Utjecaj maceracije na sastav polifenola vina Plavac mali i Babić

Božiković, Šime-Frane

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:832157

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu

Agronomski fakultet

Šime Frane Božiković

Utjecaj maceracije na sastav polifenola vina Plavac mali i Babić

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

Hortikultura- Vinogradarstvo i vinarstvo

ŠIME-FRANE BOŽIKOVIĆ

Utjecaj maceracije na sastav polifenola vina Plavac mali i Babić

DIPLOMSKI RAD

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ana Jeromel

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad je ocijenjen i obranjen dana _____

s ocjenom _____ pred Povjerenstvom u sastavu:

1. Izv. prof. dr. sc. Ana Jeromel _____
2. Doc. dr. sc. Leo Gracin _____
3. Doc. dr. sc. Marko Karoglan _____

Sažetak

Kvalitetu vina u značajnoj mjeri definira polifenolni sastav vina. Na sastav polifenola vina utječe sorta grožđa, primijenjena tehnologija prerade, maceracija te uvjeti tijekom dozrijevanja vina. Polifenoli definiraju boju, trpkoću, gorčinu i strukturu vina. Ovisno o primijenjenim uvjetima tijekom maceracije dolazi do različite ektrakcije polifenolnih spojeva u vino. Parametri koji utječu na sastav polifenola su trajanje maceracije, temperatura, kisik, SO_2 te vrsta ili način maceracije.U ovom radu će se analizirati sastav polifenola vina Plavac mali i Babić u dvije verzije maceracije. Primjenjene su otvorena maceracija u inoxu i maceracija u drvenim bačvama (vinification integrale). Cilj rada je definirati kako su različiti uvjeti maceracije utjecali na sastav polifenola vina nakon 8 mjeseci dozrijevanja u korištenim barrique bačvama. Koncentracije polifenola bile su kod jedne i druge sorte povišene kod integralne metode vinifikacije.

Ključne riječi: Plavac mali, Babić, polifenoli, vinification integrale, konvencionlna maceracija

Summary

Wine quality is significantly defined by the polyphenolic composition of the wine. The wine polyphenolic content is affected by grape variety, technology of wine production, maceration techniques, conditions during ageing. Polyphenols determine the color, astringency, bitternes and wine structure. Depending on maceration conditions different kinds and amounts of polyphenols are extracted into the wine. Paramters which affect polyphenol content are maceration duration, temperature, oxygen, SO_2 and the type of maceration. In this dissertation polyphenol content of Plavac mali and Babić will be analysed with two different maceration techniques. The open type of maceration in stainless steel was used and maceration in wooden barrels (vinification integrale). The aim of this dissertation was to define how different types of maceration affect polyphenol content, after it aged for 8 months in used barrique barrels. The concentrations of polyphenols were at both varietys higher at the vinification integrale.

Key words: Plavac mali, Babić, polyphenols, vinification integrale, conventionally maceration

Sadržaj:

1. Uvod.....7

2. Pregled literature.....8

2.1. Fenolne kiseline i njihovi derivati (Neflavonoidi).....8

2.2. Flavonoidi.....4

2.2.1. Flavonoli.....5

2.2.2. Antocijani.....5

2.2.3. Tanini.....7

3. Eksperimentalni dio.....11

3.1. Materijali.....11

3.1.1. Uzorci vina.....11

3.1.2. Kemikalije i sredstva.....12

3.1.3. Oprema i aparatura.....13

3.2. Metode.....13

3.2.1. Određivanje kromatskih karakteristika vina.....13

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola.....14

3.2.3. Određivanje ukupnih antocijana.....16

3.2.4. Određivanje ukupnih tanina.....18

3.2.5. Određivanje slobodnih antocijana primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC).....19

4. Rezultati i rasprava.....21

4.1. Ukupni sadržaj polifenola u vinu Plavac mali i Babić 21

4.2. Ukupni sadržaj tanina u vinu Plavac mali i Babić.....24

4.3. Ukupni sadržaj antocijana u vinu Plavac mali i Babić 26

4.4. Intenzitet boje vina Plavac mali i Babić.....28

4.5. Nijansa boje vina Plavac mali i Babić 30

4.6. Kompozicija boje vina Plavac mali i Babić.....32

4.7. Koncentracija slobodnih antocijana u vinu Plavac mali i Babić.....34

5. Zaključak 36

6. Literatura.....37

1. Uvod

Plavac mali najznačajnija je sorta crnog grožđa u Republici Hrvatskoj, a zauzima površinu od 1457 ha, sa brojem trsova od 11 629 569. HRZVV(Mihaljević, B.,2007). Najveći dio vinograda rasprostranjeni su u srednjoj i južnoj Dalmaciji na poluotoku Pelješcu, te na otocima Hvaru, Braču, Visu i Korčuli, gdje se ujedno i proizvode najpoznatija vina ove sorte. Babić je po zastupljenosti u RH na 10. mjestu, a uzgaja se uglavnom u okolici Primoštena.

Jedan od najvažnijih čimbenika kvalitete crnog vina predstavlja ukupna koncentracija polifenola. Polifenoli imaju utjecaj na boju, okus, trpkoću, gorčinu i potencijal starenja vina. Raznim metodama maceracije nastoji se postići što viša ekstrakcija polifenola iz kožice bobice u mošt, koji će se kasnije nalaziti u vinu. Koncentracija polifenola vina ovisi o sorti, klimatskim uvjetima, ampelotehničkim zahvatima, tip maceracije, temperatura maceracije, prisustvo kisika, SO_2 i uvjeti tijekom dozrijevanja vina

Cilj ovog rada je istražiti ima li razlike u količini pojedinih polifenola vina napravljenih konvencionalnom metodom maceracije i integralnom metodom maceracije, u vinu Plavac mali i vinu Babić, nakon što su vina odležala 8 mjeseci u korištenim barrique bačvama. Za pretpostaviti je da će količina polifenola u vinima dobivenim integralnom vinifikacijom biti veća u odnosu na vina dobivena konvencionalnom vinifikacijom. To je za pretpostaviti jer će se tijekom maceracije u drvenim bačvicama u vino ekstrahirati polifenoli iz kožice bobice i polifenoli iz drva bačvice, a u konvencionalnoj maceraciji će se ekstrahirati samo polifenoli iz kožice bobice.

2. Pregled literature

Polifenoli

Fenolni spojevi čine raznoliku skupinu sekundarnih metabolita koje se nalaze i u grožđu i u vinu. Sadržaj i sastav fenola u vinu nastalom preradom grožđa uvelike je pod utjecajem tehnologije proizvodnje i dorade kojem je grožđe podvrgnuto. Tijekom procesa prerade i dozrijevanja dolazi do mnogih kemijskih promjena pri kojima se pojavljuju neki novi spojevi, a pritom dolazi do nestanka drugih. Time se mijenja karakteristični omjer ukupnih fenola kao i drugi kvalitativni i kvantitativni parametri unutar fenolnog profila.U proizvodnji vina polifenolni spojevi imaju jako važnu ulogu. Odgovorni su za većinu razlika između bijelih i crnih vina, te su odgovorni za boju i aromu crnih vina. Imaju poželjan utjecaj na zdravlje, odgovoran za „Francuski paradoks“. Imaju baktericidna, antioksidativna i vitaminska svojstva koja štite potrošače od kardiovaskularnih oboljenja.Ovi spojevi u vino dolaze sa različitih dijelova bobice, a u prosjeku 65% se nalazi u sjemenci, 30 % se nalazi u kožici, a 5 % se nalazi u mesu bobice (ovisno o sorti).

Osnovna podjela polifenola

2.1. Fenolne kiseline i njihovi derivati (neflavonoidi)

Fenolne kiseline podijeljene su na dvije osnovne skupine: benzojeve kiseline koje sadrže sedam atoma ugljika (C6 – C1) i cimetne kiseline sa devet atoma ugljika (C6 – C3). Ovi spojevi uglavnom postoje u obliku hidroksibenzojeve kiseline ili hidroksicimetne kiseline, bilo u slobodnom ili vezanom obliku.Koncentracije se kreću između 100-200 mg/l u crnim vinima i 10-20 mg/l u bijelim vinima.Hidroksibenzojeve kiseline razlikuju se po mjestu supstitucije na benzenskom prstenu. U grožđu, su uglavnom zastupljene kao kombinacije glikozida, iz kojih se izdvajaju kiselom hidrolizom, ili su prisutni kao esteri (galni i elaginski tanini), iz koji se izdvajaju pomoću alkalne hidrolize. Najzastupljenije su para – hidroksibenzojeva kiselina, prokatehinska, vanilinska, galna i siringinska kiselina. Galna kiselina se najčešće predstavlja kao najvažniji fenolni spoje jer je prekursor svih hidrolizirajućih tanina. U vinu su identificirani i etil esteri tih fenola (Garrido, 2013).

Hidroksicimetne kiseline su najreprezentativnija skupina fenolnih kiselina u grožđu i u vinu. Najznačajniji su fenoli u bijelim vinima, a zastupljeniji spojevi su: para – kumarna kiselina, kafeinska kiselina, ferulinska, sinapinska kiselina, kaftarna kiselina i kutarna kiselina. Ove hidroksicimetne kiseline usko su povezane s procesom posmeđivanja vina te su prekursori hlapljivih fenola koji primarno nastaju radom pojedinih mikroorganizama iz roda *Brettanomyces*. Hidroksicimetne kiseline mogu imati cis– i trans– izomerni oblik, s time da je trans– izomer češći u prirodi.Trans– kaftarna kiselina i trans– fertarna kiselina uglavnom se nalaze u mesu, i tijekom prešanja grožđa, brzo se oslobađaju u sok, dok se p – kutarna kiselina ponaša suprotno. Slabije se oslobađa u sok tijekom prešanja jer se uglavnom nalazi u kožici. Ti su spojevi poznati zbog svog utjecaja na astringentnost grožđa i vina.U vinu se nalaze u slobodnom obliku ali najveća količina je esterificirana sa vinskom kiselinom(Rib´ereau-Gayon, 1965).

Hidroksicimetne kiseline su bezbojne u razrijeđenoj alkoholnoj otopini, ali su vrlo osjetljive na oksidaciju (posebno kaftarinska), uslijed čega poprimaju žute, tamnožute i smeđe tonove (Boulton i sur. 1998; Ribéreau-Gayon i sur., 2000). Kao primarni supstrat za polifenoloksidaze, odgovorne su za oksidaciju i posmeđivanje bijelih mošteva (Cheynier i sur., 1989; Jackson, 2008).

Tirozol ili p hidroksi fenil etil alkohol može biti uvršten u ovu grupu spojeva (Ribereau-Gayon i Sapis, 1965). Uvijek je prisutan u crnim i bijelim vinima (20-30 mg/l), a stvara se tijekom alkoholne fermentacije iz tirozina (p-hidroksifenilalanin), sintetiziran od strane kvasaca. Ovaj spoj ostaje u vinu u relativno stalnoj koncentraciji tijekom starenja, a pojavljuje se u pratnjidrugih nefenolnih alkohola kao što su triptofol (0-1 mg/l) i fenil etil alkohol (10-75 mg/l).

Kumarini se mogu smatrati derivatima cimetne kiseline, formirani unutarmolekularnom esterifikacijom OH skupine fenola na *α* mjestu ugljikovog lanca. Ove molekule se nalaze u hrastu, u glikozidnom obliku (esculin i scopoline) u zelenom drvu ili u aglikonskom obliku (eskuletin i skopoletin) u starom drvu. Iako su jako malo količine (nekoliko µg/l) kumarina pronađene u vinu dozrelom u drvenim bačvama, oni još uvijek utječu na organoleptična svojstva vina, glikozidi su gorki, a aglikoni su kiseli sa pragom detekcije od 3 µg/l.

Stilbeni su fenolni spojevi koji sadrže dva aromatska prstena povezana etilenskim mostom. Resveratrol (3,5,4' – trihidroksistilben) je najznačajniji i najistraživaniji predstavnik stilbena, prisutan u grožđu i vinu. Njegova koncentracija u vinu kreće se između 1-3 mg/l Osim u vinu, pronađen je i u listu i kožici, iako mu koncentracija u tim dijelovima značajno opada tijekom dozrijevanja grožđa. Resveratrol neki autori smatraju fitoaleksinom, odnosno toksinom koji nastaje u grožđu zbog gljivične infekcije (Botrytis cinerea ili Plasmopora viticola) ili kao produkt abiotskog stresa (UV zračenje, kataliza teških metala…). U prirodi se resveratrol nalazi u obliku dva izomera – cis i trans izomera i to u slobodnom i vezanom obliku. U vezanom obliku se veže na 3 – O – β – D – glukozide pri čemu nastaju cis i trans resveratrol – glukozid. Stilbeni koji se javljaju u oligomernim i polimernim oblicima nazivaju se viniferini (Garrido, 2013).

2.2. Flavonoidi

Flavonoidi su najvažnija i najopsežnija grupa polifenola. Osnovna struktura (aglikon) flavonoida temelji se na 2 aromatska prstena povezanih piranskim prstenom. Iz ove osnovne strukture nastaje velik broj različitih polifenolnih spojeva koji se razlikuju po broju i položaju hidroksilne (-OH) i metoksi (-OH3C) skupine. Važan dio strukture i boje vina potječe od flavonoida koji se nalaze u kožici, sjemenkama i mesu grožđa. Flavonoidi obuhvaćaju različite vrste spojeva poput flavona, flavonola, flavanona, flavononola, flavana, flavanola, antocijanidina i antocijanina, kalkona i dihidrokalkona.Flavonoidi se u prirodi javljaju kao slobodni ili vezani s drugim flavonoidima, šećerima, neflavonoidima ili kombinacijom istih. Kemijska raznolikost proizlazi iz mnogo različitih aglikona i glikozida kao i pojave reakcija kondenzacije pri čemu monomerni flavonoidi tvore dimerne i veće forme stvarajući cijeli niz heterogenih struktura

2.2.1. Flavonoli

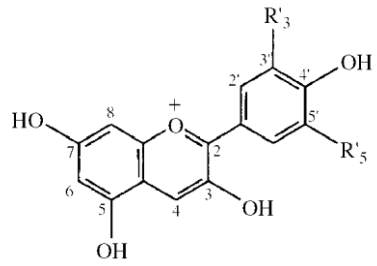
Flavonoli su žuti pigmenti u glikozidnoj formi, smješteni u lišću loze i kožici bobice s ulogom zaštite od UV zračenja. Neki flavonoli su detektirani i u mesu bobice, dok u sjemenkama nisu prisutni (Ribereau- Gayon, 1964).U grožđu su identificirani glikozidi sljedećih aglikona: kvercetin, kemferol, izoramnetin, miricetin, laricitrin i siringetin.U bijelim vinima su detektirani samo kvercetin, kemferol i izoramnetin. Flavonoidi miricetin, laricitrin i siringetin su specifični za crne kultivare i nisu pronađeni u ni jednom bijelom kultivaru.

Flavanoli (flavan-3-oli) su najzastupljeniji flavonoidi u grožđu. Koncentracija i sastav flavanola u grožđu ovisi o mnogo čimbenika, kao što su kultivar, godina, ekološki uvjeti i rok berbe (Rodríguez Montealegre i sur., 2006; Moreno-Arribas i Polo, 2009). Flavanoli su prisutni u raznim dijelovima loze, uključujući drvo, lišće, peteljke i plodove. Unutar bobice, najviše ih ima u sjemenkama- u vakuolama sjemene opne, zatim kožici crnih i bijelih kultivara dok su u mesu nađeni samo u tragovima i to uglavnom procijanidini B1 do B4 (Moreno-Arribas i Polo, 2009).Flavanoli se mogu naći u obliku slobodnih monomera (katehini), oligomera i polimera koje nazivamo proantocijanidini ili kondenzirani tanini. Glavni monomer u grožđu *Vitis vinifera* je katehin i njegov izomer epikatehin, a u manjoj mjeri galatni ester epikatehina, epikatehingalat te galokatehin (Moreno-Arribas i Polo, 2009).

2.2.2. Antocijani

Antocijani su crveni pigmenti grožđa, smješteni najvećim dijelom u pokožici, a kod nekih sorata i u mesu bobice. Nalaze se i u lišću, ali tamo se tek pojave na kraju vegetacije.

Antocijanidini zajedno sa molekulom glukoze čine antocijane, glikozidni oblik antocijanidina.Struktura antocijanidina se naziva flavilium kation. Antocijanidini su građeni od benzenskog prstena spojen na heterociklički prsten koji sadrži kisik, a taj prsten je spojen na treći benzenski prsten preko dva atoma ugljika (kovalentna veza).Pet molekula je identificirano u grožđu i vinu, sa dvije ili tri OH ili OCH_3 grupe, na bočnoj jezgri.



R'_3	R'_5	Ime aglikona
OH	H	Cyanidin
OCH_3	H	Peonidin
OH	OH	Delphinidin
OH	OCH_3	Petunidin
OCH_3	OCH_3	Malvidin

Slika 2. Struktura antocijanidina u grožđu i vinu (P. Ribéreau-Gayon 2006)

Glavna razlika između velikog broja različitih antocijana je u broju hidroksilnih skupina, prirodi i broju vezanih molekula šećera, alifatskih ili aromatskih karboksilata spojenih na šećer u molekuli i položaju tih veza (Kong et al., 2003). Do sada je u prirodi identificirano više od 500 različitih antocijana (Andersen i Jordheim, 2006) i 23 antocijanidina (Andersen i Jordheim, 2006; Kong et al., 2003; Rein, 2005).

Ove molekule su puno stabilnije u glikozidnom obliku (antocijan) nego u aglikonskom obliku (antocijanidin). U grožđu i vinu su pronađeni samo monoglukozidni antocijani i acilirani monoglukozidni antocijani. Aciliranje može biti sa p- kumarnom, kafeinskom i octenom kiselinom.Prisustvo diglukozida karakteristično je za neke vrste iz rodova Vitis (V. riparia i V. rupestris) (Ribereau- Gayon, 1959).

Boja ovih pigmenata ovisi o uvjetima medija u kojem se nalaze (pH i SO_2), kao i o molekularnoj strukturi. Izmjena bočnog prstena dovodi do bathochromic efekta absorpcije maksimalne valne duljine, prema ljubičastom. Fiksiranje glukoze i aciliranje, dovodi do stvaranja narančaste boje (Amrani-Joutei, 1993). Molekule pigmenata smještene su u vakuolama zajedno sa drugim polifenolima (fenolnim kiselinama, flavonoidima, itd.) te utječu na njihovu boju. Kopigmentacija uglavnom vinu daje ljubičastu nijansu. (Ribereau- Gayon, 1959).

Ovi čimbenici objašnjavaju različite boje crnog grožđa. Sve sorte vinove loze imaju iste osnovne strukture antocijanidina, ali postoje male razlike u sastavu. Između pet antocijanidina, malvidin je najzastupljeniji, sa 90% zastupljenosti u sorti Grenache do 50 % u sorti Sangiovese. Smatra se da je malvidin monoglukozid odgovoran za osnovnu boju crnog grožđa kao i crnog vina. Količina aciliranih monoglukozida znatno varira ovisno o sorti grožđa. (Ribereau- Gayon, 1959).

U vinu prisustvo etanolasmanjuje učinak kopigmentacije i acilirani antocijani nestaju nakon nekoliko mjeseci poslije fermentacije, tako da nije dobro njih koristiti za identificiranje sorata vinove loze. Tako da ostaje samo 5 monoglukozida i to pretežito malvidin. Koncentracije variraju u velikoj mjeri ovisno o starosti vina i sorti vinove loze. Kod Pinot-a crnog koncentracije se kreću oko 100 mg/l dok kod Syrah-a i Cabernet Sauvignon-a imamo koncentracije od 1500 mg/l. Nakon fermentacije koncentracije opadaju drastično, u prvih nekoliko godina tijekom starenja u boci i u drvenoj bačvi dok ne dostignu minimum od 0-50 mg/l. Najveći dio ovih pigmenata se spaja i kondenzira sa taninima u vinu, da bi stvorili drugu, još stabilniju grupu molekula boje, tvoreći stabilnije komplekse. Ovi kompleksni antocijana odgovorni su za boju vina ali ih nije moguće identificirati standardnim metodama.Ostale frakcije antocijana nestaju, jednim dijelom se razgrade utjecajem vanjsih čimbenika (temperatura, svjetlost, kisik i drugih) ili se iztalože. Ovaj proces je štetan jer dovodi do gubitka boje što utječe na kvalitetu vina.

2.2.3. Tanini

Tanini su polifenolni spojevi karakterističnog astringentnog svojstva, i u njihovoj prisutnosti dolazi do taloženja bjelančevina. Dijele se u dvije skupine: na hidrolizirajuće tanine i na nehidrolizirajuće tanine ili kondenzirane tanine. Prirodni tanini prisutni u grožđu uglavnom su kondenzirane građe (Garrido, 2013).U kemijskom smislu, tanini su dosta veliki spojevi, stvoreni polimerizacijom elementarnih molekula sa fenolnom funkcijom. Njihova konfiguracija utječe na njihovu reaktivnost. Moraju biti dovoljno veliki kako bi stvorili stabilne strukture sa proteinima, ali ako su prevelike, može se dogoditi da budu predaleko od aktivne strane proteina. Molekularna težina aktivnih tanina kreće se od 600 do 3500.

Hidrolizirani tanini sadrže galotanine i elagitanine koji otpuštaju galnu kiselinu i elaginsku kiselinu, nakon kiselinske hidrolize, također sadržavaju molekulu glukoze. Dva glavna elagitaninska izomera u hrastu za izradu bačava su veskalagin i kastalagin (M=934), kao i dva manje važna sastojka, grandinin i roburin. Djelomičnom hidrolizom veskalagina i kastalagina, nastaje veskalin i kastalin (M=632).Navedene molekule su topive u vodi i otapaju se brzo u razrijeđenoj alkoholnoj otopini kao što su vino i rakija (Moutounet et al., 1989). Imaju važnu ulogu

u starenju bijelog i crnog vina u hrastovim bačvama, zbog njihovih oksidativnih (Vivas i Glores, 1993, 1996) i aromatičnih svojstava (Pocock et al., 1994). Elagitaninski sastav ekstrakta srčike drveta ovisi o vrsti hrasta. Sva 4 monomera i 4 dimera (roburin A, B, C i D) elagitanina prisutni su u tri vrste europskog hrasta, dok Američke vrste praktično nemaju dimera.

Hidrolizirajući tanini se prirodno ne nalaze u grožđu. Sa druge strane, oni su glavni komercijalni tanini legalno dozvoljeni kao dodaci vinu. Elaginska kiselina u vinu potječe od drvenih posuda ili od dodanih enoloških tanina.

Kondenzirani tanini u grožđu i vinu su više ili manje kompleksni polimeri flavan-3-ola ili katehina. Osnovne strukturne jedinice su (+)- katehin i (-) –epikatehin. Zagrijavanjem ovih polimera u kiseloj otopini dolazi do oslobađanja visoko nestabilnih ugljikovih kationa koji se pretvaraju u smeđi kondenzacijski proizvod, uglavnom crveni cyanidin. To objašnjava zašto su ovi spojevi poznati kao procijanidini, što zamjenjuje nekad korišten izraz leukocijanidin.

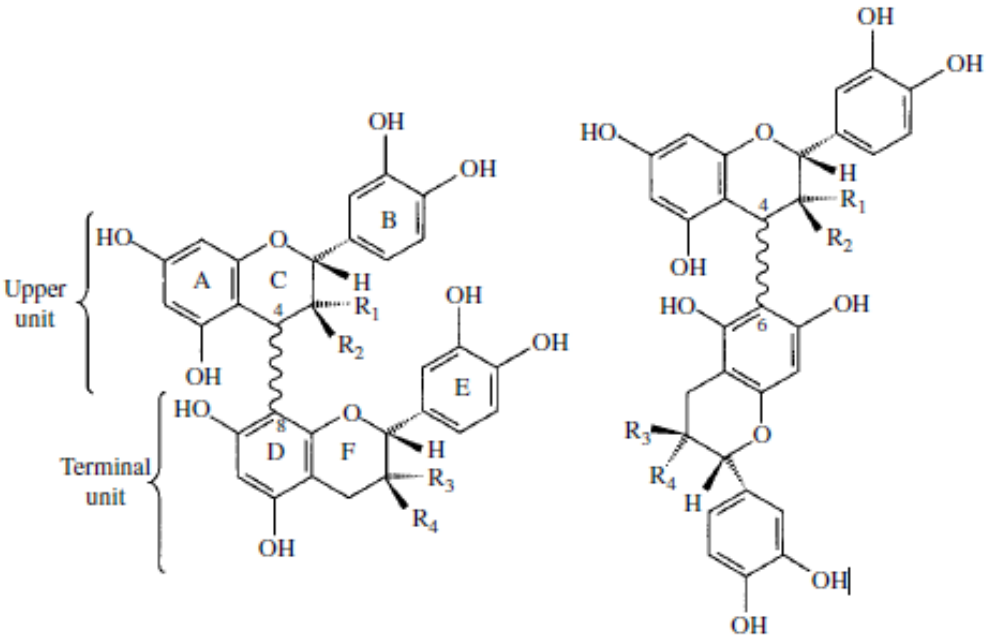
Analiza ovih molekula dosta je komplicirana, radi velike strukturne raznolikosti. Usprkos svim dostignućima u tekućinskoj kromatografiji, masenoj spektrometriji i NMR, sve strukture još uvijek nisu analizirane, samo dimeri procijanidina i neki od trimera su kompletno identificirani.

Moguće je izollirati i frakcionirati sljedeće sastojke grožđa i vina: (+) – katehin, galokatehin, (-) – epikatehin, epigalokatehin i epikatehin-3-0 galat. Postoje dimerni, trimerni, oligomerni i kondenzirani procijanidini (Burger i sur., 1990; Kondo i sur., 2000). Osnovne katehinske jedinice se ne smatraju taninima, jer je njihova molekularna masa premala te imaju ograničena svojstva u odnosu sa proteinima.

1. B- tipovi procijanidina ($C_{30}H_{26}O_{12}$)su dimeri koji nastaju kondenzacijom dvije jedinice flavan-3-ola spojeni preko C_4 -C_8 (B_1 do B_4) ili C_4- C_6 (B_5 do B_8) veze. Postoje pet različita tipa monomera i dva tipa unutramonomerne veze, tako da postoje $2x5^2$=50 dimera u vinu. Osam procijanidina predstavljenih su identificirani kao najučestaliji u vinu.

2. A- tipovi procijanidina ($C_{30}H_{24}O_{12}$) su dimeri koji u dodatku C_4–C_8ili C_4–C_6 unutarflavanske veze, također imaju drugu vezu između C_5 ili C_7 ugljika krajnje

jedinice i C_2 ugljika gornje jedinice. Procijanidin A_2 je identificiran u vinu (Vivas i Glories, 1996). B forma se može promijeniti u A preko radikalnog procesa.



Type-B procyanidins

$B_1 : R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = H; R_4 = OH$
$B_2 : R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = H; R_4 = OH$
$B_3 : R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = H; R_4 = OH$
$B_4 : R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = OH; R_4 = H$
$B_5 : R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = OH; R_4 = H$
$B_6 : R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = H; R_4 = OH$
$B_7 : R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = H; R_4 = OH$
$B_8 : R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = OH; R_4 = H$

Schedule

B_1 : 2,3-*cis*-3,4-*trans*-2",3"-*trans* [2R,3R,4R,2"R,3"S] epicatechin (4β → 8)-catechin
B_2 : 2,3-*cis*-3,4-*trans*-2",3"-*cis* [2R,3R,4R,2"R,3"R] epicatechin (4β → 8)-epicatechin
B_3 : 2,3-*trans*-3,4-*trans*-2",3"-*trans* [2R,3S,4S,2"R,3"S] catechin (4α → 8)-catechin
B_4 : 2,3-*trans*-3,4-*trans*-2",3"-*cis* [2R,3S,4S,2"R,3"R] catechin (4α → 8)-epicatechin
B_5 : 2,3-*cis*-3,4-*trans*-2",3"-*cis* [2R,3R,4R,2"R,3"R] epicatechin (4β → 6)-epicatechin
B_6 : 2,3-*trans*-3,4-*trans*-2",3"-*trans* [2R,3S,4S,2"R,3"S] catechin (4α → 6)-catechin
B_7 : 2,3-*cis*-3,4-*trans*-2",3"-*trans* [2R,3R,4R,2"R,3"S] epicatechin (4β → 6)-catechin
B_8 : 2,3-*trans*-3,4-*trans*-2",3"-*cis* [2R,3S,4S,2"R,3"R] catechin (4α → 6)-epicatechin

Slika 2. Struktura B- tipa dimera procijanidina (de Freitas, 1995)

Trimerni procijanidini se isto mogu podijeliti unutar dvije kategorije:

1. C-tip procijanidina su trimeri sa dvije unutarflavanske veze odgovaraju onima B- tipa dimera.

2. D- tip procijanidina su trimeri sa dvije unutarflavanske veze, jedan tip A i jedan tip B.

Kao i u slučaju dimera, moguće je kalkulirati broj tetramera koji možda postoje u grožđu i vinu, i.e. $2^2 \times 5^3 = 500$. Samo nekoliko trimera je identificirano u grožđu.

Oligomerni procijanidini odgovaraju polimernima nastalih od tri do deset flavanol jedinica, spojenih preko C_4–C_8ili C_4–C_6 veza. Beskonačan broj izomera je moguć, što objašnjava zašto je tako teško razdvojiti ove molekule. Kondenzirani procijanidini imaju više od deset flavanskih jedinica i molekularnu težinu veću od 3000.

Kondenzirani tanini, posebno procijanidini i katehini, prisutni u svim krutim dijelovima grožđa (pokožica, sjemenka, peteljkovina, se oslobađaju u vino kada se ostavlja u kontaktu sa pokožicom. Koncentracije u crnom vinu variraju ovisno o sorti i još većem čimbeniku, metoda korištenih tijekom proizvodnje vina. Vrijednosti se kreću od 1 do 4 g/l. U suhom bijelom vinu, kvaliteta taloženja određuje koncentraciju tanina. Varira između 100 mg/l ako je mošt istaložen pravilno, do 200 ili 300 mg/l ako se fermentacija odvija u prisustvutaloga. Slatka bijela vina spravljena od grožđa napadnutog Botrytisom imaju vrlo niski sastav tanina, jer su ovi spojevi kompletno degradirani pod utjecajem gljivica. (P. Rib´ereau-Gayon, et. al., 2006).

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijal

3.1.1. Uzorci vina

Plavac mali

Prerađeno je ukupno 800 kg grožđa sorte Plavac mali (vinogorje Pelješac, berba 2014). Provedena je primarna prerada (ruljanje i muljanje), sulfitiranje masulja (60 mg/L) i punjenje masulja u Inox tank (1100 L) i drvenu bačvu na integralnu maceraciju (http://www.vinification-integrale.com/en) (500 L).



Slika 3. Bačva za integralnu metodu vinifikacije, izvor: www.alamy.com

Integralna maceracija je inokulirana kvascom Zymaflore FX10 (Laffort). Tijekom fermentacije, u Inox tanku dva puta dnevno se provodilo prelijevanje masulja i jednom dnevno delastage dok se integralna maceracija provodila okretanjem bačve 6-8 puta dnevno. 17. dannakon inokulacije masulj je prešan i mlado vino je prebačeno u jednake drvene bačve (225 L). Nakon prešanja inokulacijom bakterija LACTOENOS® SB3 Instant (Laffort) započinje jabučno-mliječna fermentacija. Nakon jabučno-mliječne fermentacije slijedi odležavanje mladog vina u bačvama u trajanju od 6 mjeseci nakon čega je izuzet uzorak vina na kojem je provedena analiza.

Babić

U vinariju je dopremljeno ukupno 750 kg grožđa sorte Babić (vinogorje Primošten, berba 2014). Provedena je primarna prerada grožđa (ruljanje i muljanje), sulfitiranje(60 mg/L) i punjenje masulja u drvenu bačvu na integralnu maceraciju(http://www.vinification-integrale.com/en)zapremnine 500 L i plastičnu posudu (kaca) 500 L u kojoj je provođena klasična fermentacija i maceracija (metoda potapanja klobuka). Integralna maceracija je inokuliranakvascom Zymaflore F15 (Laffort). Integralna maceracija provodila se okretanjem bačve, 6-8 puta dnevno i6-8 puta potapanje klobuka u plastičnoj posudi. 14. danod primarne prerade grožđa, masulj je prešan i mlado vino je prebačeno u jednake drvene bačve (225 L). Nakon prešanja inokulacijom bakterija LACTOENOS 450 PreAc (Laffort) započinje jabučno-mliječna fermentacija. Nakon završene jabučno-mliječne fermentacije vino odležava u bačvama tijekom 6 mjeseci nakon čega je izuzet uzorak vina na kojem je provedena analiza.

3.1.2. Kemikalije i sredstva

- Folin Ciocalteus reagent, Shannon, Ireland
- Natrijev kaarbonat bezvodni, P.A., TTT d.o.o., Sv. Nedjelja
- Galna kiselina, Sigma aldrich, Kina
- Klorovodična kiselina 37%, Carlo Erba reagents, Val De Reuil, Italija
- Etanol 96%-tni, Gram-mol d.o.o. Zagreb, Hrvatska
- Natrijev hidrogensulfit, Acros Organics, New Jersey, USA
- Acetonitril- J.T. Baker, USA
- KH2PO4 Poch sa Gliwice
- Kvacsi - Zymaflore FX10, Laffort, Bordeaux, Francuska
- Sumpor kalijev bisulfit, Bisulfite 15, Laffort, Bordeaux, Francuska

3.1.3. Oprema i aparatura

- HPCL

PDA detector HPLC –Varian prostar, model 230, ser. No. 01195

Column valve module, model -500, ser. no. 00365

RI detector- model 350

Fluorescence detector, model 363, ser. no. 00704

Solvent delivery sistem- varian 9010

- Analitička vaga, Mettler Tocedo, Švicarska
- Mikrolitarska pipeta, Shott instruments, Hattenberger str., Njemačka
- Mikropipeta, Eppendorf, Ny, SAD

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje kromatskih karakteristika vina

Boja vina definirana je kao optička gustoća vina izmjerena na tri valne duljine: 520 nm (crvena), 420 nm (žuta), 620 nm (plava). Ovim određivanjem moguće je odrediti slijedeće karakteristike boje: intenzitet boje (*Glories, 1984*), nijansa boje (*Sudraud*, 1958), kompozicija boje (*Glories, 1984*).

Aparatura i pribor:

- kiveta 1 mm
- spektrofotometar

Postupak određivanja:

Izmjeri se optička gustoća vina na tri valne duljine: 520 nm, 420 nm i 620 nm, u kiveti od 1 mm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Intenzitet boje (CI) = D_{420} + D_{520} + D_{620}

Nijansa boje (T) = D_{420} / D_{520}

Kompozicija boje:

% crvene = D_{520}/ (D_{420} + D_{520} + D_{620}) * 100

% žute = D_{420}/ (D_{420} + D_{520} + D_{620}) * 100

% plave = D_{620}/ (D_{420} + D_{520} + D_{620}) * 100

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Ukupan udio polifenolnih spojeva određuje se reakcijom sa Folin Ciocalteu reagensom (Singelton i Rossi, 1965). Folin Ciocalteu reagens je smjesa fosfovolframove i fosfomolibdenove kiseline, gdje pri reakciji s fenolnim spojevima, hidroksidne grupe fenolnih spojeva oksidiraju, dok se kiseline reduciraju u plavo obojenivolframov oksid i molibdenov oksid. Intenzitet nastalog plavog obojenja mjeri se pri valnoj duljini od 765 nm. Rezultat se izražava kao ekvivalenta galne kiseline (GAE) u mg/L.

Aparatura i pribor:

- odmjerna tikvica od 100mL
- pipete od 1, 5, 10 i 15 mL
- menzura od 100 ml
- kivete od 1 cm
- analitička vaga
- spektrofotometar

Kemikalije:

- Folin-Ciocalteu reagens (pomiješa se jedan dio reagensa i dva dijela destilirane vode).

(Za svaku bocu reagensa potrebno je izraditi baždarnu krivulju)

- 20% natrijev karbonat
- glana kiselina u 12 % etanolu(baždarna krivulja)

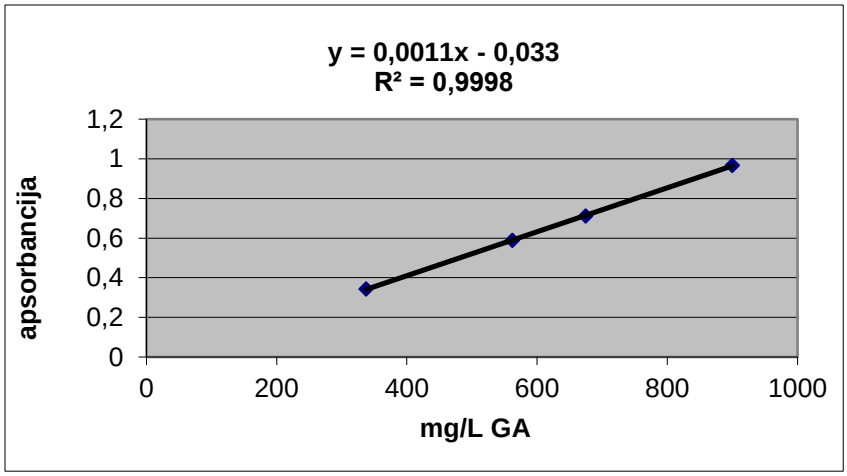
Postupak određivanja:

Crno vino razrijedi se u omjeru 1:9, v:v, s destiliranom vodom. Bijela vina analiziraju se bez razrjeđenja.U tikvicu od 100 mL otpipetira se 1 mL razrijeđenog uzorka, 5 mL FC reagensa (razrijeđenog 1:2) i 60 mL vode. Sve se dobro promiješa i poslije 30 sekundi doda se 15 mL 20% natrij-karbonata. Nadopuni se do oznake s destiliram vodom te ostavi 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm nasuprot slijepoj probi koja se priprema na slijedeći način: 1 mL vode, 5 mL FC reagensa, 60 mL vode te nakon 30 sekundi doda 15 ml 20 % natrij-karbonata i nadopuni destiliranom vodom.

Izrada baždare krivulje: Pripreme se otopine galne kiseline u 12 % etanolu slijedećih koncentracija:50, 100, 200, 400, 600i 800 mg/L. Otpipetira se se 1 mL otopine, doda 5 mL FC reagensa i 60 mL vode. Sve se dobro promiješa i poslije 30 sekundi doda se 15 mL 20 % natrijevog karbonata. Nadopuni se do oznake s destiliranom vodom i te ostavi 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm nasuprot slijepoj probi. Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancije nacrta se baždarna krivulja pri čemu se na apscisi nanese koncentracija galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije kod 765 nm.

Račun:

Iz baždarne krivulje dobije se jednadžba pravca prema kojoj se izračuna koncentracija ukupnih fenola. Koncentracija ukupnih fenola izražava se kao ekvivalent galne kiseline (GAE) u mg/L.



y – apsorbancija pri 765 nm

x – udjel ukupnih fenola izraženih kao ekvivalent galne kiseline (mg/L)

Napomena: u konačnom proračunu potrebno je uzeti u obzir i faktor razrjeđenja uzorka

3.2.3. Određivanje ukupnih antocijana

Metoda se bazira na činjenici da se HSO_3^- ion veže na položaju 2' te tako prevodi obojeni kation antocijana u bezbojni leuko oblik. Istovremeno paralelni uzorak tretira se s destiliranom vodom. Spektrofotometrijski se određuje razlika apsorbancije u oba uzorka. Ta razlika pokazuje količinu antocijana (Ribereau-Gayon i Stonestreet, 1965).

Aparatura i pribor:

- odmjerne tikvice od 25 mL
- pipete od 1, 5,10 mL
- kivete od 1 cm
- spektrofotometar

Kemikalije:

- 96 % etanol s 0,1 (v/v) HCl (100 µL koncentrirane klorovodične kiseline nadopuni se s 96 %-tnim etanolom do 100 mL)
- 2 % vodena otopina klorovodične kiseline
- 15 % otopina natrijevog hidrogensulfita (razrijediti komercijalnu 38-40% otopinu)

Postupak određivanja:

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

Račun:

Udjel antocijana u ispitivanom uzorku izračuna se prema formuli

$$A_c \ (mg/L) = 875 \times (D_1 - D_2)$$

gdje je:
A_c (mg/L) – količina antocijana u ispitivanom uzorku
875 – faktor preračunavanja
D_1 – apsorbancija uzorka kojem je dodana voda
D_2 – apsorbancija uzorka kojem je dodana 15 %-tna otopina natrijevoghidrogensulfita

3.2.4. Određivanje ukupnih tanina

Ukupni tanini određuju se prema Bate-Smith metodi, baziranoj na kiselinskoj hidrolizi proantocijanidina pri temperaturi od 100 °C pri čemu dolazi do formiranja obojenih antocijanidina (Ribereau-Gayon i Stonestreet, 1966). Spektrofotometrijski se određuje razlika obojenja pri 550 nm između hidroliziranog zagrijanog i nezagrijanog uzorka. Ta razlika pokazuje količinu tanina (Ribereau-Gayon i Stonestreet, 1965).

Aparatura i pribor:

- tube za hidrolizu
- mikoropipeta 1000 µL
- pipete 1, 5 ml
- kivete od 1 cm
- spektrofotometar

Kemikalije:

- koncentrirana klorovodična kiselina, 37% HCl
- 96% etanol

Postupak određivanja:

Uzorak vina razrijedi se 50 puta. U dvije tube za hidrolizu otpipetira se po 2 ml razrijeđenog uzorka vina, 1 ml destilirane vode te 3 ml koncentrirane klorovodiče kiseline nakon čega se tube hermetički zatvore. Jedna tuba ostavi se pri sobnoj temperaturi, dok se drugastavi se u vodenu kupelj na 100 °C. Nakon 30 minuta, tuba se izvadi iz vodene kupelji te ohladi tijekom 5 minuta ledom. U obje tube doda se po 500 µL etanola. Opitčka gustoća izmjeri se pri 550 nm nasuprot destiliranoj vodi kao slijepoj probi.

Račun:

Koncentracija tanina u ispitivanom (50 x razrijeđenom) uzorku izračuna se prema formuli

$$\text{Tanini (g/L)} = 19{,}33x\ (D_1\text{-}D_2)$$

3.2.5. Određivanje slobodnih antocijana primjenom tekućinskekromatografije visoke djelotvornosti (HPLC)

Priprema uzorka za HPLC analizu

Prije HPLC analize uzorci vina Plavac mali i Babić filtrirani su kroz NylonMembranes filter promjera 25 mm I veličine pora 0,45 µm (Supleco, Supleco Park, Bellefonte, SAD).

HPLC analiza

Analiza slobodnih monomernih antocijana (delfinidin-3-*O*-monoglukozid, cijanidin-3-*O*-monoglukozid, petunidin-3-*O*-monoglukozid, peonidin-3-*O*-monoglukozid, malvidin-3-*O*-monoglukozid, peonidin-3-*O*-monoglukozid acetat, malvidin-3-*O*-monoglukozid acetat, peonidin-3-*O*-monoglukozid p-kumarat, malvidin-3-*O*-monoglukozid p-kumarat) u vinima Plavac mali i Babić provedena je na HPLC uređaju Varian Pro Star (Varian, WalnutCreek, SAD) uz modul pumpe Varian Pro Star SolventDeliverySystem 230 (Varian, SAD), modul kolone Varian Pro Star ColumnValve Module 500 (Varian, SAD) uz detekciju na PDA detektoru 330 (Varian, SAD).

Injektirano je 20 µL prethodno filtriranog uzorka vina. Kromatografsko razdvajanje jeizvršeno na koloni Nucleosill C18, dimenzija 250x4,6 mm (Phenomenex, SAD), pri temperaturi pri temperaturi od 25 °C te uz primjenubinarne mobilne faze: otapalo A (acetonitril/pufer; 5:95; v/v) i otapalo B (acetonitril/pufer;

50:50; v/v), gdje je pufer10 mmol/L klijevhidrogenfosfat korigiran fosfatnom kiselinom napH=1,6. Pripremljene mobilne faze su filtrirane i odzračene. Razdvajanje slobodnih antocijana provedeno je primjenom gradijenta prikazanog u Tablici X, prema metodi Berente i suradnici (2000), uz protok mobilne od 1mL/min.

Tablica X: Gradijent korišten za razdvajanje slobodnih monomernih antocijana

t (min)	A (%)	B (%)	Protok (mL/min)
0	90	10	1
30	55	45	1
31	0	100	1
34	0	100	1
35	90	10	1

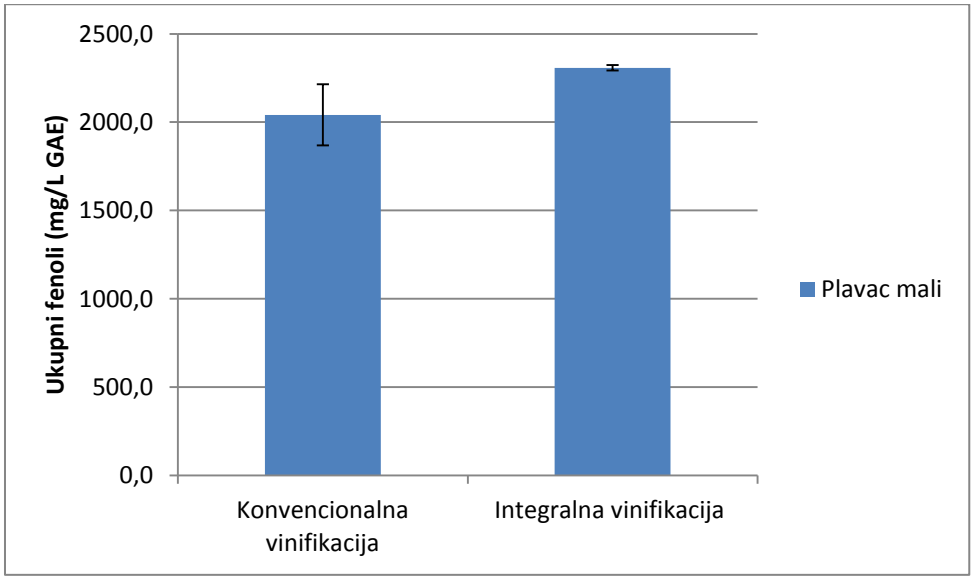
Identifikacija antocijana provedena je usporedbom vremena zadržavanja razdvojenih spojeva (Rt) s vremenom zadržavanja standarda te usporedbom UV-spektara. Kako bi se provela kvantifikacija,otopine standarda (delfinidin-3-*O*-monoglukozid, cijanidin-3-*O*-monoglukozid, petunidin-3-*O*-monoglukozid, peonidin-3-*O*-monoglukozid i malvidin-3-*O*-monoglukozida) pripravljene su u 5 različitih masenih koncentracija (10, 50, 150, 250, 500 mg/L), a iz ovisnosti površine pikova o masenoj koncentraciji standarda nacrtani su baždarni pravci i izračunate pripadajuće jednadžbe pravca. Koncentracije pojedinačnih antocijana u vinima Plavac mali i Babić izračunate su iz pripadajuće jednadžbe baždarnog pravca standarda. Koncentracije peonidin-3-*O*-monoglukozid acetata kao i peonidin-3-*O*-monoglukozid p-kumarata izražene su preko peonidin-3-*O*-monoglukozida.. Koncentracijemalvidin-3-*O*-monoglukozid acetata kao i malvidin-3-*O*-monoglukozid p-kumarata izražene supreko malvidin-3-*O*-monoglukozida.Analiza svakog uzorka provedena je u duplikatu, a dobiveni rezultati izraženi su u mg/L. Berente, B. i suradnici (2000).

4. Rezultati i rasprava

4.1. Ukupni sadržaj polifenola u vinu Plavac mali i Babić

Tablica 1. Ukupni sadržaj polifenola u vinu Plavac mali

Ukupni fenoli Plavac mali	srednja vrijednost	standardna devijacija
Konvencionalna vinifikacija	2041,1	172,8
Integralna vinifikacija	2307,8	15,7



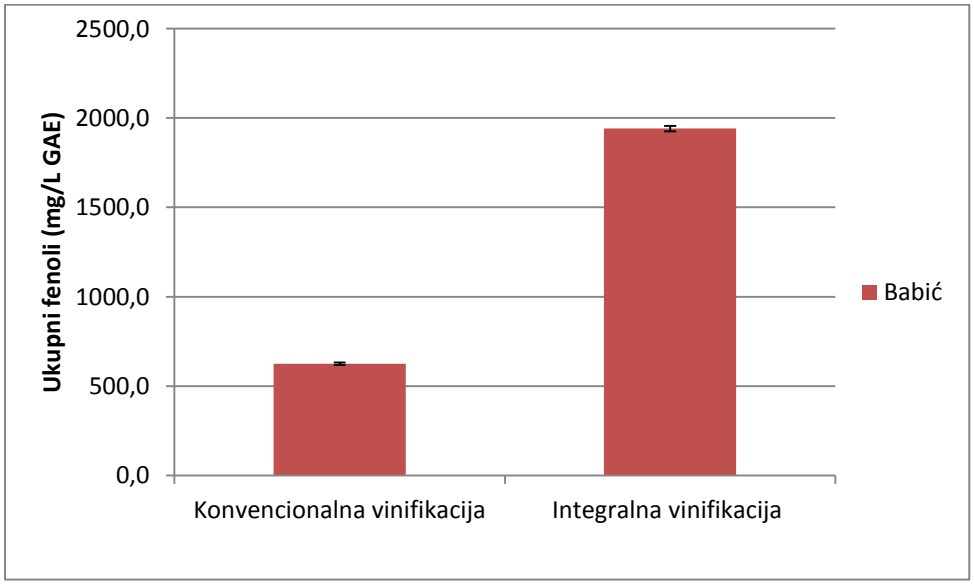
Koncentracija polifenola u vinu Plavac mali veća je kod integralne u odnosu na konvencionalnu vinifikaciju, jer je osim polifenola ekstrahiranih iz grožđa moguće došlo i do ekstrakcije polifenola iz drva bačve. Polifenoli su izraženi kao ekvivalent galne kiseline. Slične koncentracije ukupnih polifenola dobili su u svom istraživanju. Budić-Leto i sur.,(2008). Kod njih su se koncentracije polifenola kod mladih vina kretale od 2467 do 2723 mg/l, a kod vina starih 6 i 14 mjeseci od 2287 do 2580 mg/l.Njihove koncentracije čak su i više nego kod integralne vinifikacije u ovom radu.

Sigurno treba uzeti u obzir nepovoljne vremenske uvjeteu periodu dozrijevanja grožđa u 2014. godini, koji su imali utjecaj na slabiju kakvoću grožđa tj. manji ukupni sadržaj polifenola te godine.Međutim ako usporedimo dobivene vrijednosti sa rezultatima Osrečak, M. (2014) koje su se kretale između 1982,77 i 2237,20 mg/l onda te razlike i nisu tako izražene.

M. Benaziz, H. Douieb, H. Hajjaj, (2015.) su istraživali različite tehnike starenja vina na sastav polifenola vina proizvedenog od sorti Cabernet sauvignon, Merlot i Syrah. Tehnike starenja bile su dodatak čipsa, mikrooksigenacija, mikrooksigenacija + čips, starenje u drvenoj bačvi te kontrola. Količine ukupnih polifenola u vinima proizvedenih različitom tehnikom nisu se signifikantno razlikovale s izuzetkom kontrolne varijante gdje je utvrđeni značajniji pad koncentracije ukupnih polifenola tijekom starenja vina u periodu 12 mjeseci.

Tablica 2. Ukupni sadržaj polifenola u vinu Babić

Ukupni fenoli Babić	srednja vrijednost	standardna devijacija
Konvencionalna vinifikacija	624,4	7,9
Integralna vinifikacija	1941,1	15,7



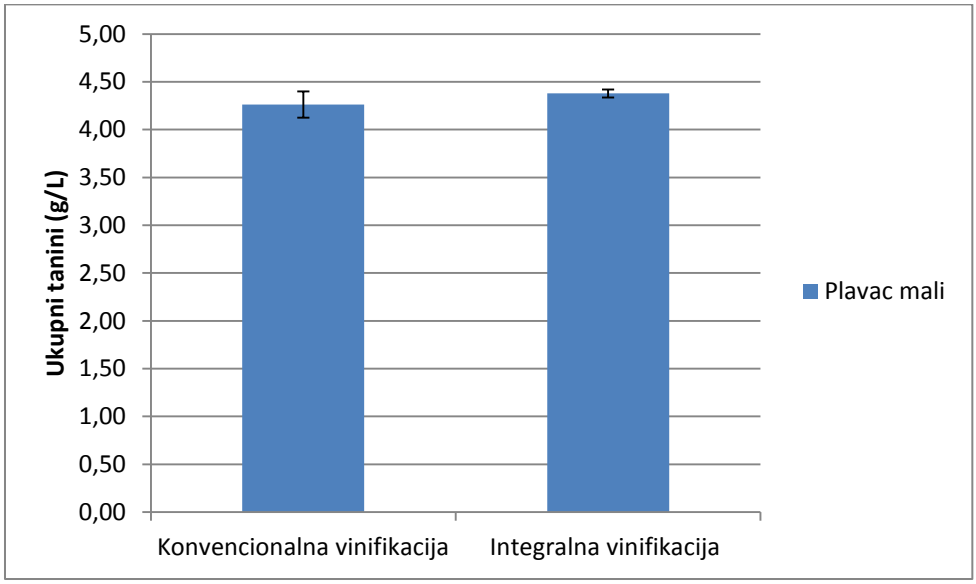
Kod vina Babić jasno je vidljiva razlika u ukupnoj koncentraciji polifenola (izraženih kao galna kiselina) između konvencionalne i integralne vinifikacije.Budić-Leto i sur., (2005) u svom radu su istraživali utjecaj različitih tipova maceracije masulja sorte Babić na sastav polifenola i dobili su rezultate od 639 do 3242 mg/lukupnih polifenola. U tom radu su korištene dvije metode maceracije, jedna je bila maceracija u zatvorenim spremnicima, a druga u vinimatiku. Kod konvencionalne i integralne vinifikacijesigurno treba uzeti u obzir kao i kod Plavca malog nedostatak sunčanih sati koji je imao utjecaj na smanjen sastav polifenola u odnosu na istraživanje Budić-Leto i sur., (2005).Dobiveni rezultati ukazali su na značajnije jači utjecaj integralne vinifikacije na ekstrakciju polifenola kod sorte Babić u odnosu na Plavac mali.

U radu Silvia Pe´rez-Magarino i sur., (2009) istraživalo se utjecaj dodatkačipsa hrasta različitog podrijetla, različitih stupnjeva paljenja čipsa, vrijeme starenja vina te utjecaj mikrooksidacije na sastav polifenola vina od sortiMencia i Tinta del Pais. Dobiveni rezultati pokazuju da su čimbenici sorte i mikrooksidacije najviše utjecali na promjene u sastavu polifenola vina, dok sustupanj paljenja čipsa i podrijetlo čipsa imali uglavnom samo utjecaj na sastav antocijana i svojstva boje.

4.2. Ukupni sadržaj tanina u vinu Plavac mali i Babić

Tablica 3. Ukupni sadržaj tanina u vinu Plavac mali

Ukupni tanini Plavac mali	srednja vrijednost	standardna devijacija
Konvencionalna vinifikacija	4,26	0,14
Integralna vinifikacija	4,38	0,04



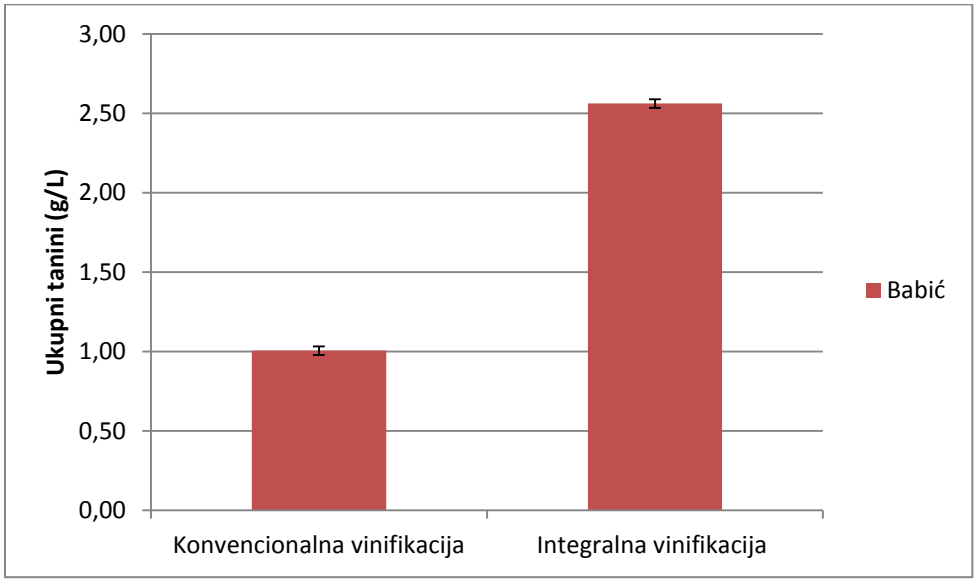
Kod uzorka Plavca malog nema naglašenije razlike u sastavu tanina između jednog i drugog uzorka. Kod integralne vinifikacije koncentracija je nešto viša nego kod konvencionalne vinifikacije, što se može objasniti ekstrakcijom tanina iz drva u vino. Budić Leto i sur., (2008) su u svojem istraživanju dobili koncentracije tanina od 2402 do 2024 mg/l. Koncentracije tanina sigurno su toliko visoke zbog dužine maceracije od 17 dana, a poznato je kako koncentracija tanina raste što maceracija duže traje. Koncentracija tanina veća je od koncentracije ukupnih polifenola zato što je koncentracija ukupnih polifenola izražena kao ekvivalent galne kiseline.

U radu Cerpa-Calderon F. K. i sur.,(2008) istraživalo se utjecaj 5 tretmana masulja sorte Merlot na ekstrakciju proantocijanidina. Kod prvog tretmana nije se muljalo grožđe nego su bobice ostale cjelovite, kod drugog tretmana izmuljalo se 25 % grožđa, kod trećeg tretmana 50 % grožđa, kod četvrtog tretmana 75 % grožđa, te

kod petog tretmana se svo grožđe izmuljalo. Kod maceracije koja je trajala 17 dana i gdje je 75 % grožđa bilo izmuljano utvrđena je najveća količina proantocijanidina (779 mg/l). Koncentracije su znatno manje nego kod Plavca malog, što je sigurno utjecaj sorte.

Tablica 4. Ukupni sadržaj tanina u vinu Babić

Ukupni tanini Babić	srednja vrijednost	standardna devijacija
Konvencionalna vinifikacija	1,01	0,03
Integralna vinifikacija	2,56	0,03



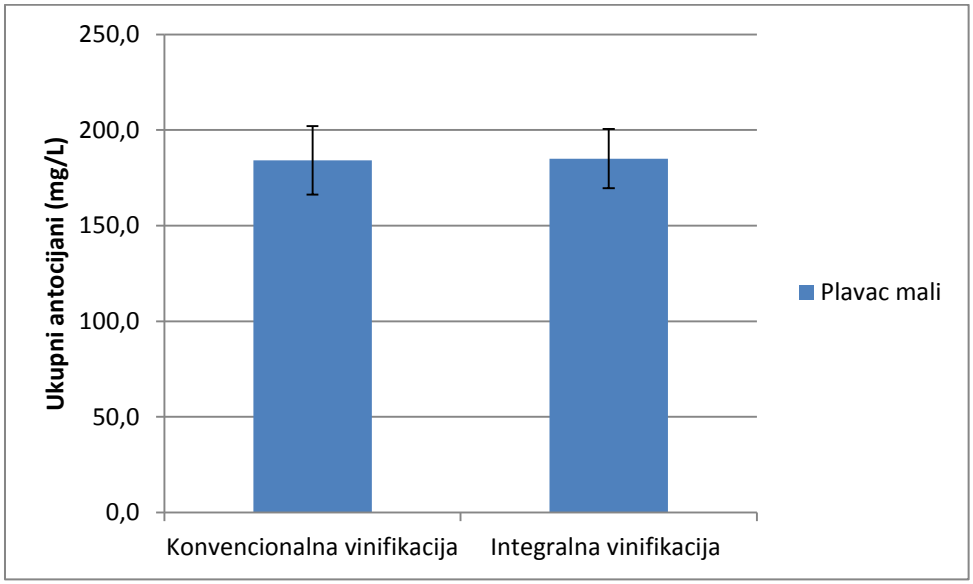
Količina ukupnih tanina veća je kod integralne vinifikacije u odnosu na konvencionalnu vinifikaciju za 1,55 g/l. Koncentracija je veća kod integralne vinifikacije najvjerojatnije uslijed ekstrakcije elagitanina iz drva bačve, koji imaju pozitivan utjecaj na procese polimerizacije monomernih i oligomernih flavan-3-ola, te su nastali polimerni proantocijanidi tj. tanini. Glavni predstavnici tanina drva hrasta su elagitanini. Elagitanini imaju utjecaj na promjene polifenola vina tijekom starenja. Jaki su regulatori oksidacije, brzo usvajaju otopljeni kisik i olakšavaju hidroperoksidaciju spojeva vina. Povoljno utječu na procese polimerizacije tanina, te na taj način utječu

na smanjenu astringenciju vina (Vivas & Glories, 1996). Kao i kod Plavca malog ukupna koncentracija tanina veća je od ukupne koncentracije polifenola, jer su polifenoli izraženi kao ekvivalent galne kiseline. Budić-Leto i sur., (2005) su u svojem radu dobili koncentracije tanina od 1191 do 3460 mg/l kod tradicionalne maceracije dok su koncentracije tanina kod maceracije u vinimatiku bile od 985 do 3530 mg/l.

4.3. Ukupni sadržaj antocijana u vinu Plavac mali i Babić

Tablica 5. Ukupni sadržaj antocijana u vinu Plavac mali

Ukupni antocijani Plavac mali	srednja vrijednost	standardna devijacija
Konvencionalna vinifikacija	184,2	17,9
Integralna vinifikacija	185,1	15,5

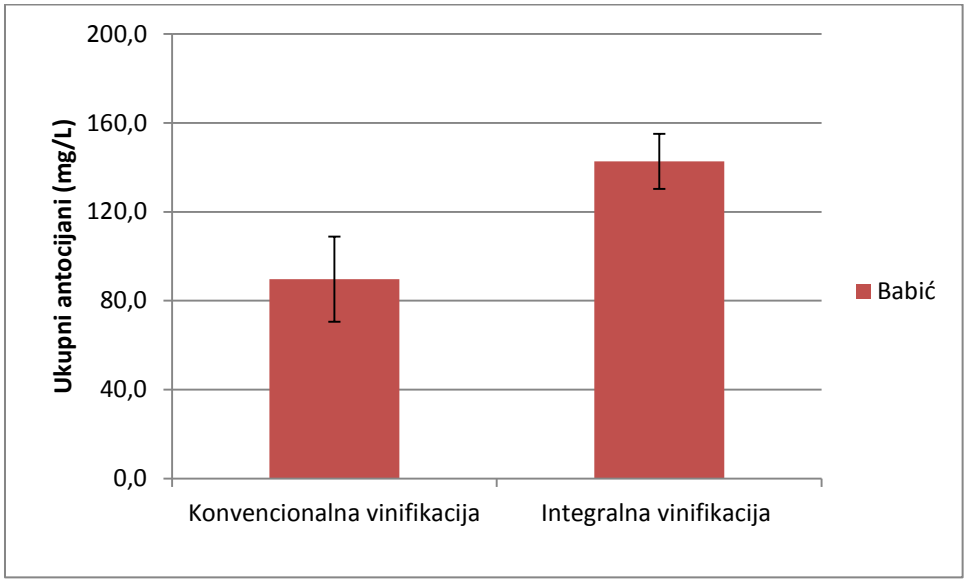


Kod sadržaja antocijana nema značajne razlike između konvencionalne vinifikacije i integralne vinifikacije. Budić-Leto i sur., (2008) su dobili više koncentracije antocijana i to od 467 do 635 mg/l u mladim vinima, te od 259 do 300 mg/l u vinima odležalih 14 mjeseci. Kao i kod ostalih grupa polifenola u ovom radu i tu se može zaključiti da je kod konvencionalne i integralne vinifikacije manja

koncentracija antocijana najvjerojatnije uvjetovana lošijim uvjetima dozrijevanja grožđa te zbog nedostatka sunčanih sati 2014. godine.

Tablica 6. Ukupni sadržaj antocijana u vinu Babić

Ukupni antocijani Babić	srednja vrijednost	standardna devijacija
Konvencionalna vinifikacija	89,7	19,2
Integralna vinifikacija	142,6	12,4

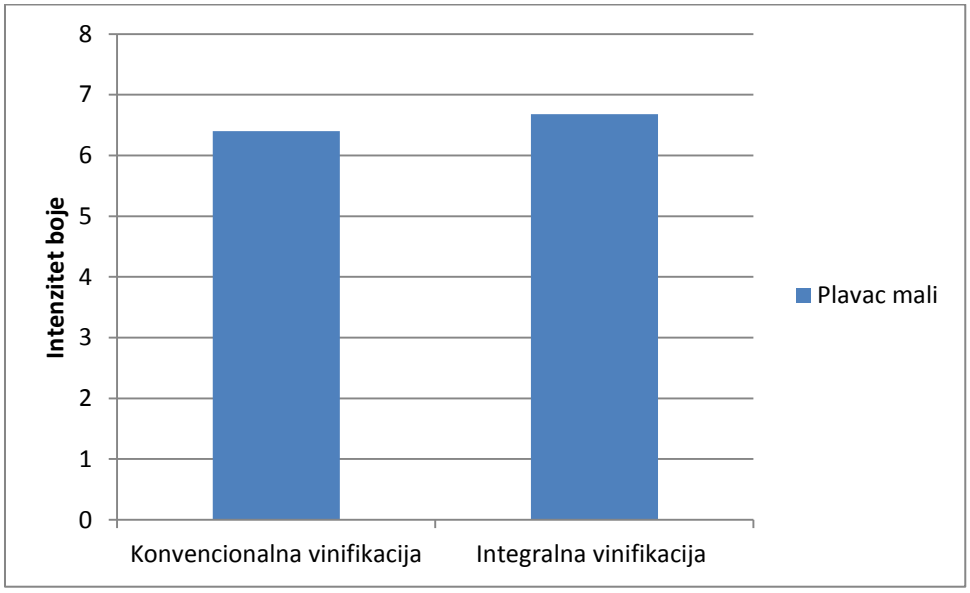


Postoji značajna razlika u koncentraciji antocijana između vina Babić napravljenog po metodi konvencionalne vinifikacije i po metodi integralne vinifikacije. Kod integralne vinifikacije koncentracija antocijana znatno je veća u odnosu na konvencionalnu vinifikaciju. Budić-Leto i sur., (2005) su istraživali koncentracije polifenola u vinu Babić kao i antocijana te su dobili koncentracije antocijana od 443 mg/l do 886 mg/l kod tradicionalne metode maceracije, te koncentracije od 311 mg/ldo 632 mg/l kod kontrolirane metode maceracije u vinimatiku.Naše vrijednosti su u oba slučaja izraženo niže najvjerojatnije kao što je već naglašeno uvjetovane lošim uvjetima dozrijevanja grožđa u proizvodnoj godini 2014.

4.4. Intenzitet boje vina Plavac mali i Babić

Tablica 7. Intenzitet boje vina Plavac mali

Intenzitet boje Plavac mali	srednja vrijednost
Konvencionalna vinifikacija	6,4
Integralna vinifikacija	6,68



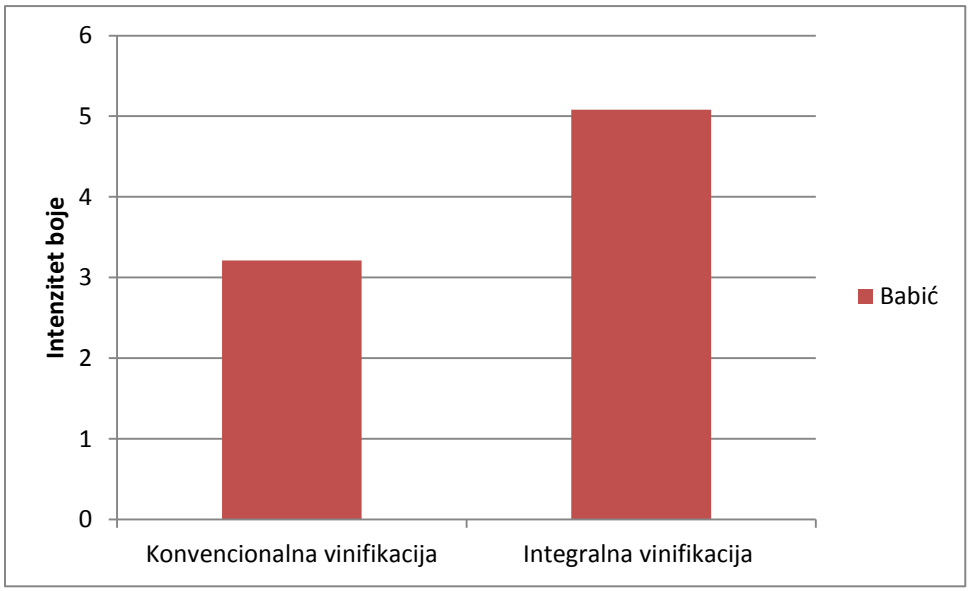
Intenzitet boje predstavlja količinu boje, a vrijednost koja je prikazana u tablici se dobije zbrojem absorbancije na valnim duljinama od 420, 520 i 620 nm. Iz tablice 7. vidljivo je da ne postoji znatna razlika u intenzitetu boje između uzorka napravljenog po konvencionalnoj metodi vinifikacije gdje vrijednost iznosi 6,4 i po integralnoj metodi vinifikacije gdje vrijednost iznosi 6,68. Intenzitet boje u odnosu je sa koncentracijom antocijana koja se nalazi u tablici 5. Što je veća koncentracija antocijana veći je i intenzitet boje, a s obzirom da nije utvrđena veća razlika u koncentraciji antocijana tako su i dobiveni rezultati u skladu.

U radu (Coradini R. i sur. 2014.) izmjereni su intenzitet i nijansa boje tijekom maceracije u tri sorte vinove loze i to kod Merlot-a, Frankovke (Burgund) i Pinot crnog. Kod sorte Frankovka (Burgund) utvrđen je pad intenziteta boje kako je fermentacija protjecala i to sa 25,13 na 21,45. Kod Merlot-a je utvrđen proces

povećanja intenziteta boje kako je fermentacija protjecala i to sa vrijednosti 5,7 na 14,55. Sorta Pinot crni imala je najmanji intenzitet boje, a kako je fermentacija protjecala vrijednost se povećala sa 3,5 na 7,73.Temeljem navedenih rezultata bilo bi interesantno popratiti promijene u intenzitetz boje i kod naših uzoraka te vidjeti da li bi promjene uvjetovane tipom maceracije bile naglašenije.

Tablica 8. Intenzitet boje vina Babić

Intenzitet boje Babić	srednja vrijednost
Konvencionalna vinifikacija	3,21
Integralna vinifikacija	5,08



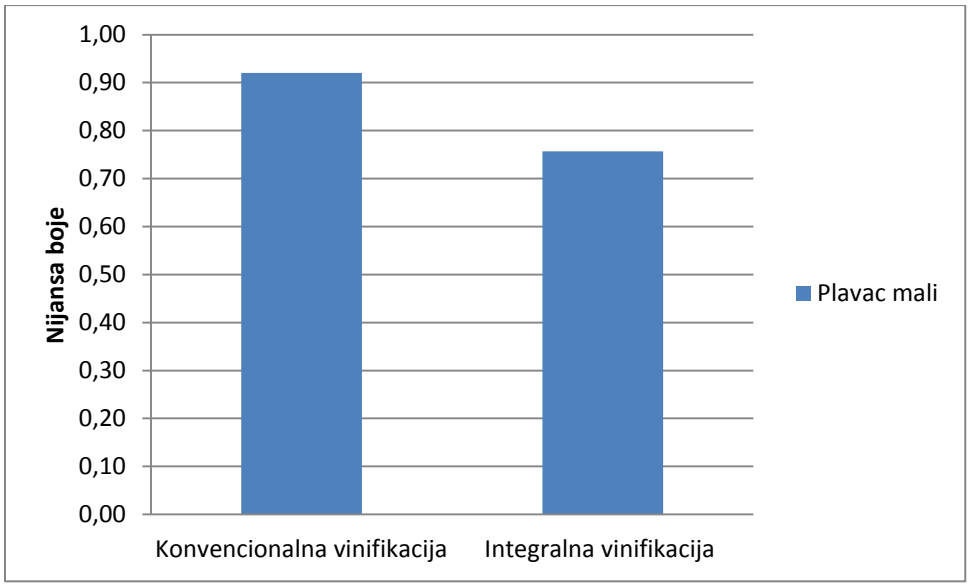
Kod vina Babić je intenzitet boje nešto slabiji u odnosu na uzorak Plavca malog, a razlika između konvencionalne metode vinifikacije i integralne metode vinifikacije je jasno vidljiva. Konvencionalna metoda vinifikacije ima vrijednost od 3,21, a integralna metoda vinifikacije ima vrijednost od 5,08. Na intenzitet boje najveći utjecaj ima koncentracija antocijana. U tablici 6. se vidi kako je koncentracija antocijana znatno veća kod integralne vinifikacije nego kod konvencionalne metode

vinifikaciječime možemo potvrditi postojanje pozitivne korelacije između navedenih parametara.

4.5. Nijansa boje vina Plavac mali i Babić

Tablica 9. Nijansa boje vina Plavac mali

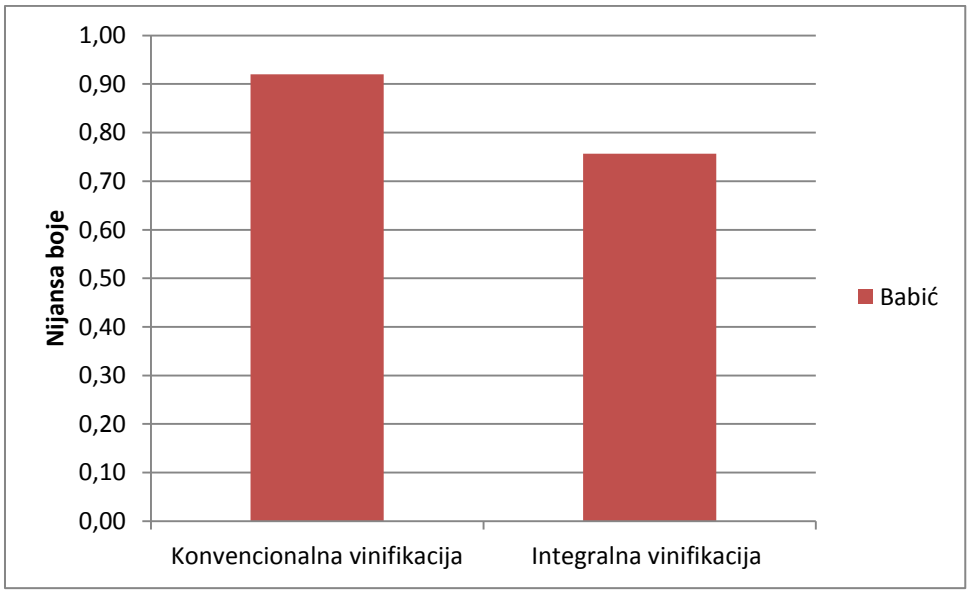
Nijansa boje Plavac mali	srednja vrijednost
Konvencionalna vinifikacija	0,94
Integralna vinifikacija	0,91



Nijansa boje pokazuje razvoj boje prema narančastom. Mlada vina imaju vrijednost od 0,5 do 0,7 koja se povećava prilikom starenja vina, te dosegne vrijednost od 1,2 do 1,3. (Rib´ereau-Gayon i sur.2006). Iz tablice 9. je vidljivo da konvencionalna metoda vinifikacije ima vrijednost od 0,94 u odnosu na integralnu metodu vinifikacije koja ima vrijednost od 0,91 tj. kao i kod intenziteta boje niti kod nijanse boje korištene metode vinifikacije nisu imale izraženiji utjecaj.

Tablica 10. Nijansa boje vina Babić

Nijansa boje Babić	srednja vrijednost
Konvencionalna vinifikacija	0,92
Integralna vinifikacija	0,76

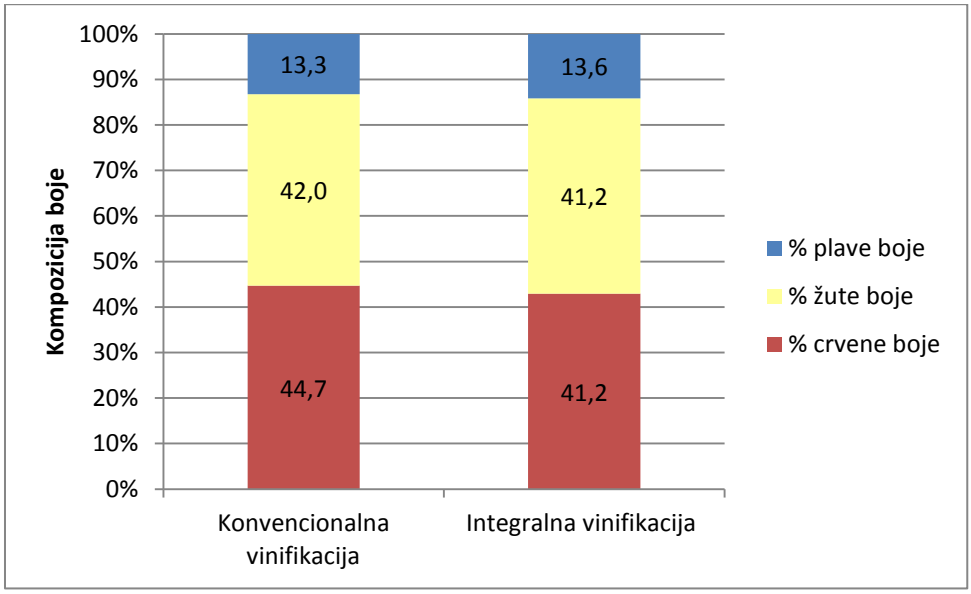


Kod nijanse boje vina Babić nešto je veća razlika između konvencionalne vinifikacije i integralne vinifikacije u odnosu na uzorak Plavac mali gdje je razlika nešto manja što se vidi u tablici 9. Konvencionalna vinifikacija kod Babića ima vrijednost 0,92, a integralna vinifikacija ima vrijednost 0,76. Povećanje vrijednosti nijanse boje za očekivati je u crnom vinu koje stari, a boja se mijenja od ljubičasto crvene preko ciglasto crvene do smeđih tonova. Prema Somers i Verette 1988. Nijansa boje kod mladih vina kreće se od 0,4 do 0,5 što se sa vremenom povećalo na 0,8 do 0,9 u starijem vinu.Za zaključiti je da je vrijednost nijanse boje bolja kod integralne vinifikacije tj. dobivene vrijednosti u skladu su sa rezultatima intenziteta boje kako i koncentracije antocijana u vinu Babić.

4.6. Kompozicija boje vina Plavac mali i Babić

Tablica 11. Kompozicija boje vina Plavac mali

Kompozicija boje	srednja vrijednost	srednja vrijednost	srednja vrijednost
Plavac mali	% crvene boje	% žute boje	% plave boje
Konvencionalna vinifikacija	44,7	42,0	13,3
Integralna vinifikacija	41,2	41,2	13,6



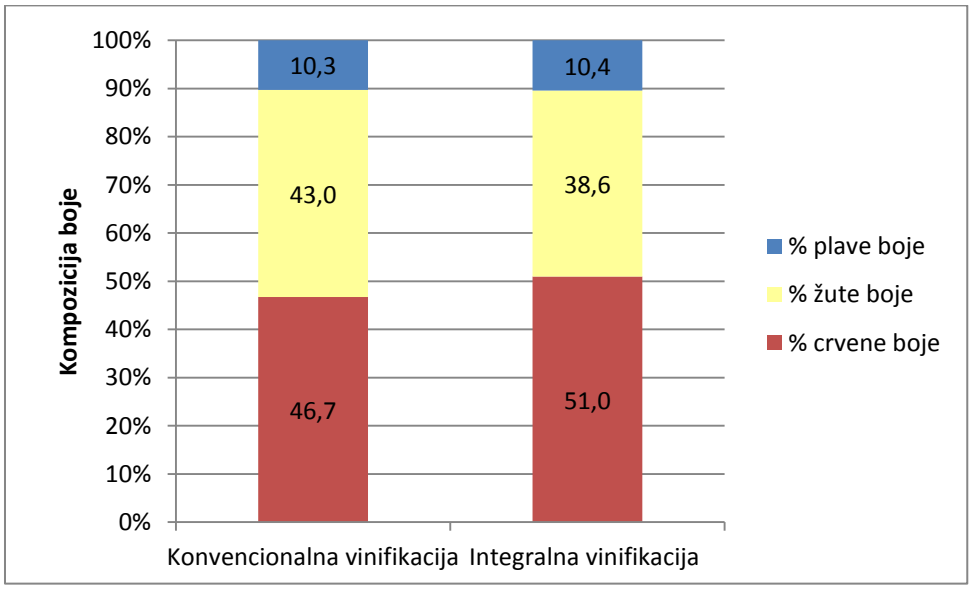
Iz tablice 11. vidi se da je crvena boja u vinu Plavac mali konvencionalne vinifikacije zastupljena sa 44,7%, žute boje ima 42 %, a plave boje ima 13,3%. Kod integralne vinifikacije crvena boja je zastupljena sa 41,2% isto kao i žuta boja, a plava boja je zastupljena sa 13,6%. Postoje male razlike u koncentraciji pojedine boje u vinu Plavac mali napravljenog po konvencionalnoj vinifikaciji i integralnoj vinifikaciji. Kod Plavca malog nije se postigao željeni efekt smanjenog razvoja ciglastožutih tonova, tj. nisu utvrđene naglašenije razlike pri korištenju opisanih metoda maceracije.

U radu (M. Benaziz, H. Douieb, H. Hajjaj, 2015.) istraživalo se utjecaj tradicionalnog starenja vina u bačvama (ba), dodatak čipsa (2 g/l) (ch), mikrooksigenacije 1ml/l/1mjesec (Mox), mikrooksigenacije 1ml/l/1mjesec+čips 2 g/l (mox+ch), te kotrole (C) na boju, sastav polifenola i organoleptična svojstva

marokanskih crnih vina. Pojedni tretman trajao je do 3 mjeseca, a nakon toga je vino još odležalo do 12 mjeseci u staklenim posudama. Tretman koji je imao najviši postotak žute boje bio je kod mox+ch, a najmanji postotak žute boje bio je kod ch tretmana (nakon 12 mjeseci starenja vina). Najviši postotak crvene boje bio je kod tretmana ba, a najmanji kod kontrole.Iz dobivenih rezultata vidi se pozitivan utjecaj dodatka čipsa te dozrijevanja u drvenim bačvama na kompoziciju boje što djelomično možemo povezati i sa našim rezultatima gdje je utjecaj drvene bačve i ekstrakcije spojeva iz drva bio prisutan.

Tablica 12. Kompozicija boje vina Babić

Kompozicija boje	srednja vrijednost	srednja vrijednost	srednja vrijednost
Babić	% crvene boje	% žute boje	% plave boje
Konvencionalna vinifikacija	46,7	43,0	10,3
Integralna vinifikacija	51,0	38,6	10,4



Kod konvencionalne vinifikacije vina Babić iz tablice 12. vidi se da crvene boje ima 46,7 %, žute boje ima 43 %, a plave boje ima 10,3 %. Kod integralne vinifikacijevina Babić crvene boje ima 51 %, žute boje ima 38,6 %, a plave boje ima

10,4 %. Koncentracija žute boje je manja kod integralne vinifikacije jer je došlo do ekstrakcije elagitanina iz drva bačve koji imaju utjecaj na smanjenje razvoja ciglastožutih boja, jer smanjuju oksidaciju fenolnih spojeva (Vivas i Glories, 1996.) Razlike u koncentraciji pojedine boje različitih tipova maceracije vina Babić su jako male, no i kod ovog parametra koji se analizirao vidi se pozitivan utjecaj drvene bačve korištene kod integralne metode vinifikacije.

U radu (M. Benaziz, H. Douieb, H. Hajjaj, 2015.) dobiveni su slčni rezultati kao i u tablici 12. Kod Babića, starenje vina u drvenoj bačvi imalo je pozitivan učinak na smanjenu pojavu žute boje, te povišen sadržaj crvene boje.

4.7. Koncentracija slobodnih antocijana u vinu Plavac mali i Babić

Tablica 13. Koncentracija slobodnih antocijana u vinu Plavac mali

Slobodni antocijani	Konvencionalna vinifikacija		Integralna vinifikacija	
Plavac mali	srednja vrijednost	standardna devijacija	srednja vrijednost	standardna devijacija
delfinidin-3-*O*-monoglukozid	9,14	0,14	9,75	0,06
cijanidin-3-*O*-monoglukozid	1,99	0,03	2,07	0,03
petunidin-3-*O*-monoglukozid	8,77	0,20	9,17	0,14
peonidin-3-*O*-monoglukozid	10,64	0,13	10,95	0,09
malvidin-3-*O*-monoglukozid	78,02	0,40	84,67	0,29
peonidin-3-*O*-monoglukozid acetat	0,28	0,01	0,65	0,03
malvidin-3-*O*-monoglukozid acetat	3,56	0,02	3,66	0,07
peonidin-3-*O*-monoglukozid p-kumarat	0,52	0,01	0,79	0,02
malvidin-3-*O*-monoglukozid p-kumarat	2,18	0,06	2,38	0,01

Iz tablice 13. se vidi da je ukupna koncentracija slobodnih antocijana kod konvencionalne vinifikacije 115,1 mg/l, a kod integralne vinifikacije 124,1 mg/l. Koncentracije svih slobodnih antocijana kod integralne vinifikacije više su za 9 mg/l u odnosu na konvencionalnu vinifikaciju, s tim da je koncentracija malvidin-3-0-monoglukozida najveća kod jedne i druge metode vinifikacije. Koncentracije svakog

pojedinog slobodnog antocijana malo su više kod integralne vinifikacije u odnosu na konvencionalnu vinifikaciju.

Tablica 14. Koncentracija slobodnih antocijana u vinu Babić

Slobodni antocijani	Konvencionalna vinifikacija		Integralna vinifikacija	
Babić	srednja vrijednost	standardna devijacija	srednja vrijednost	standardna devijacija
delfinidin-3-*O*-monoglukozid	4,11	0,04	8,71	0,16
cijanidin-3-*O*-monoglukozid	0,73	0,04	2,08	0,03
petunidin-3-*O*-monoglukozid	4,14	0,07	7,56	0,15
peonidin-3-*O*-monoglukozid	4,08	0,09	8,66	0,13
malvidin-3-*O*-monoglukozid	44,06	0,56	60,07	0,71
peonidin-3-*O*-monoglukozid acetat	0,08	0,01	0,22	0,00
malvidin-3-*O*-monoglukozid acetat	0,55	0,06	1,67	0,05
peonidin-3-*O*-monoglukozid p-kumarat	0,12	0,00	0,42	0,00
malvidin-3-*O*-monoglukozid p-kumarat	1,12	0,03	2,66	0,07

Ukupna koncentracija slobodnih antocijana vina Babić kod konvencionalne vinifikacije je 59 mg/l, a kod integralne vinifikacije 92 mg/l, što se vidi u tablici 14. Razlika između jedne i druge vinifikacije predstavlja 33 mg/l. Koncentracija svakog pojedinog slobodnog antocijana nešto je veća kod integralne vinifikacije u odnosu na konvencionalnu vinifikaciju. Razlika je nešto jače izražena kod vina Babić u odnosu na vino Plavac mali. Budić Leto i sur. (2006) su u svojem radu dobili znatno više koncentracije pojedinih slobodnih antocijana vina Babić Babić dobivenog različitim duljinama maceracije te su se one kretale od 206 do 270 mg/l pri čemu je najzastupljeniji bio malvidin-3-glukozid čije koncentracije su se povećavale sa duljinom maceracije i kretale od 129 do 166 mg/l.

5. Zaključak

Iz dobivenih rezultata istraživanja, može se zaključiti da je sorta Babić prikladnija za metodu integralne vinifikacije u odnosu na sortu Plavac mali. Koncentracija ukupnih polifenola u vinu Plavac mali nešto je veća kod integralne vinifikacije (2307,8 mg/l) u odnosu na konvencionalnu vinifikaciju (2041 mg/l) (izraženo kao ekvivalent galne kiseline) dok je kod vina Babić jasno vidljiva razlika i pozitivan utjecaj integralne vinifikacije, pri čemu je koncentracija ukupnih polifenola kod konvencionalne vinifikacije iznosila 624,4 mg/l, a kod integralne vinifikacije1941,1 mg/l. Isti trend utvrđen je i u dobivenim vrijednostima ukupnih tanina, antocijana i pojedinačnih antocijana što se na kraju očitovalo i u boljim vrijednostima intenziteta, nijanse i kompozicije boje vina Babić dobivenog metodom integralne vinifikacije.

6. Literatura

1. Amrani-Joutei K. (1993). Th`ese de Doctorat OEnologie-Amp´elologie, Universit´e de Bordeaux II.

2. Andersen, O. M., & Jordheim, M. (2006). The anthocyanins. In O. M. Andersen & K. R.Markham (Eds.), Flavonoids (2nd ed.. Chemistry, biochemistry and applications,str. 452–471). Boca Raton, FL: CRC Press.

3. Benaziz M., Douieb H., Hajjaj H. (2015).Influence of microoxygenation, chips and oak barrels breeding in the phenolic composition and sensory quality of the press wine, International Journal of Advanced Research (2015), Volume 3, Issue 7, str. 799-806

4. Berente, B., De laCalleGarcía, D., Reichenbächer, M., Danzer, K. (2000). Methoddevelopment for thedeterminationof anthocyanins in red winesbyhigh-performanceliquidchromatographyandclassificationof German red winesbymeansofmultivariate statistical methods. *J. Chromatogr.* A, 871, 95-103.

5. Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E. (1998): Principles and practices of winemaking. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, SAD.

6. Budić-Leto I., Lovrić T., Pezo I. and Gajdoš Kljusurić J. (2005).Study of Dynamics of Polyphenol Extraction DuringTraditional and Advanced Maceration Processes of the Babić Grape Variety, Food Technol. Biotechnol. 43 (1) 47–53

7. Budić-Leto I., Lovrić T., Gajdoš Kljusurić J., Pezo I., Vrhovšek U.(2006).Anthocyanin composition of the red wine Babić affectedby maceration treatment, Eur Food Res Technol (2006) 222: 397–402

8. Budić-Leto I., Gracin L., Lovrić T. and Vrhovšek U. (2008).Effects of maceration conditions on the polyphenolic composition of red wine'Plavac mali', Vitis 47 (4), 245–250 (2008)

9. Burger J.F.W., Kolodzici H., Hemingway R.W., Steynberg J.P., Young D. And Ferreira D. (1990).*Tetrahedronlett.*, 46 (16), 5733.

10. Castagnino C. and Vercauteren J. (1996). *TetrahedronLett.*, 37, 7739.

11. Cerpa-Calderon F. K. i Kennedy J. A. (2008). Berry Integrity and Extraction of Skin and SeedProanthocyanidins during Red Wine Fermentation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.*56, No. 19, str.* 9006–9014

12. Coradini R., Madoşă E., Petrescu I., Coradini C. (2014). Change of hue and intensity of color during the fermentation in case of must obtained from various varieties of red grapes from Minis-Maderat Winery, Volume 18(4), 55- 62, 2014 Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology
13. Garrido J., Borges F., (2013). Wine and grape polyphenols – A chemical perspective, Food Research International. 54: 1844 – 1858.
14. Jordao A.M., Ricardo-Da-Silva J.M., Laureano O., Mullen W. and Crozier A. (2008). Effect of ellagitannins, ellagic acid and volatile compoundsfrom oak wood on the (+)-catechin, procyanidin B1 andmalvidin-3-glucoside content of model wines ,Australian Journal of Grape andWine Research 14, 260–270, 2008
15. Jackson, R.S. (2008). Wine science Principles and Applications. Third Edition, Academic Press Elsevier: Burlington,MA,USA
16. Kondo K., Kurihara M., Fukuhara K., Tanaka T., Suzuki T., Miyata N. And Toyoda M. (2000). Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation,*Tetrahedronlett.*, 41, 485.
17. Kong J.-M., Chia L.-S., Goh N.-K., Chia T.-F., Brouillard R. (2003). Analysis andbiological activities of anthocyanins, Elsevier Ltd., Phytochemistry, 64(5), 923–933.
18. Moutounet M., Rabier Ph., Puech J.L., Verette E. and Barill`ere J.M. (1989).Analysis by HPLC of extractable substances in oak wood. Application to a Chardonnay wine [white wine; ellagic tanins, lyoniresinol, aromatic aldehydes and acids, hydroxycinnamic derivatives],*Sci. Aliments*, 9 (1), 35.
19. Moreno-Arribas, M.V. i Polo, M.C. (2009). Wine chemistry and biochemistry. Springer science+Business media, LLC, New York, USA.
20. Osrečak, M. (2014). Utjecaj djelomične defolijacije i solarizacije na polifenolni sastav vina kutivara Merlot, Plavac mali i Teran, doktorska disertacija
21.Perez-Magarino S., Ortega-Heras M., Gonzalez-SanJose M. L., Cano-Mozo E. (2009).The influence of oak wood chips, microoxygenationtreatment, grape variety oncolour, and anthocyanin and phenoliccomposition of red wines, Journal of Food Composition and Analysis, Elsevier Inc. 22 (2009) 204–211
22. Pocock K.F., Sefton M.A. and Williams P.J. (1994). Taste thesholds of phenolic extracts of French and American oakwood: the influence of oak phenols on wine flavor,*Am. J. Enol. Viticult.*, 45 (4), 429.

23. Rein, M. (2005). Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins.Helsinki: University of Helsinki. str. 10–14.
24. Ribereau-Gayon, P. i Stonestreet, E. (1965). Determination of anthocyanins in red wine. *B. Soc. Chim. Fr.*9, 2649-2652.
25. Rib´ereau-Gayon P. and Sapis J.C. (1965). On the presence in wine of tyrosol, tryptophol, phenylethyl alcohol and gamma-butyrolactone, secondary products of alcoholic fermentation,*C.R. Acad.Sciences*, 261, 1915.
26. Ribéreau-Gayon, P. i Stonestreet, E. (1966). Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure*. Chim. Anal. Paris.* 48(4), 188-196.
27. Rib´ereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (2006).Handbook of EnologyVolume 2The Chemistry of WineStabilization and Treatments2nd Edition, John wiley & Sons Ltd, England
28. Rodriguez Bencomo, J.J., Mendez Siverio J.J., Perez Trujillo J.P., Cacho, J. (2008). Effect of skin contact on bound aroma and free volatiles of Listan blanco wine. Food Chemistry,110,1: 214-225
29. Somers, T.C., and Verette, E. (1998). Phenolic composition of natural wine types, Berlin Heidelberg, Springer-Verlag
30. Singleton, V. L. I Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with posphomolybdic – phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*16(3)*,*144-158.
31. Thompson R.S., Jacques O., Haslam E. and Tanner D.J.N. (1972).Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins,*J. Chem. Soc., Perkins Trans. I*, 1387-1399.
32. Vivas N. and Glories Y. (1993).*Rev. Fr. OEnol.*, 33 (142), 33.
33. Vivas N. and Glories Y. (1996). Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging,*Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 103.
34. Weinges K., Kaltenhäuser W., Marx H.-D., Nader E., Nader F., Perner J. And Seiler D. (1968).*Liebigs Ann. Chem.*, 711, 184.