, ona se naziva reduktivnim starenje (Boulton i sur., 1996). Starenje vina rezultat je oksidacijskih i neoksidacijskih procesa (Linsenmeier i sur, 2010).

## 2.2. AROMA VINA

Aromu vina čini nekoliko stotina hlapivih spojeva u koncentracijama u rasponu od nekoliko mg L<sup>-1</sup> do nekoliko ng L<sup>-1</sup> ili čak manje (Ribereau-Gayon i sur., 2000). Mirisni učinak hlapivih spojeva u vinu ovisi o njihovoj koncentraciji i tipu. Određeni spojevi prisutni u tragovima mogu igrati veliku ulogu u određivanju arome, dok drugi spojevi prisutni i u visokoj koncentraciji mogu dati samo blagi doprinos aromi (Ribereau-Gayon i sur., 2006).

Prve studije o aromi vina proveli su Hennig i Villforth, (1942). Korištenjem klasičnih kemijskih metoda uspjeli su identificirati nekoliko spojeva arome. Bayer i sur., (1958) primijenili su plinsku kromatografiju u području arome vina te identificirali nekolicinu viših alkohola i estera.

Aromu vina možemo podijeliti u tri skupine: (i) aroma koja potječe od grožđa-primarna ili sortna aroma; (ii) aroma proizvedena fermentacijom tijekom procesa pravljenja vina-sekundarna ili fermentacijska aroma; (iii) aroma koja nastaje tijekom starenja-tercijarna ili aroma starenja (Rapp i Mandery, 1986; Clarke i Bakker, 2004).

### 2.2.1. Primarna aroma - sortna aroma

Primarna aroma potječe od grožđa te prelazi u vino. Nosioци sortne arome su uglavnom terpenски spojevi, a među njima se najviše ističu monoterpeni koji su odgovorni za voćne i cvjetne arome u vinu (Pisarnitskii, 2001). Koncentracija terpena značajno se smanjuje tijekom proizvodnje, a posebice tijekom dozrijevanja vina. Primjerice, koncentracija spojeva poput linalola,  $\alpha$ -terpineola, nerola, geraniola, furan linalola se smanji oko 60 % (Zoecklein i sur., 1999). Osim terpena nosioци sortne arome su i norizoprenoidi, C6 spojevi, metoksipirazini te sortni tioli (Álvarez-Pérez i sur., 2012). Ove grupe aromatskih spojeva mogu se nalaziti u slobodnom obliku ili mogu biti vezani u obliku glikozida (Hjelmeland i Ebeler, 2015).

Primarna aroma ovisi o samoj sorti i zrelosti grožđa, geoklimatskim uvjetima, utjecaju tla i sistema uzgoja, o tehnološkom procesu obrade vina i drugim faktorima (Lambrechts i Pretorius, 2000).

### 2.2.2. Sekundarna aroma - fermentacijska aroma

Sekundarna aroma je aroma koja se stvara tijekom procesa fermentacije. Tijekom alkoholnog vrenja formira se velika skupina aromatskih spojeva, uključujući više alkohole,

aldehide, estere, kiseline, ketone (Hashizume i Samuta, 1997). Starenjem se ovi spojevi mogu modificirati i dati vinima svoje specifične mirise. Tijekom alkoholne fermentacije, vinski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* uzrokuje velike promjene u sastavu mošta i vina: modificiranje arome, okusa, boje čime dolazi do povećanja kompleksnosti vina (Swiegers i sur., 2005). Brojni čimbenici utječu na formiranje sekundarne arome vina, a neki od najvažnijih su temperatura i trajanje fermentacije, soj kvasca koji je odgovoran za fermentaciju, pH vrijednost mošta, koncentracija kisika i sumporovog dioksida (Swiegers i sur., 2005).

Hlapivi esteri su važni spojevi arome vina. Tijekom fermentacije nastaju dvije glavne vrste estera: etil esteri i acetatni esteri. Prisutni su u malim količinama u grožđu, ali su veoma značajni spojevi prilikom formiranja arome.

Etil esteri imaju vrlo ugodne mirise po voću i medu te doprinose aromi bijelih vina. Prisutni su u ukupnim koncentracijama od nekoliko  $\text{mg L}^{-1}$  (Ribereau-Gayon i sur., 2006). Etilni esteri masnih kiselina kao što su etil heksanoat, etil oktanoat ili etil dekanat nositelji su cvjetnih i voćnih nota mladih vina (Díaz-Maroto i sur., 2005), dok tijekom starenja dolazi do promjena u koncentracije navedenih spojeva (Simpson, 1979).

Najvažniji acetatni esteri koji utječu na aromu vina su etil acetat i i-amil acetat. Najzastupljeni od njih je etil acetat koji ako se nalazi u koncentraciji ispod  $60 \text{ mg L}^{-1}$  povoljno djeluje na aromu vina, dok u većim koncentracijama može izazvati neugodne mirise po octu i narušiti aromatski profil vina (Wang i sur., 2002; Torrea i sur., 2002).

Viši alkoholi su sekundarni produkti fermentacije sa više od dva C atoma, a sintetiziraju ih kvasci iz šećera ili aminokiselina koje se nalaze u grožđu i moštu. Dijele se na alifatske i aromatske alkohole. Izobutanol, amilalkohol i izoamilalkohol su najznačajniji viši alkoholi koji nastaju fermentacijom. Viši alkoholi i njihovi esteri imaju veliki značaj za aromu vina (Lambrechts i Pretorius, 2000). Pri koncentracijama manjim od  $300 \text{ mg L}^{-1}$  pozitivno utječu na aromu vina (Boulton i sur., 1996).

Hlapive masne kiseline također su važni produkti alkoholne fermentacije, a najzastupljenija je octena kiselina. Koncentracija ostene kiseline je zakonski regulirana, te ne smije biti veća od  $1,0\text{-}1,5 \text{ g L}^{-1}$ , dok se optimalna koncentracija kreće između  $0,2\text{-}0,7 \text{ g L}^{-1}$ . Osim octene kiseline, vina mogu sadržavati mravlju, propionsku, maslačnu, kaprionsku, kaprilnu, te kaprionsku hlapivu masnu kiselinu (Lambrechts i Pretorius, 2000).

### 2.2.3. Tercijarna aroma - aroma starenja

Tijekom dozrijevanja vina u bačvama dolazi do ekstrakcije brojnih komponenti iz same bačve koje izravno doprinose okusu i aromi vina. Hlapivi spojevi ekstrahirani iz drveta su uglavnom furfuralni spojevi, gvajakol, hrastov ili viski lakton, eugenol, vanilin, aldehidi i hlapivi fenoli. Osim navedenih, kvaliteti vina doprinose i ostali spojevi ekstrahirani iz drva poput, polisaharida, slobodnih aminokiselina, peptida, elagitanina (Spillman, 1997). Iako se tradicija starenja vina u hrastovih bačvama odvija već stoljećima, ovu tehnologiju prate i određeni nedostaci. Naime, proces starenja u *barrique* bačvama je dugotrajan, a traje od nekoliko mjeseci do nekoliko godina. Osim toga bačve zauzimaju puno prostora u vinarijama i treba ih češće mijenjati, a također vremenom mogu biti kontaminirane nepoželjnim mikroorganizmima kao što su kvasci rodova *Brettanomyces* i *Dekkera*. Uzimajući u obzir ove nedostatke trenutna istraživanja su usmjerena na traženje novih tehnika koje omogućuju poboljšanje kvalitete vina nakon procesa starenja ili koji omogućuje skraćanje postupka starenja vina (Ribereau-Gayon i sur., 2006; Lambrechts i Pretorius, 2000).

Također, važno je naglasiti da tijekom samog dozrijevanja i starenja može doći do promjena u sastavu estera, viših alkohola i hlapivih masnih kiselina. Primjerice, koncentracije ravnolančanih etilnih estera se smanjuju, dok su razgranati etilni esteri su više ili manje stabilni ili čak može doći do povećanja njihove koncentracije (Díaz-Maroto i sur., 2005; Simpson, 1979). S druge strane, koncentracija viših alkohola tijekom dozrijevanja ostaje najčešće nepromjenjena (Marais i Pool, 1980; Rapp i sur., 1985). Također, zbog kemijske esterifikacije ili hidrolize tijekom starenja može doći do povećanja ili smanjenja koncentracije masnih kiselina, a osim toga može doći i do značajnih promjena u sastavu aldehida. Oksidacijom alkohola može doći do formiranja aldehida i narušavanja arome. Primjerice, acetaldehid nastaje kao posljedica kontakta s kisikom pri čemu dolazi do promjena i narušavanja aromatskog profila vina. Iako sumporov dioksid inhibira reakciju stvaranja aldehida; ipak i u njegovoj prisutnosti može doći do stvaranja acetaldehida (Wildenradt i Singleton, 1974). Također, istraživanja su pokazala kako pri kontroliranim uvjetima dozrijevanja i skladištenja količina acetaldehida koja prirodno nastaje ima značajno manju ulogu za razvoj bijelog nego crnog vina uslijed interakcije s polifenolnim spojevima (Wildenradt i Singleton, 1974).



## 2.3. DODATAK ANTIOKSIDANASA U VINO

### 2.3.1. Sumporov dioksid (SO<sub>2</sub>)

Opća upotreba sumporovog dioksida (SO<sub>2</sub>) datira od 18. stoljeća. Zbog svojih brojnih svojstava proizvodnja vina bez SO<sub>2</sub> danas je gotovo nezamisliva. Naime, treba uzeti u obzir da kvasci proizvode male količine SO<sub>2</sub> tijekom fermentacije, a formirana količina rijetko je veća od 10 mg L<sup>-1</sup>, ali u nekim slučajevima može prelaziti 30 mg L<sup>-1</sup>.

Glavna svojstva koja karakteriziraju SO<sub>2</sub> su:

1. Antiseptik-inhibira razvoj mikroorganizma te ima veću aktivnost na bakterijama nego na kvascima. Pri niskim koncentracijama, inhibicija je prolazna, dok visoke koncentracije u potpunosti uništavaju postotak mikrobne populacije.
2. Antioksidans-SO<sub>2</sub> štiti vino od oksidacije fenolnih i ostalih spojeva u vinu, te također pridonosi u uspostavi niskog oksidacijsko-redukcijskog potencijala koji pogoduje razvoju arome i okusa vina tijekom skladištenja i starenja. U prisutnosti katalizatora veže se s otopljenim kisikom i kao produkt nastaje SO<sub>3</sub>. Ova reakcija je spora, štiti vino od kemijske oksidacije, ali nema učinka na enzimatske oksidacije, koje su vrlo brze.
3. Inhibitor-trenutno inhibira djelovanje oksidacijskih enzima (tirozinaza, lakaza) i potpunu inaktivaciju. Prije fermentacije, SO<sub>2</sub> štiti mošt od oksidacije ovim mehanizmom, a također pomaže kako bi se izbjegla oksidacija u bijelim i crnim vinima (posebice kod pljesnivog grožđa).
4. Zaštitna uloga-vezivanje etanala i drugih sličnih produkata, pri čemu se štiti aroma vina (Ribéreau-Gayon i sur., 2006).

Sumporov dioksid u vinu je u ravnoteži s sumporovodikom (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, dominantan oblik) i sulfitom (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). Često se u kombinaciji koristi SO<sub>2</sub> s askorbinskom kiselinom, jer može učinkovito ukloniti kisik prije reakcije kisika s fenolnim spojevima. Ukoliko se askorbinska kiselina koristi bez SO<sub>2</sub>, tada vodikov peroksid i produkti degradacije dehidroaskorbinske kiseline mogu uzrokovati negativne senzorske promjene.

Uslijed pseudoalergenog djelovanja i osjetljivost dijela populacije, upotrebu SO<sub>2</sub> u vinarstvu nastoji se ograničiti i smanjiti. Međutim, zbog antimikrobnog i antioksidacijskog djelovanja, a posebice zbog niske cijene SO<sub>2</sub>, pronalazak alternative je izrazito kompleksan.

Ipak, ranija istraživanja pokazala su kako bi dodatak tripeptid glutationa mogao nadomjestiti antioksidativno djelovanje  $\text{SO}_2$ , a time i njegov dodatak u vino (Sonni i sur., 2011).

### 2.3.2. Glutation

Glutation (GSH) je tripeptid L-glutamata, L-cisteina i glicina. GSH ima brojne fiziološke i biokemijske uloge u biljkama, od kojih je najvažnija kontrola oksido-redukcijskih procesa, detoksikacija i metabolizam sumpora. GSH je prvi put kvantificiran u grožđu 1989. godine. Kao rezultat sve većeg interesa za GSH, razvijene su različite analitičke metode za određivanje reduciranog, oksidiranog i ukupnog glutaciona u grožđu, moštu i vinu. Razvijeno je nekoliko metoda tekućinske kromatografije kao i kapilarna elektroforeza za kvantifikaciju GSH i / ili GSSG u soku od grožđa i vinu. Jasno je da GSH ima važnu ulogu u održanju svježine i kvalitete vina. Međutim, potpuno razumijevanje uloge GSH u grožđu i vinu još je uvijek nerazjašnjeno. Razvoj analitičke kemije trebao bi pomoći u daljnjem objašnjenju njegove uloge u kemijskom i senzornom sastavu grožđa i vina (Kritzinger i sur, 2012). Glutation postoji u dva oblika: reducirani (GSH) i oksidirani (GSSG) oblik. U reduciranom stanju, tiolna skupina cisteina može donirati redukcijski ekvivalent na druge nestabilne molekule, kao što sureaktivne vrste kisika. Donirajući elektron, glutacion postaje veoma reaktivan, stoga s lakoćom reagira s drugim reaktivnim glutacionim te se formira GSSG (Badea i Antoce, 2015).

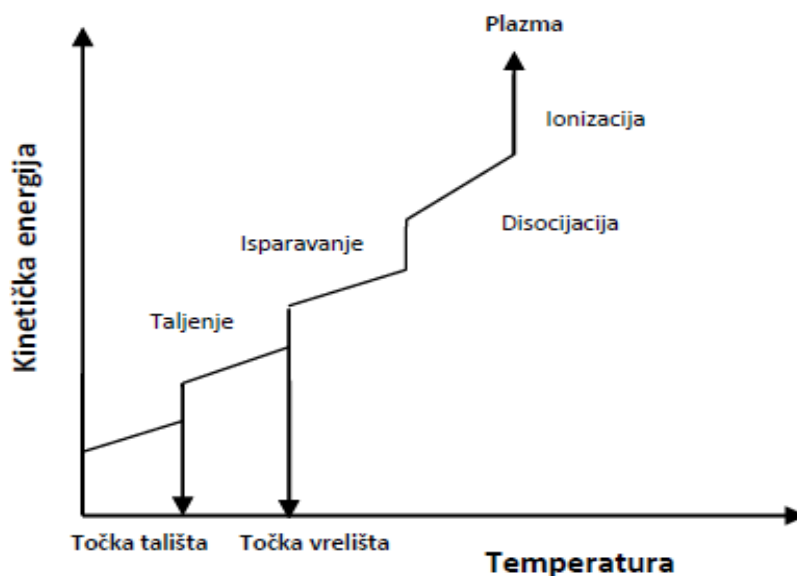
Sonni i sur. (2011) su proveli istraživanje o antioksidacijskom djelovanju glutaciona pojedinačno i u kombinaciji s askorbinskom kiselinom u bijelim vinima. Glutation je korišten u uobičajenim koncentracijama ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) te 20 puta većim koncentracijama ( $860 \text{ mg L}^{-1}$ ) kako bi se dobio omjer askorbinske kiseline ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) i glutaciona 1:1. Vino je bilo pohranjeno na  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  bez sumporovog dioksida i pri zasićenim razinama kisika u uvjetima vrlo pogodnim za oksidaciju. U tim uvjetima rezultati su pokazali kako veća koncentracija glutaciona u početku osigurava zaštitu od oksidacijske boje, međutim u konačnici je uzrokovala formiranje nepoželjne boje. U prisutnosti askorbinske kiseline, visoke koncentracije glutaciona su odgodile degradaciju u askorbinskoj kiselini i inhibirale reakciju degradacije samih produkata askorbinske kiseline s katehinom. Međutim, navedeno istraživanje također je pokazalo kako glutacion utječe na formiranje različitih polimera pigmenta. Dobiveni rezultati ukazali su na nove mehanizme djelovanja glutaciona tijekom oksidacijskog posmeđivanja vina.

Nikolantonaki i sur. (2018) pokazali su kako dodatak glutaciona (GSH) u ranoj fazi procesa vinifikacije dovodi do značajno većeg antioksidativnog metabolizma u usporedbi s kasnijim dodatkom GSH i to neovisno o samoj koncentraciji GSH te godini berbe. Ovi rezultati upućuju na to da je antioksidativni metabolizam bijelih vina od samog početka procesa proizvodnje vina ovisan o spojevima koji sadrže N- i -S skupinu.

## 2.4. VISOKONAPONSKO ELEKTRIČNO PRAŽNENJE

Visokonaponsko električno pražnjenje (plazma) se smatra četvrtim agregatnim stanjem pored tri uobičajena: tekuće, kruto i plinovito stanje. Pojam „*plazma*” prvi je definirao američki kemičar Irving Langmuir (1881.-1957.). On je prvi uočio specifične oscilacije u ioniziranom plinu koje su bile određene gustoćom i masom elektrona. Nazvao ih je „oscilacije u plazmi” koje nastaju zbog nehomogene raspodjele naboja unutar plazme (Langmuir, 1928). Shematski prikaz prijelaza stanja materije u tzv. pobuđeno stanje odnosno plazmu nalazi se na slici 1.

Plazma je nova tehnologija obrade hrane s ciljem inaktiviranja sustava patogenih mikroorganizama i poboljšanja sigurnosti hrane. To je ionizirani plin koji sadrži veliki broj različitih vrsta čestica, poput elektrona, pozitivnih i negativni iona, slobodnih radikala, elektrona i atoma plina, fotona i pogodna je za upotrebu u sustavima koji su osjetljivi na visoku temperaturu (Niemira, 2012). Pojmovi hladna plazma (Noriega i sur., 2011), atmosferska plazma pritiska, plinska plazma s hladnom atmosferom (Moisan i sur., 2001) i drugi usporedivi izrazi korišteni su u novijim publikacijama.



Slika 1. Shematski prikaz prijelaza stanja materije (Vukušić, 2016)

#### 2.4.1. Vrste sustava za proizvodnju plazme i podjela plazmi

Postoji mnoštvo tehnologija koje se brzo razvijaju za proizvodnju plazme. One mogu raditi pri atmosferskom tlaku ili pri nekom stupnju djelomičnog vakuuma. Plin koji se ionizira može biti jednostavan kao zrak ili dušik ili može biti smjesa plinova koja sadrži određeni udio plemenitih plinova, kao što su helij, argon ili neon. Pokretačka energija može biti struja, mikrovalovi ili laseri. Svi sustavi plazma namijenjeni za uporabu u obradi hrane općenito spadaju u jednu od ove tri kategorije:

1. indirektni sustavi
2. direktni sustavi
3. kontaktni sustav elektroda (Niemira, 2012).

Oblici i vrste plazmi mogu se podijeliti prema energiji i gustoći nabijenih čestica, tlaku plina pri kojem nastaje plazma te temperaturi (Vukušić, 2016). Prema temperaturi pri kojoj se primjenjuju razlikujemo vruće i hladne plazme. Kod vrućih plazmi temperatura elektrona je veoma visoka i kreće se iznad 6000 K i slična je temperaturi elektrona i neutralnih čestica, dok kod hladnih plazmi temperatura elektrona se kreće od 104 K do 105 K, a temperatura teških čestica, iona, molekula, atoma i slobodnih radikala približna je sobnoj temperaturi.

#### 2.4.2. Primjena visokonaponskog električnog pražnjenja – hladne plazme u prehrambenoj industriji

U prošlosti se za sterilizaciju osjetljivih materijala koristila tehnologija plazme, a sada se proširuje i na prehrambenu industriju kao nova tehnologija (Thirumdas i sur., 2014). Hladna plazma je nova, netoplinska, jeftina i ekološki prihvatljiva tehnologija s potencijalnom primjenom u prehrambenoj industriji (Pankaj i Keener, 2018).

Kao tehnologija za obradu hrane, hladna plazma je dovoljno nova da se terminologija još uvijek razvija. Upravo ovu tehnologiju karakterizira obrada pri sobnoj temperaturi, a time i minimalan razvoj topline u tretiranom sustavu. Tehnologija plazme može se koristiti za modifikaciju škroba kao aditiv i kao punilo u pakiranju materijala. Osim toga, cilj do sada provedenih istraživanja bio je i omogućiti što veći prinos polifenolnih spojeva u raznim prehrambenim proizvodima primjenom ove tehnologije. Iako tehnologija plazme još nije korištena komercijalno u velikoj mjeri, oprema bi trebala biti prilagodljiva (Thirumdas i sur., 2014).

### 2.4.3. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja – hladne plazme na sokove

Brojne studije pokazale su da je primjena plazme na voćnim sokovima rezultirala fizikalnim i kemijskim promjenama, uz zadržavanje ili čak poboljšanje ukupne kvalitete tretiranih sokova. Naime, netopljinska priroda hladne plazme štiti nutritivna i senzorska svojstva tako tretiranih voćnih sokova i pomaže produžiti njihov rok trajanja (Penkaj i Keener, 2018).

U studiji koju su proveli Bursač Kovačević i sur. (2016a) uočeno je povećanje stabilnosti antocijana nakon tretmana plazmom u soku od nara, dok je duže vrijeme tretmana imalo negativan utjecaj na antocijane u soku od višnje (Elez Garofulić i sur., 2015). Bursač Kovačević i sur. (2016b) proveli su još jedno istraživanje u kojem su usporedili rezultate pasteriziranog soka od aronije s rezultatima soka tretiranog hladnom plazmom. Sok od aronije je bio podvrgnut hladnoj atmosferskoj plazmi plinske faze, a praćene su kiseline, flavonoli i antocijani. Tijekom pasterizacije najnestabilnije su bile hidroksicimetne kiseline s gubicima do 59 %, a flavonoli i antocijani povećali su se za 5 % i 9 %, dok je sok od aronije tretiran plazmom sadržavao više koncentracije hidroksicimetnih kiselina i 23 % gubitka antocijana u usporedbi s netretiranim sokom.

U istraživanju Herceg i sur. (2016) provedeno je tretiranje soka od nara hladnom plazmom i dobiveni rezultati uspoređivani su s rezultatima soka tretiranog samo klasičnom pasterizacijom. Uzorak koji je bio tretiran hladnom plazmom pokazao je pozitivan porast ukupnih fenola i to za 14,95 % do 48,99 %, dok udio ukupnih fenola pasteriziranog soka od nara porastao za 29,55 %. Prema ovim rezultatima hladna plazma bi mogla biti potencijalno nova metoda u prehrambenoj industriji, međutim potrebna je daljnja optimizacija procesnih parametara hladne plazme.

Vukušić (2016) istraživala je primjenu hladne plazme na voćnim sokovima i njen utjecaj na fizikalno-kemijska i organoleptička svojstva tako tretiranih sokova. Istraživanje je provedeno u dvije faze. U prvoj fazi proveden je tretman plinskom plazmom, zatim tretman tekućinskom plazmom s mjehurićima te tretman kombinacijom ovih dviju plazmi. Tekućinska plazma s mjehurićima je imala najmanji utjecaj na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva soka od jabuke. U drugoj fazi istraživanja, nakon odabranog tretmana sok od jabuke i nektar višnje Maraske tretirani su pri vremenu od 3, 6 i 9 min, temperaturi 30, 40 i 50 °C i frekvenciji 60, 90 i 120 Hz. Nakon provedenog tretmana određeni su optimalni uvjeti kako bi se što više očuvala fizikalno-kemijska i senzorska svojstva tretiranih sokova. Optimalni uvjeti

koji vrijede za sok od jabuke ostvareni su pri vremenu od 6 minuta, temperaturi od 50 °C i frekvenciji od 60 Hz, dok su optimalni uvjeti za nektar višnje Maraske bili pri vremenu od 4 do 6 minuta, temperaturi od 30 °C, te frekvenciji od 60 do 70 Hz.

#### 2.4.4. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja – hladne plazme na vino

Postoji jako malo saznanja o utjecaju visokonaponskog električnog pražnjenja (hladne plazme) na kvalitetu vina, posebno nakon dozrijevanja vina. Također, još uvijek nisu standardizirane metode i svi procesni parametri za tretiranje ovom netoplinskom tehnikom.

Lukić i sur. (2019) proveli su istraživanje čiji je cilj bio ispitati utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja (hladne plazme) na fizikalno-kemijske karakteristike vina. Istražen je utjecaj hladne plazme na koncentraciju otopljenog kisika, koncentracije slobodnog i ukupnog sumporovog dioksida (SO<sub>2</sub>), te električnu provodljivost u bijelom i crnom vinu. Odabrani procesni parametri u tom istraživanju bili su frekvencija od 60, 90 i 120 Hz i trajanje tretmana od 3, 5 i 10 min pri pozitivnom polaritetu. Rezultati istraživanja pokazali su da je nakon tretmana hladnom plazmom došlo do smanjenja koncentracije otopljenog kisika i sumporovog dioksida u vinu, dok se električna vodljivost vina povećala. Međutim, ovi parametri ne daju uvid u cjelokupnu kvalitetu vina, te su Lukić i sur. (2019) proveli detaljnije istraživanje o utjecaju ove tehnike na polifenolne spojeve i kromatske karakteristike bijelih i crnih vina. U spomenutom istraživanju, tretman hladnom plazmom rezultirao je blagim promjenama u kromatskim karakteristikama bijelog i crnog vina te smanjenjem polifenolnih spojeva, točnije ukupnih fenola, ukupnih i slobodnih antocijana i ukupnih tanina u crnom vinu. S druge strane koncentracija pojedinačnih fenolnih spojeva, fenolnih kiselina i flavan-3-ola, blago se povećala u bijelom vinu što ukazuje na to da se ova fizikalna metoda može koristiti u poboljšanju oksidacijske stabilnosti vina, a time i poboljšanju kvalitete vina tijekom procesa starenja.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. UZORCI VINA

Vina, korištena u ovom radu, bila su bijelo vino Graševina te crno vino Cabernet Sauvignon (Erdutski vinogradi d.o.o., Erdut, Hrvatska), proizvedena 2017. godine sa sniženim udjelom sumporovog dioksida. Uzorke Graševine i Cabernet Sauvignon s fizikalno-kemijskim sastavom prikazanim u Tablici 1 smo analizirali nakon 12 mjeseci dozrijevanja u bocama.

Tablica 1. Osnovni fizikalno-kemijski sastav vina Graševina i Cabernet Sauvignon

Parametar	Graševina	Cabernet Sauvignon
Alkohol (vol %)	11,4	13,1
Ukupna kiselost ( $\text{gL}^{-1}$ vinske kiseline)	5,1	5,3
Hlapiva kiselost ( $\text{gL}^{-1}$ octene kiseline)	0,31	0,61
Reducirajući šećeri ( $\text{gL}^{-1}$ )	2,8	4,1
pH	3,37	3,46
Jabučna kiselina ( $\text{gL}^{-1}$ )	1,2	0,1
Mliječna kiselina ( $\text{gL}^{-1}$ )	0,3	1,3
Ukupni sumporov dioksid ( $\text{mgL}^{-1}$ )	78	25
Slobodni sumporov dioksid ( $\text{mgL}^{-1}$ )	15	15

##### 3.1.1. Kemikalije

Reagensi korišteni u spektrofotometrijskim analizama bili su najmanje *pro analysis* (p.a.) stupnja čistoće, a za analizu provedenu plinskom i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti svi reagensi i standardi bili su *pro chromatography* stupnja čistoće.

- Natrijev klorid-Carlo Erba, Vale de Reuil, Francuska
- *n*-amil alkohol-Fluka, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Natrijev karbonat, bezvodni, p.a. Gram-mol, Zagreb, Hrvatska



- Natrijev hidrogen sulfit, p.a. Acros, Geel, Belgija
- Folin Ciocalteu reagens, Reagecon, Shannon, Irska
- Klorovodična kiselina (37 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Mravlja kiselina (98-100 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Etanol (96 %), Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska
- Metanol (100 %), Carlo Erba, Val del Reuil, Francuska
- Metanol, HPLC čistoće, J.T.Baker, Deventer, Nizozemska
- Acetonitril (100 %), HPLC čistoće, J.T.Baker, Deventer, Nizozemska

### 3.1.2. Aparatura i pribor

Aparatura:

- Pulsni visokonaponski generator, Spellman, UK
- Spektrofotometar (Specord 50 Plus), AnalytikJena, Jena, Njemačka
- Analitička vaga, Mettler Toledo, Columbus, OH, SAD
- Termostat, Inkolab, Zagreb, Hrvatska
- HPLC Agilent Technologies 1260 Series, Santa Clara, CA, SAD sastavljen iz sljedećih komponenti:
  - ✓ Kvarterna Pumpa (Bin Pump SL) G7111B
  - ✓ Autosampler (DL-ALS) G2258A
  - ✓ Termostat Autosampler-a (FC/ALS Term) G1330B
  - ✓ Temostatirani odjeljak za kolonu (TCC SL ) G1316B
  - ✓ Diode Array Detector (DAD VL) G1316A
  - ✓ Agilent Chemstation Softver
- Plinski kromatograf (GC), Agilent Technologies 6890 Network GC System, Santa Clara, CA, SAD
- Maseni spektrometar, Agilent Technologies 5973 Inert Mass Selective Detector, Santa Clara, CA, SAD
- Termoblok s magnetskom miješalicom, Pierce, Reacti-Therm, Heating/Stirring module, No. 18971, Rockford, IL, SAD

Pribor:

- Mikropipete od 100 i 1000  $\mu$ L, Eppendorf, Hauppauge, NY, SAD
- Reaktor od 1000 mL
- Staklene tube za hidrolizu, Pirex, Corning, NY, SAD
- Pipete volumena 10, 20, 25 mL
- Odmjerne tikvice volumena 10, 25, 50, 100, 250, 500 i 1000 mL
- Staklene epruvete
- Plastična lađica za vaganje
- Laboratorijske čaše volumena 100, 150, 250 mL
- Staklene kivete od 1 cm
- SPME vlakno: 100  $\mu$ m PDMS, 23 Ga, Supelco, Bellefonte, PA, SAD
- Magnet
- HSS bočice, 20 mL, Restek, Bellefonte, PA, USA
- Slikonski čepovi za HSS bočice, Düren, Njemačka

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprema vina za tretiranje

Tretmani vina uključivali su nekoliko varijanti sa/bez antioksidansa, a pritom su kao antioksidansi korišteni glutation i sumporov dioksid. Varijante tretiranih vina obuhvatile su: (i) vino sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> (15 mg L<sup>-1</sup> slobodnog SO<sub>2</sub>); (ii) vino sa sniženim koncentracijom SO<sub>2</sub> i glutationom (15 mg L<sup>-1</sup> slobodnog SO<sub>2</sub> uz dodatak 20 mg L<sup>-1</sup> glutaciona) te (iii) vino sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub> (30 mg L<sup>-1</sup> slobodnog SO<sub>2</sub>). Kontrolno vino je bilo je vino sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub>. Primijenjene varijante bile su jednake i u slučaju bijelog i crnog vina.

### 3.2.2. Tretman vina hladnom plazmom (NTP)

Za tretman vina hladnom plazmom korištena je tekućinska hladna plazma generirana pulsним visokonaponskim generatorom (Spellman, UK) uz upuhivanje mjehurića plina argona (protok = 4 L min<sup>-1</sup>) pri pozitivnom polaritetu. Tretiranja su izvršena pri frekvenciji 60 Hz i trajanju tretmana od 3 minute. Postupak NTP tretiranja vina bio je sljedeći: 300 mL vina stavljeno je u reaktor volumena 1000 mL s otvorom na dnu za prolaz iglične visokonaponske elektrode, a začepljen gumenim čepom s otvorom prilagođenim za elektrodu uzemljenja. Tijekom NTP tretmana plin argon je upuhivan kroz igličnu visokonaponsku elektrodu.

### 3.2.3. Punjenje vina u boce i stavljanje na starenje

Odmah nakon provedenog tretmana, vina su punjena u boce koje su potom zatvorene plutenim čepom uz pomoć ručne čepilice. Prije prelijevanja vina, boce su propuhane dušikom (kroz 1,5 min) zbog eliminacije kisika iz unutrašnjosti boce. Nakon provedenog punjenja u boce, vina su skladištena u hladnjak za čuvanje vina u kontroliranim uvjetima na period od 12 mjeseci. Vina su postavljena u vodoravni položaj te su čuvana na suhom i mračnom mjestu. Temperatura hladnjaka za čuvanje vina iznosila je 12 °C.

### 3.2.4. Određivanje ukupnih fenola u bijelom i crnom vinu

#### *Princip određivanja:*

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

#### *Postupak određivanja:*

U tikvicu od 100 mL otpipetirati 1 mL uzorka bijelog vina ili razrijeđenog (1:9) uzorka crnog vina, 5 mL Folin Ciocalteu reagensa (razrijeđenog 1:2) i 60 mL vode. Sve promiješati i nakon 30 sekundi dodati 15 mL 20 % otopine natrijevog karbonata. Tikvicu zatim nadopuniti do oznake s destiliranom vodom i ostaviti 2 sata na sobnoj temperaturi. Slijepu probu pripremiti na isti način, ali je umjesto uzorka uzeti 1 mL destilirane vode. Nakon 2 sata izmjeriti apsorbanciju pri valnoj duljini od 765 nm.

#### *Izrada baždarnog pravca:*

Otopine galne kiseline pripremiti u 100 % metanolu sljedećih koncentracija: 50, 200, 400 i 600  $\text{mg L}^{-1}$ . U tikvicu od 100 mL otpipetirati 1 mL otopine određene koncentracije, te se dalje primijeniti propis za određivanje ukupnih fenola. Izraditi baždarni pravac pri čemu se na apscisu nanijeti koncentracije galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ ), a na ordinatu izmjerene vrijednosti apsorbancije kod 765 nm.

#### *Račun:*

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

Izračunata jednadžba pravca:

$$y = 0,0010x + 0,0276$$

$$R^2 = 0,999$$

gdje je:

y- apsorbancija pri 765 nm

x- koncentracija galne kiseline ( $\text{mg L}^{-1}$ )

$R^2$ - koeficijent determinacije

### 3.2.5. Određivanje ukupnih tanina u crnom vinu

#### *Princip određivanja:*

Ukupni tanini određeni su Bate-Smith metodom temeljenoj na kiselinskoj hidrolizi proantocijanidina, tzv. kondenziranih tanina na temperaturi od 100 °C pri čemu dolazi do formiranja obojenih antocijanidina (Ribereau-Gayon i Stonestreet, 1966).

Razlika obojenja između zagrijanog, hidroliziranog i nehidroliziranog uzorka držanog na sobnoj temperaturi određena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini 550 nm, a pokazuje količinu ukupnih tanina u uzorku.

#### *Postupak određivanja:*

U dvije tube za hidrolizu otpipetirati po 2 mL uzorka (razrijeđenog 49:1), 1 mL destilirane vode te 3 mL koncentrirane klorovodične kiseline te tube hermetički zatvoriti . Jednu tubu ostaviti je na sobnoj temperaturi, a drugu stavljenu u vodenu kupelj na 100 °C. Nakon 30 minuta, tuba izvaditi iz vodene kupelji te ohladiti ledom kako bi se što prije zaustavila daljnja reakcija kiselinske hidrolize. U svaku od tuba potom dodati 0,5 mL etanola. Izmjeriti optičku gustoću pri 550 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

#### *Račun:*

Koncentracija tanina u 50 puta razrijeđenom uzorku izračunata je prema formuli:

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

gdje je:

19,33 - faktor preračunavanja

D<sub>1</sub>- optička gustoća hidroliziranog uzorka

D<sub>2</sub> - optička gustoća nehidroliziranog uzorka

### 3.2.6. Određivanje ukupnih antocijana u crnom vinu

#### *Princip određivanja:*

Ukupna količina antocijana u uzorku vina određena je pomoću metode bazirane na dodatku otopine natrij hidrogensulfita u uzorak te činjenici da se  $\text{HSO}_3^-$  ion veže na 2' položaj obojene molekule antocijana te ju tako prevodi iz obojenog kationa u njen bezbojni leuko oblik. Istovremeno, paralelni uzorak ekstrakta pokožice grožđa tretiran je destiliranom vodom pri čemu ne dolazi do nikakve promjene na strukturi molekula antocijana. Količinu prisutnih antocijana pokazuje razlika spektrofotometrijski određenih apsorbancija u oba uzorka (Ribéreau-Gayon i Stonestreet, 1965).

#### *Postupak određivanja:*

U tikvicu od 25 mL otpipetirati 1 mL uzorka, 1 mL 0,1 (v/v) klorovodičnom kiselinom zakiseljenog 96 % etanola i 20 mL 2 % vodene otopine klorovodične kiseline. Po 10 mL napravljene smjese otpipetirati u dvije tikvice nakon čega u prvu tikvicu dodati 4 mL destilirane vode, a u drugu 4 mL 15 % otopine natrij hidrogensulfita. Nakon 15 minuta izmjeriti apsorbancija oba uzorka na 520 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

#### *Račun:*

Udio antocijana u ispitivanom uzorku ekstrakta pokožice grožđa izračunat je prema formuli:

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

gdje je:

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

875 – faktor preračunavanja

$D_1$ - apsorbancija uzorka kojemu je dodana voda

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

### 3.2.7. Određivanja fenolnih kiselina i flavanola u bijelom vinu primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Analiza hidroksibenzojevih kiselina (galna, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiselina), hidroksicimetnih kiselina (kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska, kaftarinska kiselina), flavan-3-ol monomera [(+)-katehin i (-)-epikatehin] i flavan-3-ol dimera (procijanidin B1 i B2) provedena je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) na Agilent1260 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) HPLC uređaju uz module kvarterne pumpe, autosampler-a, modula kolone te uz detekciju na DAD detektoru.

Priprema uzorka za HPLC analizu sastojala se filtriranja uzorka vina kroz celuloza acetat filtar promjera 25 mm i veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  (Filter-Bio, Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20  $\mu\text{L}$  ovako pripremljenog uzorka. Kromatografsko razdvajanje izvršeno je na koloni koloni Gemini C18, dimenzija 250x4,6 mm (Phenomenex, SAD), pri temperaturi od 25 °C te uz primjenu binarne mobilne faze: otapalo A (voda/mravlja kiselina; 98:2; v/v) i otapalo B (metanol). Pripremljene mobilne faze su filtrirane i odzračene. Razdvajanje fenolnih kiselina, flavanola provedeno je primjenom gradijenta prikazanog u tablici 2 uz protok mobilne faze od 1 mL min<sup>-1</sup>.

Tablica 2. Gradijent korišten za razdvajanje fenolnih kiselina i flavanola

<b>Vrijeme (min)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>	<b>Protok (mL min<sup>-1</sup>)</b>
0	98	2	1
20	68	32	1
30	60	40	1
40	50	50	1
50	50	50	1

Detekcija fenolnih spojeva provedena je pomoću DAD detektora snimanjem spektra od 220 do 450 nm. Identifikacija fenolnih spojeva provedena je na sljedećim valnim duljinama: 280 nm (hidroksibenzojeve kiseline i flavnoli) te 320 nm (hidroksicimetne kiseline). Kvantifikacija spojeva je provedena usporedbom retencijskog vremena (Rt) razdvojenog spoja s retencijskim vremenom standarda te uvidom u UV spektar spoja. Koncentracija pojedinačnih polifenolnih spojeva (galna, protokatehinska, vanilinska, siringinska, kafeinska, ferulinska, *p*-kumarinska, kaftarinska kiselina, katehin, epikatehin, procijanidin B1 i B2) izračunate su iz jednadžbi baždarnih pravca pripadajućih standarda. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su u mg/L. Ukupne hidroksibenzojeve kiseline izračunate su kao suma koncentracije galne, protokatehinska, vanilinska i siringinska kiseline, dok su ukupne hidroksicimetne kiseline izračunate kao suma kafeinske, ferulinske, *p*-kumarinske i kaftarinske kiseline. Ukupni flavan-3-ol monomeri izračunati su kao suma katehina i epikatehina, dok su ukupni flavan-3-ol dimeri izračunati kao suma procijanidna B1 i B2.

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

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

Priprema uzorka za HPLC analizu sastojala se filtriranja uzorka vina kroz celuloza acetat filtar promjera 25 mm i veličine pora 0,45 µm (Filter-Bio, Labex Ltd, Budimpešta, Mađarska). Injektirano je 20 µL ovako pripremljenog uzorka. Kromatografsko razdvajanje izvršeno je na koloni Nucleosil C18, dimenzija 250 x 4,6 mm (Phenomenex, Phenomenex Inc., Torrance, CA, SAD), pri temperaturi od 40 °C te uz primjenu binarne mobilne faze: otapalo A (voda/mravlja kiselina; 95:5; v/v) i otapalo B (acetonitril/mravlja kiselina; 95:5; v/v) (Lorrain i sur., 2011). Pripremljene mobilne faze su filtrirane i odzračene. Razdvajanje



slobodnih antocijana provedeno je primjenom gradijenta prikazanog u tablici 3 uz protok mobilne faze od 1 mL min<sup>-1</sup>.

Tablica 3. Gradijent korišten za razdvajanje slobodnih antocijana

<b>Vijeme (min)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>	<b>Protok (mL min<sup>-1</sup>)</b>
0	90	10	1
25	65	35	1
26	0	100	1
28	0	100	1
29	90	10	1
35	90	10	1

Detekcija slobodnih antocijana provedena je pomoću DAD detektora snimanjem spektra od 280 do 600 nm. Identifikacija i kvantifikacija slobodnih antocijana provedena je na 520 nm usporedbom retencijskog vremena (Rt) razdvojenog spoja s retencijskim vremenom standarda te uvidom u UV spektar spoja. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a koncentracije pojedinačnih slobodnih antocijana izražene su kao ekvivalent malvidin-3-*O*-glukozid klorida (mg L<sup>-1</sup>). Ukupni slobodni antocijan-3-*O*-glukozidi izračunati su kao suma koncentracija delphinidin-3-*O*-glukozid, cijanidin-3-*O*-glukozid, petunidin-3-*O*-glukozid, peonidin-3-*O*-glukozid i malvidin-3-*O*-glukozida. Ukupni antocijan-3-*O*-glukozid acetati izračunati su kao suma koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid acetata i malvidin-3-*O*-glukozid acetata. Ukupnih antocijan-3-*O*-glukozid *p*-kumarati izračunati su kao suma koncentracije peonidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata i malvidin-3-*O*-glukozid *p*-kumarata.

### 3.2.9. Određivanje hlapivih spojeva u bijelom i crnom vinu plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME – GC/MS)

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

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

#### *GC/MS analiza:*

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

#### *Uvjeti rada plinskog kromatografa (GC/MS):*

- Temperatura injektora: 250 °C
- Temperatura detektora: 280 °C
- Temperaturni program: 40 °C, 5 min  $\rightarrow$  200 °C, 3 °C min<sup>-1</sup>  $\rightarrow$  240 °C, 30 °C min<sup>-1</sup>
- Pokretna faza: Helij
- Protok pokretne faze: 1,2 mL min<sup>-1</sup>

Mode injektiranja: „Splitless“

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

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

#### *Identifikacija i kvantifikacija spojeva arome:*

Identifikacija spojeva arome provedena je usporedbom retencijskih vremena spojeva s retencijskim vremenima standarda te usporedbom masenih spektara spojeva s masenim spektrima u Nist05 knjižnici masenih spektara. Kvantifikacija navedenih spojeva arome provedena primjenom baždarnih krivulja pripadajućih standarda. Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su u mg L<sup>-1</sup>. Ukupni norizoprenoidi izračunati su kao suma koncentracija β-damaskenona i TDN-a. Ukupni etilni esteri izračunati su kao suma koncentracija etil butanoata, etil heksanoata, etil oktanoata, etil dekanata i dietil sukcinata; dok su acetatni esteri izračunati su kao suma koncentracija etil acetata, *i*-butil acetata, *i*-amil acetata, heksil acetata i 2-feniletal acetat, a ukupni ostali esteri kao suma metil oktanoata i metil dekanata. Ukupni viši alkoholi izračunati su kao suma *i*-amil alkohola, 1-heksanola, *cis*-3-hexen-1-ola, 2-fenil etanola. Ukupne hlapive masne kiseline izračunate su kao suma kapronske, kaprilea i kaprinske kiseline. Računalna obrada dobivenih kromatograma provedena je u programu Enhanced ChemStation (Agilent Technologies), a analiza rezultata u programu Microsoft Excel 2016.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je utvrditi utjecaj netoplinske tehnike hladne plazme i dodatka antioksidansa na stabilnost polifenolnih spojeva i hlapivih spojeva arome vina nakon starenja u bocama kako bi istražili utjecaj ove tehnike na kvalitetu vina i mogućnosti prilikom proizvodnje vina sa sniženim udjelom sumporovog dioksida. Bijelo vino Graševina te crno vino Cabernet Sauvignon tretirana su hladnom plazmom uz dodatak antioksidansa (glutacion i sumporov disoksid) te analizirani nakon 12 mjeseci starenja u bocama. Važno je napomenuti kako je za tretman vina hladnom plazmom korištena tekućinska hladna plazma generirana pulsним visokonaponskim generatorom uz upuhivanje mjehurića plina argona (optimalni uvjeti plazme).

Na uzorcima crnog vina provedene su spektrofotometrijske metode određivanja ukupnih fenola, ukupnih tanina i ukupnih antocijana, dok je sastav slobodnih antocijana određen primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Na uzorcima bijelog vina provedeno je spektrofotometrijsko određivanje ukupnih fenola te određivanje fenolnih kiselina i flavanola primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). Također, na bijelom i crnom vinu provedena je analiza hlapivih spojeva plinskom kromatografijom s masenom spektrometrijom uz mikroekstrakciju na čvrstoj fazi (SPME–GC/MS).

U daljnjem tekstu navedene su 4 slike i 4 tablice i to redom rezultati dobiveni na bijelim vinima pa zatim na crnim vinima. Također, prikazan je i opisan utjecaj hladne plazme i dodataka antioksidansa redom na stabilnost fenolnih spojeva u vinu, a zatim na stabilnost hlapivih spojeva vina. U daljnjem tekstu kontrolni uzorak je uspoređen s tretiranim uzorkom sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub>, tretiranim uzorkom sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> s glutationom te tretiranim uzorkom sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub>.

Za razliku od ostalih netoplinskih tehnika (visokog hidrostatskog tlaka i ultrazvuka visokih snaga) malo je poznato o učinku hladne plazme na kvalitetu vina. Također još uvijek nisu standardizirane metode i parametri obrade hladnom plazmom. Prethodna istraživanja (Herceg i sur. 2016; Bursać Kovačević i sur., 2016a; Bursać Kovačević i sur., 2016b; Elez Gorofulić i sur., 2015) uglavnom su bila usmjerena na utjecaj hladne plazme na voćne sokove, te su pokazala kako primjena ove tehnike poboljšava ekstrakciju fenolnih spojeva i pasterizaciju voćnih sokova.

## **4.1. UTJECAJ VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA I DODATAKA ANTIOKSIDANSA NA SASTAV POLIFENOLNIH SPOJEVA VINA**

### 4.1.1. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodataka antioksidansa na sastav polifenolnih spojeva u bijelom vinu Graševina

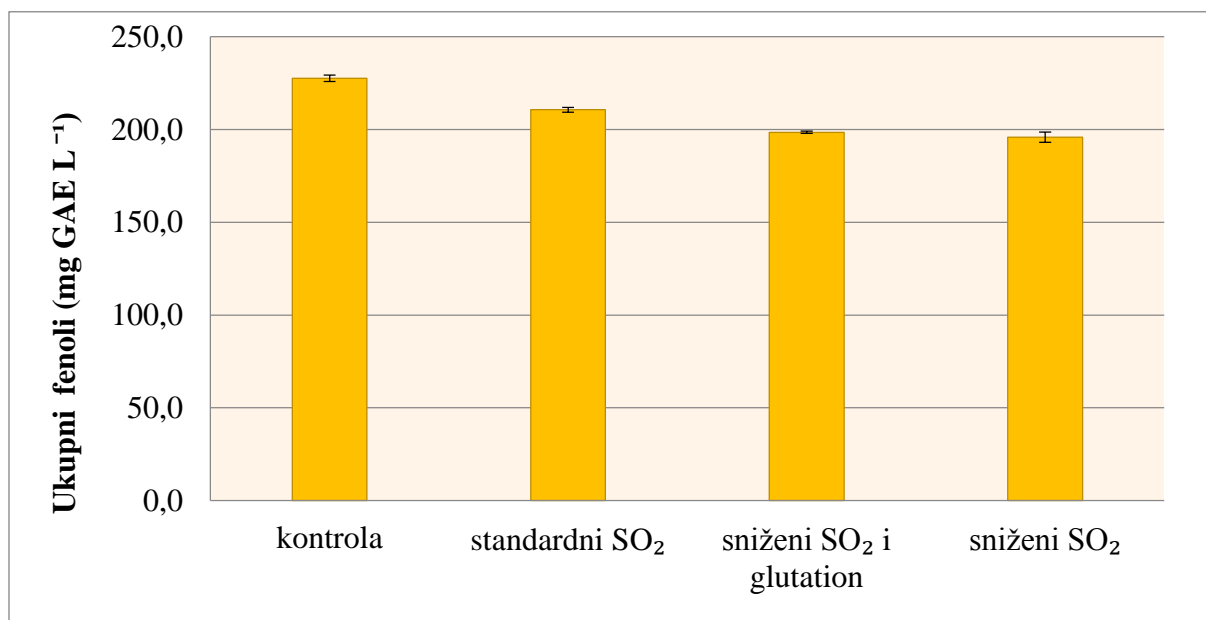
Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih fenola u crnom vinu Graševina prikazan je na slici 2. Najmanje odstupanje koncentracije fenola vidljivo je između kontrolnog uzorka koji nije tretiran (227,5 mg GAE L<sup>-1</sup>) i uzorka sa standardnim SO<sub>2</sub> koji je tretiran (210,6 mg GAE L<sup>-1</sup>). Uzorak sa sniženim SO<sub>2</sub> (195,8 mg GAE L<sup>-1</sup>) najviše odstupa od kontrolnog uzorka što znači kako je najniža koncentracija fenola upravo u tom uzorku. Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Delsart i sur. (2015), gdje je utvrđeno smanjenje koncentracije ukupnih fenola u vinima koja su tretirana visokonaponskim električnim pražnjenjem.

U tablici 4 prikazan je utjecaj tretmana na koncentraciju pojedinačnih fenolnih kiselina i flavanola (hidroksibenzojeve i hidroksicimetne kiseline, te flavan-3-ol monomeri i dimeri) u bijelom vinu Graševina. Uočen je blagi pad koncentracije hidroksibenzojevih i hidroksicimetnih kiselina u svim tretiranim uzorcima, a sličan trend utvrđen je također i kod flava-3-ol monomera (katehin i epikatehin). Gomez-Plaze i sur. (2000) pokazali su smanjenje koncentracije (+)-katehina i (-)-epikatehina za 26 % odnosno 20 % nakon dvanaest mjeseci starenjau odnosu na njihove početne vrijednosti.

S druge strane u sastavu flavan-3-ol dimera, odnosno procijanidina B2 u tretiranim uzorcima vina nakon 12 mjeseci starenja utvrđene su više koncentracije od onih u kontrolnom vinu. Nedavno provedeno istraživanje Lukić i sur. (2019) pokazalo je povećanje flavan-3-ola u bijelom vinu, za razliku od ukupnih fenola, antocijana i tanina u crnom vinu čija se koncentracija smanjila djelovanjem tretmana. Rezultati prikazani u tablici 4 prate navedene trendove, iako su dobivene koncentracije fenolih kiselina i flavanola očekivano niže s obzirom period dozrijevanja od 12 mjeseci.

Također, dodatak antioksidansa, sumporovog dioksida i glutaciona pokazao je protektivno djelovanje na koncentraciju ukupnih fenola, ali i pojedinačnih fenolih kiselina i flavan-3-ol monomera. Uspoređujući antioksidanse (SO<sub>2</sub> i glutation) dodavanjem SO<sub>2</sub> postignut je bolji učinak. Naime standardna koncentracija SO<sub>2</sub> imala je veće zaštitno djelovanje na spomenute spojeve, obzirom na niže koncentracije u uzorcima sa sniženim SO<sub>2</sub>

i glutationom (slika 2 i tablica 4). Dobiveni rezultati u skladu su s ranijim istraživanjem Nikolantonaki i sur. (2018) gdje je utvrđeno kako dodavanje glutaciona u ranoj fazi procesa vinifikacije dovodi do značajno većeg antioksidativnog metabolizma u usporedbi s kasnijim dodatkom GSH (bez obzira na dodanu količinu i godinu berbe).



Slika 2. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih fenola u vinu Graševina

Tablica 4. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa na koncentraciju fenolnih kiselina i flavanola u vinu Graševina

	<b>UZORCI</b>			
	<b>kontrola</b>	<b>standardni SO<sub>2</sub></b>	<b>sniženi SO<sub>2</sub> i glutation</b>	<b>sniženi SO<sub>2</sub></b>
<b>HIDROKSIBENZOJEVE KISELINE</b>				
Galna kiselina	4,12 ± 0,01	4,08 ± 0,00	4,01 ± 0,00	3,95 ± 0,04
Protokatehinska kiselina	3,53 ± 0,05	3,51 ± 0,08	2,67 ± 0,09	2,89 ± ,35
Vanilinska kiselina	4,09 ± 0,18	4,08 ± 0,51	3,96 ± 0,01	3,84 ± 0,06
Siringinska kiselina	2,24 ± 2,28	2,01 ± 2,26	2,04 ± 2,07	2,07 ± 2,04
Ukupne hidroksibenzojeve kiseline	13,97 ± 0,41	13,68 ± 0,84	12,68 ± 0,02	12,73 ± 0,41
<b>HIDROKSICIMETNE KISELINE</b>				
Kafeinska kiselina	3,83 ± 0,00	3,80 ± 0,02	3,83 ± 0,01	3,86 ± 0,02
<i>p</i> -Kumarinska kiselina	2,38 ± 0,00	2,14 ± 0,00	1,89 ± 0,01	1,86 ± 0,00
Ferulinska kiselina	2,58 ± 0,02	2,54 ± 0,03	2,59 ± 0,02	2,65 ± 0,00
Kaftarinska kiselina	39,32 ± 0,29	39,16 ± 0,30	39,27 ± 0,02	39,56 ± 0,11
Ukupne hidroksicimetne kiseline	48,11 ± 0,27	47,65 ± 0,32	47,57 ± 0,06	47,92 ± 0,09
<b>FLAVAN-3-OL MONOMERI</b>				
(+)-Katehin	4,34 ± 0,39	4,15 ± 0,13	4,23 ± 0,43	5,41 ± 0,14
(-)-Epikatehin	10,63 ± 0,54	10,75 ± 1,42	8,84 ± 0,03	8,60 ± 0,25
Ukupni flavan-3-ol monomeri	14,97 ± 0,93	14,90 ± 1,29	13,07 ± 0,40	14,01 ± 0,39
<b>FLAVAN-3-OL DIMERI</b>				
Procijanidin B1	2,60 ± 0,03	2,74 ± 0,07	2,19 ± 0,05	2,19 ± 0,04
Procijanidin B2	4,24 ± 0,19	4,39 ± 0,03	5,96 ± 1,05	4,77 ± 0,15
Ukupni flavan-3-ol dimeri	6,84 ± 0,23	7,14 ± 0,03	8,15 ± 1,11	6,96 ± 0,19

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija.

\*Koncentracija spoja izražena u mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodataka antioksidansa na sastav polifenolnih spojeva u crnom vinu Cabernet Sauvignon

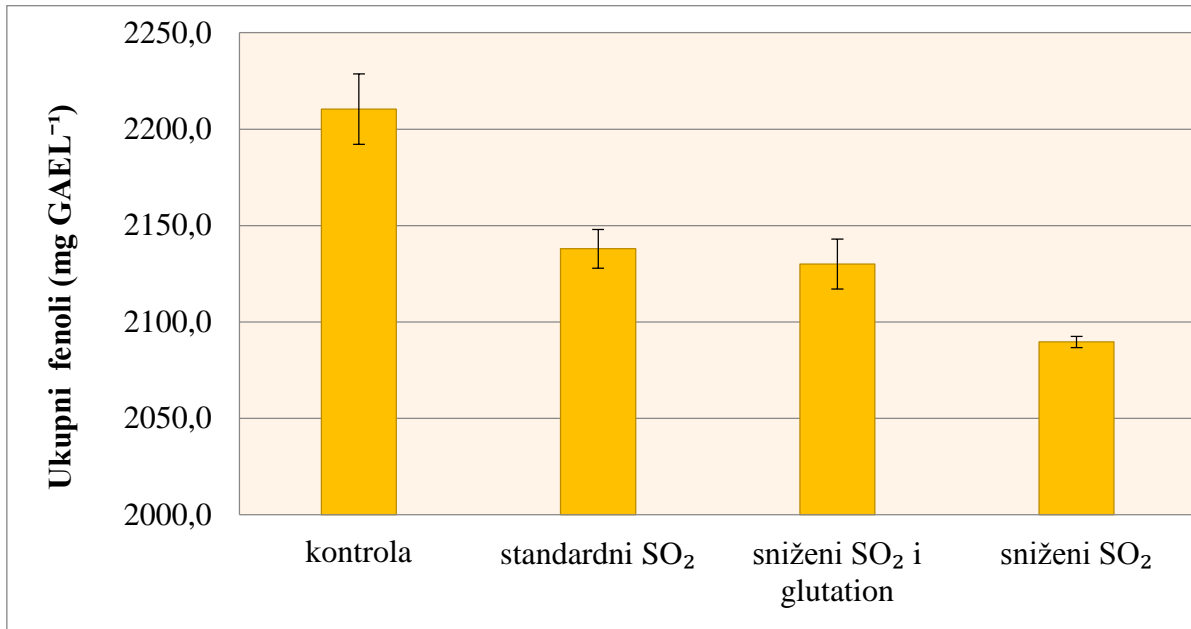
Primjena visokonaponskog električnog pražnjenja utjecala je na značajno smanjenje koncentracija ukupnih fenola u crnom vinu (slika 3). Lukić i sur. (2019) u svom istraživanju također su pokazali kako je djelovanjem visokonaponskog električnog pražnjenja došlo do degradacije ukupnih fenola u crnom vinu Cabernet Sauvignon. Koncentracija ukupnih fenola bila je viša u uzorku sa sniženim SO<sub>2</sub> i glutationom od one u uzorku sa sniženim SO<sub>2</sub> što nam opet potvrđuje pretpostavku kako antioksidansi imaju zaštitnu ulogu u očuvanju polifenola. Najviša koncentracija ukupnih fenola analizirana je u kontrolnom (netretiranom) uzorku (2210,4 mg GAE L<sup>-1</sup>), dok je najniža koncentracija dobivena u uzorku sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> (2089,6 mg GAE L<sup>-1</sup>).

S druge strane, tretman visokonaponskog električnog pražnjenja nije značajnije utjecao na promjene u sastavu ukupnih tanina. Naime, kako je i vidljivo na slici 4, koncentracije ukupnih tanina nakon 12 mjeseci dozrijevanja bile su slične u kontrolnom kao i u svim tretiranim vinima (u vinu sa standardnim SO<sub>2</sub>, sniženim SO<sub>2</sub> i glutationom, te sniženim SO<sub>2</sub>). Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako su ukupni tanini izuzetno stabilni na djelovanje visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa. Budući da starenjem crnog vina dolazi do progresivne degradacije slobodnih antocijana, kondenzacije antocijana i tanina te formiranja polimernih pigmenta (Macheix i sur., 1990) dobiveni rezultati su i očekivani.

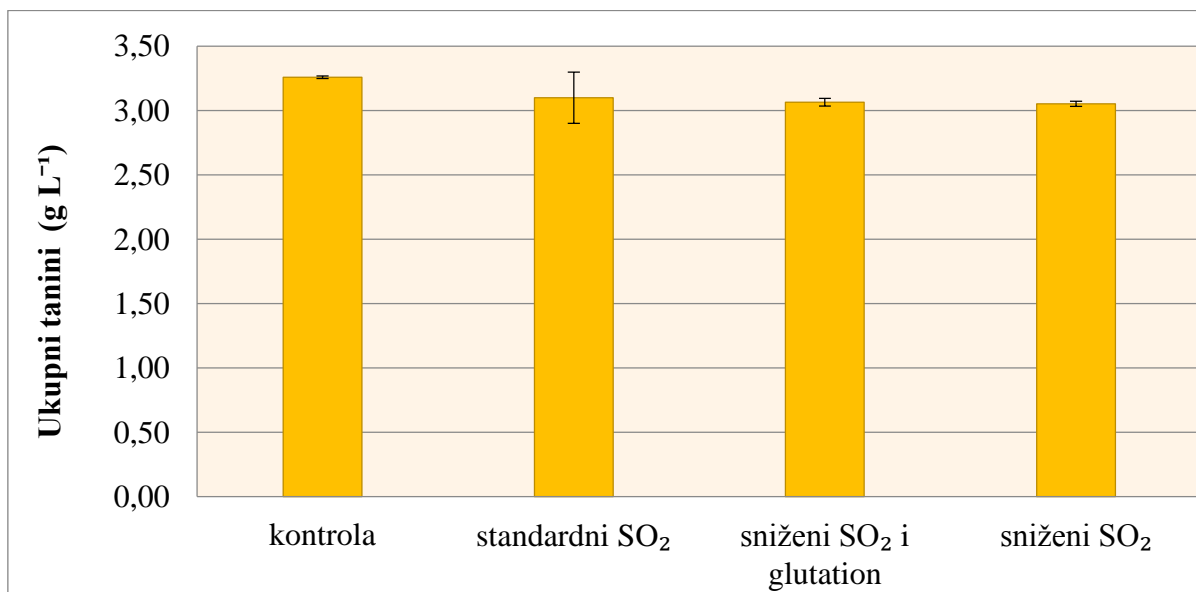
Na slici 5 prikazan je utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa nakon 12 mjeseci starenja na koncentraciju ukupnih antocijana u vinu Cabernet Sauvignon. U skladu s ranijim istraživanjima (Bursač-Kovačević i sur., 2016; Delsart i sur., 2015; Lukić i sur., 2019) značajno niže koncentracije ukupnih antocijana utvrđene su u svim tretiranim uzorcima u usporedbi s kontrolnim uzorkom (287,2 mg L<sup>-1</sup>). Također, među tretiranim uzorcima vina, uzorak sa standardnim SO<sub>2</sub> imao je najvišu koncentraciju (272,3 mg L<sup>-1</sup>), dok je u uzorku sa sniženim SO<sub>2</sub> utvrđena najniža koncentracija antocijana (210,4 mg L<sup>-1</sup>). Delsart i sur. (2015) proveli su istraživanje o djelovanju visokonaponskog električnog pražnjenja na fenolne spojeve crnih vina te također utvrdili smanjenje koncentracija antocijana u odnosu na kontrolno vino. Naime, antocijani su izrazito osjetljivi spojevi crnog vina, na čiju



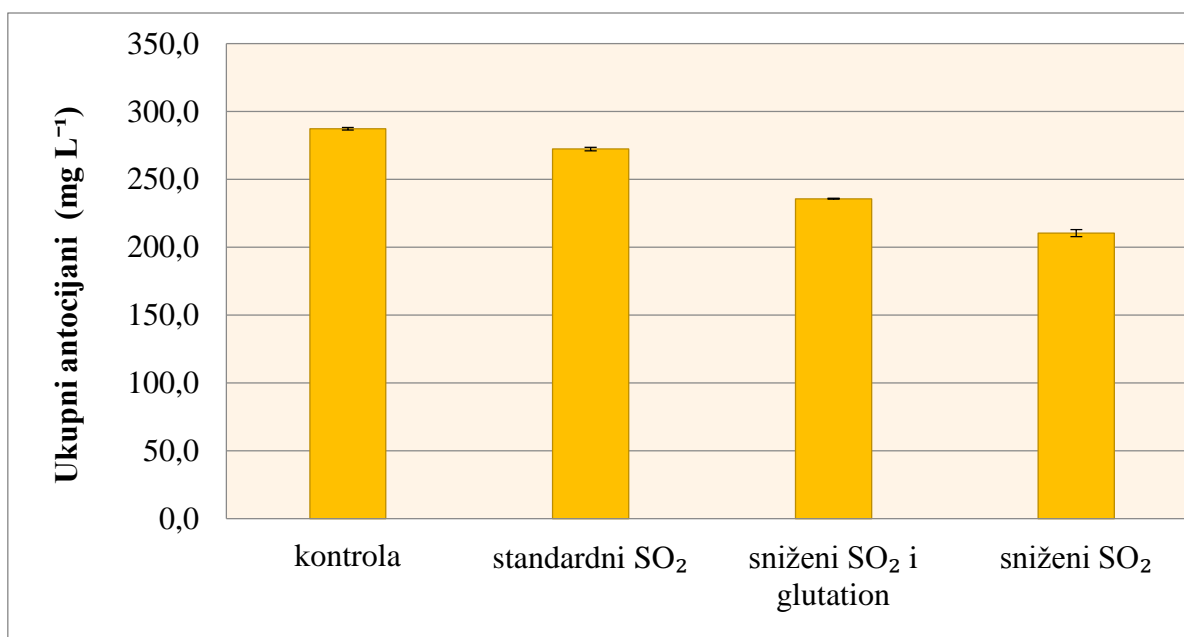
stabilnost utječe mnogo parametara kao što su pH, temperatura skladištenja, prisutnost enzima, kisika, vrsta metala, svjetlo i uvjeti obrade (Rein i Heinonen, 2004).



Slika 3. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih fenola u vinu Cabernet Sauvignon



Slika 4. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih tanina u vinu Cabernet Sauvignon



Slika 5. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa na koncentraciju ukupnih antocijana u vinu Cabernet Sauvignon

Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa na koncentraciju slobodnih antocijana u vinu Cabernet Sauvignon prikazan je u tablici 5. Sastav pojedinačnih antocijana analiziran je primjenom HPLC-a, a identificirano je i kvantificirano devet različitih slobodnih antocijana. Trendovi ranije zamjećeni u sastavu ukupnih antocijana bili su identični onima u sastavu slobodni antocijan-3-*o*-glukozida, antocijan-3-*o*-glukozid acetata i antocijan-3-*o*-glukozid *p*-kumarata. Naime, u svim tretiranim uzorcima uočene su značajno niže koncentracije slobodnih antocijana od onih dobivenih u kontrolnom uzorku. Također, koncentracija antioksidanasa pokazala se izuzetno važnom za stabilnost slobodnih antocijana, obzirom da su u uzorcima s višom koncentracijom antioksidansa utvrđene i više koncentracije. Dobiveni rezultati u skladu su s rezultatima Bursač Kovačević i sur. (2016) te Elez Gorofulić i sur. (2015), koji su pokazali kako tretman hladnom plazmom uzrokuje degradaciju antocijana kod voćnih sokova, objašnjavajući da je njihova niska stabilnost posljedica pojave oksidacije tijekom izlaganja reaktivnih radikala plazmi.

Tablica 5. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa na koncentraciju slobodnih antocijana u vinu Cabernet Sauvignon

	UZORCI			
	kontrola	standardni SO <sub>2</sub>	sniženi SO <sub>2</sub> i glutation	sniženi SO <sub>2</sub>
<b>ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZIDI</b>				
Delfinidin-3- <i>O</i> -glukozid	7,49 ± 0,36	8,14 ± 0,26	4,51 ± 0,08	4,18 ± 0,28
Cijanidin-3- <i>O</i> -glukozid	1,25 ± 0,32	2,42 ± 2,94	0,81 ± 0,06	0,39 ± 0,08
Petunidin-3- <i>O</i> -glukozid	9,49 ± 1,07	4,97 ± 0,48	4,65 ± 0,50	3,85 ± 0,13
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid	4,76 ± 1,34	9,12 ± 3,20	4,91 ± 0,20	3,99 ± 0,02
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid	61,56 ± 2,13	54,45 ± 2,89	41,28 ± 0,76	36,61 ± 1,19
Ukupni antocijan-3- <i>O</i> -glukozidi	84,55 ± 1,17	79,10 ± 3,99	56,15 ± 1,04	49,02 ± 0,72
<b>ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZID ACETATI</b>				
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat	2,00 ± 0,12	3,27 ± 0,03	1,45 ± 0,44	1,08 ± 0,23
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid acetat	27,74 ± 1,05	19,45 ± 2,89	11,19 ± 0,03	9,68 ± 0,52
Ukupni antocijan-3- <i>O</i> -glukozid acetati	29,73 ± 0,93	22,72 ± 2,86	12,63 ± 0,48	10,76 ± 0,29
<b>ANTOCIJAN-3-O-GLUKOZID <i>p</i>-KUMARATI</b>				
Peonidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	1,10 ± 0,50	1,02 ± 0,21	0,83 ± 0,13	0,82 ± 0,06
Malvidin-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarat	4,97 ± 0,65	5,13 ± 0,84	3,66 ± 0,19	3,22 ± 0,16
Ukupni antocijan-3- <i>O</i> -glukozid <i>p</i> -kumarati	6,07 ± 0,15	6,16 ± 1,05	4,49 ± 0,32	4,03 ± 0,09

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija.

\* Koncentracija spoja izražena u mg L<sup>-1</sup>.

#### 4.2. UTJECAJ VISOKONAPONSKOG ELEKTRIČNOG PRAŽNJENJA I DODATAKA ANTIOKSIDANSA NA SASTAV HLAPIVIH SPOJEVA VINA

Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa na koncentraciju hlapivih spojeva u bijelom vinu Graševina te crnom vinu Cabernet Sauvignon prikazan je u tablicama 6 i 7. Upotrebom SPME–GC/MS određeni su spojevi sorte i fermentacijske arome: norizoprenoidi, etilni esteri, acetatni esteri, ostali esteri, viši alkoholi te hlapive masne kiseline.

U sastavu norizoprenoida TDN-a (tablica 6) nakon 12 mjeseci starenja u odnosu na kontrolni uzorak uočen je pad koncentracije u tretiranom uzorku sa standardnim SO<sub>2</sub> te uzorku sa sniženim SO<sub>2</sub> i glutationom; dok je suprotan trend uočen u uzorku sa sniženim SO<sub>2</sub>.

S druge strane, tretiranje vina visokonaponskim električnim pražnjenjem niža koncentracija antioksidansa utjecala je na povećanje koncentracije  $\beta$ -damaskenona.

Nadalje, trendovi uočeni u sastavu etilnih estera (etil butanoat, etil heksanoat, etil oktanoat, etil dekanat i dietil sukcinat) bili su vrlo slični onima u sastavu acetatnih estera (etil acetat, *i*-butil acetat, *i*-amil acetat, heksil acetat i 2-feniletil acetat). Naime, tretiranje vina visokonaponskim električnim pražnjenjem uglavnom je utjecalo na smanjenje koncentracije estera bez jasnog utjecaja koncentracije antioksidansa. Koncentracije etilnih estera s obzirom na kontrolni uzorak su se uglavnom smanjile, osim par izuzetaka kod uzorka sa sniženim SO<sub>2</sub> gdje je primjerice vidljiv porast koncentracije kod etil hekanoata, etil dekanata i dietil sukcinata. Kod acetatnih estera izuzetak je etil acetat, gdje je vidljiv porast koncentracije u uzorku sa standardnim SO<sub>2</sub> i sniženim SO<sub>2</sub> uz dodatak glutaciona. Također, pad koncentracije u odnosu na kontrolni uzorak uočeno je u sastavu ostalih estera (metil oktanoat i metil dekanat).

S druge strane, tretman visokonaponskog električnog pražnjenja nije značajnije utjecao na promjene u sastavu viših alkohola (*i*-amil alkohol, 1-heksanol, *cis*-3-hexen-1-ol i 2-fenil etanol). U sastavu hlapivih masnih kiselina u svim tretiranim uzorcima uočene su niže koncentracije kaprilne kiseline, dok su kod kapronske i kaprinske kiseline u uzorku sa sniženim SO<sub>2</sub> zabilježene više koncentracije u odnosu na kontrolni uzorak.

Utjecaja visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa na koncentraciju hlapivih spojeva u vinu Cabernet Sauvignon prikazan je u tablici 7. Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako je nevedeni tretman utjecao na više koncentracije većine hlapivih spojeva u tretiranim uzorcima sa sniženom koncentracijom antioksidansa obzirom na kontrolni uzorak.

Tretman visokonaponskog električnog pražnjenja nakon 12 mjeseci starenja utjecao je više koncentracije norizoprenoida (TDN i  $\beta$ -damaskenon) u tretiranim nego u kontrolnom uzorku, uz izuzetak vina sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub>, gdje se uočene niže koncentracije.

Slični trendovi uočeni su u sastavu etilnih, acetatni i ostali estera, gdje je tretiranje vina visokonaponskim električnim pražnjenjem nakon 12 mjeseci starenja utjecalo na više koncentracije ovih spojeva u vinima sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> (sa i bez dodatka glutaciona) nego u kontrolnom vinu.

Tablica 6. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa na koncentraciju hlapivih spojeva u vinu Graševina

	UZORCI			
	kontrola	standardni SO <sub>2</sub>	sniženi SO <sub>2</sub> i glutation	sniženi SO <sub>2</sub>
<b>NORIZOPRENOIDI</b>				
TDN <sup>**</sup>	8,85 ± 0,38	2,99 ± 0,29	5,20 ± 0,91	10,27 ± 0,01
β-Damaskenon <sup>**</sup>	1,17 ± 0,10	2,43 ± 0,58	4,72 ± 0,31	5,59 ± 0,13
Ukupni norizoprenoidi <sup>**</sup>	10,02 ± 0,48	5,42 ± 0,87	9,92 ± 1,22	15,86 ± 0,12
<b>ETILNI ESTERI</b>				
Etil butanoat <sup>*</sup>	1,29 ± 0,02	0,89 ± 0,07	1,25 ± 0,05	1,24 ± 0,03
Etil heksanoat <sup>*</sup>	1,97 ± 0,08	1,23 ± 0,02	1,84 ± 0,23	2,05 ± 0,02
Etil oktanoat <sup>*</sup>	1,56 ± 0,11	0,66 ± 0,01	0,99 ± 0,18	1,40 ± 0,06
Etil dekanat <sup>*</sup>	1,12 ± 0,03	0,33 ± 0,00	0,57 ± 0,07	0,92 ± 0,02
Dietil sukcinat <sup>*</sup>	1,79 ± 0,04	1,52 ± 0,03	2,09 ± 0,13	2,31 ± 0,08
Ukupni etilni esteri <sup>*</sup>	7,71 ± 0,17	4,63 ± 0,01	6,73 ± 0,67	7,91 ± 0,11
<b>ACETATNI ESTERI</b>				
Etil acetat <sup>*</sup>	27,63 ± 0,47	30,31 ± 2,12	28,31 ± 0,97	26,81 ± 1,30
<i>i</i> -Butil acetat <sup>**</sup>	24,80 ± 2,48	14,08 ± 3,56	18,79 ± 0,30	13,53 ± 0,69
<i>i</i> -Amil acetat <sup>*</sup>	1,17 ± 0,03	0,71 ± 0,06	0,91 ± 0,06	0,98 ± 0,01
Heksil acetat <sup>*</sup>	0,09 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,00
2-feniletil acetat <sup>*</sup>	0,10 ± 0,00	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01
Ukupni acetatni esteri <sup>*</sup>	29,01 ± 0,50	21,16 ± 2,19	29,36 ± 1,04	27,96 ± 1,29
<b>OSTALI ESTERI</b>				
Metil oktanoat <sup>**</sup>	255,79 ± 21,87	123,81 ± 4,04	169,50 ± 33,71	235,76 ± 10,17
Metil dekanat <sup>**</sup>	11,76 ± 0,42	3,44 ± 0,09	5,56 ± 0,59	8,93 ± 0,18
Ostali esteri <sup>**</sup>	267,54 ± 22,29	127,24 ± 3,95	175,06 ± 34,30	244,69 ± 10,35
<b>VIŠI ALKOHOLI</b>				
<i>i</i> -Amil alkohol <sup>*</sup>	93,02 ± 1,73	86,07 ± 0,48	94,76 ± 0,01	92,42 ± 1,92
1-Heksanol <sup>*</sup>	1,57 ± 0,04	1,40 ± 0,04	1,58 ± 0,06	1,66 ± 0,01
<i>cis</i> -3-Heksen-1-ol <sup>**</sup>	153,64 ± 8,06	149,11 ± 3,52	157,40 ± 12,18	161,89 ± 4,87
2-Fenil etanol <sup>*</sup>	5,31 ± 0,49	4,55 ± 0,49	5,34 ± 0,05	5,82 ± 0,52
Ukupni viši alkoholi <sup>*</sup>	100,05 ± 1,29	92,17 ± 0,05	101,83 ± 0,01	100,06 ± 1,40
<b>HLAPIVE MASNE KISELINE</b>				
Kaprinska kiselina <sup>*</sup>	3,55 ± 0,06	2,86 ± 0,13	3,37 ± 0,14	3,71 ± 0,16
Kaprilna kiselina <sup>*</sup>	9,00 ± 0,24	6,80 ± 0,02	7,64 ± 0,03	8,53 ± 0,45
Kaprinska kiselina <sup>*</sup>	1,70 ± 0,42	1,11 ± 0,15	1,25 ± 0,09	1,77 ± 0,07
Ukupne masne kiseline <sup>*</sup>	14,25 ± 0,60	10,76 ± 0,30	12,26 ± 0,26	14,01 ± 0,67

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija.

\* Koncentracija spoja izražena u mg L<sup>-1</sup>. \*\* Koncentracija spoja izražena u µg L<sup>-1</sup>.

Tablica 7. Utjecaj visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa na koncentraciju hlapivih spojeva u vinu Cabernet Sauvignon

	UZORCI			
	kontrola	standardni SO <sub>2</sub>	sníženi SO <sub>2</sub> i glutation	sníženi SO <sub>2</sub>
<b>NORIZOPRENOIDI</b>				
TDN <sup>**</sup>	0,19 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,29 ± 0,06
β-Damaskenon <sup>**</sup>	2,23 ± 0,43	1,96 ± 0,49	2,70 ± 0,30	2,83 ± 0,86
Ukupni norizoprenoidi <sup>**</sup>	2,41 ± 0,45	2,06 ± 0,51	2,91 ± 0,33	3,11 ± 0,92
<b>ETILNI ESTERI</b>				
Etil butanoat <sup>*</sup>	0,32 ± 0,01	0,30 ± 0,06	0,40 ± 0,01	0,39 ± 0,02
Etil heksanoat <sup>*</sup>	0,38 ± 0,04	0,37 ± 0,09	0,54 ± 0,01	0,55 ± 0,13
Etil oktanoat <sup>*</sup>	0,24 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,34 ± 0,05	0,38 ± 0,16
Etil dekanooat <sup>*</sup>	0,11 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,13 ± 0,04
Dietil sukcinat <sup>*</sup>	1,16 ± 0,13	1,40 ± 0,11	2,02 ± 0,13	2,57 ± 0,70
Ukupni etilni esteri <sup>*</sup>	2,20 ± 0,21	2,29 ± 0,32	3,40 ± 0,23	4,01 ± 1,05
<b>ACETATNI ESTERI</b>				
Etil acetat <sup>*</sup>	32,22 ± 0,95	28,83 ± 3,90	37,94 ± 2,55	39,95 ± 0,65
<i>i</i> -Butil acetat <sup>**</sup>	29,69 ± 2,43	25,13 ± 6,55	29,35 ± 0,39	31,34 ± 0,48
<i>i</i> -Amil acetat <sup>*</sup>	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,06	0,50 ± 0,00	0,48 ± 0,05
Heksil acetat <sup>*</sup>	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01
2-Feniletil acetat <sup>*</sup>	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01
Ukupni acetatni esteri <sup>*</sup>	32,63 ± 0,97	29,26 ± 3,98	38,50 ± 2,55	40,49 ± 0,59
<b>OSTALI ESTERI</b>				
Metil oktanoat <sup>**</sup>	182,99 ± 20,13	150,32 ± 40,26	262,59 ± 24,58	193,47 ± 31,37
Metil dekanooat <sup>**</sup>	5,97 ± 0,83	3,03 ± 0,73	6,82 ± 1,33	8,01 ± 3,05
Ostali esteri <sup>**</sup>	188,96 ± 20,97	153,34 ± 40,98	269,41 ± 25,91	201,48 ± 28,31
<b>VIŠI ALKOHOLI</b>				
<i>i</i> -Amil alkohol <sup>*</sup>	218,20 ± 10,44	215,23 ± 2,98	223,54 ± 1,22	218,51 ± 15,86
1-heksanol <sup>*</sup>	2,39 ± 0,12	2,32 ± 0,18	2,56 ± 0,04	2,44 ± 0,06
<i>cis</i> -3-heksen-1-ol <sup>**</sup>	114,22 ± 2,96	106,56 ± 0,64	115,26 ± 2,90	117,85 ± 6,00
2-fenil etanol <sup>*</sup>	13,91 ± 2,13	18,05 ± 0,46	17,07 ± 0,67	16,98 ± 2,83
Ukupni viši alkoholi <sup>*</sup>	234,60 ± 8,43	235,69 ± 3,26	243,28 ± 1,86	238,04 ± 12,97
<b>HLAPIVE MASNE KISELINE</b>				
Kaprnska kiselina <sup>*</sup>	0,66 ± 0,12	0,70 ± 0,05	0,76 ± 0,07	0,80 ± 0,19
Kaprilna kisleina <sup>*</sup>	1,12 ± 0,18	1,19 ± 0,14	1,41 ± 0,04	1,40 ± 0,33
Kaprinska kiselina <sup>*</sup>	0,15 ± 0,05	0,15 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,05
Ukupne masne kiseline <sup>*</sup>	1,92 ± 0,35	2,03 ± 0,18	2,37 ± 0,13	2,37 ± 0,57

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dvaju mjerenja ± standardna devijacija.

\* Koncentracija spoja izražena u mg L<sup>-1</sup>. \*\* Koncentracija spoja izražena u µg L<sup>-1</sup>.

S druge strane u tretiranom vinu sa standardnom koncentracijom SO<sub>2</sub> uočene koncentracije niže ili slične kontrolnom vinu.

Nadalje, kao i kod bijelog vina, tretman visokonaponskog električnog pražnjenja u crnom vinu Cabernet Sauvignon nije značajnije utjecao na promjene u sastavu viših alkohola. S druge strane, obzirom na kontrolni uzorak, više koncentracije hlapive masne kiseline (kapronska, kaprilna i kaprinska) utvrđene su u uzrocima sa sniženom koncentracijom sumorovog dioksida (sa i bez glutaciona), ali ne i u vinu sa standardim udjelom SO<sub>2</sub> gdje nisu utvrđene značajnije promjene.

Ranije istraživanja o utjecaju visokonaponskog električnog pražnjenja pokazala su kako navedeni tretman nije negativno utjecao na aromatski profil soka jabuke i nektara višnje Maraske (Vukušić i sur., 2016). S druge strane, Križanović i sur. (2018) koji su proćavali utjecaj netermalnih tehnika (ultrazvuka, visokog tlaka i hladne plazme) na senzorske karakteristike vina utvrdili su negativano djelovanje plazme na sastav vina Cabernet Sauvignon. Svakako, utjecaj ovog tretmana na aromatski profil vina, a posebno njegove optimalne parametre i dugoroćni utjecaj potrebno je dalje istražit.

## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1. Visokonaponsko električno pražnjenje utjecalo je na blago smanjenje koncentracije ukupnih fenola, pojedinačnih fenolnih kiselina i flavan-3-ol monomera u bijelom vinu Graševina nakon 12 mjeseci dozrijevanja, pri čemu su više koncentracije navedenih spojeva utvrđene u vinima s višom koncentracijom antioksidansa (sumporovog dioksida i glutaciona).
2. Tretman visokonaponskim električnim pražnjenjem u bijelom vinu Graševina utjecao je na povećanje koncentracije flavan-3-ol dimera nakon 12 mjeseci dozrijevanja, neovisno o udjelu antioksidansa u vinu.
3. Visokonaponsko električno pražnjenje utjecalo je na značajno smanjenje koncentracije ukupnih fenola, ukupnih i slobodnih antocijana u crnom vinu Cabernet Sauvignon nakon 12 mjeseci dozrijevanja, pri čemu je viša koncentracija antioksidansa rezultirala i višom koncentracijom analiziranih spojeva.
4. Tretman visokonaponskim električnim pražnjenjem u crnom vinu Cabernet Savignon nakon 12 mjeseci dozrijevanja nije utjecao na promjene u sastavu ukupnih tanina.
5. Tretman visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa nakon 12 mjeseci starenja utjecao je na smanjenje koncentracije hlapivih spojeva u vinu Graševina osim kod određenih iznimki, gdje je uočen blagi porast koncentracije u uzorku sa sniženim SO<sub>2</sub>.
6. Tretman visokonaponskog električnog pražnjenja i dodatka antioksidansa nakon 12 mjeseci starenja utjecao je na povećanje koncentracije hlapivih spojeva u vinima Cabernet Sauvignon sa sniženom koncentracijom SO<sub>2</sub> (sa i bez dodatka glutaciona).
7. Dodatak antioksidansa u vino (SO<sub>2</sub> i glutacion) utjecao na stabilnost polifenolnih i hlapivih spojeva, pri čemu je dodavanjem SO<sub>2</sub> postignut najbolji učinak kod crnih i bijelih vina.



## 6. LITERATURA

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

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

Bayer, E., Kupfer, G., Reuther, K. H. (1968) Anwendung der Gaschromatographie zur Analyse künstlicher und natürlicher Aromastoffe. *Z. analyt. Chem.* **164**, 1–10.

Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. (1996) Principles and practice of winemaking, 1. izd., Chapman and Hall, New York.

Bourzeix, M. (1986) A study of catechins and procyanidins of grape clusters, the wine and other by products of the vine. *Bull. l'O.I.V.* **59**, 1171–1254.

Bursač Kovačević, D., Gajdoš Kljusuric, J., Putnik, P., Vukušić T., Herceg, Z., Dragović-Uzelac, V. (2016b) Stability of polyphenols in chokeberry juice treated with gas phase plasma. *Food Chem.* **212**, 323-331.

Bursač Kovačević, D., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Pedisić, S., Režek Jambrak, A., Herceg, Z. (2016a) Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chem.* **190**, 317-323.

Clarke, R. J., Bakker, J. (2004) Wine flavour chemistry, 1. izd., Blackwell Publishing Ltd., Oxford.

Del Almo Sanza, M., Nevares Dominguez, I. (2006) Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods: Anthocyanin composition. *Anal. Chem. Acta* **23**, 255-263.

Delsart, C., Grimi, N., Boussetta, N., Miot Serti, C., Ghidossi, R., Vorobiev, E., Mietton Peuchot, M. (2015) Impact of pulsed-electric field and high-voltage electrical discharges on red wine microbial stabilization and quality characteristics. *J. Appl. Microbiol.* **120**, 152-164.

Díaz-Maroto, M. C., Schneider, R., Baumes, R. (2005) Formation pathways of ethyl esters of branched short-chain fatty acids during wine aging. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 3503–3509.

- Elez Garofulić, I., Režek Jambrak, A., Milošević, S., Dragović-Uzelac, V., Zorić, Z., Herceg, Z., (2015) The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca) juice. *LWT-Food Sci. Technol.* **62**, 894-900.
- Fulcrand, H., Duenas, M., Salas, E., Cheynier, V. (2006) Phenolic reactions during winemaking and aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 289-297.
- Gomez-Plaza, E., Gil-Munoz, R., Lopez-Roca, J. M., Martinez, A. (2000) Color and phenolic compounds of a young red wine. Influence of wine-making techniques, storage temperature, and length of storage time. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 736-741.
- Hashizume, K., Samuta, T. (1997) Green Odorants of Grape Cluster Stem and Their Ability To Cause a Wine Stemmy Flavor. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1333-1337.
- Hennig, K., Villforth, F. (1942) Die Aromastoffe der Weine. *Vorrat Spfl Lebensmittelforsch.* **5**, 181–200.
- Herceg, Z., Bursač Kovačević, D., Kljusurić Gajdoš, J., Režek Jambrak, A., Zorić, Z., Dragović-Uzelac, V. (2016) Gas phase plasma impact on phenolic compounds in pomegranate juice. *Food Chem.* **190**, 665–672.
- Hjelmeland, A. K., Ebeler, S. E. (2015) Glycosidically Bound Volatile Aroma Compounds in Grapes and Wine: A Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **66**, 1-11.
- Jackson, R. S. (2008) Wine science: Principles and applications, 3. izd., Academic press, Elsevier, Burlington.
- Kennedy, J. A., Saucier, C., Glories, Y. (2006) Grape and wine phenolics: History and perspective. *Am. J. Enol. Vitic.* **57**, 239-248.
- Kritzinger, E. C., Bauer, F. F., Toit, W. J. (2013) Role of Glutathione in Winemaking: A Review. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 269–277.
- Križanović, S., Kelšin, K., Režek Jambrak, A., Bosiljkov, T., Vukušić, T., Marković, K., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K. (2018) Influence of high power ultrasound, high hydrostatic pressure and non-thermal plasma on the changes in sensory and color properties of wine. Proceedings of the interdisciplinary conference on Natural resources green technology and sustainable development/3. GREEN 2018, Zagreb, str. 6-11.

- Lambrechts, M. G., Pretorius, I. S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma: A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 97–129.
- Langmuir, I. (1928) Oscillations in ionized gases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **14**, 37-627.
- Lee, C., Jaworsky, A. (1987) Phenolic compounds in white grapes in New York. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**, 277–281.
- Linsenmeier, A. W., Rauhut., D , Sponholz, W. R. (2010) Ageing and flavour deterioration in wine. *Food Sci. Technol. Nutri.* **16**, 459-493.
- Lukić, K., Tomašević, M., Čurko, N., Vukušić, T., Kovačević Ganić, K. (2019) The impact of high voltage electrical discharge plasma on the chromatic characteristics and phenolic composition of red and white wines. *Innov. Food Sci. Emerg.* **53**, 70-77.
- Macheix, J. J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990) *Fruit phenolics*, 1. izd., CRC Press, Boca Raton.
- Marais, J., Pool, H. J. (1980) Effect of storage time and temperature on the volatile composition quality of dry white table wines. *Vitis* **19**, 151–164.
- Moisan, M., Barbeau, J., Moreau, S., Pelletier, J., Tabrizian, M., Yahia, L. H. (2001) Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int. J. Pharm.* **226**, 1–21.
- Monagas M., Bartolomé B. (2009) Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Compounds. U: *Wine Chemistry and Biochemistry* (Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C., ured.), Springer, New York, str. 439-462.
- Moreno-Arribas, M. V., Polo, M. C. (2009) *Wine Chemistry and Biochemistry*, Springer, New York.
- Niemira, B.A. (2012) Cold Plasma Decontamination of Foods: A Review. *Annu. Rev. Food. Sci. T.* **3**, 125-142.
- Nikolantonaki, M., Julien, P., Coelho, C., Roullier-Gall, C., Ballester, J., Schmitt-Kopplin, P., Gougeon, R. D. (2018) Impact of Glutathione on Wines Oxidative Stability: A Combined Sensory and Metabolomic Study. *Front. Chem.* **6**, 182.

- Noriega, E., Sharma, G., Laca, A., Diaz, M., Kong, M. G. (2011) Cold atmospheric gas plasma disinfection of chicken muscle and chicken skin contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* **28**, 1293–1300.
- Pankaj, S. K., Keener, K. M. (2018) Cold plasma processing of fruit juices. U: Fruit juices—Extraction, composition, quality and analysis (Rajauria, G., Tiwari, B. K., ured.), Elsevier Inc, Dublin, str. 529-537.
- Pérez-Magariño, S., González-San José, M. L. (2006) Polyphenls and colour varaibility of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chem.* **96**, 197-208.
- Pisarnitskii, A. F. (2001) Formation of Wine Aroma: Tones and Imperfections Caused by Minor Components: A Review. *Russ. Ac. Sc.* **33**, 71.
- Rapp A, Günter, M., Ullemeyer H. (1985) Über Veränderungen der Aromastoffewährend der Flaschenlagerung von Weißweinen der Rebsorte Riesling. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **180**, 109–116.
- Rapp, A., Mandery, H. (1986) Wine aroma. *Experientia.* **42**, 873-884.
- Rein, M. J., Heinonen, M. (2004) Stability and enhancement of berry juice color. *J Agric Food Chem.* **52**, 3106-3114.
- Rentzsch, M., Schwarz, M., Winterhalter, P., Hermosin-Gutierrez, I. (2007) Formation ofhydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Grenache wines: precursor levels and evolution during aging. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 4883-4888.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006) Handbook of Enology Volume 2, The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments, 2. izd., John Wiley & Sons, Chichester.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2000) Handbook of Enology. The Microbiology of Wine and Vinifications, 2. izd., John Wiley and Sons, New York.
- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1965) Determination of Anthocyanins in Red Wine. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **9**, 2649-2652.

- Ribéreau-Gayon, P., Stonestreet, E. (1966) Le dosage des tannins du vin rouge et la détermination de leur structure. *Chim. Anal.* **48**, 188-196.
- Simpson, R. F. (1979) Aroma composition of bottle aged white wine. *Vitis* **18**, 148–154.
- Singleton, V. L., Rossi, A. J. (1965) Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **16**, 144-158.
- Sonni, F., Clark, A. C., Prenzler, P. D., Riponi, C., Scollary, G. R. (2011) Antioxidant Action of Glutathione and the Ascorbic Acid/Glutathione Pair in a Model White Wine. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 3940–3949.
- Spillman, P. J. (1997) Oak wood contribution to wine aroma. Doctoral theses, University of Adelaide, Adelaide.
- Swiegers, J., Bartowsky, E., Henschke, P., Pretorius, I. (2005) Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Aust. J. Grape Wine. Res.* **11**, 139-173.
- Thirumdas, R., Sarangapani, C., Annapure, U. S. (2014) Cold Plasma: A novel Non-Thermal Technology for Food Processing. *Food Biophys.* **10**, 1–11.
- Torrea, D., Fraile, P., Garde, T., Ancin, C. (2002) Production of volatile compounds in the fermentation of Chardonnay musts inoculated with two strains of *Saccharomyces cerevisiae* with different nitrogen demands. *Food Control* **14**, 565-571.
- Vukušić, T. (2016) Application of cold plasma in processing of fruit juices. Doctoral thesis, University of Zagreb, Zagreb.
- Wang, X. D., Bohlscheid, J. C., Edwards, C. G. (2002) Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 349-359.
- Waterhouse, A. L. (2002) Determination of Total Phenolics. *Food Anal. Chem.* **6**, 1-8.
- Wenzel, E., Somoza, V. (2005) Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**, 472-481.
- Wildenrad, H. L., Singleton, V. L. (1974) Production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **25**, 19–126.

Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H., Nury, F. S. (1999) Wine Analysis and Production, 1. izd., Springer, Boston.

## Izjava o izvornosti

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

---

## Izjava o izvornosti

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

*Manja Julović*

---