Promjene u sastavu i sadržaju fenolnih spojeva u listovima bijelih sorata vinove loze tijekom pojedinih fenofaza

Ivančić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:204:931577

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

PROMJENE U SASTAVU I SADRŽAJU FENOLNIH SPOJEVA U LISTOVIMA BIJELIH SORATA VINOVE LOZE TIJEKOM POJEDINIH FENOFAZA

DIPLOMSKI RAD

Iva Ivančić

Zagreb, srpanj, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Vinogradarstvo i vinarstvo

PROMJENE U SASTAVU I SADRŽAJU FENOLNIH SPOJEVA U LISTOVIMA BIJELIH SORATA VINOVE LOZE TIJEKOM POJEDINIH FENOFAZA

DIPLOMSKI RAD

Iva Ivančić

Mentor: prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić

Zagreb, srpanj, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Iva Ivančić**, JMBAG 0178094703, rođena dana 10. 01. 1994. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

PROMJENE U SASTAVU I SADRŽAJU FENOLNIH SPOJEVA U LISTOVIMA BIJELIH SORATA VINOVE LOZE TIJEKOM POJEDINIH FENOFAZA

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studenta / studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Ive Ivančić**, JMBAG 0178094703, naslova

PROMJENE U SASTAVU I SADRŽAJU FENOLNIH SPOJEVA U LISTOVIMA BIJELIH SORATA VINOVE LOZE TIJEKOM POJEDINIH FENOFAZA

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

	Povjerenstvo:		potpisi:
1.	prof. dr. sc. Jasminka Karoglan Kontić	mentorica	_____
2.	izv. Prof. dr. sc. Marko Karoglan	član	_____
3.	doc. dr. sc. Željko Andabaka	član	_____

Sadržaj

1. Uvod 1

2. Cilj rada 2

3. Pregled literature 3

3.1. Biološki ciklus vinove loze 3

3.2. List vinove loze 4

3.3. Fenoli 5

3.3.1. Primjena fenola 8

4. Materijali i metode 10

4.1. Vinogradarsko vinarsko pokušalište „Jazbina“ 10

4.2. Meteorološki podaci 11

4.3. Prikupljanje uzoraka 12

4.4. Postupak liofilizacije 13

4.5. Postupak ekstrakcije 13

4.6. HPLC analiza 14

4.7. Statistička obrada podataka 14

5. Rezultati i rasprava 15

5.1. Promjene sadržaja fenolnih spojeva u listovima ispitanih sorata prema terminima uzorkovanja 15

5.1.1. Prvi termin uzorkovanja (14. lipnja) 15
5.1.2. Drugi termin uzorkovanja (04. srpnja) 16
5.1.3. Treći termin uzorkovanja (21. srpnja) 17
5.1.4. Četvrti termin uzorkovanja (14. kolovoza) 19
5.1.5. Peti termin uzorkovanja (05. rujna) 20

5.2. Promjene sadržaja fenolnih spojeva u listovima ispitanih sorata po terminima uzorkovanja 22

5.2.1. Promjene sadržaja hidroksicimetnih kiselina 22

5.2.2. Promjene sadržaja hidroksibenzojevih kiselina 24
5.2.3. Promjene sadržaja flavanola 25
5.2.4. Promjene sadržaja flavan-3-ola 27

6. Zaključak 29

7. Popis literature 30

Životopis 32

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Ive Ivančić**, naslova

Promjene u sastavu i sadržaju fenolnih spojeva u listovima bijelih sorata vinove loze tijekom pojedinih fenofaza

Fenoli su najrašireniji sekundarni metaboliti u biljnom carstvu. Iako nisu izravno uključeni u procese fotosinteze i disanja, imaju važnu ulogu u opstanku same biljke. Ponajprije, služe u zaštiti biljke od abiotičkih i biotičkih stresova. Brojnim istraživanjima utvrđena su antikancerogena, antialergijska, protuupalna, antimikrobna, neuroprotektivna i brojna druga pozitivna svojstva fenola. Upravo zbog pozitivnog utjecaja na ljudsko zdravlje, te zbog lakog vezanja s mnogim spojevima (poput proteina) fenoli su pogodni za primjenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Predmet ovog istraživanja je utvrditi promjene u sastavu i sadržaju fenolnih spojeva (flavanoli, flavan-3-oli, hidroksicimetne kiseline i hidroksibenzojeve kiseline) prisutnih u listovima 10 autohtonih i dviju introducirane bijele sorte. Istraživanje se odvijalo na vinogradarsko vinarskom pokušalištu „Jazbina“ tijekom 2017. godine. Uzorci su sakupljani periodično, počevši sa završetkom cvatnje vinove loze do tehnološke zrelosti pojedinih sorata. Listovi su potom adekvatno pohranjeni, liofilizirani te podvrgnuti ekstrakciji. Ekstrakti su analizirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, rezultati su obrađeni pomoću ANOVA testa i Duncan Multiple Range testa. Temeljem dobivenih rezultata utvrđena je značajna varijabilnost u masenim udjelima fenolnih spojeva između sorata po pojedinim terminima uzorkovanja. Također, utvrđena je i značajna varijabilnost u sadržaju fenolnih spojeva unutar iste sorte tijekom različitih termina uzorkovanja.

Ključne riječi: vinova loza, list, fenoli, bijele sorte, tekućinska kromatografija

Summary

Of the master's thesis – student **Iva Ivančić**, entitled:

Changes in the composition and content of phenolic compounds in the leaves of the white cultivates of vine grapes during ontogeny

Phenols are the most widespread secondary metabolites in the plant kingdom. Although not directly involved in the processes of photosynthesis and breathing, they play an important role in the survival of the plant itself. Primarily, they serve to protect the plant from abiotic and biotic stress. Numerous studies have identified anticancer, antiallergic, anti-inflammatory, antimicrobial, neuroprotective and many other positive properties of phenols. Due to the positive impact on human health, and because of the easy binding with many compounds (such as proteins), phenols are suitable for use in pharmaceutical, food and cosmetic industries. The subject of this research is to determine changes in the composition and content of phenolic compounds (flavanols, flavan-3-ols, hydroxycinnamic acid and hydroxybenzoic acid) present in the leaves of 10 indigenous and two introduced white varieties. The research took place at the Experimental station "Jazbina" during year 2017. The samples were collected periodically, starting with the completion of flowering vines to the technological maturity of the individual varieties. The leaves are then adequately stored, lyophilized and subjected to extraction. Extracts were analyzed with high performance liquid chromatography, and results were processed using an ANOVA test and Duncan Multiple Range test. Based on the results obtained, significant variability was found in the mass proportions of phenolic compounds between the varieties per individual sampling periods. Also, significant variability in the content of phenolic compounds within the same variety has been established during different sampling times.

Keywords: vine grapes, leaf, phenols, white varieties, liquid chromatography

1. Uvod

Vinova loza (*Vitis vinifera L.)* jedna je od najznačajnijih kultura prisutnih u poljoprivrednoj proizvodnji. U uzgoju je prisutna još od 8. tisućljeća prije Krista (Owens 2010.), a danas se uzgaja na približno 7,5 milijuna hektara. Uzgaja se u Europi, Sjevernoj i Južnoj Americi, Australiji, Africi i Aziji na područjima umjerene klime gdje se pravilno izmjenjuju godišnja doba (Maletić i sur., 2008.). Oko 500 sorata je gospodarski važno, a pretpostavlja se da u svijetu postoji više od 5000 različitih sorata. U Hrvatskoj se vinova loza uzgaja na 19 582,71 hektara (apprrr.hr 2018.). U uzgoju su prisutne brojne introducirane, ali i neke autohtone sorte.

Vinova loza se primarno uzgaja za proizvodnju vina, a potom za konzumaciju u svježem stanju te za proizvodnju suhica, sokova i destilata. Osim grožđa, kao primarnog produkta, u određenim granama proizvodnje mogli bi se koristiti i listovi vinove loze. Osnovna uloga listova je obavljanje fotosinteze, disanja i transpiracije. Kao sekundarni biljni metabolit nastaju fenoli koji bi se potencijalno mogli ekstrahirati i iskoristiti kao sirovina u komercijalne svrhe. Fenoli se sintetiziraju iz aminokiseline fenilalanina. Sastoje od fenilne skupine ($-C_6H_5$) koja je vezana na hidroksilnu skupinu (-OH). Molekule fenola karakterizira jedan ili više aromatskih prstenova na koje je povezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Najčešće ih nalazimo u vakuolama stanica epiderme. Oni služe u zaštiti biljke od abiotičkih stresova (UV zračenje, nedostatak vode) i biotičkih stresova (napad patogena ili predatora), te u oplodnji, razmnožavanju i rastu same biljke (Tomaz 2016.).

Prema brojnim istraživanjima, fenoli su pokazali značajno antikancerogeno, antialergijsko, protuupalno, antimikrobno, i neuroprotektivno djelovanje pa su stoga prikladni za primjenu u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Sorta je jedan od glavnih čimbenika uspješnosti proizvodnje. Genotip sorte izravno utječe na sastav i sadržaj brojnih spojeva, pa tako i fenola (Downey i sur., 2006.). Sadržaj fenola u listovima može ovisiti i o vremenskim prilikama (UV zračenje, temperatura, količina padalina), te starosti lista, kao i same biljke. Vremenske prilike mogu utjecati na povećanje, odnosno smanjenje sadržaja fenola u biljci, no da bi ona ostvarila svoj maksimalan potencijal potrebna joj je odgovarajuća genetska podloga.

2. Cilj rada

Cilj rada je utvrditi sastav i sadržaj fenolnih spojeva prisutnih u listovima bijelih autohtonih sorata te promjenu njihovog sastava i sadržaja tijekom različitih fenofaza.

3. Pregled literature

3.1. Biološki ciklus vinove loze

Tijekom godine vinova loza prolazi kroz nekoliko faza razvoja. Faze se odvijaju sukladno s uvjetima u kojima se vinova loza nalazi. Prema tome, godišnji biološki ciklus vinove loze može se podijeliti na razdoblje vegetacije i vrijeme mirovanja. Vegetacijski period započinje fazom suzenja ili plača vinove loze, a završava ulaskom vinove loze u period zimskog mirovanja (Mirošević, Karoglan Kontić 2008.).

Godišnji biološki ciklus vinove loze obuhvaća sedam fenofaza:

I. Suzenje ili plač vinove loze
II. Pupanje, rast i razvoj vegetacije
III. Cvatnja i oplodnja
IV. Rast i razvoj bobica
V. Dozrijevanje grožđa
VI. Priprema za zimski odmor
VII. Zimski odmor

Da bi vinova loza iz zimskog mirovanja krenula u period vegetacije potrebne su joj povoljne temperature, osobito u zoni korijena (7 do 10 °C). Prema tome, srednja dnevna temperatura zraka trebala bi iznositi 8 do 10 °C. Pojavom toplog vremena započinje translokacija vode i hranjivih tvari kroz rozgvu i pupove. Kapljice vode pojavljuju se na prerezu rozgve i stoga se ta faza zove suzenje ili plač vinove loze. Ta fenofaza traje 15 do 30 dana. (Mirošević, Karoglan Kontić 2008.)

Sljedeća faza je pupanje, rast i razvoj vegetacije. Dotok vode u tkiva omogućuje hranjivima da prijeđu u jednostavnije oblike u kojima postaju dostupni biljci pa dolazi do intenzivnog dijeljenja stanica. Navedena faza počinje izlaskom listića (faza „mišjih ušiju“), a nakon toga slijedi razvoj zelene mase tj. mladica, listova i cvjetova. Tijekom te faze vinova loza započinje proces fotosinteze. Ova fenofaza traje 40 do 60 dana. (Mirošević, Karoglan Kontić 2008.)

Odvajanjem cvjetne kapice započinje takozvana faza cvatnje. Padom polena na njušku tučka dolazi do oplodnje, odnosno zametanja bobica. Cvatnja može trajati 5 do 20 dana, ovisno o vremenskim uvjetima. (Mirošević, Karoglan Kontić 2008.)

Odmah nakon oplodnje dolazi do intenzivnog rasta bobica i započinje razvoj i dozrijevanje sjemenki. Tijekom rasta bobica dolazi do brojnih fizioloških i biokemijskih promjena te do nakupljanja organskih kiselina. Ta faza može trajati 30 do 60 dana, a traje sve do početka dozrijevanja. (Mirošević, Karoglan Kontić 2008.)

Pojavom šare započinje proces dozrijevanja grožđa, pritom kožica bobice postaje prozirna, mijenja joj se boja, oprašuje se maškom, postaje elastična i s

vremenom omekšava. Dozrijevanjem grožđa dolazi do smanjenja sadržaja ukupnih kiselina u bobici te do porasta sadržaja šećera u samoj bobici. (Mirošević, Karoglan Kontić 2008.)

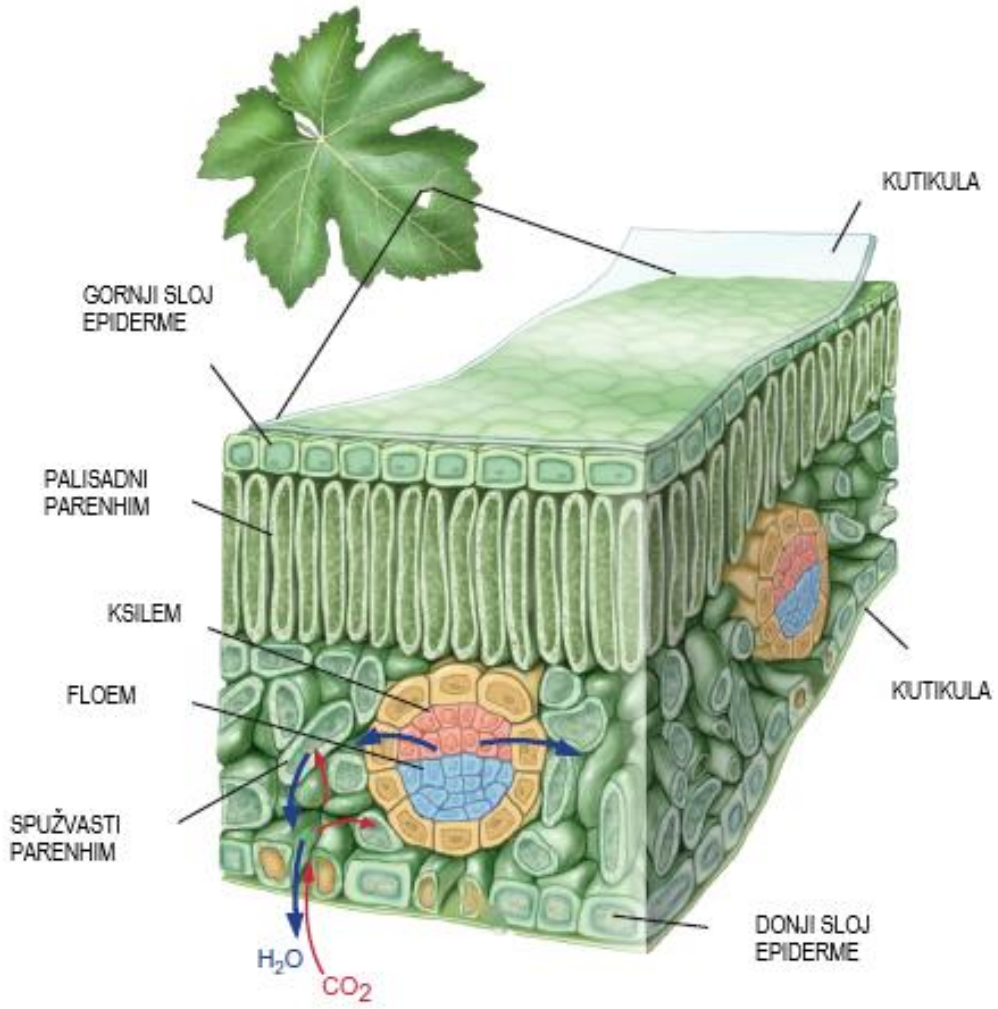
Nakon fiziološke zrelosti grožđa, vinova loza se počinje pripremati za zimski odmor. Dolazi do formiranja zimskih pupova, nakupljanja hranjivih tvari u drvu, odrvenjavanja mladice i prekida veze između mladice i lista. Opadanjem listova nastupa zimski odmor vinove loze. Tijekom zimskog odmora smanjuju se životne funkcije trsa kako bi on bio što otporniji na niske zimske temperature. (Mirošević, Karoglan Kontić 2008.)

3.2. List vinove loze

List je vegetativni biljni organ koji se sastoji od peteljke i plojke. Listovi se naizmjenično nalaze na svakom nodiju mladice, a razvijaju se iz lisnog primordija. Rast lista može se podijeliti u tri faze i usporedan je s rastom mladice. U prvoj fazi list postigne 15 % svoje veličine, u drugoj fazi naraste do 70 % veličine, dok u trećoj fazi dospije do svoje pune veličine. Cijeli proces rasta traje 30 do 40 dana. (Mirošević, Karoglan Kontić 2008.)

Osnovna funkcija lista je obavljanje procesa fotosinteze, disanja i transpiracije. Fotosinteza je proces pretvorbe molekule ugljikovog dioksida (CO_2) i vode (H_2O) u ugljikohidrate. Odvija se uz pomoć sunčeve energije u specijaliziranim staničnim organelima, kloroplastima. Disanje je složen biokemijski proces suprotan fotosintezi. Odvija se u staničnoj citoplazmi i mitohondrijima. U ovom slučaju se ugljikohidrati uz oslobađanje energije razlažu na CO_2 i H_2O. Transpiracija je fiziološki proces ispuštanja vode (u obliku vodene pare) u okoliš. Istovremeno se odvija usvajanje vode iz tla, putem korijena. Za ovaj proces troši se energija tj. toplina. (Mirošević, Karoglan Kontić 2008.)

Ključnu ulogu u navedenim procesima ima anatomska građa lista. Plojka je plosnata i ima veliku površinu na kojoj se nalazi velik broj puči. Razlikuju se gornja i donja stranu plojke. Vanjski sloj čine stanice epiderme presvučene kutikulom. Ispod epiderme nalazi se mezoderma, unutarnji sloj, koju čine stanice parenhima. Razlikuju se također i palisadni (stupičasti) i spužvasti parenhim. Stanice su poredane u dva sloja, vanjski sloj čine palisadne stanice, a unutarnji dio sastoji se od spužvastog parenhima gdje je prisutno više intercelularnog prostora. (Keller 2015.)



Slika 3.1. Anatomska građa lista; izvor: M. Keller

3.3. Fenoli

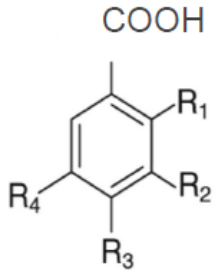
U biljnom carstvu fenoli su najrašireniji sekundarni metaboliti. Oni se nakupljaju u posebnim tkivima, a najčešće ih nalazimo u vakuolama stanica epiderme. Iako nisu izravno uključeni u procese fotosinteze i disanja, imaju važnu ulogu u opstanku same biljke. Služe u zaštiti biljke od abiotičkih stresova (UV zračenje, nedostatak vode) i biotičkih stresova (napad patogena ili predatora), te u oplodnji, razmnožavanju i rastu same biljke. (Tomaz 2016.)

Fenoli se sintetiziraju iz aminokiseline fenilalanina. Sastoje od fenilne skupine ($-C_6H_5$) koja je vezana na hidroksilnu skupinu (-OH). Molekule se strukturno mogu jako razlikovati, a karakterizira ih jedan ili više aromatskih prstenova na koje je povezana jedna ili više hidroksilnih skupina. (Tomaz 2016.) Fenoli se mogu podijeliti prema broju sadržanih fenolnih prstenova i na temelju strukturnih elemenata koji međusobno povezuju prstenove. (Tomaz i sur., 2017.)

Tablica 3.1. Podjela fenola

OSNOVNA STRUKTURA	SKUPINA
C_6	Jednostavni fenoli, benzokinoni
$C_6–C_1$	Hidroksibenzojeve kiseline
$C_6–C_2$	Feniloctene kiseline
$C_6–C_3$	Hidroksicimetne kiseline, fenilpropeni,kumarini, kromeni
$C_6–C_4$	Naftokinoni
$C_6–C_1–C_6$	Ksantoni
$C_6–C_2–C_6$	Stilbeni, antrakinoni
$C_6–C_3–C_6$	Flavanoidi (flavoni, flavonoli, flavanonoli, flavanononi, antocijanini, flavanoli, čalkoni)
$(C_6–C_3)_n$	Lignini
$(C_6–C_3–C_6)_n$	Kondenzirani tanini

Hidroksibenzojeve kiseline su C_6-C_1 aromatske karboksilne kiseline čija se struktura razlikuje ovisno o broju i položaju hidroksilnih i metoksilnih skupina na benzenskom prstenu. Obično su zastupljene u obliku estera ili glikozida, a mogu se nalaziti i u slobodnom obliku. (Tomaz 2016.) U listovima je najzastupljenija vanilijska kiselina, prisutne su još galna i prokatehinska kiselina, dok je siringinska kiselina zastupljena samo kod pojedinih sorata.

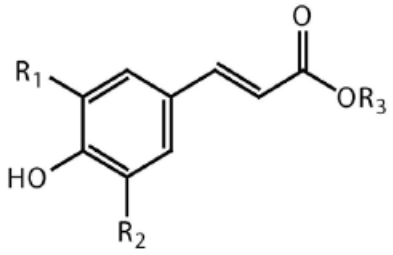


Galna kiselina $R_1 = H$; $R_2 = R_3 = R_4 = OH$
Prokatehinska kiselina $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = R_4 = OCH_3$
Siringinska kiselina $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$; $R_4 = OCH_3$
Vanilinska kiselina $R_1 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$; $R_4 = H$

Slika 3.2. Osnovna struktura hidroksibenzojevih kiselina; izvor: I.Tomaz

Osnovna struktura hidroksicimetnih kiselina je C_6-C_3 s dvostrukom vezom na bočnom lancu, koja može biti u *trans* i *cis* konfiguraciji. Oksidacijskim povezivanjem tih kiselina nastaju dimeri koji dovode do umrežavanja polisaharida stanične stjenke. Posljedica toga je povećanje čvrstoće stjenke i bolja otpornost na mikroorganizme. (Tomaz 2016.) Hidroksicimetne kiseline u biljci djeluju kao zaštitnik od UV zračenja, a u listovima su pronađene mnogo značajnije količine hidroksicimetnih kiselina u odnosu na hidroksibenzojeve kiseline. U najvećem omjeru pronađena je kaftarinska

kiselina, sijede kutarinska, kafeinska i ferulinska. Kod pojedinih sorata pronađene su i kumarinska i sinapinska kiselina.

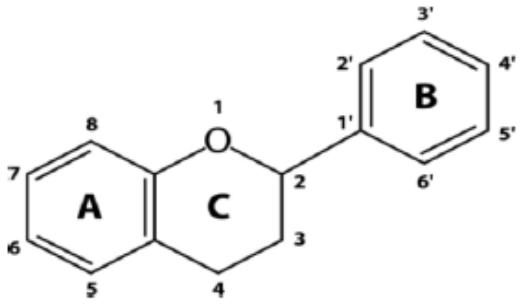


Kafeinska kiselina $R_1 = OH; R_2 = R_3 = H$
Kaftarinska kiselina $R_1 = OH; R_2 = H; R_3 = C_4H_5O_6$ (tartarat)
p-Kumarinska kiselina $R_1 = R_2 = R_3 = H$
p-Kutarinska kiselina $R_1 = OH = R_2 = H; R_3 = C_4H_5O_6$
Ferulinska kiselina $R_1 = OCH_3$; $R_2 = R_3 = H$
Sinapinska kiselina $R_1 = R_2 = OCH_3; R_3 = H$

Slika 3.3. Osnovna struktura hidroksicimetnih kiselina; izvor: I. Tomaz

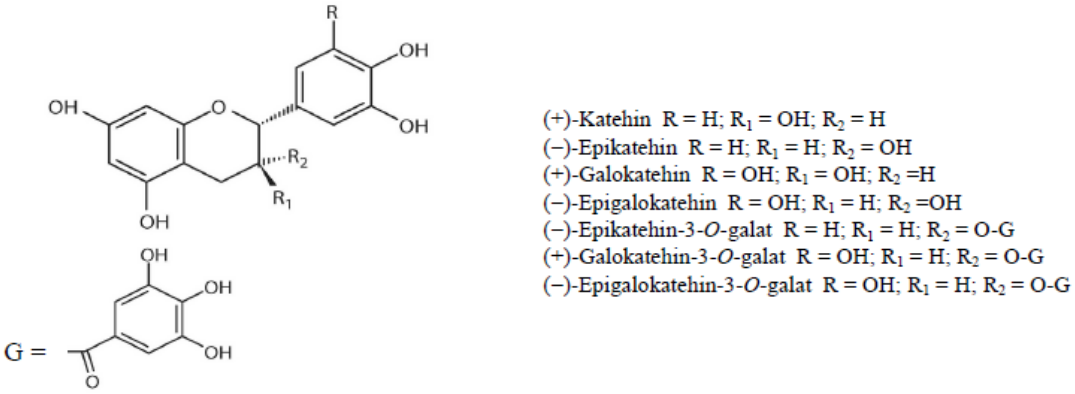
Osnovnu strukturu flavanoida čini difenilpropanska jedinica u kojoj su dva hidroksilirana benzenska prstena međusobno povezana lancem. Lanac je izgrađen od tri ugljikova atoma te je ujedno i dio heterocikličkog prstena. Ovisno o oksidacijskom stanju heterocikličkog prstena, flavanoidi se mogu podijeliti na flavanole, flavan-3-ole i antocijane. U listovima bijelih sorata sadržani su flavanoli i flavan-3-oli. Kod flavanola je prisutna karbonilna (keto) skupina na položaju 4 i dvostruka veza između položaja 2 i 3 prstena C. U listovima su najčešće sintetiziraju u obliku 3-*O*-glikozida. Prema broju supstituenata na prstenu B, flavanoli se dijele na monosupstituirane (kemferol), disupstituirane (kvercetin i izoramnetin) i trisupstituirane (miricetin). Od šećernih jedinica glukoza, galaktoza ili galakturonska kiselina. Ramnoza je vezana isključivo na kvercetin. (Tomaz 2016.)

Prema tome, u listovima mogu biti sintetizirani mircetin-3-*O*-glukonorid, mircetin-3-*O*-glukozid, rutin, kvercetin-3-*O*-glukonorid, kvercetin-3-*O*-glukozid, kemferol-3-*O*-glukonorid, kemferol-3-*O*-glukozid, kemferol-3-*O*-galaktozid i izoramnetin-3-*O*-glukozid. U najvećoj mjeri prisutan je kvercetin-3-*O*-glukozid. Flavanoli su smješteni u vakuolama stanica vanjske epiderme i služe biljci kao zaštita od UV zračenja. Dok na sastav flavanola utječe genotip, njihov sadržaj uvelike ovisi o okolišnim čimbenicima. Također, položaj lista na biljci, to jest njegova izloženost sunčevim zrakama, ima značajnu ulogu u sadržaju fenolnih spojeva. S obzirom da sudjeluju u obrani od štetnog UV zračenja, prilikom povećane radijacije dolazi do povećane sinteze flavanola. U stresnim situacijama biljka proizvodi povećane količine slobodnih radikala. Istovremeno dolazi do povećane sinteze flavanola (i drugih fenola), koji štite biljku na način da na sebe vežu nastale slobodne radikale. (Greiesser i sur., 2015.) Osobito veliku ulogu u zaštiti protiv UV zračenja imaju kvercetin-3-*O*-glukozid i kemferol-3-*O*-glukozid. Njihova povećani sadržaj može poslužiti i kao indikator UV-B stresa. (Schoedl i sur., 2013.)



Slika 3.4. Osnovna struktura flavanola; izvor: I. Tomaz

Flavan-3-oli sadrže hidroksilnu skupinu na položaju 3 prstena C. U listovima su prisutni galokatehin, procijandin B1, epigalokatehin, B3, katehin, B4, procijanidin B2, epikatehin i epikatehin-galat. Procijanidini B1 i B2 najzastupljeniji su dimeri u listovima, oni se međusobno razlikuju po uređenju (+)-katehina i (-)-epikatehina kao termnalnih jedninica (Tomaz 2016.).



Slika 3.5. Osnovna struktura flavan-3-ola; izvor: I. Tomaz

3.3.1. Primjena fenola

Fenoli sudjeluju u reakcijama s raznim spojevima, među kojima su i proteini. Upravo zbog svoje antioksidacijske sposobnosti pogodni su za primjenu u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Fenoli djeluju na način da odgađaju ili inhibiraju oksidaciju supstrata, tvoreći s navedenim supstratom (radikalom) stabilan spoj. Važnu ulogu u antioksidacijskoj aktivnosti čine položaj, struktura spoja i broj vezanih šećera u fenolu. Stoga aglikoni imaju značajno veću antioksidacijsku aktivnost od glikoziliranih oblika fenola. Dimerni i trimerni oblici učinkovitiji su od monomernih. Fenolne kiseline su također dobri antioksidansi. (Tomaz 2016.)

Osobito važnu ulogu fenoli imaju u farmaceutskoj industriji. Mogu se koristiti u proizvodnji lijekova, u ovom slučaju ključna su njihova protuupalna, antimikrobna i antitumorska svojstva. Također, fenoli djeluju kao neuroprotektori i štite neurone od potencijalne upale. Na taj način poboljšavaju se kognitivne sposobnosti, pamćenje i učenje. Osim toga, fenoli imaju izraženu antibakterijsku, antimikotičku i antiviralnu sposobnost (Tomaz 2016.). Zbog izrazite antioksidacijske sposobnosti primjenjuju se u proizvodnji lijekova za srčane bolesti (Hmamouchi i sur., 1996.).

Fenoli mogu biti korisni u sastavu brojnih kozmetičkih preparata. Oni apsorbiraju UV zračenje i sprječavaju da prodire kroz kožu. Na taj način sprječavaju upale, oštećenja kože i njeno prerano starenje. (Tomaz 2016.)

U prehrambenoj industriji fenoli, zbog svoje antioksidativne sposobnosti, mogu zamijeniti konzervanse. Konzervansi su uglavnom sintetički proizvodi koji imaju negativan utjecaj na ljudsko zdravlje. Osim toga mogu zamijeniti i umjetna bojila. (Tomaz 2016.)

Kovalentno vezanje fenola na polisaharidne dijelove stanične stjenke smanjuje njenu osjetljivost prema gljivičnim bolestima. Budući da gljivične bolesti (siva plijesan, plamenjača i pepelnica) izazivaju značajne ekonomske štete, poboljšavanjem otpornosti biljaka na iste uvelike bi se olakšala proizvodnja vinove loze te smanjila upotreba sredstava za zaštitu bilja (Weber 1995.).

4. Materijali i metode

Eksperimentalni dio rada obavljen je u vinogradarsko-vinarskom pokušalištu „Jazbina“ u sklopu Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Pokušalište je smješteno je na obroncima Medvednice u smjeru juga i jugozapada (Slika 4.1.). U sklopu pokušališta nalazi se „Nacionalna kolekcija autohtonih sorata vinove loze“. Ona broji 120 genotipova, a uzorci su uzeti sa sljedećih deset: 'Bogdanuša', 'Debit', 'Dišeća ranina', 'Kraljevina', 'Malvazija istarska', 'Maraština', 'Pošip', 'Škrlet', 'Zlatarica vrgorska', 'Žlahtina'. Osim uzoraka listova bijelih autohtonih sorata, uzeti su i uzorci listova Graševine i Chardonnaya. (www.agr.unizg.hr)

4.1. Vinogradarsko vinarsko pokušalište „Jazbina“

Pokušalište Jazbina je svojevrstan znanstveno-nastavni poligon u sklopu kojeg se odvijaju istraživanja iz područja vinogradarstva i vinarstva, a ujedno i educiraju studenti. Svoj današnji oblik Jazbina je poprimila 1995. godine kada pokrenut proces njene revitalizacije (www.agr.unizg.hr). Pokušalište zauzima prostor od 25 hektara na kojima se nalaze vinogradi, voćnjaci i gospodarske zgrade (Žarak, 2018.). Tu su posađeni vinogradi u kojima se nalaze gospodarski važne sorte ovoga vinogradarskog područja. Osim toga, posađene su stolne sorte grožđa, međuvrsni križanci, kao i matični nasad loznih podloga te već spomenuta kolekcija autohtonih sorata vinove loze. (www.agr.unizg.hr)



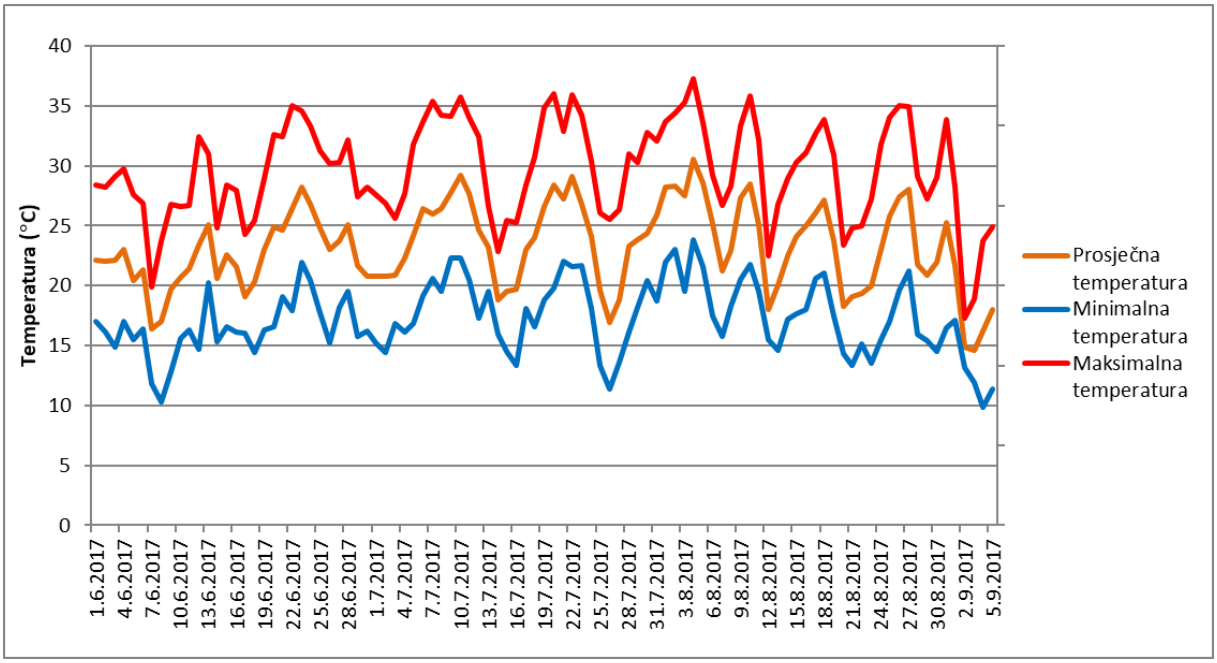
Slika 4.1. Položaj na karti i prikaz Jazbine iz zraka; izvor: www.agr.unizg.hr

Kolekcijski nasad podignut je u razdoblju od 2001. do 2005. godine. Prostire se na površini od 0,8 hektara na nadmorskoj visini 250 metara. Redovi se pružaju u smjeru sjeveroistok – jugozapad, s nagibom oko 5 %. Razmak sadnje je 2,20 x 1,10 m, a kao podloga upotrjebljena je Kober SO4 (*Vitis berlandieri x Vitis riparia*). Uzgojni oblik je jednostrani kordonac visine stabla 80 centimetara, prosječnog opterećenja 8 do 10 pupova. (Andabaka 2015.)

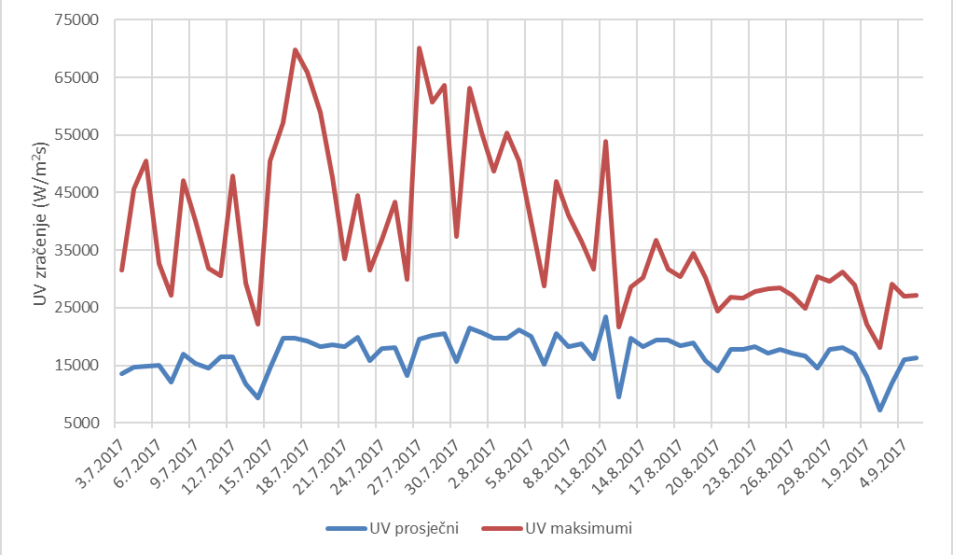
U sklopu gospodarskih zgrada nalazi se i laboratorij u kojem su se pripremali i čuvali prikupljeni uzorci te obavljale sve potrebne analize.

4.2. Meteorološki podaci

U sklopu ovog istraživanja obavljena su i mjerenja temperature zraka (C°) i intenziteta UV zračenja (W/m^{2}s). Mjerenja su obavljena na meteorološkoj stanici koja se nalazi na pokušalištu Jazbina. Temperatura zraka mjerena je u periodu od 01.06. (prvo uzorkovanje bilo je 14.06.) do 05.09. kada je bio posljednji termin uzorkovanja listova. Graf 4.1. prikazuje minimalne, maksimalne i prosječne temperature zraka za navedeni period. Mjerenje intenziteta UV zračenja provođeno je od 03.07. do 05.09. Grafički su prikazana prosječna i maksimalna mjerenja za svaki dan (Graf 4.2.).



Graf 4.1. Temperature zraka u periodu od 01.06 do 05.09.



Graf 4.2. Intenzitet UV zračenja u periodu od 03.07 do 05.09.

4.3. Prikupljanje uzoraka

Uzorci su prikupljeni tijekom 2017. godine, prvi uzorci prikupljeni su neposredno nakon cvatnje (sredina lipnja), a posljednji su prikupljeni u vrijeme tehnološke zrelosti pojedine sorte. Prikupljanje uzoraka odvijalo se svaka tri tjedna počevši od 14. lipnja (Tablica 4.1.).

Tablica 4.1: Termini uzorkovanja

	Termini uzorkovanja
1.	14.06.2017.
2.	04.07.2017.
3.	21.07.2017.
4.	14.08.2017.
5.	05.09.2017.

Da bi istraživanje bilo što reprezentativnije, uzimali su se listovi koji su rasli nasuprot prvom grozdu na mladici. Ukoliko nije bilo listova nasuprot prvom grozdu, uzimali su se prvi sljedeći listovi. Prikupljeni uzorci spremali su se u koverte s jasno naznačenim imenom sorte te datumom uzorkovanja (Slika. 4.2.). Tako spremljeni uzorci čuvali su se u zamrzivaču na temperaturi od –20 °C.



Slika 4.2. Spremljeni uzorci listova; izvor: P. Baždarić

4.4. Postupak liofilizacije

Liofilizacija je postupak sušenja prethodno zamrznutih uzoraka sublimacijom i desorpcijom. Pod sublimacijom podrazumijevamo primarno sušenje. Ona se odvija u kontroliranim uvjetima, to jest pri sniženom tlaku i temperaturi. Nakon sublimacije u uzorku ostaje 7 do 8 % vezane vode, koja se potom uklanja desorpcijom odnosno sekundarnim sušenjem. U tom slučaju temperatura mora biti viša od sobne, dok je tlak i dalje snižen. (Tomaz 2016.)

Prije stavljanja listova u liofilizator bilo je potrebno odvojiti peteljku od plojke lista. Plojke su se potom stavljale u kuverte te potom u liofilizator. Primarno sušenje provedeno je pri tlaku od 0,10 mbar u trajanju od najmanje 24 sata. Sekundarno sušenje provedeno je pri tlaku od 0,01 mbar u trajanju od najmanje 12 sati. Za opisan proces uporabljen je liofilizator Alpha 1-2 LDPlus (Martin Christ, Njemačka).

4.5. Postupak ekstrakcije

Nakon liofilizacije listovi su usitnjeni u fini prah i prosijani radi uklanjanja dlačica. Uzorci listova stavljeni su u staklene posudice za uzorke. Na izvagane uzorke mase 180 ±1 mg dodano je 10 mL ekstrakcijskog otapala. Ono se sastojalo od 20 % acetonitrila, 1 % mravlje kiseline i 79 % vode. Ovako pripravljena ekstrakcijska smjesa stavljena je na magnetnu miješalicu u trajanju od 90 min pri temperaturi od 48 °C. Dobiveni supernatant filtriran je preko membranskog filtra (PTFE (teflon), 0,45 μm) te potom stavljen na HPLC analizu.



Slika 4.3. Vaganje usitnjenih uzoraka; izvor: M. Žarak

4.6. HPLC analiza

Za analizu uzoraka koristio se tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti Agilent 1100 series. Instrument se sastoji od automatskog uzorkivača, detektora s nizom dioda, binarne pumpe te fluorescentnog detektora, boca za pokretnu fazu i računala preko kojeg se upravlja programom za HPLC. Za razdvajanje pojedinih polifenola koristila se kolona Luna Phenyl-Hexyl (4,6× 250 mm; 5 µm veličina čestica (Phenomenex, SAD)). U ovoj analizi koristila se 0,5 % (*v/v*) vodena otopina fosforne kiseline kao prvo otapalo te otopina acetonitrila, vode i fosforne kiseline (50:49,5:0,5; *v/v/v*) kao drugo otapalo. Brzina protoka bila je 0,9 mL/min, volumen ubrizganog uzorka 20 µL, a temperatura kolone 50 ºC. Analize su provedene u tri ponavljanja, a rezultati su izraženi u µg/g suhog lista.

4.7. Statistička obrada podataka

Analizom varijance ustanovljena je signifikantnost razlika između pokusnih varijanata. Usporedba srednjih vrijednosti, odnosno aritmetičkih sredina provedena je pomoću Duncan Multiple Range testa. Za statističku obradu podataka upotrjebljen je SAS v 9.3 statistički softvera (2012, SAS Institute Inc., Cary, NC, SAD).

5. Rezultati i rasprava

5.1. Promjene sadržaja fenolnih spojeva u listovima ispitanih sorata prema terminima uzorkovanja

U tablicama 5.1. do 5.5. navedeni su maseni udjeli fenolnih spojeva zastupljenih u listovima bijelih sorata odabranih za ovo istraživanje. Maseni udjeli izraženi su u µg/g suhog lista. Od hidroksicimetnih kiselina u listovima su bile detektirane kaftarinska, kafeinska, kutarinska, kumarinska, ferulinska i sinapinska kiselina. Od navedenih je najzastupljenija bila kaftarinska kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline su bile najmanje zastupljene od svih istraživanih fenolnih spojeva. U listovima su bile detektirane galna, prokatehinska, vanilijska i siringinska kiselina. Flavanoli koji su bili zastupljeni u listovima su mircetin-3-*O*-glukonorid, mircetin-3-*O*-glukozid, rutin, kvercetin-3-*O*-glukonorid, kvercetin-3-*O*-glukozid, kemferol-3-*O*-glukozid, kemferol-3-*O*-galaktozid i izoramnetin-3-*O*-glukozid. Od flavan-3-ola zastupljeni su bili galokatehin, procijandin B1, epigalokatehin, B3, katehin, B4, procijanidin B2, epikatehin i epikatehin-galat.

5.1.1. Prvi termin uzorkovanja (14. lipnja)

U tablici 5.1. navedeni su maseni udjeli fenolnih spojeva u sortama uzorkovani 14. lipnja. U navedenom terminu izmjeren je najviši sadržaj flavanola (31 418,45 µg/g) kod sorte 'Graševina', dok je najniži sadržaj pronađen kod sorte 'Bogdanuša' (21 198,68 µg/g). Od ispitivanih flavanola najzastupljeniji su bili rutin i kvercetin-3-*O*-glukozid. Kemferol-3-*O*-glukonorid najmanje je bio zastupljen od svih flavanola, a kod nekih sorata nije bio ni detektiran.

Hidroksicimetne kiseline bile su u rasponu od 4877,10 µg/g (određeno kod sorte 'Maraština') do 8225,66 µg/g (kod sorte 'Žlahtina'). Većim dijelom je to bila kaftarinska kiselina. Kutarinska, ferulinska i sinapinska kiselina kod nekih sorata nisu bile ni pronađene. Konkretno kod sorte 'Žlahtina' 7522,51 µg/g otpada na kaftarinsku kiselinu, dok ferulinska i sinapinska kiselina nisu bile detektirane.

Najviši maseni udio hidroksibenzojevih kiselina bio je izmjeren kod sorte 'Debit i iznosio je 542,13 µg/g. Najmanji sadržaj izmjeren je kod sorte 'Bogdanuša' te je iznosio 53,24 µg/g. To je ujedno i najmanji maseni udio neke grupe fenolnih spojeva izmjeren u ovom terminu uzorkovanja. Najzastupljenija od hidroksibenzojevih kiselina bila je vanilijska, nakon nje prokatehinska pa galna kiselina. Siringinska kiselina pronađena je samo kod nekih sorata.

Flavan-3-oli bili su u rasponu od 1139,99 µg/g kod sorte 'Malvazija istarska', do 3077,26 µg/g kod sorte 'Chardonnay'. Najzastupljeniji flavan-3-ol je procijandin B1.

Ukupno gledajući, najmanji maseni udjeli svih fenolnih spojeva utvrđeni su kod sorata 'Maraština' (27 547,06 µg/g) i 'Bogdanuša' (28 484,47 µg/g). Najveći maseni

udjeli izmjereni su kod sorata 'Chardonnay' (40 803,81 µg/g), 'Malvazija istarska' (39 959,26 µg/g), 'Graševina' (39 787,06 µg/g) i 'Debit' (39 520,93 µg/g).

Prvo uzorkovanje izvršeno je neposredno nakon cvatnje vinove loze. U ovoj fenofazi uzgoja vinove loze listovi su gotovo posve razvijeni te samostalno obavljaju fotosintezu. Prosječna temperatura zraka u periodu od 01.06. do 14.06. (prije termina uzorkovanja) bila je 21 °C. U samo tri dana utvrđena je maksimalna dnevna temperatura viša od 30 °C (Graf 4.1.). Takve vremenske prilike idealne su za proces fotosinteze, prilikom koje fenoli nastaju kao sekundarni metabolit.

Tablica 5.1. Maseni udjeli fenolnih spojeva u sortama u prvom terminu uzorkovanja

	Hidroksicimetne kiseline	Hidroksibenzojeve kiseline	Flavanoli	Flavan-3-oli
Bogdanuša	4886,21 f	77,21 f	21198,68 c	2322,37 b
Debit	5741,10 e	542,13 a	31056,18 a	2181,52 bc
Dišeća ranina	5749,28 e	298,19 c	27968,82 ab	2480,84 b
Kraljevina	7605,67 b	257,21 cd	27850,90 ab	1886,86 cd
Malvazija istarska	6854,19 cd	230,81 de	30858,78 a	2015,48 bcd
Maraština	4877,10	86,15 f	21443,82 c	1139,99 e
Pošip	6099,29 cd	53,24 f	30918,01 a	1098,80 e
Škrlet	6874,75 c	281,54 cd	25665,41 abc	3066,06 a
Zlatarica vrgorska	6746,55 cd	272,73 cd	28207,78 ab	2104,14 bcd
Žlahtina	8225,66 a	131,04	23674,94 bc	2036,47 bcd
Chardonnay	7054,18 c	206,54 e	30465,83 a	3077,26 a
Graševina	6417,29 d	235,79 de	31418,45 a	1715,53 d

*srednje vrijednosti označene različitim slovima među sortama razlikuju se na razini p<0,05 korištenjem Duncan's multiple- range testa

**sve brojčane vrijednosti izražene su u µg/g suhog lista

5.1.2. Drugi termin uzorkovanja (04. srpnja)

Tablica 5.2. prikazuje masene udjele fenolnih spojeva izmjerene u drugom terminu uzorkovanja (04.07.). U ovom terminu uzorkovanja najviši sadržaj hidroksicimetnih kiselina imala je sorta 'Žlahtina' (8989,93 µg/g) To je ujedno i najveći sadržaj hidroksicimetnih kiselina opažen kod neke sorte, od svih termina uzorkovanja. Navedeni maseni udio značajno je veći u odnosu na sorte koje slijede: 'Chardonnay' (6908,49 µg/g) i 'Škrlet' (6640,75 µg/g). Najmanji sadržaj hidroksicimetnih kiselina imala je sorta 'Debit' (4852,21 µg/g).

Hidroksibenzojeve kiseline su i u ovom terminu bile najmanje zastupljena skupina fenola. Najmanji maseni udio izmjeren je kod sorte 'Pošip' i iznosi 28,45 µg/g. To je ujedno i najmanji izmjeren sadržaj nekog fenolnog spoja tijekom svih termina uzorkovanja, uključujući sve ispitane sorte. Najveći sadržaj hidroksibenzojevih kiselina izmjeren je kod sorte 'Debit' (809,25 µg/g), slijede sorte 'Bogdanuša' (551,38 µg/g) i 'Škrlet' (541,71 µg/g).

Najveći sadržaj flavanola izmjeren je kod sorte 'Graševina' (32 401,93 µg/g), a nešto manji sadržaji flavanola izmjereni su kod sorata 'Chardonnay' (30 925,32 µg/g)

i 'Škrlet' (29 747,49 µg/g). Sorta 'Maraština' imala je najmanji sadržaj flavanola za ovo razdoblje (20 972,89 µg/g), nakon nje slijedi sorta 'Bogdanuša' (22 333,99 µg/g).

Sorta 'Pošip' je u ovom terminu uzorkovanja imala najveći maseni udio flavan-3-ola (4003,19 µg/g). Navedeni maseni udio značajno je veći u odnosu na sorte koje slijede ('Škrlet' s 2351,26 µg/g i 'Chardonnay' s 2324,24 µg/g). To je ujedno i najveći izmjeren maseni udio flavan-3-ola u odnosu na ostale termine uzorkovanja. Najmanji sadržaji flavan-3-ola izmjereni su kod sorata 'Bogdanuša' (508,27 µg/g) i 'Maraština' (749,01 µg/g).

Najveći sadržaji svih fenolnih spojeva izmjereni su kod sorata 'Chardonnay', 'Graševina' i 'Škrlet', a iznosili su 40 540,03 µg/g, 40 064,75 µg/g odnosno 39 281,21 µg/g. Najmanji maseni udjeli izmjereni su kod sorata 'Maraština' (26 986,38 µg/g) i 'Bogdanuša' (28 387,77 µg/g).

Prosječne temperature između prvog i drugog perioda uzorkovanja bile su u rasponu od 19 °C do 28 °C. Maksimalne temperature za navedeno razdoblje najčešće nisu prelazile 30 °C (Graf 4.1.). Sadržaj fenolnih spojeva nije se značajno mijenjao u odnosu na prethodno razdoblje ni kod sorata s najvišim masenim udjelom fenolnih spojeva, kao ni kod sorata s najnižim sadržajem.

Tablica 5.2. Maseni udjeli fenolnih spojeva u sortama u drugom terminu uzorkovanja

	Hidroksicimetne kiseline	Hidroksibenzojeve kiseline	Flavanoli	Flavan-3-oli
Bogdanuša	4994,13 e	551,38 b	22333,99 d	508,27 e
Debit	4852,21 e	809,25 a	27414,09 abcd	2148,09 bc
Dišeća ranina	6211,92 d	339,99 e	27795,76 abcd	2047,62 bc
Kraljevina	6496,87 c	233,87 f	25709,39 bcd	2081,37 bc
Malvazija istarska	6561,51 c	334,32 e	28246,81 abcd	1729,34 bcd
Maraština	5032,54 e	232,24 g	20972,59 e	749,01 d
Pošip	5991,52 c	28,45 h	24053,47 d	2135,44 a
Škrlet	6640,75 c	541,71 b	29747,49 abc	2351,26 b
Zlatarica vrgorska	6237,65 d	478,88 c	25359,09 cd	1478,79 cd
Žlahtina	8989,93 a	318,61 e	28309,77 abcd	1280,14 cd
Chardonnay	6908,49 b	381,98 d	30925,32 ab	2324,24 b
Graševina	6082,95 d	229,57 f	32401,93 a	1350,30 cd

*srednje vrijednosti označene različitim slovima među sortama razlikuju se na razini p<0,05 korištenjem Duncan's multiple- range testa

**sve brojčane vrijednosti izražene su u µg/g suhog lista

5.1.3. Treći termin uzorkovanja (21. srpnja)

U tablici 5.3. vidljiv je prikaz masenih udjela fenolnih spojeva u sortama u trećem terminu uzorkovanja (21.07.). U ovom terminu uzorkovanja kod sorte 'Bogdanuša' izmjereni su najmanji sadržaji flavanola (18 200,48 µg/g) i flavan-3-ola (424,33 µg/g) u odnosu na preostale termine uzorkovanja i sorte.

Najmanji sadržaj hidroksicimetnih kiselina također je izmjeren kod sorte 'Bogdanuša' (odnosi se samo na ovaj termin), a iznosio je 3517,77 µg/g. Sorta 'Pošip'

imala je najveći maseni udio hidroksicimetnih kiselina (7905,58 μg/g), slijede sorte 'Žlahtina' (7369,13 μg/g) i 'Chardonnay' (6975,58 μg/g) .

Najveći maseni udjeli hidroksibenzojevih kiselina izmjereni su kod sorata 'Debit' (668,25 μg/g), 'Bogdanuša' (521,05 μg/g) i 'Škrlet' (508,98 μg/g). Najmanji sadržaj imala je sorta 'Maraština' (187,52 μg/g).

Sadržaj flavanola bio je u rasponu od 18 200,48 μg/g do 33 097,72 μg/g, pri čemu je najveći sadržaj izmjeren kod sorte 'Graševina'. Sorte koje slijede se nisu značajno razlikovale: 'Chardonnay' (30 160,92 μg/g), 'Žlahtina' (28 442,21 μg/g). Nakon sorte 'Bogdanuša', najmanji sadržaj flavanola utvrđen je kod sorte 'Maraština' i iznosio je 19 469,90 μg/g.

Sorta s najvećim sadržajem flavan-3-ola bila je 'Chardonnay', kod koje je izmjereno 2106,53 μg/g. Slijede sorte 'Škrlet' i 'Malvazija istarska' s 2095,11 μg/g, odnosno 1796,39 μg/g. Najmanji maseni udio, nakon sorte 'Bogdanuša', izmjeren je kod sorte 'Maraština' te je bio 596,06 μg/g.

Sorte 'Graševina' i 'Chardonnay' imale su najveće masene udjele svih fenolnih spojeva u ovom terminu uzorkovanja. Kod sorte 'Graševina' izmjereno je 40 771,12 μg/g, a kod sorte 'Chardonnay' 39 705,24 μg/g. Najmanji sadržaj svih fenolnih spojeva izmjeren je kod sorte 'Bogdanuša' i iznosio je 22 663,64 μg/g, slijedi sorta 'Maraština' (24 966,36 μg/g).

U razdoblju između drugog i trećeg termina uzorkovanja prikupljeni su podaci o UV zračenju. Najviše izmjerene vrijednosti UV zračenja iznosile su 69 846,425 W/m^{2}s i 65 859,28 W/m^{2}s (Graf 4.2.). Prosječna temperatura zraka kod većeg broja dana je bila viša od 25 °C. Maksimalne temperature nekoliko dana prelazile su 35 °C (Graf 4.1.). Sorte s najvišim sadržajem fenolnih spojeva i dalje su zadržavale podjednake masene udjele fenolnih spojeva. Suprotno tome, u ovom terminu uočen je minimalni sadržaj dvije grupe fenolnih spojeva kod sorte 'Bogdanuša'.

Tablica 5.3. Maseni udjeli fenolnih spojeva u sortama u trećem terminu uzorkovanja

	Hidroksicimetne kiseline	**Hidroksibenzojeve kiseline**	**Flavanoli**	**Flavan-3-oli**
Bogdanuša	3517,77 h	521,05 b	18200,48 g	424,34 h
Debit	4515,40 g	668,25 a	22477,95 e	1307,87 e
Dišeća ranina	4592,81 g	371,44 de	21134,13 f	1210,29 e
Kraljevina	6713,68 d	305,95 f	22428,30 e	1616,34 d
Malvazija istarska	5729,30 f	424,14 c	25664,89 d	1766,15 b
Maraština	4712,88 g	187,52 h	19469,90 g	596,06 g
Pošip	7155,34 a	379,59 d	28039,82 c	1215,02 e
Škrlet	5761,36 f	508,98 b	28157,52 c	2095,11 a
Zlatarica vrgorska	5257,99 f	342,40 e	22454,89 c	1490,70 d
Žlahtina	7369,13 b	247,93 g	28442,21 c	1301,81 e
Chardonnay	6975,58 c	462,21 c	30160,92 b	2106,53 a
Graševina	6251,54 e	302,91 f	33097,72 a	1118,95 f

*srednje vrijednosti označene različitim slovima među sortama razlikuju se na razini p<0,05 korištenjem Duncan's multiple- range testa

**sve brojčane vrijednosti izražene su u μg/g suhog lista

5.1.4. Četvrti termin uzorkovanja (14. kolovoza)

Tablica 5.4. prikazuje masene udjele fenolnih spojeva u četvrtom terminu uzorkovanja (14.08.). Podaci za sortu 'Bogdanuša' nisu poznati. U ovom terminu uzorkovanja najveći maseni udjeli hidroksicimetnih kiselina utvrđeni su kod sorata 'Žlahtina' (8136,10 μg/g), 'Pošip' (7718,20 μg/g) i 'Kraljevina' (6541,88 μg/g). Najmanji sadržaj hidroksicimetnih kiselina imala je sorta 'Dišeća ranina' (4931,62 μg/g), slijedi sorta 'Maraština' (4944,86 μg/g).

U ovom terminu izmjeren je najveći sadržaj hidroksibenzojevih kiselina, uspoređujući s ostalim terminima. On je utvrđen kod sorte 'Debit' i iznosio je 1013,62 μg/g. Maseni udio hidroksibenzojevih kiselina ove sorte značajno se razlikovao od ostalih, te je gotovo dvostruko veći od prve sljedeće sorte 'Škrlet' (565,49 μg/g). Najmanji sadržaji hidroksibenzojevih kiselina utvrđeni su kod sorata 'Maraština' i 'Graševina', a iznosili su 144,98 μg/g, odnosno 261,49 μg/g.

Sadržaji flavanola bili su u rasponu od 19 522,36 μg/g (izmjereno kod sorte 'Maraština') do 34 766,83 μg/g (izmjereno kod sorte 'Zlatarica vrgorska'). Sorta 'Maraština' imala je značajno manji maseni udio flavanola u odnosu na ostale sorte. Prva sljedeća sorta, 'Dišeća ranina', imala je izmjeren maseni udio 26 286,93 μg/g (> 6000 μg/g u odnosu na sortu 'Maraština'). Sorta 'Zlatarica vrgorska' imala je ukupno najveći sadržaj flavanola od svih sorata, tijekom svih termina uzorkovanja. Nešto manji sadržaj imala je sorta 'Pošip' (34 692,32 μg/g).

Najviši sadržaj flavan-3-ola utvrđen je kod sorte 'Debit' (1884,60 μg/g) i značajno je veći u odnosu na prvu sljedeću sortu 'Malvazija istarska' (2365,67 μg/g). Sorte s najmanjim sadržajem flavan-3-ola bile su 'Maraština' (1055,97 μg/g) i 'Pošip' (1250,33 μg/g). Među navedenim sortama nema značajne razlike u masenim udjelima flavan-3-ola.

U ovom terminu uzorkovanja najmanji sadržaj svih fenolnih spojeva bio je izmjeren kod sorte 'Maraština' i iznosio je 25 668,17 μg/g. Navedena sorta imala je značajno manji maseni udio fenolnih spojeva u odnosu na ostale sorte. Sljedeća sorta s najmanjim masenim udjelom bila je 'Dišeća ranina', čiji je maseni udio svih fenolnih spojeva iznosio 32 967,17 μg/g. Sorte s najvećim sadržajem fenolnih spojeva u ovom terminu uzorkovanja bile su 'Pošip' (43 399,92 μg/g) i 'Žlahtina' (43 129,56 μg/g).

U periodu između trećeg i četvrtog uzorkovanja izmjereni su visoki intenziteti UV zračenja, koji su trajali tijekom cijelog navedenog perioda. Maksimalan zabilježen iznos bio je 70 196,38 W/m^2s (Graf 4.2.). U ovom razdoblju zabilježen je manji broj dana s maksimalnom temperaturom blizu 35 °C, dok je prosječna dnevna temperatura zraka iznosila 25 °C (Graf 4.1.). U četvrtom terminu uzorkovanja čak dvije sorte imale su maksimalne iznose određenih fenolnih spojeva. Sukladno tome, moguće je zaključiti da su sorte dobro prilagođene jer su pri povećanom UV zračenju sintetizirale više fenolnih spojeva, koji pomažu u zaštiti biljke od navedenog.

Tablica 5.4. Maseni udjeli fenolnih spojeva u sortama u četvrtom terminu uzorkovanja

	Hidroksicimetne kiseline	Hidroksibenzojeve kiseline	Flavanoli	Flavan-3-oli
Bogdanuša				
Debit	5250,65 d	1013,62 a	28422,95 bc	2884,6 a
Dišeća ranina	4931,62 e	330,76 d	26286,93 c	1417,86 d
Kraljevina	6541,88 b	327,60 d	28457,11 bc	2097,07 c
Malvazija istarska	5463,79 cd	449,38 c	28706,79 bc	2355,32 abc
Maraština	4944,86 e	144,98 f	19522,36 d	1055,97 d
Pošip	7015,74 a	441,53 c	34692,32 a	1250,33 d
Škrlet	5300,11 d	565,49 b	26856,06 bc	2148,47 bc
Zlatarica vrgorska	5865,04 c	444,58 c	34766,83 a	2053,11 c
Žlahtina	8136,10 a	343,94 d	29469,77 b	2115,57 c
Chardonnay	5518,66 cd	301,87 d	27461,30 bc	2628,54 ab
Graševina	5427,76 cd	261,49 e	32923,27 a	1489,89 d

*srednje vrijednosti označene različitim slovima među sortama razlikuju se na razini p<0,05 korištenjem Duncan's multiple- range testa

**sve brojčane vrijednosti izražene su u µg/g suhog lista

5.1.5. Peti termin uzorkovanja (05. rujna)

Posljednje uzorkovanje bilo je 05. rujna, a u tablici 5.5. prikazani su dobiveni rezultati. Među masenim udjelima hidroksicimetnih kiselina u sortama nije bilo značajnih razlika. Najveći sadržaji utvrđeni su kod sorata 'Žlahtina' (6599,01 µg/g), 'Pošip' (6499,97 µg/g) i 'Zlatarica vrgorska' (6252,29 µg/g), dok su najmanji sadržaji utvrđeni kod sorata 'Maraština' (3468,64 µg/g) i 'Bogdanuša' (3539,76 µg/g). Navedeni maseni udio kod sorte 'Maraština' ujedno je bio i najmanji maseni udio hidroksicimetnih kiselina u svim sortama tijekom svih termina uzorkovanja.

Sadržaj hidroksibenzojevih kiselina bio je u rasponu od 184,61 µg/g do 733,59 µg/g. Najmanji sadržaj utvrđen je kod sorte 'Maraština', slijedi sorta 'Graševina' (198,95 µg/g). Najveći maseni udio hidroksibenzojevih kiselina izmjeren je kod sorte 'Debit', nešto manji imala je 'Bogdanuša' (665,68 µg/g), a značajno manji sorta 'Zlatarica vrgorska' (347,18 µg/g) .

Sorta 'Debit' imala je najveći sadržaj flavanola u ovom terminu uzorkovanja (33 111,89 µg/g). Slijede sorte 'Maraština' (31 881,92 µg/g) i 'Škrlet' (31 148,42 µg/g). Najmanji sadržaji flavanola utvrđeni su kod sorata 'Dišeća ranina' i 'Bogdanuša', a iznosili su 18 671,71 µg/g, odnosno 19 039,74 µg/g.

Sadržaji flavan-3-ola u ovom terminu uzrokovanja bili su vrlo raznoliki. Najmanji sadržaj ove skupine spojeva utvrđen je kod sorte 'Bogdanuša' u iznosu od 558,26 µg/g, slijede sorta 'Maraština', čiji je maseni udio bio gotovo dvostruko veći 947,26 µg/g. Značajnija varijabilnost bila je prisutna između sorata s najvećim sadržajem flavan-3-ola. Kod sorte 'Debit' izmjereno je 3526,07 µg/g, dok je kod sorte 'Malvazija istarska' izmjereno 2552,91 µg/g.

U posljednjem terminu uzorkovanja najveći sadržaj svih fenolnih spojeva izmjeren je kod sorte 'Debit' (42 189,04 µg/g), slijedi sorta 'Škrlet' (38 978,50 µg/g). Najmanji maseni udjeli izmjereni su kod sorata 'Bogdanuša' i 'Dišeća ranina' te je iznosio 23 803,44 µg/g, odnosno 24 702,90 µg/g.

U razdoblju između posljednja dva termina uzorkovanja dolazi do značajnog smanjenja UV zračenja. Maksimalan iznos UV zračenja navedenog perioda bio je 36 788,09 W/m^{2}s. Također, dolazi i do smanjenja fotosintetske aktivnosti i do starenja samog lista. Navedene promjene uzrokovale su smanjenu sintezu fenolnih spojeva, to jest smanjenje njihovog sadržaja u listovima.

Tablica 5.5. Maseni udjeli fenolnih spojeva u sortama u petom terminu uzorkovanja

	Hidroksicimetne kiseline	**Hidroksibenzojeve kiseline**	**Flavanoli**	**Flavan-3-oli**
Bogdanuša	3539,76	665,68 b	19039,74	558,26
Debit	4817,49 d	733,59 a	33111,89 a	3526,07 a
Dišeća ranina	4205,30	323,84 c	18671,71	1502,05 cd
Kraljevina	4594,05 e	251,71 de	20698,31	1221,77 cde
Malvazija istarska	4756,27 d	295,74 cde	29505,84 c	2552,91 b
Maraština	3468,64	184,61	31881,92 b	947,26 e
Pošip	5899,41 a	268,77 de	28096,33 e	1007,59 e
Škrlet	5066,99 c	299,27 cd	31148,42 b	2463,82 b
Zlatarica vrgorska	6252,29 b	347,18 c	28302,81 de	1626,52 c
Žlahtina	6599,01 a	235,95 e	21232,65	1359,05 cde
Chardonnay	3881,19	327,90 c	26456,32	2186,89 b
Graševina	4483,41 e	198,95	29038,9 cd	1067,57 de

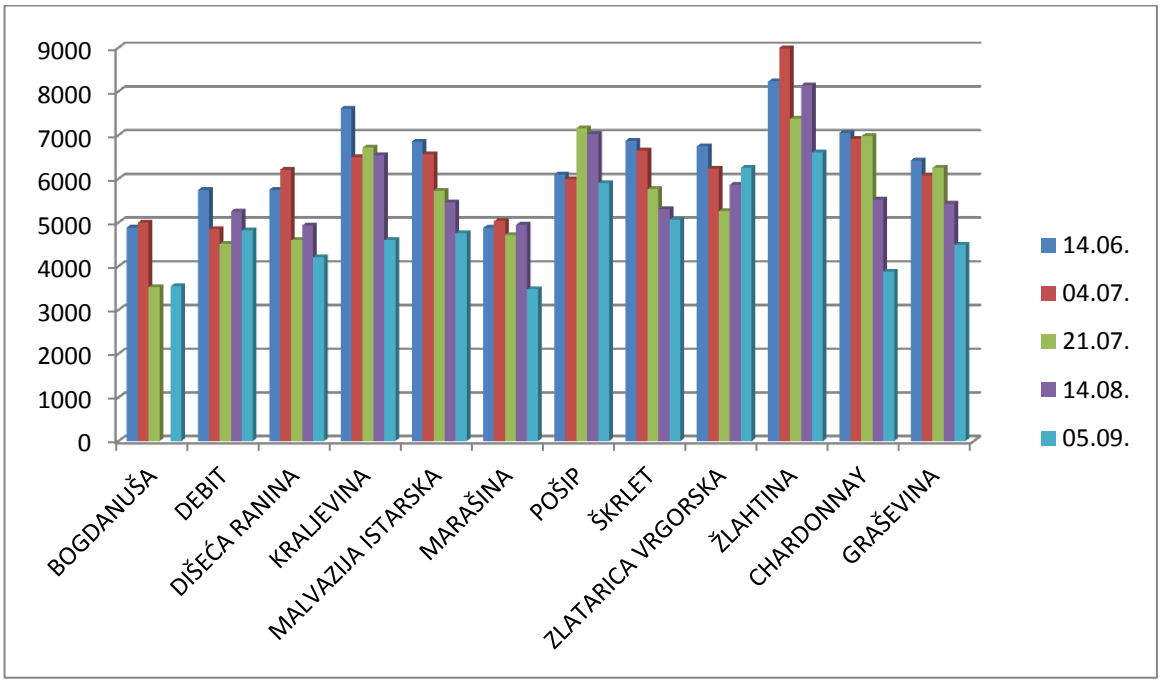
*srednje vrijednosti označene različitim slovima među sortama razlikuju se na razini p<0,05 korištenjem Duncan's multiple- range testa

**sve brojčane vrijednosti izražene su u µg/g suhog lista

Analizom prethodno navedenih podataka moguće je utvrditi da neovisno o terminu uzorkovanja sorta 'Bogdanuša' ima značajno manji sadržaj fenolnih spojeva u odnosu na ostale sorte. Nizak sadržaj fenolnih spojeva u prva četiri termina uzorkovanja uočen je i kod sorte 'Maraština'. Sorta 'Dišeća ranina' također je imala vrlo male sadržaje fenolnih spojeva u posljednja dva termina uzorkovanja. Sorte kod kojih je utvrđen najveći sadržaj fenolnih spojeva u prva tri termina uzorkovanja su 'Chardonnay' i 'Graševina', dok je kod sorte 'Debit' velik sadržaj fenolnih spojeva utvrđen prilikom prvog i posljednjeg uzorkovanja.

5.2. Promjene sadržaja fenolnih spojeva u listovima ispitanih sorata po terminima uzorkovanja

5.2.1. Promjene sadržaja hidroksicimetnih kiselina



Graf 5.1. Promjene sadržaja hidroksicimetnih kiselina u sortama

Analizom podataka (Graf 5.1.) utvrđena je velika varijabilnost u sadržaju hidroksicimetnih kiselina među pojedinim sortama. Utvrđena je i razlika u sadržaju navedenih spojeva tijekom pojedinih termina uzorkovanja. U prvom terminu uzorkovanja (14.06.) utvrđen je veliki sadržaj hidroksicimetnih kiselina kod većine sorata. Kod sorata 'Debit', 'Kraljevina', 'Malvazija istarska', 'Škrlet', 'Zlatarica vrgorska', 'Chardonnay' i 'Graševina' to je ujedno bio i najveći izmjereni sadržaj. Uspoređujući sa ostalim terminima uzorkovanja, znatno veći sadržaj hidroksicimetnih kiselina u ovom terminu vidljiv je kod sorata 'Debit' i 'Kraljevina'.

Sorte 'Bogdanuša', 'Dišeća ranina', 'Maraština' i 'Žlahtina' su u drugom terminu uzorkovanja (04.07.) imale najveći sadržaj hidroksicimetnih kiselina. U tom terminu izmjeren je i najviši sadržaj hidroksicimetnih kiselina tijekom cijelog perioda uzorkovanja kod sorte 'Žlahtina' (8989,93 µg/g). Nagli pad sadržaja ispitanih spojeva u ovom terminu pojavljuje se kod sorata 'Debit' i 'Kraljevina', dok se blagi pad javlja kod sorata 'Malvazija istarska', 'Pošip', 'Škrlet', 'Zlatarica vrgorska', 'Chardonnay' i 'Graševina'.

U trećem terminu uzorkovanja (21.07.) kod većine sorata dolazi do naglog pada sadržaja hidroksicimetnih kiselina. Kod sorata 'Bogdanuša', 'Debit' i 'Zlatarica vrgorska' to je ujedno i najmanji izmjeren sadržaj navedenih spojeva. Kod sorata 'Kraljevina', 'Chardonnay' i 'Graševina' dolazi do blagog povećanja u sadržaju hidroksicimetnih kiselina u odnosu na prethodno razdoblje. Naglo povećanje sadržaja

hidroksicimetnih kiselina javlja se jedino kod sorte 'Pošip'. Toj sorti ovo je ujedno i najveći izmjeren sadržaj navedenih spojeva tijekom svih termina uzorkovanja (7155,34 µg/g).

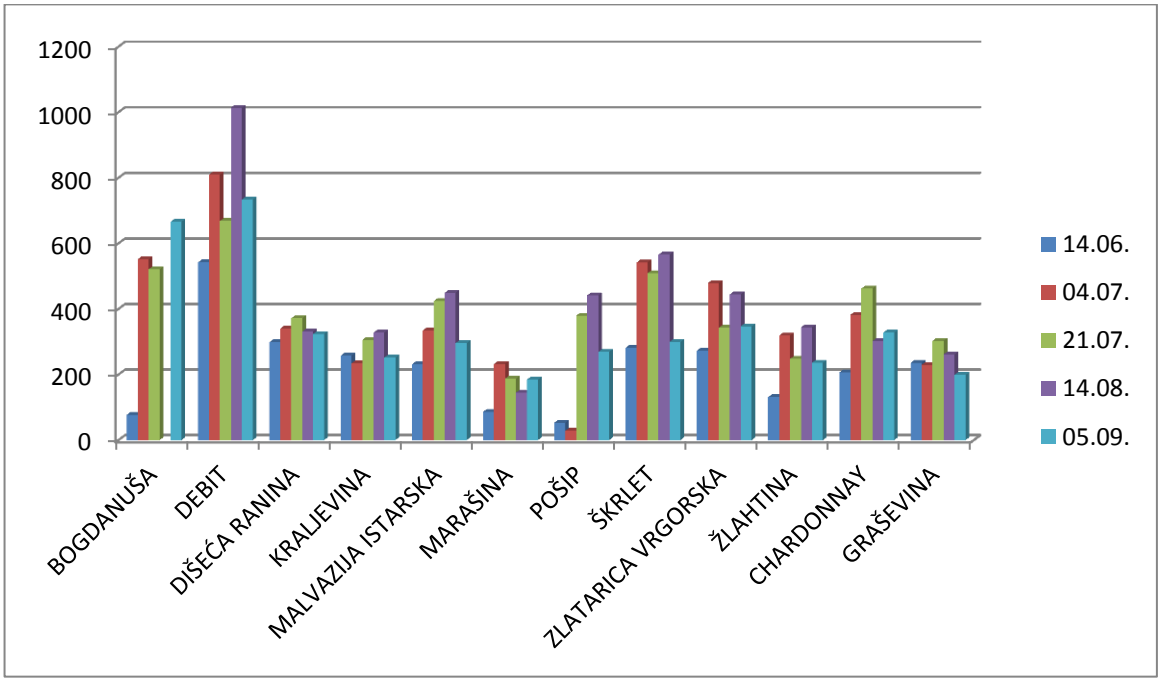
Četvrti termin uzorkovanja bio je 14. kolovoza. Kod sorata 'Debit', 'Dišeća ranina', 'Maraština' i 'Zlatarica vrgorska' utvrđen je blagi porast sadržaja hidroksicimetnih kiselina u odnosu na prethodno razdoblje. Kod sorte 'Žlahtina' porast je nešto izraženiji. Sorte 'Kraljevina', 'Malvazija istarska', 'Pošip' i 'Škrlet' bilježe blagi pad sadržaja ispitivanih spojeva. Osobito nagli pad sadržaja hidroksicimetnih kiselina utvrđen je kod sorata 'Chardonnay' i 'Graševina'. Varijabilnost u sadržaju navedenih spojeva kod sorata 'Chardonnay' i 'Graševina' je u prethodnim terminima uzorkovanja bila vrlo mala. Podaci za sortu 'Bogdanuša' za ovaj termin uzorkovanja nisu poznati.

U posljednjem terminu uzorkovanja (05.09.) kod sorata 'Kraljevina', 'Maraština', 'Pošip', 'Žlahtina', 'Chardonnay' i 'Graševina' vidljiv je nagli pad (>1100 µg/g) sadržaja hidroksicimetnih kiselina uspoređujući s prethodnim terminom uzorkovanja. Kod sorata 'Debit', 'Dišeća ranina', 'Malvazija istarska' i 'Škrlet' taj pad je nešto blaži. Jedina sorta kod koje je zabilježen porast u sadržaju hidroksicimetnih kiselina u odnosu na prethodne termine je 'Zlatarica vrgorska'. Vrijednost sadržaja hidroksicimetnih kiselina kod sorte 'Bogdanuša' slična je onoj u trećem razdoblju uzorkovanja (21.07.).

Većina sorata ima izmjerene najveće sadržaje hidroksicimetnih kiselina u prvom (sedam sorata) ili drugom (tri sorte) terminu uzorkovanja. S vremenom se njihov sadržaj smanjuje pa je kod devet sorata vidljiv najmanji sadržaj hidroksicimetnih kiselina u posljednjem terminu uzorkovanja. 'Pošip' je jedina sorta kod koje su najveći sadržaji zabilježeni u srednjim terminima uzorkovanja (21.07. i 14.08.).

Općenito gledajući, manji sadržaji hidroksicimetnih kiselina tijekom cijelog perioda uzorkovanja zabilježeni su kod sorata 'Bogdanuša' i 'Maraština'. Sorte 'Kraljevina', 'Malvazija istarska', 'Pošip', 'Škrlet', 'Zlatarica vrgorska', 'Chardonnay' i 'Graševina' u minimalno dva termina imale su sadržaj hidroksicimetnih kiselina veći od 6000 µg/g. Sorta 'Žlahtina' je u tri termina imala izmjerene sadržaje veće od 8000 µg/g.

5.2.2. Promjene sadržaja hidroksibenzojevih kiselina



Graf 5.2. Promjene sadržaja hidroksibenzojevih kiselina u sortama

Utvrđena je značajna varijabilnost u sadržaju hidroksibenzojevih kiselina po pojedinim terminima uzorkovanja (Graf 5.2.). Također, utvrđena je i varijabilnost masenog udjela hidroksibenzojevih kiselina kod pojedinih sorata tijekom promatranog perioda. Kod većine sorata (osim 'Kraljevine', 'Pošipa' i 'Graševine') zabilježen je najmanji sadržaj hidroksibenzojevih kiselina u prvom terminu uzorkovanja (14.06.). Umjereni porast u sadržaju pojavio se kod sorata 'Dišeća ranina' i 'Malvazija istarska', dok se nagli porast sadržaja hidroksibenzojevih kiselina pojavio kod sorata 'Bogdanuša', 'Debit', 'Maraština', 'Škrlet', 'Zlatarica vrgorska', 'Žlahtina' i 'Chardonnay'.

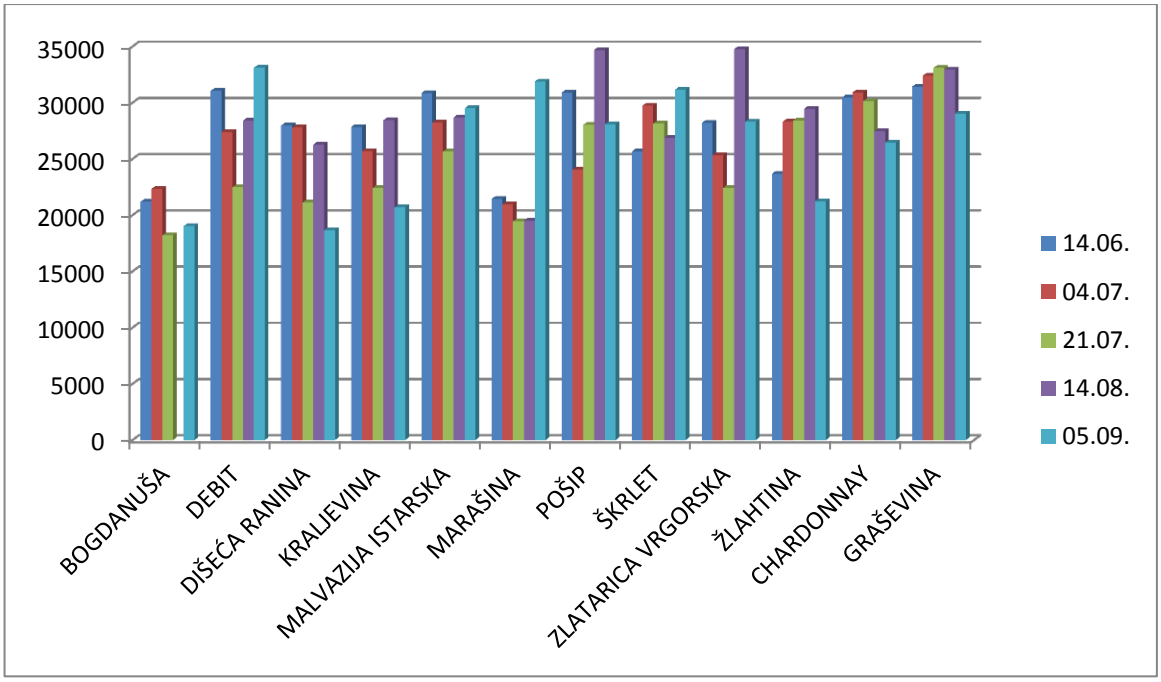
U trećem terminu uzorkovanja (21.07.) sadržaj navedenih spojeva nije se drastično promijenio. Kod sorata 'Bogdanuša', 'Debit', 'Maraština', 'Škrlet', 'Zlatarica vrgorska' i 'Žlahtina' utvrđen je blagi pad, dok je kod ostalih sorata (izuzevši sortu 'Pošip') utvrđen blagi porast sadržaja hidroksibenzojevih kiselina. Kod sorte 'Pošip' se u ovom terminu uzorkovanja (21.07.) javlja nagli porast pa se sadržaj hidroksibenzojevih kiselina s 28,45 µg/g popeo na 379,59 µg/g. U odnosu na cijeli period uzorkovanja, ovom terminu zabilježen je najveći sadržaj hidroksibenzojevih kiselina za sorte 'Dišeća ranina', 'Chardonnay' i 'Graševina'. Kod svih ostalih sorata (izuzevši 'Bogdanušu' i 'Maraštinu') utvrđen je najveći sadržaj tih spojeva u četvrtom terminu uzorkovanja (14.08.). Podaci za sortu 'Bogdanuša' za navedeni termin nisu poznati. Sorta 'Maraština' je u ovom terminu imala niži sadržaj hidroksibenzojevih kiselina u odnosu na sadržaj u ostalim terminima. Najveći sadržaj tih spojeva sorta 'Maraština' imala je u drugom terminu uzorkovanja (04.07.).

Posljednje uzorkovanje obavljeno je 05. rujna. U ovom terminu se kod većine sorata vidi blagi pad u sadržaju hidroksibenzojevih kiselina. Osim sorata 'Maraština' i

'Bogdanuša', iznimka je ovoga puta i sorta 'Chardonnay'. Zbog nedostatka podataka od prethodnog termina, nemoguće je utvrditi u kojem bi se smjeru kretao sadržaj hidroksibenzojevih kiselina kod sorte 'Bogdanuša'. Kod sorata 'Maraština' i 'Chardonnay' vidljiv je blagi porast sadržaja prethodno navedenih spojeva.

Najveći sadržaj hidroksibenzojevih kiselina u svim terminima uzorkovanja zabilježen je kod sorte 'Debit'. Najviša vrijednost izmjerena je u četvrtom terminu uzorkovanja (14.08.), a iznosila je 1013,62 µg/g. Veći sadržaj zabilježen je kod sorata 'Bogdanuša' (do 700 µg/g), 'Malvazija istarska', 'Škrlet' i 'Zlatarica vrgorska' (u barem dva termina zabilježen je sadržaj hidroksibenzojevih kiselina već od 400 µg/g). Najmanji sadržaj u odnosu na ostale sorte zabilježen je kod sorte 'Maraština', dok je najmanja izmjerena vrijednost tijekom cijelog perioda zabilježena kod sorte 'Pošip' (28,45 µg/g u drugom terminu uzorkovanja).

5.2.3. Promjene sadržaja flavanola



Graf 5.3. Promjene u sadržaju flavanola u sortama

Sadržaj flavanola u prvom terminu uzorkovanja je povećan u odnosu na ostale termine, kod većine sorata (graf 5.3.). Kod sorata 'Dišeća ranina' i 'Malvazija istarska' to je ujedno bio i najveći izmjereni sadržaj flavanola. Uspoređujući s ostalim terminima, kod sorata 'Škrlet' i 'Žlahtina' sadržaj ove skupine spojeva u ovom terminu nešto je manji (kod sorte 'Škrlet' najmanji).

Drugi termin uzorkovanja bio je 04. srpnja. Kod sorata 'Bogdanuša', 'Chardonnay' i 'Graševina' vidi se blagi porast sadržaja flavanola. Sortama 'Bogdanuša i 'Chardonnay' to je ujedno i najviši izmjeren sadržaj flavanola. Značajno veći porast sadržaja flavanola, u drugom terminu uzorkovanja, vidljiv je kod sorata 'Škrlet' i 'Žlahtina'. Sadržaj flavanola blago se smanjuje kod sorata 'Dišeća ranina' 'Kraljevina',

'Malvazija istarska', 'Maraština' i 'Zlatarica vrgorska'. Nagli pad sadržaja flavanola vidljiv je kod sorata 'Debit' i 'Pošip'. Sorta 'Pošip' je jedina sorta koja u ovom terminu imala izmjeren najniži sadržaj flavanola.

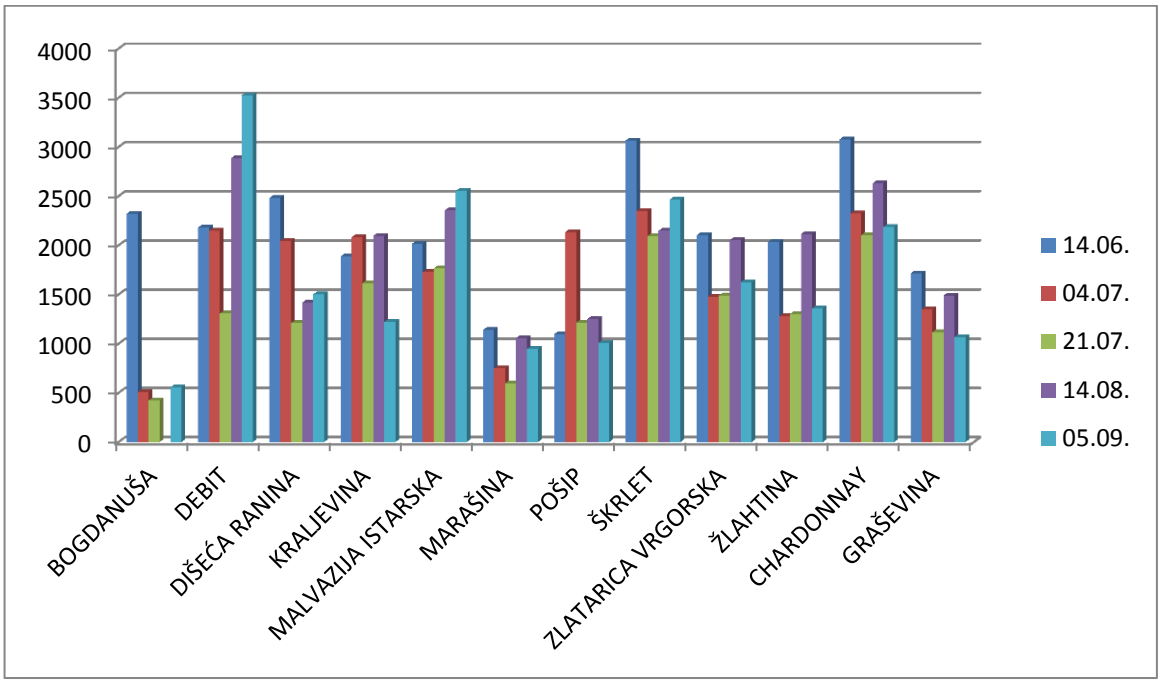
Sorte 'Bogdanuša', 'Debit', 'Malvazija istarska', 'Maraština' i 'Zlatarica vrgorska' u trećem terminu uzorkovanja (21.07.) imale su izmjeren najmanji sadržaj flavanola. Nizak sadržaj flavanola u odnosu na ostale termine vidljiv je i kod sorata 'Dišeća ranina' i 'Kraljevina'. Kod sorata 'Škrlet' i 'Chardonnay' sadržaj flavanola nešto je manji u odnosu na prethodni termin uzorkovanja, dok je kod sorata 'Pošip', 'Žlahtina' i 'Graševina' sadržaj flavanola nešto veći (osobito kod sorte 'Pošip'). Sorti 'Graševina' u ovom terminu izmjeren je najveći sadržaj flavanola.

U četvrtom terminu uzorkovanja (14.08.) došlo je do naglog porasta sadržaja flavanola kod brojnih sorata ('Debit', 'Dišeća ranina', 'Kraljevina', 'Malvazija istarska', 'Pošip', 'Zlatarica vrgorska'). U ovom slučaju posebno se ističu sorte 'Pošip' i 'Zlatarica vrgorska'. To su ujedno i sorte s najvećim izmjerenim sadržajima flavanola kroz cijelo razdoblje mjerenja. Blagi porast sadržaja flavanola dogodio se kod sorata 'Maraština' i 'Žlahtina' (kod sorte 'Maraština' sadržaj je gotovo nepromijenjen). Kod sorata 'Škrlet' i 'Chardonnay' vidljiv je blagi pad sadržaja flavanola, dok je kod sorte 'Graševina' sadržaj flavanola ostao gotovo isti. Za sortu 'Bogdanuša' nisu poznati podaci za navedeni termin uzorkovanja.

U posljednjem terminu uzorkovanja (05.09.) kod sorata 'Debit', 'Maraština' i 'Škrlet' zabilježene su maksimalne vrijednosti u sadržaju flavanola. Kod sorte 'Maraština' vidljiv je osobito nagli porast. Porast sadržaja flavanola u odnosu na prethodni termin uzorkovanja, vidljiv je i kod sorte 'Malvazija istarska'. Sorta 'Bogdanuša' u ovom terminu uzorkovanja imala je sadržaj flavanola sličan onome u trećem terminu uzorkovanja (21.07.). Najmanje vrijednosti sadržaja flavanola u ovom terminu imale su sorte 'Dišeća ranina', 'Kraljevina', 'Žlahtina', 'Chardonnay' i 'Graševina'. Pad sadržaja flavanola u odnosu na prethodno razdoblje vidljiv je i kod sorata 'Pošip' i 'Zlatarica vrgorska'.

Najmanje sadržaje flavanola u promatranom razdoblju imale su sorte 'Bogdanuša' i 'Maraština'. Iznimka je posljednji termin uzorkovanja kod kojeg je uočen nagli porast sadržaja flavanola kod sorte 'Maraština'. Ostale ispitane sorte pokazale su veliki sadržaj flavanola u listovima. Kod sorata 'Chardonnay' i 'Graševina' sadržaj flavanola bio je stalan kroz cijelo razdoblje mjerenja i značajno se smanjio tek u posljednjim terminima uzorkovanja.

5.2.4. Promjene sadržaja flavan-3-ola



Graf 5.4. Promjene u sadržaju flavan-3-ola u sortama

Uspoređujući termine uzorkovanja i ispitane sorte, utvrđena je velika varijabilnost u sadržaju flavan-3-ola (Graf 5.4.). U prvom terminu uzorkovanja (14.06.) sorte 'Bogdanuša', 'Dišeća ranina', 'Maraština', 'Škrlet', 'Zlatarica vrgorska' 'Chardonnay' i 'Graševina' imale su maksimalne zabilježene vrijednosti flavan-3-ola.

U drugom terminu uzorkovanja (04.07.) sadržaj flavan-3-ola kod većine sorata naglo pada. Osobito nagli pad uočen je kod sorata 'Bogdanuša', 'Škrlet', 'Zlatarica vrgorska', 'Žlahtina' i 'Chardonnay'. Kod sorata 'Dišeća ranina', 'Malvazija istarska', 'Maraština' i 'Graševina' uočen je nešto blaži pad sadržaja flavan-3-ola, dok je kod sorte 'Debit' gotovo nepromijenjen. Sortama 'Malvazija istarska', 'Zlatarica vrgorska' i 'Žlahtina' ovo je ujedno bio i najmanji izmjeren sadržaj flavan-3-ola. Blagi porast vidljiv je kod sorte 'Kraljevina', a nagli porast kod sorte 'Pošip' koja je u ovom terminu uzorkovanja imala maksimalan sadržaj flavan-3-ola.

Sadržaj flavan-3-ola blago je padao u trećem terminu uzorkovanja (21.07.) kod sorata 'Bogdanuša', 'Maraština', 'Škrlet', 'Chardonnay' i 'Graševina'. Nagli pad vidljiv je kod sorata 'Debit', 'Dišeća ranina', 'Kraljevina' i 'Pošip'. Sortama 'Bogdanuša', 'Debit', 'Dišeća ranina', 'Maraština', 'Škrlet' i 'Chardonnay' ovo je termin u kojem su imale najmanje izmjerene vrijednosti flavan-3-ola. Kod sorata 'Malvazija istarska', 'Zlatarica vrgorska' i 'Žlahtina' sadržaj flavan-3-ola je ostao gotovo isti kao prilikom prethodnog uzorkovanja.

U četvrtom terminu uzorkovanja (14.08.) dolazi do porasta sadržaja flavan-3-ola kod svih sorata. Osobito nagli porast vidljiv je kod sorata 'Debit', 'Malvazija istarska', 'Maraština', 'Žlahtina' i 'Chardonnay' (>500 µg/g). Sorte 'Kraljevina' i

'Žlahtina' u ovom terminu imale su maksimalnu izmjerenu vrijednost flavan-3-ola. Podaci za sortu 'Bogdanuša' nisu poznati za ovaj termin uzorkovanja.

Promjena sadržaja flavan-3-ola u posljednjem terminu uzorkovanja (05.09.) vrlo je različita. Kod sorata 'Debit', 'Dišeća ranina', 'Malvazija istarska' i 'Škrlet' došlo je do povećanja sadržaja flavan-3-ola. Osobito nagli porast dogodio se kod sorte 'Debit' (>600 µg/g). Također, sorta 'Debit' u ovom je terminu imala maksimalnu izmjerenu vrijednost flavan-3-ola, kao i sorta 'Malvazija istarska'. Kod preostalih sorata: 'Kraljevina', 'Maraština', 'Pošip', 'Zlatarica vrgorska', 'Chardonnay' i 'Graševina' došlo je do pada sadržaja flavan-3-ola. Kod sorata 'Kraljevina' i 'Žlahtina' pad je vrlo izražen. Sorte 'Kraljevina', 'Pošip' i 'Graševina' imale su najmanju izmjerenu vrijednost flavan-3-ola upravo u ovom terminu uzorkovanja.

Najniži sadržaj flavan-3-ola izmjeren je kod sorte 'Bogdanuša' u trećem terminu uzorkovanja (21.07.), a iznosio je 424,34 µg/g. Navedena sorta pokazala je vrlo niske vrijednosti sadržaje flavan-3-ola, osim pri prvom uzorkovanju. Sorte s relativno malim sadržajem flavan-3-ola su 'Maraština', 'Pošip' i 'Graševina' (iznimka je drugi termin uzorkovanja kod sorte 'Pošip'). Sorte s velikim sadržajem flavan-3-ola su 'Debit', 'Škrlet' i 'Chardonnay', a najviša vrijednost izmjerena je kod sorte 'Debit' u posljednjem terminu uzorkovanja (05.09.) i iznosila je 3526,07 µg/g.

6. Zaključak

Na temelju istraživanja provedenog tijekom 2017. godine o promjenama u sastavu i sadržaju fenolnih spojeva (hidroksicimetne kiseline, hidroksibenzojeve kiseline, flavanoli i flavan-3-oli) u listovima sorata 'Bogdanuša', 'Debit', 'Dišeća ranina', 'Kraljevina', 'Malvazija istarska', 'Maraština', 'Pošip', 'Škrlet', 'Zlatarica vrgorska', 'Chardonnay' i 'Graševina' mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Postoje značajne razlike u masenim udjelima fenolnih spojeva između sorata po pojedinim terminima uzorkovanja
2. Postoje značajne razlike u masenim udjelima fenolnih spojeva unutar iste sorte tijekom različitih termina uzorkovanja
3. Sadržaj fenolnih spojeva ovisi o okolišnim uvjetima (UV zračenje, temperatura zraka)
4. Najzastupljenija grupa ispitivanih fenolnih spojeva su flavanoli, slijede ih hidroksicimetne kiseline, flavan-3-oli te hidroksibenzojeve kiseline
5. Najzastupljeniji flavanoli su kvercetin-3-*O*-glukozid i rutin. kemferol-3-*O*-glukonorid je najmanje zastupljen od svih flavanola, a kod nekih sorata nije ni detektiran
6. Najzastupljenija hidroksicimetna kiselina je kaftarinska kiselina, dok kutarinska, ferulinska i sinapinska kiselina kod nekih sorata nisu ni pronađene
7. Najzastupljenija hidroksibenzojeva kiselina je vanilijska, dok je siringinska pronađena samo kod nekih sorata
8. Od flavan-3-ola najzastupljeniji su procijanidin B2, procijanidin B1 i epigalokatehin. Epikatehin-galat i epikatehin nisu prisutni u svim sortama

7. Popis literature

1. Andabaka, Ž., (2015): Ampelografska evaluacija autohtonih Dalmatinskih sorata vinove loze (*Vitis vinifera* L.). Doktorski rad, Agronomski fakultet u Zagrebu.
2. Doshi, p., Adsule, P., banarjee, K. (2006) Phenolic composition and antioxidant activity in grapevine parts and berries (*Vitis vinifera L*.) cv. Kishmish Chornyi (Sharad Seedless) during maturation. Interntaional journal of Food Science and Technology 41, 1-9.
3. Downey, M.O., Dokoozlian N.K., Krstic M.P., (2006): Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. American Journal of Enology and Viticulture 57(3):257–268.
4. Gavranić, M., (2015): Mikrovalna ekstrakcija polifenolnih spojeva iz kožice grožđa. Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu.
5. Griesser, M., Weingart, G., Schoedl-Hummel, K., Neumann,N., Becker, M., varmuza, K., liebner, F., Schuhmacher, R., Forneck, A. (2015) Sever drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir, Plant Physiology and Biochemistry 88:17-26.
6. Hmamouchi, M., Es-Safi, N., Lahrichi, M., Fruchier, A., Essassi, E.M. (1996) Flavones and Flavonols in Leaves of some Moroccan *Vitis vinifera* Cultivars. American Jorunal of Enology and Viticulture,47:
7. Kaštelan-Macan M., (2003): Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, str. 79-83.
8. Keller, M., (2010): Botany and Anatomy. In The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology; Second Edition; Academic Press: San Diego, CA.
9. Maletić, E., Karoglan Kontić J., Pejić, I. (2008). Vinova loza – ampelografija, ekologija, oplemenjivanje. Školska knjiga, Zagreb
10. Mirošević, N., Karoglan-Kontić, J., (2008): Vinogradarstvo. udžbenik Sveučilišta u Zagrebu, Nakladni zavod Globus
11. Owens C.L., Hancock F. J. (2010.), Temperate fruit crop breeding, Springer Science+Business Media B.V., 197-235.
12. Schoedl, K., Schuhmacher, R., Forneck, A. (2013) Correlating physiological parameters with biomarkers for UV-B stress indicators in leaves of grapevine cultivars Pinot noir and Riesling. Journal of Agricultural Science, 151, 198-200.
13. Tomaz, I., (2016): Optimiranje priprave uzoraka za analizu polifenolnih spojeva u kožici grožđa tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.
14. Tomaz, I., Štambuk, P., Andabaka, Ž., Preiner, D., Stupić, D., Maletić, E., Karoglan Kontić, J., Ašperger, D., (2017): The Polyphenolic Profile of Grapes; Grapes: Polyphenolic Composition, Antioxidant Characteristics and Health

Benefits / Sandra Thomas (ur.). New York: Nova Science Publishers, Inc., str. 1-70.
15. Žarak M., (2018.): Promjene sastava i sadržaja polifenolnih spojeva tijekom dozrijevanja grožđa crnih sorata vinove loze. Diplomski rad, Agronomski fakultet u Zagrebu.
16. Weber, B., Hoesch, L., rast, D.M. (1995) Protocatechualdehyde and other phenols as cell wall components of grapevine leaves, Phytochemistry, 40:433-437.
17. http://www.agr.unizg.hr/hr/category/poku%C5%A1ali%C5%A1te_jazbina/60; pristupljeno: 30.04.2019.
18. apprrr.hr 2018 https://bit.ly/2NG9uhn; pristupljeno: 21.06.2019.

Životopis

Iva Ivančić rođena je 10. siječnja 1994. godine u Zagrebu. U Jastrebarskom završava osnovnu školu Ljubo Babić te opću gimnaziju u Srednjoj školi Jastrebarsko. Nakon toga 2012. godine upisuje preddiplomski smjer Ekološka poljoprivreda na Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. U srpnju 2016. stječe akademski naziv Sveučilišne prvostupnice Inženjerke Ekološke poljoprivrede obranom završnog rada na temu *Oplemenjivanje vinove loze na otpornost prema gljivičnim bolestima*. Školovanje nastavlja 2016. Godine na diplomskom studiju Hortikultura usmjerenje Vinogradarstvo i vinarstvo. Tijekom studiranja aktivno sudjeluje u izvannastavnim aktivnostima poput Ampelografske grupe i Istraživačke grupe za analizu grožđa i vina.